Etablierung ultrasensitiver generischer Nukleinsäuretestverfahren zum Nachweis hochpathogener Mikroorganismen

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Kati Schröder

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzende: Prof. Dr. V. Meyer
Gutachter: Prof. Dr. R. Lauster
Gutachter: PD Dr. A. Nitsche
Gutachter: Prof. Dr. J. Kurreck

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 22. Juni 2012

Berlin 2012
D83

Take a method and try.

If it fails, admit it frankly, and try another.

But by all means, try something.

Franklin D. Roosevelt

Zusammenfassung

In der Diagnostik und Detektion von hochpathogenen Mikroorganismen bilden molekularbiologische, nukleinsäurebasierte Methoden, wie die (*real-time*) PCR eine tragende Säule. In dieser Arbeit wurden sowohl die Aufbereitung von Erreger-Nukleinsäuren aus Umweltproben, als auch die eigentliche Nukleinsäure- Detektion optimiert. So wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem mögliche PCR-Inhibitoren vor der Extraktion von DNA und RNA erfolgreich aus diversen Umweltsubstanzen entfernt werden konnten. Die anschließende Detektion der isolierten Erreger- Nukleinsäuren wurde vor allem in Hinblick auf Schnelligkeit, Zuverlässigkeit und Spezifität optimiert.

Durch die, im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, Entwicklung eines Screening Verfahrens, welches die *real-time* PCR mit der Pyrosequenzierung (PSQ) kombiniert, können Erreger-Nukleinsäuren schnell und sehr spezifisch nachgewiesen und die detektierten Pathogene durch die anschließende Sequenzierung typisiert werden.

Um Probenmaterial und Reagenzien, sowie Zeit und Kosten zu sparen, wurden verschiedene multiplex *real-time* PCR Systeme entwickelt. Zum einen wurde eine 5-plex *real-time* PCR etabliert, mit der weniger als 40 Genomäquivalente von vier bioterroristisch relevanten hochpathogenen Erregern detektiert werden können. Zum anderen wurde die *multicolour* multiplex PCR am Beispiel der Diagnostik von Pockenvirusinfektionen entwickelt. Diese ermöglicht die Differenzierung von Ortho- (OPV), Para- und Molluscipockenviren, der drei wichtigsten Genera, die humanpathogene Vertreter der Pockenviren enthalten. Die weitere Identifizierung und Typisierung von OPV wird durch die, in dieser Arbeit, etablierte multiplex PSQ ermöglicht. Jede OPV Spezies erzeugt dabei ein spezifisches Sequenzmuster und kann damit in weniger als einer Stunde nach der PCR Reaktion identifiziert werden.

Für die ungerichtete Suche nach Infektionserregern in klinischen Proben, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem die Aufbereitung von Nukleinsäuren aus humanem Gewebe in Vorbereitung auf das *Next Generation Sequencing* ermöglicht wird. Nach Entfernung humaner Hintergrund- rRNA findet die Sequenzierung aller Nukleinsäuren einer Probe mit der 454-Technologie statt. Mit diesem Verfahren wurde nach einer infektiösen Ursache des plötzlichen Kindstods gesucht.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit verschiedene innovative Verfahren der nukleinsäurebasierten Detektion von hochpathogenen Erregern erfolgreich etabliert und optimiert, die das Methodenspektrum der bisherigen molekularbiologischen Diagnostik erweitern und ergänzen können.

Summary

Today, molecular diagnostics and detection of highly pathogenic agents rely to a great extent on nucleic acid-based methods, especially on real-time PCR. In this thesis, the preparation of nucleic acids of pathogens from environmental samples as well as the detection of nucleic acids could be optimized. A preparation method could be established to diminish PCR-inhibitory substances from diverse environmental samples prior to extraction of DNA and RNA. The subsequent detection of the extracted nucleic acids was optimized concerning speed, reliability and specificity.

As a screening method, a combination of real-time PCR and pyrosequencing was established allowing the fast and very specific detection of nucleic acids and typing of detected pathogens by the subsequent sequencing.

In order to save sample material and reagents and to reduce process time and costs, different multiplex real-time PCR formats were developed. On the one hand, a 5-plex real-time PCR assay was established, that allows sensitive detection of less than 40 genome equivalents of four highly pathogenic biothreat agents in parallel. On the other hand, a multicolour, multiplex (mm) PCR was developed using the example of poxvirus diagnostics. This mmPCR assay allows the fast and specific differentiation of ortho- (OPV), para- and molluscipoxviruses, which are the three most important genera containing human pathogenic poxviruses. In addition, OPV can be identified and typed by the multiplex pyrosequencing assay that has been developed in the course of this project. In doing so, a specific fingerprint is generated for each OPV species, enabling the identification in less than one hour after the PCR reaction.

Beyond that, an optimized protocol has been developed for the preparation of nucleic acids from human specimens in order to search for infectious agents in clinical samples by an unbiased next generation sequencing approach. This protocol includes an additional step to remove human rRNA from the sample and subsequent sequencing of all remaining nucleic acids in the sample by 454-sequencing. This approach was then applied for the search of an infectious cause of sudden infant death syndrome.

In conclusion, different innovative methods of nucleic acid based detection of highly pathogenic agents have been successfully established and optimized. These novel detection methods can broaden and complement current systems of molecular diagnostics.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ..... **III**
Summary ..... **IV**
Inhaltsverzeichnis **5**

1. Einleitung **7**
1.1 Diagnostik und Detektion von Infektionskrankheiten 7
1.2 Biologische Agenzien 8
1.2.1 Bakterien der CDC Kategorie A 10
1.2.2 Hämorrhagisches Fieber auslösende Viren 11
1.2.3 Humanpathogene Pockenviren 12
1.3 Detektion biologischer Agenzien 14
1.3.1 Quantitative Polymerase Kettenreaktion 16
1.3.2 DNA Sequenzierung 17
1.3.3 Multiplex Pyrosequenzierung 20
1.3.4 Next Generation Sequencing 21
1.4 Zielstellung dieser Arbeit 24

2 Material **26**
2.1 Mikroorganismen 26
2.2 Nukleinsäuren und Plasmide 26
2.3 Oligonukleotide 27
2.4 Geräte 30
2.5 Software 31
2.6 Kits 31
2.7 Chemikalien 32
2.8 Verbrauchsmaterialen 33

3 Methoden **34**
3.1 Präparation von Nukleinsäuren 34
3.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Umweltproben 34
3.3 Quantitative PCR 35
3.3.1 Standard *real-time* PCR zum Nachweis von DNA 35
3.3.2 *One-step* RT-PCR zum Nachweis von RNA 35
3.3.3 Multiplex *real-time* PCR 36
3.3.4 *Multicolour*, multiplex *real-time* PCR 37
3.3.5 Validierung von *real-time* PCR Assays 38
3.4 Klonierung von Positivkontrollen 38
3.5 DNA Sequenzierung nach Sanger 38
3.6 Pyrosequenzierung 39
3.6.1 Screening-PSQ Assays 39
3.6.2 Multiplex PSQ 41
3.6.3 Quantitative Gelelektrophorese 41
3.7 Erregersuche in humanem Gewebe von SIDS Proben 41
3.7.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus humanem Gewebe 41
3.7.2 Erregerspezifische *real-time* PCRs 42
3.7.3 Vorbereitung der Gewebe RNA für das *Next Generation Sequencing* 42
3.7.4 Herstellung einer 454-Bibliothek 43

3.7.5 DNA Qualitätskontrolle 44
3.7.6 Emulsions-PCR und 454-Sequenzierung 44

4 Ergebnisse 45
4.1 Entfernung von PCR Inhibitoren aus Umweltproben 45
4.2 Schnelle und spezifische Nukleinsäure- Detektion durch Kombination der Pyrosequenzierung mit der *real-time* PCR 50
4.2.1 Etablierung der Pyrosequenzierung für biologische Agenzien 50
4.2.2 Parallele Pyrosequenzierungen als Screening Methode 55
4.3 Etablierung von multiplex Verfahren zur Detektion von Nukleinsäuren am Beispiel von BT-Erregern 60
4.4 Multiplex Detektion von humanpathogenen Pockenviren 62
4.5 Etablierung der multiplex Pyrosequenzierung zur Typisierung von Orthopockenviren 65
4.6 Erregersuche in humanem Gewebe von SIDS Proben 68
4.6.1 SIDS Proben und Voruntersuchungen der Rechtsmedizin 68
4.6.2 Spezifische Erregersuche 68
4.6.3 Aufbereitung von Nukleinsäuren aus humanem Gewebe für das *Next Generation Sequencing* 70
4.6.4 Sequenzierung der SIDS Proben mit der 454-Technologie 71

5 Diskussion 74
5.1 Aufbereitung von Umweltproben 74
5.2 Die Kombination der *real-time* PCR mit der Pyrosequenzierung ermöglicht die spezifische Detektion biologischer Agenzien 77
5.3 Die multiplex *real-time* PCR zur Detektion biologischer Agenzien 82
5.4 Die *multicolour*, multiplex PCR am Beispiel der Diagnostik humanpathogener Pockenviren 86
5.5 Interne Kontrollen in Nukleinsäure- Nachweisen 88
5.6 Die multiplex Pyrosequenzierung zur Identifizierung und Typisierung von Orthopockenviren 89
5.7 Erregersuche in humanem Gewebe von SIDS Proben 91
5.7.1 Spezifische und generische Erregersuche 91
5.7.2 Analyse der erzeugten Sequenzdaten 94
5.7.3 Pathogenspezifische *Reads* in den SIDS Proben 96
5.7.4 Hat SIDS eine infektiöse Ursache? 98
5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick 102

Abkürzungsverzeichnis 104
Abbildungsverzeichnis 106
Tabellenverzeichnis 107
Literaturverzeichnis 108
Liste eigener Veröffentlichungen 115
Danksagung 116
Eidesstattliche Erklärung 117

1. Einleitung

1.1 Diagnostik und Detektion von Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten gehören seit jeher zum menschlichen Leben und nehmen massiven Einfluss auf menschliche Populationen. Trotz moderner Medizin und jahrzehntelanger Forschung führen ansteckende Erkrankungen, ausgelöst vor allem durch Bakterien und Viren, weltweit zu mehr als 15 Millionen Todesfällen in jedem Jahr (1). Neben den direkten Leiden für die Betroffenen, verursachen Infektionskrankheiten zudem hohe Kosten für die Gesundheitssysteme weltweit und bedingen durch Arbeitsausfälle zusätzlich indirekt hohe wirtschaftliche Verluste. Um dem Einzelnen durch gezielte Behandlung zu helfen und zudem eine Ausbreitung der entsprechenden Infektion in der menschlichen Population eindämmen zu können, ist eine schnelle und zuverlässige Diagnostik unabdingbar. Neben der Schnelligkeit muss eine solche Diagnostik sensitiv und spezifisch sein, um zielgerichtete Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Das kann zum Beispiel bedeuten, bei einer bakteriellen Infektion ein Antibiotikum zu verabreichen, sowie die Symptome zu bekämpfen. Darüber hinaus ist bei einer hoch kontagiösen Infektion eine Isolierung des Patienten und möglicher Kontaktpersonen notwendig, um weitere Ansteckungen zu verhindern oder die gezielte Impfung gefährdeter Gruppen.

Zusätzlich zu dieser Diagnostik im engeren Sinne, also des Nachweises eines Erregers in klinischen Proben aus dem Patienten, gibt es die Möglichkeit, Pathogene in nicht klinischem Material nachzuweisen. Dabei wird häufig der Begriff „Detektion“ verwendet, da keine Diagnose einer Erkrankung erstellt wird, sondern Erreger außerhalb des menschlichen Körpers detektiert werden. Dies wird zum Beispiel nötig, um Kontaminationen von Wasser, Lebensmitteln oder anderen Umweltproben mit Infektionserregern zu erkennen und entsprechende Risikoabschätzungen treffen zu können. Bei genannten Kontaminationen kann es sich um ein natürliches Vorkommen eines Pathogens oder eine ungewollte Verunreinigung handeln, wie bei der unbeabsichtigten Kontamination von Gemüsesprossen mit dem EHEC Erreger im Sommer 2011 (2). Ebenso kann aber auch eine absichtliche Ausbringung von Pathogenen als bioterroristischer Angriff nicht ausgeschlossen werden. Der Detektion von biologischen Agenzien in Verdachtsfällen kommt eine besondere Bedeutung zu, die im Rahmen dieser Dissertation diskutiert wird.

1.2 Biologische Agenzien

Der Gebrauch biologischen Materials zur Kriegsführung, sowie der Missbrauch als bioterroristische Waffe sind nicht neu. Berichten zufolge nutzten bereits die Römer, Griechen und Perser der Antike verwesende Leichen, um die Brunnen ihrer Feinde zu verunreinigen (3). Im Mittelalter, im Jahr 1346, beschossen Tartaren die Stadt Kaffa nach dreijähriger Belagerung mit Pesttoten. Es wird vermutet, dass die darauf folgende große Pestwelle in Europa durch infizierte Flüchtlinge aus der Stadt ausgelöst wurde (4). Es lassen sich zahlreiche weitere Beispiele aus der Geschichte nennen, in denen entweder Leichen (-teile), verseuchte Tiere oder verunreinigte Materialien zur biologischen Kriegsführung verwendet wurden. Mit der Entdeckung und Beschreibung von Bakterien und Viren als Ursache von Infektionen im 20. Jahrhundert, begannen auch die gezielte Erforschung dieser Erreger und die Verwendung als Biowaffe. Mit Inkrafttreten der Biowaffenkonvention im Jahre 1975 wurden die Herstellung und der Besitz von Biowaffen weltweit verboten (5). Das schließt allerdings den Missbrauch von biologischen Agenzien durch Terroristen nicht aus. Obwohl es bisher keine größeren, flächendeckenden Anschläge mit biologischen Waffen gegeben hat, so zeugen zum Beispiel die Anthrax-Anschläge von 2001 in den USA von der potentiellen, schwer einzuschätzenden Gefahr, die vom Bioterrorismus (BT) ausgeht. Bei diesem Vorfall im September 2001 infizierten sich 22 Menschen mit *Bacillus anthracis,* dessen Sporen mit Briefen an Politiker und Journalisten versendet worden waren. Fünf der infizierten Personen verstarben an der Infektion (6).

Neben *B. anthracis* gibt es viele weitere Bakterien, sowie Viren und bakterielle Toxine, die als potentielle biologische Waffen gelten und denen damit besondere Aufmerksamkeit in der Erforschung und Entwicklung von Detektionsmöglichkeiten, sowie von geeigneten Gegenmaßnahmen zukommt. Die *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) in Atlanta, USA, teilen potentielle biologische Agenzien in drei Kategorien (A-C) ein (Tabelle 1). Agenzien aller drei Kategorien kommen gewöhnlich in der Natur vor und können durch Luft, Wasser oder Lebensmittel verbreitet werden. Es ist jedoch möglich, diese Agenzien genetisch so zu verändern, dass sie infektiöser werden, also eine geringere Partikelanzahl zu einer schnelleren Infektion des Menschen führt, sie gegenüber vorhandenen Medikamenten resistent sind oder leichter in der Umgebung verbreitet werden können (7). Da zwischen dem Ausbringen des Agens und dem Auftreten einer Erkrankung mehrere Stunden bis Tage liegen können, ist die Erkennung eines BT-Anschlags unter Umständen verzögert. Während einige biologische Agenzien, wie z.B. Menschenpocken, leicht von Mensch zu Mensch übertragen werden können, gilt dies für andere biologische Agenzien, wie *B. anthracis,* nicht.

Tabelle 1: Biologische Agenzien und ihre Einordnung nach den Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Agens	Erkrankung	CDC Kategorie
Bacillus anthracis	Milzbrand	A
Francisella tularensis	Tularämie	A
Yersinia pestis	Pest	A
Variola Virus	Pocken	A
Lassa Virus	HF (Lassa Fieber)	A
Filoviren	HF (Ebola, Marburg)	A
Botulinum Toxin	Botulismus	A
Brucella sp.	Brucellose	B
Coxiella burnetii	Q Fieber	B
Rizin	Rizin-Vergiftung	B
Nipah Virus	unspezifisch	C
Hanta Viren	unspezifisch	C

HF: Hämorrhagisches Fieber

Die Einteilung der CDC erfolgt nach der Möglichkeit der Verbreitung, sowie der Schwere der ausgelösten Erkrankung bzw. der Mortalität. In Kategorie A sind Organismen und Toxine zu finden, die ein sehr hohes Risiko für die öffentliche Gesundheit und die nationale Sicherheit darstellen, da sie sich leicht ausbringen und verteilen lassen oder leicht von Mensch zu Mensch übertragbar sind (Tabelle 1). Sie verursachen viele Todesfälle und besitzen neben dem Einfluss auf öffentliche Gesundheitssysteme ein hohes Panikpotential. Bakterien wie *B. anthracis*, *Yersinia pestis* und *Francisella tularensis*, sowie Menschenpocken Viren (Variola Virus) fallen ebenso in diese Kategorie wie Viren, die hämorrhagisches Fieber auslösen (Filoviren wie Ebola und Marburg Viren und Arenaviren wie das Lassa Virus) und das Toxin von *Clostridium botulinum*. Vertreter der Kategorie B haben die zweithöchste Priorität, da sie relativ einfach zu verbreiten sind und die Anzahl von zu erwartenden Erkrankungs- und Todesfällen moderat bis gering ist. Dazu gehören die Bakterien der Gattung *Brucella*, das Bakterium *Coxiella burnetii* und das Pflanzentoxin Rizin. In Kategorie C sind sogenannte „emerging“, also neu auftretende, Erreger einzuordnen. Pathogene, die durch genetische Manipulation so verändert werden, dass sie in Zukunft massenhaft ausgebracht werden könnten, werden ebenfalls hier eingeordnet. Die Vertreter der Kategorie C sind leicht verfügbar, können leicht produziert und verbreitet werden und besitzen potentiell hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten. In diese Kategorie werden beispielweise das Nipah Virus und die Hanta Viren eingeordnet.

Zusätzlich zur Einteilung der CDC gibt es weitere Möglichkeiten, biologische Agenzien zu kategorisieren, wie beispielsweise von der Australia Group (8), die jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht näher erläutert werden.

1.2.1 Bakterien der CDC Kategorie A

Unter den Bakterien, die laut CDC als bioterroristisch relevant gelten, sind vor allem die drei Bakterien der Kategorie A, *B. anthracis*, *F. tularensis* und *Y. pestis,* und deren Nachweis in Umwelt- und Patientenproben von höchster Priorität. Dabei ist zu beachten, dass alle drei Bakterien, lokal begrenzt, auch natürlich vorkommen (9). *B. anthracis* ist in Afrika, aber auch Mitteleuropa verbreitet, *F. tularensis* ist endemisch in Nord- und Südosteuropa und *Y. pestis* ist in Afrika, aber auch in Teilen des Südwestens der USA zu finden. Bei allen drei Bakterien handelt es sich um zoonotische Erreger, was bedeutet, dass eine Übertragung natürlicherweise vom Tier auf den Menschen erfolgt. Eine Ansteckung auf natürlichem Wege ist daher durch den Kontakt zu infizierten Tieren und Tierprodukten möglich. Zusätzlich ist eine Infektion über die Inhalation von Staub und Aerosolen möglich. *F. tularensis* wird auch über Vektoren, wie Zecken und Stechmücken übertragen, *Y. pestis* über Flöhe (9).

B. anthracis bildet als sehr umweltresistente Dauerform Sporen aus, die jahrzehntelang infektiös sein können (10). Zudem gelten Anthraxerreger als einfach zu züchten und können in flüssiger und getrockneter Form produziert werden. Die Möglichkeit der massenhaften Verbreitung begründet die Zuordnung zu der Kategorie A der CDC, obwohl eine Übertragung von Mensch zu Mensch bisher nicht beobachtet wurde (9). Neben dem bakteriellen Chromosom besitzt *B. anthracis* zwei Virulenzplasmide: pXO1 und pXO2. Das Vorhandensein dieser beiden Plasmide unterscheidet *B. anthracis* von anderen, nah verwandten Bakterienspezies der *B. cereus* Gruppe (11, 12).

Von *F. tularensis*, dem Erreger der Tularämie (Hasenpest), sind zwei klinisch relevante Subspezies (Biovare) bekannt: *F. tularensis* ssp. *tularensis* und *F. tularensis* ssp. *holarctica* (13). Ein breites Wirtsspektrum (über 150 verschiedene Säugetierarten), eine hohe Stabilität in der Umwelt, sowie eine leichte Verbreitungsmöglichkeit über Aerosole mit einhergehender hoher Infektiösität begründen die Zuordnung von *F. tularensis* zu den Erregern der Kategorie A, obwohl auch hier keine Mensch-zu-Mensch Übertragung bekannt ist (9). *F. tularensis* besitzt keine Virulenzplasmide, eine Abgrenzung zu eng verwandten, weniger virulenten Subspezies *F. tularensis novicida* und *mediasiatica* muss über das Chromosom erfolgen.

Auch der Erreger der Pest, *Y. pestis,* ist umweltstabil und kann mehrere Wochen in Flöhen, im Erdboden, auf Kleidung, in Wasser und auf Lebensmitteln überleben (9). Bei der Übertragung durch Aerosole reichen je nach Quelle (9) geschätzte 1-500 Erreger, um eine Infektion auszulösen. Die daraus resultierende Pestpneumonie führt unbehandelt oder zu spät behandelt in nahezu 100% der Fälle zum Tod (14). Diese Faktoren begründen zusammen mit der hohen Ansteckungsgefahr eine Zuordnung von *Y. pestis* zu der Kategorie A. *Y. pestis* besitzt neben

dem Chromosom drei Plasmide: das ca. 75 kb große Virulenzplasmid pYV, das ca. 110 kb große Plasmid pTOX und das ca. 9,5 kb große Plasmid $pPCP_1$ (15). Während pTOX und $pPCP_1$ spezifisch für *Y. pestis* sind, ist das Virulenzplasmid auch bei den nah verwandten Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterolytica* zu finden.

1.2.2 Hämorrhagisches Fieber auslösende Viren

Viele für den Menschen hochpathogene Viren weisen einen ähnlichen Krankheitsverlauf mit hämorrhagischem Fieber auf, sind jedoch unterschiedlichen Virusfamilien zuzuordnen:
(I) In die Familie der *Filoviridae* sind die Genera Ebola- und Marburgvirus einzuordnen. Während es mit dem Lake Victoria Marburgvirus nur eine Spezies innerhalb der Marburgviren gibt, sind im Genus Ebolavirus die humanpathogenen Vertreter Ebola-Sudan-Virus, Ebola-Zaïre-Virus, Ebola-Côte d'Ivoire und Ebola-Bundibugyo, sowie das nicht humanpathogene Ebola-Reston-Virus zu finden (16, 17). Bis auf das, auf den Philippinen endemische, Ebola-Reston-Virus, kommen Viren beider Genera in Äquatorialafrika vor, wo es immer wieder zu Ausbrüchen mit Letalitätsraten von 50-80% kommt (18). Das tierische Reservoir ist bisher nicht bekannt. Eine Infektion des Menschen erfolgt häufig über infizierte Affen oder durch Übertragung des Virus von Mensch zu Mensch durch Blut oder andere Körperflüssigkeiten.
(II) Das Lassavirus aus der Familie der *Arenaviridae* kommt endemisch in Westafrika vor (19). Das Reservoir stellen chronisch infizierte Nagetiere dar (20). Der Mensch kann sich über den Kontakt zu Ausscheidungen oder Blut infizierter Tiere, meist über Lebensmittelkontaminationen, infizieren. Eine Übertragung über die Atemwege durch Aerosole ist ebenfalls möglich.
(III) In der Familie *Bunyaviridae* sind zahlreiche humanpathogene Viren zu finden. Besonders hervorzuheben sind das Krim-Kongo-Fieber-Virus (*Crimean-Congo-hemorrhagic-fever Virus*, CCHFV) aus dem Genus *Nairovirus*, sowie das Rifttal-Fieber-Virus (*Rift-Valley-fever-virus*, RVFV) aus dem Genus *Phlebovirus*. Eine Übertragung auf den Menschen erfolgt aber hauptsächlich durch Zecken der Gattung *Hyalomma* (21). Das Krim-Kongo-Fieber ist die am weitesten verbreitete, durch Zecken übertragene Erkrankung mit Fällen in über 30 Ländern in Asien, der Türkei, Afrika und Südosteuropa (21, 22). Das CCHFV nutzt Pflanzenfresser, Vögel und Nagetiere als Reservoir. Da es ebenfalls in domestizierten Tieren vorkommt (Kühe, Schafe, Ziegen und Kamele), kann der Mensch sich auch über den Kontakt zu Fleisch oder Blut infizierter Tiere anstecken. Die Letalität im Menschen beträgt 10 - 50% (21).

Das RVFV tritt als Zoonose in Afrika südlich der Sahara endemisch und epidemisch auf. Stechmücken bilden das Virusreservoir und übertragen das Virus von infizierten Wiederkäuern. Infektionen des Menschen treten meist im Rahmen von Tierepidemien auf (18), die Übertragung von Mensch zu Mensch ist jedoch selten.

Den genannten Viren der Familien *Filo-, Arena-* und *Bunyaviridae* ist gemeinsam, dass sie im Menschen nach anfänglichen unspezifischen Symptomen Fieber mit Hämorrhagien auslösen können. Die Verläufe sind mitunter zwar recht unterschiedlich, eine eindeutige Diagnose anhand der Symptomatik erweist sich jedoch häufig als schwierig. Für das Arbeiten und die Diagnostik ist ein Speziallabor der Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) erforderlich, Ausnahme ist das RVFV (BSL-3). Durch die hohe Kontagiösität und Mortalität, sowie das Fehlen einer spezifischen Impfung und Therapie, zählen Filo- und Lassaviren zu den Erregern der Kategorie A der CDC Klassifizierung (7). Das CCHFV wird von den CDC nicht als bioterroristisch relevanter Erreger aufgeführt, sollte aber aufgrund seiner Infektiösität und Letalität, des Fehlens eines Impfstoffes und seiner recht weiten natürlichen Verbreitung in punkto Detektionsverfahren nicht außer Acht gelassen werden. Das RVFV ist zwar weniger gefährlich für den Menschen als die anderen genannten RNA Viren, besitzt jedoch das Potential der weiteren Ausbreitung in bisher RVFV freie Regionen (18) und könnte als biologisches Agens verwendet werden.

Als Grundlage für eine Diagnostik bzw. Detektion dieser Viren kann der spezifische Nachweis der viralen Nukleinsäure dienen. Die genannten Viren besitzen alle ein einzelsträngiges RNA Genom in Minusstrang-Orientierung. Das Genom der *Filoviridae* liegt dabei unsegmentiert vor. Das Lassa Virus Genom ist in die Segmente S und L unterteilt, welche für zwei Leserahmen kodieren, die in ambisense Orientierung vorliegen. Die *Bunyaviridae* besitzen zusätzlich zu einem S- und einem L- Segment das M-Segment.

1.2.3 Humanpathogene Pockenviren

Der bekannteste und zugleich gefährlichste Vertreter der humanpathogenen Pockenviren (Familie *Poxviridae*) ist das Variola Virus aus dem Genus Orthopockenviren. Obwohl das Variola Virus durch die weltweite Impfkampagne der WHO bis 1977 ausgerottet werden konnte (23, 24), gehört es zu den bioterroristisch relevanten Erregern der Kategorie A der CDC (25). Dies ist zum einen durch die sehr hohe Infektiösität des Virus und Mortalitätsraten von bis zu 45% (Variola major) zu erklären (26). Zum anderen wurden die Impfungen aufgrund der starken Nebenwirkungen Anfang der 1980er eingestellt, sodass eine Vielzahl an Menschen immunologisch naiv gegen dieses Virus ist (27). Derzeit gibt es zwei Labore

weltweit, die das Variola Virus offiziell besitzen, die CDC in Atlanta, USA und das State Research Center for Virology and Biotechnology (Vector) in Koltsovo, Russland (28). Weitere, illegale Vorkommen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass zukünftig nah verwandte Pockenviren des gleichen Genus, genetisch modifiziert oder komplett synthetisch hergestellt werden, sodass sie eine vergleichbare Infektiösität und ein ähnlich tödliches Potential erlangen wie das Variola Virus (29).

Tabelle 2: Charakteristische Vertreter der Poxviridae. Es sind nur Genera dargestellt, die humanpathogene Spezies (rot) enthalten. Modifiziert nach Modrow (16).

Unterfamilie	Genus	Virusspezies
Chordopoxvirinae (Pockenviren der Wirbeltiere)	Orthopockenviren	Variola Virus Affenpockenvirus Kuhpockenvirus Vacciniavirus Kamelpockenvirus Mauspockenvirus
	Parapockenviren	Pseudokuhpockenvirus Orfvirus
	Molluscipockenviren	Molluscum contagiosum Virus
	Yatapockenviren	Tanapockenvirus Yabapockenvirus

Neben dem Variola Virus, gibt es im Genus der Orthopockenviren (OPV) weitere humanpathogene Vertreter, die für zoonotische Infektionen verantwortlich sind (Tabelle 2). Das Affenpockenvirus (*monkeypox virus*, MPXV), endemisch in West- und Zentralafrika, infiziert hauptsächlich Nagetiere und Hörnchen (18). Durch infizierte Nagetiere aus Ghana wurde das Affenpockenvirus im Frühjahr 2003 in die USA importiert, wo es über Präriehunde auf Tierhändler und -besitzer übertragen wurde und zu rund 70 Erkrankungen führte (30). Auch in Europa (Niederlande, Dänemark) sind Fälle von Affenpocken bekannt (18). Das Kuhpockenvirus (*cowpox virus*, CPXV) kommt in Europa und Mittelasien vor und besitzt ein breites Wirtspektrum. Das CPXV ist, im Gegensatz zu allen anderen OPV, in der Lage, sehr viele verschiedene Tiere, einschließlich exotischer Tiere, Reptilien und Haustiere zu infizieren und in ihnen zu replizieren. Das Reservoir bilden Nagetiere, von denen das Virus direkt oder über Zwischenwirte wie Katzen, auf den Menschen übertragen werden kann (31). In Deutschland traten in den Jahren 2008 - 2010 vermehrt Infektionen mit dem Kuhpockenvirus auf (32-34).

Einen weiteren humanpathogenen Vertreter der OPV stellt das Vacciniavirus dar, welches auch als Impfstamm zur Ausrottung der echten Pocken (Variola Virus) verwendet wurde.

Zoonotische Ausbrüche wurden vor allem nach Impfungen von Tierherden, z.B. in Südamerika, beobachtet (18).

Affenpocken- und Kuhpockenviren und das Vacciniavirus sind für den Menschen weit weniger infektiös als das Variola Virus, eine Übertragung von Mensch zu Mensch wird selten bis gar nicht beobachtet. Das eng verwandte Kamelpockenvirus wurde bisher nur in Einzelfällen beim Melken von Kamelen auf den Menschen übertragen, es infiziert gewöhnlich nur Kamele (35). Weiterhin gehört zu den OPV das Mauspocken- oder Ectromelia Virus, welches nicht humanpathogen ist, jedoch für eine Differentialdiagnostik relevant ist.

Neben den OPV gehören sieben weitere Genera zur Unterfamilie der *Chordopoxvirinae* (den Pockenviren der Wirbeltiere), von denen drei weitere humanpathogene Vertreter enthalten. Das sind zum einen Viren der Genera Parapockenviren (PPV) und Yatapockenviren, sowie das Molluscum contagiosum Virus des Genus Mollucipockenvirus.

Diagnostisch ist zum einen die Unterscheidung von humanpathogenen Pockenviren der verschiedenen Genera wichtig, zum anderen die Differenzierung und Typisierung innerhalb der OPV, nicht zuletzt zur Abgrenzung einer Pockenerkrankung von den echten Pocken. Orthopockenviren sind DNA Viren mit einem bis zu 230 kb großen doppelsträngigen Genom. Der Nachweis pockenviraler DNA innerhalb eines Screenings kann zunächst auf der Ebene des Genus erfolgen, also zum Beispiel durch die Detektion von OPV DNA.

1.3 Detektion biologischer Agenzien

Detektionsverfahren für den Nachweis biologischer Agenzien in Umweltproben sowie Patientenmaterial müssen schnell und zuverlässig, sowie spezifisch und sensitiv sein. In den letzten Jahren und Jahrzehnten sind viele Methoden entwickelt und optimiert worden, die als Screening Verfahren in Frage kommen, für die Vor-Ort Diagnostik verwendet werden können oder als Bestätigungsverfahren ein gut ausgestattetes Speziallabor erfordern. Die Wahl der geeigneten Methode ist dabei zusätzlich von der Art der Probe abhängig. Bei Material aus dem Patienten sind Hintergrundinformationen aus der Anamnese des Betroffenen bekannt, die Hinweise auf die zugrundeliegende Infektion liefern. Auch die klinischen Symptome, wie Hautausschlag oder hämorrhagisches Fieber engen das Spektrum der in Frage kommenden Erreger möglicherweise ein. Ebenso sind die Eigenschaften des entsprechenden Gewebes oder der Körperflüssigkeit bekannt. Umweltproben hingegen stellen eine besondere Herausforderung dar, da Zusammensetzung und Eigenschaften der Matrices meistens nicht

bekannt sind. Zusätzlich können mikrobielle Verunreinigungen, sowie inhibitorische Substanzen in einer Umweltprobe zu verfälschten Ergebnissen führen.

Bevor eine Probe auf Erreger untersucht werden kann, muss zunächst eine Aufarbeitung des Probenmaterials erfolgen, die sich auch nach der nachfolgenden Detektionsmethode richten muss. So können Bakterien oder Viruspartikel über optische Nachweisverfahren wie die (Elektronen-)Mikroskopie oder den Nachweis spezifischer Antigene detektiert werden (Abbildung 1). Um die Lebensfähigkeit des Erregers bzw. im Falle der Viren ihre Infektiösität nachzuweisen, erfolgt eine Anzucht auf entsprechenden Nährmedien bzw. in Zellkultur. Jedoch ist eine Bearbeitung in einem entsprechenden Sicherheitslabor zwingend notwendig, um eine Ansteckung des Laborpersonals und eine weitere Verbreitung des Erregers zu verhindern.

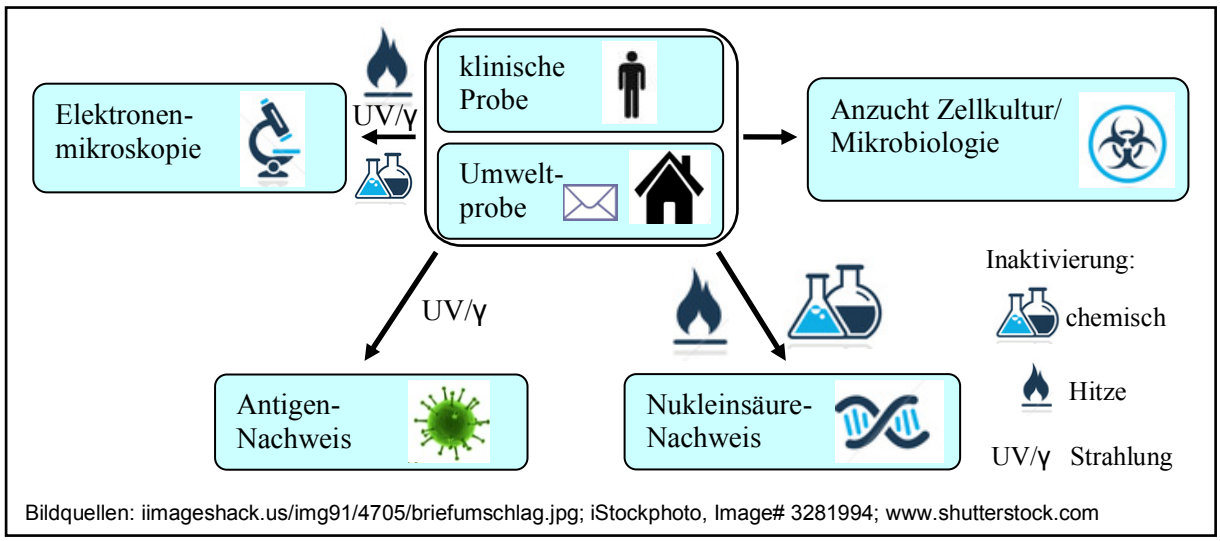


Abbildung 1: Detektion biologischer Agenzien in klinischen Proben und Umweltproben. Erregerpartikel können „optisch“ über die (Elektronen-) Mikroskopie oder über den Nachweis spezifischer Antigene detektiert werden. Eine Inaktivierung der Probe kann dabei mit UV- oder γ-Strahlung erfolgen. Um die Lebensfähigkeit von Bakterien bzw. die Infektiösität von Viren zu beurteilen, erfolgt eine Bakterienkultur bzw. Anzucht in Zellkultur, jedoch in entsprechenden Sicherheitslaboren (BSL-3/4), da die Probe dazu nicht inaktiviert wird. Der Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuren, beispielsweise über PCR Reaktionen, kann nach Inaktivierung durch Hitze oder Chemikalien in unter Standardbedingungen (BSL-1) erfolgen.

Um den Laboraufwand zu verringern und die Sicherheit zu erhöhen, sollte ein Teil der Probe, der nicht zur Anzucht verwendet werden soll, inaktiviert werden. Eine solche biologische Inaktivierung ist über Hitze, Bestrahlung (UV-Licht, γ-Strahlung) oder Einwirkung von Chemikalien, wie Peressigsäure, möglich. Die Wahl der Inaktivierungsmethode ist wiederum abhängig von der nachfolgenden Methode. So ist der Antigennachweis nach Hitzeeinwirkung möglicherweise verhindert.

Sehr schnelle und sensitive Verfahren stellen molekularbiologische Methoden dar, die die Nukleinsäure des Erregers detektieren. Hierfür kann eine Inaktivierung beispielsweise über Hitze oder Chemikalien erfolgen, sodass die Nukleinsäure nicht zerstört wird. Anschließend erfolgt die Isolierung von Nukleinsäuren aus der Probe. Dadurch wird die nachzuweisende Nukleinsäure aufkonzentriert und mögliche Inhibitoren und Stellstoffe entfernt. Der anschließende Nukleinsäurenachweis kann auf drei Ebenen erfolgen (siehe auch Abbildung 5): (i) Der Nachweis ist spezifisch, beispielsweise bei der Detektion von Ebolavirus RNA mit Hilfe der PCR. (ii) Der Nachweis erfolgt generisch, beispielsweise durch den Einsatz degenerierter Primer in der PCR, die gleichzeitig Ebola- und Marburgviren amplifizieren. Ebenso können multiplex Verfahren verwendet werden, bei denen eine Probe gleichzeitig auf das Vorhandensein verschiedener Erreger untersucht wird. (iii) Die Probe wird mit einem „offenen Blick“ ohne Kenntnisse des möglichen Pathogens und seiner Nukleinsäure untersucht. Wie bei der Elektronenmikroskopie (EM) Partikel aller Formen und Größen ohne vorherige Eingrenzung detektiert werden können, ist ein solcher „offener Blick“ auf molekularbiologischer Ebene beispielsweise durch den Einsatz des *Next Generation Sequencing* (auch *deep sequencing* genannt) möglich. Dazu ist keine vorherige Kenntnis der Nukleinsäuresequenz erforderlich.
In dieser Arbeit wurden Nachweismethoden aller drei Ebenen entwickelt und optimiert. Im Folgenden werden die Prinzipien der verwendeten molekularbiologischen Methoden genauer beschrieben.

1.3.1 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

In der molekularbiologischen Diagnostik wird die quantitative oder *real-time* Polymerase Kettenreaktion (PCR) als Goldstandard verwendet, da die nachzuweisenden Nukleinsäuren gleichzeitig amplifiziert und detektiert werden. Dabei wird die Amplifikation der Zielsequenz während des Prozesses durch den Einsatz sequenzspezifischer, fluoreszenzmarkierter Sonden sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das so genannte TaqMan® Sonden Format (5’ Nuklease Format) verwendet. Bei intakter Sonde wird die anregende Energie des Reporterfarbstoffs am 5’ Ende der Sonde auf den räumlich nahen Quencher am 3’ Ende übertragen (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET), dessen Emission nicht gemessen wird. Während der Neustrangsynthese wird die Sonde durch die 5´-3´ Exonuklease- Aktivität der Polymerase in kleine Fragmente zerschnitten. Die räumliche Nähe von Quencher und Reporter ist aufgehoben und die Emission der Reporterfluoreszenz wird detektiert. Dabei ist die gemessene Fluoreszenzintensität proportional zur Produktmenge im Reaktionsgefäß.

Dadurch ist neben der qualitativen Detektion einer Nukleinsäure, und damit beispielsweise eines Erregers, eine vage Quantifizierung möglich. Dazu wird ein so genannter Schwellenwert (*treshold cycle*, C_T) festgelegt, der den PCR Zyklus definiert, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die DNA Quantifizierung basiert nicht auf absoluten Mengen an PCR Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR Reaktion. Bei Erreichen des C_T-Wertes ist die Amplifikation exponentiell. Des Weiteren treten zu diesem Zeitpunkt keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel, abnehmende Enzymaktivität oder Produkt- Inhibition der PCR Reaktion auf. Da der C_T-Wert abhängig von der Ausgangsmenge der DNA ist, kann über einen mitgeführten internen Standard die Probenkonzentration bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die *real-time* PCR für verschiedene Fragestellungen verwendet. Abhängig von der Art der Ziel-Nukleinsäure (RNA oder DNA) finden dabei verschiedene PCR Systeme Anwendung. Zum Nachweis von viraler RNA werden *one-step* Reverse Transkriptase (RT-) PCRs verwendet, bei denen die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert und mit einer spezifischen TaqMan Sonde nachgewiesen wird. Neben Einzelassays zur Detektion von Erreger-Nukleinsäuren wurden verschiedene multiplex PCR Systeme zum gleichzeitigen Nachweis verschiedener Zielsequenzen etabliert.

1.3.2 DNA Sequenzierung

Um ein positives PCR Ergebnis zu bestätigen und gleichzeitig die genaue Sequenz der detektierten Erreger- Nukleinsäure bestimmen zu können, wird eine DNA Sequenzierung des PCR Produktes durchgeführt. Die Kenntnis der Sequenz erlaubt eine Typisierung des detektierten Erregers, wodurch Ursprung, Übertragungsweg und eine mögliche genetische Manipulation nachgewiesen werden können. Die Standardmethode stellt die DNA Sequenzierung nach Sanger dar (36). Diese ist gut etabliert und zuverlässig, aber auch vergleichsweise langwierig, da relativ lange Sequenzen bis zu 1000 Basen gelesen werden können. Als schnellere Alternative kann die Pyrosequenzierung (PSQ) verwendet werden, die kurze Sequenzen von 30 – 60 Basen erzeugt (37, 38), die zur schnellen Identifikation und Klassifikation des detektierten Erregers oftmals ausreichen.

Ausgangsstoff für die PSQ ist einzelsträngige DNA, die in der PCR Reaktion gewonnen wird (Abbildung 2A). Einer der beiden PCR-Primer wird durch einen modifizierten Primer ersetzt, der an seinem 5’ Ende ein Biotinmolekül trägt. Dadurch entsteht während der PCR ein PCR Produkt, das an einem Strang ebenfalls mit Biotin markiert ist. Über Streptavidin-gekoppelte

Sepharose Kügelchen erfolgt die Aufreinigung des biotinylierten DNA-Stranges, an welchen der PSQ Primer bindet. Beteiligt sind also mindestens drei Primer: ein unmodifizierter PCR Primer, ein biotinylierter PCR Primer und der PSQ Primer. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt im PyroMark ID Gerät durch automatisierte Zugabe der vier Nukleotide in vorgegebener Reihenfolge sowie der Enzym- und Substratlösung. Bei der PSQ erfolgt die Sequenzierung während der Synthese eines komplementären DNA-Strangs zu dem vorgegebenen Matrizenstrang aus der vorhergehenden PCR Reaktion (Abbildung 2B). Das Enzymsystem wandelt die chemischen Signale, die während der Strangsynthese entstehen, in optisch messbare Signale um, die in einem sogenannten Pyrogramm ausgegeben werden. Die Sequenz des synthetisierten DNA-Strangs ist direkt am Pyrogramm ablesbar und entspricht der komplementären Sequenz des eingesetzten DNA-Strangs aus der PCR Reaktion.

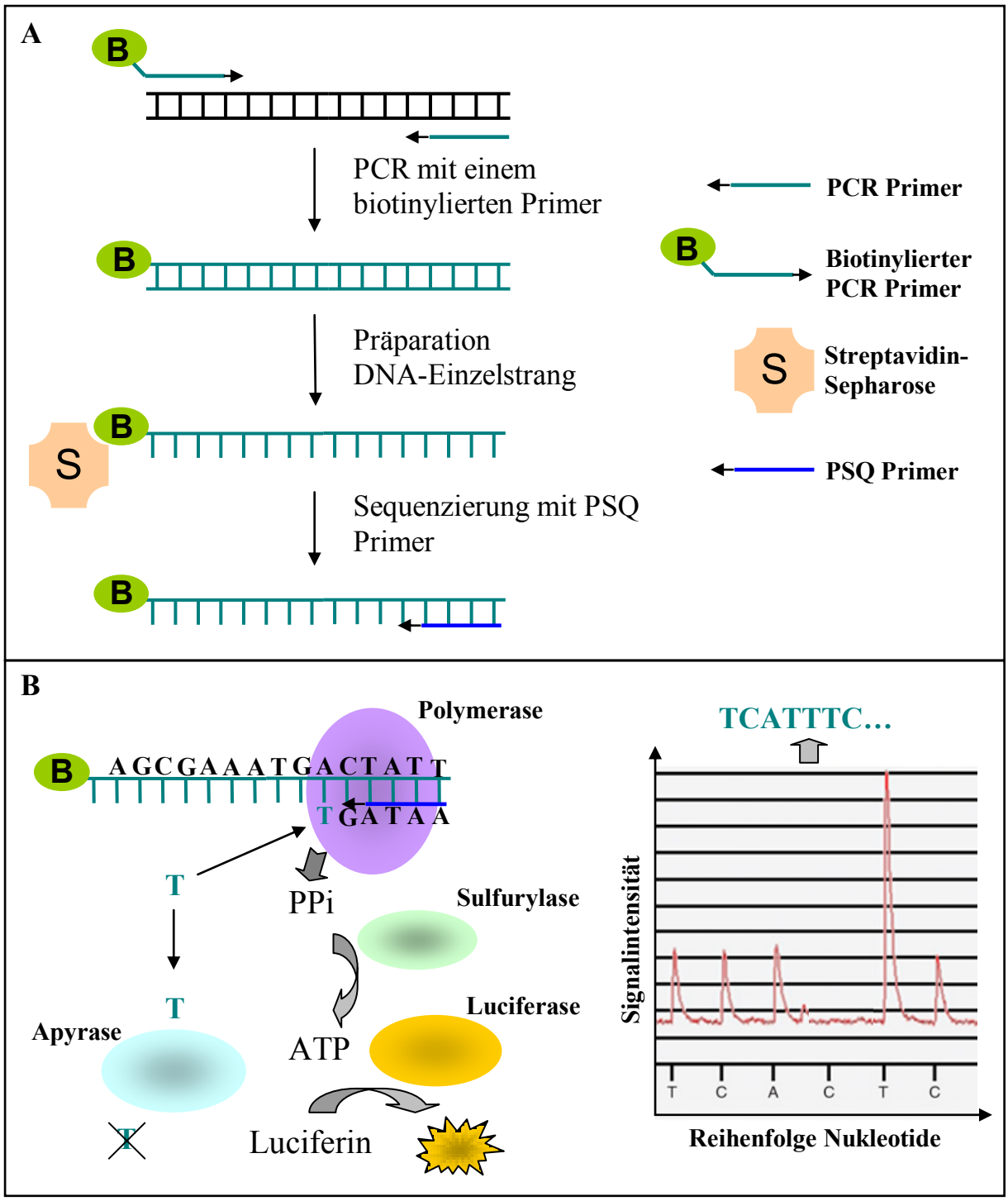


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung (PSQ). A Mit einem biotinylierten und einem unmodifizierten Primer wird in der PSQ-PCR ein PCR Produkt mit einem biotinylierten Strang generiert. Über Streptavidin-Sepharose wird der biotinylierte DNA-Strang aufgereinigt und zusammen mit einem PSQ Primer (komplementär zum biotinylierten PCR Primer) in die PSQ eingesetzt. **B** Eines der vier Nukleotide wird hinzugefügt. Die Polymerase baut die Nukleotide komplementär zum Matrizenstrang ein. Dabei entsteht Pyrophosphat (PPi) (39), welches der Sulfurylase zur Bildung von ATP dient. Das ATP wird von der Luciferase als Katalysator für die Umwandlung von chemischer (Luciferin) in Lichtenergie verwendet. Ein Lichtsignal, dessen Intensität proportional zur Menge an gebildetem PPi und damit zur Anzahl der eingebauten Nukleotide ist, wird in Form eines Peaks in einem Pyrogramm (rechts) aufgezeichnet. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch die Apyrase abgebaut, bevor ein neuer Zyklus mit dem nächsten Nukleotid beginnt. Die Sequenz des gebildeten DNA-Strangs wird am Pyrogramm durch das Vorhandensein und die Höhe der Peaks abgelesen.

1.3.3 Multiplex Pyrosequenzierung

Durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer PSQ Primer werden mehrere Sequenzabschnitte eines oder mehrerer PCR Produkte zeitgleich in einem Reaktionsgefäß sequenziert (Abbildung 3A). Während der PSQ kann die Polymerase das jeweilige Nukleotid abhängig von der Zielsequenz hinter jedem PSQ Primer einbauen, sodass ein entstehender Peak im Pyrogramm nicht mehr eindeutig einer Ausgangssequenz zugeordnet werden kann. Vielmehr entsteht ein Sequenzmuster, welches durch die geeignete Auswahl der PSQ Primer und der Zielsequenzen durch die bioinformatische Auswertung einem Organismus zugeordnet werden kann (Abbildung 3B).

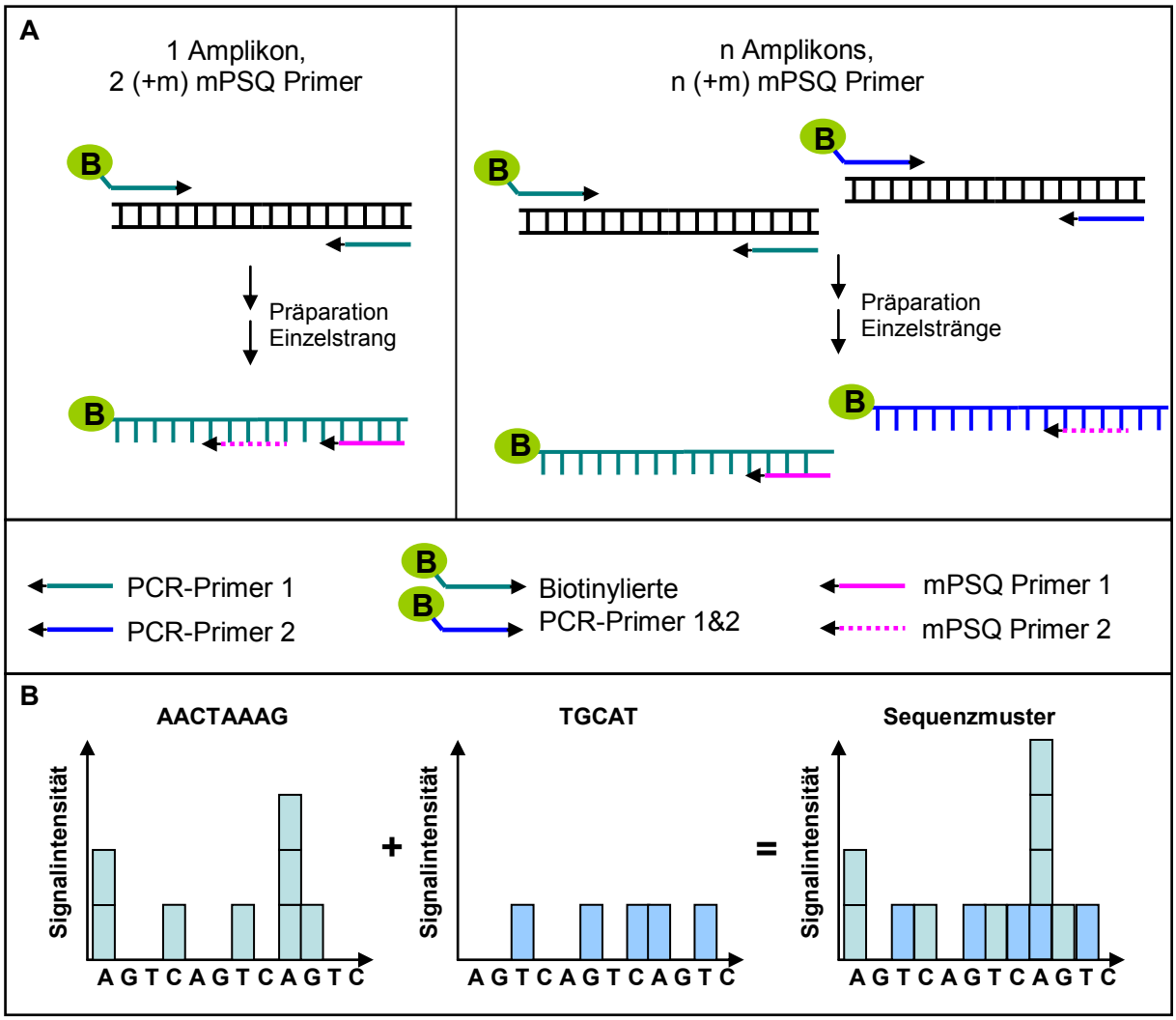


Abbildung 3: Prinzip der multiplex Pyrosequenzierung. A Während der PSQ-PCR werden entweder ein Amplikon oder mehrere Amplikons generiert. Nach Herstellung des DNA Einzelstrangs erfolgt die PSQ mit mindestens zwei verschiedenen PSQ Primern, die entweder an verschiedenen Stellen des einen Amplikons oder an die verschiedenen Amplikons binden. **B** Der Einbau von Nukleotiden hinter jedem der Primer ergibt ein Lichtsignal. Diese Lichtsignale überlagern sich im finalen Pyrogramm, sodass ein charakteristisches Sequenzmuster entsteht. Veränderungen in jeder der Einzelsequenzen verändern das Sequenzmuster. Das erlaubt eine Klassifizierung, die auf SNPs (Einzel-Nukleotid-Polymorphismen) von verschiedenen Regionen eines PCR Produktes oder gar von verschiedenen PCR Produkten basiert.

1.3.4 Next Generation Sequencing

Die bisher genannten molekularbiologischen Methoden, PCR und Pyrosequenzierung, haben aufgrund ihrer Spezifität den Nachteil, dass das nachzuweisende Pathogen bekannt sein muss bzw. ähnliche Sequenzen zu bereits bekannten Organismen besitzen muss. Bei neuen, bisher unbekannten Erregern oder solchen Erregern, deren Sequenzen aufgrund geringer Verwandtschaft von bekannten Sequenzen stark abweichen, sind diese Methoden nicht anwendbar (40). Soll eine Probe zudem auf eine große Anzahl an Erregern untersucht werden, ist die Anwendung verschiedener PCR Assays material- und arbeitsaufwendig. In den letzten Jahren Technologien wurden entwickelt, um Nukleinsäuren in Hochdurchsatz Verfahren zu sequenzieren. Diese ermöglichen es, die angesprochenen Limitierungen vorhandener molekularbiologischer Methoden aufzuheben. Durch das so genannte *Next Generation Sequencing (NGS)* ist die massive parallele Sequenzierung von Millionen DNA Fragmenten in einem einzigen Sequenzierlauf möglich. Nachdem die ersten NGS Techniken und Geräte 2005 eingeführt wurden (41) gibt es heute verschiedene NGS Plattformen, die auf verschiedenen Strategien beruhen. Die derzeit am häufigsten verwendeten Technologien stammen von Roche/454, Illumina und Life Technologies. Dabei wird bei allen NGS Technologien die gesamte, in einer Probe vorliegende Nukleinsäure sequenziert ohne vorherige Festlegung auf eine bestimmte Zielsequenz oder einen Zielorganismus. Dadurch bietet sich beispielsweise die Möglichkeit, alle in einer bestimmten Probe vorhandenen Erreger gleichzeitig in einem Ansatz zu detektieren.

Die 454-Technologie von Roche. Die ursprünglich von 454 Life Sciences entwickelte und dann von Roche übernommene 454-Technologie basiert auf der massiven parallelen Pyrosequenzierung (42). Dabei wird die Nukleinsäure in kurze Sequenzabschnitte von 500 bis 1000 bp Länge fragmentiert, die anschließend an Trägermaterial immobilisiert und parallel in einer Emulsions-PCR (emPCR) amplifiziert werden (Abbildung 4). Die eigentliche Sequenzierung erfolgt in Picotiterplatten (PTP), wobei Millionen Pyrosequenzierungen (gleiches Prinzip wie in Abbildung 2B) parallel ablaufen. Die entstehenden Lichtsignale in den einzelnen Vertiefungen der PTP werden von einer *charge-coupled device* (CCD) Kamera aufgenommen und in Sequenzinformationen umgewandelt. Die resultierenden Sequenzabschnitte (*Reads*) werden mit verschiedenen bioinformatischen Werkzeugen ausgewertet. Sequenzen, die auf das humane Genom treffen, werden aussortiert. Die restlichen Sequenzen werden mit Erreger-Datenbanken abgeglichen, um erregerspezifische *Reads* zu erhalten.

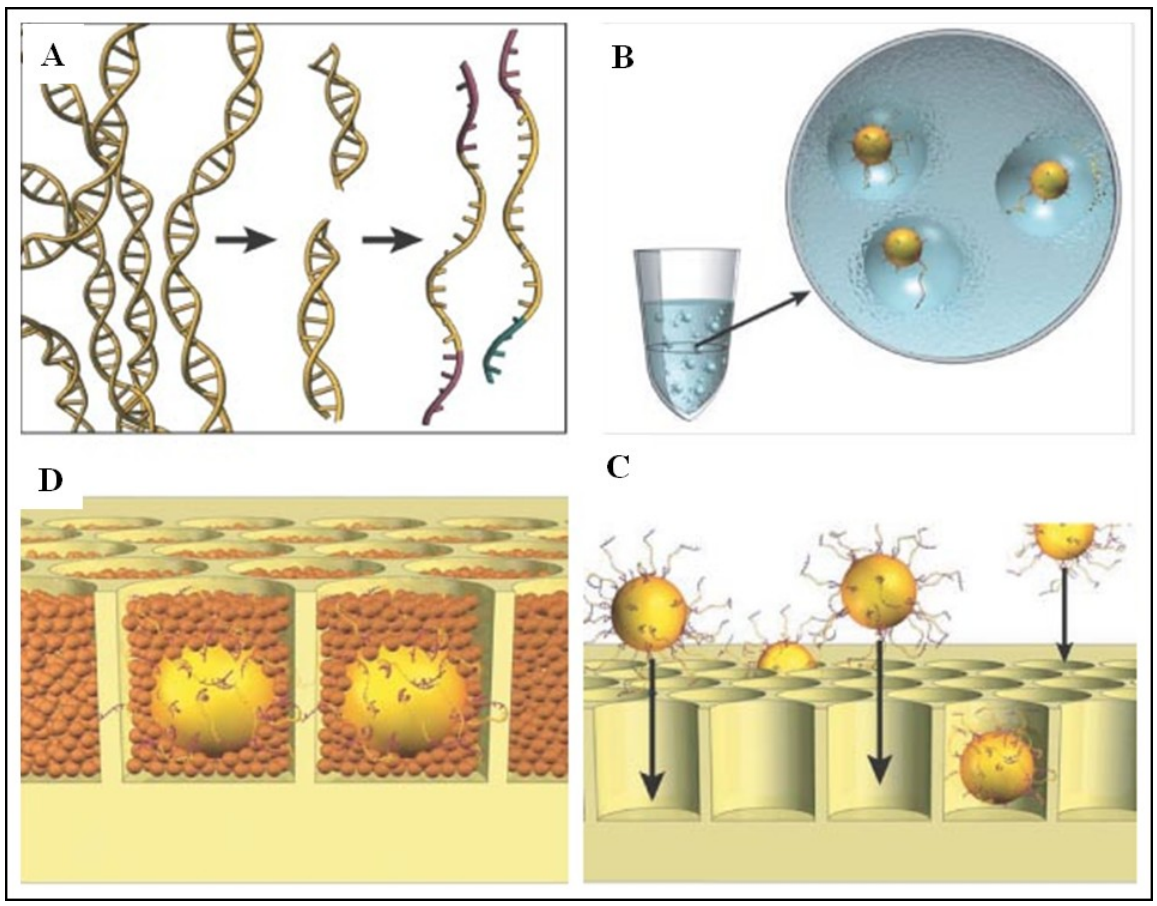


Abbildung 4: Schematische Darstellung der 454-Sequenzierung. A Genomische DNA wird isoliert, fragmentiert, an Adaptoren ligiert (rot und grün) und in Einzelstränge aufgetrennt. **B** Die Fragmente werden an Trägermaterialien (*Capture Beads*) gebunden (ein Fragment / *Bead*). In Mikroreaktoren innerhalb einer Öl-in-Wasser Emulsion erfolgt die PCR Amplifikation der DNA Fragmente. Es entstehen Beads, die jeweils 10 Millionen Kopien eines einzigartigen DNA Fragments tragen. **C** Die Emulsion wird aufgebrochen und die DNA Stränge denaturiert. Jedes *Capture Bead* mit einem ssDNA Klon wird in eine Vertiefung der Picotiterplatte (PTP) gegeben. **D** Zusammen mit kleineren *Beads,* auf denen Enzyme für die Pyrosequenzierung immobilisiert sind (orange), erfolgt die massive parallele Pyrosequenzierung aller DNA Fragmente. Modifiziert nach (42).

Anwendung der 454-Technologie zur Erregersuche. Die 454-Technologie erreicht im Vergleich zu anderen NGS Technologien eine relativ lange Leselänge von ca. 330 Basen je *Read* (43), mit neueren Kits sogar bis zu 700 Basen. Des Weiteren ist die Laufzeit mit ca. acht Stunden kürzer als bei den meisten anderen Plattformen, bei denen ein Sequenzierlauf bis zu acht Tage (Illumina) dauern kann. Durch beide Eigenschaften eignet sich die 454-Technologie unter anderem für Metagenom Studien, also die Sequenzierung der Gesamtheit aller Mikroorganismen und Viren einer bestimmten Lebensgemeinschaft (44). Durch den Vergleich der *Reads* mit bereits bekannten Sequenzen in Gendatenbanken können Erregergenome identifiziert werden. Durch das Auffinden von Sequenzhomologien zu bereits bekannten Spezies können zudem neuartige Erreger gefunden und phylogenetisch eingeordnet werden. Das Prinzip der Metagenom Analyse kann zudem angewendet werden, wenn beispielsweise eine klinische Probe auf die Anwesenheit von Infektionserregern untersucht

werden soll. So wurde die 454-Sequenzierung verwendet, um neue Viren zu identifizieren und mit Erkrankungen des Menschen zu assoziieren (17, 45, 46).
In dieser Arbeit wird die 454-Technolgie angewendet, um nach einer möglichen infektiösen Ursache des plötzlichen Kindstodes zu suchen.

Der plötzliche Kindstod (*sudden infant death syndrome*, SIDS) ist definiert als das plötzliche Versterben eines Säuglings, überwiegend im ersten Lebensjahr und meistens in der vermuteten Schlafphase, ohne dass durch eine umfassende Autopsie, sowie eine Untersuchung des Todesortes eine Ursache für den Tod gefunden werden kann (47). Lassen sich in rechtsmedizinischen Untersuchungen alle natürlichen und nicht-natürlichen Todesursachen, wie Vergiftung, Unfälle, Fehlbildungen und Infektionen ausschließen und geben die klinische Vorgeschichte und Analyse der Auffindesituation keine Hinweise auf die Todesursache, so wird als Ausschlussdiagnose der plötzliche Kindstod festgestellt. Dem Deutschen Ärzteblatt zufolge, sterben in Deutschland jährlich etwa 400 Säuglinge an SIDS. Damit ist SIDS die häufigste Todesursache im Kindesalter jenseits der Neugeborenenphase (47, 48). Die Ursachen für SIDS sind weiterhin unbekannt. Es wird allgemein von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen, bei dem sowohl äußere Stressoren, wie Rauchen der Eltern und Bauchlage des Kindes, als auch eine Vulnerabilität (aufgrund bisher ungeklärter innerer Faktoren) des Kindes in einer kritischen Phase seiner Entwicklung zum plötzlichen Tod führen (47). Ein Einfluss von Infektionserregern wird ebenfalls diskutiert, da in Studien an SIDS Proben eine erhöhte Prävalenz von bestimmten Viren und Bakterien festgestellt werden konnte. So wurden Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* und *Enterococcus faecium*, sowie Epstein Barr Viren (EBV) und das Humane Herpes Virus 6 (HHV-6) in Proben von SIDS Fällen gefunden (47, 49-52). Eine andere Studie führt eine Ljungan Virus Infektion als mögliche Ursache für SIDS an (53). Diese Studien haben ihre Limitierungen, da zum einen nur eine geringe Anzahl an Fällen und/oder jeweils nur bestimmte Organe untersucht wurden, zum anderen eine spezifische und gezielte Suche nach bestimmten Infektionserregern erfolgte.
Durch die Anwendung des NGS ergibt sich die Möglichkeit, Gewebeproben von SIDS Fällen umfassend auf das Vorhandensein von Infektionserregern zu untersuchen, ohne sich auf ein bestimmtes Erregerspektrum zu beschränken. Ziel dieser Arbeit ist es, ein Protokoll zur Aufarbeitung der Gesamtnukleinsäure (DNA und RNA) aus verschiedenen humanen Geweben von SIDS Fällen, sowie zur Vorbereitung der Nukleinsäureextrakte für das NGS mittels der 454-Technologie zu entwickeln.

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen molekularbiologische Methoden entwickelt und etabliert werden, mit denen eine schnelle und zuverlässige Detektion von hochpathogenen Erregern ermöglicht wird. Dies soll sowohl Verfahren beinhalten, die spezifisch sind und gezielt bestimmte Erreger identifizieren, als auch Techniken, mit denen ein „offener Blick“ in die Probe möglich ist (Abbildung 5). Die entwickelten Methoden sollen zum einen der optimierten molekularbiologischen Diagnostik von Infektionserregern, wie beispielweise von humanpathogenen Pockenviren dienen. Zum anderen soll die Detektion von biologischen Agenzien verbessert werden. Dazu wurden im Einzelnen folgende Ziele definiert:

- **Entwicklung eines allgemeinen Verfahrens zur Präparation von Nukleinsäuren aus Umweltproben**, um die PCR-Detektion verschiedener DNA und RNA Erreger zu optimieren

  Dazu soll ein möglichst einfaches und schnelles Protokoll entwickelt werden, das auf verschiedene Umweltsubstanzen anwendbar ist. Zudem sollen beide Arten von Nukleinsäuren, RNA und DNA, gleichzeitig isoliert werden. Dabei sollen Inhibitoren, die eine anschließende PCR-Detektion stören, möglichst effektiv entfernt werden.

- **Spezifischer Nachweis biologischer Agenzien mit der Pyrosequenzierung**

  Durch Kombination der *real-time* PCR mit der Pyrosequenzierung sollen biologische Agenzien spezifisch detektiert und anschließend klassifiziert werden. Die Etablierung einer Internen Kontrolle für PCR und Pyrosequenzierung ermöglicht zudem eine zuverlässige Diagnose.

- **Etablierung von multiplex Detektionsverfahren am Beispiel hochpathogener Erreger**

  Um Zeit, Material und Kosten einzusparen, soll eine multiplex, *real-time* PCR am Beispiel von vier BT Erregern der höchsten Priorität etabliert werden.

  Das Prinzip der *multicolour* Sonden wird am Beispiel der Detektion von Pockenviren verdeutlicht. Dadurch wird eine schnelle und einfache Detektion verschiedener humanpathogener Pockenviren unterschiedlicher Genera möglich. Um die Zuverlässigkeit beider multiplex PCR Verfahren zu sichern, soll jeweils eine geeignete Interne Kontrolle etabliert werden.

Darüber hinaus soll eine multiplex Pyrosequenzierung am Beispiel der Orthopockenviren entwickelt werden, die durch die Generierung eines spezies-spezifischen Sequenzmusters die eindeutige Differenzierung und Klassifizierung aller OPV ermöglicht.

- **Entwicklung eines generischen Verfahrens zur Erregersuche in klinischen Proben**

  Dabei soll ein allgemeinen Protokolls zur Aufarbeitung humaner Gewebeproben für das *Next Generation Sequencing* (NGS) und Suche nach infektiösen Ursachen des plötzlichen Kindstodes (SIDS) entwickelt werden.

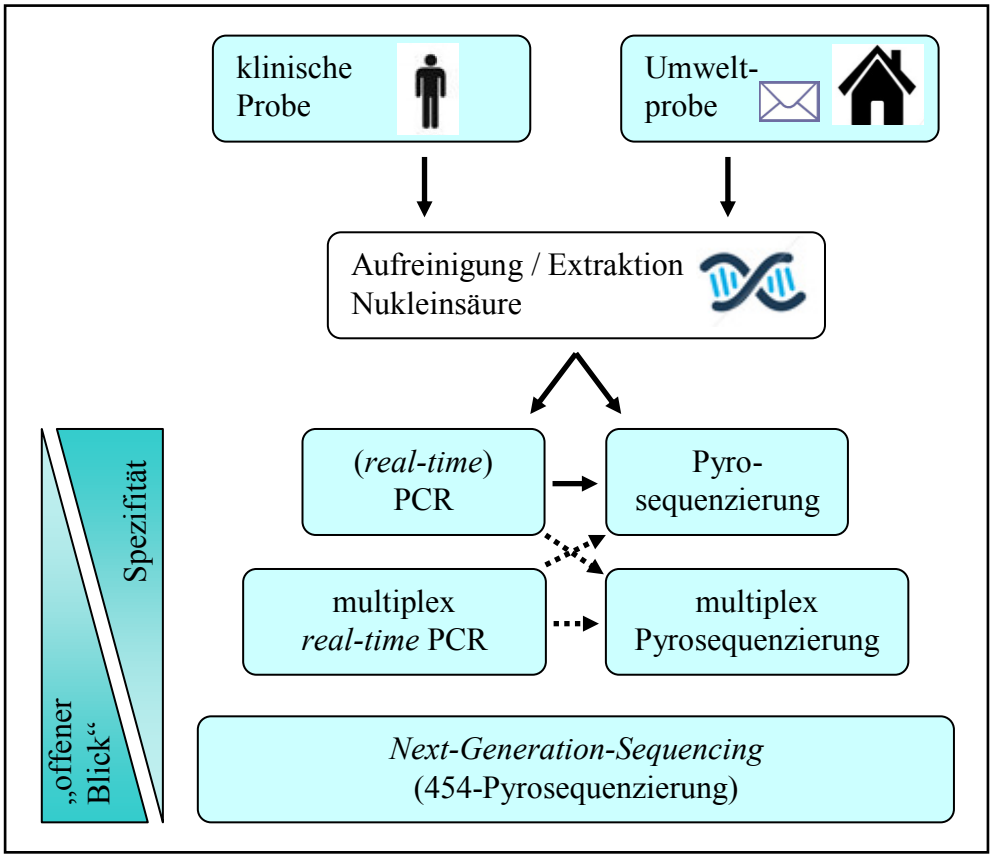


Abbildung 5: Molekularbiologische Diagnostik/ Detektion von hochpathogenen Erregern. Zunächst erfolgt die Extraktion der Nukleinsäuren aus einer klinischen Probe oder einer Umweltprobe. Der molekularbiologische Nachweis der Erreger-Nukleinsäure kann auf drei Ebenen erfolgen. Während mit (*real-time*) PCR Assays und Pyrosequenzierungen Erreger-Nukleinsäuren sehr spezifisch detektiert werden (Ebene 1), ermöglichen multiplex Verfahren einen besseren „offenen Blick“ in eine Probe (Ebene 2). Um in einer Probe nach Nukleinsäuren von unbekannten oder unerwarteten Erregern mit einem vollständig „offenen Blick“ zu suchen, kann das *Next-Generation-Sequencing* verwendet werden (Ebene 3).

2 Material

2.1 Mikroorganismen

CPXV 81/02	Dr. Hermann Meyer, München, D
CPXV GuWi	Deutsches Konsiliarlabor für Pockenviren, RKI
CPXV Brighton Red	ATCC # VR-302
Calpoxvirusisolat (CPXV)	ZBS1, RKI
Vaccinia Lister Elstree (LE)	ATCC # VR-1549
Vaccinia New York City Department of Health Laboratories (NYCDOH)	ATCC # VR-1536
Felines Calicivirus (FCV)	ZBS1, RKI
MPXV MSF #6	Dr. Hermann Meyer, München, D
ECTV MP-Nü	Dr. Hermann Meyer, München, D
CMLV CP-19	Dr. Hermann Meyer, München, D
Dengue Virus 1	ZBS1, RKI
Bacillus anthracis	Dr. Daniela Jacob, RKI
Escherichia coli (Top10)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Francisella tularensis	Dr. Daniela Jacob, RKI
Yersinia pestis	Dr. Daniela Jacob, RKI

2.2 Nukleinsäuren und Plasmide

Gesamt-RNA von folgenden Viren für die Etablierung von PSQ Assays wurde von Allen Grolla, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Kanada bereitgestellt: CCHFV, Lassa Virus, RVFV.

Gesamt-DNAs als Positivkontrollen für die SIDS PCRs von *Enterococcus faecium* wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Guido Werner, RKI. DNA von *Neisseria meningitidis* von Dr. Christoph Schoen, Institute für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg; DNA von *Staphylococcus aureus* von Dr. Ulrich Nübel, RKI und DNA von *Streptococcus pneumoniae* von Prof. Dr. Regine Hakenbeck, Universitätsklinikum Kaiserslautern.

Kontrollplasmid (PCR) pKoMa	Bio & Sell, Nürnberg, D

pCRII TOPO	Life Technologies, Carlsbad, USA
pCR2.1 TOPO	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kontrollplasmide (PSQ) für CCHFV, Lassa Virus, Filovirus & RVFV	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.3 Oligonukleotide

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Oligonukleotide für die einzelnen PCR bzw. PSQ Ansätze aufgeführt. Vorwärts-Primer sind mit „F“ und Rückwärts-Primer mit „R“ bezeichnet. PSQ Primer sind mit „PS“ benannt, biotinylierte Primer sind mit „bio“ gekennzeichnet. Sonden sind entweder mit „TM“ (TaqMan), „TMGB“ (TaqMan, MGB = *Minor Groove Binder*) oder „LNA“ (*locked nucleic acid)* benannt. In den Sequenzen wird die Base “G” klein geschrieben, um Verwechslungen mit “C” vorzubeugen. Folgende Abkürzungen werden verwendet: F = FAM Markierung, V = VIC Markierung, H = HEX Markierung, TEX = Texas Red Markierung, NFQ = *Non-fluorescent quencher*, BBQ = *Black Berry Quencher*, BHQ = *Black Hole Quencher*

[a] *Accession* Nummer der *ncbi* Gen-Datenbank mit entsprechender Lokalisation der Oligonukleotide

Tabelle 3: Primer und Sonden für die *real-time* (PSQ-) PCRs und Pyrosequenzierungen

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR Produktes und Sequenzen (5’ → 3’)	Eintrag in Genbank [a]	Anwendung
	OPV (129 bp)	**EF675191**	
OPV F	TAATACTTCgATTgCTCATCCAgg	54898-921	
OPV R	ACTTCTCACAAATggATTTgAAAATC	55026-001	
OPV TMGB	F-TCCTTTACgTgATAAATCAT NFQ MGB	54980-99	mmHuPox
OPV LNA	Cyan-TCCTTTACgTg+A+T+A+A+A+T+C+A+T-BHQ	54980-99	5-plex BT
	PPV (85 bp)	**AY278208**	
PPV F	TCgATgCggTgCAACAC	455-471	
PPV R	gCggCgTNTTCTTCTCggAC	539-520	
PPV TMGB	V-TgCggTAgAAgCC NFQ MGB	489-501	mmHuPox
	MOCV (91 bp)	**MCU60315**	
MOCV F	CAAgTACAACTTCgTggCgTTT	3223-3244	
MOCV R	CCTACACggAACAgAATgCTTTg	3313-3291	
MOCV TMGB	F-CCACACggAACgAgAA NFQ MGB	3288-3264	mmHuPox
MOCV TMGB	V-CCACACggAACgAgAA NFQ MGB	3288-3264	mmHuPox
	***c-myc* (81 bp)**	**K01906**	
c-myc F	gCCAgAggAggAACgAgCT	427-445	
c-myc R	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA	507-487	

c-myc TM	Cy5-ATgCCCTgCgTgACCAgATCC NFQ	480-461	mmHuPox
	***B. anthracis* (96 bp)**	**AE016879**	
BA dhp_61 F	CgTAAggACAATAAAAgCCgTTgT	4844825-848	
BA dhp_61 R	CgATACAgACATTTAggAACTACAC	4844920-893	
BA dhp_61 LNA	F-CTAAtgAACAA+T+g+A+C+C+C+T-BBQ	4844868-885	5-plex BT
BA dhp_61 F PS	ggACAATAAAAgCCgTTg	4844830-847	PSQ
BA dhp_61 R bio	Biotin-CgATACAgACATTTATTgggAACTACAC	4844920-893	PSQ-PCR
	***Y. pestis* (178 bp)**	**U22457**	
YP inv/IS F	TTATTTACCTgCACTCCCACAA	907-928	
YP inv/IS R	CCAgACCgCAAACTgTTTTA	1084-1065	
YP inv/IS LNA	H-CCTAAAgC+A+A+C+A+C+g+C-BHQ	981-966	5-plex BT
YP inv/IS F PS	TTATTTACCTgCACTCCCACA	907-927	PSQ
YP inv/IS R bio	Biotin-CCAgACCgCAAACTgTTTTA	1084-1065	PSQ-PCR
	***F. tularensis* (101 bp)**	**M93695**	
FT fopA F	TTgggCAAATCTAgCAggTCA	821-841	
FT fopA R	ATCTgTAgTCAACACTTgCTTgAACA	921-896	
FT fopA LNA	Cy5-CCAACATCCC+A+A+g+C+A-BHQ	865-851	5-plex BT
FT fopA PS	AACAggTgCTTgggAT	845-860	PSQ
FT fopA R bio	Biotin-ATCTgTAgTCAACACTTgCTTgAACA	921-896	PSQ-PCR
	Interne Amplifikationskontrolle [b] (139 bp)		
KoMa F	ggTgATgCCgCATTATTACTAgg	198-220	
KoMa R	ggTATTAgCAgTCgCAggCTT	336-316	
KoMa TM	TEX-TTCTTgCTTgAggATCTgTCgTggATCg q	224-251	5-plex BT
KoMa F PS	TgATgCCgCATTATTACTAg	196-219	PSQ
KoMa R bio	Biotin-ggTATTAgCAgTCgCAggCTT	336-316	PSQ-PCR

[b] Synthetisches Plasmid als Interne Amplifikationskontrolle (PCR) bzw. Interne DNA Kontrolle (PSQ)

Tabelle 4: Weitere Primer und Sonden für die PSQ- (*real-time*) PCRs und die Pyrosequenzierungen

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR Produktes und Sequenzen (5' → 3')	Eintrag in Genbank [a]
	CCHFV (181 bp)	**HM452305**
RWC F bio	Biotin-CAAggggTACCAAgAAAATgAAgAAggC	1068-1095
RWC R	gCCACAgggATTgTTCCAAAgCAgAC	1248-1223
RWC R PS	ggATTgTTCCAAAgCAgAC	1241-1223
	Filoviren (293 bp)	**EU224440**
Filo F1	AAgCATTTCCTAgCAATATgATggT	13340-13364
Filo F2	AAgCCTTTCCTAgCAACATgATggT	13340-13364
Filo F3	AAgCATTCCCTAgCAACATgATggT	13340-13364
Filo F PS	ATTYCCTAgCAAYATgATggT	13344-13364
Filo R1	ATgTggTgggTTATAATAATCACTgACATg	13632-13603
Filo R2	gTgAggAgggCTATAAAAgTCACTgACATg	13632-13603

	Lassa Virus (392 bp)	**AY628202**
LV F1	AgAATCAgTgAAAgggAAAgCAAYTC	3921-3896
LV F2	AgAATTAgTgAAAgggAGAgTAAYTC	3921-3896
LV F1 PS	TCAgTgAAAgggAAAgCAAYTC	3917-3896
LV F2 PS	TTAgTgAAAgggAgAgTAAYTC	3917-3896
LV R1 bio	Biotin-CACATCATTggTCCCCATTTACTATgRTC	3527-3555
LV R2 bio	Biotin-CACATCATTggTCCCCATTTACTgTgRTC	3527-3555
	OPV (91 bp)	**DQ121394**
Pox Dpol F bio	CgCgATAATAgATAgTgC	134674-691
Pox Dpol R	gTgTTCRgCTTCCACCAggTC	134764-744
Pox Dpol R PS	gTgTTCRgCTTCCACCAg	134764-741
	RVFV (123 bp)	**EU312138**
RVFV N up	gTCCgAgAgTTTgCTTATCAAgg	1580-1558
RVFV N up PS	CCgAgAgTTTgCTTATCAAg	1578-1557
RVFV N do1 bio	Biotin-gCCACgAgTYAgAgCCAgAAC	1458-1478
RVFV N TM	F-CTCCCAgTCAgCCCCACCATAC XT p	1500-1521
	Interne RNA Kontrolle [c] (88bp)	
FCV F	CgTTACCgCCACACCCAT	
FCV R	gAgTTCACgAAAgATTTCAgACCAT	
FCV TM	Tex-ACCCATCATTCTAACACTCCCgCCAAT-BBQ	

[c] RNA-Extraktions- und Amplifikationskontrolle (FCV), kein Eintrag in der Gen-Datenbank vorhanden

Tabelle 5: Primer für die PSQ- PCR und die multiplex Pyrosequenzierung von OPV

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR Produktes und Sequenzen (5' → 3')	Eintrag in Genbank [a]
	mPox (510 bp)	**AF012825**
mPox F	gTgATTTTggCAATAgTCCATgT	68023-68045
mPox R bio	Biotin-TAAAATggCCgAggAATTTg	68532-68513
mPox PS 1	AAATTCCggATACAT	68138-68152
mPox PS 2	CTTgACAAAAATTgT	68469-68483

Tabelle 6: Primer und Sonden für die erregerspezifischen PCRs mit den SIDS Proben

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR Produktes und Sequenzen (5' → 3')	Eintrag in Genbank [a]
	***Enterococcus faecium* (75 bp)**	**AF130998**
Efaecm F	TTCTTTgCTTTATCCgATgT	622–641
Efaecm R	CggTTTTCTgCTTTTgTAAT	678–696
Efaecm TM	F-ACTAgAACCCATATTCgCC-BBQ	652–670
	***Neisseria meningitidis* (111 bp)**	**CP002424**
Nmen F	TTgTCgCggATTTgCAACTA	79704-79685
Nmen R	gCTgCggTAggTggTTCAA	79594-79612
Nmen TM	F-CATTgCCACgTgTCAgCTgCACAT-BBQ	79657-79634

	***Staphylococcus aureus* (166 bp)**	**FR821779**
Saur S	CCTgAAgCAAgTgCATTTACgA	836540-561
Saur AS	CTTTAgCCAAgCCTTgACgAACT	836705-683
Saur P	F-CATCAgCATAAATATACgCTAAgCCACgTCCA-BBQ	836660-629
	***Streptococcus pneumoniae* (68 bp)**	**CP002121**
Spneu F	ACCgCTggAggAAgCACA	58224-58241
Spneu R	gCCTgTAgCCATTTCgCCT	58291-58273
Spneu TMGB	F-AgACggCAACTggTACT NFQ MGB	58243-58259
	Epstein Barr Virus (=HHV-4) (175 bp)	**HQ020558**
HHV4 F	CCAAgAAggTggCCCAgA	94235-94252
HHV4 R	CgggTTggAACCTCCTTg	94409-94392
HHV4 TM	F-CCgCAgATgACCCAggAgAAggCC-BBQ	94294-94317
	HHV-6 (223 bp)	**AF157706**
HHV6 F	TTTgCAgTCATCACgATCgg	46661-46680
HHV6 R	AgAgCgACAAATTggAggTTTC	46883-46862
HHV6 TM	F-AgCCACAgCAgCCATCTACATCTgTCAA-BBQ	46753-46780
	Lungjan Virus (187 bp)	**AF327920**
LV F	gCggTCCCACTCTTCACAg	239–257
LV R	gCCCAgAggCTAgTgTTACCA	425–405
LV TMGB	FAM-TgTCSAgAggTgAAAgC MGB	289–273

2.4 Geräte

Die folgenden Geräte wurden verwendet. Zur üblichen Laborausstattung gehörende Geräte sind nicht gesondert aufgelistet.

ABI 7500	Life Technologies, Carlsbad, USA
ABI StepOnePlus™	Life Technologies, Carlsbad, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DynaMag™ -2	Life Technologies, Carlsbad, USA
FastPrep Homogenisator	MP Biomedicals, Eschwege, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Fluorometer, Qubit® 2.0	Life Technologies, Carlsbad, USA
GS FLX+ Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Infinite F200 Plattenfluorometer	Tecan Trading AG, Crailsheim, D
LightCycler® 480	Roche Applied Science, Mannheim, D
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
PyroMark ID	Qiagen, Hilden, D

PyroMark Q96 Vacuum Prep	Qiagen, Hilden, D
Rotator SB3	Stuart, Staffordshire, UK
Sandbad	Techne / Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge für Mikrotiter-Platten (Heraeus)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, D
Tissue Lyser II	Retsch / Qiagen, Haan, D
Vakuum Zentrifuge (SpeedVac Concentrator)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Z1 Coulter® Particle Counter	Beckman Coulter, Brea, USA

2.5 Software

E.A.S.Y RH-3 (Gel-Dokumentation)	Herolab, Wiesloch, D
Geneious Pro 5.4.3	Biomatters, Auckland, NZ
LightCycler® 480 Software, Version 1.5	Roche Applied Science, Mannheim, D
TIB MOLBIOL Software	TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, D
PyroMark Q96 ID Software	Qiagen, Hilden, D
StepOne™ Software v2.2.1	Life Technologies, Carlsbad, USA
7500 System SDS v2.0.5	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.6 Kits

Agilent DNA 7500 und RNA 6000 Pico	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agilent High Sensitivity DNA	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
blackPREP Powder DNA/RNA Kit	Analytik Jena, Jena, D
GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors	Roche Diagnostics, Mannheim, D
GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-L)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
GS FLX Titanium emPCR Breaking Kit LV/MV	Roche Diagnostics, Mannheim, D
GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70	Roche Diagnostics, Mannheim, D
MinElute® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
Nucleospin® RNA II, DNA/RNA Buffer Set	Macherey & Nagel, Düren, D

Nucleospin® Plasmid Quickpure Kit	Macherey & Nagel, Düren, D
PyroMark Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden, D
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Qubit® RNA Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
RiboMinus™ Concentration Module	Life Technologies, Carlsbad, USA
RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum®Taq	Life Technologies, Carlsbad, USA
TOPO TA Cloning® Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
WGA2 GenomePlex®	Sigma-Aldrich, München, D
WTA2, TransPlex®	Sigma-Aldrich, München, D

2.7 Chemikalien

Agarose	Life Technologies, Carlsbad, USA
Agencourt® AMPure® XP	Beckman Coulter, Brea, USA
Aqua (ultrapure)	Eppendorf, Hamburg, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D
Ethanol; technisch	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, D
Ladepuffer (6-fach)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Low mass DNA ladder	Life Technologies, Carlsbad, USA
$MgCl_2$	Life Technologies, Carlsbad, USA
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
PCR-Puffer (10x)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Platinum® Taq DNA-Polymerase	Life Technologies, Carlsbad, USA
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Wash Buffer	Qiagen, Hilden, D
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega, Madison, USA
Streptavidin Sepharose	GE Healthcare, Freiburg, D

2.8 Verbrauchsmaterialen

GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit 70x75	Roche Diagnostics, Mannheim, D
LightCycler® 480 Multiwell Plates	Roche Applied Science, Mannheim, D
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche Applied Science, Mannheim, D
96-Well Mikrotiterplatte; Optical Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
Optical Adhesive Covers	Life Technologies, Carlsbad, USA
PyroMark Q96 Plate Low	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden, D

3 Methoden

3.1 Präparation von Nukleinsäuren

Die Isolation von Nukleinsäuren aus verschiedenen Geweben oder Zellkulturüberständen erfolgt, sofern nicht anders beschrieben, mit kommerziell erhältlichen Extraktionskits. Zur Extraktion von RNA und DNA aus derselben Probe wird das Nucleospin® RNA II Kit (Macherey & Nagel) zusammen mit dem *total* DNA/RNA Puffer Set verwendet, bei welchem zunächst die DNA in jeweils 100 µl DNA Elutionspuffer isoliert wird. Nach einem rDNAse Verdau (15 min, Raumtemperatur) auf der Extraktionssäule und zwei Waschschritten erfolgt die Elution der RNA mit 60 µl RNAse freiem Wasser.

3.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Umweltproben

Umweltproben stehen im Gegensatz zu klinischen Proben und sind im weitesten Sinne Stoffe und Substanzen nicht menschlichen oder tierischen Ursprungs. Die in dieser Arbeit verwendeten Umweltsubstanzen sind handelsübliche Stoffe, die in vielen üblichen Haushalten zu finden sind (Tabelle 7). Um Erreger-Nukleinsäuren in Umweltproben nachzuweisen, wurde eine Aufreinigungsmethode aus Anreicherung der Erreger und gleichzeitiger Abreicherung von Inhibitoren und anschließender Extraktion der Nukleinsäuren etabliert.

Tabelle 7: Verwendete Umweltsubstanzen

Umweltsubstanz	Merkmal / Herkunft
Puderzucker	
Schwarzer Pfeffer	gemahlen
Waschpulver	"Persil"
Mehl	Typ 405
Blumenerde	Zimmerpflanzen-Erde
Backpulver	
Salz	Kochsalz
Tabak	aus Zigarette „Camel menthol"
Kaffeepulver	gemahlen
Schwarzer Tee	„Ceylon Assam" aus Teebeuteln

Dazu werden Umweltproben aus je einer pulverigen Substanz und einem Erreger simuliert. Je eine der Umweltsubstanzen wird mit VACV (5×10^6 GE / ml), FCV ($2{,}5 \times 10^6$ GE / ml), Dengue Virus 1 ($2{,}8 \times 10^5$ GE / ml) oder vegetativen *Yersinia pestis* Zellen (5×10^6 GE / ml)

gemischt. Nach Zugabe von 1 ml PBS, erfolgt die Aufreinigung der Nukleinsäuren mit dem blackPREP Powder DNA/RNA Kit der Firma Analytik Jena nach den Herstellerangaben. Nach dem Vorfiltern (2 × 500µl) wird das Filtrat mit je 20 µl der Reagenzien 1 und 2 vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es bildet sich ein Polymer, welches Erregerpartikel aus der Lösung fängt. Nach der Zentrifugation von 2 min mit Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge wird der Überstand entfernt und das gelartige Pellet mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Reagenz 3 und Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler für maximal 20 min wird das Pellet anschließend wieder gelöst. Anschließend wird die Nukleinsäure über Extraktionssäulen (im Kit enthalten) aus den Proben isoliert.

3.3 Quantitative PCR

3.3.1 Standard *real-time* PCR zum Nachweis von DNA

Um Erreger-DNA nachzuweisen, wird die Platinum® Taq DNA Polymerase mit 10 x PCR Puffer verwendet. Die Konzentrationen von Primern, Sonden, $MgCl_2$ und der Nukleotide werden dabei für jeden PCR Assay optimiert. Die Amplifikation erfolgt am ABI 7500 oder am LC480 mit dem Temperaturprotokoll in Tabelle 8.

Tabelle 8: Programm für Standard- PCRs.

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 min	1
95°C	15 s	45
60°C	30 s	

3.3.2 *One-step* RT-PCR zum Nachweis von RNA

Um Erreger-RNA nachzuweisen, wird das *one-step* RT-PCR Verfahren verwendet, bei welchem Reverse Transkription (RT) von RNA in cDNA und anschließende Amplifikation in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Dazu werden kommerziell erhältliche *one-step* RT-PCR Kits verwendet, die alle Reagenzien in optimierten Konzentrationen beinhalten. Lediglich die Primer- und Sondenkonzentrationen werden angepasst. Das empfohlene Temperaturprofil des jeweiligen Kits für die RT-Phase wurde eingehalten. Für den Nachweis von Nukleinsäuren aus Umweltproben wurde das *one-step* RT-PCR Kit von Qiagen verwendet. RNA für die Pyrosequenzierung wurde mit dem *one-step* RT-PCR Kit von Invitrogen amplifiziert.

3.3.3 Multiplex *real-time* PCR

Durch Kombination einzelner PCR Assays in einem Reaktionsgefäß (multiplex PCR) ist die zeitgleiche Detektion verschiedener Zielsequenzen aus einer Probe möglich. Dabei ist jede Sonde mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, sodass eine getrennte, eindeutige Zuordnung positiver Signale in den verschiedenen Detektionskanälen des *real-time* PCR Gerätes zu der jeweiligen Zielsequenz möglich ist. In dieser Arbeit wurde eine multiplex PCR zum Nachweis von vier hochpathogenen Erregern, sowie einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) entwickelt (Tabelle 9). Die Detektion der fünf verschiedenen Farbstoffe - FAM, HEX, Cyan 500, Cy5, Texas Red - erfolgt mit dem LC480. Da sich die Emissionspektren der Farbstoffe teilweise überlappen, kann ein Kanal fälschlicherweise das Signal eines anderen Farbstoffes detektieren. Um diesen „crosstalk" zu korrigieren, muss zunächst eine Farbkompensation (*Color Compensation, CC*) nach Herstellerangaben durchgeführt werden.

Tabelle 9: Multiplex *real-time* PCR mit Reporterfarbstoffen

Agens/ Zielsequenz	Assaybezeichnung	Reporter
Bacillus anthracis	BA dhp_61	FAM
Francisella tularensis	FT fopA	Cy5
Yersinia pestis	YP inv/IS	HEX
OPV	OPV	Cyan 500
IAC	KoMa	Texas Red

Die multiplex PCR wird nach dem Protokoll in Tabelle 10 angesetzt und mit dem Temperaturprofil in Tabelle 8 durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit der Gerätesoftware, wobei jeder Detektionskanal einzeln ausgewertet wird. Zur Korrektur der Emissionsspektren der einzelnen Farbkanäle wird die vorher durchgeführte CC angewendet.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die multiplex *real-time* PCR

Reagenz	25 µl Ansatz	
10 × Puffer	2,5	µl
$MgCl_2$	2	mM
dNTPs	100	µM
Primer F BA dhp_61, KoMa (jeweils)	0,2	µM
Primer R BA dhp_61, KoMa (jeweils)	0,2	µM
Primer F YP inv/IS, FT fopA, OPV (jeweils)	0,3	µM
Primer R YP inv/IS, FT fopA, OPV (jeweils)	0,3	µM
Sonden OPV, KoMA (jeweils)	0,04	µM
Sonden YP inv/IS, FT fopA, BA dhp_61 (jeweils)	0,1	µM
Platinum Taq	1	U
Wasser	ad 24	µl
DNA	1	µl

3.3.4 *Multicolour*, multiplex *real-time* PCR

In dieser Arbeit wurde eine *multicolour*, multiplex PCR entwickelt, die die verschiedenen humanpathogenen Pockenviren detektieren kann. Dazu wird die OPV spezifische Sonde FAM markiert, die PPV spezifische Sonde mit VIC, während die Detektion von MOCV mit zwei Sonden erfolgt, die bei gleicher Sequenz mit FAM bzw. VIC markiert sind (Tabelle 3). Zusätzlich wird eine vierte PCR zur Detektion der Internen Kontrolle *c-myc* mit einer Cy5 markierten Sonde hinzugefügt. Der PCR Ansatz ist in Tabelle 11 dargestellt, mit den entsprechenden Sondenkonzentrationen in Tabelle 12. Während die Einzel-PCRs mit einem kurzen Temperaturprogramm durchgeführt werden, wird das Profil für die mmPCR angepasst (Tabelle 13), indem ein zusätzlicher Elongationsschritt eingeführt wird. Die PCR erfolgt am ABI 7500.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die *multicolour*, multiplex *real-time* PCR

Reagenz	25 µl Ansatz
10 × Puffer	2,5 µl
$MgCl_2$	4 mM
dNTPs	100 µM
Primer F (jeweils)	0,3 µM
Primer R (jeweils)	0,3 µM
Sonde(n)	variabel [a]
Platinum Taq	1 U
Wasser	ad 24 µl
DNA	1 µl

[a] Sondenkonzentration je nach PCR Methode unterschiedlich, siehe Tabelle 12

Tabelle 12: Sonden für die uniplex bzw. *multicolour*, multiplex *real-time* PCR

Sonde	Markierung	Konzentration uniplex	Konzentration multiplex
OPV	FAM	0,4 µM	0,1 µM
PPV	VIC	0,1 µM	0,1 µM
MOCV	FAM	0,1 µM	0,072 µM
MOCV	VIC	-	0,2 µM
c-myc	Cy5	0,1 µM	0,1 µM

Tabelle 13: Programm für die uniplex bzw. *multicolour*, multiplex *real-time* PCR

Temperatur	Zeit uniplex PCR	Zeit mmPCR	Zyklen
95°C	10 min	10 min	1
95°C	15 s	15 s	45
60°C	34 s	30 s	
72°C	0 s	34 s	

farblich markiert: Messung des Fluoreszenzsignals

3.3.5 Validierung von *real-time* PCR Assays

Um einen PCR Assays zu validieren, werden die Intra- und Interassayvarianzen bestimmt, sowie eine Probit Analyse durchgeführt. Für die Varianzanalysen wird eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Plasmid DNA mit 10^4 bis 10 Kopien pro Reaktion hergestellt und in Vierfachbestimmung in der *real-time* PCR gemessen (Intraassayvarianz). Diese Analyse wird in Doppelbestimmungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt (Interassayvarianz). Die Probit Analyse dient der Bestimmung der unteren Nachweisgrenze (NWG). Dazu wird die jeweilige Kontroll-Plasmid DNA in Verdünnungen von 100 bis 0,1 Kopien pro Reaktion in neun parallelen Ansätzen gemessen. Anschließend wird mit Hilfe des PASW Statistikprogrammes (Version 18.0.3, IBM, Armonk, NY, USA, www.ibm.com) die Kopienzahl der jeweiligen Plasmid DNA berechnet, die mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit mit dem jeweiligen PCR System detektiert wird.

3.4 Klonierung von Positivkontrollen

Als Positivkontrollen für die verschiedenen PCRs wird das jeweilige PCR Produkt in einen Plasmidvektor kloniert. Dabei erfolgt eine TOPO TA Klonierung des jeweiligen PCR Produktes in den Vektor pCR2.1-TOPO bzw. pCRII-TOPO mit dem TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben. Die Vektoren werden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Nach dem Ausplattieren der transformierten Bakterien und der Anzucht bei 37°C über Nacht, erfolgt die Überprüfung einzelner Klone durch eine konventionelle Kolonie-PCR mit M13-Primern, welche in der Vektorsequenz liegen. Positive Klone werden in Flüssigkulturen vermehrt und die Plasmide mit dem Nucleospin Plasmid Quickpure Kit aufgereinigt. Über eine Sanger Sequenzierung wird die Sequenz des Inserts überprüft (3.5). Nach einer Konzentrationsbestimmung werden die Plasmide bei -20°C gelagert. Ein Teil der Flüssigkultur des jeweiligen Klons wird mit Glycerol bei -80°C eingefroren.

3.5 DNA Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von DNA Fragmenten nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (36) erfolgte mit dem ABI PRISM® BigDye Terminator v3.1 Kit. Dabei werden in einer PCR Reaktion unterschiedlich lange DNA Fragmente erzeugt, die in einer hoch auflösenden Kapillar- Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA

werden 150 – 300 ng DNA eingesetzt, von PCR Produkten je nach Länge 1 ng (100 -200 bp) bis 20 ng (500 -1000 bp) DNA. Die Sequenzierungs- PCR wird wie in Tabelle 14 angesetzt und erfolgt nach dem Protokoll in Tabelle 14 am Eppendorf Thermocycler. Nach der PCR Reaktion erfolgt eine Aufreinigung durch Gelfiltration und die eigentliche Sequenzierung am 3500xl Dx Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabelle 14: Ansatz und Programm der Sequenzierungs- PCR

Reagenz	10 µl Ansatz
DNA	1 - 4 µl
Sequenzierprimer	0,5 µl
BigDye 3.1	1 µl
5 x Puffer	1,5 µl
PCR Wasser	ad 10 µl

Temperatur	Zeit	Zyklen
96°C	2 min	1
96°C	10 s	25
45-60°C*	5 s	
60°C	4 min	
4°C	∞	1

* *Annealing*-Temperatur des Sequenzierprimers

3.6 Pyrosequenzierung

3.6.1 Screening-PSQ Assays

Für folgende Erreger wurden PSQ Assays auf der Basis vorhandener PCR Assays etabliert: CCHFV, Lassa Virus, Filoviren, OPV, RVFV, *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*. Zusätzlich wurde ein PSQ Assay für die Interne Amplifikationskontrolle KoMa entwickelt. Primer und ggf. Sonden für die PCR, sowie die PSQ sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Erreger-DNA, sowie die Interne Kontrolle pKoMa werden mit einem Platinum Taq Polymerase Mix amplifiziert (Tabelle 15). Zur Amplifikation von RNA wird das One-Step RT-PCR Kit von Invitrogen verwendet (Tabelle 16). Die PCR wird am ABI StepOnePlus mit dem Temperaturprofil in Tabelle 17 durchgeführt, wobei der Heizblock des Gerätes in verschiedene Zonen unterteilt wird, sodass für die verschiedenen Assays verschiedene *Annealing*- Temperaturen eingestellt werden können. Dabei werden folgende *Annealing*-Temperaturen gewählt: 54°C für CCHFV, Lassa Virus, Filoviren und RVFV; 57°C für die Bakterienassays, sowie für OPV und 60°C für die IAC und eine FCV PCR, die als Kontroll-PCR für die erfolgreiche RNA Extraktion verwendet wird.

Die Aufreinigung des biotinylierten DNA-Einzelstrangs erfolgt an der PyroMark Q96 Vacuum Workstation. Dabei werden bis zu 25 µl PCR Produkt mit 40 µl PyroMark Binding Buffer und 3 µl Streptavidin-Sepharose in eine Vertiefung der PCR Platte gegeben und mit Wasser auf 80 µl aufgefüllt. Nach Inkubationen bei RT von 5 min und weiteren 5 min unter Schütteln (1400 rpm), wird das PCR Produkt durch aufeinanderfolgende Inkubationen mit

70% Ethanol, NaOH (0,2 M) und Waschpuffer (1-fach) zu einem Einzelstrang denaturiert und aufgereinigt. Die Einzelstränge werden in die PSQ Platte gegeben, in der sich der PSQ Primer (375 nM) in 40 µl PyroMark Annealing Buffer befindet. Anschließend erfolgt die Bindung des PSQ Primers an das einzelsträngige PCR Produkt durch Inkubation von 2 min bei 80°C im Sandbad. Die Sequenzierung erfolgt im PyroMark ID Gerät mit zyklischer Zugabe (60-mal) von Nukleotiden in der Reihenfolge CTGA (15-mal CTGA).

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die DNA PSQ- PCR

Reagenz	25 µl Ansatz	
10 × Puffer	2,5	µl
$MgCl_2$	4	mM
dNTPs	100	µM
Primer F	0,4	µM
Primer R	0,4	µM
Sonde [a]	0,1	µM
Platinum Taq	1	U
Wasser	ad 24	µl
DNA	1	µl

[a] Für OPV und FT liegt keine passende Sonde vor.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die *one-step* RT PSQ- PCR

Reagenz	25 µl Ansatz	
Reaction Mix	12,5	µl
Primer F [a]	0,5	µM
Primer R [a]	0,5	µM
Sonde [b]	0,1	µM
RT-Mix	1	µl
Wasser	ad 24	µl
RNA	1	µl

[a] Für Lassa Virus PCR je 2 F und R Primer mit je 0,5 µM eingesetzt; für Filovirus PCR 3 F Primer äquimolar mit zusammen 0,5 µM und 2 R Primer äquimolar mit zusammen 0,5 µM eingesetzt.
[b] Sonde nur für RVFV vorhanden.

Tabelle 17: Programm für die PSQ- PCRs

Temperatur	Zeit uniplex	Zyklen
50°C	15 min	1
95°C	2 min	1
95°C	15 s	45
54/57/60°C*	30 s	
72°C	20 s	

* Annealingtemperatur abhängig von PCR Assay;
Einteilung Heizblock in verschiedene Zonen
farblich markiert: Messung des Fluoreszenzsignals

3.6.2 Multiplex PSQ

Die multiplex PSQ zur Identifizierung von OPV basiert auf der Sequenzierung eines PCR Produktes mit zwei PSQ Primern. Der Ansatz für die mPSQ-PCR ist in Tabelle 18 und das Temperaturprofil in Tabelle 19 gezeigt. Bis zu 25 µl PCR Produkt werden, wie in 3.6.1 beschrieben, aufgereinigt. Für die Sequenzierung werden beide PSQ Primer mit je 10 pmol eingesetzt. Die Nukleotide werden in acht Zyklen AGTC eingespritzt.

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die mPox PSQ-PCR

Reagenz	25 µl Ansatz	
10 × Puffer	2,5	µl
$MgCl_2$	4	mM
dNTPs	80	µM
Primer mPox F	0,8	µM
Primer mPox R	0,8	µM
Platinum Taq	1	U
Wasser	ad 22	µl
DNA	3	µl

Tabelle 19: Programm für die mPox PSQ-PCR

Temperatur	Zeit uniplex	Zyklen
95°C	5 min	1
95°C	15 s	45
54°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	1

3.6.3 Quantitative Gelelektrophorese

Für die quantitative Gelelektrophorese werden 2 µl PCR Produkt mit 1 µl 6-fach Ladepuffer gemischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, welches 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthält. Parallel dazu werden 2 µl eines Massenstandards (low mass DNA ladder) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in 1 × TAE Puffer bei 90 V für ca. 30 min. Die Quantifizierung der resultierenden Banden erfolgt mit der E.A.S.Y RH-3 Software.

3.7 Erregersuche in humanem Gewebe von SIDS Proben

3.7.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus humanem Gewebe

Die Gewebeproben werden unter sterilen Bedingungen in der Rechtsmedizin Berlin gewonnen, bei -80°C eingefroren und für den Transport in das RKI und die Lagerung nicht

aufgetaut. Pro SIDS Fall werden 18-22 Gewebeproben, wenn möglich in doppelter Ausführung, entnommen. Für die Extraktion der Nukleinsäuren werden ca. 3 mm^3 große Stückchen des gefrorenen Gewebes mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und in ein Reaktionsgefäß mit Keramikkügelchen gegeben. Nach Zugabe von jeweils 350 µl RA1 Puffer (enthält 3,5 µl β-Mercaptoethanol) aus dem Nucleospin® RNA II Kit (Macherey & Nagel) wird das Gewebe in dem FastPrep Homogenisator (5 m/sec für 20 sec, 2-3 Wiederholungen) aufgeschlossen und die Probe homogenisiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 5000 g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit Zugabe von 350 µl 70 %igem Ethanol erfolgt die weitere Extraktion der DNA und anschließend der RNA nach den Herstellerangaben mit dem *total* DNA/RNA Puffer Set (Macherey & Nagel). Die Extraktion von DNA und RNA aus Körperflüssigkeiten (Blut, Liquor) erfolgt aus 100 µl Probe durch Zugabe von 350 µl RA1 Puffer (enthält β-Mercaptoethanol) und anschließend ebenfalls nach Herstellerangaben. Die DNA wird in jeweils 100 µl DNA Elutionspuffer und die RNA in 2 × 30 µl RNAse freiem Wasser eluiert. Sofern sie nicht sofort weiter verwendet werden, wird die DNA bei -20°C und die RNA bei -80°C gelagert.

3.7.2 Erregerspezifische *real-time* PCRs

Für folgende DNA Erreger werden spezifische *real-time* PCRs etabliert und validiert: *Enterococcus faecium*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, EBV und HHV-6 (Tabelle 6). In der PCR werden jeweils 2,5 µl der Gewebe-DNAs in Doppelbestimmung wie in 3.3.1 beschrieben amplifiziert. Parallel wird eine *c-myc* PCR mit allen DNA Proben durchgeführt, um eine erfolgreiche Extraktion nachzuweisen. Zusätzlich erfolgt eine Lungjan Virus spezifische *one-step* RT-PCR wie in 3.3.2 beschrieben mit jeweils 2,5 µl Gewebe RNA.

3.7.3 Vorbereitung der Gewebe RNA für das *Next Generation Sequencing*

Die 454-Sequenzierung der SIDS Proben soll zunächst nur mit der isolierten RNA erfolgen. Mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop) wird die Konzentration der extrahierten RNAs bestimmt. Jeweils 120 ng von jeder RNA eines SIDS Falles werden gemischt. Dieses RNA-Gemisch wird mit einer Vakuum Zentrifuge (SpeedVac) aufkonzentriert, sodass maximal 20 µl RNA-Gemisch übrig bleiben. Anschließend wird die humane ribosomale RNA (rRNA) mithilfe des RiboMinus™ Transcriptome Isolation Kit (Life Technologies) nach

Herstellerangaben entfernt. Dabei wird die Gesamt-RNA (<20 µl) mit der RiboMinus™ Sonde (8 µl) inkubiert (5 min bei 70°C; 30 min bei 37°C im Wasserbad). Die gebundene rRNA wird anschließend über magnetische Kügelchen (15 min bei 37°C) entfernt. Das RNA-Gemisch, das keine rRNA mehr enthält, wird mit dem RiboMinus™ Concentration Module nach Herstellerangaben aufkonzentriert und mit 12 µl Wasser eluiert.
Zur Quantifizierung des abgereicherten RNA-Gemisches wird das Qubit® RNA Assay Kit mit dem Qubit® Fluorometer verwendet. Um eine geeignete Ausgangskonzentration an RNA für das Sequenzieren zu erhalten, werden 25 - 30 ng des RNA-Gemischs anschließend mit dem Whole Transcriptome Amplification Kit (WTA2, TransPlex®, Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben vor-amplifiziert. Abschließend erfolgt die Aufreinigung des WTA Produktes, welches doppelsträngige DNA darstellt, mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), wobei mit 10 µl EB Puffer eluiert wird. Die Quantifizierung wird mit dem Qubit® dsDNA BR Assay Kit durchgeführt.

3.7.4 Herstellung einer 454-Bibliothek

Die Herstellung einer DNA- Bibliothek für das Sequenzieren mit der 454-Technologie erfolgt mit dem GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche). Ausgangsprodukt für die Bibliothek sind jeweils 500 ng WTA Produkt des jeweiligen RNA-Gemisches (siehe 3.7.3), wobei eine entsprechende Verdünnung des WTA Produktes in TE Puffer auf 16 µl Gesamtvolumen erfolgt. Die Erstellung der DNA- Bibliothek beginnt mit der Reparatur der Fragmentenden (*Fragment End Repair*) wie in der Anleitung (GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit, Version Oktober 2009, überarbeitet Januar 2010) beschrieben. Nach Hinzufügen eines 3'-Adenin-Überhanges (*A-Tailing*) erfolgt die Ligation eines Multiplex Identifier (MID)-Adapters (MID-2) durch TA-Ligation. Der Adapter besteht aus doppelsträngiger DNA mit einem A- und einem B- Teil, sowie einer FAM Markierung. Zusätzlich enthält er eine 10 Basen kurze Erkennungssequenz, die spezifisch für jeden MID-Adaptor ist. Er dient sowohl zur Aufreinigung, Amplifikation und Quantifizierung der DNA-Bibliothek als auch zur Identifizierung der *Reads* nach der Sequenzierung. Abschließend erfolgt eine Größenaufreinigung über magnetische Kügelchen. Die fertige DNA- Bibliothek wird im Plattenfluorometer mithilfe der FAM Markierung des Adapters und eines mitgeführten Standards (in der Anleitung beschrieben) direkt quantifiziert.

3.7.5 DNA Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der Fragmentlängen und Konzentrationen der DNA Bibliothek wird der 2100 Bioanalyzer (Agilent) verwendet. Dieses System basiert auf der *Microfluidics*-Technologie und ermöglicht die elektrophoretische Größenbestimmung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren auf einem Glaschip. Die Qualitätskontrolle der DNA-Bibliothek erfolgt mit einem High Sensitivity DNA Chip nach Herstellerangaben, wobei 1 µl Probe aufgetragen werden.

3.7.6 Emulsions-PCR und 454-Sequenzierung

Vor der Emulsions-PCR (emPCR) wird die fertige DNA- Bibliothek auf 10^7 mol/µl in TE Puffer verdünnt. Die emPCR wird mit dem GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei für eine Bibliothek ein *Cup* und damit eine von zwei Regionen pro Picotiterplatte (PTP) verwendet wird. Dabei wird die einzelsträngige DNA- Bibliothek über den B-Teil des Adapters an Trägermaterialien, sogenannten *Capture Beads*, immobilisiert. Die Amplifikation der DNA Fragmente der Bibliothek erfolgt in Mikroreaktoren, die sich in dem Öl-Wasser-Gemisch ausbilden. Um eine spätere Isolation der Amplifikate zu ermöglichen, werden in der emPCR Biotin-markierte Primer verwendet, die an die Adapterregion binden. Die Emulsion wird mit dem GS FLX Titanium emPCR Breaking Kit aufgebrochen und die *Capture Beads* mit den amplifizierten DNA Fragmenten über Streptavidin-gekoppelte magnetische *Beads* angereichert. Nach der Bindung des Sequenzierprimers werden die *Beads* mit den amplifizierten DNA Fragmenten zusammen mit Enzym *Beads* auf die PTP gegeben. Die PTP besitzt 1,8 Millionen Kavitäten, in die jeweils ein *Capture Bead* mit den Enzym *Beads* passt. Für die Sequenzierung der SIDS Proben wird das GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70 verwendet. Es wird das NGS Gerät GS FLX+ von Roche verwendet, das die Lichtsignale aus den Pyrosequenzier-Reaktionen der einzelnen Vertiefungen mit einer CCD Kamera detektiert. Aus den Lichtsignalen werden sogenannte *flowgrams* erstellt und zusammen mit den zugehörigen Sequenzen als *standard flowgram format* (sff) Datei dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Entfernung von PCR Inhibitoren aus Umweltproben

Bisherige Verfahren zur Detektion von Erreger-Nukleinsäuren basieren auf der Isolation von DNA bzw. RNA aus der jeweiligen Probenmatrix mit kommerziell erhältlichen Extraktionskits. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Isolation von VACV DNA aus Umweltproben wie Blumenerde oder Backpulver mit den herkömmlichen Methoden kaum oder nicht möglich war (54). So gelang es in der vorangegangenen Studie trotz sorgfältiger Anpassung der Präparationsmethoden nicht, VACV-DNA mit hohen Konzentrationen (4×10^8 GE/ Probe) aus Blumenerde zu isolieren und mit Hilfe einer spezifischen *real-time* PCR nachzuweisen. Ebenso konnte VACV-DNA mit mittleren Konzentrationen (6×10^5 GE/ Probe) in Substanzen wie Waschpulver, Backpulver oder schwarzem Tee nicht mit der PCR detektiert werden (Tabelle 20).
Zur Verbesserung der Detektion von Erreger-Nukleinsäuren aus Umweltproben wurden in dieser Arbeit folgende Verfahren entwickelt: (i) Etablierung einer Aufreinigungsmethode für Nukleinsäuren aus Umweltproben. (ii) Anwendung der entwickelten Methode auf RNA Viren. (iii) Vergleich zweier PCR Systeme (*one-step* und *two-step* PCR) zum Nachweis von Erreger- RNA und DNA. (iv) Validierung des entwickelten Verfahrens mit verschiedenen hochpathogenen Erregern, sowie Entwicklung eines allgemeinen Protokolls zum Nachweis von Nukleinsäuren aus Umweltproben.

Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Umweltproben. Vor die eigentliche Nukleinsäure Extraktion mit kommerziell erhältlichen Kits wurde ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt eingeführt. Damit wurden Erreger-Partikel angereichert und inhibitorische Substanzen entfernt, bevor die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte. Um dieses neue zweistufige Präparationsverfahren mit dem herkömmlichen Verfahren ohne Aufreinigung zu vergleichen, wurden VACV mit je einer von zehn handelsüblichen Haushaltssubstanzen vermischt und wie in 3.2 beschrieben, aufgereinigt. Die Detektion erfolgte mit einer OPV spezifischen *real-time* PCR mit der Platinum Taq Polymerase. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines entsprechenden Plasmidstandards wurde eine Standardgerade erstellt, mit der die Konzentration der Ausgangslösung des Virus bestimmt wurde. Somit wurden VACV mit 50.000 GE / PCR eingesetzt. Tabelle 20 zeigt die vergleichenden Ergebnisse für den

Nachweis von VACV aus den verschiedenen Haushaltssubstanzen ohne und mit zusätzlicher Aufreinigung vor der DNA Extraktion. Durch die zusätzliche Aufreinigung war es möglich VACV DNA aus Blumenerde und Backpulver nachzuweisen, was ohne Aufreinigung nicht gelang. Die Detektion von VACV in Waschpulver und schwarzem Tee war trotz Aufreinigung nicht möglich.

Tabelle 20: Vergleich der VACV Detektion durch *real-time* PCR in aufgereinigten und nicht aufgereinigten Proben

Probe	VACV	
	nicht aufgereinigt 600.000 GE/PCR (54)	aufgereinigt 50.000 GE/PCR
Ko [a]	+	+
Puderzucker	+	+
Schwarzer Pfeffer	+	+
Waschpulver	-	-
Mehl	+	+
Blumenerde	-	+
Backpulver	-	+
Salz	+	+
Tabak	+	+
Kaffeepulver	+	+
Schwarzer Tee	-	-

[a] VACV Kontrolle ohne zusätzliche Substanz
+: positiv in PCR
-: negativ in PCR

Erweiterung des Verfahrens auf RNA Viren und Vergleich zweier PCR Systeme. Zusätzlich zum Nachweis von DNA Erregern, wie dem VACV, ist auch die Detektion von RNA Viren aus Umweltsubstanzen notwendig. Das zweistufige Präparationsverfahren wurde daher in einem nächsten Etablierungsschritt für die Aufreinigung von Virus RNA verwendet. Als Modell-Organismus für RNA Viren wurde FCV mit 25.000 GE / PCR verwendet und mit der beschriebenen Methode aufgereinigt. Da die Amplifikation und damit der Nachweis von RNA durch *one-step* oder *two-step* RT-PCR erfolgen kann, sollte untersucht werden, ob der Effekt des Abreicherns von Inhibitoren von dem verwendeten PCR System abhängig ist. Der Nachweis erfolgte mit beiden PCR Systemen. Während bei der *two-step* RT-PCR cDNA Synthese und *real-time* PCR Amplifikation mit der Platinum Taq Polymerase separat und nacheinander erfolgen, finden beide Schritte bei der *one-step* RT-PCR kombiniert in einem Reaktionsgefäß statt (siehe 3.3.1 und 3.3.2).

Mit der *two-step* RT-PCR war die Detektion von aufgereinigter FCV RNA in allen Umweltsubstanzen möglich, mit Ausnahme des schwarzen Tees (Tabelle 21). Wurde die cDNA aus schwarzem Tee 1:10 verdünnt in die PCR eingesetzt, war ebenfalls kein Nachweis

der FCV RNA möglich. Auch mit der *one-step* RT-PCR konnte keine FCV RNA aus aufgereinigtem schwarzem Tee detektiert werden. Wurde der schwarze Tee jedoch nicht wie beschrieben aufgereinigt, sondern die RNA direkt extrahiert, gelang der RNA Nachweis mit der *one-step* RT-PCR. Anzumerken ist jedoch, dass durch den Prozess der Aufreinigung beziehungsweise der Extraktion von Nukleinsäuren sehr viel RNA verloren ging und die eingesetzte Menge an RNA (25.000 GE/PCR) in keiner der Proben, einschließlich der Kontrolle ohne Umweltsubstanz, wiedergefunden werden konnte.

Die Amplifikation von DNA ist ebenfalls mit dem *one-step* RT-PCR Kit möglich. In Tabelle 21 ist zu erkennen, dass VACV DNA mit Hilfe der *one-step* RT-PCR in allen Haushaltssubstanzen, einschließlich in schwarzem Tee und Waschpulver, nachgewiesen werden konnte, was mit der Platinum Taq DNA Polymerase, wie bereits beschrieben, nicht möglich war. Allerdings sind die C_T-Werte der *one-step* RT-PCR deutlich höher als mit der Platinum Taq Polymerase. Das bedeutet, es wurde weniger DNA in der PCR (geringere Anzahl GE) wiedergefunden, was auf eine schlechtere Sensitivität der *one-step* RT-PCR beim Nachweis von DNA hindeutet. Jedoch wurde auch mit der Platinum Taq DNA Polymerase nicht die eingesetzte DNA Menge (50.000 GE/PCR) wiedergefunden.

Tabelle 21: Vergleich der *one-step* RT-PCR und *two-step* (RT) PCR zum Nachweis von FCV und VACV aus aufgereinigten Proben. Angegeben sind die GE/PCR, die aus den gemessenen C_T-Werten errechnet wurden, indem sie in die Geradengleichung des jeweiligen Standards eingesetzt wurden. Alle Angaben, eingesetzte und gemessene Nukleinsäure-Menge, beziehen sich auf das Volumen der PCR Reaktion (25 µl).

Probe	FCV 25.000 GE/PCR		VACV 50.000 GE/PCR	
	one-step RT-PCR	*two-step* RT-PCR [a]	*one-step* RT-PCR	*two-step* (RT) PCR [a]
Ko [a]	78	67	236	13499
Puderzucker	11	115	253	20517
Schwarzer Pfeffer	31	156	67	6719
Waschpulver	23	288	102	-
Mehl	169	336	155	6719
Blumenerde	1	46	205	10950
Backpulver	67	34	10	773
Salz	18	212	545	22000
Tabak	25	25	22	952
Kaffeepulver	21	197	145	6266
Schwarzer Tee	(145)	-	58	-

[a] bei VACV wurde keine cDNA Synthese durchgeführt, bei FCV wurde die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben

[b] Kontrolle ohne zusätzliche Substanz

-: negativ in PCR

( ): in nicht aufgereinigter Probe detektiert

Validierung des neuen Verfahrens. Abschließend wurde die etablierte Methode aus Aufreinigung und Extraktion in Kombination mit der *one-step* RT-PCR mit weiteren Pathogenen validiert. Zusätzlich zu VACV wurde *Y. pestis* mit 50.000 GE / PCR als Vertreter der Bakterien und ein weiteres RNA Virus, das Dengue Virus 1 mit 14.000 GE / PCR eingesetzt. Mit der etablierten Methode war es möglich, alle getesteten Pathogene in allen zehn Haushaltssubstanzen zu detektieren (Tabelle 22). Dabei war in schwarzem Tee ein bemerkenswerter Effekt zu beobachten: *Y. pestis* DNA war nur in dem für die PCR 1:10 verdünnten Nukleinsäureextrakt nachzuweisen, nicht aber im unverdünnten Eluat. Dengue Virus RNA war, wie zuvor FCV RNA, nicht in aufgereinigtem schwarzen Tee zu detektieren. Wurde die RNA erneut auf herkömmliche Weise aus dem schwarzen Tee extrahiert, wurde die *one-step* RT-PCR zum Nachweis viraler RNA nicht inhibiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei der Aufreinigung inhibitorische Komponenten des schwarzen Tees mit angereichert werden, die die Reverse Transkriptase und/oder die Polymerase hemmen.

Tabelle 22: Detektion von Pathogenen in Haushaltsprodukten. VACV (DNA Virus), Dengue Virus 1 (RNA Virus) und *Yersinia pestis* wurden mit zehn Haushaltsprodukten gemischt. Vor der Extraktion der Gesamtnukleinsäure erfolgte eine Aufreinigung der Erregerpartikel. Angegeben sind die GE/PCR, die aus den gemessenen C_T-Werten errechnet wurden, indem sie in die Geradengleichung des jeweiligen Standards eingesetzt wurden. Alle Angaben, eingesetzte und gemessene Nukleinsäure-Menge, beziehen sich auf das Volumen der PCR Reaktion (25 µl).

Probe	Ergebnisse der *one-step* RT-PCR					
	VACV 50.000 GE/PCR		Dengue Virus 1 14.000 GE/PCR		*Yersinia pestis* 50.000 GE/PCR	
	unverdünnt	verdünnt 1:10	unverdünnt	verdünnt 1:10	unverdünnt	verdünnt 1:10
Ko [a]	236	n.b.	1283	n.b.	53	10
Puderzucker	253	n.b.	1207	n.b.	1468	n.b.
Schwarzer Pfeffer	67	n.b.	789	n.b.	121	n.b.
Waschpulver	102	n.b.	9	n.b.	178	n.b.
Mehl	155	n.b.	94	n.b.	157	n.b.
Blumenerde	205	n.b.	582	n.b.	639	n.b.
Backpulver	10	n.b.	516	n.b.	2	n.b.
Salz	545	n.b.	789	n.b.	10	n.b.
Tabak	22	n.b.	195	n.b.	22	n.b.
Kaffeepulver	145	n.b.	404	n.b.	13	n.b.
Schwarzer Tee	58	n.b.	(38)	n.b.	-	5

Eluate wurden unverdünnt in die *one-step* RT-PCR eingesetzt und, wenn die Amplifikation nicht möglich war, weiter verdünnt auf 1:10.
-: negativ in PCR
n.b.: nicht bestimmt
( ): in nicht aufgereinigter Probe detektiert
[a] Kontrolle ohne zusätzliche Substanz

Aus den dargestellten Ergebnissen lassen sich daher folgende Schlussfolgerungen ableiten: (i) In der Mehrzahl der getesteten Substanzen kann eine zusätzliche Aufreinigung inhibitorische

Effekte aus Umweltsubstanzen reduzieren. (ii) Eine mögliche Inhibition der PCR kann durch Verdünnen der Nukleinsäure vor der PCR weiter reduziert werden. (iii) Das *one-step* RT-PCR System kann sowohl für die Amplifikation von RNA, als auch von DNA verwendet werden, sofern Gesamtnukleinsäure isoliert wurde. (iv) Durch den Prozess der Aufreinigung und Extraktion geht ein Teil der RNA und DNA verloren, sodass bis zu vier log Stufen weniger Nukleinsäure mit der PCR detektiert wird als eingesetzt wurde.

Daher sollte ein generelles Protokoll zur Analyse von Umweltproben auf Pathogene folgende Schritte beinhalten (Abbildung 6): (i) Parallele Präparation von Gesamtnukleinsäure aus aufgereinigter und unbehandelter Probe. (ii) Verdünnung der Nukleinsäure auf 1:10. (iii) Verwendung von *one-step* RT-PCR Reagenzien, sowie eines entsprechenden Protokolls zur simultanen Amplifikation von DNA und RNA.

Mit diesem Verfahren konnten PCR-inhibierende Effekte aller zehn Umweltsubstanzen reduziert werden.

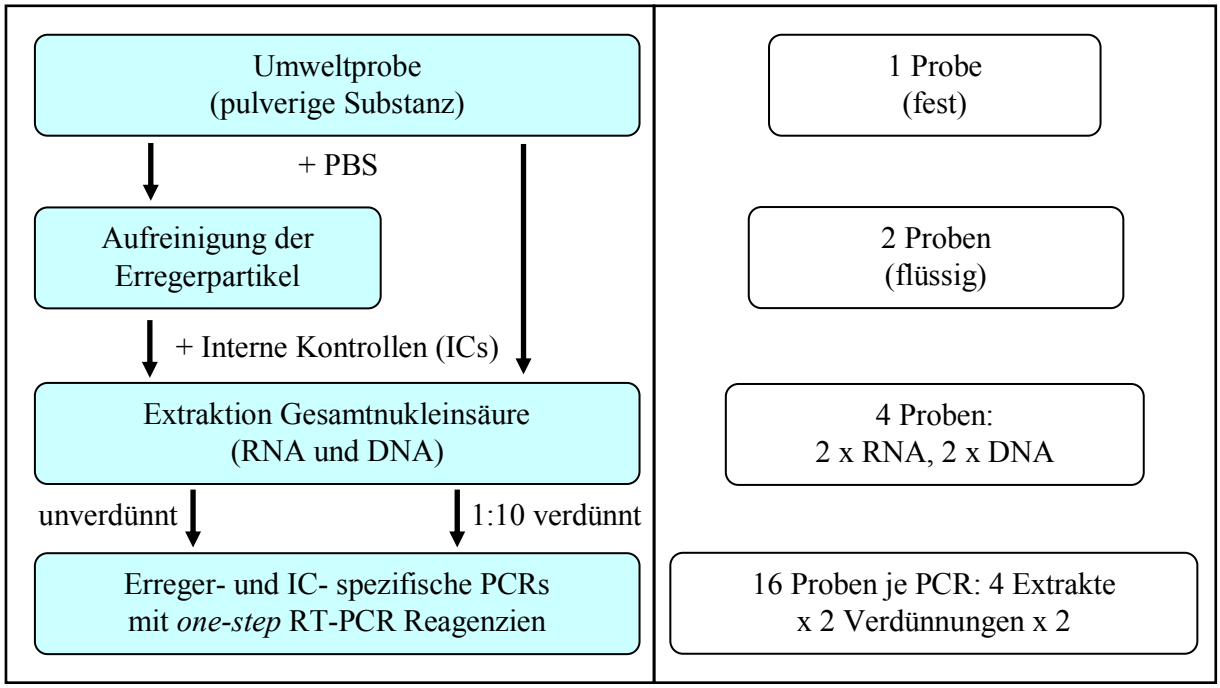


Abbildung 6: Schema der Nukleinsäurepräparation und PCR- Detektion aus Umweltproben. Die feste, (pulverige) Substanz wird mit 1,2 ml PBS aufgeschwemmt. Davon werden 200 µl direkt in die Extraktion eingesetzt und 1 ml wird vor der Extraktion aufgereinigt (2 Proben). Nach der Zugabe einer Internen Kontrolle (IC) erfolgt die Extraktion der Gesamtnukleinsäure mit kommerziell erhältlichen Kits. Die Eluate (4 Proben) werden unverdünnt, sowie 1:10 verdünnt in die spezifische PCR Reaktion eingesetzt. Die PCR Detektion erfolgt unabhängig von der Art der Nukleinsäure mit *one-step* RT-PCR Reagenzien in Doppelbestimmung (16 Proben). Für eine sichere und verlässliche Detektion von erregerspezifischen Nukleinsäuren aus Umweltproben wird die Probe in zwei Teile geteilt, die Gesamtnukleinsäure aus aufgereinigter und nicht aufgereinigter Probe extrahiert und verschiedene Verdünnungen des Extraktes in die spezifischen PCRs mit *one-step* RT-PCR Reagenzien eingesetzt.

4.2 Schnelle und spezifische Nukleinsäure- Detektion durch Kombination der Pyrosequenzierung mit der real-time PCR

4.2.1 Etablierung der Pyrosequenzierung für biologische Agenzien

Um eine Pyrosequenzierung durchzuführen, wird zunächst ein biotinyliertes PCR Produkt der Zielsequenz hergestellt, von welchem der biotinylierte Strang als Matrize für die PSQ Reaktion dient (Abbildung 7). Dieses zweistufige Verfahren aus PCR und PSQ wird genutzt, um die PSQ mit verschiedenen PCR Formaten inklusive der *real-time* PCR zu kombinieren. Nach der Etablierung der einzelnen PCR-PSQ Kombinationen werden die verschiedenen Assays parallel durchgeführt, um eine Screening Methode für biologische Agenzien zu entwickeln. In dieser Arbeit wurden PSQ Assays zur Detektion folgender biologischer Agenzien aufgebaut: *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, Orthopockenviren (OPV), Krim-Kongo-Hämorrhagisches-Fieber Virus (CCHFV), Lassa Virus, Rifttal-Fieber-Virus (RVFV) und Filoviren (Tabelle 23). Für die genannten Erreger lagen etablierte PCR Protokolle vor, die als Grundlage für die PSQ verwendet wurden. Dabei erfolgte die Amplifikation von DNA mit der Platinum Taq Polymerase, während RNA mithilfe eines *one-step* RT-PCR Kits (Life Technologies) amplifiziert wurde. Sofern eine spezifische TaqMan® Sonde vorhanden war, wurde die PCR als *real-time* PCR durchgeführt. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität der Viren mit RNA Genom, ist das Design einer zusätzlichen spezifischen Sonde erschwert. Daher existieren keine geeigneten Sonden wie im Fall von Lassa Virus oder es werden drei oder mehr verschiedene Sonden je PCR Ansatz benötigt (bei Filoviren und CCHFV), um die verschiedenen Virus-Spezies und Stämme detektieren zu können, wodurch der gesamte Ansatz relativ teuer wird.

Tabelle 23: Erregerspektrum für die Kombination aus (*real-time*) PCR und Pyrosequenzierung

Erreger	Genom	PCR Format
Bacillus anthracis	DNA	*real-time* PCR
Francisella tularensis	DNA	*real-time* PCR
Yersinia pestis	DNA	*real-time* PCR
Orthopockenviren	DNA	konventionelle PCR
CCHFV	RNA	konventionelle RT-PCR
Lassa Virus	RNA	konventionelle RT-PCR
RVFV	RNA	*real-time* RT-PCR
Filoviren	RNA	konventionelle RT-PCR

HF: Hämorrhagisches Fieber

Design der PSQ Assays. Für den Einsatz des jeweiligen PCR Produktes in der PSQ, wurden die vorhandenen PCR Assays wie folgt modifiziert: (I) Grundsätzlich kann von beiden Seiten

des PCR Produktes sequenziert werden, wobei von einer Sequenzlänge von ca. 40 Basen ausgegangen wurde. Innerhalb des Amplikons wurde daher eine entsprechend große Region ausgewählt, die innerhalb der jeweiligen Erregergruppe gut konserviert ist, jedoch möglichst ausreichend Unterschiede aufweist, um einzelne Erreger Spezies oder Stämme zu differenzieren. (II) Befand sich eine solche Region *downstream* der Bindungsstelle einer der beiden PCR Primer, wurde der entsprechende PCR Primer als PSQ Primer ausgewählt (Abbildung 7). Dieser PSQ Primer sollte in jedem Fall an das PCR Produkt binden. Für den Einsatz in der PSQ wurde der PSQ Primer am 5' Ende verkürzt, sodass er eine Schmelztemperatur von ca. 50°C besaß, wie es vom Hersteller der PSQ Reagenzien empfohlen wird. (III) Alternativ wurde ein zusätzliches Oligonukleotid innerhalb des PCR Produktes als PSQ Primer gewählt. (IV) Der andere PCR Primer wurde mit Biotin markiert, wobei darauf geachtet wurde, dass PSQ Primer und biotinylierter Primer auf komplementären DNA Strängen lagen.

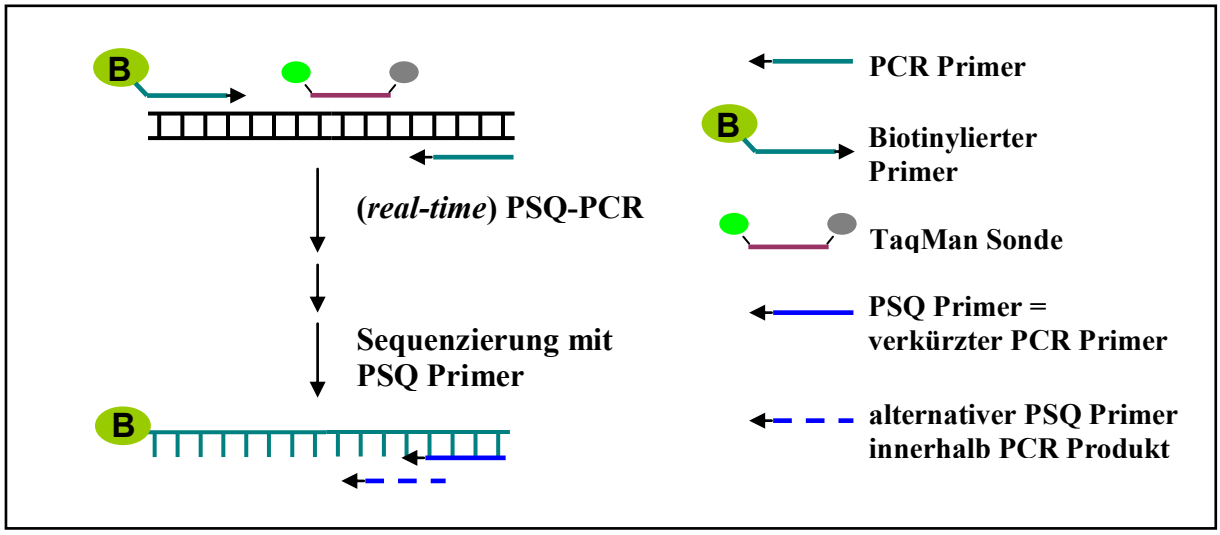


Abbildung 7: Aufbau eines PSQ Assays. Die (*real-time*) PSQ-PCR der Zielsequenz erfolgt mit einem biotinylierten und einem unmodifizierten Primer und ggf. einer TaqMan Sonde. Über Streptavidin-Sepharose wird der biotinylierte DNA-Strang des PCR Produktes aufgereinigt und in die PSQ eingesetzt. Die PSQ erfolgt mit einem PSQ Primer, der entweder dem verkürzten, unmodifizierten PCR Primer entspricht oder mit einem alternativen PSQ Primer, der innerhalb der Zielsequenz liegt.

PCR Reaktion mit biotinyliertem Primer. Die PCR Reaktion darf durch die Biotinylierung des einen Primers nicht beeinträchtigt werden. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven, die aus der *real-time* PSQ-PCR mit Verdünnungen des Kontrollplasmides für *B. anthracis* resultierten und denen einer *real-time* PCR ohne Biotin ähneln. Ebenso konnten mit den *real-time* PCR Assays für *Y. pestis*, *F. tularensis* und RVFV entsprechende Amplifikationskurven erzeugt werden. Bei den konventionellen PCR Assays

war das jeweilige PCR Produkt als Bande im Agarosegel zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass die Biotinylierung des einen PCR Primers einen geringen Einfluss auf die PCR Reaktion hatte. Die C_T-Werte beziehungsweise die Bandendicke im Agarosegel waren vergleichbar.

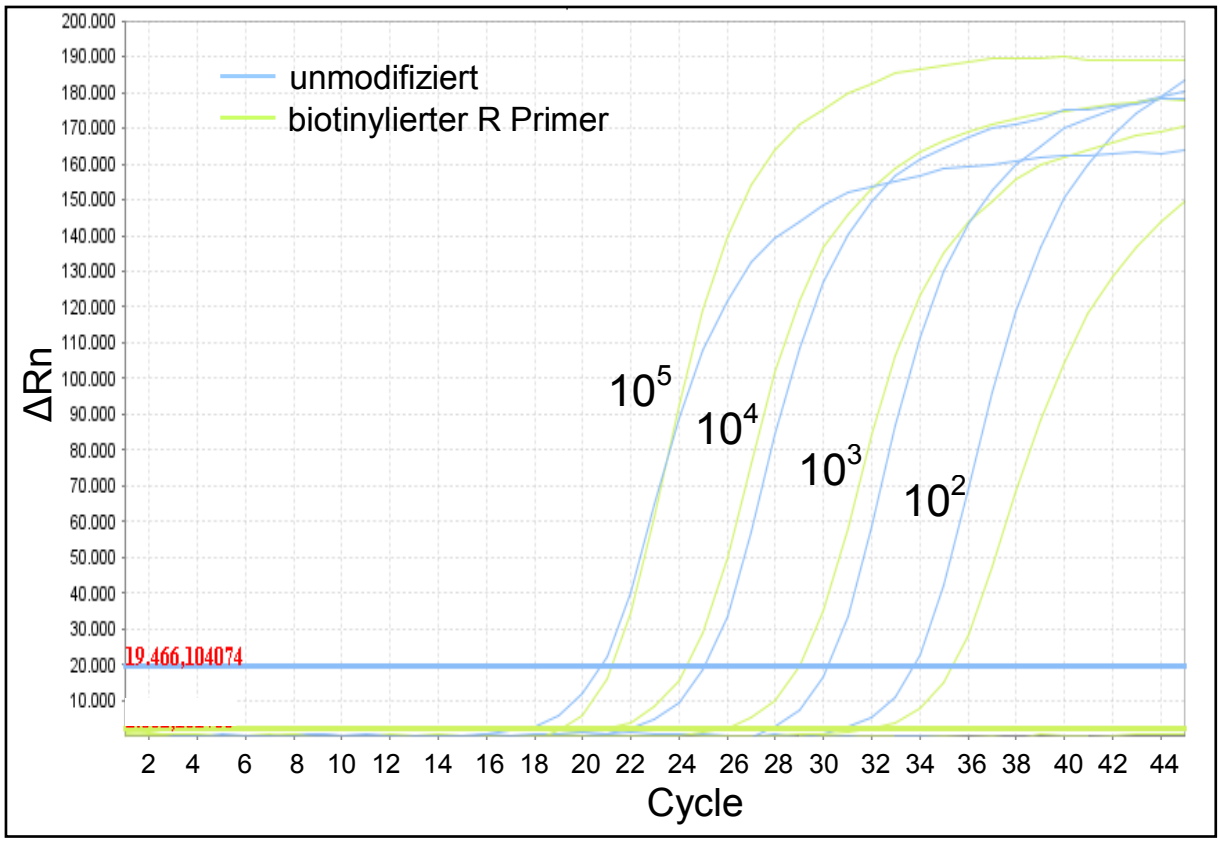


Abbildung 8: Amplifikationskurven der *B. anthracis* PCR mit unmodifizierten Primern im Vergleich zur PCR mit einem biotinylierten Primer. Beide PCR Ansätze waren identisch bis auf den R Primer, der entweder unmodifiziert (blaue Kurven) oder mit Biotin markiert (grüne Kurven) war. Es wurden Verdünnungen von 10^5 bis 10 Kopien/µl des *B. anthracis* Kontrollplasmids eingesetzt. Bei 10^5 und 10^4 Kopien/µl sind die Kurvenverläufe und C_T-Werte beider PCRs ähnlich, bei 10^3 Kopien/µl ist die PCR mit dem biotinylierten Primer ungefähr einen C_T-Wert besser, bei 100 Kopien/µl ist es umgekehrt. Da keine Regelmäßigkeit in den Unterschieden zu erkennen ist, sind diese vermutlich durch leicht abweichende PCR Bedingungen in den unterschiedlichen Vertiefungen der PCR Platte und nicht durch die Biotinylierung des R Primers zu erklären.

PSQ Kontrollen. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen PSQ Assays etabliert und optimiert. Dazu wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, die sicherstellen, dass Fehlerquellen ausgeschlossen werden können (Abbildung 9). Die Ergebnisse der Überprüfung zeigten die Funktionsfähigkeit der PSQ Assays an, da alle Kontrollen negativ waren. Das richtige PCR Produkt hingegen, erzeugte unter Verwendung des entsprechenden PSQ Primers ein auswertbares Pyrogramm (Abbildung 10).

Quantifizierung mit Hilfe der PSQ. Da die Signalintensität eines Peaks proportional zu der Anzahl an eingebauten Nukleotiden ist, ist sie ebenfalls abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Je mehr Ziel-DNA vorhanden ist, desto mehr Nukleotide werden gleichzeitig eingebaut und desto mehr PPi entsteht. Über eine Standardgeraden mit einer Verdünnungsreihe der Ziel-DNA in definierten Konzentrationen wird eine Quantifizierung der DNA Menge einer unbekannten Probe möglich (Abbildung 11). Da die Signalhöhen jedoch in einem Pyrogramm und von PSQ zu PSQ trotz gleicher Ausgangsmenge an DNA beziehungsweise PCR Produkt stark schwanken, ist diese Form der Quantifizierung ungenauer als beispielsweise über eine *real-time* PCR.

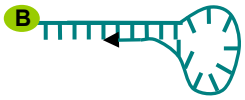
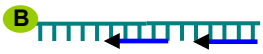
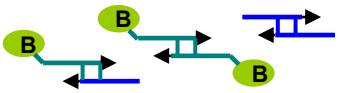
	Fehlerquelle	Überprüfung	Beobachtung
A	 DNA Einzelstrang bildet Sekundärstruktur aus	PCR Produkt ohne PSQ Primer	kein Pyrogramm
B	 PSQ Primer bindet mehrfach am Amplikon	PCR Produkt mit PSQ Primer	Pyrogramm mit erwarteter Sequenz ohne Sequenzüberlagerungen
C	biotinylierter Primer bindet am Amplikon	PCR Produkt mit biotinyliertem Primer	kein Pyrogramm
D	 Ausbildung von Primerdimeren	Primerkombinationen ohne PCR Produkt	kein Pyrogramm
E	PSQ Primer bindet an falsches Amplikon	PCR Negativkontrolle mit PSQ Primer	kein Pyrogramm

Abbildung 9: Fehlerquellen und Kontrollen einer Pyrosequenzierung. A Die DNA Einzelstränge von keinem der entwickelten PSQ Assays bildeten eine Sekundärstruktur aus, sodass die PSQ mit PCR Produkt allein negativ war. **B** Die PSQ Primer haben jeweils nur an der erwarteten Sequenz des DNA Einzelstrangs gebunden, sodass die PSQ korrekt verlief. **C** Der biotinylierte Primer hat nicht unspezifisch an den Matrizenstrang gebunden, die PSQ war negativ. **D** Es bildeten sich keine Primerdimere aus, sodass die verschiedenen Primerkombinationen ohne PCR Produkt kein Pyrogramm ergaben. **E** Die PSQ Primer aller Assays waren spezifisch und haben nicht unspezifisch an falsche PCR Produkte gebunden. Die PCR Negativkontrollen waren auch in der PSQ negativ. Waren alle Kontrollen wie erwartet, war das Design des PSQ Assays erfolgreich, sodass die PSQ für reale Proben eingesetzt werden konnte.

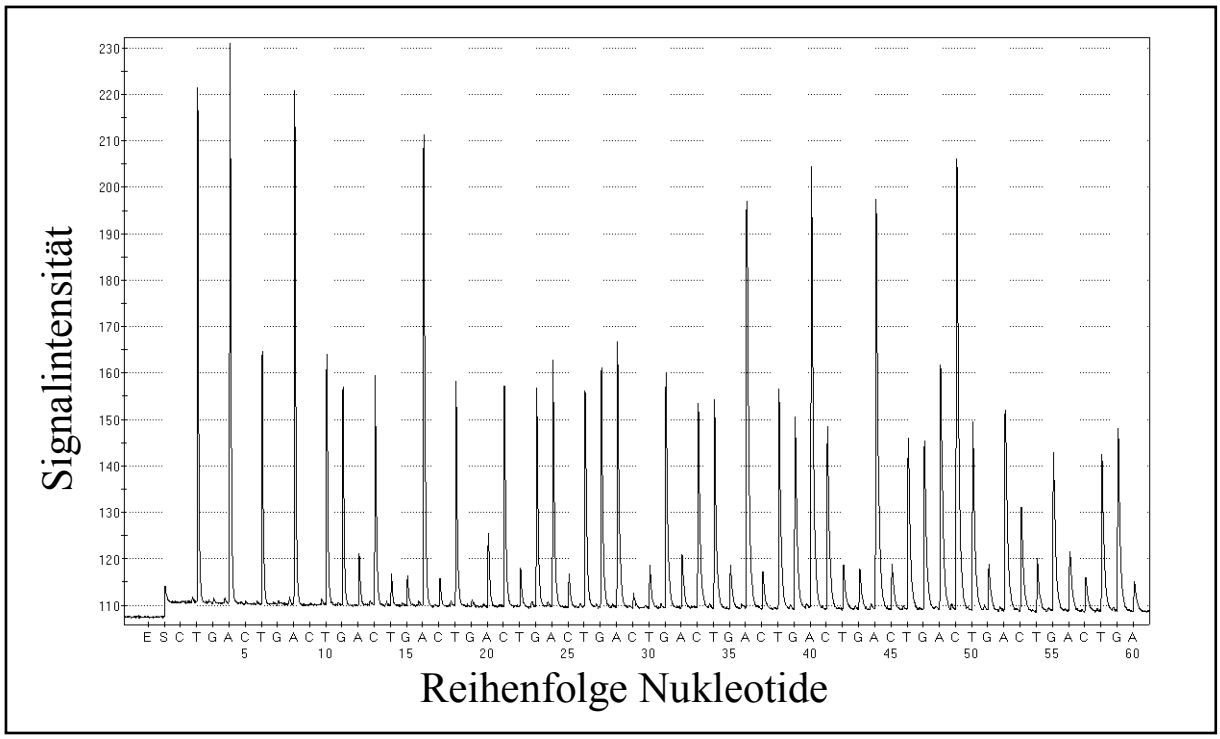


Abbildung 10: Beispiel- Pyrogramm von *B. anthracis*. Es wurden 100 Kopien des Kontrollplasmids von *B. anthracis* eingesetzt. Der Einbau eines Nukleotides während der PSQ resultiert in einem Peak mit einer Signalintensität von ca. 142-168, bei zwei gleichen Nukleotiden ist die Signalintensität ca. 198-230.

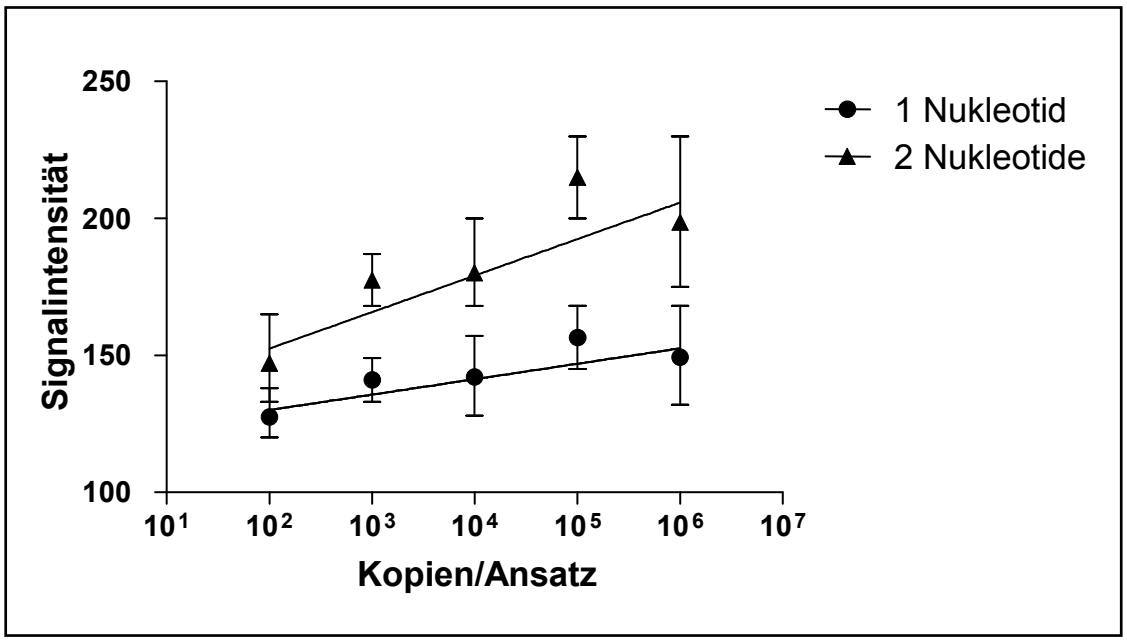


Abbildung 11: Standardgeraden der PSQ von *B.anthracis*. Das Kontrollplasmid für *B. anthracis* wurde von 10^6 bis 10^2 Kopien/ Ansatz in die PSQ-PCR und jeweils das gesamte PCR Produkt in die PSQ eingesetzt. Die resultierenden Signalintensitäten aus den Pyrogrammen für ein bzw. zwei eingebaute Nukleotide wurden über die Kopienzahl aufgetragen und zwei Standardgeraden erstellt. Über die Signalintensität der Peaks einer unbekannten Probe kann die Konzentration der Probe ermittelt werden. Jedoch sind die Schwankungen der Signalintensitäten in einem Pyrogramm und zwischen verschiedenen PSQ Ansätzen (und damit die Standardabweichungen) recht groß, sodass die Quantifizierung relativ ungenau und nicht reproduzierbar ist. Die Kombination aus quantitativer *real-time* PCR und PSQ, wie in dem gezeigten Beispiel, erlaubt eine genauere Quantifizierung und anschließende Typisierung des detektierten Erregers.

4.2.2 Parallele Pyrosequenzierungen als Screening Methode

Aufbau der PCR und PSQ Platte. Um die Kombination aus (*real-time*) PCR und PSQ als Screening Methode nutzen zu können, wurden alle PCR Assays so angeglichen, dass sie unter den gleichen PCR-Bedingungen ablaufen können. Die PCR Reaktionsansätze waren dabei die gleichen wie in den Einzelassays, lediglich das PCR Temperaturprofil wurde vereinheitlicht. Um RNA und DNA parallel auf einer PCR Platte zu amplifizieren (Abbildung 12), wurde das Temperaturprofil des *one-step* RT-PCR Kits verwendet. Die DNA wird während der RT-Phase weder beschädigt noch amplifiziert, da sich die Amplifikationskurven für DNA mit und ohne RT-Phase gleichen (nicht gezeigt). Die RNA in angrenzenden Reaktionsgefäßen wird in der RT-Phase in cDNA umgeschrieben. In der anschließenden eigentlichen PCR Reaktion werden beide Nukleinsäurearten amplifiziert. Die optimalen *Annealing*- Temperaturen der einzelnen PCR Assays liegen zwischen 54°C und 60°C (Tabelle 24), sodass das Temperaturprofil der PCR Reaktion sich im Falle des Primer- *Annealings* unterscheidet. Um unterschiedliche Temperaturzonen, sowie eine *real-time* Detektion, zu ermöglichen, wurde der ABI StepOnePlus™ (Life Technologies) als PCR Gerät ausgewählt. Eine parallele Durchführung der PCR in zwei verschiedenen PCR Geräten ist ebenfalls möglich, bedeutet jedoch einen größeren Zeit- und Materialaufwand.

Optimierung der PSQ Assays. Zusätzlich zu den unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen während der PSQ-PCR wurde ein Elongationsschritt in die PCR Reaktion eingefügt (siehe Tabelle 17). Es zeigte sich, dass dadurch während der PSQ-PCR von einigen RNA Viren (Lassa und Filoviren) mehr PCR Produkt gebildet wurde, sodass im Agarosegel stärkere Banden detektiert wurden (nicht gezeigt).

Tabelle 24: *Annealing*- Temperatur während der PSQ-PCR und untere Nachweisgrenze der PSQ.

Erreger	T_a der PCR Primer	Anzahl der PCR- und (PSQ-) Primer	Untere NWG der PSQ
Bacillus anthracis	57°C	2 (1)	100 Kopien
Francisella tularensis	57°C	2 (1)	100 Kopien
Yersinia pestis	57°C	2 (1)	100 Kopien
Orthopockenviren	57°C	2 (1)	10 GE
CCHFV	54°C	2 (1)	10 Kopien
Lassa Virus	54°C	4 (2)	10^4 Kopien
RVFV	54°C	2 (1)	10 Kopien
Filoviren	54°C	5 (1)	10^4 Kopien

T_a: *Annealing*- Temperatur
GE: Genomäquivalente

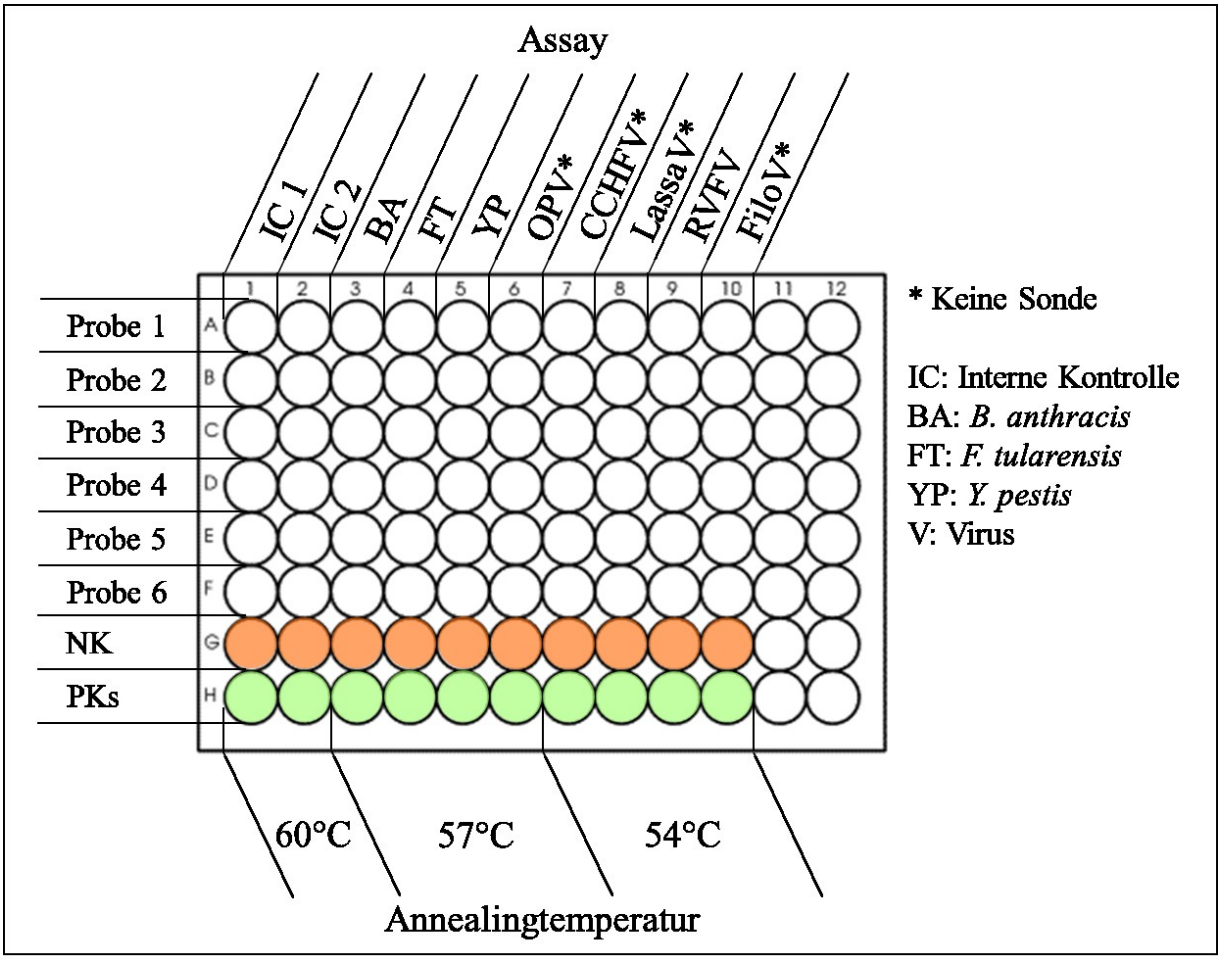


Abbildung 12: Einteilung einer PCR- bzw. PSQ Platte zum Screening von max. sechs Proben auf verschiedene BT Erreger. In jeder Spalte wird ein anderer erreger- bzw. IC- spezifischer PCR Assay eingesetzt. Entsprechend der PCR wir die *Annealing*- Temperatur der PCR Primer durch unterschiedliche Temperaturzonen am PCR Gerät eingestellt. PCR Assays ohne Sonde werden parallel als konventionelle PCR durchgeführt. Zu jedem Assay gibt es eine spezifische Positivkontrolle (PK). Die PCR Produkte werden nach Amplifikation in eine PSQ Platte übertragen, die ebenfalls nach dem gezeigten Muster aufgebaut ist, sodass pro Spalte der entsprechende PSQ Primer hinzugefügt wird.

Um die untere Nachweisgrenze der PSQ Assays zu bestimmen, wurden Verdünnungen (10^6 bis 1 Kopie(n)/ PCR) des jeweiligen Kontrollplasmides mit der PSQ-PCR am ABI StepOne amplifiziert und das gesamte PCR Produkt in die PSQ eingesetzt. Für die Bestimmung der NWG des OPV PSQ Assays wurde Virus DNA mit 10^6 bis 1 GE/ PCR verwendet, die zuvor mithilfe der OPV *real-time* PCR (Tabelle 3) quantifiziert worden war. Die NWGs der einzelnen PSQ Assays sind in Tabelle 24 dargestellt. Während 10 Kopien/ Ansatz von CCHFV und RVFV bzw. 10 GE/ Ansatz von OPV nachgewiesen werden konnten, lag die NWG für die Bakterien bei 100 Kopien/ Ansatz. Bei den RNA Viren, bei denen in der *one-step* RT-PCR mehr als ein Primerpaar (5 Primer für Filoviren und 4 Primer für Lassa Virus) bzw. in der PSQ mehr als ein Primer (zwei für Lassa Virus) eingesetzt wurde, lag die NWG deutlich höher bei 10^4 Kopien/ Ansatz. Es zeigte sich, dass die zum Teil hohen NWG durch die Wahl des PCR Zyklers für die PSQ-PCR erklärt werden können. Während bei

Verwendung eines konventionellen PCR Zyklers (Eppendorf) bis zu 10^3 Kopien des Kontrollplasmids für Filoviren im Agarosegel nachweisbar waren, waren bei Verwendung des *real-time* PCR Gerätes (Applied Biosystems) nur bis 10^5 Kopien des Kontrollplasmids eine schwache Bande im Agarosegel erkennbar (Abbildung 13).

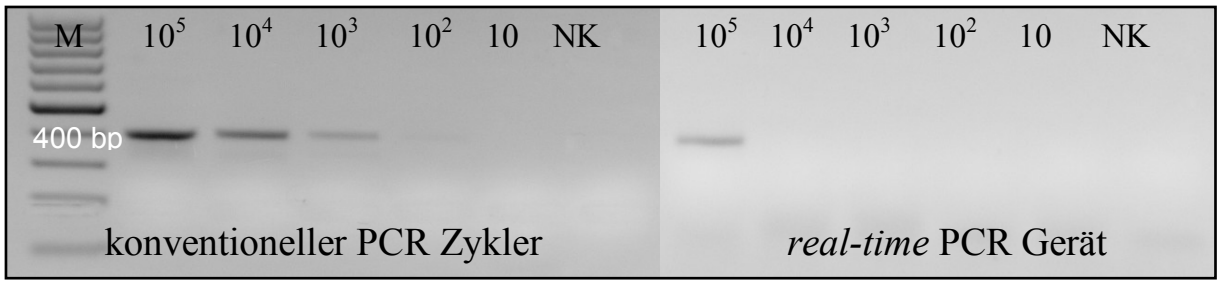


Abbildung 13: Agarosegel Bilder zum Vergleich der PCR Produktmenge mit zwei verschiedenen PCR Geräten. Es wurden Verdünnungen des Kontrollplasmids für Filoviren von 10^5 bis 10 Kopien/ Ansatz erstellt und mit dem gleichen PSQ-PCR Ansatz amplifiziert. Das Temperaturprofil beider Geräte war identisch. Während mit dem konventionellen PCR Gerät (Eppendorf) bis zu einer Konzentration von 10^3 Kopien/ Ansatz eine Bande im Agarosegel detektiert werden konnte, war mit dem *real-time* PCR Gerät (ABI StepOne) nur bei 10^5 Kopien/ Ansatz eine Bande erkennbar. Dieses Phänomen könnte durch unterschiedlich effektive Heiz- und Kühlraten beider Geräte begründet werden, sodass die PCR Bedingungen trotz identischen Temperaturprofils unterschiedlich sind.

Positivkontrollen. Für jeden Erreger wurde eine spezifische Positivkontrolle (PK) mitgeführt, die sowohl der Überprüfung der PCR Reaktion als auch der erfolgreichen Sequenzierung diente. Um auf jeden Fall über der unteren Nachweisgrenze der PSQ zu liegen, wurden jeweils 10^4 Kopien/ µl assayspezifisches Kontrollplasmid bzw. 10^4 GE/ µl (OPV) DNA eingesetzt. Während bei den PCR Assays im *real-time* Format (IC 1, IC 2, *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, RVFV) eine erfolgreiche PCR durch eine Amplifikationskurve der PK angezeigt wird, fehlt diese Form der Überprüfung bei den PCRs ohne Sonde (OPV, CCHFV, Lassa Virus, Filoviren). Unabhängig von der PCR Detektion wurde während der PSQ eine Sequenz der PKs erstellt, sodass der erfolgreiche Verlauf der PCR-Reaktion und der PSQ bestätigt werden konnte.

Um mögliche Kontaminationen zwischen PKs und Proben auszuschließen, wurde ein Teil der Kontrollplasmide modifiziert. Die Plasmide der RNA Viren (CCHFV, LassaV, FiloV und RVFV) trugen eine Markierung aus drei bis vier Nukleotiden, die bei der PSQ mit sequenziert wurden und vor der eigentlichen erregerspezifischen Sequenz lagen (Abbildung 14). Eine Sequenz, die aus einem der Kontrollplasmide stammte, begann folglich mit den eingefügten Nukleotiden, während die Erreger-RNA diese zusätzlichen Nukleotide nicht enthielt.

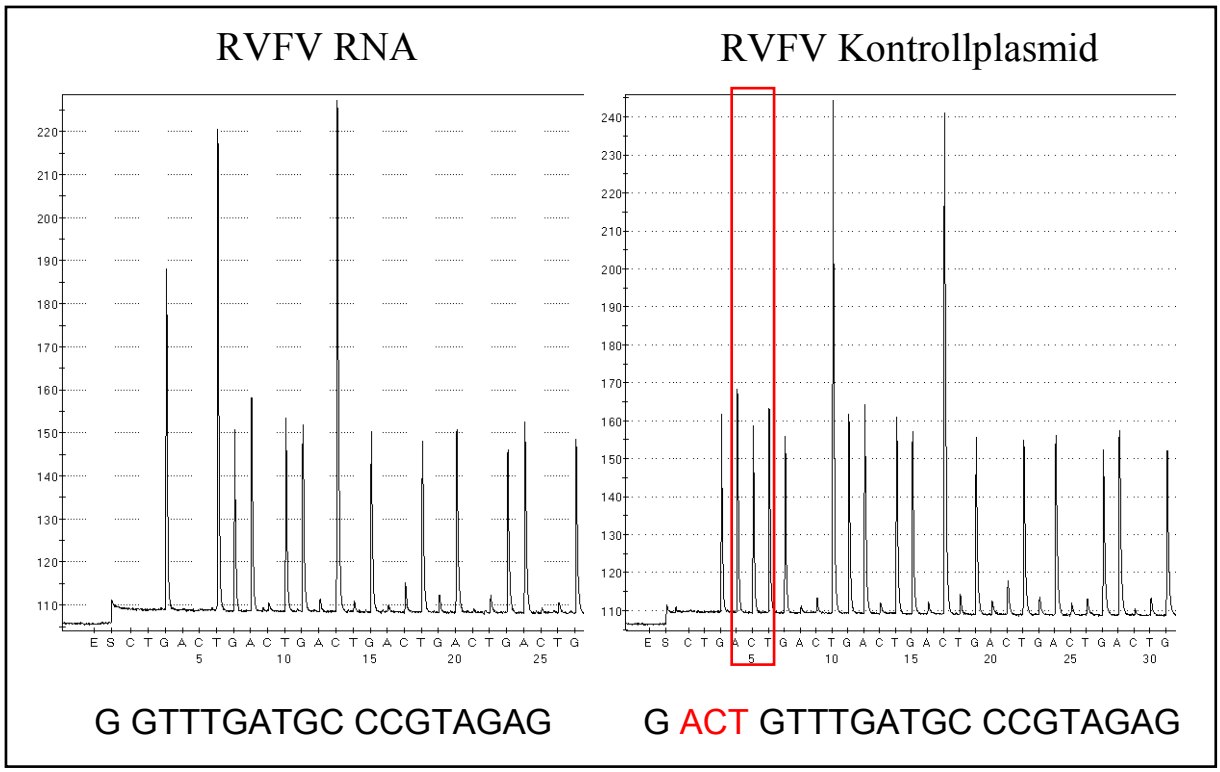


Abbildung 14: Kontrolle von Kontaminationen in der PSQ am Beispiel von RVFV. Die Sequenz des Kontrollplasmids für RVFV enthielt zusätzlich die Nukleotide TGA (gelesen ACT, rot markiert). Der PSQ Primer entsprach dem Vorwärts-PCR-Primer, war jedoch am 3' Ende um eine Base verkürzt, wodurch die erste gelesene Base der letzten 3' Base des PCR Primers, hier einem G, entspricht. Während bei einer RVFV RNA die speziesspezifische Sequenz folgt, werden bei dem RVFV Kontrollplasmid nach dem G zunächst die eingefügten Nukleotide und darauffolgend die eigentliche RVFV spezifische Sequenz gelesen. Durch die eingefügten Nukleotide kann eine mögliche Kontamination der Probe mit dem Kontrollplasmid identifiziert und falsch-positive Ergebnisse der PSQ minmiert werden.

Interne Kontrollen. Zusätzlich wurden PCR und PSQ Assays für zwei Interne Kontrollen (IC) etabliert. In beiden Fällen handelt es sich um Kontrollen zur Überprüfung der erfolgreichen Extraktion. Die IC 1 (FCV) dient dem Nachweis erfolgreicher RNA Extraktion aus der Probe, IC 2 (KoMa) zeigt eine erfolgreiche DNA Extraktion an. Dazu werden vor der Extraktion FCV aus Zellkulturüberstand, sowie das synthetische Plasmid pKoMa mit 500 Kopien in die zu untersuchende Probe gemischt. Bei erfolgreicher Extraktion von RNA und DNA aus der Probe werden sowohl FCV RNA (IC 1) als auch pKoMa (IC 2) mit extrahiert und müssen dann in der jeweils spezifischen PCR nachzuweisen sein. Während die Sequenzierung der IC 1 trotz erfolgreicher PCR Amplifikation nicht gelang, wurde die IC 2 parallel zu den erregerspezifischen PSQs sequenziert. Ist die erregerspezifische PCR bzw. PSQ für eine Probe negativ, müssen die ICs positiv sein. Bei einem positiven Ergebnis in der erregerspezifischen PCR bzw. PSQ sind die ICs vernachlässigbar.

Auswertung der PSQ. Die Auswertung der PSQ erfolgte zunächst mit Hilfe der Herstellersoftware und anschließend manuell. Die Software des Herstellers ordnet jedes

Pyrogramm einer Qualitäts-Gruppe zu: „passed“ für auswertbare, eindeutige Pyrogramme; „check“ für weniger gute Pyrogramme und „failed“ für nicht oder schlecht lesbare Pyrogramme. Als „failed“ eingestufte Pyrogramme weisen zum einen Peaks mit Signalhöhen unter 120 auf. Zum anderen variieren die Peakhöhen im Bereich unter 120 sehr stark, sodass Peaks, die von einem oder zwei eingebauten Nukleotiden stammen, von der Software nicht unterschieden werden können. Jedoch war vor allem bei Pyrogrammen für Lassa Virus und Filoviren häufiger zu beobachten, dass richtige Sequenzen erzeugt wurden, die allerdings als „failed“ eingestuft wurden. Daher erfolgte eine manuelle Auswertung unabhängig von der Einordnung der Ergebnisse durch die Software. Bei der manuellen Auswertung der Pyrogramme wurde wie in Abbildung 15 dargestellt, vorgegangen: (i) Jeder Assay wurde einzeln betrachtet. Die NK musste negativ (keine Sequenz oder *nonsense* Sequenz), die PK positiv sein. Die gelesene Sequenz der PK wurde mit der theoretisch erwarteten Sequenz des Erregers abgeglichen. (ii) Wurde für eine unbekannte Probe eine Sequenz generiert, so wurde diese ebenfalls mit der erwarteten Sequenz abgeglichen. (iii) Jede Sequenz wurde mit der *ncbi* Datenbank abgeglichen. (iv) Sequenzen, die weder mit der erwarteten Sequenz übereinstimmten, noch Treffer in der Genbank ergaben, wurden als negativ bewertet. (v) Sequenzen, die mit der erwarteten Sequenz übereinstimmten und bei dem Abgleich mit der Genbank Treffer mit niedrigen *e-values* lieferten, wurden als positiv gewertet. Die entsprechende Probe war für diesen Erreger positiv. Ergab der Datenbankabgleich eindeutige Treffer, konnte eine Klassifizierung des gefundenen Erregers erfolgen. (vi) Sequenzen, die mit der erwarteten Sequenz nicht übereinstimmten, aber einen positiven Treffer für den jeweiligen Erreger ergaben, wurden mit der Sequenz des entsprechenden biotinylierten Primers abgeglichen. Es handelte sich dabei um falsch-positive Sequenzen, die durch Sequenzierung des biotinylierten Primers erzeugt wurden und damit nicht den Erreger nachwiesen.

War die PK falsch negativ und/oder die NK falsch positiv, mussten PCR und PSQ für den entsprechenden Erreger wiederholt werden. War die PK zwar positiv, aber die Probe und die ICs negativ, musste erneut Nukleinsäure aus der Probe isoliert werden.

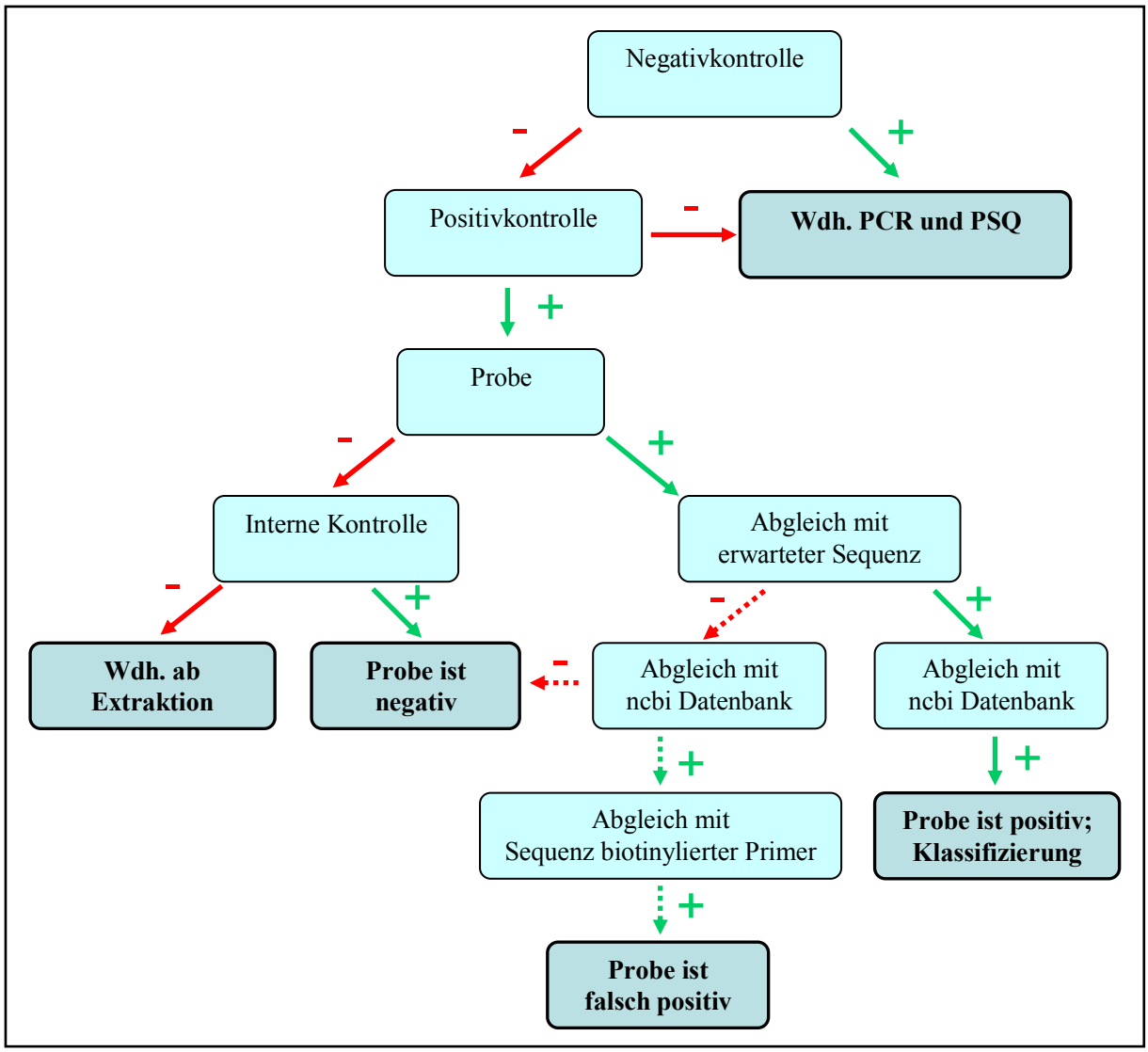


Abbildung 15: Schema der Auswertung eines PSQ Assays. Es wird jeder PSQ Assay einzeln betrachtet. Die NK muss negativ und die PK positiv sein, sonst müssen PCR und PSQ wiederholt werden. Ist die Probe in der jeweiligen PSQ negativ und die IC positiv, so handelt es sich um eine echt negative Probe. Ist die IC bei negativer Probe ebenfalls negativ, muss die Extraktion wiederholt werden. Ist die Probe in der jeweiligen PSQ positiv, wird die generierte Sequenz mit der erwarteten Sequenz abgeglichen. Bei ausreichender Übereinstimmung ermöglicht ein anschließender Abgleich mit der ncbi Datenbank eine Klassifizierung des detektierten Erregers. Stimmt die Probensequenz nicht mit der erwarteten Sequenz überein, gibt es zwei Möglichkeiten. Ergibt auch der Abgleich mit der Datenbank keinen erregerspezifischen Treffer, so ist die Probe negativ für diesen Erreger. Ergibt der Abgleich mit der Datenbank jedoch einen erregerspezifischen Treffer und stimmt die Sequenz aus der PSQ mit der Sequenz des biotinylierten Primers überein, ist die Probe falsch positiv.

4.3 Etablierung von multiplex Verfahren zur Detektion von Nukleinsäuren am Beispiel von BT-Erregern

Die multiplex *real-time* PCR besteht aus vier erregerspezifischen Einzel-PCRs zur Detektion von *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis* und OPV, sowie einer Kontroll-PCR zur Detektion der Internen Amplifikationskontrolle (IAC). Um die einzelnen PCR Assays miteinander zu kombinieren, wurden die gleichen Reagenzien verwendet und die Reaktionsbedingungen

angeglichen. Für jeden Einzelassay wurden die optimalen Primer- und Sondenkonzentration bestimmt. Dabei wurde die geringst mögliche Konzentration gewählt, bei der der C_T-Wert unverändert blieb. Um die fünf einzelnen uniplex PCRs zu einer multiplex Reaktion zu kombinieren, wurde die $MgCl_2$ Konzentration angepasst (Tabelle 10). Mit allen fünf unterschiedlichen markierten Sonden erfolgte eine *Color Compensation*, die das Auftrennen der Emissionspektren der einzelnen Farbstoffe ermöglicht.

Während für die uniplex PCRs die Spezifität von jeweils 100% bereits bekannt war (55-58), wurde zusätzlich die Spezifität des multiplex Assays mit folgenden DNA Proben getestet: Bakterielle DNA (*E. coli, S. epidermidis, S. pneumoniae, N. meningitidis, S. aureus, S. enterica, E. faecium*), virale nicht- OPV DNA (Adenovirus 11 [AdV11], Herpes Simplex Virus 1 [HSV-1], Varizella Zoster Virus [VZV], Epstein Barr Virus [EBV], Human Herpes Virus 6 [HHV-6]) und Gewebe DNA (humane Niere, humane Leber und Ratten Leber). Dabei war auch die multiplex *real-time* PCR 100% spezifisch. Um die untere Nachweisgrenze der einzelnen PCR Assays in der multiplex PCR zu bestimmen, wurde eine Probitanalyse durchgeführt (siehe 3.3.5 und Abbildung 16). Die untere Nachweisgrenze lag bei 12,9 Kopien pro Reaktion für *F. tularensis*, 19,3 Kopien für *B. anthracis*, 9,4 Kopien für *Y. pestis* und 37,4 Kopien pro Reaktion für OPV mit einer Detektionswahrscheinlichkeit von 95%.

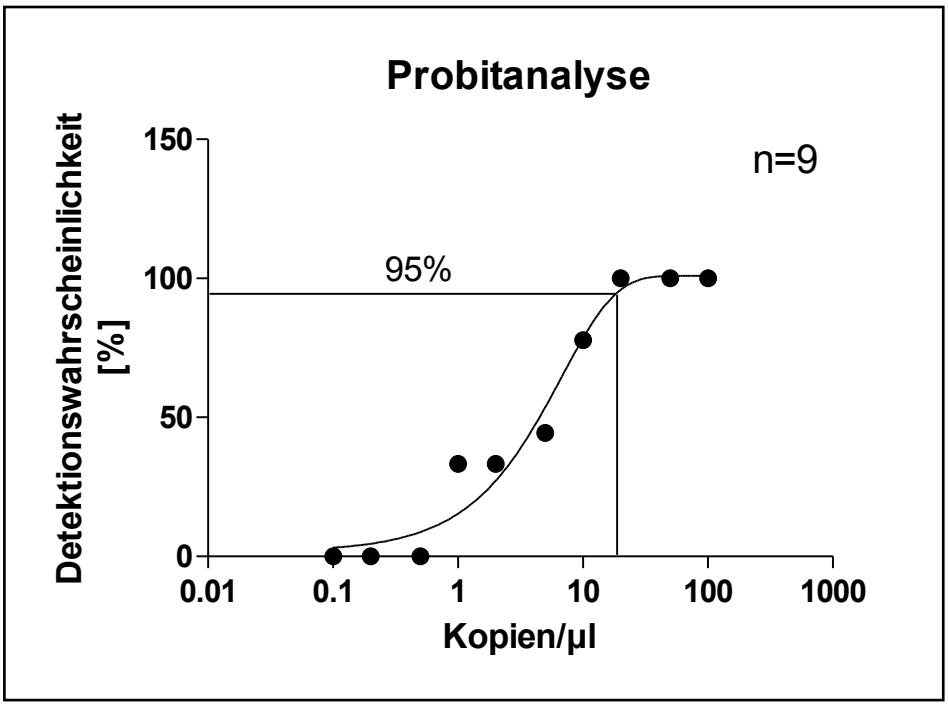


Abbildung 16: Grafische Darstellung einer Probitanalyse am Beispiel der *F. tularensis* Detektion. Es wurden Verdünnungen der Kontrollplasmid DNA für *F. tularensis* von 100 bis 0,1 Kopien/µl hergestellt und in jeweils neun Ansätzen (n=9) in der *F. tularensis* PCR gemessen. Der Anteil der positiven Ansätze (je neun Ansätze) in Prozent wurde über die Konzentration aufgetragen. Durch nichtlineare Regression wurde die Konzentration ermittelt, die mit 95%iger Wahrscheinlichkeit detektiert werden kann. Für *F. tularensis* ergab die Probitanalyse eine NWG von 12,9 Kopien.

4.4 Multiplex Detektion von humanpathogenen Pockenviren

Das Verfahren der *multicolour*, multiplex PCR wurde am Beispiel der Detektion humanpathogener Pockenviren etabliert. Als Grundlage dienten vier uniplex PCR Assays zum Nachweis von Orthopockenviren (OPV), Parapockenviren (PPV), dem Molluscum contagiosum Virus (MOCV), sowie zum Nachweis von humaner DNA (*c-myc*) als Interne Amplifikationskontrolle (IAC). Für den Aufbau einer *multicolour* PCR wurden die Sonden der vier uniplex PCRs mit unterschiedlichen Reporterfarbstoffen markiert: die OPV-spezifische Sonde war FAM- markiert, die PPV- spezifische Sonde war VIC- markiert und die *c-myc* Sonde war mit Cy5 markiert. Für die MOCV PCR wurden zwei Sonden mit gleicher Sequenz, aber unterschiedlicher Markierung (FAM bzw. VIC) verwendet.

Um die *multicolour*, multiplex PCR (mmPCR) aufzubauen, wurden zunächst alle vier uniplex PCR Assays insofern optimiert, dass sie mit dem gleichen Temperaturprofil laufen können. Die Konzentrationen der beiden unterschiedlich markierten 5' Nuklease Sonden für die MOCV PCR wurden angepasst und 0,072 µM der FAM- markierten, sowie 0,2 µM der VIC-markierten Sonde verwendet. Weiterhin war für die Einzelassays bereits bekannt, dass sie 100% spezifisch sind und eine untere Nachweisgrenze von weniger als 10 Kopien pro Reaktion aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Durch schrittweise Kombination der vier individuellen uniplex PCRs wurde eine multiplex PCR aufgebaut. Dabei wurde zunächst das Temperaturprofil der uniplex PCRs für die mmPCR verwendet. Jedoch waren dadurch zum einen die C_T-Werte der mmPCR verschlechtert (2-3 C_T-Werte höher), zum anderen verliefen die Amplifikationskurven flacher (nicht gezeigt). Um die Kurvenverläufe der mmPCR an die der uniplex PCRs anzugleichen, wurde ein zusätzlicher Elongationsschritt eingeführt, sodass sich das in 3.3.4 gezeigte Temperaturprotokoll (Tabelle 13) ergab. Die Spezifität der mmPCR wurde mit DNA folgender Viren getestet: OPV (17 Stämme von VACV, CPXV, MPXV, ECTV und CMLV), PPV (40 Stämme von Orf Virus, Bovines Papular Stomatitis Virus, Pseudo- CPXV und Seehundpockenviren (59) und MOCV (zwei klinische Proben). Eine Amplifikation mit detektierter Fluoreszenz im FAM Kanal wurde bei den OPV Proben nachgewiesen. PPV-positive Proben wurden im VIC Kanal detektiert. Ein positives Signal in beiden Fluoreszenz-Kanälen (FAM und VIC) war nur bei den beiden MOCV- positiven Proben messbar. Ebenso wie die uniplex PCRs, war somit auch die HuPox mmPCR 100% spezifisch.

Die untere Nachweisgrenze (NWG) der mmPCR lag bei 9,7 Kopien je Reaktion für MOCV DNA, bei 22,1 Kopien je Reaktion für OPV DNA und bei 28,1 Kopien je Reaktion für PPV

DNA mit einer Detektionswahrscheinlichkeit von 95%. Die Sensitivität der mmPCR ist damit etwas geringer als die der uniplex PCRs.

In Abbildung 17 sind beispielhaft die Intra- und Interassay Varianzen für PPV dargestellt. Aus den Schwankungen der C_T-Werte für die jeweilige Kopienzahl wurde der Koeffizient der Varianz in Prozent errechnet. So wurde mit allen drei virusspezifischen PCR Assays der mmPCR verfahren. Bei Konzentrationen nahe der NWG (10 und 10^2 Kopien/µl) lag die Intraassay Varianz bei 0,4 - 5,7%, während sie für höhere Plasmid DNA Konzentrationen bei 1 - 3,5% lag. Die Interassay Varianz betrug 3,5 - 5,6% für Konzentrationen nahe der NWG, sowie 1 - 3,5% für höhere DNA Konzentrationen.

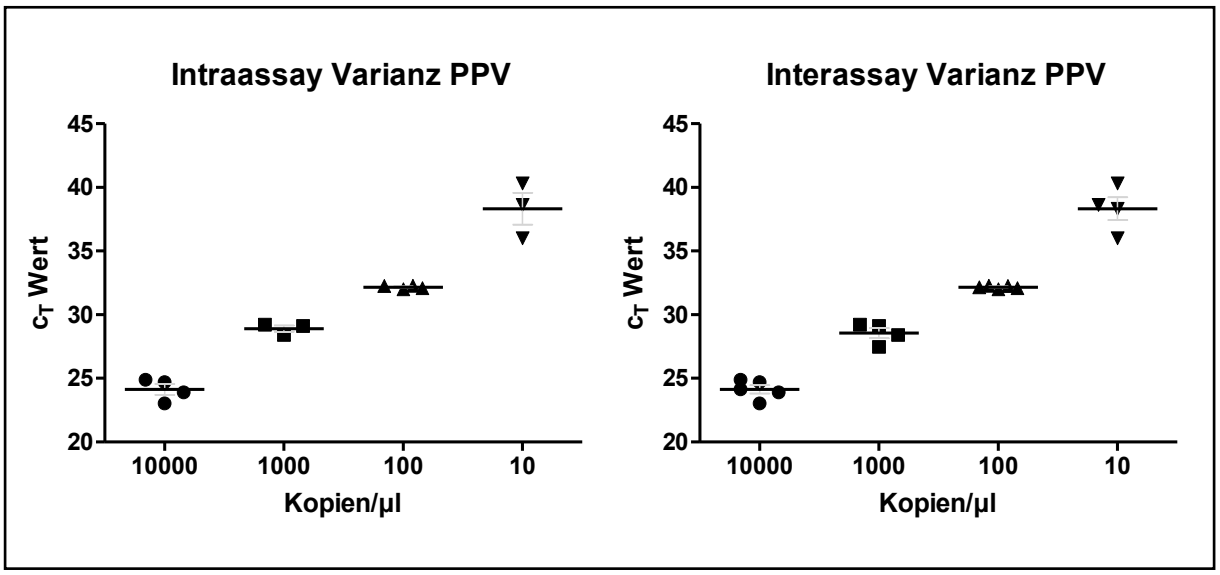


Abbildung 17: Varianzanalyse am Beispiel der PPV Detektion. Aufgetragen wurden die C_T-Werte, die für die jeweilige Kopienzahl bestimmt wurden mit der dazugehörigen Standardabweichung. Bei geringen Kopienzahlen nahe der Nachweisgrenze sind die Schwankungen der C_T-Werte mit bis zu 5,7% am größten.

Die entwickelte HuPox mmPCR wurde abschließend mit 36 klinischen Proben aus den Deutschen Konsiliarlabor für Pockenviren validiert. Die Proben waren zuvor in der Routine Diagnostik des Konsiliarlabors mit den entsprechenden uniplex PCRs analysiert worden. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der neuen mmPCR im Vergleich zu den vergangenen Untersuchungsergebnissen aufgeführt. Dabei waren 21 Proben mit beiden Methoden Pockenvirus positiv, wobei jeweils Viren des gleichen Genus detektiert wurde. Bei 14 Proben ist übereinstimmend mit beiden Tests keine Pockenvirus DNA detektiert worden. Daher ergab sich eine 100%ige Spezifität der HuPox mmPCR im Vergleich zu den uniplex PCRs. Eine mit der uniplex PCR OPV positiv getestete Probe (C_T-Wert: 36,2) war in der HuPox mmPCR wiederholt negativ, wodurch deren Sensitivität bei 94,5% lag. Bemerkenswerterweise waren die C_T-Werte der mmPCR in den klinischen Proben überwiegend ein bis zwei Werte höher als

mit der entsprechenden uniplex PCR (15 von 21 Proben). In drei dieser Proben (Nr. 4, 21, 34) war der C_T-Wert der mmPCR über 2,6 höher als der C_T-Wert der uniplex PCR. In drei weiteren Proben (Nr. 12, 22, 32) waren die C_T-Werte der mmPCR wiederum mehr als 2,6 niedriger. Bei der Detektion der Plasmid DNAs ergab die mmPCR niedrigere C_T-Werte als die uniplex PCR. Alle Proben waren positiv in der Kontroll-PCR (*c-myc*).

Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse der mmPCR und der entsprechenden uniplex *real-time* PCRs

Proben #	DNA Quelle[a]	Virus Genus	Konzentration[b]	Uniplex[c]	multiplex[c] (FAM)	multiplex[c] (VIC)
1	Gewebe	MOCV	4,4E+06	18,2/19	18,4	20,2
2	Tupfer	MOCV	4,8E+04	24,5/24,4	24,7	24,2
3	Hautschuppe	PPV	2,1E+06	21,4	-	22,7
4	Wundsekret	PPV	4,9E+02	34,5	-	41,7
5	Kruste	PPV	7,5E+05	23,0	-	24,8
6	Serum	PPV [d]	0,0E+00	-	-	-
7	Tupfer	PPV	2,7E+04	28,2	-	31,1
8	Tupfer	PPV	6,6E+04	26,8	-	27,8
9	Liquor	OPV	4,6E+04	23,9	24,3	-
10	Wundsekret	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
11	Kruste	OPV	6,3E+05	19,9	19,2	-
12	Kruste	OPV	9,7E+05	19,3	15,7	-
13	Kruste	OPV	1,7E+07	14,9	15,2	-
14	Serum	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
15	Serum	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
16	Gewebe	OPV	1,1E+05	22,6	22,4	-
17	Gewebe	OPV	5,5E+04	23,6	22,2	-
18	Gewebe	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
19	Gewebe	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
20	Gewebe	OPV	3,2E+04	24,5	25,7	-
21	Gewebe	OPV	1,1E+07	15,5	18,1	-
22	Gewebe (Paraffin)	OPV	4,9E+03	27,3	24,7	-
23	Blut	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
24	Blut	OPV	1,5E+01	36,2	-	-
25	Blut	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
26	Blut	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
27	Blut	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
28	Tupfer	OPV	2,1E+05	21,6	19,8	-
29	Tupfer	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
30	Tupfer	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
31	Tupfer	OPV	1,3E+06	18,8	17,7	-
32	Tupfer	OPV	4,9E+04	23,8	19,9	-
33	Tupfer	OPV	5,4E+05	20,1	20,3	-
34	Tupfer	OPV	2,3E+07	14,4	18,1	-
35	Tupfer	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
36	Tupfer	OPV [d]	0,0E+00	-	-	-
37	Plasmid	MOCV	1,0E+06	20,8	18,8	19,1

38	Plasmid	MOCV	1,0E+05	23,2	21,7	22,1
39	Plasmid	MOCV	1,0E+04	26,3	24,8	25,3
40	Plasmid	MOCV	1,0E+03	29,3	28,0	28,4
41	Plasmid	MOCV	1,0E+02	33,8	31,5	31,8
42	Plasmid	MOCV	1,0E+01	36,4	34,4	34,9
43	Plasmid	PPV	1,0E+06	22,6	n.b.	n.b.
44	Plasmid	PPV	1,0E+05	26,2	n.b.	n.b.
45	Plasmid	PPV	1,0E+04	29,7	-	24,1
46	Plasmid	PPV	1,0E+03	33,4	-	28,9
47	Plasmid	PPV	1,0E+02	37,0	-	32,2
48	Plasmid	PPV	1,0E+01	-	-	38,3
49	Plasmid	OPV	1,0E+06	19,3	n.b.	n.b.
50	Plasmid	OPV	1,0E+05	22,6	n.b.	n.b.
51	Plasmid	OPV	1,0E+04	26,3	24,6	-
52	Plasmid	OPV	1,0E+03	29,7	28,2	-
53	Plasmid	OPV	1,0E+02	33,2	31,5	-
54	Plasmid	OPV	1,0E+01	36,9	35,5	-

[a] Menschliche Gewebeproben stammen von Hautläsionen, außer bei Liquor, Blut und Serum
[b] Die Konzentration viraler DNA in Gewebeproben wurde durch eine Plasmid Standardkurve mit der entsprechenden uniplex *real-time* PCR bestimmt
[c] Ergebnisse als C_T-Werte angegeben
[d] Verdachtsprobe
n.b.: nicht bestimmt
-: negatives Ergebnis

4.5 Etablierung der multiplex Pyrosequenzierung zur Typisierung von Orthopockenviren

Die multiplex Pyrosequenzierung (mPSQ) wird angewendet, um Organismen zu differenzieren, die nicht durch eine einzige kurze Sequenzabfolge zu unterscheiden sind. Das ist bei nah verwandte Organismen zu beobachten, die sich zwar in mehreren Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) unterscheiden, bei denen die SNPs jedoch nicht unbedingt eindeutig eine Spezies charakterisieren. Durch Verwendung mehrerer PSQ Primer werden in einem Reaktionsgefäß zeitgleich mehrere Sequenzabschnitte sequenziert, sodass ein spezifisches Sequenzmuster entsteht. In dieser Arbeit wurde ein mPSQ Assay zur Identifizierung und Typisierung von Orthopockenviren etabliert.

Um geeignete Regionen mit den entsprechenden SNPs auszuwählen, wurden folgende Schritte angewendet: Zunächst wurde ein Alignment aller bis dahin bekannten OPV Genome erstellt. Die darin enthaltenen Sequenzen wurden nach der Spezies geordnet. Geeignete SNPs lagen in der individuellen Gruppe konserviert vor, waren jedoch nicht vollständig konserviert in den anderen Gruppen. Im konkreten Beispiel der OPV Genome konnten einige SNPs innerhalb einer Region identifiziert werden, die auf einem PCR Amplikon liegen. Um alle

SNPs des Amplikons abzudecken, wurden zwei Pyrosequenzierprimer so ausgewählt, dass die verschiedenen SNPs mit wenigen Sequenzierzyklen sequenziert werden konnten. DNA von folgenden Viren aus Zellkulturüberständen wurde verwendet: CMLV CP-19, CPXV GuWi, CPXV Brighton Red, CPXV (Calpoxvirus), ECTV MP-Nü, MPXV MSF #6, VACV VR-1536. Die resultierenden Sequenziermuster waren eindeutig für die jeweilige OPV Spezies (Abbildung 18). Eine Probe mit nicht-OPV DNA wurde korrekt als unbekannt („unknown“) erkannt. Die Negativkontrolle ohne DNA ist eindeutig negativ.

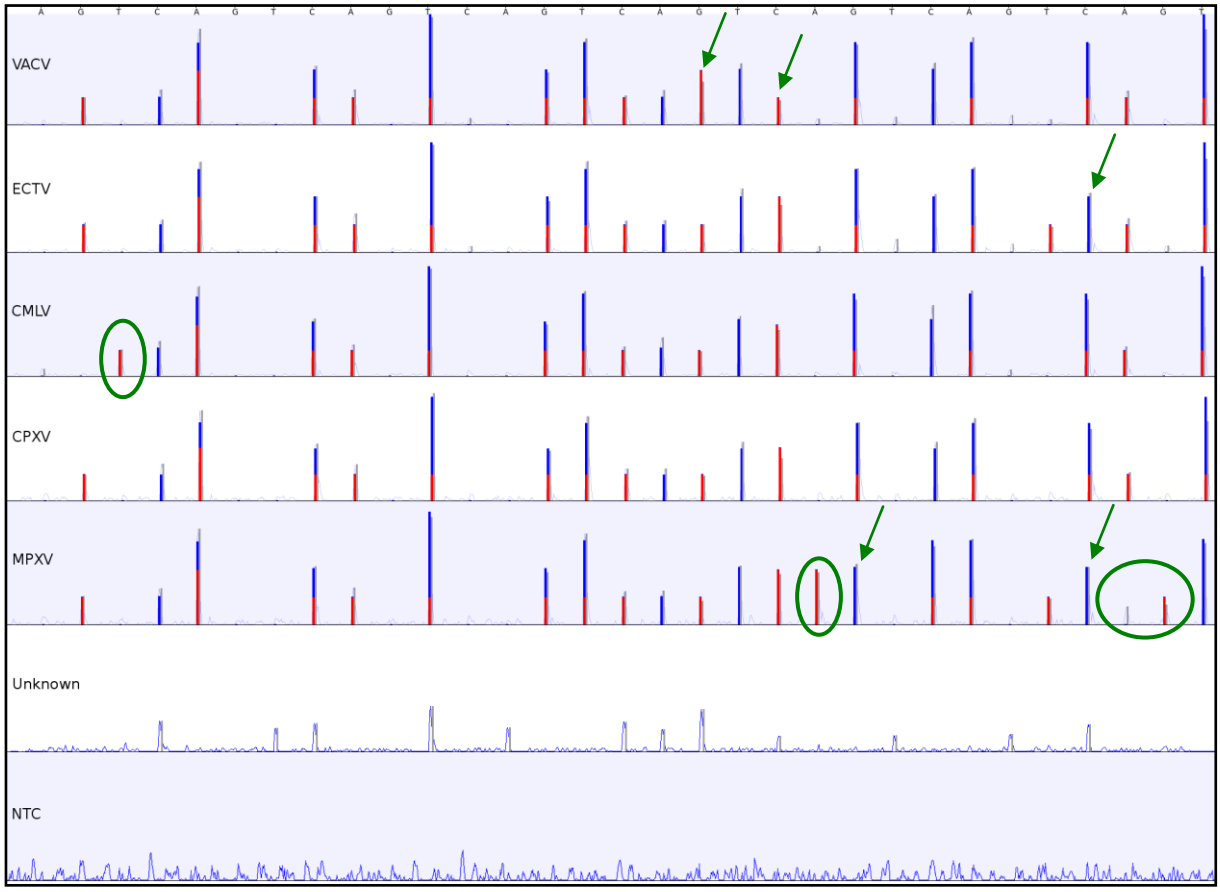


Abbildung 18: Sequenziermuster (*Fingerprints*) der multiplex PSQ mit verschiedenen OPV. Durch die PSQ zweier Sequenzabschnitte eines PCR Produktes mit zwei PSQ Primern entsteht ein Muster, mit dem die OPV Spezies eindeutig zugeordnet werden kann. Die roten und blauen Balken zeigen den theoretisch errechneten Anteil der Signale der beiden PSQ Primer an dem detektierten Peak (grauer Balken). Die Ellipsen markieren Peaks, die beispielsweise in einer OPV Spezies auftauchen, in den anderen nicht und umgekehrt. Die Pfeile markieren spezies-spezifische Unterschiede in der Peakhöhe (jeweils nicht alle Unterschiede markiert). Nicht-OPV DNA wird als „unknown“ detektiert, die NTC ohne DNA ergibt kein Pyrogramm. Die Entwicklung der Auswertesoftware erfolgte in Zusammenarbeit mit Wojtek Dabrowski.

Beide Methoden identifizierten die 22 klinischen Proben eindeutig und übereinstimmend als CPXV bzw. ECTV positiv. Von vier Proben, von denen keine HA Sequenz vorlag, lag jedoch die Sequenz des Gesamtgenoms vor, sodass diese Proben mit der mPSQ ebenfalls korrekt als CPXV identifiziert wurden. Vier Proben, von denen weder eine HA Sanger Sequenz noch das Gesamtgenom vorlag, wurden mit der mPSQ als CPXV positiv bestimmt.

Tabelle 26: Ergebnisse der multiplex PSQ im Vergleich zur Sanger Sequenzierung

Proben #	Spezies	DNA Quelle[a]	OPV PCR	Sanger Sequenzierung	Multiplex Pyrosequenzierung
1	Hund	Gewebe, Paraffin	+	n.b.	CPXV
2	Jaguarundi	Haut	+	CPXV	CPXV
3	Katze	Kruste	+	CPXV	CPXV
4	Katze	Abstrich	+	CPXV	CPXV
5	Mara	Auge	+	(CPXV)	CPXV
6	Maus	Lunge	+	ECTV	ECTV
7	Mensch	Abstrich	+	CPXV	CPXV
8	Mensch	Kruste	+	(CPXV)	CPXV
9	Mensch	Abstrich	+	CPXV	CPXV
10	Mensch	Abstrich	+	CPXV	CPXV
11	Mensch	Wundsekret	+	CPXV	CPXV
12	Mensch	Abstrich	+	CPXV	CPXV
13	Mensch	Haut	+	CPXV	CPXV
14	Mensch	Kruste	+	(CPXV)	CPXV
15	Mensch	Kruste	+	CPXV	CPXV
16	Mensch	Netzhaut	+	CPXV	CPXV
17	Mensch	Gewebe	+	CPXV	CPXV
18	Mensch	Gewebe, Paraffin	+	n.b.	CPXV
19	Mensch	Gewebe	+	(CPXV)	CPXV
20	Mensch	Abstrich	+	n.b.	CPXV
21	Mensch	Gewebe	+	CPXV	CPXV
22	Mensch	Kruste	+	CPXV	CPXV
23	Mensch	Abstrich	+	n.b.	CPXV
24	Mensch	Lymphknoten	+	CPXV	CPXV
25	Mensch	Handschuh	+	CPXV	CPXV
26	Mensch	Wundsekret	+	CPXV	CPXV
27	Ratte	Abstrich	+	CPXV	CPXV
28	Ratte	Haut	+	CPXV	CPXV
29	Ratte	Lunge	+	CPXV	CPXV
30	Ratte	Abstrich	+	CPXV	VACV
31	Zebramanguste	Haut	+	CPXV	CPXV
32	Mensch	Abstrich	-	PPV	-
33	Mensch	Serum	-	PPV	-
34	Mensch	Abstrich	-	MOCV	-
35		Zellkultur	+	CMLV	CMLV
36		Zellkultur	+	CPXV	CPXV
37		Zellkultur	+	CPXV	CPXV
38		Zellkultur	+	CPXV	CPXV
39		Zellkultur	+	ECTV	ECTV
40		Zellkultur	+	MPXV	MPXV
41		Zellkultur	+	VACV	VACV

[a] Gewebeproben, Krusten und Abstriche stammen von Hautläsionen
n.b.: nicht bestimmt
-: negatives Ergebnis
(CPXV): Sequenz aus Gesamtgenom-Sequenzierung

Im Fall der Probe Nr. 31 widersprechen sich die Ergebnisse beider Sequenziermethoden. Während die HA Sequenz der Probe mit CPXV Sequenzen übereinstimmt, war das Sequenziermuster der mPSQ VACV typisch. Andere humanpathogene Pockenviren aus nicht-OPV Genera, PPV und MOCV, waren in der mPSQ negativ.

4.6 Erregersuche in humanem Gewebe von SIDS Proben

4.6.1 SIDS Proben und Voruntersuchungen der Rechtsmedizin

In dem Zeitraum dieser Arbeit sind im Institut für Rechtsmedizin der Charité Berlin drei Fälle mit Verdacht auf SIDS eingegangen. Durch umfassende makroskopische und mikroskopische (histo-) pathologische Untersuchungen, sowie toxikologische und erste molekularbiologische Untersuchungen wurde die Ausschlussdiagnose SIDS in allen drei Fällen gestellt. Folgende Gewebeproben und Körperflüssigkeiten sind daher asserviert und an das RKI gesendet worden:

- Fall 1: Blut, Fettgewebe, Gaumenmandel, Gehirn, Herz, Hirnhaut, Knochenmark, Leber, Liquor, Lunge, Lymphknoten, Milz, Muskel, Nebenniere, Niere, Pankreas, Parotis, Schilddrüse, Thymus und Zwerchfell
- Fall 2: Blut, Fettgewebe, Gaumenmandel, Gehirn, Herz, Knochenmark, Leber, Liquor, Lunge, Lymphknoten, Milz, Muskel, Nebenniere, Niere, Pankreas, Parotis, peripherer Nerv, Rückenmark, Schilddrüse und Thymus
- Fall 3: Blut, Dickdarm, Dünndarm, Fettgewebe, Gaumenmandel, Glaskörperflüssigkeit, Gehirn, Herz, Hirnhaut, Knochenmark, Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz, Muskel, Nebenniere, Niere, Pankreas, Parotis, peripherer Nerv, Rückenmark, Schilddrüse, Thymus und Zwerchfell

4.6.2 Spezifische Erregersuche

Für die spezifische Suche nach Infektionserregern, die in Zusammenhang mit SIDS diskutiert werden, wurden verschiedene uniplex *real-time* PCR Assays etabliert. Diese ermöglichten die spezifische Detektion von Erreger-DNA aus *E. faecium*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, EBV und HHV-6. Für den Nachweis von Lungjan Virus-RNA wurde eine bereits etablierte *real-time* PCR verwendet (60). Für den PCR Nachweis wurden RNA und DNA getrennt durch aufeinanderfolgende Elution mit unterschiedlichen Puffern aus den jeweiligen Geweben bzw. Körperflüssigkeiten der SIDS Proben isoliert (siehe 3.1). In keiner der SIDS

Proben konnte Virus-DNA von EBV und HHV-6, DNA von *E. faecium*, *N. meningitidis*, und *S. aureus*, bzw. Lungjan Virus-RNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war die *S. pneumoniae* PCR schwach positiv mit DNA aus den Gaumenmandeln aller drei untersuchten Fälle, sowie mit DNA aus dem Liquor von Fall 2 (Tabelle 27). Bei Wiederholung der *S. pneumoniae* PCR waren die gleichen Proben erneut positiv. Über einen mitgeführten internen Standard wurde die Anzahl der GE ermittelt, welche je nach Probe zwischen 13 und 100 GE/ PCR lag.

Tabelle 27: Ergebnisse der *S. pneumoniae real-time* PCR mit den SIDS Proben

DNA Quelle	C_T- Mittelwert	Standardabweichung	GE / PCR
Gaumenmandel Fall 1	34,8	± 0,40	32
Gaumenmandel Fall 2	34,1	± 0,26	52
Liquor Fall 2	32,9	± 0,40	100
Gaumenmandel Fall 3	35,8	± 0,38	13

C_T: Schwellenwert-Zyklus
GE: Genomäquivalente

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine *nested* PCR durchgeführt. Dabei wurde auf einen zweiten PCR Assay zurückgegriffen, der eine Region des *S. pneumoniae* Genoms amplifiziert, die auf dem gleichen Zielgen (*lytA*), aber in einem zum *real-time* PCR Assay benachbarten Bereich liegt (Abbildung 19). Dadurch sollte ein längeres Amplikon in ausreichenden Konzentrationen für die Sanger Sequenzierung generiert werden. Allerdings war es mit den gewählten Primerkombinationen nicht möglich, *S. pneumoniae* DNA aus den SIDS Proben zu amplifizieren, sodass die Ergebnisse der *real-time* PCR nicht bestätigt werden konnten.

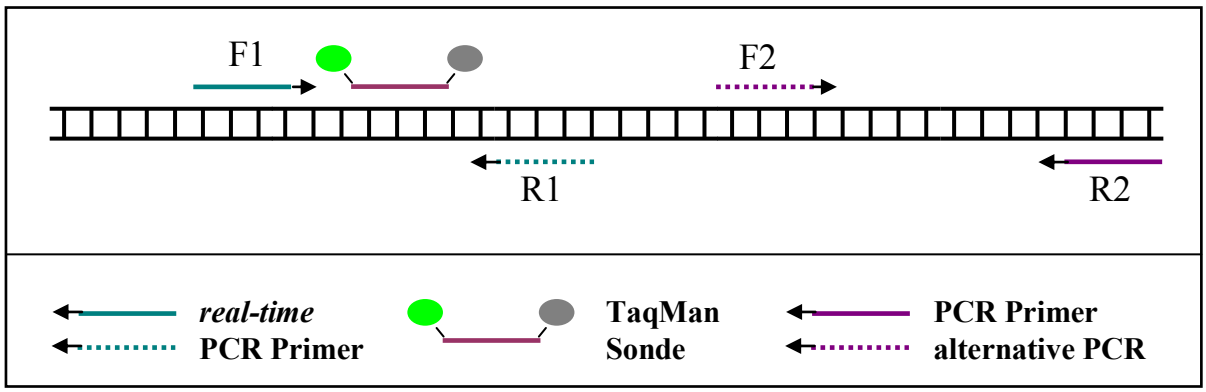


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Primer für die *S. pneumoniae real-time* und *nested* PCR. Die erste Runde der *nested* PCR erfolgte mit R2 und dem dazu passenden Primer F1 aus der *real-time* PCR. Die eigentliche *nested* PCR wurde anschließend mit dem gleichen Primerpaar durchgeführt oder mit F1 oder R2 und dem jeweils anderen Primer aus den ursprünglichen PCRs (R1) bzw. F2.

4.6.3 Aufbereitung von Nukleinsäuren aus humanem Gewebe für das *Next Generation Sequencing*

Im Gegensatz zu den erregerspezifischen PCRs werden mit Hilfe des NGS alle Nukleinsäuren einer Probe gleichzeitig analysiert. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Nukleinsäuren aus den verschiedenen Geweben der SIDS Proben hauptsächlich um humane DNA bzw. RNA handelt. Nukleinsäuren von Pathogenen hingegen liegen vermutlich in geringeren Mengen vor. Um in der Sequenzierung den Anteil an erregerspezifischen *Reads* zu erhöhen, ist es notwendig, humane Sequenzen möglichst schon vor der Erstellung einer NGS-Bibliothek zu entfernen.

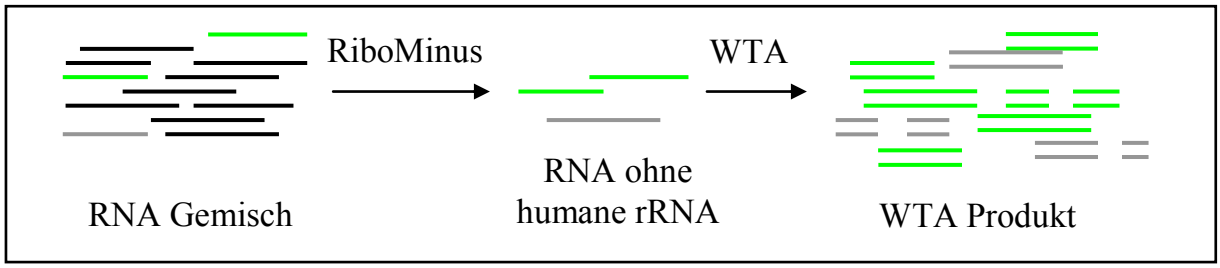


Abbildung 20: Aufbereitung von RNA aus den SIDS Gewebeproben für die 454-Sequenzierung. Die RNAs aus den verschiedenen Geweben eines SIDS Falls werden gemischt. Mit Hilfe des RiboMinus Kits wird humane rRNA entfernt. Die verbliebenen RNAs inklusive möglicher Erreger-RNAs werden mit dem WTA Kit vor-amplifiziert. Es entstehen unterschiedlich lange, doppelsträngige DNA-Fragmente, die zur Erstellung einer 454 DNA Bibliothek verwendet werden.

Grundsätzlich ist es möglich, RNA oder DNA für die Erstellung einer NGS Bibliothek zu verwenden. Bei einer Suche nach unbekannten Erregern bietet RNA den Vorteil, dass sowohl Viren erfasst werden, deren Genom als RNA vorliegt, sowie alle anderen Erreger, die in ihrem Replikationszyklus RNA ausbilden. Da humane ribosomale RNA (rRNA) den größten Anteil an der humanen, aber auch an der Gesamt- RNA Menge in den SIDS Proben ausmacht, wurde diese mit kommerziell erhältlichen Kits entfernt. Dazu wurden die RNAs aus den verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten eines SIDS Falles gemischt und humane rRNA wie in 3.7.3 beschrieben, entfernt (Abbildung 20). Trotz anschließender Aufkonzentrierung des RNA Gemisches war die Konzentration mit 13 – 15 ng / µl für die Erstellung einer NGS Bibliothek zu gering. Um das RNA Gemisch weiter anzureichern, wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (siehe 3.7.3), mit dem üblicherweise das gesamte Transkriptom amplifiziert (Whole Transcriptome Amplification, WTA) werden kann. Da mit diesem Kit unspezifisch alle RNAs einer Probe vervielfältigt werden, wurde es genutzt, um die RNA Menge des RNA Gemisches zu erhöhen. Die Amplifikation ist ein zweistufiger Prozess: zunächst wird die RNA fragmentiert und durch Ligation von

Adapterenden mit universeller Primersequenz eine Bibliothek erstellt; anschließend erfolgt die Amplifikation aller Fragmente über universelle Primer. Das bedeutet, dass nach dem WTA ein Gemisch aus kurzen, doppelsträngigen DNA Fragmenten vorlag. Dieses DNA Gemisch war Ausgangsstoff für die Erstellung der NGS Bibliothek.

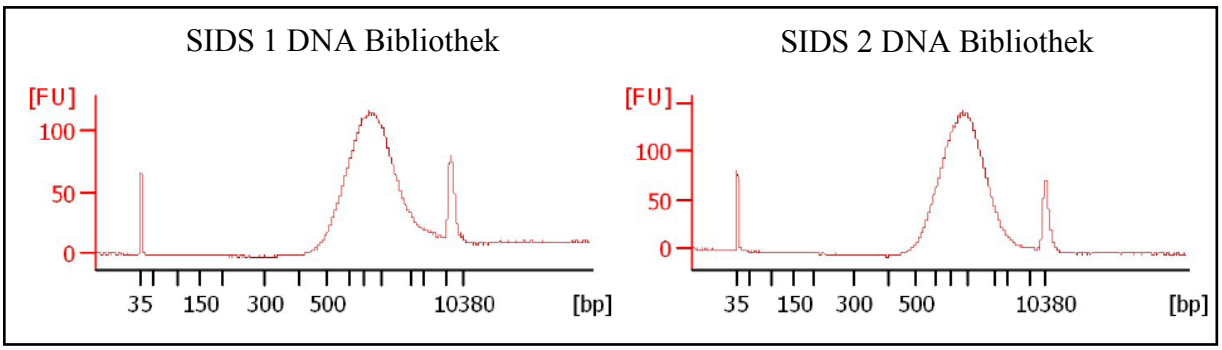


Abbildung 21: Qualitätskontrolle der DNA Bibliotheken. Je DNA Bibliothek wurde 1 µl auf einen High Sensitivity DNA Chip (Agilent) aufgetragen und gemessen. Im Diagramm sind die gemessenen Fluoreszenzeinheiten [FU] über die Fragmentgrößen [bp] aufgetragen. Neben zwei Marker-Peaks ergibt sich ein großer Peak, der die Fragmentgrößen der Bibliothek anzeigt. Die Bibliotheken der SIDS Proben 1 & 2 bestehen im Durchschnitt aus 800-900 bp langen Fragmenten. Diese Fragmentgrößen eignen sich für die anschließende 454-Sequenzierung.

Für eine 454 DNA Bibliothek wurden je Probe 500 ng DNA benötigt. Im Fall der SIDS Proben waren nach dem WTA 470 – 760 ng /µl WTA Produkt vorhanden, sodass jeweils ca. 1 µl für die Erstellung der DNA Bibliothek ausreichten. Da die DNA in den Proben nach der beschriebenen Vorbehandlung bereits fragmentiert vorlag, wurde der Schritt der Fragmentierung zur Erstellung einer DNA Bibliothek übersprungen. Der gesamte Prozess der Probenaufarbeitung ist in Abbildung 22 zusammengefasst. Die fertigen DNA Bibliotheken wurden auf einem High Sensitivity Chip (Agilent) analysiert (Abbildung 21) und in die 454-Sequenzierung eingesetzt.

4.6.4 Sequenzierung der SIDS Proben mit der 454-Technologie

Von den drei SIDS Fällen sind die Proben von Fall 1 und 2 erfolgreich mit der 454-Technologie sequenziert worden. Dazu wurde jeweils eine halbe PTP mit der amplifizierten und angereicherten DNA Bibliothek aus dem RNA Gemisch eines SIDS Falls belegt. Für die Probe aus Fall 1 wurden insgesamt 563.673 *Reads*, für die Probe aus Fall 2 592.455 *Reads* generiert. Diese *Reads* wurden anschließend über verschiedene bioinformatische Werkzeuge analysiert. Die schematische Abfolge dieser Auswertung ist in Abbildung 23 dargestellt.

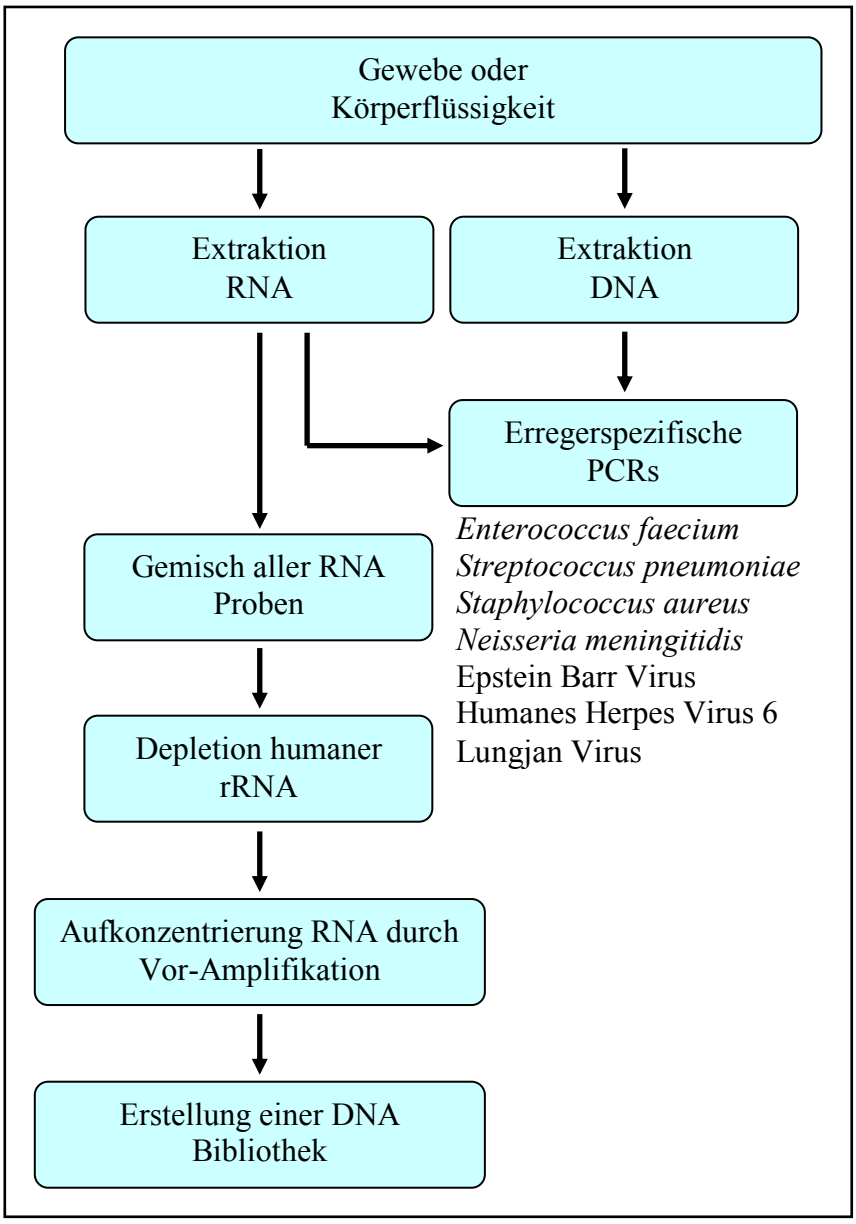


Abbildung 22: Schema der Vorgehensweise bei der Vorbereitung humaner Gewebeproben auf das *Next Generation Sequencing*. Aus dem humanen Gewebe oder der Körperflüssigkeit werden getrennt RNA und DNA extrahiert. Mit beiden Nukleinsäuren erfolgt die spezifische Detektion durch erregerspezifische PCRs. Die RNA Proben eines Falles werden gemischt und die humane rRNA durch Anwendung eines kommerziell erhältlichen Kits entfernt. Durch eine *Whole Transcriptome Amplification* (WTA) wird die RNA anschließend vervielfältigt. Das WTA Produkt wird für die Erstellung einer NGS DNA Bibliothek verwendet.

Da die Proben trotz Abreicherung humaner rRNA viele humane Sequenzen enthielten, die für die Fragestellung irrelevant waren, wurden diejenigen *Reads* herausgefiltert, die humanen Sequenzen entsprechen. Dazu wurde eine Negativselektion durchgeführt, bei der die *Reads* gegen eine Gendatenbank aus allen humanen Einträgen abgeglichen wurden. Tatsächlich wurde diese Datenbank in mehrere kleinere Datenbanken geteilt, da sonst zuviel Rechenzeit benötigt worden wäre. Nach diesem Filterschritt waren in der Probe von Fall 1 noch 54.148 *Reads* und in der Probe des Falls 2 65.056 *Reads* übrig. Letztendlich wurden die verbliebenen *Reads* mit der gesamten ncbi nr/nt Datenbank abgeglichen. Durch die darauf folgende

Qualitätsfilterung wurden nur solche *Reads* herausgefiltert, die bei dem Datenbankabgleich zu der gefundenen Sequenz eine Identität von mindestens 70% aufwiesen. Um die Eindeutigkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurden solche *Reads*, die Ähnlichkeit zu Sequenzen von mehreren, taxonomisch entfernten Gruppen hatten, verworfen. Nach diesen Filterungsvorgängen blieb in den Proben 1 und 2 jeweils ein erregerspezifischer *Read* übrig.

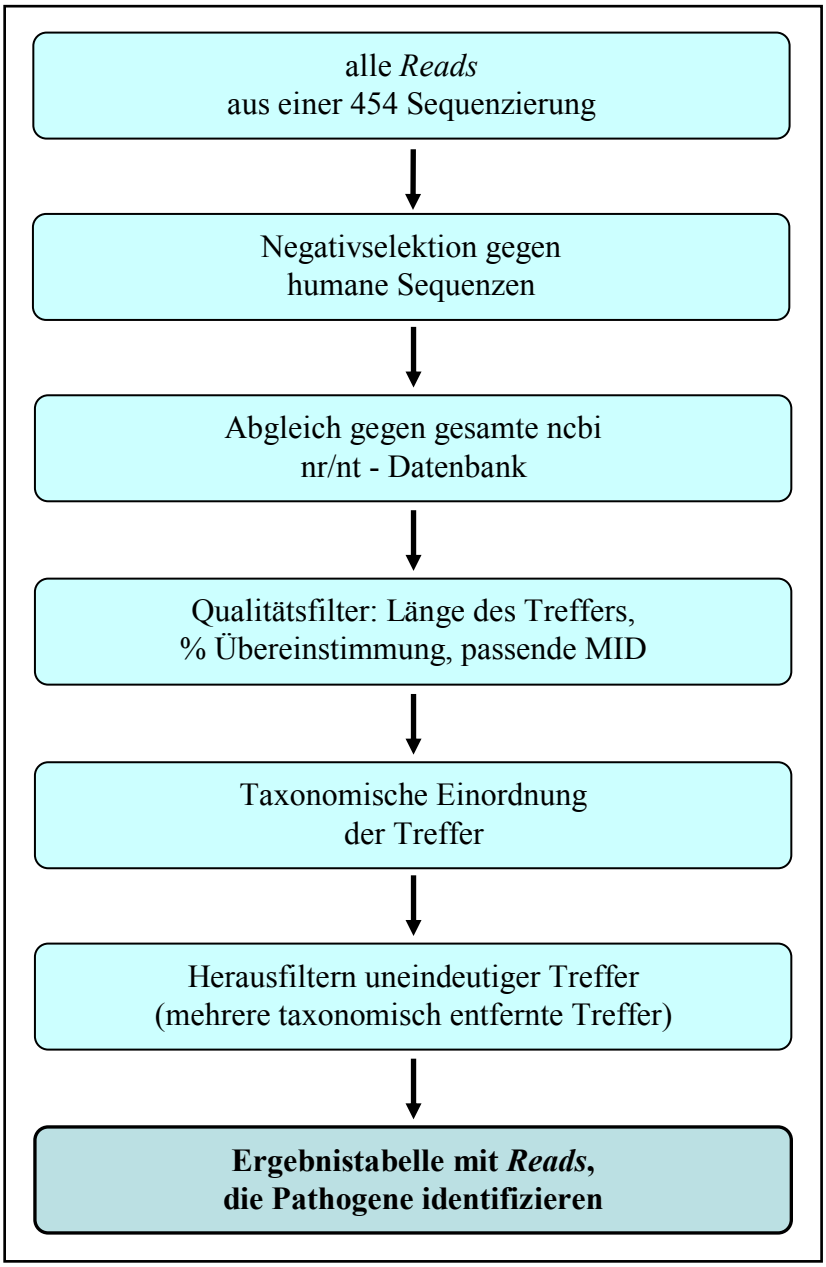


Abbildung 23: Vorgehensweise bei der bioinformatischen Analyse der Sequenzdaten. Nachdem humane Sequenzen herausgefiltert wurden, erfolgt der Abgleich der verbliebenen *Reads* mit der ncbi Datenbank. Die ermittelten Treffer passieren eine Qualitätskontrolle und werden taxonomisch eingeordnet, um erregerspezifische Treffer zu identifizieren.

5 Diskussion

5.1 Aufbereitung von Umweltproben

Die molekularbiologische Detektion von Pathogenen basiert auf der Isolierung der Nukleinsäuren aus der gegebenen Matrix und dem anschließenden Nachweis der RNA bzw. DNA mittels erregerspezifischer *real-time* (RT-) PCR. Für die Extraktion von Nukleinsäuren aus klinischen Proben, bei denen die Matrix weitestgehend bekannt ist, existieren gut angepasste kommerziell erhältliche Extraktionskits, wie beispielsweise für die Isolation von DNA und/oder RNA aus Blut. Bei Umweltproben jedoch, ist die Zusammensetzung der Probe meistens unbekannt. Zudem enthalten solche Umweltsubstanzen häufig Komponenten, die bei der Extraktion der Nukleinsäuren mit isoliert werden können und eine zuverlässige PCR Detektion beeinträchtigen oder gar inhibieren können. So ist beispielsweise bekannt, dass Huminsäuren aus dem Erdboden die PCR Reaktion stören (61). Auch viele handelsübliche, leicht verfügbare Haushaltsprodukte enthalten PCR inhibierende Komponenten (54, 62). Für eine umfassende Risikoabschätzung und um die Infektion von Menschen zu verhindern, wird die Detektion von Pathogenen aus Umweltproben jedoch immer wichtiger. Des Weiteren kann im Falle eines bioterroristischen Ereignisses nicht ausgeschlossen werden, dass Pathogene absichtlich mit Umweltsubstanzen gemischt werden, um sie zu maskieren und leichter verbreiten zu können. Substanzen, die in Pulverform vorliegen, gelten zudem als Quelle für inhalierbare Pathogene (63). Um inhibitorische Effekte zu minimieren, müssen vorhandene Detektionssysteme, bestehend aus Nukleinsäure Extraktion und PCR Reaktion, angepasst werden.

Zusätzliche, vorgeschaltete Aufreinigung von Erregerpartikeln. In dieser Arbeit wurde ein allgemeines Protokoll entwickelt, um verschiedene Infektionserreger in unterschiedlichen Umweltsubstanzen zu detektieren. Dabei wurde zum einen das Verfahren zur Isolation von Nukleinsäuren abgeändert, zum anderen wurde die PCR Reaktion für den Nachweis von DNA und RNA optimiert. Umweltproben, die als Pulver oder in ähnlich fester Form vorliegen, werden nach dem neu entwickelten Verfahren zunächst mit PBS aufgeschwemmt und in zwei Portionen geteilt. Während der Hauptteil der Probe nach dem neu entwickelten Protokoll aufgereinigt wird, bevor die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgt, wird der kleinere Teil der Probe direkt in die herkömmliche Extraktion eingesetzt, ohne vorherige Aufreinigung. Es konnte gezeigt werden, dass das neu etablierte Verfahren bei den getesteten

Haushaltsprodukten überwiegend erfolgreich angewendet werden konnte. Eine Ausnahme stellte schwarzer Tee dar, bei dem inhibitorische Komponenten nicht durch die zusätzliche Aufreinigung entfernt werden konnten. Um eine zuverlässige Detektion aus den meist unbekannten Matrices der Umweltproben zu ermöglichen, sollten daher beide Verfahren wie beschrieben parallel angewendet werden.

Extraktion von RNA und DNA. Die eigentliche Extraktion sollte die parallele Isolation von RNA und DNA aus unterschiedlichen Pathogenen ermöglichen. Neben der Extraktion von Nukleinsäuren aus behüllten und unbehüllten Viren, sollte auch DNA aus Bakterien mit unterschiedlich beschaffenen Zellwänden (gram-positiv bzw. -negativ) und deren Sporen isoliert werden können. Als Modellorganismen wurden ein behülltes DNA Virus (VACV), ein unbehülltes (FCV) und ein behülltes (Dengue Virus) RNA Virus, sowie ein gram-negatives Bakterium (*Y. pestis*) gewählt. Die hier verwendeten Kits ermöglichten die Extraktion von RNA und DNA der ausgewählten Pathogene und deren erfolgreiche Detektion in zehn ausgewählten Umweltsubstanzen mit Hilfe der *one-step* (RT-) PCR. Die Aufreinigung mit dem blackPREP Kit stellt eine sehr universelle Methode dar, bei der jegliche Erregerpartikel unspezifisch über die Ausbildung eines Polymers anreichert werden. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf weitere Erreger, wie gram-positive Bakterien und Bakteriensporen muss in weiteren Versuchen überprüft werden. Auch könnte im Anschluss an die Aufreinigung, je nach Organismus, ein anderes Extraktionskit verwendet oder ein zusätzlicher Lyseschritt eingefügt werden. So könnte beispielsweise zwecks Lyse von Bakterienzellwänden ein Verdau mit Lysozym eingefügt werden.

PCR Detektion. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche PCR Systeme für die Detektion der Pathogene aus Umweltproben getestet. Wie sich gezeigt hat, war die verwendete *one-step* (RT-) PCR (Qiagen) robuster gegenüber inhibitorischen Substanzen als die Platinum Taq Polymerase, mit der beispielsweise DNA aus Waschmittel und schwarzem Tee nicht amplifiziert werden konnte. Allerdings war die NWG der DNA Detektion mit der *one-step* (RT-) PCR etwa zwei log Stufen geringer als mit der Platinum Taq Polymerase. Durch Zugabe von Platinum Taq Polymerase zu den *one-step* RT-PCR Reagenzien konnte die Sensitivität der DNA Detektion nicht gesteigert werden. Auch eine Erhöhung der Konzentration an Platinum Taq Polymerase im *two-step* PCR System auf fünf *Units*, wie von Kurth *et al.* gezeigt (54), konnte die inhibitorischen Effekte nicht verringern. Um DNA aus Umweltproben erfolgreich zu amplifizieren, kann also die Platinum Taq Polymerase

verwendet werden, die zwar weniger robust gegenüber Inhibitoren, aber sensitiver ist. Das kann beispielsweise von Vorteil sein, wenn eine Probe sehr wenig DNA enthält. Das *one-step* RT-PCR Kit hingegen sollte verwendet werden, um mögliche inhibitorische Effekte unbekannter Substanzen aufzuheben, wobei ein Verlust an Sensitivität einkalkuliert werden muss. Für eine sichere und sensitive DNA Detektion aus Umweltproben sollten jedoch beide Systeme parallel angewendet werden.

Es zeigte sich jedoch, dass das Verfahren der Aufreinigung und Extraktion generell zu einem Verlust an Nukleinsäuren führte, da mit der PCR unabhängig von dem verwendeten PCR System, der Art des Erregers und der Umweltsubstanz weniger Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte als initial hineingegeben wurde. Eine Ursache dieses Phänomens könnte der Vorfilter sein, auf den die Proben nach dem Aufschwemmen mit PBS gegeben wurden, um Schwebeteilchen und grobe Partikel zu entfernen. Möglicherweise werden von diesem Filter auch Erregerpartikel zurückgehalten, die somit für die anschließende Aufreinigung und Extraktion der Nukleinsäuren nicht mehr zur Verfügung stehen.

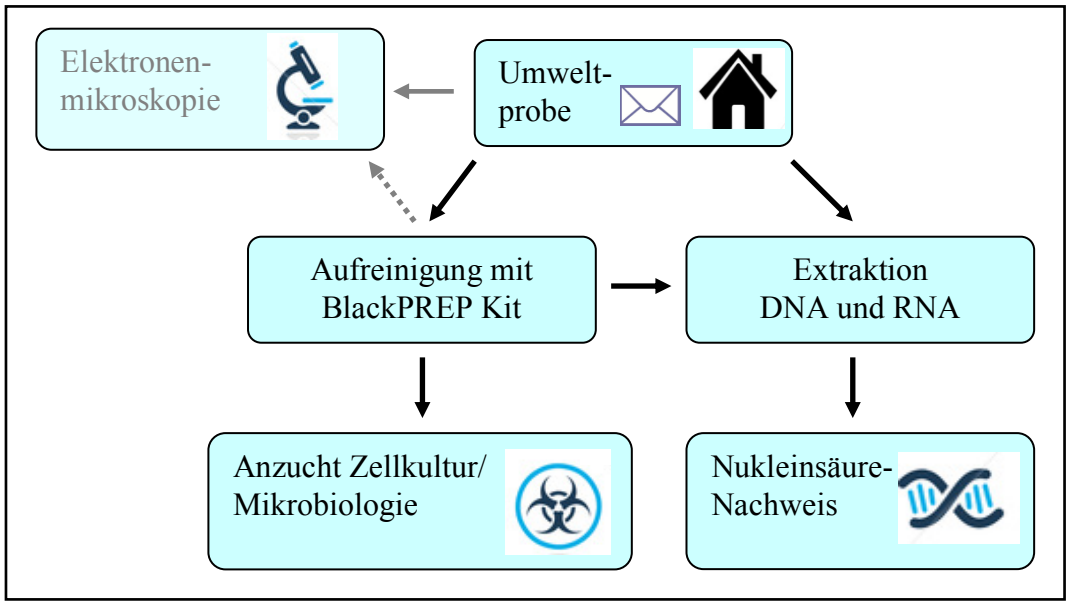


Abbildung 24: Mögliches Vorgehen zur Untersuchung von Umweltproben. Die Umweltprobe wird mit PBS aufgeschwemmt. Ein Teil wird mit dem BlackPREP Kit aufgereinigt, ein Teil wird direkt in die Nukleinsäure-Extraktion gegeben. Aufgereinigte, angereicherte Erregerpartikel können über Virusanzucht in Zellkultur bzw. mikrobielle Kultivierung nachgewiesen werden. Ein zweiter Teil der aufgereinigten Probe wird für die Extraktion verwendet. Mit der extrahierten DNA und RNA erfolgt die molekularbiologische Analyse auf erregerspezifische Nukleinsäuren. Parallel wird die Probe mit weiteren Methoden wie der Elektronenmikroskopie auf das Vorhandensein von Pathogenen untersucht.

Bestätigung positiver PCR Ergebnisse. Wie alle nukleinsäurebasierten Nachweismethoden hat die PCR den Nachteil, dass nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln unterschieden werden kann. Daher muss ein positives PCR Ergebnis durch weitere Methoden

wie Virusanzucht in Zellkultur bzw. Bakterienkultur bestätigt werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass manche Umweltsubstanzen wie Waschmittel oder schwarzer Tee die Kultivierung von Zellen verhindern (54), wodurch die Virusanzucht und der Nachweis infektiöser Viruspartikel mittels Plaquetest nicht möglich ist. Erste Untersuchungen mit VACV aus Zellkulturüberständen legen nahe, dass die beschriebene Aufreinigungsmethode die Isolation intakter, infektiöser Viruspartikel ermöglicht (Daten nicht gezeigt). Daher wäre es möglich, eine Probe mit dem BlackPREP Aufreinigungskit zu behandeln und anschließend in zwei Portionen zu teilen (Abbildung 24). Während ein Teil der Probe für den molekularbiologischen Nachweis via PCR inaktiviert und lysiert wird, kann der zweite Teil der Probe beispielsweise zur Virusanzucht verwendet werden.

Fazit. Das entwickelte Verfahren kann zur Analyse von Umweltproben über die PCR verwendet werden. Der zusätzliche Aufreinigungsschritt dauert etwa 40 Minuten, sodass der gesamte Prozess bis zur PCR Amplifikation innerhalb von fünf Stunden durchgeführt werden kann. Durch das Entfernen inhibitorischer Komponenten ist eine zuverlässige PCR Detektion von DNA und RNA enthaltenden Pathogenen in diversen problematischen Umweltsubstanzen möglich. Es bleibt anzumerken, dass es nicht möglich ist, jede in Frage kommende Substanz mit diesem Prozess zu testen. Die Auswahl beschränkte sich auf einige wenige Haushaltsprodukte, die leicht verfügbar sind oder auch schon in Zusammenhang mit BT Ereignissen verwendet wurden (54). Des Weiteren kann eine Kombination verschiedener Umweltsubstanzen oder verschiedener Pathogene in einer Probe nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus muss die Sensitivität des Verfahrens optimiert werden. Jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass das etablierte Verfahren universell und für eine Vielzahl von sehr heterogenen Substanzen verwendbar ist. Zudem kann es bei weiteren, bisher nicht getesteten Substanzen oder anderen Pathogenen gegebenenfalls angepasst werden.

5.2 Die Kombination der real-time *PCR mit der Pyrosequenzierung ermöglicht die spezifische Detektion biologischer Agenzien*

Um ein positives PCR Ergebnis abzusichern und den detektierten Organismus zu typisieren, werden üblicherweise DNA Sequenzierungen durchgeführt. In der Diagnostik biologischer Agenzien ist ein schnelles und sicheres Ergebnis gefordert, welches mit Hilfe der Pyrosequenzierung gewonnen werden kann. Im Gegensatz zur zeitaufwendigen Sanger Sequenzierung, werden bei der PSQ kurze Sequenzen von bis zu 70 Basen generiert (64). Da

die PSQ des Weiteren auf einer zuvor durchgeführten PCR Reaktion basiert, kann sie mit der *real-time* PCR zu kombinieren. Dadurch kann ein positives PCR Ergebnis direkt im Anschluss bestätigt und zusätzlich der detektierte Organismus anhand der gelesenen Sequenz identifiziert werden. In den letzten Jahren sind daher diverse PSQ Assays entwickelt worden, die im Anschluss an eine *real-time* PCR durchgeführt werden und zur Identifikation und Differenzierung von klinisch relevanten Viren oder Bakterien dienen (65-69). Für die Identifizierung biologischer Agenzien, obwohl ebenfalls klinisch relevant, existieren hingegen wenige oder gar keine PSQ Assays.

PSQ Assays für die bakteriellen Erreger basieren dabei häufig auf konventionellen PCR Reaktionen. Beispielsweise können bakterielle Pathogene über Pyrosequenzierung der 16S rRNA identifiziert werden (70). Jacob *et al*. konnten 2011 zeigen, dass diese universelle Methode für die Identifizierung und Subtypisierung von *F. tularensis* geeignet ist (71). Für die Detektion von *B. anthracis* sind PSQ Assays beschrieben worden, die vier SNPs im *rpoB* Gen von *B. anthracis* als chromosomalen Marker identifizieren, sowie je ein Segment auf den beiden Plasmiden sequenzieren (72). Ahmod *et al*. nutzen die Sequenzierung des Gens *yeaC* zur Differenzierung von *B. anthracis* von anderen *B. cereus* Spezies (73). Loveless *et al*. nutzen die PSQ zur Analyse von Mutationen, die die Antibiotika Resistenz (Ciprofloxacin) von *B. anthracis, F. tularensis* und *Y. pestis* bedingen (74). Für weitere biologische Agenzien, darunter OPV und verschiedene RNA Viren sind keine PSQ Assays bekannt. Des Weiteren fehlen in der bisherigen Detektion biologischer Agenzien Methoden, mit denen ein *real-time* PCR Ergebnis bestätigt und der detektierte Erreger typisiert werden kann.

Kombination aus real-time PCR und PSQ als neuer Ansatz. In dieser Arbeit wurde die Kombination aus *real-time* PCR und PSQ für die Detektion folgender Erreger erfolgreich etabliert: *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, RVFV und die IC 1 (KoMa). Dabei wurden bereits etablierte *real-time* PCR Assays als Grundlage für die PSQ verwendet (siehe auch 5.2). Während die *real-time* PCR als sehr sensitive Methode 1 – 10 Kopien des jeweiligen Kontrollplasmides nachweisen konnte, war die PSQ mit 10 – 100 Kopien ein bis zwei log Stufen weniger, aber ausreichend sensitiv.

Die PCR Assays für CCHFV, Lassa Virus und Filoviren wurden als konventionelle *one-step* RT-PCRs durchgeführt. Da RNA Viren eine hohe Mutationsrate besitzen, sind innerhalb eines Genus bzw. einer Spezies sehr diverse Viren (Quasispezies) zu finden (75). Es lassen sich daher nur wenige, gut konservierte Genomabschnitte finden, die für den Nachweis über Sonden geeignet wären. Eine Möglichkeit, trotzdem alle Viren der jeweiligen Gruppe

nachweisen zu können, wäre, mehrere individuelle PCR Ansätze zu verwenden. Dadurch würde allerdings die Gesamtanzahl an verschiedenen PCR Ansätzen und damit der Bedarf an Proben- und Reagenzienmaterial ansteigen. Eine zweite Möglichkeit ist die Verwendung generischer Primer und Sonden. Um beispielsweise bei den Filoviren die sehr unterschiedlichen Ebola- und Marburgviren in einem Ansatz nachweisen zu können, existiert eine *real-time* PCR mit fünf Primern und drei Sonden (76). Die gewählte CCHFV PCR nutzt drei Sonden im *real-time* Format (77). Für den Lassa Virus Nachweis war zu dem Zeitpunkt des Projektes keine gut funktionierende *real-time* PCR verfügbar, die verwendete konventionelle PCR nutzt jedoch zwei generische Primerpaare (78). Um Reagenzien (Sonden) einzusparen und Wechselwirkungen der verschiedenen Oligonukleotide zu minimieren, wurden konventionelle *one-step* RT-PCRs ohne Sonden durchgeführt und die PCR Produkte der genannten RNA Viren über die PSQ detektiert und analysiert. Eine erfolgreiche Amplifikation kann dabei vor der PSQ mit Hilfe der Gelelektrophorese über die Detektion entsprechend großer Amplikons nachgewiesen werden. Um jedoch das gesamte Verfahren zu beschleunigen, wurde dieser Schritt nach erfolgreicher Etablierung der PSQ Assays eingespart und die PCR Produkte wurden direkt in die PSQ gegeben. Eine Auswertung einer konkreten Sequenz aus der PSQ ist zudem genauer und eindeutiger als die optische Beurteilung der Bandengröße im Agarosegel.

Neues Screening Verfahren. Um ein schnelles Screening einer verdächtigen Probe auf die verschiedenen Pathogene zu ermöglichen, wurden die einzelnen Kombinationen aus PCR und PSQ Assays auf einer Platte parallel durchgeführt. Da gleichzeitig sowohl Erreger detektiert werden sollen, die ein DNA Genom besitzen, als auch RNA Viren, wurde ein Temperaturprofil für die PCR gewählt, welches für beide Nukleinsäurearten geeignet ist. Die RT-PCR wurde zudem als *one-step* Verfahren durchgeführt. Dazu wurde für RNA Viren ein anderes *one-step* RT-PCR Kit (Invitrogen) verwendet als es ursprünglich in der Literatur vorgesehen war (Qiagen) (76-78). Dadurch wurde die RT-Phase von 45 auf 17 Minuten verkürzt. Nach der RT-Phase liegt RNA als cDNA vor, während die DNA in den parallelen Ansätzen für DNA Erreger unverändert vorliegt, sodass anschließend die eigentliche PCR Reaktion parallel in allen Proben erfolgen kann. Die Gesamtzeit der PSQ-PCR konnte damit von ca. 120 auf 90 Minuten verkürzt werden.

Optimierung der Reaktionsbedingungen. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturoptima für die Hybridisierung der Primer der einzelnen PCR Reaktionen war es

nicht möglich, ein einheitliches Temperaturprofil für die Amplifikation zu verwenden. Eine einheitliche Temperatur während der Primerhybridisierung führte zu einem massiven Sensitivitätsverlust einiger Assays (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ein PCR Gerät verwendet, welches parallel unterschiedliche Temperaturzonen ausbilden kann. Mit dem ausgewählten Gerät von Applied Biosystems war zusätzlich die *real-time* Detektion der PCR Reaktionen möglich, sodass alle PCR Reaktionen, mit und ohne Sonden, parallel stattfinden konnten.

Um die Effektivität einzelner PCR Reaktionen zu verbessern, wurde zudem ein Elongationsschritt eingefügt, sodass letztendlich das Temperaturprofil in Tabelle 17 etabliert wurde. Die parallele Amplifikation von RNA und DNA auf einer PCR Platte ermöglicht es zudem, Material und Zeit einzusparen. Jedoch zeigte sich, dass die Nachweisgrenzen einiger PSQ Assays (Lassa und Filoviren) bei Verwendung des *real-time* PCR Gerätes für die PSQ-PCR mit 10^4 Kopien pro Reaktion sehr hoch waren. Wie bereits erwähnt, wurden für die Amplifikation von Lassa Virus bzw. Filoviren generische Primer verwendet. Es lässt sich daher vermuten, dass die PCR Amplifikation ineffektiv war. Jedoch konnte die Nachweisgrenze durch den Einsatz einer höheren Primerkonzentration nicht verbessert werden. Bemerkenswerterweise wurde unter Verwendung eines konventionellen PCR Zyklers mehr PCR Produkt erzeugt als mit dem *real-time* PCR Gerät, sodass die verminderte Sensitivität der Kombination aus PCR und PSQ bei manchen RNA Viren auf die Wahl des PCR Zyklers zurückzuführen ist. Vermutlich sind die Heiz- und Kühlraten beider Geräte unterschiedlich, wodurch trotz des gleichen Temperaturprofils unterschiedliche Bedingungen in beiden Geräten herrschen. Möglicherweise könnte eine Verlängerung der *Annealing*- und Elongationsphase am *real-time* PCR Gerät den Effekt ausgleichen. Alternativ kann die PSQ-PCR für diese RNA Viren auf einer separaten PCR Platte in einem konventionellen Zykler stattfinden. Jedoch führen beide Maßnahmen, Verlängerung des Temperaturprofils oder Verwendung einer zweiten PCR Platte, wieder zu einer verlängerten Prozesszeit beziehungsweise einem höheren Materialverbrauch. Möglicherweise können alternative PCR und PSQ Assays die Nachweisgrenzen für die RNA Viren verbessern.

Da RNA und DNA parallel amplifiziert und detektiert werden, wurden zwei geeignete Interne Kontrollen für die PSQ-PCR und die PSQ (siehe 5.5) etabliert. Während pKoMa auch sequenziert wird, war das für FCV nicht möglich. Da die erfolgreiche RNA Extraktion jedoch durch entsprechende Amplifikationskurven des FCV in der *real-time* PCR angezeigt wird, ist eine anschließende Sequenzierung nicht zwingend notwendig und kann daher vernachlässigt werden.

Auswertung der PSQ. Die Auswertung der Pyrogramme, sowie der gelesenen Sequenzen sollte manuell erfolgen, da die Software des Gerätes nicht jedes Pyrogramm richtig bewertet. Ein direkter Abgleich der gelesenen Sequenz mit der ncbi Datenbank ist möglich, kann jedoch zu falsch positiven Ergebnissen führen. In einigen PSQ Assays wurde trotz vorheriger Optimierung fälschlicherweise der biotinylierte Primer als Matrize für die Sequenzierung verwendet, vor allem, wenn kein PCR Produkt vorhanden war. Dieser Primer ist ebenfalls mit Biotin markiert und bleibt daher bei der Aufreinigung des DNA Einzelstranges ebenso an der Streptavidin- Sepharose hängen. Um diese falsch positiven Ergebnisse zu minimieren, sollte die gelesene Sequenz mit der erwarteten und der Primersequenz abgeglichen werden. Zusätzlich könnte eine Optimierung der Konzentration des biotinylierten Primers während der PCR oder die Verwendung eines alternativen PCR Assays die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse verringern.

Fazit. Insgesamt stellt die PSQ eine geeignete Alternative in der Detektion biologischer Agenzien dar, die vor allem durch ihre Schnelligkeit als eine Screening Methode eingesetzt werden kann. In Kombination mit der *real-time* PCR können positive Ergebnisse direkt bestätigt werden und anhand der generierten Sequenz kann eine erste Typisierung des detektierten Pathogens erfolgen. Die Gesamtprozesszeit vom Ansetzen der PCR Reaktion bis zur Analyse der Sequenz konnte durch die beschriebene Optimierung der einzelnen Schritte auf wenige Stunden reduziert werden. Durch Vorbereitung der PCR Ansätze und Vorlegen der Ansätze und Reagenzien für PCR und PSQ kann die Gesamtzeit weiter reduziert werden. Denkbar wäre das Vorbereiten und Einfrieren der PCR Platte mit den vorgelegten Reagenzien, die dann bei Bedarf aufgetaut und mit den Proben befüllt werden kann. Durch die Verwendung von lyophillisierten Reagenzien könnte die Zeit des Ansetzens der Reaktionen und damit die Gesamtprozesszeit weiter verkürzt werden.
Die PSQ kann somit das Spektrum der molekularbiologischen Methoden zur Detektion von biologischen Agenzien erweitern. Da jedoch ein entsprechend ausgestattetes Labor und das zugehörige PSQ Gerät benötigt werden, stellt die PSQ keine Vor-Ort anwendbare Methode für den Feldeinsatz dar.

5.3 *Die multiplex* real-time *PCR zur Detektion biologischer Agenzien*

Die *real-time* PCR stellt eine Standardmethode in der molekularbiologischen Diagnostik von hochpathogenen Erregern dar. Um mehr als eine Zielsequenz in einem Ansatz detektieren zu können, werden verschiedene individuelle PCR Assays zu einer multiplex Reaktion zusammengeführt. Die Differenzierung der detektierten Nukleinsäuren erfolgt dabei entweder über unterschiedliche Amplikongrößen in der konventionellen PCR oder über die Verwendung verschiedener Fluorophore als Reporterfarbstoff der Sonde. Durch das multiplex Format werden Reagenzien und Verbrauchsmaterialen eingespart und der Arbeitsaufwand, sowie die Arbeitszeit verringert. Ein sehr wichtiger, weiterer Vorteil ist das Einsparen von wertvollem Probenmaterial. Daher sind in den letzten Jahren sehr viele molekularbiologische Methoden für die Detektion von bioterroristisch relevanten Erregern entwickelt worden, die hauptsächlich auf der *real-time* PCR und Microarray Techniken basieren und auch im multiplex Format funktionieren. Diese können herkömmliche, zeitaufwendige Methoden wie Virus- Anzucht in Zellkultur und Serologie ergänzen oder gar ersetzen (79).

Varma-Basil *et al.* entwickelten 2004 einen multiplex PCR Assay zur Detektion von *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* (CDC Kategorie A) und *Burkholderia mallei* (CDC Kategorie B) unter Verwendung von *Molecular Beacons,* einem speziellen Sondenformat (80). Skottman *et al.* nutzen MGB Sonden zur Detektion von *B. anthracis*, *Y. pestis* und *F. tularensis* (81). Allerdings handelt es sich dabei um Einzelassays, die zwar eine parallele Amplifikation der Zielsequenzen, jedoch in unterschiedlichen PCR Ansätzen ermöglicht. Janse *et al.* detektieren die drei Bakterien der CDC Kategorie A mit drei parallel angewendeten triplex PCR Assays, sodass von jedem Zielorganismus jeweils drei unterschiedliche Sequenzen amplifiziert werden (82). Zusätzlich führten sie eine Interne Kontrolle ein, die aus DNA aus den Sporen von *B. thuringiensis* und einem entsprechenden spezifischen PCR Assay besteht. Eine Kombination aus drei spezifischen PCRs für die drei hochpathogenen Bakterien und einer spezifischen PCR zur Detektion von Variola Viren (bzw. OPV) führten Elsholz *et al.* 2009 ein (56). Dabei kombinieren die Autoren vier *real-time* PCR Assays mit elektronischen Mikroarrays. Die Identifizierung der PCR Produkte erfolgt jedoch über die anschließende spezifische Hybridisierung an Detektionssonden auf dem Microarray Chip, wofür die PCR Reaktionsgefäße nach der PCR geöffnet werden müssen.

Um die drei Bakterien der CDC Kategorie A und das Variola Virus (beziehungsweise OPV) in einem Screening Verfahren gleichzeitig, schnell und sicher detektieren zu können, fehlte bisher die passende Methode. In dieser Arbeit wurde daher eine multiplex *real-time* PCR zur

Detektion der vier hochpathogenen DNA Erreger der CDC Kategorie A etabliert. Es handelt sich dabei um eine echte multiplex *real-time* PCR, bei der jede Zielsequenz mit einem spezifischen Primerpaar amplifiziert und mit einer unterschiedlich markierten Sonde detektiert wird. Ein positives Ergebnis kann direkt abgelesen werden, ohne dass das Reaktionsgefäß anschließend geöffnet werden muss. Dadurch werden mögliche Übertragungs- Kontaminationen zwischen unterschiedlichen Proben, wie sie beispielsweise bei einer Microarray Analyse vorkommen können, verhindert. Zusätzlich enthielt der multiplex PCR Ansatz eine weitere spezifische PCR für die Detektion der Internen Amplifikationskontrolle. Dadurch können Nukleinsäure- Extraktion und PCR Reaktion überprüft und der Anteil falsch negativer Ergebnisse reduziert werden (siehe 5.5).

Auswahl der Zielsequenzen. Entscheidend für eine zuverlässige und spezifische Detektion der ausgewählten Pathogene ist die Wahl geeigneter Zielgene bzw. Sequenzen, die mit der PCR amplifiziert und detektiert werden sollen. Bei *B. anthracis* wird die Virulenz durch das Vorhandensein der beiden Virulenzplasmide pXO1 und pXO2 bestimmt. Fehlt eines der oder beide Plasmide, gilt das Bakterium als nicht virulent oder signifikant attenuiert (83, 84). Daher basieren viele PCR Nachweise auf der Detektion von Genen beider Plasmide (81, 82). Da bei einem Verdacht auf einen bioterroristischen Anschlag in erster Linie die Identifikation des Erregers und erst in zweiter Linie die Beurteilung der Virulenz entscheidend ist, kann in einem Screening Verfahren ein Abschnitt der genomischen DNA als Zielsequenz gewählt werden. Während einige Zielgene wie beispielsweise *rpoB*, das von Elsholz *et al*. ausgewählt wurde, auch in nah verwandten *Bacillus* Spezies vorhanden sind, konnten Antwerpen *et al*. sogenannte Signaturgene ausfindig machen, die spezifisch für *B. anthracis* sind (55, 56). Um in der multiplex *real-time* PCR nur eine spezifische Zielsequenz pro Pathogen zu detektieren, wurde für *B. anthracis* eines dieser Signaturgene, nämlich *dhp_61*, ausgewählt. Ist eine verdächtige Probe in der multiplex *real-time* PCR positiv für *B. anthracis,* sollten im Anschluss weitere spezifische PCRs durchgeführt werden, um den Stamm identifizieren zu können und die Virulenz des detektierten Stammes zu beurteilen.
Das gleiche gilt auch für die anderen erregerspezifischen PCR Assays der multiplex Reaktion. Eine Differenzierung und Typisierung und damit der Nachweis, ob es sich um virulente Stämme handelt, erfolgt in weiteren PCR Reaktionen und anschließenden DNA Sequenzierungen. Die etablierte multiplex *real-time* PCR dient folglich als Screening Methode, die einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines der vier Pathogene in einer verdächtigen Probe geben kann.

Die Sensitivität der multiplex *real-time* PCR war mit 9 - 37 Kopien pro Reaktion sehr gut und ist mit den Sensitivitäten anderer *real-time* PCR Assays aus der Literatur vergleichbar. Skottman *et al.* konnten mit ihren Einzelansätzen 20 - 200 Kopien pro Reaktion nachweisen, bei Elsholz *et al. w*aren es 10 - 50 GE pro Reaktion (56, 81).

Vergleich mit anderen Plattformen. Neben diversen PCR Assays, die für die BT Diagnostik entwickelt wurden, existieren auch kommerziell erhältliche, PCR- basierte Detektionsplattformen, die zusätzlich für die Vor-Ort-Diagnostik geeignet sind: das GeneXpert® System von Cepheid und das RAZOR™ EX System von Idaho Technologies (85). Beide Systeme beinhalten eine Nukleinsäure- Extraktion und PCR Detektion. Für den GeneXpert existierte bis 2010 eine Kartusche für den Nachweis von *B. anthracis*, *Y. pestis* und *F. tularensis,* die jedoch nicht mehr hergestellt wird. Eine Kartusche für den Nachweis von *B. anthracis* beinhaltete zwei spezifische Assays für den Nachweis beider Virulenzplasmide und zwei Kontrollassays (86). Das System von Idaho Technologies kann neben *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* und dem Variola Virus, sechs weitere Pathogene gleichzeitig detektieren. Trotz Schnelligkeit der Detektion und einfacher Handhabung, besitzen solche Plattformen den Nachteil, dass es sich um geschlossene Systeme handelt. Der Nutzer muss sich die Geräte samt Reagenzien kaufen und ist auf die dazu erhältlichen Kits angewiesen (79). Im Gegensatz dazu sind selbst entwickelte PCR Assays, wie die beschriebene multiplex BT-PCR, leicht auf verschiedene Plattformen übertragbar und können einfacher angepasst werden, indem beispielweise Reporterfarbstoffe ausgetauscht werden.
Da die multiplex Kapazität der *real-time* PCR durch die verfügbaren Geräte und die damit verbundenen Detektionskanäle limitiert ist, können derzeit nicht mehr als vier bis fünf Pathogene gleichzeitig detektiert werden. Um das Spektrum an detektierbaren Erregern zu erweitern, existieren alternative Methoden, die auf multiplex PCR Reaktionen basieren, jedoch die PCR Produkte über andere Verfahren detektieren. He *et al*. nutzen zwei konventionelle multiplex PCRs für die Amplifikation von fünf DNA Erregern bzw. fünf RNA Erregern und detektieren die PCR Produkte über einen Enzym Hybridisierungsassay (EHA) (79). Während dadurch die multiplex Kapazität der PCR erhöht ist und auch die Handhabung einfach sein soll, entsteht das Risiko der Übertragungs- Kontamination, da PCR Produkte gereinigt und verarbeitet werden, bevor sie detektiert werden. Einen ähnlichen Nachteil hat auch die sogenannte MassTag PCR. Diese Technik nutzt Moleküle einer definierten Masse für die Markierung der Primer und damit der entstehenden PCR Produkte (87). Durch eine, an die multiplex PCR Reaktion anschließende, massenspektrometrische Analyse werden diese

Masse-Markierungen der PCR Produkte detektiert und der jeweiligen Zielsequenz zugeordnet. Da viele verschiedene Markierungsmoleküle unterschiedlicher Massen existieren, ist die Anzahl der Reaktionen der MassTag PCR eher durch die Konkurrenz der Primer in der eigentlichen PCR Reaktion limitiert.

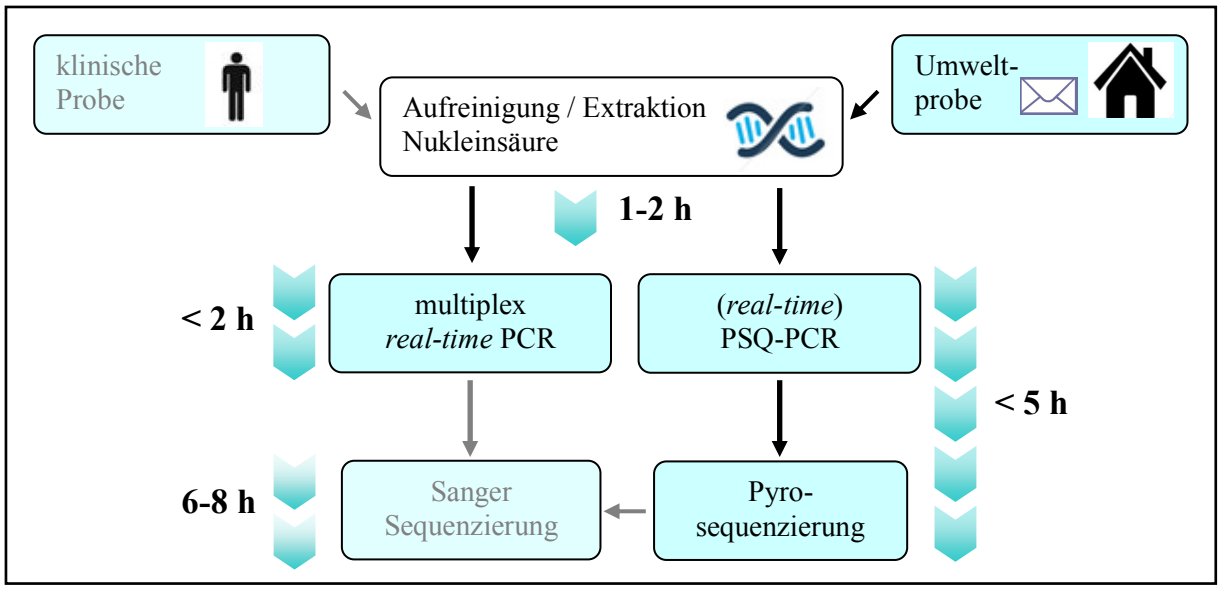


Abbildung 25: Vorgeschlagenes Verfahren zur optimierten Detektion von hochpathogenen Erregern. Nach der Aufreinigung und Extraktion von Nukleinsäuren aus der klinischen Probe oder Umweltprobe wird als Screening Verfahren die multiplex *real-time* PCR verwendet. Parallel können die PSQ-PCR und die anschließende PSQ erfolgen, sodass Identifizierung und Typisierung eines Erregers von der Probe zum Ergebnis innerhalb von 6-7 h möglich ist. Positive multiplex PCR Ergebnisse sollten mit einer Sanger Sequenzierung bestätigt werden. Positive PSQ Ergebnisse können ebenfalls mit einer Sanger Sequenzierung verifiziert werden.

Fazit. Zusammenfassend dient die entwickelte 5-plex *real-time* BT-PCR als Screening Methode zur schnellen, sicheren, sensitiven und spezifischen Detektion von vier biologischen Agenzien und einer Internen Amplifikationskontrolle. Zusätzlich kann die 5-plex *real-time* BT-PCR auch in der Diagnostik klinischer Proben angewendet werden.

Für die Detektion von hochpathogenen Erregern im Allgemeinen und biologischen Agenzien im Speziellen wird die in Abbildung 25 dargestellte Vorgehensweise vorgeschlagen. Als Screening Verfahren erleichtern und beschleunigen multiplex Verfahren und parallel angewendete PSQ Assays die bisherige Detektion biologischer Agenzien.

5.4 *Die* multicolour*, multiplex PCR am Beispiel der Diagnostik humanpathogener Pockenviren*

In der klinischen Diagnostik von Infektionen ermöglicht die *real-time* PCR die Differenzierung minimal unterschiedlicher Virustypen durch Verwendung spezifischer Sonden. Diese Spezifität erschwert jedoch die gleichzeitige Detektion von Viren verschiedener Genera oder Familien. Um genetisch verschiedene Viren in einer Probe nachzuweisen, werden verschiedene individuelle PCR Reaktionen parallel durchgeführt oder können zu einer multiplex PCR wie in 5.3 beschrieben zusammengeführt werden. Wie bereits erwähnt, ist die multiplex Kapazität der *real-time* PCR jedoch begrenzt. Eine weitere Möglichkeit wäre die generische Amplifikation von Virusgruppen und anschließende Differenzierung durch post-PCR Analysen, wie einer Schmelzkurvenanalyse oder DNA Sequenzierung (27, 60). Jedoch ist dazu ein gewisser Grad an Homologie der verschiedenen Viren notwendig.

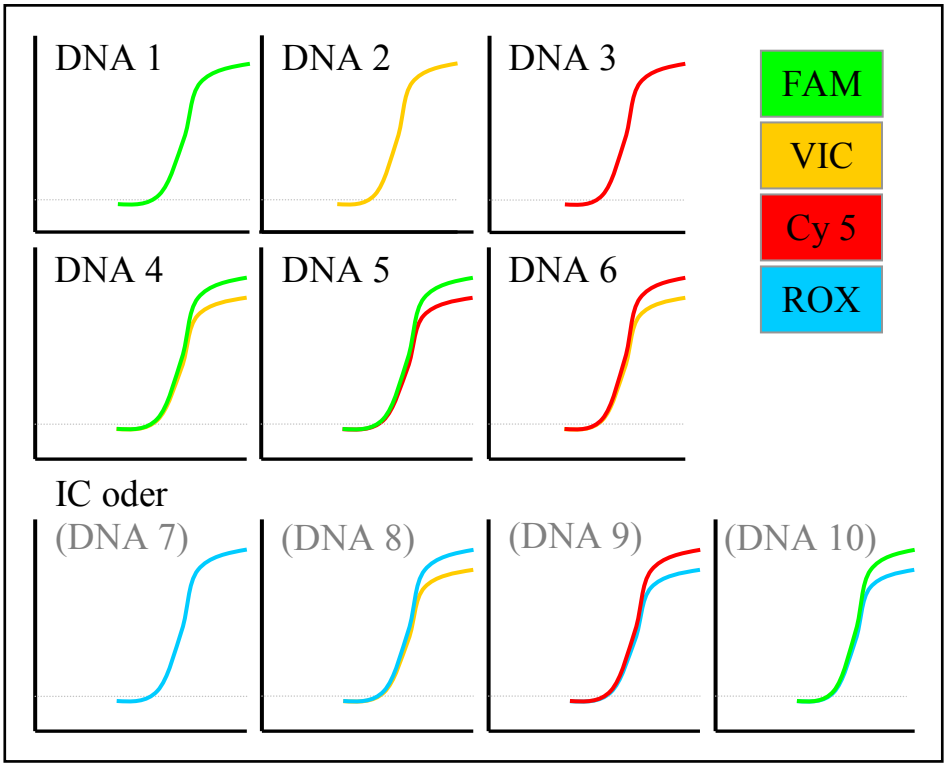


Abbildung 26: *Multicolour* Detektion in der *real-time* PCR. Die DNAs 1-3 (beispielsweise aus Erregern 1-3) werden über einfarbig markierte Sonden detektiert. Für die DNAs 4-6 existieren jeweils zwei Sonden mit jeweils gleicher Sequenz, jedoch unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung. So können mit drei Farbstoffen sechs verschiedene Ziel-DNAs nachgewiesen werden. Durch die Verwendung eines vierten Farbstoffs kann die multiplex Reaktion auf insgesamt zehn Ziel-DNAs erweitert werden. Bei der Verwendung einer Internen Kontrolle (IC) fallen die zusätzlichen Farbstoffkombinationen weg, da die IC in allen Proben gemessen wird und das Fluoreszenzsignal der IC das der Ziel-DNA überdecken würde.

Eine weitere Lösungsmöglichkeit stellt das Prinzip der *multicolour* PCR dar, das von Huang *et al.* entwickelt wurde, um acht Lebensmittel- Pathogene in einer *real-time* PCR Reaktion zu detektieren (88, 89). Dabei werden neben den einfach markierten Sonden, solche Sonden verwendet, die zwei Fluorophore kombinieren (Abbildung 26). Durch diese Kombination von Farbstoffen konnte die multiplex Kapazität der *real-time* PCR auf theoretisch 15 Ziel-Sequenzen erhöht werden. Huang *et al.* beobachteten jedoch einen Verlust an Sensitivität von 3-4 log Stufen gegenüber den Einzelreaktionen (88).

Humanpathogene Pockenviren als Modellorganismen. Die molekularbiologische Diagnostik von humanpathogenen Pockenviren stellt ein geeignetes Modell für dieses neue Verfahren dar, da bisherige Methoden recht aufwendig sind und viel klinisches Probenmaterial benötigen. Zudem ähneln sich Pockenvirusinfektionen in ihrer Symptomatik. Humanpathogene Pockenviren finden sich in verschiedenen Genera der *Poxviridae* Familie (siehe Tabelle 2) und sind dadurch genetisch so verschieden, dass sie durch verschiedene PCR Assays nachgewiesen werden müssen. Des Weiteren sind die Viruslasten in Hautläsionen einer Pockeninfektion üblicherweise hoch, sodass selbst bei einem Verlust an Sensitivität ausreichend virales Genom für einen positiven Nachweis vorhanden sein sollte. Die entwickelte mmPCR für humanpathogene Pockenviren hatte eine untere Nachweisgrenze von < 30 Kopien/ Reaktion und war damit etwas weniger sensitiv als die individuellen PCR Assays mit < 10 Kopien/ Reaktion. Dadurch war eine klinische Probe in der mmPCR negativ, die zuvor in dem Einzelnachweis positiv war (C_T ~ 36). Die DNA dieser Probe stammte zudem aus Vollblut, wobei diskutiert wird, ob während einer Pockeninfektion überhaupt eine Virämie nachweisbar ist. Durch die Messung der *c-myc* DNA Kontrolle konnten negative Ergebnisse bestätigt werden, da zelluläre DNA erfolgreich extrahiert und amplifiziert werden konnte. Die starken Unterschiede der C_T-Werte zwischen der mmPCR und der jeweiligen uniplex PCR in einzelnen Proben können zum Teil mit dem Alter der Proben und möglicher Degradation von Virus-DNA erklärt werden, sodass bei der Messung mit der mmPCR ein höherer C_T-Wert und damit eine geringere DNA-Menge bestimmt werden konnte. Im Gegensatz dazu, war die mmPCR in wenigen OPV Proben deutlich sensitiver als die uniplex OPV PCR. Der OPV PCR Assay der mmPCR amplifiziert einen anderen Genomabschnitt der OPV-DNA als die uniplex OPV PCR, wodurch teilweise unterschiedliche C_T-Werte gemessen werden.

Eine Voraussetzung für den *multicolour* Ansatz ist, dass nur eines der entsprechenden Pathogene in der untersuchten Probe vorhanden ist. Eine Co-Infektion mit OPV und PPV

könnte als MOCV Infektion interpretiert werden. Ebenso könnte bei einer Co-Infektion von MOCV und einem der anderen beiden Pockenviren die OPV- beziehungsweise PPV-Infektion möglicherweise nicht erkannt werden. Es kann jedoch spekuliert werden, dass die Viruslasten bei einer solchen Co-Infektion unterschiedlich wären, was zu unterschiedlichen C_T-Werten führen würde. Des Weiteren wurden im Falle der Pockenviren bisher keine Co-Infektionen beobachtet. Zur Bestätigung eines positiven Ergebnisses mit der mmPCR sollten grundsätzlich weitere spezifische PCRs durchgeführt werden.

Fazit. Die entwickelte HuPox mmPCR ermöglicht die schnelle, simultane Detektion der drei wichtigsten humanpathogenen Vertreter der Pockenviren ohne einen hohen Verlust an Sensitivität. Das Prinzip der *multicolour* Detektion kann generell zur Vereinfachung und Erweiterung von multiplex PCR Reaktionen dienen. Das Verfahren bietet sich vor allem dann an, wenn verschiedene Erreger zeitgleich detektiert werden sollen, die ähnliche Symptome auslösen, jedoch nicht zusammen in einer Probe erwartet werden und auch keine Co-Infektionen verursachen. Zudem hilft die mmPCR wertvolles Probenmaterial einzusparen und kann demnach eingesetzt werden, wenn die Probenmenge gering ist.

5.5 Interne Kontrollen in Nukleinsäure- Nachweisen

Zusätzlich zu geeigneten Positiv- und Negativkontrollen erhöhen Interne Kontrollen (IC) die Verlässlichkeit und Sicherheit von molekularbiologischen Verfahren und weisen auf falsch negative Ergebnisse hin (90). Bei der PCR dienen ICs sowohl dem Nachweis einer erfolgreichen Nukleinsäure- Extraktion als auch der Bestätigung einer erfolgreichen PCR Reaktion. Je nach Art der zu untersuchenden Probe und der Nukleinsäure können verschiedene ICs verwendet werden. Handelt es sich um klinische Proben, in denen sich neben der nachzuweisenden Erreger- Nukleinsäure auch zelluläre, humane DNA befindet, kann ein zelluläres Gen als IC dienen. So wurde in dieser Arbeit ein Abschnitt des zellulären *c-myc* ORFs und ein entsprechender PCR Assay als IC für die erfolgreiche Extraktion von DNA aus klinischen Proben mit Verdacht auf eine Pockenvirusinfektion verwendet.
Plasmidkontrollen stellen eine sichere und stabile Alternative bei der Überprüfung von DNA Nachweisen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mehrfach das synthetische Plasmid pKoMa mit einem entsprechenden PCR- und auch PSQ Assay verwendet. Dabei wurde pKoMa in einer geringen, verlässlich nachweisbaren Konzentration vor der Extraktion der Nukleinsäuren in die Probe gemischt und co- extrahiert. Die Detektion von pKoMa mittels

PCR, und optional mittels PSQ, bestätigte eine erfolgreiche DNA Aufbereitung aus der Probe. Um eine erfolgreiche RNA Extraktion und Amplifikation nachzuweisen, wird eine geeignete RNA Kontrolle benötigt. Da freie RNA sehr instabil ist, können alternativ ganze Viruspartikel als IC verwendet werden. Dabei wurde für diese Arbeit das nicht humanpathogene FCV gewählt, welches leicht in Zellkultur angezogen werden kann und vor der RNA Extraktion in definierter Menge in die Probe gemischt wird (65). Alternativ können andere RNA Viren, wie beispielsweise das Sigma Virus, welches ausschließlich Insekten infiziert, verwendet werden.
Ist der erregerspezifische Nachweis negativ, muss die jeweilige IC positiv sein, sonst muss die Extraktion wiederholt werden. Ist der erregerspezifische Nachweis positiv, waren Extraktion und Nachweistest erfolgreich und die IC kann vernachlässigt werden. Häufig wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, dass die IC bei hohen Konzentrationen an erregerspezifischer Nukleinsäure negativ war. Dieses Phänomen kann zum einen durch die konkurrierenden erreger- und IC- spezifischen Reaktionen begründet werden. Zum anderen wird die IC in niedrigen Konzentrationen eingesetzt, um die erregerspezifische PCR nicht zu beeinflussen. Folglich dient die IC vor allem der Absicherung negativer erregerspezifischer PCR Ergebnisse.

5.6 Die multiplex Pyrosequenzierung zur Identifizierung und Typisierung von Orthopockenviren

Da die PSQ durch Synthese eines DNA Stranges funktioniert („sequencing-by-synthesis“), sind die generierten Sequenzen eher kurz (37). Dadurch ist es schwierig, mit einer konventionellen PSQ mehr als zwei nah verwandte Organismen zu differenzieren, die sich in einigen wenigen, nicht konservierten SNPs unterscheiden. Ein solches Problem kann durch eine multiplex PSQ gelöst werden (91). Dabei werden durch Verwendung mehrerer PSQ Primer gleichzeitig mehrere Sequenzen erzeugt, die zusammen ein spezifisches Sequenzmuster ergeben. Über dieses Muster wird der jeweilige Erreger identifiziert. Pourmand *et al*. nutzten dieses Verfahren zur Genotypisierung von Hepatitis C (92), Gharizadeh *et al*. konnten über Sequenzmuster Co- Infektionen mit verschiedenen Humanen Papillomaviren identifizieren (93).
Wie bereits in 5.4 beschrieben, basiert die derzeitige Diagnostik von Pockenviren auf verschiedenen *real-time* PCR Assays und der anschließenden Sanger Sequenzierung. Dabei identifiziert die PCR Pockenviren nur auf der Ebene des jeweiligen Genus, also beispielsweise alle OPV. Durch Sequenzierung des Hämagglutinin (HA) ORFs nach der

Sanger Methode (816 - 957 Basen lang) wird die Spezies des detektierten OPV bestimmt, was mehrere Stunden dauert. Die etablierte mPSQ hingegen, ermöglicht eine schnellere Klassifizierung von OPV in weniger als einer Stunde von der Aufbereitung des PCR Produktes bis zur Identifizierung der Spezies.
Das etablierte Verfahren konnte erfolgreich an klinischen Proben getestet werden. Jedoch wurde mit der mPSQ eine klinische Probe nicht korrekt identifiziert. Das Design der mPSQ erfolgte auf der Basis aller bis dahin bekannten und annotierten OPV Genome, die in der Genbank zu finden waren oder durch Gesamt- Genomsequenzierungen im eigenen Labor erstellt wurden. Die Sanger Sequenzierung des HA ORFs identifizierte Probe Nummer 31 als CPXV. In der Region, die als Grundlage für die mPSQ dient (*coding sequence* O2L), hat dieser Stamm jedoch Homologie zu VACV. Bei einem solchen uneindeutigen Fall kann die mPSQ mit einem zweiten Amplikon und weiteren PSQ Primern neue Informationen liefern.
Die Klassifizierung der OPV mit der mPSQ basiert auf der Ähnlichkeit der generierten Sequenzmuster mit den theoretisch erzeugten Sequenzmustern der einzelnen Virusgruppen. Treten neue Virusvarianten auf, wodurch das erhaltene Sequenzmuster von den theoretisch zu erwartenden Mustern abweicht, wird diese neue Sequenz als unbekannt definiert. Da die individuelle Sequenz wie in Abbildung 3 ersichtlich, nicht rekonstruiert werden kann, ist nicht nachvollziehbar, ob der Unterschied im Sequenzmuster auf einem SNP oder größeren Unterschieden beruht. Um zu untersuchen, ob es sich um eine neue, bisher unbekannte OPV Variante handelt und wie die Sequenz von den erwarteten Sequenzen abweicht, können die PSQ Assays, die der mPSQ zugrunde liegen, einzeln durchgeführt werden. Aus den neu gewonnenen Erkenntnissen kann dann gegebenenfalls ein neuer mPSQ Assay entwickelt werden, der neue Varianten mit einschließt.
Es bleibt anzumerken, dass die mPSQ nicht für die Identifizierung von Co- Infektionen mit mehreren OPV Spezies geeignet ist. Jedoch sind solche Co- Infektionen mit mehreren OPV Stämmen bisher nicht beobachtet worden, sodass davon auszugehen ist, dass sie sehr unwahrscheinlich sind.

Fazit. Die etablierte mPSQ kann für die schnelle und einfache Identifizierung und Klassifizierung von humanpathogenen OPV verwendet werden. Das Verfahren kann auf weitere Fragestellungen angewendet werden, bei denen Proben auf Basis der Nukleinsäuresequenz differenziert werden sollen. Durch Verwendung mehrerer Amplikons mit jeglicher Anzahl an PSQ Primern können auch schwierige Probleme gelöst werden, wo wenig unterschiedliche SNPs vorhanden und weit voneinander entfernt sind.

Zusammen mit der in 5.4 entwickelten mmPCR kann somit die Diagnostik von humanpathogenen Pockenviren beschleunigt und vereinfacht werden (Abbildung 27). Bisherige Verfahren können erweitert, wenn nicht sogar ersetzt werden. Neben der Zeitersparnis können durch multiplex Verfahren zudem wertvolles Probenmaterial, sowie Reagenzien eingespart werden.

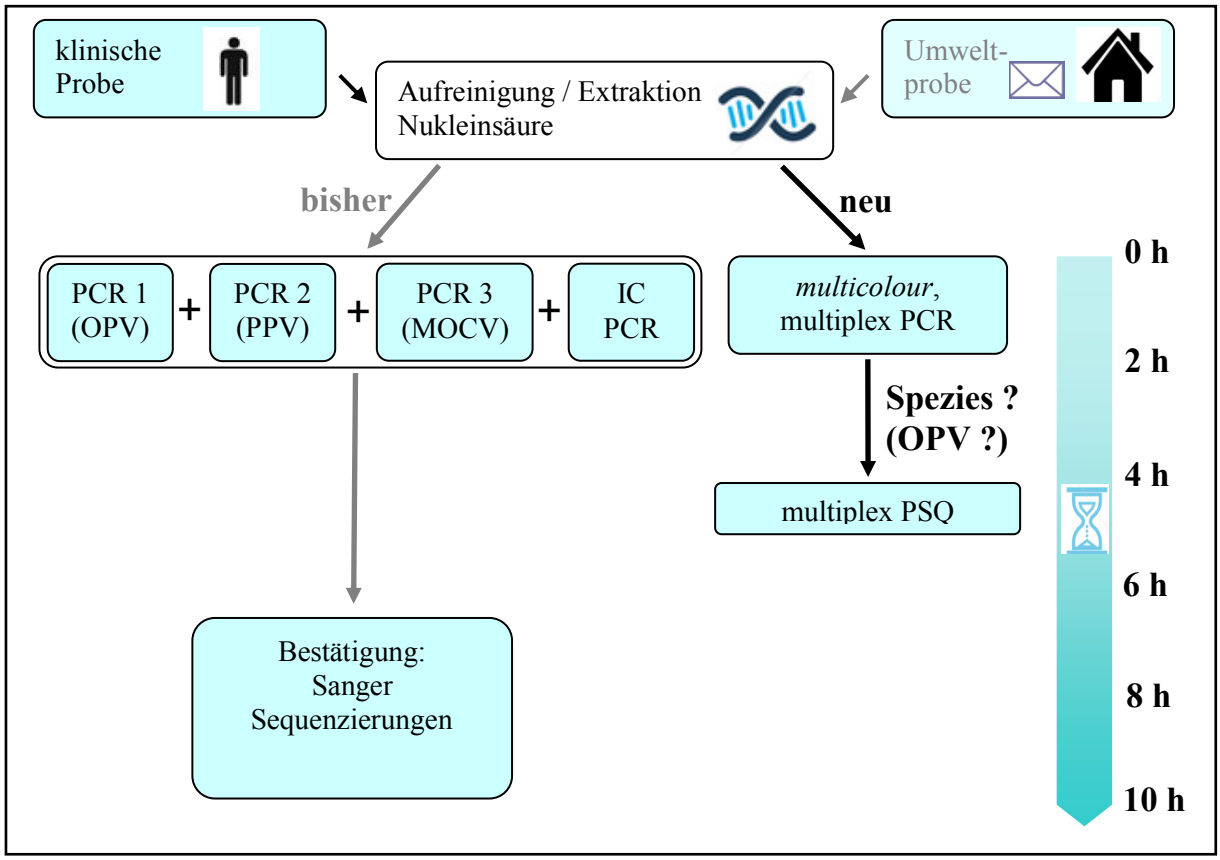


Abbildung 27: Optimierte Diagnostik durch multiplex Verfahren am Beispiel der Pockenvirus Diagnostik. Die *multicolour*, multiplex PCR ersetzt die uniplex PCRs, zum Beispiel drei Pockenvirus-spezifische uniplex PCRs und eine IC-spezifische PCR. Neben der Zeitersparnis werden wertvolles Probenmaterial und Reagenzien eingespart. Zur anschließenden Typisierung kann die mPSQ verwendet werden. Im Fall der Pockenviren können OPV innerhalb kürzester Zeit (< 5h) differenziert werden. Im Gegensatz dazu benötigten bisherige Routine-Diagnostik- Verfahren mit Einzel-PCRs und Sanger Sequenzierungen bis zu zehn Stunden.

5.7 Erregersuche in humanem Gewebe von SIDS Proben

5.7.1 Spezifische und generische Erregersuche

Die *real-time* PCR eignet sich aufgrund ihrer Spezifität für die Suche nach erwarteten und bekannten Infektionserregern in klinischen Proben. Sie wurde daher verwendet, um in den SIDS Proben nach Erregern zu suchen, die in Zusammenhang mit SIDS diskutiert werden. Jedoch wurden keine der vermuteten Pathogene in den SIDS Proben mit der *real-time* PCR detektiert (47, 49-52).

Während die *real-time* PCR auf die Detektion erwarteter Pathogene beschränkt ist, können mit Hilfe des NGS auch bekannte, aber unerwartete, sowie neue Infektionserreger identifiziert werden (45, 94), da alle in einer Probe vorhandenen Nukleinsäuren detektiert werden. Die NGS Technologie wurde daher in den letzten Jahren zur Identifikation möglicher infektiöser, viraler Ursachen unterschiedlicher Krankheitsbilder verwendet (17, 45, 46, 95, 96). Diese Studien nutzten den Ansatz der Metagenom-Sequenzierung und sequenzierten die Gesamtnukleinsäuren der jeweiligen Proben, ohne vorherige Trennung von Wirts-Nukleinsäuren von denen infektiöser oder kommensaler Mikroorganismen (95). So nutzten Cox-Foster *et al*. die NGS Technologie, um Honigbienen Kolonien mit der Erkrankung „colony collapse disorder" und gesunde Kolonien bezüglich des Metagenoms zu vergleichen (96). Durch die 454-Sequenzierung von humanen Gewebeproben aus Transplantatempfängern konnten Palacios *et al*. 2008 ein neues Arenavirus als Ursache für den Tod der Patienten ausmachen, die alle nach der Transplantation von Organen desselben Spenders verstorben waren (46). Towner *et al*. identifizierten durch NGS einen neuen Ebola Stamm in Patientenproben aus Uganda (17). Durch die 454-Sequenzierung von Liquorproben aus Patienten mit Enzephalitis ungeklärter Ursache konnten Benjamin *et al*. im Liquor von zwei Kindern das Parvovirus 4 nachweisen (45). Dieses Virus galt zuvor als nicht humanpathogen und wird nun als mögliche, infektiöse Ursache der Enzephalitis diskutiert.

Abreicherung des Wirtsgenoms. Ein allgemeines Problem der Metagenom-Sequenzierung stellt das Ungleichgewicht zwischen den Nukleinsäuren des Wirtes und den Mikroorganismen dar. In den genannten Studien wurde die Gesamtnukleinsäure aus Patientenmaterial isoliert, gegebenenfalls unspezifisch amplifiziert, und direkt für die Erstellung einer NGS Bibliothek verwendet. Es erfolgte keine Abreicherung der Wirts- Nukleinsäuren. Mit dieser Vorgehensweise gelang es Palacios *et al*. in über 100.000 *Reads,* 14 Arenavirus-spezifische *Reads* zu identifizieren (46). Bishop-Lilly *et al*. fanden in Moskitoproben, neben 92% wirtsspezifischen rRNA *Reads,* spezifische *Reads* für das Dengue Virus 1 wieder, welches sie zuvor in die Moskitoproben gemischt hatten (95). Die Autoren konnten jedoch auch zeigen, dass durch eine Abreicherung eukaryotischer rRNA über das, auch in dieser Arbeit verwendete, RiboMinus Kit (Invitrogen), der Anteil an wirtsspezifischen *Reads* verringert und die Tiefe der Abdeckung („coverage") des Dengue Virus Genoms erhöht werden konnte.
Da rRNA etwa 90% der zellulären und damit einen hohen Anteil an der Gesamt- RNA ausmacht (97), sollte durch ihre Abreicherung in den SIDS Proben die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, erregerspezifische *Reads* zu erhalten. Derzeit existieren wenige kommerziell

erhältliche Kits, die eine effektive Abreicherung von Wirts- Nukleinsäuren ermöglichen. Neben dem verwendeten Kit von Invitrogen existiert das ähnlich funktionierende Ribo-Zero™ Kit von Epicentre/Biozym. Eine Alternative zu diesen Kits könnte das SureSelect System der Firma Agilent darstellen (98), welches der gezielten Anreicherung humaner Exonsequenzen in einer NGS- Bibliothek dient. Über spezifische RNA Oligonukleotide werden humane Sequenzen angereichert, wobei die restliche, nicht angereicherte Fraktion erregerspezifische Sequenzen enthalten müsste und in der anschließenden Sequenzierung eingesetzt werden könnte.
Alternativ zu den kommerziellen Kits könnten selbst hergestellte, humanspezifische Oligonukleotide als Fängermoleküle eingesetzt werden, die humane DNA und/oder RNA aus einer Probe fangen. Durch Markierung der Fänger- Oligonukleotide mit Biotin und die Bindung an magnetische, Streptavidin- gekoppelte Kügelchen würden die humanen Nukleinsäuren aus einer Lösung entfernt. Erste Versuche mit selbst hergestellten Fängermolekülen waren jedoch nicht sehr effektiv und müssten optimiert werden (Daten nicht gezeigt).

Anreicherung von RNA für die 454-Sequenzierung. Die RNA Gemische der SIDS Proben, aus denen die humane rRNA entfernt wurde, mussten anschließend aufkonzentriert und angereichert werden, um die erforderliche Ausgangsmenge für die Erstellung einer 454-Bibliothek zu erhalten. Es wurde daher eine quasi-zufällige RT-PCR mit dem Whole Transcriptome Amplification Kit (Sigma-Aldrich) vorgenommen, das laut Herstellerangaben unspezifisch und ungerichtet („unbiased“) alle RNAs einer Probe gleichwertig amplifiziert. Nakamura *et al*. fanden jedoch einen systematischen Fehler („bias“) dieses Kits, wodurch TG (CA)- reiche Regionen bevorzugt amplifiziert wurden (99). Da dieser Effekt sowohl in humanen, als auch viralen Sequenzen beobachtet werden konnte, schließen die Autoren daraus, dass trotz des systematischen Fehlers zumindest keine quantitativen Unterschiede der detektierten Sequenzen in Bezug auf die Originalpopulation entstehen.

Fazit. Zusammenfassend ist in dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt worden, mit dem RNA aus humanen Gewebeproben für die Sequenzierung mit der 454-Technologie schnell und einfach vorbereitet werden kann. Die Methode ist auch auf andere NGS Technologien übertragbar.

5.7.2 Analyse der erzeugten Sequenzdaten

Bei der Sequenzierung mit der 454-Technologie und der FLX Titanium Chemie werden auf einer PTP ungefähr eine Millionen *Reads* erzeugt. Für die Suche nach einer infektiösen Ursache von SIDS wurde je Fall eine halbe PTP verwendet, sodass je Probe über 500.000 *Reads* gelesen wurden. Um die erzeugten *Reads* ihrer Herkunft zuzuordnen, könnten theoretisch alle erzeugten Sequenzen mit der gesamten ncbi Datenbank abgeglichen werden. Bei der derzeitigen Rechenkapazität der verfügbaren Ressourcen dauert der Abgleich eines *Reads* mit der gesamten Datenbank ungefähr 20 Sekunden, sodass für 500.000 *Reads* circa vier Monate Rechenzeit benötigt würden. Des Weiteren bestehen die *Reads* trotz Vorbehandlung der Proben zu einem hohen Anteil aus humanen Sequenzen, die für die Fragestellung uninteressant sind. Für die Erregersuche sollen die interessanten *Reads*, die zu möglichen Pathogenen gehören, identifiziert und die humanen *Reads* aussortiert werden. Unglücklicherweise existiert keine frei zugängliche „Erreger- Datenbank“, die alle bekannten Sequenzen von Pathogenen enthält, mit der alle positiven *Reads* herausgefiltert werden könnten. Daher wurden zunächst alle *Reads*, die humane Sequenzen treffen, herausgesucht und aussortiert. Da keine Datenbank sämtliche verfügbare, humane Sequenzen vereint oder auf einfache Weise zugänglich macht, wurde bei der Filterung wie folgt vorgegangen:

(i) die *Reads* aus der Sequenzierung wurden gegen ein bekanntes, humanes Genom abgeglichen und sämtliche, dort passende *Reads* aussortiert.
(ii) Die verbleibenden *Reads* wurden gegen die humane (unvollständige) Datenbank der ncbi abgeglichen.
(iii) Aus der gesamten ncbi nr/nt Datenbank wurden Sequenzen mit der Bezeichnung „homo sapiens“ extrahiert und die *Reads* mit diesen Einträgen abgeglichen, passende *Reads* wurden aussortiert.

Trotz dieses dreistufigen Verfahrens werden nicht alle Genbankeinträge gefunden, die eine humane Sequenz enthalten, da einige mit „human DNA sequence“ oder anderen Namen bezeichnet sind. Das Filtern nach „human“ hingegen würde erregerspezifische Sequenzen mit herausziehen, die diese Bezeichnung ebenfalls enthalten (zum Beispiel „human herpes virus“). Zusätzlich ändert sich die Genbank ständig, wenn neue Sequenzen hinzugefügt werden. Die genannten Gründe führen dazu, dass in den *Reads*, die nach dem Aussortieren von humanen Sequenzen übrig bleiben, trotzdem weitere *Reads* enthalten sind, die bei genauer Analyse einer humanen Sequenz entsprechen.

Nach der Filterung humaner Treffer blieben je nach Probe über 50.000 bzw. 60.000 *Reads* übrig. Diese wurden anschließend mit der gesamten Genbank abgeglichen. Fast alle *Reads* treffen dabei jeweils verschiedene Datenbankeinträge von Organismen unterschiedlicher taxonomischer Einordnung, sind also nicht für einen Organismus spezifisch. Würden alle diese uneindeutigen Treffer herausgefiltert werden, bliebe bei den SIDS Proben 1 und 2 jeweils nur ein *Read* übrig (Tabelle 28). Bei genauer Analyse handelt es sich in Probe 1 um einen *Read*, von dem 27 Basen (39%) zu 100% mit einer Sequenz der Hefe *Yarrowia lipolytica* (CR382129) übereinstimmen. Jedoch handelt es sich bei dieser Sequenz um eine Aneinanderreihung von Guanin- und Thyminbasen, so dass vermutet werden kann, dass es sich bei diesem *Read* um ein Artefakt handelt. Der *Read* der Probe 2 stimmt zu 94% mit dem Topoisomerase Gen des Bakteriums *Streptococcus salivarius* (AF353638) überein.

Anpassen der Filterungsstrategie. Da nach der sehr stringenten Filterung aller uneindeutiger Treffer nur noch wenige *Reads* übrig bleiben, muss die Filterungsstrategie nach folgenden Kriterien angepasst werden:

(i) Trefferlänge (Anzahl der übereinstimmenden Basen)
(ii) Treffergenauigkeit (Prozentsatz der Identität zu gefundenen Genbankeinträgen)

Je höher die Identität zu einer Sequenz der Genbank ist und je mehr Basen übereinstimmen, desto wahrscheinlicher ist es, dass der *Read* von dem jeweiligen Organismus stammt. Nach der Filterung von *Reads*, von denen mindestens 200 Basen zu mindestens 90% mit dem jeweiligen Genbankeintrag übereinstimmen, bleiben mehrere Hundert Treffer übrig. Bei genauerer Analyse handelt es sich dabei um einige wenige *Reads*, die mit unterschiedlichen Sequenzen der Genbank übereinstimmen und dadurch jeweils mehrere Treffer erzeugen. Wird die geforderte Trefferlänge erhöht, sinkt die Anzahl an Treffern. Dagegen ergeben *Reads*, deren Sequenz mit weniger als 200 Basen mit den Datenbankeinträgen übereinstimmt, weitere uneindeutige Treffer. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese *Reads* mit Sequenzen mehrerer unterschiedlicher Organismen übereinstimmen, steigt an, sodass eine Identifizierung von Pathogenen schwieriger wird. Ebenso verhält es sich mit der Identität, also der Übereinstimmung der *Reads* mit den gefundenen Sequenzen. Bei Herabsetzen der Identität auf unter 90% erhöht sich die Anzahl der Treffer und der zugehörigen *Reads*, allerdings sinkt auch die Glaubwürdigkeit der erhaltenen Treffer.

Fazit. Generell bleibt bei der Erregersuche in humanem Gewebe das Problem bestehen, dass das Probenmaterial sehr viel mehr humane als erregerspezifische Sequenzen enthält. Hinzu kommt der Fakt, dass Erregergenome sehr viel kleiner sind, als das humane Genom mit über drei Milliarden Basen. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass bei der Präparation der Nukleinsäure und der Erstellung einer Bibliothek sehr viel mehr humane, als andere Sequenzen vorliegen. Viele erregerspezifische Sequenzen gehen vermutlich bei der Präparation verloren und sind schlichtweg unterrepräsentiert, sowohl in der DNA Bibliothek, als auch in den generierten *Reads*. Daher ist neben einer Anpassung der bioinformatischen Auswertung von Sequenzdaten, vor allem die bessere Abreicherung der humanen Hintergrund- DNA, sowie eine Anreicherung erregerspezifischer Sequenzen erforderlich. Da der offene Blick der Methode erhalten bleiben soll und die gesuchten Pathogene sehr unterschiedlich in ihren Eigenschaften und ihren Genomen und zudem unbekannt sind, ist eine gezielte Anreicherung von Erregergenomen schwierig. Vielmehr wird eine effektive Methode benötigt, mit der humane DNA und RNA spezifisch abgereichert werden kann, ohne dabei erregerspezifische Nukleinsäuren zu beeinträchtigen.

5.7.3 Pathogenspezifische *Reads* in den SIDS Proben

Durch die Wahl der Filterungskriterien (mindestens 200 Basen Trefferlänge und mindestens 90% Identität zu den gefundenen Genbankeinträgen) bleiben bei den SIDS Proben einige wenige *Reads* übrig (Tabelle 28).

Treffer von SIDS Probe 1. Im Fall der SIDS Probe 1 finden sich viele Treffer in der Gruppe der Pilze, die auf einen *Read* (Nr. 1.2) zurückzuführen sind. Von der Sequenz dieses *Reads* stimmen 228 Basen (77%) mit bis zu 99% mit verschiedenen *Candida* und *Pichia* Spezies und weiteren Hefearten überein. Bei Lockerung der Filterungskriterien auf 80% Identität kommen weitere Treffer hinzu, die jedoch alle in den gleichen Gruppen und Untergruppen der Pilze liegen, also keine weiteren Erreger identifizieren. Im Gegensatz dazu, lassen sich in der SIDS Probe 2 mit den oben genannten Kriterien Treffer in verschiedenen Abzweigungen der Taxonomie- Datenbank der ncbi finden, darunter Treffer in der Gruppe der Pilze, Bakterien und Viren.

Treffer SIDS Probe 2. In der SIDS Probe 2 finden sich ebenfalls viele Treffer in der Gruppe der Pilze, ein *Read* trifft unter anderem in der Gruppe der Viren und sieben *Reads* treffen in der Gruppe der Bakterien (Tabelle 28). Bei genauerer Betrachtung der *Reads* in der Gruppe

der Pilze handelt es sich überwiegend um humane Sequenzen, die mit „human DNA sequence“ oder ähnlich bezeichnet sind, also nicht durch die Suche nach mit „homo sapiens“ bezeichneten Sequenzen erfasst wurden oder neu in die Datenbank hinzugefügt wurden. Die gefundenen Treffer lassen sich drei Gruppen zuordnen:

(i) Verunreinigungen/ Artefakte: *Read* Nr. 2.3 in der Gruppe der Viren ist identisch mit einem der sieben *Reads* in der Gruppe der Bakterien. Es handelt sich also um einen uneindeutigen Treffer, der bei einem manuellen Abgleich mit der gesamten ncbi Datenbank am besten auf Agrobakterien trifft. Da es sich dabei um Pflanzenpathogene handelt, ist von einer Verunreinigung der Probe oder einem Sequenzierungsartefakt auszugehen.

(ii) Kommensale Mikroorganismen: Zwei *Reads* (Nr. 2.4, 2.5) erkennen bei einem manuellen Sequenzabgleich unkultivierte Bakterien und Bakterien der Gattung *Deinococcus*. Diese gram-positiven Bakterien sind sehr robust und gelten als chemoorganotroph. Es wird spekuliert, dass *Deinococci* in reichhaltigen organischen Habitaten, wie beispielsweise auch dem menschlichen Darm leben (100). Es lässt sich daher vermuten, dass es sich ebenfalls um eine Verunreinigung der Probe bzw. einen kommensalen Organismus des menschlichen Körpers handelt.

(iii) Mögliche Pathogene: *Read* Nr. 2.6 stimmt mit der Sequenz der 23S rRNA von verschiedenen Clostridien Spezies überein. Die größte Übereinstimmung hat der *Read* dabei mit *C. botulinum*, dem Produzenten des Nervengiftes Botulinum Toxin. Drei weitere *Reads* deuten auf verschiedene Streptokokken hin. Diese vier *Reads*, die entweder Clostridien oder Streptokokken Sequenzen treffen, sind Hinweise auf in der SIDS Probe 2 vorhandene Erreger.

Clostridien sind grampositive, anaerobe, Sporen bildende Bakterien, von denen einige Spezies humanpathogen sind und über vergiftete Lebensmittel aufgenommen werden können, darunter das Botulismus auslösende *C. botulinum* und der Erreger des Gasbrandes *C. perfringens* (101-104). Streptokokken wiederum kommen natürlicherweise auf und im Menschen vor und können je nach Spezies auch Infektionen auslösen. Spezies wie *S. oralis* und *S. salivarius* gehören zur Mundflora des Menschen, gelten aber als opportunistisch pathogen, wenn sie in den Blutkreislauf gelangen (105-108). *S. pneumoniae* ist der Erreger der Lungenentzündung und eines der klinisch bedeutendsten humanpathogenen Bakterien weltweit (109), *S. pyogenes* löst unter anderem Scharlach und Angina aus (110). *S. agalactiae*

gehört zur normalen Flora von Gastrointestinal- und Genitaltrakt, kann jedoch die sogenannte Neugeboreneninfektion auslösen, die - während oder vor der Geburt übertragen - zum Tod des Neugeborenen führen kann (111, 112). Ob und wie die genannten Pathogene in Verbindung zur Todesursache SIDS stehen, bleibt zu klären.

Tabelle 28: Erregerspezifische *Reads* der SIDS Proben

Filterung	SIDS Fall	Nr.	Länge [Basen]	Bester Treffer [a]	Trefferlänge/ Treffergenauigkeit [Basen / %]
eindeutige Treffer	1	1.1	71	*Yarrowia lipolytica*	27 / 100
	2	2.1	520	*Streptococcus salivarius*	451 / 94
uneindeutige Treffer: mind. 200 Basen mit mind. 90% Identität	1	1.2	291	*Candida, Pichia*	228 / 99
	2	2.2		= 2.1	
		2.3	438	*Agrobakterium*	366 / 95
		2.4	419	*Deinococcus*	338 / 97
		2.5	482	*Deinococcus*	428 / 92
		2.6	356	Clostridien	324 / 96
		2.7	491	Streptokokken	455 / 99
		2.8	415	*Streptococcus oralis*	382 / 99

[a] bei eindeutigen Treffern ist der einzige Treffer in der ncbi Datenbank angegeben, bei uneindeutigen Treffern ist der Treffer mit der größten Übereinstimmung angegeben

5.7.4 Hat SIDS eine infektiöse Ursache?

Da die *Reads* überwiegend nicht eindeutig sind und innerhalb der Gattung mit Sequenzen verschiedener Spezies übereinstimmen, kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, aus welchem spezifischen Erreger die Nukleinsäure stammt, die dem *Read* zugrunde liegt. Da zudem ein Gemisch von RNAs der verschiedenen Gewebe untersucht wurde, ist die genaue Quelle der Erreger- Nukleinsäure unklar.

Verifizierung der Sequenzier-Ergebnisse. Um die Ergebnisse zu verifizieren, müssen in einem nächsten Schritt spezifische (*real-time*) PCR Assays etabliert werden. So kann zunächst geklärt werden, ob sich die gefundenen Genomabschnitte auch mit Hilfe einer PCR aus dem ursprünglichen RNA Gemisch amplifizieren lassen (Abbildung 28). Durch zusätzliche Primerpaare außerhalb des jeweiligen *Reads* kann untersucht werden, ob sich weitere Genomabschnitte des jeweiligen Erregers in dem RNA Gemisch der SIDS Probe 2

finden lassen, was dafür sprechen würde, dass es sich bei den *Reads* um keine zufälligen Funde handelt und die jeweilige Erreger- Nukleinsäure tatsächlich in der Probe vorliegt. Um die Quelle der detektierten Nukleinsäure ausfindig zu machen, werden in einem nächsten Schritt alle DNAs und RNAs aus den einzelnen Geweben mit Hilfe der spezifischen PCRs untersucht. Da für die 454-Sequenzierung nur die RNA betrachtet wurde, kann zudem geklärt werden, ob sich auch in den DNA Proben erregerspezifische Genomabschnitte amplifizieren lassen. Durch anschließende DNA Sequenzierungen nach Sanger müssen die NGS Ergebnisse bestätigt und die Erreger-Spezies bestimmt werden. So kann verifiziert werden, ob tatsächlich Clostridien und/oder Streptokokken in den SIDS Proben nachzuweisen sind oder ob die *Reads* falsch positiv sind. Je nach Vorkommen der detektierten Spezies kann dann auf eine normale Besiedlung des jeweiligen Organs oder eine mögliche Infektion geschlossen werden.
Bisher wurden *Reads*, die auf das Vorhandensein eines Pathogens hindeuten, nur in dem RNA Gemisch der SIDS Probe 2 gefunden, während in Probe 1 keine erregerspezifischen *Reads* gefunden werden konnten. Die Sequenzierung des dritten SIDS Falls steht noch aus, die Untersuchung weiterer SIDS Fälle sollte folgen. Lassen sich die gleichen Pathogene in den Proben weiterer SIDS Fälle nachweisen und kommen sie auch dort gewebespezifisch vor, deutet das möglicherweise auf eine Beteiligung des jeweiligen Pathogens an SIDS hin.

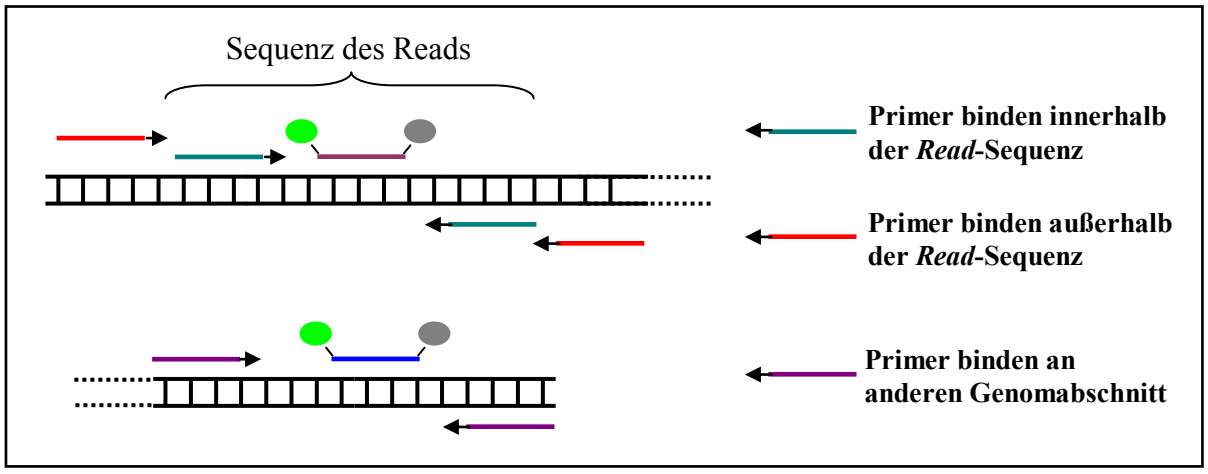


Abbildung 28: Spezifische *real-time* PCR Assays zur Verifizierung der NGS Ergebnisse der SIDS Proben. Mit einer PCR innerhalb der Sequenz des *Reads* (grün) wird das NGS Ergebnis überprüft. Eine PCR mit Primern außerhalb der *Read*-Sequenz (rot) zeigt, ob sich größere Genomabschnitte des jeweiligen Erregers amplifizieren lassen, die auch für eine Sanger Sequenzierung zur Bestätigung der NGS Ergebnisse geeignet wären. Mit einer dritten PCR (lila) können weitere Genomabschnitte amplifiziert werden, wodurch das Vorhandensein des jeweiligen Erregers bestätigt werden kann.

Beteiligung von Pathogenen an SIDS? Obwohl eine Infektionserkrankung als direkte Todesursache (die während der rechtsmedizinischen Untersuchung ermittelt werden müsste) wegfällt, kann eine Beteiligung von Infektionserregern an SIDS nicht ausgeschlossen werden.

In vielen SIDS Fällen wurde eine milde virale Begleiterkrankung festgestellt, die jedoch nicht den Tod erklärt (51, 113, 114). Ebenso treten zwei Drittel der Fälle in der infektbelasteten kalten Jahreszeit auf (47). In molekularbiologischen Untersuchungen von SIDS Proben wurde eine erhöhte Prävalenz des Epstein Barr Virus (EBV) und des Humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) im Vergleich zu gesunden Kindern gefunden (49). Andere Studien halten gewöhnliche bakterielle Toxine im Respirationstrakt in Assoziation mit einer viralen Infektion für eine mögliche Ursache von SIDS (50, 115). Auch wurden in SIDS Geweben, häufiger als in gesunden Geweben, kultivierbare Bakterien (*S. aureus* und *E. coli*) gefunden (50). Diese Studien haben jedoch den Nachteil, dass sie mit spezifischen molekularbiologischen Methoden wie der PCR nach bestimmten Erregern gesucht haben, beziehungsweise nur kultivierbare Erreger detektieren konnten. Des Weiteren wurden teilweise nur einige ausgewählte Gewebe der SIDS Fälle untersucht. Eine systematische Suche nach Infektionserregern in verschiedenen Organen ohne Einschränkung auf bestimmte Pathogene fehlte bisher und sollte durch das NGS ermöglicht werden.

Weitere NGS-Technologien. Neben der 454-Technologie gibt es weitere NGS Plattformen, die durch eine höhere Sequenzierleistung mehr *Reads* erzeugen, also eine höhere Sensitivität aufweisen müssten. Während mit der 454-Technologie bei einer Millionen *Reads* überwiegend humanspezifische und sehr wenig erregerspezifische Genomfragmente detektiert werden konnten, kann durch die Generierung von 750 Millionen *Reads* aus einer Probe (wie es mit dem HiScan SQ Gerät von Illumina theoretisch möglich ist) die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, erregerspezifische Segmente zu detektieren. Die höhere Sequenzierleistung erfordert allerdings sehr viel mehr Rechenleistung zur Analyse der Daten und eine angepasste Auswerte- Strategie. Zusätzlich sind die erzeugten *Reads* anderer NGS Plattformen deutlich kürzer als 454-Reads, wodurch die eindeutige Zuordnung der *Reads* zu Erregersequenzen erschwert sein dürfte.

Vergleichsproben zu SIDS Fällen. Ein Problem in der Erforschung von SIDS ist das Fehlen einer geeigneten Negativkontrolle. So ist es ethisch ausgeschlossen, Gewebeproben von gesunden Säuglingen zu bekommen. Bei Proben von verstorbenen Säuglingen könnten der Tod und seine Umstände Einfluss auf das natürliche Vorkommen und die Verbreitung von Pathogenen im und am menschlichen Körper haben, sodass unklar bleibt, ob ein Pathogen auch im gesunden Säugling zu finden wäre oder sich beispielsweise erst nach dem Tod ansiedeln oder verbreiten konnte. Proben von verunfallten Säuglingen könnten eine

Alternative darstellen, jedoch ist auch hier nicht auszuschließen, dass der Unfall selbst Einfluss auf die Besiedlung mit Pathogenen hat oder dass das Kind möglicherweise ohne den Unfall an SIDS verstorben wäre. Es wäre dadurch eine große Anzahl an Proben nötig, um statistische Fehler herausrechnen zu können. Da sich Körper und Immunsystem des Menschen in der kindlichen Entwicklung erheblich verändern, sind auch Vergleichsproben von älteren Kindern oder gar Erwachsenen als Negativkontrolle ungeeignet.

Fazit. Glücklicherweise sind in dem über einjährigen Zeitraum der Studie wider Erwarten nur drei Fälle von SIDS in der Rechtsmedizin Berlin eingegangen. Aufgrund der Fallzahlen zurückliegender Jahre wurde von zehn bis zwölf Fällen in einem Jahr ausgegangen. So bleibt weiterhin zu klären, ob sich eine infektiöse Ursache von SIDS oder zumindest eine Beteiligung von Pathogenen finden lässt. Der Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuren in Gewebeproben von SIDS Fällen an sich, wäre noch kein Beweis für eine solche Beteiligung von Infektionserregern an der Todesursache. Jedoch könnte bei weiteren SIDS Fällen gezielt nach den entsprechenden Pathogenen gesucht werden, beispielweise über spezifische *real-time* PCRs, um die Ergebnisse statistisch abzusichern. In einem nächsten Schritt könnten dann gesunde Säuglinge gezielt untersucht werden, um das Risiko von SIDS abschätzen und eindämmen zu können.

5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurden nukleinsäurebasierte Verfahren entwickelt, die eine schnellere, vereinfachte und verbesserte Detektion von hochpathogenen Erregern ermöglichen. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung von Screening Verfahren, die helfen sollen, verdächtige BT Proben schnellstmöglich zu untersuchen und so erste Hinweise auf vorliegende Pathogene zu erhalten. Da im Falle eines BT Ereignisses die Zusammensetzung der Probe meist unbekannt ist, werden möglichst universell einsetzbare und robuste Verfahren benötigt, um Nukleinsäuren zu isolieren und zuverlässig zu detektieren. Dabei kann der Nachweis von Erreger-Nukleinsäuren auf drei Ebenen erfolgen (siehe Abbildung 5).

Generell sollten, vor allem in der Detektion biologischer Agenzien, viele verschiedene Methoden zur Verfügung stehen, die unterschiedliche Anforderungen erfüllen müssen. Der Nachweis der Nukleinsäure des Pathogens stellt dabei einen Grundpfeiler der umfassenden Detektion dar. Da Manipulationen des Erbgutes von Pathogenen nicht ausgeschlossen werden können, bedarf es zudem verschiedener PCR Assays, die unterschiedliche Bereiche des jeweiligen Genoms abdecken. Auch sollten nicht alle PCR Assays der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden, um geeignete „back-up“ Methoden für den Ernstfall vorhalten zu können. Jedes Ergebnis muss durch weitere geeignete Verfahren bestätigt werden. Grundsätzlich können die entwickelten Detektionsmethoden auch in der Diagnostik klinischer Proben eingesetzt werden, da der Nachweis der Nukleinsäure (nahezu) unabhängig von deren Quelle ist.

Auch in Bezug auf die klinische Diagnostik von Pockenvirusinfektionen wurden Verfahren etabliert, die die bisherige Diagnostik vereinfachen und beschleunigen und zudem wertvolles Probenmaterial einsparen. Die entwickelte HuPox mmPCR kann Pockenviren auf Genusebene identifizieren, die mPSQ wiederum, ermöglicht die schnelle Identifizierung und Charakterisierung von OPV.

Neue, hochsensitive NGS Techniken ermöglichen einen vollständig „offenen Blick“ auf eine Probe ohne vorherige Kenntnisse des Pathogens und seines Genoms. Sie eignen sich daher zur Suche nach Pathogenen in klinischen Proben, um mögliche infektiöse Ursachen einer Erkrankung zu ergründen. Mit dem dargestellten Verfahren können Nukleinsäuren aus humanem Gewebe extrahiert und für das NGS aufbereitet werden. Eine infektiöse Ursache des plötzlichen Kindstodes konnte bisher nicht identifiziert, aber auch nicht ausgeschlossen werden, sodass die Untersuchung weiterer Proben erforderlich ist.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragestellungen und Aspekte, die in zukünftigen Projekten bearbeitet werden könnten:

- Erweiterung und Optimierung der Nukleinsäureaufreinigung aus Umwelt-substanzen: die entwickelte Methode aus Aufreinigung und Extraktion von Nukleinsäuren sollte mit weiteren Pathogenen und vor allem mit weiteren Umweltsubstanzen getestet werden. Eine Optimierung der PCR Reaktion in Bezug auf Sensitivität und Robustheit sollte durch Verwendung alternativer Reagenzien, vor allem Polymerasen, erfolgen.

- Für eine verlässliche BT Detektion sollten vorhandene *real-time* PCR Assays immer wieder optimiert werden und, sofern möglich, zu multiplex Ansätzen zusammengeführt werden. Weitere, spezifische *real-time* PCR Assays für weitere BT-relevante Erreger sollten in das Spektrum der verfügbaren Methoden aufgenommen werden. Wenn möglich, sollten neben laborabhängigen Methoden, Plattformen für die Vor-Ort Diagnostik entwickelt werden.

- Die Verwendung von Trockenreagenzien oder vorgefertigten Materialien für PCR und PSQ könnte den Gesamtprozess der Erreger- Detektion beschleunigen. Weitere PSQ Assays könnten dem Screening Verfahren hinzugefügt werden, beispielsweise für den Nachweis von *C. botulinum* DNA als Hinweis auf das Vorliegen des Produzenten von Botulinum Toxin in einer verdächtigen Probe.

- Die Suche nach einer infektiösen Ursache des plötzlichen Kindstods sollte durch Sequenzierung weiterer SIDS Proben fortgeführt werden. Die NGS Ergebnisse müssen durch spezifische *real-time* PCRs verifiziert werden. Die Anwendung weiterer, alternativer NGS Techniken könnte den Anteil erregerspezifischer *Reads* und damit die Sensitivität der Detektion erhöhen.

- Die entwickelten Verfahren zur Aufbereitung von Nukleinsäuren aus humanem Gewebe können auf weitere Fragestellungen angewendet werden, die mit Hilfe der NGS Technologie bearbeitet werden. Methoden zur Abreicherung von (humaner) Hintergrund- DNA sollten dabei verbessert werden.

Abkürzungsverzeichnis

BA	*Bacillus anthracis*
BBQ	*Black Berry Quencher*
BHQ	*Black Hole Quencher*
BSL	*Biosafety Level*
BT	Bioterrorismus
CC	*Colour Compensation*
CCD Kamera	*charge-coupled device* Kamera
CCHFV	*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, Krim-Kongo-Fieber-Virus
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
cDNA	*complementary* DNA, komplementäre DNA
CMLV	*camelpox virus*, Kamelpockenvirus
c-myc Gen	humanes Gen *c-myc*
CPXV	*cowpox virus*, Kuhpockenvirus
C_T	*threshold cycle*, Schwellenwert-Zyklus
Cy3, Cy5	Cyanine
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
EBV	Epstein Barr Virus
ECTV	Ectromelia Virus, Mauspockenvirus
EDTA	Ethylendiamin- tetraacetat
EHA	Enzym Hybridisierungsassay
EHEC	Enterohämorrhagische *Escherichia coli*
EM	Elektronenmikroskopie
emPCR	Emulsions-PCR
FAM	Carboxyfluorescein
FCV	Felines Calicivirus
FiloV	Filoviren
FRET	*fluorescence resonance energy transfer*
FT	*Francisella tularensis*
GE	*genome equivalents*, Genomäquivalente
HA Gen	Hämagglutinin Gen
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
HF	Hämorrhagisches Fieber
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
IAC	*Internal amplification control*, Interne Amplifikationskontrolle
IC	*Internal control*, Interne Kontrolle
kb	Kilobasen
Ko	Kontrolle
LNA	*locked nucleic acid*
MGB	*Minor Groove Binder*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mmPCR	*multicolour*, multiplex PCR

MOCV	Molluscum contagiosum Virus
mPSQ	multiplex Pyrosequenzierung
MPXV	*monkeypox virus*, Affenpockenvirus
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
ncbi	*National Center for Biotechnology Information*
NFQ	*Non-fluorescent quencher*
NGS	*Next Generation Sequencing*
NK	Negativkontrolle
NTC	*non-template control*
NWG	Nachweisgrenze
OPV	Orthopockenviren
ORF	*open reading frame*, offener Leserahmen
PBS	*phosphate buffered saline*, Natriumphosphat Puffer
PCR	*Polymerase chain reaction*, Polymerase Kettenreaktion
PK	Positivkontrolle
pKoMa	Kontroll Plasmid
PPV	Parapockenvirus
PSQ	Pyrosequenzierung
PTP	Picotiterplatte
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rpm	*revolutions per minute,* Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RVFV	*Rift Valley fever virus*, Rifttal-Fieber-Virus
SIDS	*Sudden infant death syndrome*, Plötzlicher Kindstod
SNP	s*ingle nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotid Polymorphismus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEX	Texas Red, Fluoreszenzfarbstoff
VACV	Vacciniavirus
VARV	Variola Virus
VIC	Fluoreszenzfarbstoff
WHO	*World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation
YP	*Yersinia pestis*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Detektion biologischer Agenzien in klinischen Proben und Umweltproben. 15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung (PSQ). 19
Abbildung 3: Prinzip der multiplex Pyrosequenzierung. 20
Abbildung 4: Schematische Darstellung der 454-Sequenzierung. 22
Abbildung 5: Molekularbiologische Diagnostik/ Detektion von hochpathogenen Erregern. .. 25
Abbildung 6: Schema der Nukleinsäurepräparation und PCR- Detektion aus Umweltproben. 49
Abbildung 7: Aufbau eines PSQ Assays. 51
Abbildung 8: Amplifikationskurven der *B. anthracis* PCR mit unmodifizierten Primern im Vergleich zur PCR mit einem biotinylierten Primer. 52
Abbildung 9: Fehlerquellen und Kontrollen einer Pyrosequenzierung. 53
Abbildung 10: Beispiel- Pyrogramm von *B. anthracis.* 54
Abbildung 11: Standardgeraden der PSQ von *B.anthracis*. 54
Abbildung 12: Einteilung einer PCR- bzw. PSQ Platte zum Screening von max. sechs Proben auf verschiedene BT Erreger. 56
Abbildung 13: Agarosegel Bilder zum Vergleich der PCR Produktmenge mit zwei verschiedenen PCR Geräten. 57
Abbildung 14: Kontrolle von Kontaminationen in der PSQ am Beispiel von RVFV. 58
Abbildung 15: Schema der Auswertung eines PSQ Assays. 60
Abbildung 16: Grafische Darstellung einer Probitanalyse am Beispiel der *F. tularensis* Detektion. 61
Abbildung 17: Varianzanalyse am Beispiel der PPV Detektion. 63
Abbildung 18: Sequenziermuster (*Fingerprints*) der multiplex PSQ mit verschiedenen OPV. 66
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Primer für die *S. pneumoniae real-time* und *nested* PCR. 69
Abbildung 20: Aufbereitung von RNA aus den SIDS Gewebeproben für die 454-Sequenzierung.. 70
Abbildung 21: Qualitätskontrolle der DNA Bibliotheken. 71
Abbildung 22: Schema der Vorgehensweise bei der Vorbereitung humaner Gewebeproben auf das *Next Generation Sequencing.* 72
Abbildung 23: Vorgehensweise bei der bioinformatischen Analyse der Sequenzdaten. 73
Abbildung 24: Mögliches Vorgehen zur Untersuchung von Umweltproben. 76
Abbildung 25: Vorgeschlagenes Verfahren zur optimierten Detektion von hochpathogenen Erregern. 85
Abbildung 26: *Multicolour* Detektion in der *real-time* PCR. 86
Abbildung 27: Optimierte Diagnostik durch multiplex Verfahren am Beispiel der Pockenvirus Diagnostik. 91
Abbildung 28: Spezifische *real-time* PCR Assays zur Verifizierung der NGS Ergebnisse der SIDS Proben. 99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologische Agenzien und ihre Einordnung nach den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 9
Tabelle 2: Charakteristische Vertreter der Poxviridae. 13
Tabelle 3: Primer und Sonden für die *real-time* (PSQ-) PCRs und Pyrosequenzierungen 27
Tabelle 4: Weitere Primer und Sonden für die PSQ- (*real-time*) PCRs und die Pyrosequenzierungen 28
Tabelle 5: Primer für die PSQ- PCR und die multiplex Pyrosequenzierung von OPV 29
Tabelle 6: Primer und Sonden für die erregerspezifischen PCRs mit den SIDS Proben 29
Tabelle 7: Verwendete Umweltsubstanzen 34
Tabelle 8: Programm für Standard- PCRs. 35
Tabelle 9: Multiplex *real-time* PCR mit Reporterfarbstoffen 36
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die multiplex *real-time* PCR 36
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die *multicolour*, multiplex *real-time* PCR 37
Tabelle 12: Sonden für die uniplex bzw. *multicolour*, multiplex *real-time* PCR 37
Tabelle 13: Programm für die uniplex bzw. *multicolour*, multiplex *real-time* PCR 37
Tabelle 14: Ansatz und Programm der Sequenzierungs- PCR 39
Tabelle 15: Reaktionsansatz für die DNA PSQ- PCR 40
Tabelle 16: Reaktionsansatz für die *one-step* RT PSQ- PCR 40
Tabelle 17: Programm für die PSQ- PCRs 40
Tabelle 18: Reaktionsansatz für die mPox PSQ-PCR 41
Tabelle 19: Programm für die mPox PSQ-PCR 41
Tabelle 20: Vergleich der VACV Detektion durch *real-time* PCR in aufgereinigten und nicht aufgereinigten Proben 46
Tabelle 21: Vergleich der *one-step* RT-PCR und *two-step* (RT) PCR zum Nachweis von FCV und VACV aus aufgereinigten Proben. 47
Tabelle 22: Detektion von Pathogenen in Haushaltsprodukten. 48
Tabelle 23: Erregerspektrum für die Kombination aus (*real-time*) PCR und Pyrosequenzierung 50
Tabelle 24: *Annealing*- Temperatur während der PSQ-PCR und untere Nachweisgrenze der PSQ. 55
Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse der mmPCR und der entsprechenden uniplex *real-time* PCRs 64
Tabelle 26: Ergebnisse der multiplex PSQ im Vergleich zur Sanger Sequenzierung 67
Tabelle 27: Ergebnisse der *S. pneumoniae real-time* PCR mit den SIDS Proben 69
Tabelle 28: Erregerspezifische *Reads* der SIDS Proben 98

Literaturverzeichnis

1. Kaufmann SHE, Sütterlin S. Infektionskrankheiten. Vol.: Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2009.
2. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Bohmer MM, Remschmidt C, Wilking H, et al. German outbreak of escherichia coli o104:H4 associated with sprouts. The New England journal of medicine 2011;365:1763-70.
3. Robertson AG, Robertson LJ. From asps to allegations: Biological warfare in history. Military medicine 1995;160:369-73.
4. Wheelis M. Biological warfare at the 1346 siege of caffa. Emerging infectious diseases 2002;8:971-5.
5. Anonymous. Unog. The biological weapons convention. www.unog.ch/bwc (Accessed 12/12/2011.
6. Anonymous. Update: Investigation of bioterrorism-related anthrax--connecticut, 2001. MMWR Morbidity and mortality weekly report 2001;50:1077-9.
7. Anonymous. Cdc bioterrorism overview. www.bt.cdc.gov/bioterrorism/overview.asp (Accessed 12/12/2011.
8. Anonymous. The australia group. List of biological agents for export control. http://www.australiagroup.net/en/biological_agents.html (Accessed 03/05/2012).
9. Klee SRJ, D.; Nattermann, H.; Appel, B. Bioterroristisch relevante bakterielle erreger. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2003;11:935-48.
10. Böhm R. Milzbrand. In: Blobel H, Schließer T, eds. Handbuch der bakteriellen infektionen bei tieren, Vol. II. 2 ed: Gustav Fischer, Stuttgart, 1995.
11. Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. Bacillus anthracis pxo1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. Journal of bacteriology 2002;184:134-41.
12. Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the bacillus anthracis pxo2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. BMC genomics 2002;3:34.
13. Johansson A, Ibrahim A, Goransson I, Eriksson U, Gurycova D, Clarridge JE, 3rd, Sjostedt A. Evaluation of pcr-based methods for discrimination of francisella species and subspecies and development of a specific pcr that distinguishes the two major subspecies of francisella tularensis. Journal of clinical microbiology 2000;38:4180-5.
14. Perry RD, Fetherston JD. Yersinia pestis--etiologic agent of plague. Clinical microbiology reviews 1997;10:35-66.
15. Neubauer H, Meyer H, Prior J, Aleksic S, Hensel A, Splettstosser W. A combination of different polymerase chain reaction (pcr) assays for the presumptive identification of yersinia pestis. Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health 2000;47:573-80.
16. Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. Molekulare virologie: Spektrum Akademischer Verlag, 2010:734pp.
17. Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albarino CG, Conlan S, Reeder SA, et al. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in uganda. PLoS pathogens 2008;4:e1000212.
18. Anonymous. Steckbriefe seltener und importierter infektionskrankheiten. Vol. Berlin: Robert Koch Institute, 2011.
19. Fukuma A, Kurosaki Y, Morikawa Y, Grolla A, Feldmann H, Yasuda J. Rapid detection of lassa virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. Microbiology and immunology 2011;55:44-50.

20. Lecompte E, Fichet-Calvet E, Daffis S, Koulemou K, Sylla O, Kourouma F, et al. Mastomys natalensis and lassa fever, west africa. Emerging infectious diseases 2006;12:1971-4.
21. Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, Cook N, Bruce C, Dowall SD, Hewson R. Development of a real-time rt-pcr assay for the detection of crimean-congo hemorrhagic fever virus. Vector borne and zoonotic diseases 2012.
22. Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-congo hemorrhagic fever. Archives of Iranian medicine 2007;10:204-14.
23. Fenner F. The global eradication of smallpox. The Medical journal of Australia 1980;1:455-5.
24. Henderson DA. Smallpox eradication. Public health reports 1980;95:422-6.
25. Fenner F. Smallpox: Emergence, global spread, and eradication. History and philosophy of the life sciences 1993;15:397-420.
26. Behbehani AM. The smallpox story: Life and death of an old disease. Microbiological reviews 1983;47:455-509.
27. Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time pcr and identification of variola virus DNA by melting analysis. Journal of clinical microbiology 2004;42:1207-13.
28. Gottschalk R, Preiser W. Bioterrorism: Is it a real threat? Medical microbiology and immunology 2005;194:109-14.
29. Moss B. Poxviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, eds. Fields virology, Vol. 5: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:2905-75.
30. Ligon BL. Monkeypox: A review of the history and emergence in the western hemisphere. Seminars in pediatric infectious diseases 2004;15:280-7.
31. Herder V, Wohlsein P, Grunwald D, Janssen H, Meyer H, Kaysser P, et al. Poxvirus infection in a cat with presumptive human transmission. Veterinary dermatology 2011;22:220-4.
32. Becker C, Kurth A, Hessler F, Kramp H, Gokel M, Hoffmann R, et al. Cowpox virus infection in pet rat owners: Not always immediately recognized. Deutsches Arzteblatt international 2009;106:329-34.
33. Campe H, Zimmermann P, Glos K, Bayer M, Bergemann H, Dreweck C, et al. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, germany. Emerging infectious diseases 2009;15:777-80.
34. Kurth A, Straube M, Kuczka A, Dunsche AJ, Meyer H, Nitsche A. Cowpox virus outbreak in banded mongooses (mungos mungo) and jaguarundis (herpailurus yagouaroundi) with a time-delayed infection to humans. PloS one 2009;4:e6883.
35. Bera BC, Shanmugasundaram K, Barua S, Venkatesan G, Virmani N, Riyesh T, et al. Zoonotic cases of camelpox infection in india. Veterinary microbiology 2011;152:29-38.
36. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977;74:5463-7.
37. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome research 2001;11:3-11.
38. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Analytical biochemistry 1996;242:84-9.
39. Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, Miranda ME, Trappier SG, Khan AS, et al. Detection and molecular characterization of ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. The Journal of infectious diseases 1999;179 Suppl 1:S164-9.

40. Quan PL, Briese T, Palacios G, Ian Lipkin W. Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. Antiviral research 2008;79:1-5.
41. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. Nature methods 2008;5:16-8.
42. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 2005;437:376-80.
43. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nature reviews Genetics 2010;11:31-46.
44. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clinical chemistry 2009;55:856-66.
45. Benjamin LA, Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Zhao G, Sharp C, Simmonds P, et al. Human parvovirus 4 as potential cause of encephalitis in children, india. Emerging infectious diseases 2011;17:1484-7.
46. Palacios G, Druce J, Du L, Tran T, Birch C, Briese T, et al. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. The New England journal of medicine 2008;358:991-8.
47. Bajanowski TP, C. Der plötzliche kindtod: Epidemiologie, ätiologie, pathophysologie und differenzialdiagnostik. Deutsches Ärzteblatt 2004;101:A3185-90.
48. Hilienhof A. Mangelnde hirnstammdurchblutung als ursache für plötzlichen kindstod. Vol.: Deutsches Ärzteblatt, 2010:957.
49. Alvarez-Lafuente R, Aguilera B, Suarez-Mier MA, Morentin B, Vallejo G, Gomez J, Fernandez-Rodriguez A. Detection of human herpesvirus-6, epstein-barr virus and cytomegalovirus in formalin-fixed tissues from sudden infant death: A study with quantitative real-time pcr. Forensic science international 2008;178:106-11.
50. Blood-Siegfried J. The role of infection and inflammation in sudden infant death syndrome. Immunopharmacology and immunotoxicology 2009;31:516-23.
51. Blood-Siegfried J, Rambaud C, Nyska A, Germolec DR. Evidence for infection, inflammation and shock in sudden infant death: Parallels between a neonatal rat model of sudden death and infants who died of sudden infant death syndrome. Innate immunity 2008;14:145-52.
52. Weber MA, Klein NJ, Hartley JC, Lock PE, Malone M, Sebire NJ. Infection and sudden unexpected death in infancy: A systematic retrospective case review. Lancet 2008;371:1848-53.
53. Niklasson B, Almqvist PR, Hornfeldt B, Klitz W. Sudden infant death syndrome and ljungan virus. Forensic science, medicine, and pathology 2009;5:274-9.
54. Kurth A, Achenbach J, Miller L, Mackay IM, Pauli G, Nitsche A. Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: Inhibitory influences of common household products. Applied and environmental microbiology 2008;74:32-7.
55. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time pcr system targeting a chromosomal marker specific for bacillus anthracis. Molecular and cellular probes 2008;22:313-5.
56. Elsholz B, Nitsche A, Achenbach J, Ellerbrok H, Blohm L, Albers J, et al. Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex pcr products from biological agents. Biosensors & bioelectronics 2009;24:1737-43.
57. Kirchner S, Kramer KM, Schulze M, Pauly D, Jacob D, Gessler F, et al. Pentaplexed quantitative real-time pcr assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. Applied and environmental microbiology 2010;76:4387-95.

58. Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time pcr assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. Molecular and cellular probes 2010;24:110-3.
59. Nitsche A, Buttner M, Wilhelm S, Pauli G, Meyer H. Real-time pcr detection of parapoxvirus DNA. Clinical chemistry 2006;52:316-9.
60. Donoso Mantke O, Kallies R, Niklasson B, Nitsche A, Niedrig M. A new quantitative real-time reverse transcriptase pcr assay and melting curve analysis for detection and genotyping of ljungan virus strains. Journal of virological methods 2007;141:71-7.
61. Sutlovic D, Definis Gojanovic M, Andelinovic S, Gugic D, Primorac D. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. Croatian medical journal 2005;46:556-62.
62. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and environmental microbiology 1997;63:3741-51.
63. Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, et al. Investigation of bioterrorism-related anthrax, united states, 2001: Epidemiologic findings. Emerging infectious diseases 2002;8:1019-28.
64. Clarke SC. Pyrosequencing: Nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications. Expert review of molecular diagnostics 2005;5:947-53.
65. Achazi K, Nitsche A, Patel P, Radonic A, Donoso Mantke O, Niedrig M. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time pcr and pyrosequencing. Journal of virological methods 2011;171:34-9.
66. Adelson ME, Feola M, Trama J, Tilton RC, Mordechai E. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time pcr and pyrosequencing. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 2005;33:25-34.
67. Kramski M, Meisel H, Klempa B, Kruger DH, Pauli G, Nitsche A. Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-pcr and pyrosequencing. Clinical chemistry 2007;53:1899-905.
68. Trama JP, Adelson ME, Mordechai E. Identification and genotyping of molluscum contagiosum virus from genital swab samples by real-time pcr and pyrosequencing. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 2007;40:325-9.
69. Unemo M, Olcen P, Fredlund H, Thulin S. Real-time pcr and subsequent pyrosequencing for screening of pena mosaic alleles and prediction of reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in neisseria gonorrhoeae. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 2008;116:1004-8.
70. Jonasson J, Olofsson M, Monstein HJ. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16s rdna fragments. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 2002;110:263-72.
71. Jacob D, Wahab T, Edvinsson B, Peterzon A, Boskani T, Farhadi L, et al. Identification and subtyping of francisella by pyrosequencing and signature matching of 16s rdna fragments. Letters in applied microbiology 2011;53:592-5.
72. Wahab T, Hjalmarsson S, Wollin R, Engstrand L. Pyrosequencing bacillus anthracis. Emerging infectious diseases 2005;11:1527-31.
73. Ahmod NZ, Gupta RS, Shah HN. Identification of a bacillus anthracis specific indel in the yeac gene and development of a rapid pyrosequencing assay for distinguishing b. Anthracis from the b. Cereus group. Journal of microbiological methods 2011;87:278-85.
74. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine HS, 3rd, Wasieloski LP, Kulesh DA. Identification of ciprofloxacin resistance by simpleprobe, high

resolution melt and pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: Bacillus anthracis, yersinia pestis and francisella tularensis. Molecular and cellular probes 2010;24:154-60.

75. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S. Rapid detection and quantification of rna of ebola and marburg viruses, lassa virus, crimean-congo hemorrhagic fever virus, rift valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-pcr. Journal of clinical microbiology 2002;40:2323-30.
76. Panning M, Laue T, Olschlager S, Eickmann M, Becker S, Raith S, et al. Diagnostic reverse-transcription polymerase chain reaction kit for filoviruses based on the strain collections of all european biosafety level 4 laboratories. The Journal of infectious diseases 2007;196 Suppl 2:S199-204.
77. Wolfel R, Paweska JT, Petersen N, Grobbelaar AA, Leman PA, Hewson R, et al. Virus detection and monitoring of viral load in crimean-congo hemorrhagic fever virus patients. Emerging infectious diseases 2007;13:1097-100.
78. Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, Hass M, et al. Rt-pcr assay for detection of lassa virus and related old world arenaviruses targeting the l gene. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2007;101:1253-64.
79. He J, Kraft AJ, Fan J, Van Dyke M, Wang L, Bose ME, et al. Simultaneous detection of cdc category "a" DNA and rna bioterrorism agents by use of multiplex pcr & rt-pcr enzyme hybridization assays. Viruses 2009;1:441-59.
80. Varma-Basil M, El-Hajj H, Marras SA, Hazbon MH, Mann JM, Connell ND, et al. Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents. Clinical chemistry 2004;50:1060-2.
81. Skottman T, Piiparinen H, Hyytiainen H, Myllys V, Skurnik M, Nikkari S. Simultaneous real-time pcr detection of bacillus anthracis, francisella tularensis and yersinia pestis. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2007;26:207-11.
82. Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ. Reliable detection of bacillus anthracis, francisella tularensis and yersinia pestis by using multiplex qpcr including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC microbiology 2010;10:314.
83. Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in bacillus anthracis. Infection and immunity 1983;39:371-6.
84. Welkos SL. Plasmid-associated virulence factors of non-toxigenic (px01-) bacillus anthracis. Microbial pathogenesis 1991;10:183-98.
85. Anonymous. Iti razor™ ex biodetection system. http://www.idahotech.com/RAZOREX/index.html (Accessed 01/31/2012.
86. Ulrich MP, Christensen DR, Coyne SR, Craw PD, Henchal EA, Sakai SH, et al. Evaluation of the cepheid genexpert system for detecting bacillus anthracis. Journal of applied microbiology 2006;100:1011-6.
87. Lamson D, Renwick N, Kapoor V, Liu Z, Palacios G, Ju J, et al. Masstag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in new york state during 2004-2005. The Journal of infectious diseases 2006;194:1398-402.
88. Huang Q, Hu Q, Li Q. Identification of 8 foodborne pathogens by multicolor combinational probe coding technology in a single real-time pcr. Clinical chemistry 2007;53:1741-8.
89. Huang Q, Zheng L, Zhu Y, Zhang J, Wen H, Huang J, et al. Multicolor combinatorial probe coding for real-time pcr. PloS one 2011;6:e16033.

90. Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A, Fach P. Diagnostic pcr: Making internal amplification control mandatory. Journal of applied microbiology 2004;96:221-2.
91. Patel P, Shiao YH, Fortina P. Multiplex pyrosequencing for DNA variation analysis. Methods in molecular biology 2007;373:75-88.
92. Pourmand N, Elahi E, Davis RW, Ronaghi M. Multiplex pyrosequencing. Nucleic acids research 2002;30:e31.
93. Gharizadeh B, Oggionni M, Zheng B, Akom E, Pourmand N, Ahmadian A, et al. Type-specific multiple sequencing primers: A novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. The Journal of molecular diagnostics : JMD 2005;7:198-205.
94. Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus va1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. Journal of virology 2009;83:10836-9.
95. Bishop-Lilly KA, Turell MJ, Willner KM, Butani A, Nolan NM, Lentz SM, et al. Arbovirus detection in insect vectors by rapid, high-throughput pyrosequencing. PLoS neglected tropical diseases 2010;4:e878.
96. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 2007;318:283-7.
97. Janning W, Knust E. Genetik: Allgemeine genetik-molekulare genetik-entwicklungsgenetik: Georg Thieme Verlag, 2004:475pp.
98. Ernani FP, LeProust EM. Agilent´s sureselect target enrichment system: Bringing cost and process efficiency to next-generation sequencing. Agilent Technologies, Inc 2009.
99. Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, et al. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. PloS one 2009;4:e4219.
100. Slade D, Radman M. Oxidative stress resistance in deinococcus radiodurans. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 2011;75:133-91.
101. Cowden J. Food-borne clostridium botulinum intoxication from mass produced foodstuffs in europe. Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 2011;16:20033.
102. Lindstrom M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of clostridium perfringens type a food poisoning. Food microbiology 2011;28:192-8.
103. Lindstrom M, Myllykoski J, Sivela S, Korkeala H. Clostridium botulinum in cattle and dairy products. Critical reviews in food science and nutrition 2010;50:281-304.
104. Rebagliati V, Philippi R, Tornese M, Paiva A, Rossi L, Troncoso A. Food-borne botulism in argentina. Journal of infection in developing countries 2009;3:250-4.
105. Conte A, Chinello P, Civljak R, Bellussi A, Noto P, Petrosillo N. Streptococcus salivarius meningitis and sphenoid sinus mucocele. Case report and literature review. The Journal of infection 2006;52:e27-30.
106. Hakenbeck R, Madhour A, Denapaite D, Bruckner R. Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in streptococcus pneumoniae and commensal streptococci. FEMS microbiology reviews 2009;33:572-86.
107. Reichmann P, Nuhn M, Denapaite D, Bruckner R, Henrich B, Maurer P, et al. Genome of streptococcus oralis strain uo5. Journal of bacteriology 2011;193:2888-9.
108. Rosado P, Gallego L, Junquera L, de Vicente JC. Lemierre's syndrome: A serious complication of an odontogenic infection. Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal 2009;14:e398-401.

109. Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, Havarstein LS, Bek-Thomsen M, Tettelin H, Sorensen UB. Evolution of streptococcus pneumoniae and its close commensal relatives. PloS one 2008;3:e2683.
110. Stock I. [streptococcus pyogenes--much more than the aetiological agent of scarlet fever]. Medizinische Monatsschrift fur Pharmazeuten 2009;32:408-16; quiz 17-8.
111. Valkenburg-van den Berg AW, Houtman-Roelofsen RL, Oostvogel PM, Dekker FW, Dorr PJ, Sprij AJ. Timing of group b streptococcus screening in pregnancy: A systematic review. Gynecologic and obstetric investigation 2010;69:174-83.
112. Verani JR, Schrag SJ. Group b streptococcal disease in infants: Progress in prevention and continued challenges. Clinics in perinatology 2010;37:375-92.
113. Blackwell CC, Weir DM. The role of infection in sudden infant death syndrome. FEMS immunology and medical microbiology 1999;25:1-6.
114. Willinger M, James LS, Catz C. Defining the sudden infant death syndrome (sids): Deliberations of an expert panel convened by the national institute of child health and human development. Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association 1991;11:677-84.
115. Morris JA. The common bacterial toxins hypothesis of sudden infant death syndrome. FEMS immunology and medical microbiology 1999;25:11-7.

Liste eigener Veröffentlichungen

Artikel in Zeitschriften

Schroeder K & Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. Molecular and Cellular Probes 2010;24:110-113.

Suess T, Remschmidt C, Schink SB, Schweiger B, Nitsche A, **Schroeder K**, Doellinger J, Milde J, Haas W, Koehler I, Krause G & Buchholz U. 2012. The role of facemasks and hand hygiene in the prevention of influenza transmission in households: results from a cluster randomised trial; Berlin, Germany, 2009-2011. BMC Infectious Diseases 2012;12:26

Schroeder K, Doellinger J, Witt N, Heunemann C & Nitsche A. Comparison of real-time PCR and MassTag PCR for the multiplex detection of highly pathogenic agents. Eingereicht

Schroeder K, Dabrowski PW, Nitsche A. MultiPSQ: A software solution for the analysis of diagnostic n-plexed pyrosequencing reactions. Eingereicht

Suess T, Remschmidt C, Schink SB, Schweiger B, Heider A, Milde J, Nitsche A, **Schroeder K**, Doellinger J, Haas W, Krause G & Buchholz U. Comparison of shedding and transmission characteristics of seasonal virus subtypes and influenza A(H1N1)pdm09 from community respiratory samples; Germany, 2007-2011. Eingereicht

Vorträge auf Konferenzen

Schroeder K & Nitsche A. 2011. Detection and classification of microorganisms by combination of qPCR and pyrosequencing. 5. Internationales qPCR Symposium 2011

Danksagung

An dieser Stelle sei all denjenigen recht herzlich gedankt, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Andreas Nitsche, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit und die damit verbundenen Projekte durchzuführen, der immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte und der mir immer wieder neue Impulse für die Durchführung dieser Arbeit gegeben hat. PD Dr. Mathias Niedrig danke ich für die finanzielle Einwerbung des S.O.N.D.E Projektes. Prof. Dr. Roland Lauster von der TU Berlin möchte ich herzlich für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Sarah Heinze (ehemals Rechtsmedizin, Charité Berlin) bedanken, die durch ihr Engagement in dem SIDS Projekt dieses überhaupt möglich gemacht hat. Bei Dr. Katjana Daskalow und Dr. Timo Hillebrand (AJ Innuscreen) bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Dr. Dr. Jonas Schmidt-Chanasit (BNI) für die Bereitstellung von Virus-RNAs.

Bei Wojtek Dabrowski bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung in allen Software Fragen, die anregenden Diskussion und den persönlichen IT Support. Folgenden Kollegen von ZBS1, sei besonders gedankt: Silvia Muschter für ihr freundliches Wesen und die Unterstützung bei der Pyrosequenzierung, Jule Tesch, Jule Hinzmann und Dr. Aleksandar Radonic für ihre Hilfe beim *Next-Generation-Sequencing* und die anregenden Gespräche.
Weiterhin sei allen (ehemaligen) Kollegen gedankt, die mich tatkräftig unterstützt haben: Marlies Panzer, Imke Hartwigsen, Manja Jargosch, Carolin Heunemann, Jörg Döllinger, Daniel Stern, Marco Kaiser. Livia Schünadel, Constanze Yue, Christian Holdack und vielen weiteren netten Kollegen danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, Gisela und Uwe Schröder, und meiner Schwester Jenny, danke ich für die umfassende moralische Unterstützung. Ich konnte immer auf euch zählen.

Meinem lieben Daniel danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung, sein Verständnis in allen Lebenslagen und seine Geduld mit mir.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Etablierung ultrasensitiver generischer Nukleinsäuretestverfahren zum Nachweis hochpathogener Mikroorganismen“ selbständig verfasst habe. Alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sind aufgeführt.

Berlin,

K. Schröder