

Virale Enzephalitis

-

**Neue Diagnostik und
neuartige Erreger**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Julia Melchert

Berlin, 2024

Die Experimente in dieser Arbeit wurden am Institut für Virologie der Charité -
Universitätsmedizin Berlin von Januar 2019 bis März 2024 unter der Leitung von
Prof. Dr. Christian Drosten durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian Drosten

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Haike Antelmann

Tag der Disputation: 24.06.2024

“Kommt auf die Fragestellung an.”

Dr. Victor Corman

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung	6
Abstract	8
1. Einleitung	10
1.1. Enzephalitis	10
1.2. Virale Enzephalitis-Erreger	11
1.2.1. Häufige Enzephalitis-Erreger	12
1.2.2. Seltene und neuartige Enzephalitis-Erreger	14
1.3. Hochdurchsatz-Sequenzierung	18
1.3.1. Illumina	18
1.3.2. Oxford Nanopore	19
1.3.3. Anreicherung viraler Nukleinsäure	20
2. Zielsetzung dieser Dissertation	22
3. Material und Methoden	25
3.1. Material	25
3.1.1. Probenmaterial und Ethik	25
3.1.2. Technisches Equipment	25
3.1.3. Chemikalien und Puffer	27
3.1.4. Kommerzielle Kits	28
3.1.5. Verbrauchsmaterial	30
3.1.6. Oligonukleotide und Kontrollen	31
3.1.7. Software	33
3.2. Nukleinsäure-Extraktion	34
3.2.1. QIAamp Viral RNA Mini Kit	34
3.2.2. MagNA Pure 96	34
3.2.3. RNeasy	34
3.2.4. RNeasy FFPE	35
3.3. PCR-Analysen	35
3.3.1. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und Sanger-Sequenzierung	35
3.3.2. <i>In vitro</i> Transkription	36
3.3.3. Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	37
3.4. Hochdurchsatz-Sequenzierung	38
3.4.1. Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken	38
3.4.2. Wirtsgenom-Abreicherung	40
3.4.3. <i>Capturing</i> - Anreicherung viraler Sequenzen	40
3.4.4. Datenanalyse	40
3.5. Erstellen von Konsensussequenzen	41
3.6. Phylogenetische Analysen	41

3.7. Serologische Methoden	42
3.7.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay	42
3.7.2. Indirekter Immunfluoreszenztest.....	42
3.8. Statistik	42
4. Ergebnisse	43
4.1. Entwicklung und Etablierung eines zeiteffizienten und sensitiven HTS-Arbeitsablaufs... 43	
4.1.2. Strategie zum parallelen Nachweis von RNA- und DNA-Viren	44
4.1.3. Qualitätskontrolle: Positivkontrolle und Ringversuche.....	46
4.1.4. Sensitivität.....	48
4.1.5. Kontaminationen im HTS.....	49
4.1.6. Arbeitsablauf für die Diagnostik	53
4.1.7. Optimierte Techniken für die Vollgenomsequenzierung	54
4.2. Rolle von seltenen und neuartigen Erregern in ungeklärten Enzephalitis-Fällen in Berlin	56
4.2.1. Retrospektive Untersuchung von Liquorproben	56
4.2.2. Akute Enzephalitis-Fälle	60
4.3. Hepatitis-E-Virus als seltener Erreger des zentralen Nervensystems	64
4.4. West-Nil-Virus als neuartiger Enzephalitis-Erreger in Berlin, Deutschland.....	73
4.5. Pegiviren, die am häufigsten nachgewiesen Viren.....	81
5. Diskussion	94
5.1. Hochdurchsatz-Sequenzierung für die Diagnostik viraler Enzephalitis-Fälle.....	94
5.2. Detektion und Kausalität von Pathogen	99
5.3. Kompartiment-spezifische Virusdiversität in einer chronischen Hepatitis-E-Virusinfektion	101
5.4. West-Nil-Virus als neuartiger Erreger in Deutschland.....	102
5.5. Pegiviren als neuartige Enzephalitis-Erreger	103
6. Ausblick	107
7. Verzeichnis der erfolgten Publikationen	109
8. Beiträge an wissenschaftlichen Konferenzen.....	112
9. Lebenslauf	113
10. Selbstständigkeitserklärung	114
11. Anhang	115
12. Abkürzungsverzeichnis	134
13. Abbildungsverzeichnis	136
14. Tabellenverzeichnis	138
15. Danksagung	140
16. Referenzen	142

Zusammenfassung

Als Enzephalitis bezeichnet man die Entzündung des Hirngewebes. Jedes Jahr werden etwa 1,5-20/100.000 Einwohner mit Verdacht auf Enzephalitis hospitalisiert. In den meisten Fällen kann keine Ursache identifiziert werden. Mehr als 100 verschiedene Viren können eine Enzephalitis verursachen. Die große Anzahl und Vielfalt der möglichen Erreger erschweren die Diagnostik. Die Routinediagnostik konzentriert sich daher in der Regel auf die häufigsten Erreger und wird gegebenenfalls iterativ erweitert, wenn die initialen Tests keinen Erreger nachweisen. Das (Wieder-)Auftauchen neuer und seltener Viren wird wahrscheinlich durch Faktoren wie Klimawandel, Entwaldung, Globalisierung und Urbanisierung weiter zunehmen und ist in den letzten Jahren durch die Zika-Virus-Ausbrüche in Lateinamerika, das Auftreten autochthoner West-Nil-Virus (WNV) Infektionen in Deutschland und die COVID-19-Pandemie eindrücklich belegt worden. Daher ist es wichtig, eine breite Diagnostik zur schnellen und zuverlässigen Identifizierung von Viren zu entwickeln. Diese muss in der Lage sein, bekannte Krankheitserreger, aber auch unbekannte oder ungewöhnliche, zum Beispiel reiseassoziierte Erreger, nachzuweisen.

Das initiale Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Hochdurchsatz-Sequenziermethode mit möglichst kurzer Zeitspanne von der Probenentnahme bis zur Erreger-Identifikation. Dies ist von entscheidender Bedeutung für eine schnelle Diagnose, Behandlung und somit für das Überleben der Patienten. Mit dem etablierten Arbeitsablauf können die Ergebnisse innerhalb von drei Tagen nach dem Probeneingang bereitgestellt werden. Kritisch ist dabei die Erkennung klinisch relevanter Nachweise, die Abgrenzung von möglichen Virusnachweisen ohne ursächliche Bedeutung für die Enzephalitis sowie das Erfassen von Kontaminationen.

Die hier etablierte Methode wurde bei der retrospektiven Untersuchung von 1676 Liquorproben von Enzephalitis-/Meningitis-Patienten ungeklärter Ursache angewendet und in der Routinediagnostik angewendet. Bei den untersuchten Personen wurden bereits bekannte Infektionen festgestellt, aber auch zahlreiche seltene, zuvor nicht diagnostizierte Erreger. Dazu gehören ein humanes Cosavirus bei einem Kind mit akuter schlaffer Lähmung und ein Dobrava-Belgrad-Hantavirus im Liquor eines Patienten mit Enzephalitis. Besonders erwähnenswert sind der mehrfache Nachweis des Hepatitis-E-Virus (HEV), die Identifikation zuvor unbekannter WNV-Infektionen und der Nachweis von humanen Pegiviren (HPgV) im zentralen Nervensystem (ZNS) bei Patienten mit Enzephalitis. Die Etablierung von Methoden zur Vollgenomsequenzierung und der mehrfache Nachweis von HEV und HPgV in ZNS-Proben ermöglichten eine vertiefende Untersuchung dieser Erreger. So wurde die Virus-Diversität in einer chronischen HEV-Infektion mit neurologischen Symptomen untersucht. Dabei konnten distinkte virale Populationen in verschiedenen Kompartimenten festgestellt werden. Diese zeigten eine unterschiedliche Komposition von Mutationen, die zuvor im Zusammenhang mit einer Ribavirin-Resistenz beschrieben wurden.

Ausgelöst durch WNV-Nachweise in der retrospektiven Kohorte wurde ein weiteres Ziel dieser Dissertation definiert: Die Untersuchung der Rolle des WNV bei Berliner Enzephalitis-Fällen. Nach dem Auftreten erster WNV-Fälle bei Vögeln in Deutschland war es wichtig zu verstehen, ob es sich bei humanen Fällen um reiseassoziierte oder lokal erworbene Infektionen handelt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strategien für die Vollgenomsequenzierung entwickelt. In dieser Dissertation wurden insgesamt 13 menschliche WNV-Fälle untersucht. Eine phylogenetische Studie zeigte eine enge Verwandtschaft zwischen den WNV-Sequenzen von Menschen, Vögeln sowie Stechmücken. Dies deutet darauf hin, dass sich in Berlin eine isolierte und stabile WNV-Population etabliert hat. Die serologische Untersuchung von 105 Freiwilligen aus einer Kleingartenkolonie führte zur Entdeckung einer weiteren möglichen WNV-Infektion. Da WNV nur in etwa 1% der Fälle neurologische Symptome hervorruft, ist auf Grundlage unserer Nachweise im Liquor davon auszugehen, dass es eine hohe Zahl nicht diagnostizierter Infektionen in Berlin gibt.

Ausgelöst durch den häufigen Nachweis von HPgV im Liquor stellte sich die Frage nach deren Bedeutung als Auslöser einer Enzephalitis. Humane Pegiviren wurden bisher nicht mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht. Sie wurden aber in den letzten Jahren vereinzelt in Liquorproben von Enzephalitis-Patienten nachgewiesen. Analysen der Virusdiversität zeigten das Vorhandensein von Viruspopulationen in verschiedenen Kompartimenten und somit eine unabhängige Replikation im ZNS. Intensive Untersuchungen zeigten einen anhaltenden Nachweis von HPgV-RNA im Serum und Liquor über teilweise mehr als einem Jahr und führten zur Klassifizierung des Bildes einer HPgV-Enzephalitis.

Die Sensitivität der etablierten Hochdurchsatz-Sequenziermethode ist fast mit der einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion vergleichbar. Aufgrund der zeitnahen Ergebnisse des nicht-zielgerichteten Arbeitsablaufs könnte der Einsatz dieser Methodik die Diagnostik in Zukunft erheblich erleichtern und weitere Daten zum Tropismus verschiedener Erreger bereitstellen. Eine verbleibende Herausforderung bleibt aber die Frage der Qualitätssicherung einer solchen breiten Diagnostik. Es stellt sich besonders die Frage nach der klinischen Signifikanz bei der Detektion einzelner Viren.

Abstract

Encephalitis is an inflammation of the brain parenchyma. Every year, around 1.5-20 per 100,000 inhabitants are admitted to hospital due to encephalitis. In most cases, no causative agent can be identified. A broad range of pathogens can cause acute encephalitis, including over 100 viruses. The large number and variety of possible pathogens complicates the identification of the causative agent. Routine diagnostics therefore usually concentrate on the most common pathogens and may be extended iteratively if the initial tests do not detect a pathogen. The (re-)emergence of new and rare viruses is likely to continue to increase due to factors such as climate change, deforestation, globalization and urbanization. This has been dramatically demonstrated in recent years by Zika virus outbreaks in Latin America, the emergence of autochthonous West Nile virus (WNV) infections in Germany, and the COVID-19 pandemic. It is therefore important to establish a broad diagnostic tool for rapid and reliable parallel detection and identification of viruses in a diverse range of patient sample material. This must be applicable to common pathogens, to those that are rare or unusual, such as those associated with travel, and have the potential to detect previously unknown viruses.

The initial aim of this work was therefore to develop a high-throughput sequencing (HTS) method requiring the shortest possible time from sample collection to pathogen identification. This is of crucial importance for rapid diagnosis and treatment, and therefore patient survival. With the established workflow, results can be reported within three days of sample arrival. In addition to the considerable challenges of differentiating between viral findings of clinical relevance and those without causal significance for encephalitis, identification of contamination is a critical factor.

The method was used for retrospective examination of 1676 cerebrospinal fluid (CSF) samples from encephalitis/meningitis cases of unknown cause. Previously known infections were detected in the examined individuals, as well as numerous other previously undiscovered pathogens, including a human cosavirus in a child with acute flaccid paralysis and a Dobrava-Belgrade hantavirus in the CSF of a patient. Particularly noteworthy are the multiple detections of hepatitis E virus (HEV) in the central nervous system (CNS), previously unknown WNV infections, and frequent detection of human pegiviruses (HPgV). The establishment of methods for full genome sequencing and the multiple detection of HEV and HPgV in CNS samples enabled an in-depth investigation of these pathogens. For example, investigation of the viral diversity in a chronic HEV infection with neurological symptoms, identified distinct viral populations in different compartments. These showed a composition of mutations previously described in connection with ribavirin resistance.

Following the detection of WNV in the retrospective cohort, a further objective of this dissertation was defined: To investigate the role of WNV in Berlin encephalitis cases. After the detection of the first WNV cases in birds in Germany, it was important to understand whether human cases were travel-associated or locally acquired infections. For this purpose, different strategies for whole genome sequencing were developed. Thirteen human WNV cases were investigated in this dissertation. A phylogenetic study showed that a stable WNV population has been established

in Berlin. The serological examination of 105 volunteers from an allotment garden colony led to the discovery of an additional possible WNV infection. Our detection of WNV in CSF and the fact that the virus causes neurological symptoms in only ~1% of cases together imply that there are a high number of undiagnosed WNV infections in Berlin.

The frequent detection of HPgV in CSF raised the question of its significance as a cause of encephalitis. Human pegiviruses have not previously been associated with any disease in humans. However, in recent years they have occasionally been detected in CSF samples from encephalitis patients. Analyses of virus diversity showed the presence of distinct virus populations in different compartments and thus independent replication in the CNS. Intensive investigations showed persistent detection of HPgV RNA in serum and CSF for periods exceeding a year, leading to the classification of HPgV encephalitis.

The sensitivity of the established HTS workflow is almost comparable to that of a quantitative polymerase chain reaction. Due to the rapid results from the non-targeted workflow, the use of this method could considerably facilitate diagnostics in the future and provide further data on the tropism of various pathogens. One remaining challenge is the question of quality assurance for such broad diagnostics. The question of the clinical significance of the detection of individual viruses is a particular challenge.

1. Einleitung

1.1. Enzephalitis

Eine Enzephalitis ist eine Entzündung des Gehirns. Dabei werden verschiedene Formen anhand der beteiligten Hirnregionen bzw. des beteiligten Hirngewebes unterschieden. Charakteristisch ist eine Kombination von Symptomen: Fieber, Kopfschmerzen, Wesensveränderungen sowie Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma. Häufig, aber nicht obligatorisch, zeigen sich neurologische Herdsymptome wie Paresen, Sprachstörungen, sowie epileptische Anfälle. Schätzungsweise 1,5-20/100.000 Menschen sind jährlich von diesem Krankheitsbild betroffen¹⁻⁶. Häufige Ursachen von Enzephalitiden sind Infektionen mit Viren, Bakterien oder Pilzen^{7,8}. Mehr als 100 verschiedene Viren sind dafür bekannt, oder stehen im Verdacht, eine Enzephalitis verursachen zu können (Tabelle A1). Bei einem Drittel der Fälle von akuter Enzephalitis wird eine immunvermittelte Pathogenese angenommen. Diese erfolgt oft mit zeitlicher Verzögerung nach einer Virusinfektion^{9,10}. Zur Diagnostik dienen zunächst bildgebende Verfahren sowie eine Lumbalpunktion zur Gewinnung von Liquor. Zellzahl, Zellart, Glukose- und Laktatgehalt sowie die Farbe/Trübung des Liquores können Hinweise auf den Ursprung der Enzephalitis geben. Darauf folgende molekularbiologische und serologische Untersuchungen beinhalten die Testung auf die häufigsten Enzephalitis-Erreger (Abbildung 1)¹¹.

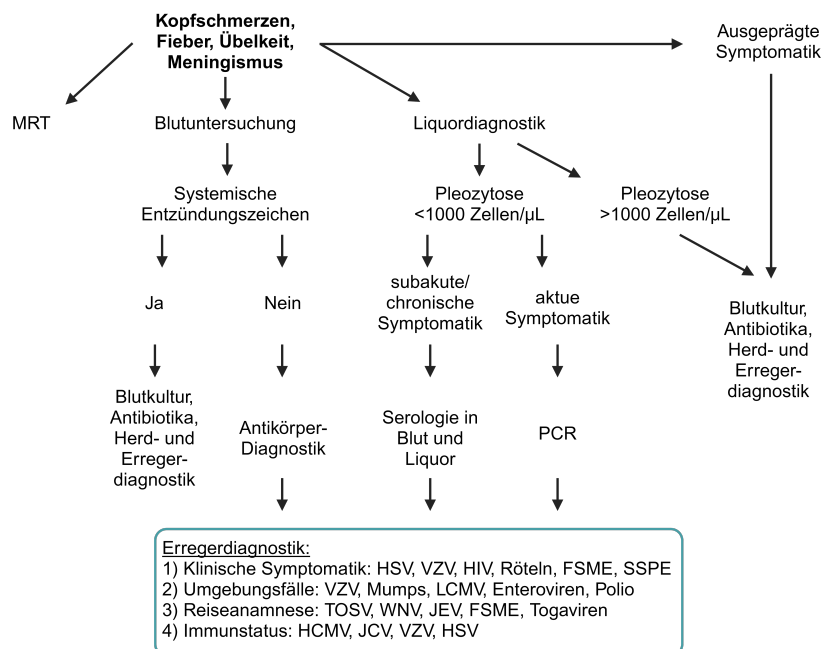


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Diagnostik entzündlicher ZNS-Erkrankungen. Darstellung entsprechend der Leitlinie für die virale Meningoenzephalitis¹¹, modifiziert. FSME, Frühsommer-Meningoenzephalitis; HCMV, Humanes Zytomegalievirus; HIV, Humanes Immundefizienz-Virus; HSV, Herpes-simplex-Virus; JCV, JC-Polyomavirus; JEV, Japanische Enzephalitis-Virus; LCMV, Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus; MRT, Magnetresonanztomographie; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; SSPE, subakute sklerosierende Panenzephalitis; TOSV, Toskana-Virus; WNV, West-Nil-Virus; VZV, Varizella-Zoster-Virus. Erstellt mit BioRender.com.

Der Goldstandard für den Beweis einer akuten Virusinfektion ist der Nachweis viraler Nukleinsäure durch einen spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Test. Grundvoraussetzung für diese zielgerichtete Methode ist ein Verdacht auf einen spezifischen Erreger, da mittels PCR-Testung nur bekannte Viren nachgewiesen werden können. Ein konkreter Verdacht kann sich beispielsweise durch erregerspezifische Symptome oder Aufenthalt in gewissen Regionen der Welt ergeben^{11,12}. Erschwert wird die Nukleinsäure-basierte Diagnostik grundsätzlich dadurch, dass zahlreiche Erreger nur in geringen Mengen, gar nicht und/oder nur kurz im Liquor nachweisbar sind. So werden das Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus (FSME), Zika-Virus oder Herpesviren nur selten und kurz im Liquor detektiert^{13–15}. Tollwutviren können in manchen Fällen nur im (Hirn-)Gewebe und nicht im Liquor nachgewiesen werden¹⁶. Für manche Viren, wie das JC-Polyomavirus, sind besonders sensitive PCR-Tests notwendig, da nur wenig Virus-Ribonukleinsäure (RNA) im Liquor vorkommt^{17,18}.

Zur Diagnostik werden kommerzielle Kits verwendet, die die häufigsten Meningitis- und Enzephalitis-Erreger abdecken. Das BIOFIRE®FILMARRAY® Meningitis/Enzephalitis (ME/E)-Panel der Firma Biomérieux, welches aktuell in der Routinediagnostik der Charité eingesetzt wird, testet parallel auf 14 häufige Enzephalitis-Erreger^{19,20}. Diese sind: Humanes Zytomegalievirus (HCMV), Enterovirus, Herpes-simplex-Virus (HSV)-1, HSV-2, Humanes Herpesvirus (HHV) 6, Humanes Parechovirus, Varizella-Zoster-Virus (VZV), *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans/gattii*. Ergebnisse können innerhalb einer Stunde ab Probeneingang vorliegen. Trotz umfassender diagnostischer Maßnahmen kann in der Mehrzahl der Enzephalitis-Fälle die Ursache nicht festgestellt werden^{6,21–23}. Dabei ist eine zeitnahe Diagnose oft Voraussetzung für eine adäquate Therapie, da unterschiedliche Ursachen teils konträre Maßnahmen nach sich ziehen. So bedarf eine Autoimmunenzephalitis einer Immunsuppression, wohingegen diese bei einer viralen Enzephalitis von Nachteil sein kann⁷. Therapeutisch wird mitunter bei Verdacht auf virale Enzephalitis sofort Aciclovir verabreicht, um eine häufige und therapierbare Ursache zu behandeln, die HSV/VZV-Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS)^{11,24}. Leider gibt es bisher für viele andere virale Enzephalitis-Erreger keine spezifische medikamentöse Therapie²⁴.

1.2. Virale Enzephalitis-Erreger

Mehr als 100 verschiedene Viren können eine virale Enzephalitis auslösen, oder stehen im Verdacht, dies zu können (Tabelle A1). Zwar ist für viele Pathogene noch immer unklar, wie sie in das ZNS einwandern, jedoch werden die folgenden Mechanismen unterschieden:

- I. Passive Diffusion der Viren zwischen den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins ZNS²⁸,
- II. Aktive Infektion von Endothelzellen der BHS und Virusfreisetzung an der basolateralen Membran^{29,30},
- III. Transzytose durch Endothelzellen der BHS in endosomalen Vesikeln³¹,

- IV. Zell-assoziiertes Transport: Infizierte, im Blut zirkulierende Zellen können zwischen den Endothelzellen hindurch ins ZNS einwandern³²,
- V. Infektion von Dendriten der olfaktorischen Rezeptor-Neuronen im Nasen-Epithel, die sich bis zum Bulbus olfactorius im ZNS erstrecken³³,
- VI. Infektion von peripheren Nerven und retrograder Transport ins ZNS³⁴.

Es wurde gezeigt, dass der Immunstatus des Patienten einen Einfluss auf die Pathogenese hat^{35,36}. Auch das Alter scheint eine Rolle zu spielen. So verursacht das WNV eher bei Älteren neurologische Symptome, während das La-Crosse-Virus eher bei Kindern zu Symptomen führt³⁷⁻⁴⁰. Für einige Enzephalitis-verursachende Erreger, besonders für Arboviren (zum Beispiel FSME, WNV und Toskana-Virus (TOSV)), die auf Vektoren zur Übertragung angewiesen sind, werden regionale und saisonale Unterschiede verzeichnet^{5,6}. Im Folgenden werden die häufigsten viralen Enzephalitis-Erreger sowie Erreger, auf die in dieser Arbeit näher eingegangen wird, kurz vorgestellt.

1.2.1. Häufige Enzephalitis-Erreger

1.2.1.1. Herpesviren

Die Familie der *Orthoherpesviridae* wird in die Subfamilien *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* sowie *Gammaherpesvirinae* untergliedert. Diese beinhalten acht humane Herpesviren (Tabelle 1). Vertreter der *Orthoherpesviridae* haben ein lineares doppelsträngiges (ds) Desoxyribonukleinsäure (DNA) Genom mit einer Länge von 125-241 Kilobasenpaaren (kbp)⁴¹.

Tabelle 1. Übersicht der humanpathogenen Herpesviren.

Subfamilie	Genus	Virus
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	<i>Humanes Alphaherpesvirus 1</i> , HSV-1
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	<i>Humanes Alphaherpesvirus 2</i> , HSV-2
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	<i>Humanes Alphaherpesvirus 3</i> , VZV
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Humanes Betaherpesvirus 5</i> , HCMV
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	<i>Humanes Betaherpesvirus 6A</i> , HHV-6A
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	<i>Humanes Betaherpesvirus 6B</i> , HHV-6B
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	<i>Humanes Betaherpesvirus 7</i> , HHV-7
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Humanes Gammaherpesvirus 4</i> , Epstein-Barr-Virus (EBV)

HSV-1 und -2 sind weltweit verbreitet. Sie werden durch Speichel, Genitalsekrete sowie Schmierinfektionen übertragen⁴². Die Infektion durch HSV-1 erfolgt häufig bereits im Kindesalter, durch HSV-2 später sexuell^{43,44}. In Deutschland erreicht die HSV-1 Seroprävalenz bei Erwachsenen rund 90%⁴⁵. Die Erstinfektion erfolgt oftmals symptomlos oder als unspezifische,

fieberhafte Erkrankung. HSV-1 verursacht typischerweise Läsionen oberhalb, HSV-2 unterhalb der Gürtellinie⁴⁶.

VZV ist ein hochansteckendes, weltweit verbreitetes Herpesvirus. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich aerogen im Kindesalter und kann zum klinischen Bild der Windpocken führen⁴⁷. Die HCMV-Primärinfektion ist bei Immunkompetenten meist symptomlos oder ggf. gezeichnet durch ein mehrwöchiges hohes Fieber. Bei Neugeborenen und Immunsupprimierten kann HCMV jedoch schwerste Erkrankungen und Komplikationen verursachen⁴⁸. HHV-6B und HHV-7 verursachen das Dreitagefieber (*Exanthema subitum*). Die Infektion erfolgt zumeist im Kindesalter durch einen Speichel-Schleimhaut-Kontakt^{49,50}. Die EBV-Infektion erfolgt ebenfalls häufig im Kindesalter und ist ursächlich für die infektiöse Mononukleose⁵¹. Es kann jedoch auch Nasopharynxkarzinome sowie das Burkitt-Lymphom verursachen⁴⁶.

Die HHV können nach Primärinfektion in ein Latenzstadium übergehen und später reaktivieren⁵². HSV-1, -2, EBV sowie VZV gehören zu den häufigsten Ursachen einer viralen Enzephalitis. Weltweit ist das HSV-1 der häufigste Enzephalitis-Erreger^{5,53-55}. Unbehandelt beträgt die Letalität einer HSV-Enzephalitis bis zu 70%⁵⁶. Daher wird bei Verdacht auf eine HSV-Enzephalitis unverzüglich mit der Gabe von Aciclovir begonnen¹¹. Selbst bei frühzeitiger Diagnose und Therapiebeginn sterben bis zu 30% der Patienten⁵⁶.

1.2.1.2. Picornaviren

Die Familie der *Picornaviridae* wird in 63 Genera unterteilt. Im Genus *Enterovirus* werden über 300 Virustypen unterschieden. Das einzelsträngige (ss) RNA-Genom positiver Orientierung (+) hat eine Länge von ungefähr 7,3 Kilobasen (kb) und kodiert einen offenen Leserahmen (ORF)⁵⁷. Aufgrund der hohen Sequenzdiversität unterscheidet das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) die Spezies *Enterovirus A-L*, wobei nur die Enteroviren A-D den Menschen infizieren⁵⁷. Die Übertragung verläuft überwiegend fäkal-oral, seltener respiratorisch oder über in-/direkten Kontakt^{58,59}. Das Virus wird im Stuhl über mehrere Monate ausgeschieden⁶⁰. Infektionen verlaufen häufig symptomlos oder werden von Erkältungs- und Magen-Darm-Symptomen begleitet^{61,62}. Enteroviren sind in der Lage, das ZNS zu infizieren. Sie verursachen eine Reihe neurologischer Störungen, unter anderem Enzephalitis, Meningitis und akute, schlaffe Lähmung⁶³. Zu den häufigsten neurotrophen Enteroviren gehört das Poliovirus (vor den Impfkampagnen), Enterovirus A71, Coxsackievirus A6 und A16, Echovirus 6/7/11/13 sowie Enterovirus D68⁶³. Zusammen mit den Herpesviren gehören Enteroviren zu den häufigsten viralen Enzephalitis-Erregern⁵⁵.

Im Genus *Cosavirus* (CoSV) werden fünf Spezies (CoSV-A, -B, -D, -E, -F) unterschieden. Die formale Benennung der Spezies C steht aufgrund unvollständiger Sequenzverfügbarkeit noch aus⁶⁴. Humane Cosaviren (HCoSV) wurden erstmals 2003 bei Patienten mit akuter, schlaffer Lähmung identifiziert⁶⁵. Abwasser-Untersuchungen weisen auf eine weite Verbreitung in verschiedenen Teilen der Welt hin. Die humanpathogene Rolle dieser Viren ist noch unklar. In zahlreichen Studien wurden HCoSV bei symptomatischen und asymptomatischen Personen nachgewiesen⁶⁵⁻⁷⁸. Zuletzt wurden HCoSV auch im Liquor von Enzephalitis-Patienten

nachgewiesen⁷⁹. Menschen und Schweine sind die bisher einzigen bekannten Wirte dieser Viren^{80,81}.

1.2.1.3. Arboviren

Auch von Arthropoden übertragene Viren, sogenannte Arboviren, können Enzephalitis auslösen⁸². Das FSME Virus gehört zum Genus *Orthoflavivirus* innerhalb der Familie *Flaviviridae*⁸³. Das von Zecken der Gattung *Ixodes* spp. übertragene Virus ist in nahezu ganz Europa und weiten Teilen Asiens verbreitet⁸⁴. Im Menschen kann es zu schwersten neurologischen Erkrankungen führen⁸⁵. Das FSME Virus gehört zu den häufigsten arboviralen Ursachen einer Enzephalitis in Europa⁸⁶. Jährlich werden 10.000-12.000 Infektionen gemeldet. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation liegt die Dunkelziffer deutlich höher⁸⁷. In Deutschland wurden 2021-2023 je 424, 565 und 474 Infektionen gemeldet (<https://survstat.rki.de>, abgefragt am 13.02.2024). Eine Impfung ist möglich und wird von der Ständigen Impfkommission insbesondere für Personen empfohlen, die sich in FSME-Gebieten aufhalten oder dort leben und von Zecken gebissen werden könnten⁸⁸.

Das TOSV (*Phlebovirus toscanaense*) gehört zur Gattung *Phlebovirus* innerhalb der Familie der *Phenuiviridae*. Das ssRNA-Genom negativer Orientierung (-) ist in drei Segmente aufgeteilt⁸⁹. Das Virus wird durch Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* spp. übertragen. Das Vorkommen des Virus ist von der Verbreitung seiner Vektoren abhängig. TOSV wurde in zahlreichen Ländern des Mittelmeerraumes nachgewiesen⁹⁰⁻⁹⁶. In Nordafrika wurden bei bis zu 33% der Bevölkerung neutralisierende Antikörper gegen TOSV nachgewiesen. In Kroatien wurden bei bis zu 54% der Untersuchten Immunglobulin (Ig) G-Antikörper detektiert, deutlich mehr als in der Bevölkerung Südwesteuropas^{97,98}. Im Mittelmeerraum gehört TOSV zu den häufigsten Enzephalitis-Erregern, insbesondere in den Sommermonaten^{99,100}. Die hohe Seroprävalenz in Verbindung mit der geringen Zahl der nachgewiesenen Infektionen lässt vermuten, dass asymptomatische oder milde Verläufe regelmäßig auftreten¹⁰¹. Eine 2015-2018 in Deutschland durchgeführte Studie identifizierte keine TOSV-positiven Sandmücken in Süddeutschland¹⁰². Eine retrospektive Untersuchung von Meningoenzephalitis-Patienten in Südwestdeutschland identifizierte mutmaßliche TOSV-Infektionen. Da die Patienten keine kürzliche Reise in ein endemisches Gebiet angaben, bleibt ungeklärt, ob es sich bei diesen Fällen um eine lokale Infektion handelte¹⁰³.

1.2.2. Seltene und neuartige Enzephalitis-Erreger

1.2.2.1. Hepatitis-E-Virus

Das humane Hepatitis-E-Virus (HEV), Spezies *Paslahepevirus balayani*, gehört innerhalb der Familie *Hepeviridae* zum Genus *Paslahepevirus*¹⁰⁴. Es werden acht Genotypen unterschieden¹⁰⁵. Die Genotypen 1 und 2 wurden ausschließlich im Menschen gefunden. Die Genotypen 3 bis 6 infizieren vor allem Schweine und Wildschweine, wobei es bei Genotypen 3 und 4 sporadisch zu zoonotischen Infektionen des Menschen kommt^{106,107}. Genotyp 3 kann darüber hinaus ein breites Spektrum von Säugetieren infizieren, darunter Kaninchen und Rotwild^{108,109}. Die Genotypen 7

und 8 wurden bei Dromedaren bzw. baktrischen Kamelen nachgewiesen^{110,111}. Das HEV-Genom besteht aus einer (+)ssRNA mit einer ungefähren Länge von 7,2 kb. Das 5'-Ende weist eine Cap-Struktur auf, gefolgt von einer kurzen, untranslatierten Region (UTR) und drei sich überlappenden ORFs. ORF 1 kodiert Nichtstrukturproteine (NS). Diese fungieren als Methyltransferase, Guanylyltransferase, Protease, Helikase und RNA-abhängige RNA-Polymerase¹⁰⁴. ORF 1 ist aufgrund von Insertionen oder Deletionen innerhalb einer hypervariablen Region (HVR) von unterschiedlicher Länge^{112,113}.

ORF 2 kodiert für das hochkonservierte Kapsidprotein, gegen das neutralisierende Antikörper gebildet werden¹¹⁴. ORF 3 kodiert für ein multifunktionales Protein, VP13, das auf der Oberfläche von umhüllten Viruspartikeln exprimiert wird. Obwohl HEV-Viruspartikel nicht umhüllt sind, können im Blut zirkulierende Viruspartikel eine von der Wirtszelle abgeleitete Hülle haben¹¹⁵. Jährlich infiziert HEV etwa 20 Millionen Menschen, von denen ~3 Millionen erkranken und ~56.000 sterben¹⁰⁴. Die Genotypen 1 und 2 werden fäkal-oral durch die Aufnahme von kontaminiertem Wasser übertragen. Die Genotypen 3 und 4 werden durch den Verzehr von kontaminierten oder rohen Fleischprodukten sowie durch den direkten Kontakt zu infizierten Tieren übertragen. Eine Übertragung durch Blutprodukte ist möglich¹¹⁶. In Europa ist Genotyp 3 der am häufigsten vorkommende Genotyp. Er wird mit mildereren Verläufen in Verbindung gebracht als die Genotypen 1 und 2, die in Asien/Nordamerika bzw. Mittelamerika/Zentralafrika zirkulieren. Genotyp 3 wird in die Subtypen 3a - 3m unterteilt¹⁰⁵. Schwerere Infektionsverläufe werden bei den Subtypen 3e, 3f und 3g beobachtet¹¹⁷. Die HEV-Infektion äußert sich nach einer Inkubationszeit von zwei bis sieben Wochen durch grippeähnliche Symptome wie Fieber, Erbrechen, Kopfschmerzen sowie erhöhte Leberenzymwerte. Zudem sind zahlreiche extrahepatische Manifestationen bekannt, darunter Guillain-Barre-Syndrom, Enzephalitis, Meningitis und Myelitis¹¹⁸⁻¹²¹. In der Regel ist die Infektion selbstlimitierend. Chronisch persistierende Infektionen werden bei immunsupprimierten oder lebertransplantierten Patienten beobachtet und können zur Hepatitis sowie Leberzirrhose führen¹²². Therapeutisch kann der Einsatz von Ribavirin oder pegyliertem Interferon alpha sowie die Reduzierung von Immunsuppressiva erwogen werden. Zahlreiche Mutationen werden jedoch mit dem Versagen der Ribavirin-Behandlung in Verbindung gebracht^{123,124}.

1.2.2.2. West-Nil-Virus

Das WNV (*Orthoflavivirus nilense*) gehört zum Genus *Orthoflavivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae*⁸³. Das (+)ssRNA-Genom mit einer Länge von ~11 kb kodiert einen ORF. Dieser kodiert ein Polyprotein und wird an beiden Enden von UTRs flankiert⁸³.

Das Virus befällt eine Vielzahl von Wirbeltieren. Es zirkuliert in ornithophilen Stechmücken der Gattung *Culex* spp. als Hauptvektor¹²⁵. Vögel dienen als Amplifikationswirte¹²⁶. Eine Übertragung auf Pferde und Menschen, die als Fehlwirte agieren, erfolgt nur selten. Menschen infizieren sich hauptsächlich durch den Stich infizierter Mücken, seltener durch virushaltige Blutprodukte oder den direkten Kontakt zu infizierten Tieren¹²⁷.

Das Virus wurde erstmals 1937 in Uganda in einem Patienten mit Fieber beschrieben¹²⁸. Seitdem

konnte es weltweit nachgewiesen werden¹²⁹. Mehrere WNV-Linien werden unterschieden, die eine charakteristische geographische Verbreitung zeigen¹³⁰. Nach der Einschleppung in die USA im Jahr 1999, hat sich das Virus in nur drei Jahren von der Ost- zur Westküste verbreitet¹³¹. Heute ist es dort einer der häufigsten Enzephalitis-Erreger¹³². Auch in Europa verursachte das WNV in den letzten Jahren vermehrt größere Ausbrüche. Diese wurden durch WNV-Linie 1 und insbesondere Linie 2 verursacht. Das Europäische Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten meldete 2018 insgesamt 2083 humane WNV-Infektionen im Mittelmeerraum^{133–135}. Im selben Jahr wurde WNV erstmals in 12 Vögeln und zwei Pferden in Deutschland detektiert. Ein Jahr später wurde es bereits in 76 Vögeln, 36 Pferden und mehreren Stechmücken nachgewiesen. Im Jahr 2018 infizierte sich ein Veterinärpathologe beim Sezieren von Vögeln aus einem Wildpark in Süddeutschland. Im folgenden Jahr kam es zur ersten autochthonen humanen WNV-Infektion eines Menschen durch eine deutsche Stechmücke^{136–138}. Insbesondere im östlichen Teil Deutschlands werden WNV-Infektionen detektiert (Abbildung 2,¹³⁹).

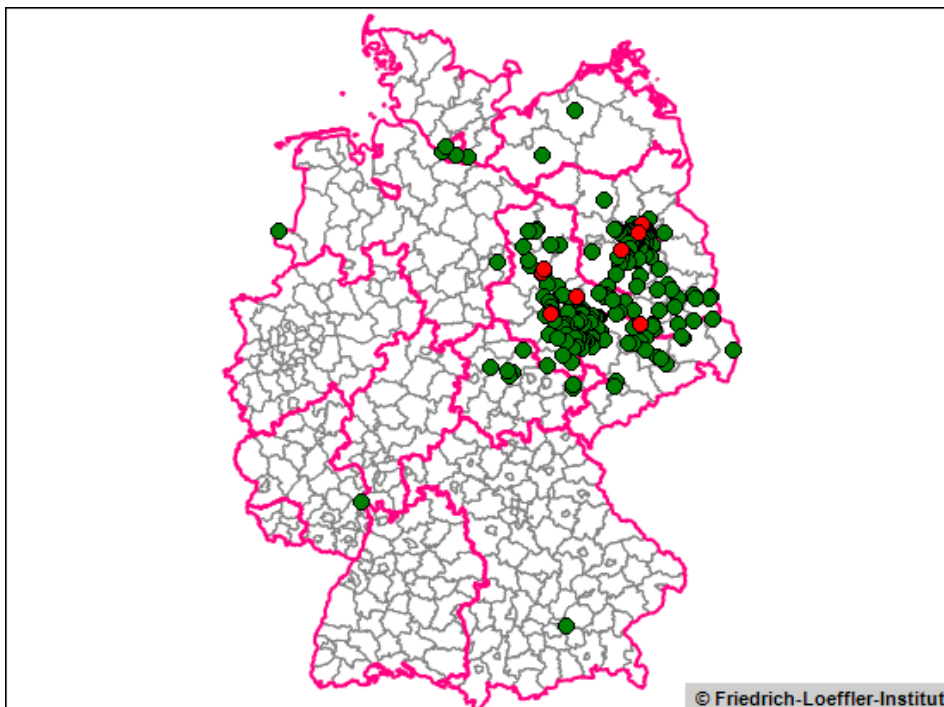


Abbildung 2. Detektion von WNV in Vögeln und Pferden in den Jahren 2018-2023 in Deutschland. Erstellt mittels Tierseuchen-Informationssystem (<https://tsis.fli.de>, Datenabruf: 01.11.2023). Punkte stellen aktive (rot) und bereits aufgehobene (grün) WNV-Fälle dar.

Humane WNV-Infektionen verlaufen in ~80% der Fälle asymptomatisch. Etwa ~20% entwickeln milde Symptome, inklusive Kopf-, Gelenk- und Gliederschmerzen oder Hautausschlag. Schwere Erkrankungen, die sich als neuroinvasive Erkrankungen manifestieren, sind selten (<1%)^{140,141}. Das Robert Koch-Institut empfiehlt WNV-Tests bei Patienten, die aus WNV-Endemiegebieten zurückkehren und bei denen eine Enzephalitis unklarer Genese vorliegt, sowie bei gehäuften Fieberfällen unbekannter Genese. Routinetests bei Verdacht auf Enzephalitis inkludieren WNV nicht. Eine WNV-Testung erfolgt nur nach spezifischer Anfrage der behandelnden Ärzte¹⁴².

Um Infektionen durch virushaltige Blutspenden zu verhindern, empfiehlt das Paul-Ehrlich-Institut, Blutspenden zwischen dem 1. Juni und dem 30. November zu untersuchen. Dies betrifft Blutspender, nachdem sie mindestens zwei aufeinanderfolgende Tage lang ein WNV-endemisches Gebiet besucht haben¹⁴³. WNV-Infektionen werden in Deutschland wahrscheinlich unterdiagnostiziert, da es keine Routinetestung auf dieses Virus gibt und die meisten Infektionen symptomfrei verlaufen. Es fehlen großflächige Seroprävalenz-Studien, um das Ausmaß humaner WNV-Infektionen zu erfassen.

1.2.2.3. Pegivirus

Pegiviren (PgV) gehören zum Genus *Pegivirus* innerhalb der Familie *Flaviviridae*. Ihr Genom besteht aus einer (+)ssRNA mit einer Länge von 8.9-11.3 kb und kodiert für einen ORF. Seit ihrer Erstbeschreibung in 1995¹⁴⁴ wurden diese Viren in einer Vielzahl von Säugetieren beschrieben¹⁴⁵⁻¹⁵³. Zwei humane Pegiviren (HPgV) werden unterschieden: *Pegivirus hominis* (Human Pegivirus, HPgV-1) und *Pegivirus columbianse* (Human Hepegivirus, auch Human Pegivirus 2, HPgV-2). Für HPgV-1 werden sieben Genotypen unterschieden. HPgV-1 ist weltweit verbreitet, jedoch gibt es regionale Unterschiede¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. So überwiegt Genotyp 2 in Nordamerika und Europa¹⁵⁸.

Die HPgV-1-Übertragung erfolgt parenteral, sexuell und vertikal¹⁵⁹⁻¹⁶¹. In Industriestaaten werden diese Viren in 1-5% aller Blutspenden nachgewiesen. Antikörper gegen das E2 Glykoprotein sind in bis zu 13% der Blutspenden detektierbar. In Entwicklungsländern sind bis zu 20% der untersuchten Personen virämisch. Bei etwa 25% der Infizierten ist HPgV-1 auch noch nach zwei Jahren nachweisbar^{162,163}. Im Menschen sind diese Viren mit keinem spezifischen Krankheitsbild assoziiert. Jedoch werden HPgV vermehrt in Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten detektiert¹⁶⁴. Blutspenden werden aufgrund der fehlenden Pathogenität nicht auf HPgV-RNA getestet, sodass virämische Personen nicht von der Blutspende ausgeschlossen werden¹⁶⁵. In den letzten Jahren gab es vereinzelte Nachweise von HPgV-1 im Liquor und im Gehirn. Diese basieren hauptsächlich auf der Verwendung der Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS)¹⁶⁶⁻¹⁷². Bukowska-Oko et al. gelang es, die ersten Hinweise auf eine Kompartimentierung dieser Viren und die damit verbundene Möglichkeit einer unabhängigen Replikation im ZNS zu präsentieren¹⁶⁷.

Der Zelltropismus ist noch nicht vollständig geklärt und wird durch fehlende Tier- und Zellkulturmodelle erschwert. Studien zeigten eine hohe Viruslast in zirkulierenden Lymphozyten, einschließlich T- und B-Lymphozyten. Autopsie-Berichte legen eine primäre Replikation in der Milz und dem Knochenmark nahe¹⁷³⁻¹⁷⁵.

Das 2015 erstmals beschriebene HPgV-2 infiziert periphere, mononukleäre Blutzellen, insbesondere B-Lymphozyten¹⁷⁶. Bisher wurde dieses Virus nicht im ZNS nachgewiesen.

1.3. Hochdurchsatz-Sequenzierung

Nach der Beschreibung der DNA im Jahr 1953 dauerte es noch weitere 50 Jahre bis zur Entschlüsselung des ersten humanen Genoms. Im Rahmen des Humangenomprojektes kostete dies etwa 300 Millionen \$^{177,178}. Durch die Weiterentwicklung der HTS liegen die Kosten heute bei lediglich 1000 \$ je humanem Genom^{179,180}. Über die Jahre wurden zahlreiche Sequenzier-Methoden (und -Plattformen) entwickelt, einschließlich: *Sequencing-by-ligation* (SOLiD), *Sequencing-by-synthesis* (Illumina, Qiagen, Roche 454, Ion Torrent) und *Single-molecule long-read sequencing* (PacBio, Oxford Nanopore)¹⁸¹. HTS ermöglicht die parallele, ungerichtete Sequenzierung und führte in den letzten Jahren zur Entdeckung zahlreicher Pathogene^{182,183}. Im Folgenden werden zwei Sequenzier-Plattformen genauer betrachtet.

1.3.1. Illumina

Seit der Gründung 1998 entwickelte Illumina zahlreiche Sequenziergeräte mit unterschiedlichen Spezifikationen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Spezifikationen ausgewählter Illumina Sequenziergeräte.

	MiniSeq	MiSeq	NextSeq 500/550	NextSeq 1000/2000	NovaSeq 6000
Max. Cluster [Mio.]	25	25	400	1100	2000
Max. Readlänge [bp]	2x150	2x300	2x150	2x150	2x250
Laufzeit [h]	4-24	4-55	12-30	11-48	13-44
Output [Gigabasen]	7,5	15	120	330	6000

Die Sequenzierung basiert auf der *Sequencing-by-Synthesis*-Technologie. Während der Herstellung der Sequenzier-Bibliotheken werden Adapter an zuvor fragmentierte dsDNA-Moleküle ligiert. Die Adapter sind komplementär zu Oligonukleotiden, die auf der Oberfläche der Illumina-*Flowcell* vorhanden sind, und enthalten einen 8-12 Nukleotid (nt) langen Index. Dieser Index wird benötigt, um die generierten Sequenzen den einzelnen Proben eines Sequenzierlaufes zuzuordnen. Für die *Bridge*-Amplifikation wird zunächst eine denaturierte, einzelsträngige Sequenzier-Bibliothek auf die *Flowcell* gespült. Dabei binden Moleküle der Bibliothek an komplementäre Oligonukleotide, die sich auf der Oberfläche der *Flowcell* befinden. Die Moleküle biegen sich und binden erneut an komplementäre Oligonukleotide. Wiederholte Denaturierungs- und Verlängerungszyklen (ähnlich wie bei der PCR) führen zu einer lokalisierten Amplifikation einzelner Moleküle in klonale Cluster. Anschließend wird der jeweilige *reverse*-Strang entfernt und der Sequenzierprimer bindet an das 3'-Ende des *forward*-Stranges. Die Sequenzierung beginnt. Jeder Cluster erzeugt eine *single-end* Sequenz bzw. zwei *paired-end* Sequenzen^{181,184}.

Für die eigentliche Sequenzierung werden vier fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet. Pro Zyklus wird jedem Sequenzier-Molekül ein einzelnes markiertes Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) hinzugefügt. Die Nukleotidmarkierung dient als reversibler Terminator. Nach dem Einbau des dNTP wird der Fluoreszenzfarbstoff durch Laseranregung und Bildgebung identifiziert. Nach der enzymatischen Spaltung wird der nächste Zyklus initiiert. Die Basen werden direkt aus den Messungen der Signalintensität, während jedes Zyklus, ermittelt^{181,184}.

1.3.2. Oxford Nanopore

Oxford Nanopore Technologies wurde im Jahr 2005 gegründet. Der von der Firma entwickelte, handtellergroße MinION ist seit 2015 kommerziell verfügbar und wird seitdem in vielen Laboren weltweit eingesetzt. Ab 2017 folgten der GridION, der PromethION und der noch leistungsfähigere PromethION48 sowie die Einführung des Flongle-Adapters. Letzterer ermöglicht die Sequenzierung auf einer kostengünstigen, kleinen *Flowcell*-Variante¹⁸⁵. Trotz verbleibender Einschränkungen, zum Beispiel einer stabilen Internetverbindung, ist diese Technik durch ihre direkte Anwendung im Feld einzigartig^{186–189}. Die Oxford Nanopore Sequenzierung überwindet die Limitationen anderer Plattformen und ermöglicht die Sequenzierung von Molekülen mit einer Länge von mehreren Megabasenpaaren¹⁹⁰. Ein weiterer Vorteil ist, dass die erzeugten Sequenzen in Echtzeit zur Verfügung stehen und analysiert werden können¹⁹¹.

Die Vorbereitung von Sequenzierung-Bibliotheken ist sehr variabel und hängt vom Ausgangsmaterial (RNA, DNA, komplementäre DNA, PCR-Produkte) ab und davon, ob eine zusätzliche PCR und/oder Barcoding durchgeführt wird. Für einige Kits wird eine Präparationszeit von nur 10 Minuten (min) angegeben¹⁹². In jedem Fall werden Adapter an den Sequenzier-Molekülen benötigt. Diese interagieren mit Nanoporen, die in die Membran der *Flowcell* eingelassen sind. Durch die Membran fließt ein kontinuierlicher Strom. Ein Motorprotein ermöglicht die Translokation des Sequenzier-Moleküls durch die Nanopore. Dabei kommt es zu einer messbaren Spannungsänderung. Diese ist charakteristisch für die jeweilige Base, sodass die zugrunde liegende Sequenz festgestellt werden kann (Abbildung 3)¹⁹³. Jedoch geht die Nanopore Sequenzierung bis heute mit einer deutlich höheren Fehlerrate einher als die Illumina Sequenzierung^{194,195}.

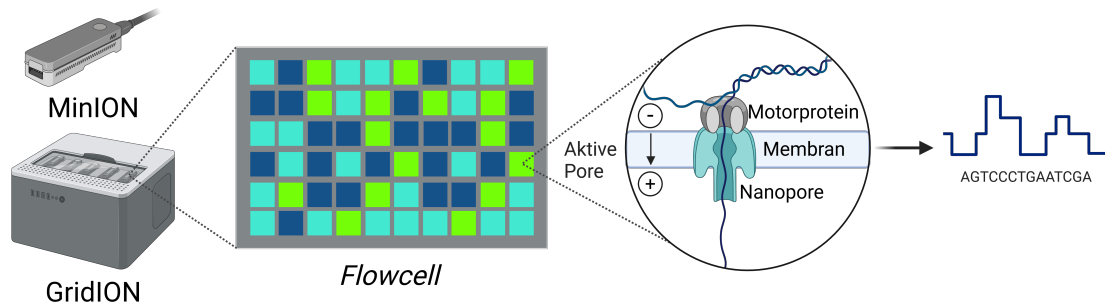


Abbildung 3. Vereinfachte, schematische Darstellung der Oxford Nanopore Sequenzierung. Der handtellergröße, mobile MinION und der GridION ermöglichen die Sequenzierung und Analyse in Echtzeit. In die Membran der *Flowcell* sind Nanoporen eingebettet, durch die kontinuierlich ein Strom fließt. Adapter-ligierte DNA-Moleküle werden mit Hilfe eines Motorproteins durch die Nanopore geführt. Dabei kommt es zu charakteristischen Spannungsänderungen, die dann in eine Basensequenz übersetzt werden. Erstellt mit BioRender.com.

1.3.3. Anreicherung viraler Nukleinsäure

Trotz zahlreicher Vorteile der HTS gibt es eine große Limitation: Die Sensitivität. PCR-basierte Verfahren sind in der Lage, wenige Zielmoleküle (RNA/DNA) auch bei hohen Mengen Hintergrund-RNA/DNA nachzuweisen¹⁹⁶. Die Sensitivität der HTS ist im Allgemeinen niedriger und hängt unter anderem stark vom Probentyp, dem Wirtsgenom-Hintergrund, der Probenqualität, der Vorbereitung der Sequenzier-Bibliothek und der Sequenzier-Tiefe ab. Sie kann durch Anreicherung der viralen Nukleinsäure erhöht werden. Dies ist unter anderem möglich durch^{197,198}:

Virus-unabhängige Methoden

- 1) Filterung, Ultrazentrifugation¹⁹⁹,
- 2) Abreicherung von Wirtsgenom-Hintergrund, z. B. ribosomale RNA (rRNA), Globin Messenger-RNA (mRNA)²⁰⁰,

Virus-abhängige Methoden

- 3) DNA-Verdau für die Sequenzierung von RNA-Viren¹⁹⁹,
- 4) gezielte Amplifizierung des gesamten Genoms oder von Teilbereichen (z. B. Polymerase)²⁰¹,
- 5) Anreicherung durch die Hybridisierung mit *Capture*-Sonden (*Baits*)²⁰².

Die Anreicherung viraler Nukleinsäure mittels *Capture*-Sonden (*Baits*) ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Dafür wird zunächst ein Alignment von Zielsequenzen erstellt. Es werden 80-120 nt lange Oligonukleotide synthetisiert, die diese Sequenzen repräsentieren. Ein *Bait*-Set kann dabei mehrere zehner- oder hunderttausende Sonden umfassen. Deren Produktion kann mehrere Monate benötigen. Um mit Hilfe der *Capture*-Sonden virale Sequenzen anzureichern, werden erstellte Sequenzier-Bibliotheken zunächst denaturiert. Adapter-Blocker binden an einzelsträngige DNA-Moleküle, um die Adapter-Sequenzen für die weitere Bearbeitung

unzugänglich zu machen. Biotinylierte *Baits* binden über mehrere Stunden an die denaturierten Sequenzier-Moleküle. Anschließend werden diese an Streptavidin-gekoppelte Magnetbeads gebunden. Bei einem Waschschrift werden nicht-gebundenen Moleküle verworfen. Die verbleibende Sequenzier-Bibliothek wird amplifiziert und schließlich sequenziert.

Zahlreiche *Capture*-Sets sind bereits für einzelne Pathogene, Genera oder sogar Familien beschrieben^{202–209}. Briese et al. erstellten ~2 Millionen *Baits*, die die Genome von Vertretern von 207 Virustaxa abdecken, von denen bekannt ist, dass sie Wirbeltiere infizieren²¹⁰.

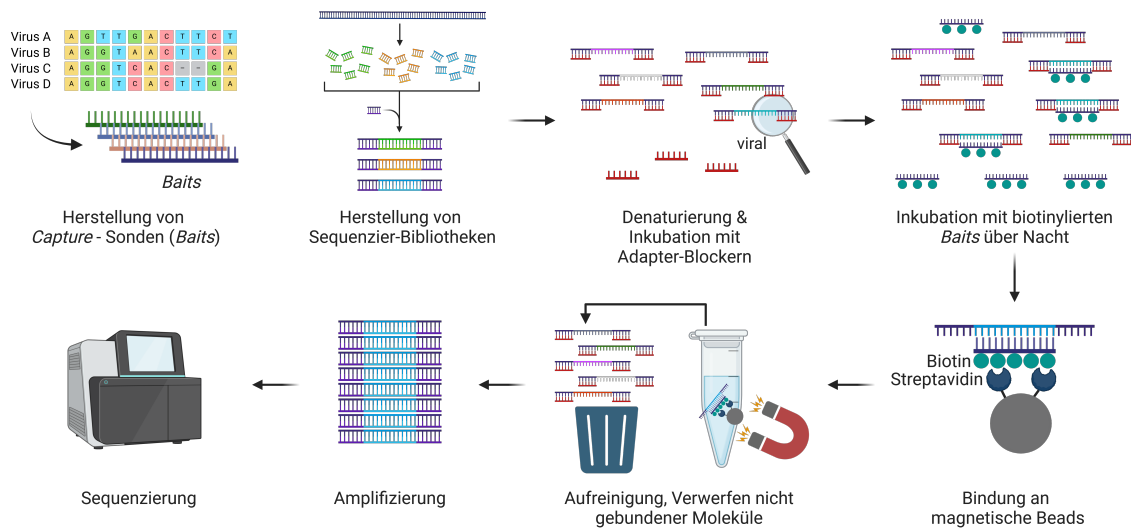


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Anreicherung viraler Nucleinsäure. Aus einem Alignment von Zielsequenzen, die angereichert werden sollen, werden kurze *Baits* erstellt. Nach der Erstellung einer Sequenzier-Bibliothek wird diese zunächst denaturiert. Anschließend werden die Sequenzieradapter durch die Anlagerung kurzer Oligonukleotide blockiert. Während der Hybridisierung binden biotinylierte *Baits* an virale Sequenzen der Sequenzier-Bibliothek. Diese werden dann über magnetische, Streptavidin-gekoppelte Beads gesammelt. Ungebundene Moleküle werden in einem Waschschrift verworfen. Die angereicherten Sequenzen werden nun amplifiziert und sequenziert. Erstellt mit BioRender.com.

2. Zielsetzung dieser Dissertation

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, eine sensitive, nicht-zielgerichtete Sequenzier-Diagnostik für die schnelle und zuverlässige Virus-Identifikation zu etablieren. Diese sollte nicht nur bekannte und häufige, sondern insbesondere unbekannt oder ungewöhnliche z. B. reiseassoziierte Pathogene erkennen. Eine große Herausforderung bestand darin, einen möglichst kurzen Zeitraum von der Probenentnahme bis zur Erreger-Identifikation zu gewährleisten, um eine schnelle Diagnose, Behandlung und somit das Überleben des Patienten zu ermöglichen. Dazu mussten verschiedene Methoden zur Probenaufbereitung sowie Sequenzier-Plattformen evaluiert und weiterentwickelt werden. Ein häufiges Problem bei diagnostischen Proben ist die geringe Viruslast. Um die Vollgenomsequenzierung auch bei geringer Genom-Kopienzahl zu ermöglichen, sollten Anreicherungs-Verfahren etabliert werden.

Als zweites Ziel sollte diese Methodik anschließend in der Routinediagnostik für die Erreger-Identifikation genutzt werden. Die retrospektive Untersuchung von Liquores von Enzephalitis-Patienten ungeklärter Ursache sollte zur Identifizierung neuer relevanter Enzephalitis-Erreger führen. In den letzten Jahren wurden immer mehr Viren als ursächlich für eine Enzephalitis diskutiert. Durch die Sequenzierung ungelöster Fälle sollte das Wissen über mögliche Infektionserreger erweitert werden, um deren Relevanz einzuschätzen. Im weiteren Verlauf und auf Basis der Befunde wurden die folgenden Arbeitsfelder für diese Arbeit definiert:

HEV im ZNS - zeigt entstehende Virusdiversität Therapieversagen an?

Für HEV ist die Replikation im ZNS insbesondere im Hinblick auf Ribavirin-Resistenzen nicht umfassend untersucht. Die etablierte HTS-Methodik inklusive der daraus entstehenden Möglichkeit Virusdiversität innerhalb des Wirtes zu untersuchen, soll genutzt werden, um die Bedeutung des Virus für das ZNS besser zu verstehen. Dies gilt insbesondere mit Blick auf Resistenzen gegen das antivirale Mittel Ribavirin, welches das ZNS Kompartiment in der Regel nicht erreicht.

WNV - ein neuer relevanter Erreger in Berlin, Deutschland?

Das WNV ist ein relevanter Enzephalitis-Erreger im Mittelmeerraum und einer der häufigsten Enzephalitis-Erreger in den USA. 2018 wurde das Virus erstmals in Vögeln in Deutschland nachgewiesen. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche Rolle dieses Virus in Enzephalitis-Fällen in Berlin und im Umland einnimmt.

HPgV-1 - ein neuer Enzephalitis-Erreger?

Bis heute sind HPgV mit keiner humanen Erkrankung assoziiert und ihre Bedeutung als Pathogen ist grundsätzlich unklar. In den letzten Jahren gab es vereinzelte Nachweise von HPgV-1 in Liquor und Hirngewebe, wobei diese Befunde überwiegend auf dem Einsatz von HTS bei Patienten mit Enzephalitis beruhen. Eine Unterscheidung zwischen zufälligem Nachweis und Infektion als Krankheitsursache erfolgte bisher, insbesondere aufgrund fehlender Kontrollen, nicht. Im

Rahmen dieser Arbeit soll die Relevanz von HPgV-1 als neuartiger Enzephalitis-Erreger untersucht werden.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich daher wie folgt zusammenfassen (Abbildung 5):

- 1) Etablierung eines sensitiven und zeiteffizienten HTS-Arbeitsablaufs, um virale Nukleinsäuren zu detektieren.
- 2) Weiterentwicklung der HTS-Methodik, um gezielt virale Sequenzen anzureichern und die Vollgenomsequenzierung auch aus schwierigem Probenmaterial zu ermöglichen.
- 3) Anwendung des in 1) entwickelten Arbeitsablaufes, um Viren in Enzephalitis-Fällen unklarer Ursache zu identifizieren. Dies sollte sowohl retrospektiv für eine große Anzahl von Patienten als auch in akuten diagnostischen Fällen erfolgen.

Virus-spezifische Forschungsfragen und Ziele, die unter Anwendung der in 1) und 2) etablierten Methoden bearbeitet werden, um folgende Hypothesen zu bearbeiten:

- 4) Hypothese: HEV zeigt bei Patienten mit Immunsuppression und Nachweis im ZNS eine unabhängige Replikation in diesem Kompartiment, welches schwer durch Therapeutika erreicht wird. Ist das ZNS ein Ort unabhängiger Replikation mit distinkter Viruspopulation? Hier ist das Ziel, die virale Diversität in HEV-Infizierten mit ZNS-Affektion zu erfassen und Aussagen über Kompartimentalisierung und Resistenzbildung zu treffen.
- 5) Hypothese: WNV etabliert sich als endemisches Humanpathogen in Berlin und gewinnt an Bedeutung als ZNS-Erreger. Gibt es undiagnostizierte WNV-Infektionen? Sind humane Infektionen eher reiseassoziiert oder lokal akquiriert? Hier werden unter anderem Liquores von Enzephalitis-Patienten auf WNV-RNA und/oder spezifische Antikörper getestet und ggf. sequenziert.
- 6) Hypothese: Obwohl HPgV-1 beim Menschen als Apathogene (Besiedler) gelten, können sie bei chronischen Infektionen mit Befall des ZNS pathogen werden. Repliziert HPgV-1 im ZNS oder erfolgt eine Ko-Detektion verursacht durch eine Blutkontamination? Hier sollen die Relevanz und ZNS-Tropismus eines im Rahmen dieser Arbeit mehrfach im ZNS nachgewiesenen Erregers besser verstanden werden.

2. Zielsetzung dieser Dissertation

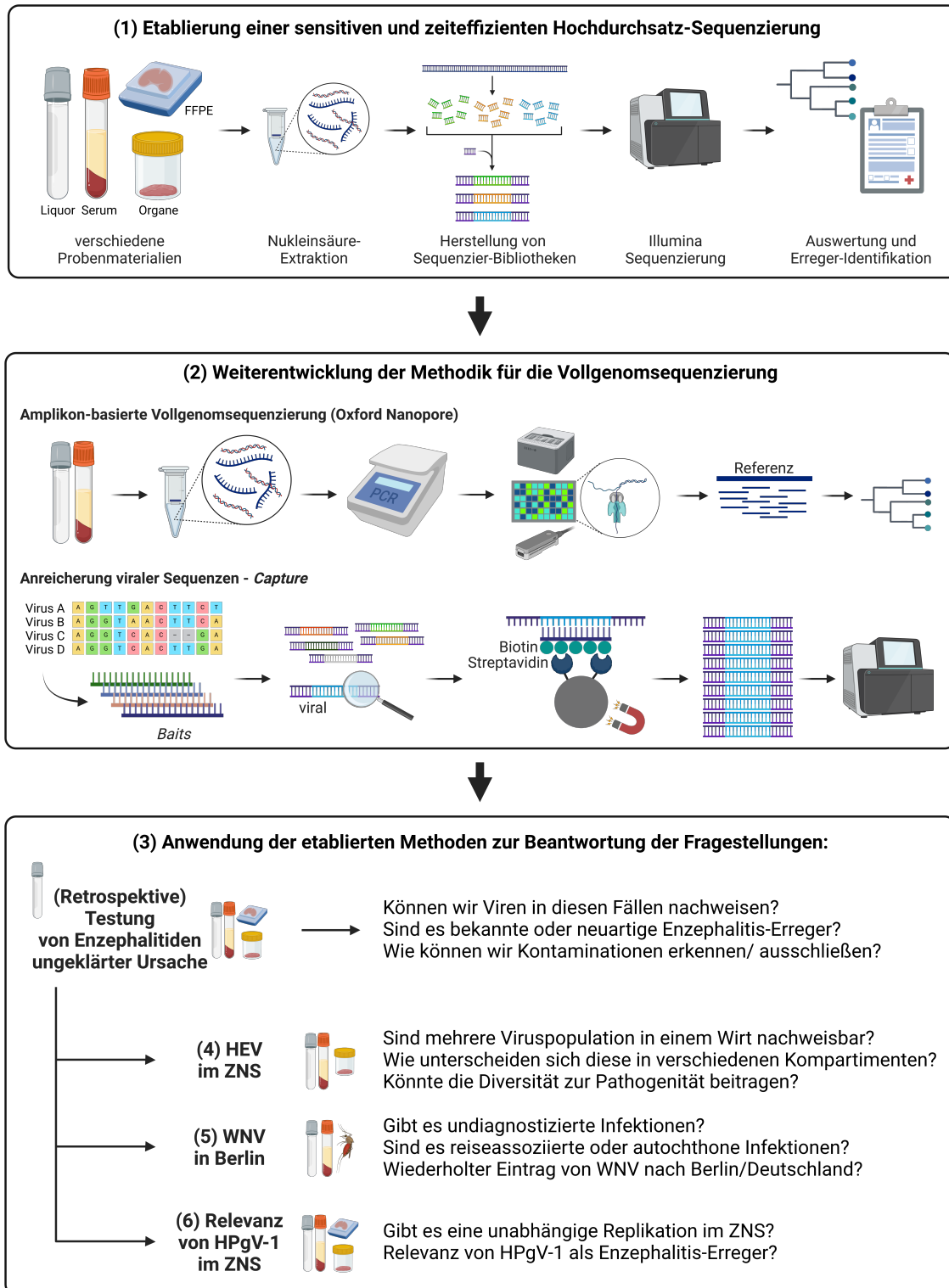


Abbildung 5. Grafische Zusammenfassung der Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit. FFPE, Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet; HEV, Hepatitis-E-Virus; HPgV-1, Humanes Pegivirus-1; WNV, West-Nil-Virus; ZNS, zentrales Nervensystem. Erstellt mit BioRender.com.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Probenmaterial und Ethik

Das in dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial wurde im Rahmen der Routinediagnostik oder aufgrund spezifischer Fragestellungen an das Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, gesendet. Die Verwendung von Daten aus Routineuntersuchungen ist durch § 25 des Berliner Krankenhausgesetzes gedeckt und bedarf keiner weiteren ethischen oder rechtlichen Genehmigung. Die Untersuchung von Liquorproben auf Viren für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin beraten und genehmigt (Aktenzeichen EA4/169/21).

3.1.2. Technisches Equipment

Tabelle 3. Technisches Equipment.

Gerät	Typ	Hersteller
Adapter für Flongle	ADP-FLG001	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Autoklav	Systec VX -100	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Automation	EUROIMMUN Analyzer I	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
ELISA Messgerät	Tecan INFINITE M Plex	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
ELISA Waschgerät	Tecan hydro FLEX	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Extraktionsroboter	MagNA Pure 96 System	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Feinwaage	Präzisionswaage LPC-313	VWR International GmbH, Darmstadt
Gefrierschrank	-20 °C Liebherr Premium -80 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz Eppendorf, Hamburg
Geldokumentation	Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Gelelektrophorese	EPS 301	Amersham Biosciences, Amersham, UK
Netzgerät Kammer	PerfectBlue Gelsystem	VWR International GmbH, Darmstadt
Glasflaschen	Duran	Schott AG, Mainz
Heizblock	Thermoschüttler Pro	Cellmedia GmbH und Co. KG, Zeitz
Inkubator	Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kugelmühle	TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Kühlschrank	4 °C Liebherr	Liebherr, Bulle, Schweiz

3. Material und Methoden

Gerät	Typ	Hersteller
Magnetplatte	DynaMag™-96 Side	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnetständer für 1,5 mL Gefäße	DynaMag™-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskop	Olympus BX60	OLYMPUS EUROPA SE + CO. KG, Hamburg
pH-Meter	ph 50+ Benchtop	Giorgio Bormac, Carpi, Italien
Pipetten	Research ® Plus	Eppendorf, Hamburg
	Multichannel Xplorer	Eppendorf, Hamburg
	Accujet ® pro	Brand, Wertheim
Real-Time PCR Cycler	LightCycler ® 480 II	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Sequenziergeräte	MiniSeq, MiSeq,	Illumina, San Diego, CA, USA
	NextSeq500/550,	Illumina, San Diego, CA, USA
	NextSeq1000, HiSeq	Illumina, San Diego, CA, USA
	MinION, GridION Mk1	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
TapeStation	4200 TapeStation	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Thermocycler	Mastercycler nexus flexid	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	VWB 6	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifugen	Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Sprout Mini Centrifuge	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

3.1.3. Chemikalien und Puffer**Tabelle 4. Chemikalien.**

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
AccuGENE™ Wasser für Molekularbiologie	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Agarose Ultra Pure™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Bovines Serumalbumin	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
<i>carrier</i> RNA	Qiagen, Hilden
De-Paraffinierungspuffer	Qiagen, Hilden
Descosept	Dr. Schumacher, Malsfeld
DNA Tissue Lysis Buffer	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
dNTPs (100 mM)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Dulbeccos Phosphatgepufferte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kochsalzlösung (PBS)	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Elutionspuffer	Qiagen, Hilden
Ethanol \geq 99,9%	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Marker	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
GeneRuler™ 100 bp DNA Marker	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Midori Green	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
SheetFluid MagnaPure	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA

Tabelle 5. Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
10x TRIS-Borat-EDTA (TBE) Puffer	108 g TRIS 55 g Borsäure 900 mL Aqua dest 40 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)
1x TBE	200 mL 10x TBE 1800 mL Aqua dest
1x PBS-Tween	50 mL 10x PBS 450 mL Aqua dest 0,5 mL Tween 20
6x Gel-Ladepuffer, pH 7,0	40 g Saccharose 0,223 g EDTA 0,25 g Bromphenolblau ad 100 mL Aqua dest

3.1.4. Kommerzielle Kits

Tabelle 6. Kommerzielle Kits.

Kit	Hersteller
Nukleinsäure-Extraktionskits	
AllPrep RNA/DNA FFPE	Qiagen, Hilden
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small / Large Volume Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini	Qiagen, Hilden
RNeasy	Qiagen, Hilden
RNeasy FFPE	Qiagen, Hilden
Enzym-Kits	
GenUP™ Exo SAP Kit	biotechrabbit GmbH, Berlin
MEGAscript™ T7 Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Platinum™ Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RealStar® WNV RT-PCR Kit	Altona Diagnostics GmbH, Hamburg
SuperScript™ III One-Step RT-PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TIB Molbiol für verschiedene Pathogene	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin

Kit	Hersteller
TurboDNase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kits für die Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken	
Fast Select HMR -rRNA/-Globin	Qiagen, Hilden
Flow Cell Priming Kit EXP-FLP002	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Flow Cell Wash Kit EXP-WSH004	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
KAPA Dilution Buffer	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
KAPA Dual-Index Adapter	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
KAPA Frag Kit	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
KAPA HIFI Amp	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
KAPA Hyper Prep Kit	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
KAPA Pure Beads	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
KAPA RNA Prep Kit	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
myBaits Capture Kits	Daicel Arbor Bioscience, Ann Arbor, MI, USA, Biocat, Heidelberg
NEB Blunt/TA Ligase Master Mix	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBNext End repair/dA-tailing Module	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBNext FFPE Repair Mix	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBNext LongAmp Hot Start 2x Master Mix	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBNext Quick Ligation Module	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PCR-Sequencing Kit	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
PCR Barcoding Kit	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Nukleinsäure-Quantifizierung	
Qubit HS 1x dsDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Qubit HS dsDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Qubit HS RNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ScreenTape D1000 High Sensitivity	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

3. Material und Methoden

Kit	Hersteller
Sequenzier-Reagenzien	
Illumina MiniSeq 300 cycles	Illumina, San Diego, CA, USA
Illumina MiSeq 600 cycles	Illumina, San Diego, CA, USA
Illumina NextSeq 150/200/300 cycles	Illumina, San Diego, CA, USA
Illumina HiSeq 150 cycles	Illumina, San Diego, CA, USA
Flongle <i>Flowcell</i>	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
MinION <i>Flowcell</i>	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Serologie	
Anti-Hanta Virus Pool 1 "Eurasia" ELISA	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
Anti-West-Nil-Viren-IIFT /-ELISA	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
DiaSorin Molecular West Nile Virus DxSelect™	DiaSorin, Saluggia, Italien

3.1.5. Verbrauchsmaterial

Tabelle 7. Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
ELISA Deepwell Platte	Corning Inc., Corning, NY, USA
ELISA Leitfähige Spitzen (300 µL, 1100 µL)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck
MagNAPure 96: Goldfolie, Deep-Well Platte, Processing Cartridge, external System Fluid, Elutionsplatte, Pipettenspitzen	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
PCR Platten, 96 Well, non-skirted	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
PCR-Platten Deckel	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
PCR Platten, 96 Well, semi-skirted, inklusive Folie	4titude Ltd. Germany, Berlin
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	STARLAB GmbH, Hamburg

Material	Hersteller
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Lock (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipette (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Skalpell	Aesculap AG, Tuttlingen
Umarex Stahlrundkugeln 5000 Stück, 4,5 mm	Umarex GmbH & Co. KG, Arnberg
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht

3.1.6. Oligonukleotide und Kontrollen

Oligonukleotide sowie gBlocks wurden in Geneious Prime (v2022.0.1) designt, mittels Oligocalc²¹¹ (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) überprüft und über die Firma Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien bezogen.

Tabelle 8. Oligonukleotide für die Reverse Transkriptase (RT)-PCR und anschließende Sanger-Sequenzierung.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HPgV 5'UTR (diese Arbeit und ²¹², modifiziert)		
PegiV_5'UTR_124Fw	CCAAAAGGTGGTGGATGGGTGA	Erste Runde
PegiV_5'UTR_156Fw ²¹²	TGGTAGGTCGTAAATCCYGGTCA	Zweite Runde
PegiV_5'UTR_554Rev	GGAGCAKRAGGACTGCCATGAT	Zweite Runde
PegiV_5'UTR_737Rev	VCCCGCCTGATACARYGGCCA	Erste Runde
Pan-Phlebovirus²¹³		
Ph-F1	TCAARAAGAMICAACATGGTGG	Erste Runde
Ph-F2	GGACTTAGAGAGATYTAYGTITTGG	Zweite Runde
Ph-R1	TATGCCYTGCATCATYCCWG	Erste Runde
Ph-R2	ACATGRTGACCYTGRTTCCA	Zweite Runde

I=A, C, G oder T; K=G oder T; M=A oder C; R=A oder G; V=A, C oder G; W=A oder T; Y=C oder T.

Tabelle 9. Oligonukleotide und Sonden für die Detektion und Quantifizierung.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Referenz
Beta-2-Microglobulin (B2M)		
B2M Forward	GAGTATGCCTGCCGTGTG	214
B2M Reverse	AATCCAAATGCGGCATCT	214
B2M Probe	FAM-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC-TAMRA	214
CoSV		
Cosa173_3D_fw	GAATAATAGATGTCACTCCTCTTGACC	diese Arbeit, ⁷³
Cosa173_3D_rev	AGCTGAGCCAAGATTAAAGCC	diese Arbeit, ⁷³
Cosa173_3D_probe	CTTTCAGAATTGTTCTAGGTAGGTTTATGGCATACT-FAM	diese Arbeit, ⁷³
Dobrava-Belgrad-Hantavirus (DOBV)		
DOBV_Fw	GACTCACCRTCATCAATYTGGGT	215
DOBV_Rev	GATGCCATGATIGTRTTCCTCAT	215
DOBV_Probe	FAM-CATTGCAGGCATGGCAGAGTTAGGTG-IABkFQ	diese Arbeit
HEV		
JVHEVF	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	216
JVHEVR	AGGGGTTGGTTGGRTGRA	216, modifiziert
JVHEVP	FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-MGB	216, modifiziert
JC-Virus		
JC 11	AGAGTGTTGGGATCCTGTGTTTT	217
JC 12	GAGAAGTGGGATGAAGACCTGTTT	217
JC 13F	FAM-TCATCACTGGCAAACATTTCTTCATGGC-TAMRA	217
HPgV-1		
5'UTRq_124Fw	CCAAAAGGTGGTGGATGGGTGA	diese Arbeit
5'UTRq_165Rev	CTCTTAAGACCCACCTATAGTGGC	diese Arbeit
5'UTRq_156P	FAM-AGGGTTGGTAGGTCGTAAATCCCGGTCA-IABkFQ	212, modifiziert
WNV		
FLI-WNF5-F	GGGCCTTCTGGTCGTGTTT	218
FLI-WNF6-R	GATCTTGGCYGTCCACCTC	218
FLI-WNF-Probe	FAM-CCACCCAGGAGGTCCTTCGCAA-TAMRA	218

I=A, C, G oder T; R=A oder G; Y=C oder T.

Virus-spezifische Positivkontrollen und Standards wurden von Dr. Victor Corman (Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt. Von der ehemaligen Arbeitsgruppe von Dr. Sabrina Weiß (Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) wurde ein Hantavirus *Capture*-Kit für die Anreicherung viraler Nukleinsäure sowie ein Standard für die Quantifizierung von DOBV-RNA zur Verfügung gestellt.

3.1.7. Software

Tabelle 10. Software und verwendete Software-Pakete.

Software	Version / Website
AdapterRemoval ²¹⁹	2.3.2
BioRender	https://www.biorender.com/
<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
<i>Burrows-Wheeler Alignment tool</i> (bwa) ²²⁰	0.7.17-r1188
<i>Dark Matter</i>	https://github.com/acorg/dark-matter
DIAMOND ²²¹	2.1.7
EUROIMMUN Analyzer I; EVA: 48431	EUROIMMUN Analyzer I v1.96.3
FigTree	1.4.4, http://tree.bio.ed.ac.uk/
Flash ²²²	1.2.11
Geneious Prime	2022.0.1
IBM SPSS Statistics	29.0.0.0
Image Lab	6.1.0
jModelTest ²²³	2.1.10
Jupyter Notebook ²²⁴	6.4.8
LightCycler II 480 Software	1.5.1.62
MAFFT ^{225,226}	7.450
MagNAPure 96 Software	3.1.1
Matplotlib ²²⁷	3.4.3
Minimap2 ²²⁸	2.17-r941
MrBayes ²²⁹	3.2.6
<i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) databases	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OligoCalc ²¹¹	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html

Software	Version / Website
Pandas ²³⁰	2.0.3
Porechop ²³¹	0.2.4
Python ²³²	3.9.16
RDP4 ²³³	4.97
Samtools ²³⁴	1.12
Seaborn ²³⁵	0.110
Simplplot ²³⁶	3.5.1
Slurm Pipeline ²³⁷	https://github.com/acorg/slurm-pipeline
Tecan i-control	2.0.10.0

3.2. Nukleinsäure-Extraktion

3.2.1. QIAamp Viral RNA Mini Kit

Für die Extraktion von Nukleinsäure aus Liquor und Serum wurden standardmäßig 140 µL, von Stuhlproben wurden 70 µL Probe verwendet. Die Extraktion erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Jedoch erfolgte die Elution in 50-100 µL 80 °C heißem Elutionspuffer.

Zur Aufkonzentrierung wurde ein höheres Probenvolumen verwendet und im Verhältnis 1:4:4 mit AVL-Puffer sowie Ethanol gemischt. Extrahierte Nukleinsäure wurde kurzzeitig bei -20 °C, langfristig bei -80 °C gelagert.

3.2.2. MagNA Pure 96

Für die Extraktion mittels MagNAPure 96 wurden Liquor- und Serumproben in eine Deep-Well-Platte pipettiert. Entsprechend dem Probenvolumen wurde das DNA and Viral NA Small Volume oder Large Volume Kit verwendet und in 100 µL Elutionspuffer, entsprechend den Herstellerangaben, eluiert.

Für die Extraktion von Organproben wurden zunächst ein linsengroßes Stück Gewebe, 350 µL PBS und eine Stahlkugel in ein 2 mL Safe Lock-Gefäß überführt. Die Probe wurde dann mit dem TissueLyser II für 3-6 min bei 30 Hertz homogenisiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 8000 Umdrehungen/min wurden 250 µL Überstand in eine Deep-Well-Platte überführt und mit 250 µL DNA Tissue Lysis Buffer gemischt. Die Proben wurden mit dem Large Volume Kit extrahiert und in 100 µL eluiert. Die Nukleinsäure-Extrakte wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.3. RNeasy

Alternativ wurden für einzelne Organproben ein linsengroßes Gewebestück in ein 2 mL Safe Lock Gefäß mit 600 µL RLT-Puffer, 6 µL β-Mercaptoethanol und einer Stahlkugel überführt und für

3 min bei 30 Hertz im TissueLyser II homogenisiert. Die weitere Extraktion erfolgte mittels RNeasy Kit nach Herstellerangaben mit Elution in 100 µL 80 °C heißem Elutionspuffer. RNA wurde kurzzeitig bei -20 °C, langfristig bei -80 °C gelagert.

3.2.4. RNeasy FFPE

Die Extraktion von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Proben aus Curls und direkt von Mikroskop-Objektträgern erfolgte standardmäßig mit dem RNeasy FFPE Kit. Zunächst wurden die Proben deparaffiniert. Dies geschah für Curls mit 160 µL Deparaffinierungslösung direkt im Reaktionsgefäß. Für Slides wurde die Lösung direkt auf den Objektträger pipettiert. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe mit einem Skalpell vom Objektträger gelöst und die Mischung in ein Safe Lock-Gefäß überführt.

Die Proben wurden dann gemäß den Anweisungen des Herstellers bearbeitet. Der DNase-Verdau wurde in diesem Prozess nur bei ausgewählten Proben durchgeführt, um den gleichzeitigen Nachweis von RNA- und DNA-Viren zu ermöglichen. Um spezifisch RNA bzw. DNA zu extrahieren, wurde das AllPrep RNA/DNA FFPE Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Um die erfolgreiche RNA- Extraktion zu bestätigen, wurden die Extrakte mittels B2M-PCR auf *housekeeper*-mRNA untersucht.

3.3. PCR-Analysen

3.3.1. Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und Sanger-Sequenzierung

Die Amplifikation viraler RNA erfolgte mittels RT-PCR unter Verwendung des SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase. In Tabelle 11 und 12 sind das Standardprotokoll für den Pipettieransatz sowie das Temperaturprofil dargestellt. Je nach Länge des Amplikons sowie der Primer-Schmelztemperatur wurden diese entsprechend modifiziert.

Tabelle 11. Standardprotokoll für die RT-PCR mittels SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
RNase freies Wasser (RFA)	3,1 µL
2x Reaktionsmix	12,5 µL
Magnesiumsulfat [50 mM]	0,4 µL
Bovines Serumalbumin [1 mg/mL]	1 µL
<i>forward</i> Primer [10 µM]	1 µL
<i>reverse</i> Primer [10 µM]	1 µL
SuperScript™ III RT/Platinum Taq Mix	1 µL
RNA	5 µL

Tabelle 12. Standard Temperaturprofil einer RT-PCR mittels SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase.

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	1	50 / 55 °C	10-15 min
Initiale Denaturation	1	95 °C	3 min
Denaturierung	45	95 °C	15 s
Annealing		56 °C	15 s
Elongation		72 °C	1 min/kb
Finale Elongation	1	72 °C	2 min
Kühlung	1	4 °C	∞

Zur Überprüfung der erzeugten Amplifikate wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet, dem Midori Green zugesetzt wurde. Die Größentrennung erfolgte in 1x TBE-Puffer für 20 min bei 350 V. Das Ergebnis wurde am UV-Transilluminator visualisiert. Die Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte wurde von der Firma MicroSynth durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die PCR-Produkte gemäß den Anweisungen des Herstellers mit ExoSap aufgereinigt. Jeweils 3 µL des gereinigten PCR-Produkts, 6 µL RFA und 1 µL des entsprechenden Primers (10 µM) wurden gemischt und zur Sequenzierung an das Unternehmen geschickt. Die generierten Elektropherogramme und Sequenzen wurden in Geneious Prime (v2022.0.1) ausgewertet.

3.3.2. In vitro Transkription

Für die Quantifizierung der RNA-Kopienzahl wurden spezifische *in vitro* Transkripte hergestellt. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Genombereiche ausgewählt, die die PCR-Region(en) umfassen und mit M13- sowie T7-Primer-Bindestellen versehen. Die dsDNA-Fragmente (gBlocks) wurden auf unseren Auftrag von der Firma Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien synthetisiert. Die Transkription wurde mit dem MEGAscript™ T7 Transcription Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Transkription wurde für 4 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 µL Turbo-DNase für 60 min degradiert. Die resultierenden *in vitro* Transkripte wurden mit dem RNeasy Mini Kit über eine Säule gereinigt und mittels Qubit vermessen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in *carrier*RFA hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde unter Verwendung des SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase getestet. Das Vorhandensein von gBlock-Resten in der Standardreihe wurde mit dem Platinum™ Taq DNA Polymerase Kit, ohne Reverse Transkriptase, überprüft. Sequenzen von *in vitro* Transkripten, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, sind im Anhang angegeben. Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau eines *in vitro* Transkriptes am Beispiel HCoV.



Abbildung 6. Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit designten *in vitro* Transkriptes für HCoV-229E. Hervorgehoben sind zwei genomische Regionen (5'UTR, 3D), sowie Primer (grün) und Sonden (rot).

3.3.3. Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Der Nachweis und gegebenenfalls die Quantifizierung viraler Nukleinsäure erfolgte durch eine quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Bei den meisten Protokollen wurde hierfür das SuperScript™ III OneStep Kit eingesetzt (Tabelle 13 und 14). Für den Nachweis von HEV-RNA wurde das Qiagen OneStep Kit verwendet (Tabelle 15 und 16). Die Quantifizierung viraler RNA erfolgte über die verwendete, serielle Verdünnung eines entsprechenden *in vitro* Transkriptes.

Tabelle 13. Standardprotokoll für die RT-qPCR mittels SuperScript™ III OneStep Kit.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
RFA	ad 25 µL
2x Reaktionsmix	12,5 µL
Magnesiumsulfat [50 mM]	0,4 µL
Bovines Serumalbumin [1 mg/mL]	1 µL
<i>forward</i> Primer [10 µM]	1 µL
<i>reverse</i> Primer [10 µM]	1 µL
Sonde [10 µM]	0,5/0,7 µL
SuperScript™ III RT/Platinum Taq Mix	1 µL
RNA	5 µL

Tabelle 14. Standard Temperaturprofil einer RT-qPCR mittels SuperScript™ III OneStep Kit.

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	1	50 / 55 °C	15 min
Initiale Denaturation	1	95 °C	3 min
Denaturierung	45	95 °C	20 s
Annealing		56 °C	15 s
Elongation		72 °C	1 min/kb
Finale Elongation	1	72 °C	2 min

Tabelle 15. Standardprotokoll für die RT-qPCR mittels Qiagen OneStep Kit.

Reagenz	Volumen pro Reaktion
RFA	10,5 µL
5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	5 µL
dNTPs	1 µL
<i>forward</i> Primer [10 µM]	1 µL
<i>reverse</i> Primer [10 µM]	1 µL
Sonde [10 µM]	0,5 µL
Qiagen OneStep Enzyme Mix	1 µL
RNA	5 µL

Tabelle 16. Standard Temperaturprofil einer RT-qPCR mittels Qiagen OneStep Kit.

Schritt	Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	1	50 °C	30 min
Initiale Denaturation	1	95 °C	15 min
Denaturierung	45	95 °C	15 s
Annealing		60 °C	30 s
Finale Elongation	1	40 °C	30 s

3.4. Hochdurchsatz-Sequenzierung

3.4.1. Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken

3.4.1.1. KAPA RNA Hyper Prep

Für die Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken wurde hauptsächlich das KAPA RNA Hyper Prep Kit verwendet und mit Modifikationen gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für die Reaktionen wurden halbe Volumina und bis zu 100 ng RNA verwendet. Die Fragmentierung wurde je nach gewünschter Zielgröße bei 85 °C für 5-6 min durchgeführt. Die aus FFPE-Proben extrahierte RNA wurde 5 min mit dem Fragmentierungspuffer bei 4 °C inkubiert. Bei Proben mit einer messbaren RNA-Konzentration von mehr als 2 ng/µL wurde eine Adapterkonzentration von 1,5 µM gewählt. Für Proben mit geringerer Konzentration wurde eine Adapterkonzentration von 0,15 µM gewählt, um die Bildung von Adapter-Dimeren zu reduzieren. Nach der Adapterligation und der Amplifikation wurde jeweils eine 0,7-fache Bead-Aufreinigung durchgeführt. Ein oberer Größenausschluss wurde nicht vorgenommen. Die Adapter-ligierten Moleküle wurden für 8-14 Zyklen amplifiziert. Für die Normalisierung der Bibliotheken wurden diese quantifiziert. Dafür wurde das HighSensitivity D1000 Kit verwendet. Ein Gemisch aus 2 µL Probenpuffer, 1 µL RFA und 1 µL aufgereinigter Sequenzier-Bibliothek wurde in der TapeStation 4200 vermessen und die mittlere Fragmentlänge zwischen 25 - 1000 Basenpaaren

(bp) kalkuliert. Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2 µL Sequenzier-Bibliothek mit 198 µL 1x dsDNA Buffer vermischt und nach zweiminütiger Inkubation im Qubit gemessen. Mit Hilfe einer zuvor gemessenen Standardreihe wurde die Konzentration bestimmt. Anhand beider Parameter wurde die Stoffmengenkonzentration berechnet. Die Bibliotheken wurden anschließend äquimolar vereinigt. Der Pool wurden erneut vermessen, um die erwartete Konzentration zu bestätigen. Die resultierenden Pools wurden anschließend nach Herstellerangaben auf einem MiniSeq, MiSeq, NextSeq500/550, NextSeq1000 oder HiSeq sequenziert. Es erfolgte stets die *paired-end* Sequenzierung, mit einer Sequenzierlänge zwischen 75-300 bp.

3.4.1.2. KAPA Hyper Prep

Die Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken von PCR-Produkten oder DNA-Extrakten erfolgte mittels KAPA Hyper Prep Kit entsprechend den Herstellerangaben mit geringfügigen Modifikationen. Die Fragmentierung wurde für 5-15 min bei 85 °C mit dem KAPA Frag Kit durchgeführt, anschließend erfolgte eine zweifache Bead-Aufreinigung. PCR-Produkte mit einer Länge von ~600 bp wurden nicht fragmentiert, wenn sie auf einem Illumina MiSeq sequenziert wurden. Sämtliche Reaktionen erfolgten ebenfalls in einem 0,5-fachen Ansatz. Nach der äquimolaren Vereinigung wurden die Sequenzier-Bibliotheken, wie in Abschnitt 3.4.1.1. beschrieben, auf die Zielkonzentration verdünnt und schließlich auf einem MiSeq, MiniSeq oder NextSeq500/550 sequenziert. Es erfolgte stets die *paired-end* Sequenzierung, mit einer Länge zwischen 75-300 bp.

3.4.1.3. Oxford Nanopore Sequenzierung

Die WNV-Vollgenomsequenzierung, mittels der im Rahmen dieser Arbeit etablierten *hemi-nested* Vollgenom-Primersets (Kapitel 4.2.2.), erfolgte unter Verwendung des PCR Sequencing Kit (SQK-PSK004, Version: PSK_9072_v1_revK_14Aug2019) für einzelne Proben oder des PCR Barcoding Kit für bis zu 12 Proben (SQK-PBK004, Version: PBK_9073_v1_revN_14Aug2019). Die PCR-Produkte einer Probe wurden dafür zunächst vereinigt und mittels KAPA PureBeads und einem zweifachen Beadvolumen entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Die Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken erfolgte dabei nach Herstellerangaben und wurde anschließend auf einer (Flongle-) *Flowcell* mittels MinION oder GridION sequenziert. Die resultierenden Rohdaten wurden anschließend mit den folgenden Befehlen bioinformatisch ausgewertet.

Zunächst wurden die Adapter entfernt.

```
$ porechop -i input.fastq --extra_end_trim 25 > output-trimmed.fastq
```

Anschließend wurde eine Referenzsequenz hinterlegt.

```
$ minimap2 -d Referenz.mmi Referenz.fa
```

Und die getrimmten Sequenzen gegen die Referenz gemappt.

```
$ minimap2 -a Referenz.mmi output-trimmed.fastq > ProbeX.bam
```

Das resultierende Bam-File wurde anschließend in Geneious Prime (v2022.0.1) analysiert.

3.4.2. Wirtsgenom-Abreicherung

Um rRNA und Globin-mRNA abzureichern wurde das FastSelect HMR Kit von Qiagen genutzt. Dabei wurden je 0,5 µL des entsprechenden Reagenzes zum Fragmentierungs-Ansatz zugefügt und ein geändertes Temperaturprofil gewählt. Der Reaktionsansatz wurde bei 85 °C für 5-6 min inkubiert, anschließend für je 2 min bei 75 °C, 70 °C, 65 °C, 60 °C, 55 °C, 37 °C und 25 °C. Für FFPE-Proben wurde der erste Inkubationsschritt nicht durchgeführt. Anschließend wurde mit der Herstellung der Sequenzier-Bibliotheken, wie in Kapitel 3.4.1.1. beschrieben, fortgefahren.

3.4.3. Capturing - Anreicherung viraler Sequenzen

Für die Entwicklung der *Capture Bait*-Sets wurden alle bekannten Referenzsequenzen von der NCBI-Datenbank heruntergeladen. In Geneious wurden zunächst Sequenzen, die weniger als ~70% des Genoms abdeckten oder eine schlechte Qualität aufwiesen, herausgefiltert. Die übrigen Sequenzen wurden mittels MAFFT aligniert. Anschließend wurde die Genomanzahl so lange reduziert, bis die nt-Identität nur noch ~90-95% betrug. Das resultierende Design wurde für die finale Bearbeitung an die Firma Daicel Arbor Biosciences gesendet. Für die gezielte Anreicherung viraler Sequenzen wurden bis zu sechs Bibliotheken in einer Reaktion (7 µL) vereinigt und anschließend den Herstellerangaben entsprechend prozessiert. Die Hybridisierung und folgende Waschschrte wurden bei 65 °C durchgeführt. Die angereicherten Produkte wurden für bis zu 22 Zyklen amplifiziert.

3.4.4. Datenanalyse

Die Pipeline zur Analyse von HTS-Rohdaten wurde von der bioinformatischen Arbeitsgruppe um Dr. Terence Jones (Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) entwickelt²³⁸ und zur Verfügung gestellt. Diese besteht aus einer Verkettung von Shell-Skripten, die Programme von Drittanbietern sowie eigene Programme aufruft. Die Ausführung wird durch ein Slurm-Pipeline-Python-Paket koordiniert und umfasst die folgenden Hauptschritte:

- I) Adaptersequenzen werden mittels AdapterRemoval²¹⁹ entfernt.
- II) Die *paired-end* sequenzierten Moleküle werden mit Flash²²² kombiniert.
- III) Die Sequenzen werden anschließend mittels bwa²²⁰ gegen Referenzen gemappt, wobei alle übereinstimmenden Sequenzen mittels samtools²³⁴ von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen werden. Die Datenbanken beinhalten: *Homo sapiens* Genom GRCh38.p7 (März 2016), GRCh38 *Homo sapiens* RNA (August 2019), *Homo sapiens* mitochondriale DNA (Juli 2020), rRNA (Juli 2020), lange nicht-kodierende RNA (Juli 2020).

- IV) Doppelte Sequenzen werden mit dem Skript `filter-fasta.py` aus den *Dark-Matter* Python-Tools (Version 4.0.58) entfernt.
- V) Die Sequenzen werden mit Hilfe von DIAMOND^{220,221} auf Aminosäuren (AA) -Ebene gegen Proteindatenbanken abgeglichen: NCBI, virale Referenzsequenzen (heruntergeladen im Juni 2023)²³⁹ und Proteinsequenzen aus einer Sammlung von Insekten-Viren²⁴⁰. Diese Proteindatenbanken werden in einem internen Verfahren unter Verwendung von Code aus dem *Dark-Matter* Paket erstellt.
- VI) Die Ergebnisse des Abgleichs werden mit dem Code von *Dark-Matter* als HTML-Zusammenfassung zur Verfügung gestellt. Diese enthält Taxonomie-Informationen aus einer sqlite3-Datenbank, die mit Python (<https://github.com/acorg/ncbi-taxonomy-database>) auf der Grundlage der NCBI-Taxonomie-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) erstellt wurde.

Virus-Funde wurden anschließend in Geneious Prime (v2022.0.1) manuell und im Vergleich zu Referenzsequenzen überprüft.

3.5. Erstellen von Konsensussequenzen

Zur Erstellung von Konsensussequenzen wurden die Rohdaten zunächst mit der Geneious Prime-Einstellung "Medium-Low Sensitivity/Fast" gegen eine Referenz gemappt. Die resultierende Konsensussequenz wurde dann iterativ mittels nt BLAST gegen die NCBI *non-redundant nucleotide* Datenbank überprüft, eine möglichst ähnliche Referenz ausgewählt und erneut gemappt. Die Mappings wurden manuell überprüft. Die Geneious Prime-Einstellung "75% Highest Quality" wurde gewählt, um eine einfache Konsensussequenz zu erzeugen. Dabei wird die Qualität einer sequenzierten Base berücksichtigt und Varianten mit einer Häufigkeit von mindestens 25% werden in der Konsensussequenz einbezogen. Für Analysen der viralen Diversität wurden ggf. strengere Kriterien verwendet, diese sind in den entsprechenden Kapiteln ausführlicher beschrieben. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Sequenzen wurden in die GenBank Datenbank hochgeladen. Die entsprechenden Accession Nummern sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Bisher unveröffentlichte Sequenzen sind in einem Github-Repository veröffentlicht, das auf Anfrage zugänglich gemacht wird.

3.6. Phylogenetische Analysen

Nukleotid- und AA-Sequenzen wurden mit MAFFT^{225,226} Plugin (v7.450) in Geneious Prime (v2022.0.1) aligniert und anschließend manuell überprüft. Das am besten geeignete Substitutionsmodell wurde mit jModelTest²²³ (v2.1.10) ermittelt. Nach Ausschluss von Rekombinationsereignissen mittels RDP4²³³ (v4.97) und Simplot²³⁶ (v3.5.1) wurden phylogenetische Stammbäume mittels MrBayes²²⁹ (v3.2.69), PHYML²⁴¹ (v3.3) oder FastTree²⁴² (v2.1.11) Plugin in Geneious Prime berechnet und mit Figtree (v1.4.4) visualisiert. Die genauen Parameter sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

3.7. Serologische Methoden

3.7.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Für den Nachweis von Anti-WNV- und Anti-Hantavirus-spezifischen Antikörpern wurden kommerzielle ELISA Kits der Firma EUROIMMUN, Lübeck, verwendet. Diese wurden automatisiert unter Verwendung des EUROIMMUN Analyzer I nach Herstellerangaben durchgeführt. Für einzelne Proben sowie bei Verwendung des Molecular West Nile Virus DxSelect™ Assays der Firma DiaSorin, Saluggia, Italien, wurden die Experimente händisch nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und anschließend am Tecan INFINITE M Plex gemessen.

3.7.2. Indirekter Immunfluoreszenztest

Für den Nachweis von Anti-WNV IgM- und IgG-Antikörpern wurden kommerzielle Kits der Firma EUROIMMUN, Lübeck, entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Slides wurden anschließend im Vier-Augen-Prinzip begutachtet und ausgewertet.

3.8. Statistik

Deskriptive Statistiken wurden mittels Python (v3.9.16) unter Verwendung von Seaborn (v0.11.0,²³⁵), Matplotlib (v3.4.3,²²⁷) sowie Pandas (v2.0.3,²³⁰) berechnet und grafisch dargestellt. Statistische Analysen zur Prüfung signifikanter Unterschiede in der Viruslast zwischen verschiedenen Probenarten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test in IBM SPSS Statistics (v29) durchgeführt.

Um die Nachweisgrenze und das 95% Konfidenzintervall der HPgV-1 RT-qPCR zu bestimmen, wurde eine Probit-Analyse mittels IBM SPSS Statistics (v29) durchgeführt. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen eines *in vitro* Transkripts (0,005-5000 Kopien pro Reaktion) in acht parallelen Messungen getestet und der Anteil positiver Reaktionen ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklung und Etablierung eines zeiteffizienten und sensitiven HTS-Arbeitsablaufs

Für die Entwicklung eines sensitiven und zugleich zeiteffizienten HTS-Arbeitsablaufs, wurden zahlreiche Experimente für die Validierung, Etablierung und Qualitätssicherung durchgeführt.

4.1.1. Einfluss von Fragmentierung und rRNA Reduzierung

Teile dieses Kapitels wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Corman, V. M., Preusse, C., **Melchert, J.**, Benveniste, O., Koll, R., Goebel, H.-H., Jones, T. C., Drosten, C., Schara-Schmidt, U., Leonard-Louis, S., Stenzel, W. & Radke, J. Deep RNA sequencing of muscle tissue reveals absence of viral signatures in dermatomyositis. **Free Neuropathol.** 5, (2023).

Der erste Schritt für die Produktion einer Sequenzier-Bibliothek ist die Fragmentierung der isolierten Nukleinsäure, da Illumina nur kurze Fragmente sequenzieren kann. Es war daher notwendig, eine geeignete RNA-/DNA-Fragmentierung, determiniert durch die Zeit und Konzentration des Fragmentierung-Puffers, zu wählen, sodass virale Nukleinsäure beim unteren Größenausschluss nicht selektiert wird. Zeitgleich muss virale Nukleinsäure stark genug fragmentiert werden, da Moleküle >1000 bp nicht effektiv sequenziert werden können.

Die meisten viralen Enzephalitis-Erreger besitzen ein RNA-Genom (Tabelle A1). Daher wurde für die folgenden Versuche ein HEV-positives Serum verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden jeder Reaktion 50.000 Cavally-Virus Genome beigefügt. Beide Viren haben ein (+)ssRNA-Genom, mit Längen von ~7,2 kb (HEV) und ~20,1 kb (Cavally-Virus). Die Genome dieser Viren sind repräsentativ für eine Vielzahl viraler Pathogene.

In diesem Versuch wurden verschiedene Fragmentierungszeiten (1, 3 und 5 min bei 85 °C) sowie Fragmentierungspuffer-Konzentrationen (unverdünnt, 1:100 sowie ohne Fragmentierung/-puffer) gewählt. Die fragmentierten RNAs wurden fortan in der Präparation gleichbehandelt und anschließend auf einem Illumina MiSeq (2x300 bp, *paired-end*) sequenziert.

Nach dem Abgleich gegen die Referenzsequenzen wurde die höchste Genomabdeckung sowie der höchste Anteil viraler Sequenzen für den unverdünnten Fragmentierungs-Puffer erreicht. Eine Fragmentierungszeit von 5 min war insbesondere für das Cavally-Virus von Vorteil, während nach 3 min die höchste Ausbeute für HEV erzielt wurde (Tabelle 17). Für die Herstellung einer Sequenzier-Bibliothek für einen MiSeq Sequenzierlauf wurden fortan diese Parameter gewählt. Eine sechsminütige Fragmentierungszeit wurde für Sequenzierläufe auf dem NextSeq gewählt, da dieser kürzere Sequenzen generiert.

Tabelle 17. Zusammenfassung der Ergebnisse für verschiedene Fragmentierungszeiten sowie Pufferkonzentrationen und der resultierenden Anzahl viraler Sequenzen.

Fragmentierungszeit und -temperatur	Pufferkonzentration	generierte Sequenzen	HEV-Sequenzen pro Million generierter Sequenzen	% HEV Genomabdeckung	Cavally-Virus Sequenzen pro Million generierter Sequenzen
1 min, 85 °C	unverdünnt	3.270.462	24	75,3	18
3 min, 85 °C	unverdünnt	2.040.604	83	99,7	76
5 min, 85 °C	unverdünnt	2.595.882	65	98,0	98
1 min, 85 °C	unverdünnt	1.275.174	70	81,1	81
1 min, 85 °C	1:100	1.275.174	2	4,9	4
keine	kein Puffer	2.698.874	0	0	0

Reduzierung des Wirtsgenoms

Die Sequenzierung von Gewebeproben stellt eine besondere Herausforderung dar, da hier der Wirtsgenom-Hintergrund besonders hoch ist. Eine Option ist die gezielte Reduktion von rRNA und/oder Globin mRNA. Im Folgenden wurden vier Muskelbiopsien nativ sequenziert und zusätzlich wurden rRNA und Globin mRNA gezielt abgereichert. Ohne Behandlung wurden ~90% aller generierten Sequenzen als rRNA und <1% als Globin mRNA identifiziert. Mit Behandlung lag der Anteil für Globin mRNA weiterhin unter <1%. Der Anteil von rRNA Sequenzen war stark reduziert (Tabelle 18). Für beide Ansätze wurden keine viralen Erreger identifiziert. Nach der Wirtsgenom-Abreicherung wurden allerdings Kontaminationen aus der RNeasy-Säule (Kapitel 4.1.5.) identifiziert, die zuvor nicht detektiert wurden, beispielsweise Beihai picorna-like Virus, Wenling crustacean Virus und Wenzhou narna-like Virus.

Tabelle 18. Anteil von rRNA und Globin mRNA Sequenzen vor und nach der gezielten Abreicherung in Muskelproben²³⁸.

ID	native Sequenzierung			nach rRNA/Globin mRNA Abreicherung		
	Sequenzen	% rRNA ^a	% Globin ^b	Sequenzen	% rRNA ^a	% Globin ^b
201	16.964.910	91,1	0,00059	13.702.822	1,6	0,285
207	27.551.144	92,6	0,00004	44.306.206	8,0	0,012
212	30.284.074	87,1	0,00018	6.687.426	4,3	0,087
217	26.934.130	93,7	0,00004	6.484.016	8,2	0,383

^a NR_145820.1 & NR_003287.4; ^b NM_000558.5, NM_000517.6, NM_000518.5, NM_000519.4.

4.1.2. Strategie zum parallelen Nachweis von RNA- und DNA-Viren

Zahlreiche RNA- und DNA-Viren können eine Enzephalitis verursachen. Je nach Genom sind unterschiedliche Vorbereitungen für die Sequenzier-Bibliotheken erforderlich. Jedoch ist die parallele Erstellung von RNA- und DNA-Sequenzier-Bibliotheken zeit- und kostenintensiv. Im Folgenden wurde untersucht, ob DNA-Viren auch mittels RNA-Präparation nachweisbar sind,

zum Beispiel durch den Nachweis von viralen Transkripten. Dazu wurde eine RNA- und DNA-Präparation für Liquores mit nachgewiesener HSV, VZV und Adenovirus (AdV) Infektion durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Abstrich einer Mpox (ehemals Affenpocken) Läsion getestet. Für beide Präparationen wurde dasselbe Eluat einer Qiagen Extraktion genutzt. Die resultierenden Sequenzier-Bibliotheken wurden anschließend auf einem Illumina MiSeq sequenziert. In einem weiteren Versuch wurde der parallele Nachweis von JC-Viren aus FFPE-Hirngewebe untersucht. Dazu wurde spezifisch RNA (inklusive DNA-Verdau) bzw. DNA mittels AllPrep RNA/DNA FFPE extrahiert und entsprechend RNA- bzw. DNA-Sequenzier-Bibliotheken erstellt. Anschließend wurden diese auf einem Illumina Nextseq sequenziert.

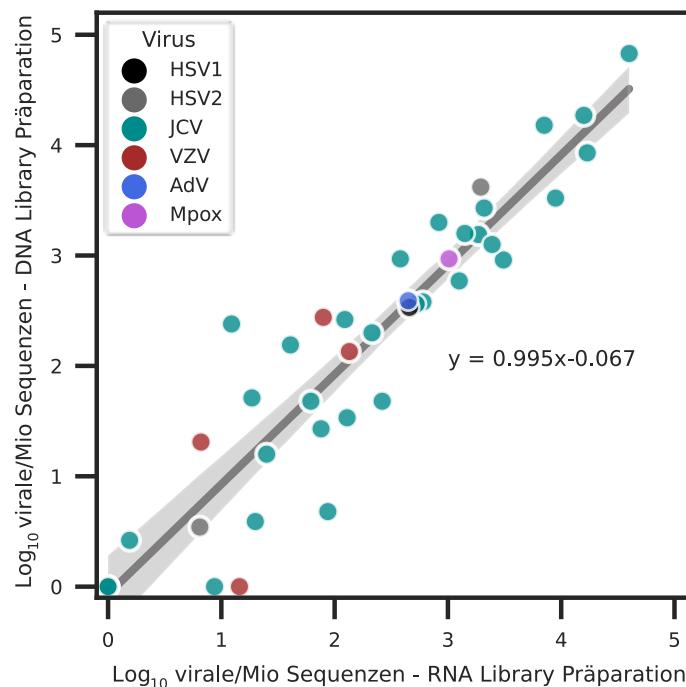


Abbildung 7. Virale Sequenzen pro Million generierter Sequenzen für verschiedene Viren und Extraktionsmethoden. Untersucht wurden Herpesviren (HSV-1/2, VZV), AdV, Mpox-Virus (jeweils Qiagen Extraktion) sowie JC-Virus (RNeasy AllPrep RNA/DNA FFPE Extraktion). Für den Nachweis von JC-Viren wurde entsprechend das RNA- bzw. DNA-Eluat für die Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken verwendet. Regressionslinie sowie 95% Konfidenzintervall wurden mittels Regplot-Funktion in Seaborn/Jupyter Notebook berechnet. AdV, Adenovirus; HSV, Herpes-simplex-Virus; JCV, JC-Polyomavirus; Mio, Million; Mpox, Mpox-Virus, VZV, Varizella-Zoster-Virus.

Virale Sequenzen wurden für alle getesteten DNA-Viren in beiden Ansätzen nachgewiesen. Abbildung 7 zeigt die Anzahl viraler Sequenzen pro Million generierter Sequenzen für eine Probe, die entweder durch RNA- oder DNA-Präparation aufbereitet wurde. Es war möglich, mit Hilfe der RNA-Präparation zuverlässig virale Sequenzen zu erzeugen. Der Anteil viraler Sequenzen war bei beiden Ansätzen vergleichbar. Daher wurde fortan nur noch diese Präparation für die Erreger-Identifikation verwendet. Im Rahmen der HTS-basierten Diagnostik wurden so zahlreiche Infektionen detektiert, die durch DNA-Viren verursacht wurden. Dabei handelte es sich unter anderem um Herpesviren (HSV, VZV, EBV, HHV6), AdV, AdV-assoziierte Viren und Polyomaviren.

4.1.3. Qualitätskontrolle: Positivkontrolle und Ringversuche

Um eine Positivkontrolle für den Arbeitsablauf zu entwickeln und zu testen, ob die Detektion von Viren mit 5.000 bzw. 50.000 Genomkopien pro Reaktion gewährleistet ist, wurde der Zellkulturüberstand eines Cavally-Virus verwendet. Dieser wurde zunächst auf einem MiSeq sequenziert, um das Vorhandensein weiterer Viren auszuschließen. Beide Konzentrationen wurden diagnostischen Proben während der Extraktion parallel zugesetzt. Der Nachweis von 5.000 Genomkopien pro Reaktion wurde für Liquor- und Serumproben erfolgreich erreicht. Nach der Etablierung des NextSeq, der eine deutlich höhere Sequenziertiefe ermöglicht (25 Millionen gegenüber 400 Millionen Clustern), wurden zusätzliche Viren im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Um keine falsch-positiven Befunde herbeizuführen, wurde die Verwendung des Cavally-Virus als Positivkontrolle gestoppt.

Nachfolgend wurde die Qualität über die Teilnahme an (HTS-)Ringversuchen sichergestellt, unter anderem zum Nachweis von Hantaviren, Enteroviren und Alphaviren, welche zu den viralen Enzephalitis-Erregern gehören. Exemplarisch aufgezeigt sind die Ergebnisse für einen Alphavirus-Ringversuch (Tabelle 19). Dabei wurden die Proben zunächst per spezifischer Chikungunya-Virus RT-qPCR und Spezies-unabhängiger Pan-PCR vorgetestet. Alle Proben wurden anschließend per HTS sequenziert und konnten fehlerlos zugeordnet werden. Nur 9/23 (39,1%) der teilnehmenden Labore meldeten fehlerfreie Ergebnisse, waren aber nicht in der Lage, alle Viren zu erfassen. Lediglich 5/23 (21,7%) Labore identifizierten alle Virusspezies fehlerfrei.

Tabelle 19. Ergebnisse des Alphavirus-Ringversuchs.

#	Extraktion / Molekulare Testung	Sensitivität											Spezifität			
		CHIKV1	CHIKV2	CHIKV3	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	Negativkontrolle			
1	Manuell / CHIKV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	neg.	neg.	neg.	neg.
2	Automatisiert / CHIKV, ONNV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	CHIKV	neg.	neg.	neg.	neg.
3	Manuell / BFV, CHIKV, EEEV, MAYV, ONNV, RRV, SINV, VEEV, WEEV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	BFV
4	Manuell / CHIKV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	neg.	neg.	neg.	neg.
5	Automatisiert / CHIKV, pan-alpha, HTS	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
6	Automatisiert / CHIKV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	CHIKV	neg.	neg.	neg.	neg.
7	Automatisiert / CHIKV, MAYV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	neg.	neg.	WEEV	neg.	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
8	Automatisiert / CHIKV, MAYV, SINV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
9	Automatisiert / CHIKV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ink.	ink.	ink.	ink.
10	Manuell / CHIKV, SINV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	SINV	neg.	neg.	neg.	neg.	RRV	neg.	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
11	Automatisiert / BFV, CHIKV, EEEV, MAYV, ONNV, RRV, SINV, VEEV, WEEV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	neg.	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
12	Automatisiert / CHIKV, EEEV, MAYV, WEEV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
13	Automatisiert / CHIKV, EEEV, VEEV, WEEV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	NA	NA	NA	NA	CHIKV	neg.	neg.	neg.	neg.
14	Automatisiert / BFV, CHIKV, EEEV, ONNV, RRV, SINV, VEEV, WEEV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
15	Automatisiert / BFV, CHIKV, EEEV, MAYV, ONNV, RRV, SINV, VEEV, WEEV, Weitere	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	CHIKV
16	Automatisiert / CHIKV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	neg.	neg.	neg.	neg.	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
17	Automatisiert / CHIKV, pan-alpha	SINV	CHIKV	CHIKV	neg.	CHIKV	WEEV	BFV	SINV	RRV	ONNV	CHIKV	Alpha-virus	Alpha-virus	Alpha-virus	neg.
18	Manuell / CHIKV, EEEV, ONNV, RRV, SINV, VEEV, WEEV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	NA	SINV	RRV	NA	CHIKV	neg.	neg.	neg.	neg.
19	Automatisiert / CHIKV, MAYV, ONNV, SINV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	ONNV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
20	Manuell / CHIKV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	neg.	neg.	neg.	neg.
21	Manuell / BFV, CHIKV, EEEV, MAYV, ONNV, RRV, SINV, VEEV, WEEV, pan-alpha	CHIKV	CHIKV	CHIKV	VEEV	EEEV	WEEV	BFV	SINV	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
22	Manuell / CHIKV	CHIKV	CHIKV	neg.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	neg.	neg.	neg.	neg.
23	Automatisiert / CHIKV, MAYV, ONNV, RRV	CHIKV	CHIKV	CHIKV	NA	NA	NA	NA	NA	RRV	MAYV	ONNV	neg.	neg.	neg.	neg.
% Total korrekt, NA ausgeschlossen		95,7	100	95,7	66,7	73,3	86,7	76,9	92,9	100	78,6	72,2	90,2			
% Total NA		0	0	0	34,8	34,8	34,8	43,5	39,1	34,8	39,1	21,7				

Ergebnisse des Instituts für Virologie der Charité (Labor-Nummer 5), die mit dem in dieser Arbeit etablierten Arbeitsablauf erzielt wurden, sind hervorgehoben. Grün, korrekt positives/negatives (neg.) Ergebnis; rot, falsch positives/negatives Ergebnis; ink/gelb, inkonklusiv; NA, nicht anwendbar/nicht durchgeführt. BFV, Barmah-Forest-Virus; CHIKV, Chikungunya-Virus; EEEV, Eastern-Equine-Encephalitis-Virus; HTS, High-throughput-sequencing; MAYV, Mayaro-Virus; ONNV, Onyong-nyong Virus; pan-alpha, Spezies-unabhängiges pan-Alphavirus Assay; RRV, Ross-River-Virus; SINV, Sindbis-Virus; VEEV, Venezuelan-Equine-Encephalitis-Virus; WEEV, Western-Equine-Encephalitis-Virus.

4.1.4. Sensitivität

Um die HTS-basierte Diagnostik zu etablieren, war es nötig, eine Mindestanzahl von Sequenzen zu definieren, die sicherstellt, dass virale Erreger nachgewiesen werden können. Initial war nicht klar, ob der Nachweis viraler Nukleinsäure von der Genomart (DNA/RNA) oder der Genomgröße (5 kb/200 kb) abhängig ist. Auch die Art des Probenmaterials kann einen Einfluss haben, z. B. aufgrund des hohen Wirtsgenom-Hintergrunds in Gewebeproben. Aus diesem Grund wurde eine Regressionsanalyse für die Anzahl viraler Sequenzen pro Million generierter Sequenzen für verschiedene Erreger und Probenarten in Abhängigkeit des ct-Wertes durchgeführt (Abbildung 8). Da nicht für alle Erreger eine Quantifizierung möglich war, wurden ct-Werte für die Darstellung verwendet.

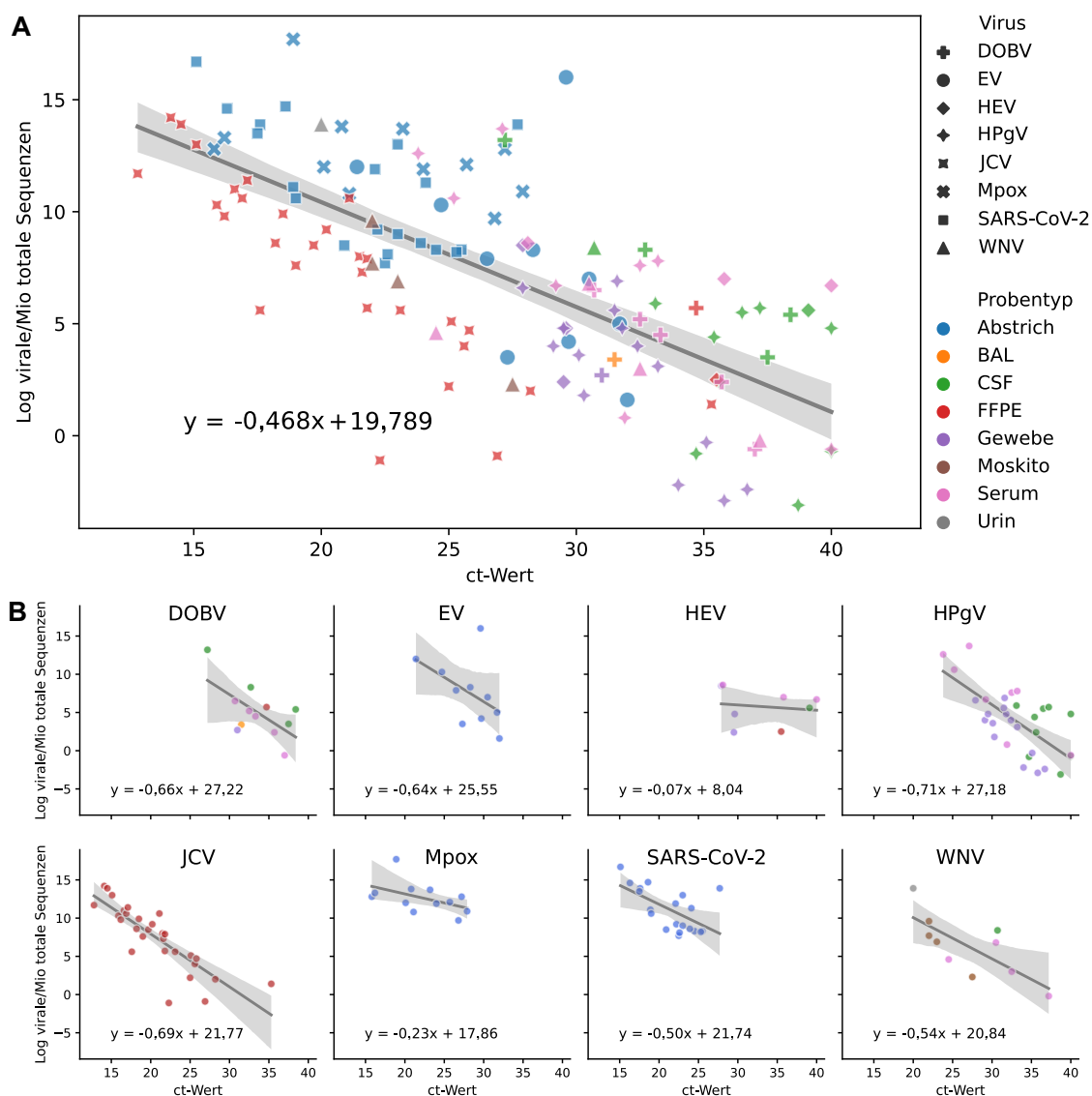


Abbildung 8. Nachweis viraler Sequenzen pro Million generierter Sequenzen in Abhängigkeit des ct-Wertes für verschiedene Erreger und Probentypen (A) und für individuelle Erreger (B). Für die Sequenzierung von HPgV aus Geweben wurde zuvor rRNA angereichert. Regressionsgleichung und 95% Konfidenzintervall wurden mittels Regplot-Funktion in Seaborn/Jupyter Notebook berechnet. Aufgrund der großen Anzahl verschiedener Organ- und

Gewebetypen wurden diese unter der Kategorie 'Gewebe' zusammengefasst. BAL, Bronchoalveoläre Lavage; CSF, Cerebrospinalflüssigkeit; DOBV, Dobrava-Belgrad-Virus; EV, Enterovirus; FFPE, Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet; HEV, Hepatitis-E-Virus; HPgV, humanes Pegivirus; JCV, JC-Polyomavirus; Mpox, Mpox-Virus; SARS-CoV-2, *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*; WNV, West-Nil-Virus.

Im Vergleich zeigte sich:

- I. Für FFPE-Proben (JC-Polyomavirus) ist bei gleichem ct-Wert eine höhere Sequenziertiefe nötig, um virale Nukleinsäure nachzuweisen als bei anderen Probenarten.
- II. Es gibt eine zum Teil starke Varianz für das gleiche Virus und den gleichen Probentyp. So konnten für drei HPgV-positive Seren mit ähnlichem ct-Wert (31,9 / 32,5 / 33,2) je 2, 194 und 226 virale pro Million generierte Sequenzen identifiziert werden.
- III. Die Detektionsrate von Mpox (~200 kb dsDNA-Genom) und *Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)-2* (30 kb ssRNA-Genom) aus Abstrichen mit einem ct-Wert <30 ist vergleichbar, obwohl sich ihr Genom stark unterscheidet.

Je mehr Sequenzen für eine Probe generiert werden, desto wahrscheinlicher ist, dass virale Nukleinsäuren detektiert werden. Für Gewebe und FFPE-Proben sollte eine höhere Sequenziertiefe angestrebt werden, als für Liquor und Serum. Anhand von Abbildung 8 kann aufgrund der Anzahl generierter Sequenzen abgeschätzt werden, bis zu welchem ct-Wert ein Virus hätte detektiert werden können. Zum Beispiel: Wenn für einen HPgV-1 positiven Liquor (ct-Wert: 40) zehn Millionen Sequenzen erzeugt werden, sind etwa zehn virale Sequenzen zu erwarten.

4.1.5. Kontaminationen im HTS

Ein weiteres Problem bei der HTS-Diagnostik ist der mögliche Eintrag von Kontaminationen während des Arbeitsprozesses. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit potentielle Kontaminationen und deren Quellen identifiziert. Sie können während des gesamten Prozesses, von der Probennahme bis zur bioinformatischen Auswertung, eingetragen werden (Abbildung 9). Im Folgenden werden diese anhand von Beispielen dargestellt.

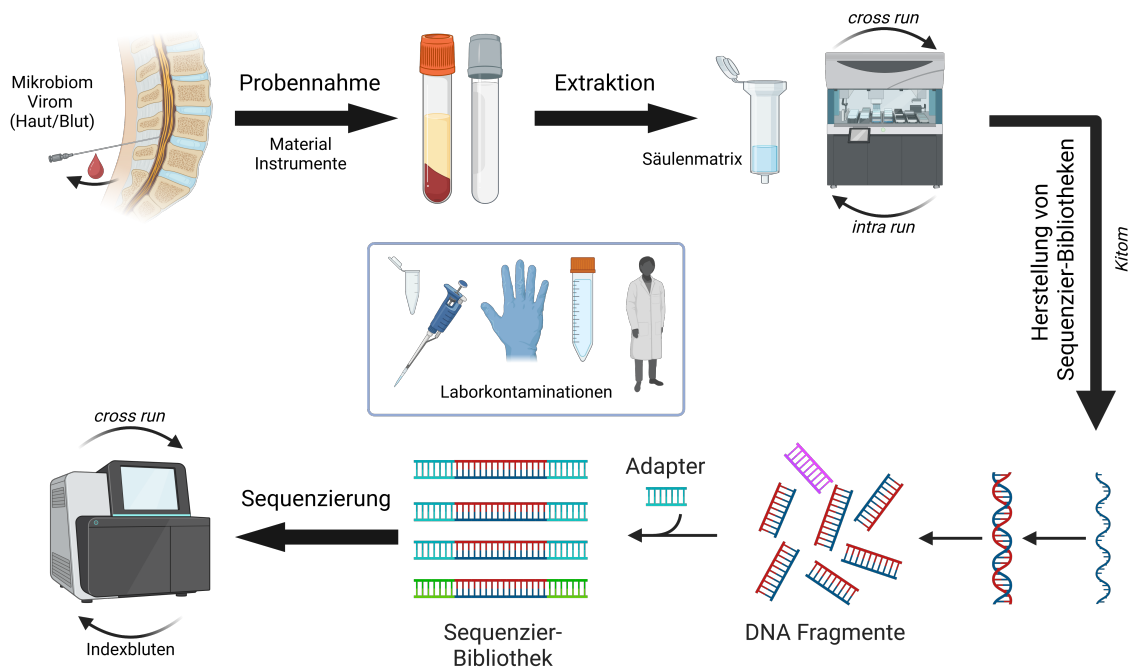


Abbildung 9. Schematischer Überblick über den Arbeitsablauf und mögliche Kontaminationsquellen. Bereits bei der Entnahme der Liquorprobe im Rahmen der Lumbalpunktion kann es zu Kontaminationen durch das Hautmikrobiom oder geringfügige Blutbeimengungen kommen. Bei der Extraktion können Nukleinsäuren von der Silikamembran eluiert werden. Bei der Verwendung von Extraktionsrobotern kann es während eines Extraktionslaufs zu Kontaminationen kommen. Auch die Verschleppung von Molekülen zwischen zwei Läufen ist möglich, z. B. durch das Totvolumen in den Schläuchen. Bei der Herstellung von Sequenzier-Bibliotheken gibt es zahlreiche Kontaminationsmöglichkeiten, darunter auch Verunreinigungen innerhalb der kommerziellen Kit-Reagenzien (sogenanntes Kitom). Auch im Endgerät kann es während der Sequenzierung zu Verschleppungen kommen. Indexbluten kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Verunreinigungen können während des gesamten Prozesses durch Materialien, Geräte, Pipetten und den Experimentator auftreten. Erstellt mit BioRender.com.

Blut-Kontamination während der Lumbalpunktion

Bereits während der Lumbalpunktion können geringste Mengen Blut die Liquor-Probe kontaminieren²⁴³. In einigen Fällen ist eine Blutkontamination des Liquors bereits makroskopisch sichtbar (Abbildung 10). Dies kann zum Nachweis von im Blut zirkulierenden Viren führen und muss bei der Bewertung von Virusfunden in Betracht gezogen werden. Eine mögliche Störung der Blut-Hirn-Schranke kann mit Hilfe eines Reiber-Diagramms und der Zählung von Erythrozyten untersucht werden²⁴⁴. Die Vollgenomsequenzierung verschiedener Probenarten und eine anschließende Untersuchung der Viruspopulationen (Kapitel 4.5.) kann dazu beitragen Kompartiment-spezifische Replikation nachzuweisen.

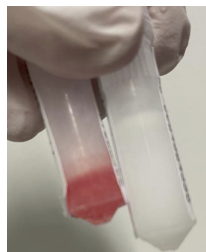


Abbildung 10. Gefrorene Liquorproben. Die linke Probe zeigt makroskopisch sichtbare Einblutungen.

Kontaminationen durch Säulen-basierte Extraktion

Bei der Säulen-basierten Extraktion können Nukleinsäuren aus der Matrix ausgewaschen werden²⁴⁵. Aufgrund der (hohen) Sensitivität des HTS können diese Nukleinsäuren detektiert und fälschlicherweise als positiver Befund gewertet werden. So wurde beispielsweise das Norway Luteo-like Virus 4 im Liquor eines Patienten mit neurologischen Symptomen gefunden. Insgesamt wurden 81,8% des Genoms sequenziert, das zu 97,0% mit der Referenzsequenz MF141070.1 identisch war (Abbildung 11).

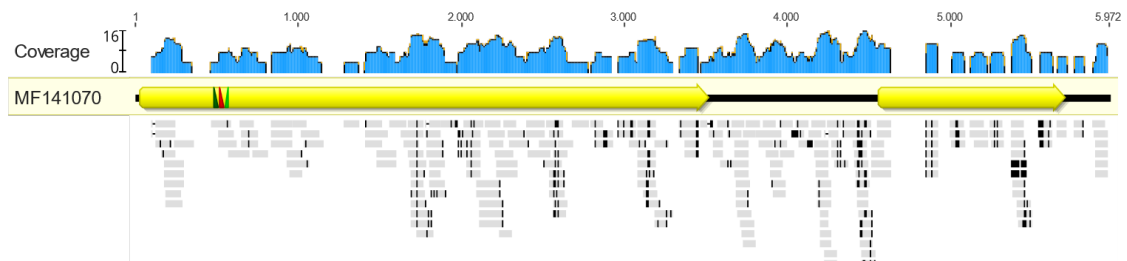


Abbildung 11. Genomabdeckung des Norway Luteo-like Virus 4, das im Liquor eines Enzephalitis-Patienten detektiert wurde. Schwarz hervorgehoben sind Unstimmigkeiten zur Referenz MF141070.1 (gelb). Bindestellen von Primern (grün) und Sonde (rot) sind durch Dreiecke markiert.

Luteoviren infizieren Pflanzen²⁴⁶, jedoch wurde dieses Virus in Zecken in Norwegen beschrieben²⁴⁷. Zur Verifizierung des Virusnachweises wurde eine spezifische RT-qPCR auf der Grundlage der generierten Contigs entwickelt (Abbildung 11). Virale Nukleinsäure war sowohl in der Sequenzier-Bibliothek als auch in der extrahierten RNA nachweisbar. Um zu überprüfen, ob es sich um eine Kontamination während der Extraktion handelte, wurden alle Puffer neu angesetzt, einzeln auf frische Extraktionssäulen pipettiert und zentrifugiert. Diese Eluate wurden mittels spezifischer RT-qPCR getestet. Virale RNA wurde in allen Extrakten nachgewiesen. Somit wurde eine Kontamination der Qiagen-Säulen als wahrscheinlichste Ursache identifiziert. Pettersson et al.²⁴⁷, die das Luteo-like Virus beschrieben, verwendeten ebenfalls eine Säulen-basierte Extraktionsmethode. Aufgrund der hohen Identität zwischen den Sequenzen ist es möglich, dass die Autoren eine Kontamination beschrieben haben.

Kontaminationen durch Extraktionsroboter

Mit automatisierten Extraktionsrobotern können Moleküle innerhalb eines Laufs (*intra run*), aber auch zwischen Läufen (*cross run*) verschleppt werden. Im Rahmen der retrospektiven Liquor Studie (Kapitel 4.2.1.) wurden Proben mit einem Extraktionsroboter (MAGNA Pure) extrahiert. In der 2021-Kohorte wurden in vier Pools Dengue-Virus (DENV) Sequenzen identifiziert. Jedoch wurde in keiner Einzelprobe, nach erneuter Extraktion, per spezifischer RT-qPCR DENV RNA bestätigt. Direkt zuvor wurden humane Serumproben aus Südamerika auf diesem Gerät extrahiert. Nach Rücksprache mit den Verantwortlichen konnte bestätigt werden, dass in diesen Proben DENV-positive Seren vorlagen. Ein Datenbankabgleich einzelner Sequenzen zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu DENV-Referenzsequenzen aus Brasilien (97,7% OR025653.1). Daher ist es

wahrscheinlich, dass es sich hierbei um eine *cross run* Kontamination innerhalb des Extraktionsroboters handelte.

Cross run Kontamination im Sequenzierer

Eine weitere Kontaminationsquelle stellt die sogenannte *cross run* Kontamination dar. Hierbei können wenige Moleküle der Sequenzier-Bibliothek im Sequenzier-System (z. B. Schläuche) verbleiben. Diese werden bei den folgenden Sequenzierläufen auf die *Flowcell* gespült und sequenziert.

Um dies zu untersuchen, wurden zwei aufeinanderfolgende Sequenzierläufe analysiert. FSME-Virusisolate wurden mittels Illumina MiSeq sequenziert. Im folgenden Lauf wurden die verwendeten Adapter nicht verwendet. Insgesamt wurden 0,49% der 2,59 Millionen *Undetermined*-Sequenzen als FSME-Sequenzen identifiziert. Diese deckten dabei das vollständige Genom ab. Daher ist es erforderlich zu wissen, welche Adapter zuvor verwendet wurden und welche Art von Proben/Viren sequenziert wurden. Adapter sollten so gewählt werden, dass sie möglichst selten hintereinander verwendet werden. Indexe, die so durch *cross run* Kontamination sequenziert werden, werden dann beim Demultiplexen den *Undetermined*-Sequenzen zugeordnet.

Indexbluten

Während der Sequenzierung kann es zu Fehlern beim Ablesen der Indexe kommen, sodass Sequenzen dem falschen Index und schließlich der falschen Probe zugeordnet werden (Indexbluten). Dies kann insbesondere dann beobachtet werden, wenn Proben mit hoher Viruslast, z. B. Zellkultur-Isolate, im selben Lauf sequenziert werden. Dies konnte beobachtet werden, als auf einem Illumina Nextseq 1000 sechs *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS)-Isolate sequenziert wurden. Virale Sequenzen wurden dabei in 10 der 29 weiteren Proben detektiert. Die bioinformatische Pipeline identifizierte dabei zwischen 10 - 1640 Sequenzen.

Wird mittels HTS-Diagnostik virale Nukleinsäure nachgewiesen, stellen sich verschiedene Fragen zur Richtigkeit des Befundes. Abbildung 12 veranschaulicht den Arbeitsablauf bei der Bewertung viraler Befunde, um eine Kontamination auszuschließen bzw. zu bestätigen. Besteht ein begründeter Verdacht auf eine Kontamination, so sollte die Probe erneut extrahiert werden, idealerweise mit einer zweiten Extraktionsmethode. Zur Bestätigung sollte anschließend eine spezifische PCR durchgeführt werden.

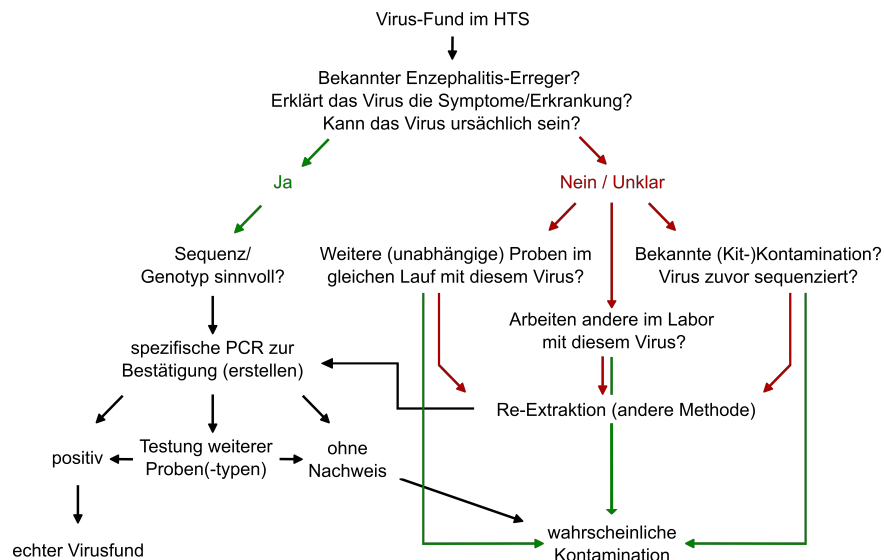


Abbildung 12. Schematische Darstellung zum Arbeitsablauf bei der Detektion viraler Nukleinsäure zum Ausschluss potentieller Kontaminationen.

4.1.6. Arbeitsablauf für die Diagnostik

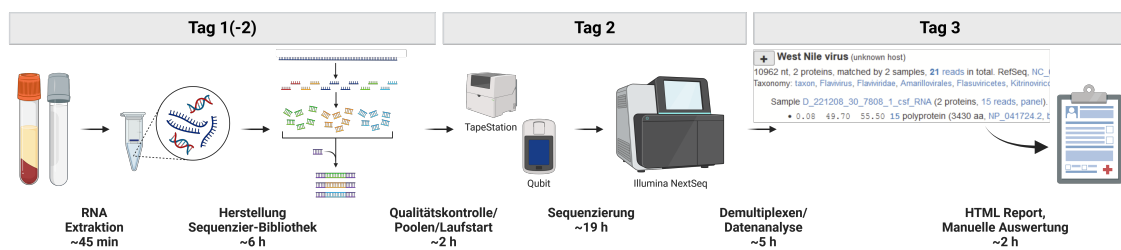


Abbildung 13. Schematischer Arbeitsablauf der HTS-Diagnostik. Nach der Nukleinsäureextraktion wird eine Sequenzier-Bibliothek erstellt. Nach der Qualitätskontrolle werden die Bibliotheken in einem Pool zusammengefasst und der Sequenzierlauf gestartet. Dies kann innerhalb eines Arbeitstages geschehen. Die Rohdaten werden anschließend anhand der verwendeten Adaptersequenzen bioinformatisch den einzelnen Proben zugeordnet und die Analyse gestartet. Die Überprüfung der Ergebnisse sollte durch geschultes Personal im Vier-Augen-Prinzip erfolgen. Optional kann eine Überprüfung der Ergebnisse mit einer spezifischen PCR erfolgen. Die Ergebnisse werden dann an die behandelnden Ärzte übermittelt.

Abbildung 13 zeigt schematisch den Arbeitsablauf der HTS-Diagnostik. Die Extraktion, Vorbereitung einer Sequenzier-Bibliothek und der Start des Sequenzierlaufs können innerhalb eines Tages durchgeführt werden. Die Sequenzierung wird über Nacht mit einer Laufzeit von etwa 19 Stunden durchgeführt (NextSeq500/550, 150 Zyklen). Nach der Übertragung der Rohdaten auf den *Cluster* des Berliner Institutes für Gesundheitsforschung kann die Datenanalyse gestartet werden. Die Laufzeit der Pipeline variiert in Abhängigkeit von der Datenmenge und der Zusammensetzung der Ergebnisse. Die Laufzeit lag zwischen 30 min und 2 h 22 min (Mittelwert: 1 h 19 min) für acht Läufe der retrospektiven Liquor Studie und drei diagnostische Läufe mit zusätzlichen forschungsassoziierten Proben. Optional werden anschließend PCR-Analysen durchgeführt, um den Virusbefund zu bestätigen, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben.

4.1.7. Optimierte Techniken für die Vollgenomsequenzierung

Teile dieses Kapitels wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Ruscher, C.*, Patzina-Mehling, C.*, **Melchert, J.***, Graff, S. L., McFarland, S. E., Hieke, C., Kopp, A., Prasser, A., Tonn, T., Schmidt, M., Isner, C., Drosten, C., Werber, D., Corman, V. M. & Junglen, S. Ecological and clinical evidence of the establishment of West Nile virus in a large urban area in Europe, Berlin, Germany, 2021 to 2022. **Eurosurveillance** 28, 2300258 (2023). (*, geteilte Erstautorenschaft)

Melchert, J., Radbruch, H., Hanitsch, L. G., Baylis, S. A., Beheim-Schwarzbach, J., Bleicker, T., Hofmann, J., Jones, T. C., Drosten, C. & Corman, V. M. Whole genome sequencing reveals insights into hepatitis E virus genome diversity, and virus compartmentalization in chronic hepatitis E. **J. Clin. Virol.** 168, 105583 (2023).

Die Sequenzierung von klinischem Probenmaterial kann durch:

- I. eine geringe Viruslast (z. B. spät im Infektionsverlauf oder unter Therapie),
- II. degradierte Nukleinsäuren,
- III. neuartige Erreger,
- IV. einen hohen Wirtsgenom-Hintergrund und/oder
- V. Quasispezies/Doppelinfectionen erschwert sein.

Für die Generierung von Vollgenomsequenzen wurden daher zwei Strategien entwickelt. Zum einen wurde eine Amplikon-basierte Strategie für das WNV etabliert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend mittels Oxford Nanopore sequenziert. Zum anderen wurden für folgende Viren im Rahmen dieser Arbeit *Capture*-basierte Systeme für die gezielte Anreicherung viraler Sequenzen etabliert:

- Arboviren (WNV, TOSV, Gelbfieberevirus, Sandmückenfieberevirus (SFV), zusätzlich Astroviren)
- Pegiviren (HPgV, ICTV Spezies)
- Picornaviren (CoSV A-F, Enterovirus A-D, Rhinovirus A-C, zusätzlich: EBV nukleäres Antigen 1)
- Coronaviren (SARS-CoV, SARS-CoV-2, *Middle East respiratory syndrome coronavirus*, endemische Coronaviren: NL63, OC43, HKU1, 229E)

Die *Capture*-basierte Sequenzierung wurde insbesondere für HEV, WNV und HPgV-1 angewendet und ist in den Kapiteln 4.3. und 4.4. ausführlich beschrieben. Die Amplikon-basierte Sequenzierung ist am Beispiel WNV in Kapitel 4.4. beschrieben. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HTS-Arbeitsablauf ist in Abbildung 14 grafisch zusammengefasst.

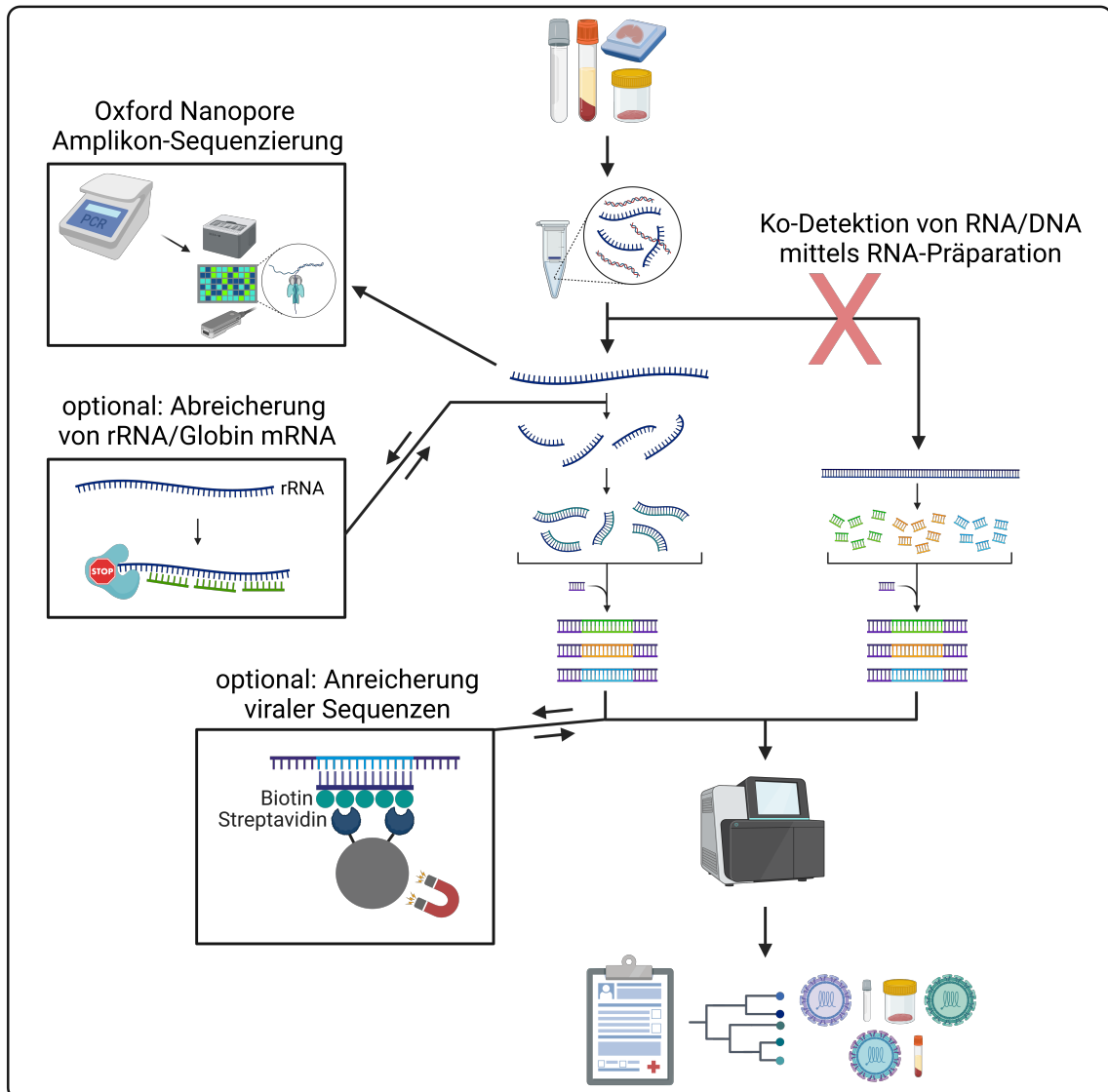


Abbildung 14. Schematische Zusammenfassung des HTS-Arbeitsablaufs und möglicher Schnittstellen für die gezielte Anreicherung viraler Nucleinsäuren oder die Abreicherung von Wirtsgenom. Nach der Nucleinsäure-Extraktion wird eine Sequenzier-Bibliothek erstellt. Eine spezifische DNA-Präparation ist nicht erforderlich. Es wurde gezeigt, dass DNA-Viren auch mit einer RNA-Präparation nachgewiesen werden können. Während der Fragmentierung können optional rRNA und Globin mRNA abgereichert werden. Dies empfiehlt sich insbesondere bei Proben mit hohem Wirtsgenom-Hintergrund, z. B. bei Gewebeproben. Virale Nucleinsäure in den erzeugten Sequenzier-Bibliotheken kann optional angereichert werden, um das Verhältnis von viralen zu generierten Sequenzen zu erhöhen. Nach der Sequenzierung sollten die viralen Befunde auf mögliche Kontaminationen überprüft werden. Anschließend können weitere Analysen (phylogenetische Studien, Virusdiversitätsanalysen) durchgeführt werden. Nach der Extraktion der viralen Nucleinsäure kann eine spezifische Amplifikation durchgeführt werden und die resultierenden Amplicons können mittels Oxford Nanopore sequenziert werden. Erstellt mit BioRender.com.

4.2. Rolle von seltenen und neuartigen Erregern in ungeklärten Enzephalitis-Fällen in Berlin

Die in Kapitel 4.1 weiterentwickelte Sequenzierungsmethode wurde eingesetzt, um Enzephalitis-Fälle unklarer Ursache zu untersuchen. Zum einen wurden 1676 Liquorproben retrospektiv untersucht. Zum anderen wurde die Methode in der Routinediagnostik bei akuten Patienten der Charité - Universitätsmedizin Berlin angewendet.

4.2.1. Retrospektive Untersuchung von Liquorproben

Labor Berlin erhält jährlich etwa 1000 Liquorproben von Enzephalitis- und Meningitis-Patienten zur Untersuchung auf 14 der häufigsten Erreger (ME/E-Panel, Kapitel 1.1.). Im Durchschnitt bleiben etwa 88% dieser Panel-Untersuchungen ohne positives Ergebnis (Tabelle 20). Im Folgenden wurde der etablierte HTS Arbeitsablauf retrospektiv auf diese Proben angewendet.

Tabelle 20. Überblick über die Gesamtstruktur der ausgewerteten ME/E-Panels und die Anzahl der untersuchten Proben. Die Daten basieren auf einem Datenbankauszug vom 03.02.2023, der von Labor Berlin zur Verfügung gestellt wurde.

	2019	2020	2021	2022	Σ
Einsendungen	988	931	1332	1610	4861
Geschlecht					
weiblich	452	445	596	707	2200
männlich	536	485	734	897	2652
unbekannt	0	1	2	6	9
Alter					
<5	183	203	267	320	973
5-15	92	93	106	143	434
15-25	81	67	90	100	338
25-45	192	164	197	262	815
45-65	211	188	326	363	1088
>65	226	215	344	416	1201
unbekannt	3	1	2	6	12
Panel ohne Befund	832 (84,2%)	836 (89,8%)	1219 (91,5%)	1404 (87,2%)	4291 (88,3%)
per HTS untersuchte Proben	333	340	489	514	1676

Ziel war es, ursächliche virale Erreger zu identifizieren. Im Hinblick auf die ersten autochthonen WNV-Fälle in Deutschland wurden Proben aus den Monaten Juni bis Oktober, dem Zeitraum der WNV-Saison, untersucht. Insgesamt wurden 1676 Proben individuell mittels MagnaPure extrahiert. Bis zu neun Nukleinsäure-Extrakte wurden anschließend in einem Pool zusammengefasst ($n(9)=12$, $n(8)=192$, $n(7)=2$, $n(6)=2$, $n(5)=1$). Die Pools wurden dann mittels Illumina Nextseq (150/300 Zyklen, *high-output*) *paired-end* sequenziert. Für die Pools wurden

zwischen 1,2 und 57,2 Millionen Sequenzen generiert (Mittelwert: 13,1 Millionen; Median: 11,5 Millionen). In Tabelle 21 sind die Virusfunde zusammengefasst.

Tabelle 21. Übersicht der mittels HTS detektierten Pathogene auf Poolebene.

Genom	Familie	Genus	Spezies	2019	2020	2021	2022	Σ
(-)ssRNA	<i>Phenuiviridae</i>	<i>Phlebovirus</i>	Toskana-Virus	1/42	0/42	0/61	0/64	1/209
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	Hepatitis-C-Virus	1/42	0/42	0/61	0/64	1/209
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	West-Nil-Virus	0/42	0/42	2/61	0/64	2/209
	<i>Flaviviridae</i>	<i>Pegivirus</i>	Pegivirus	3/42	8/42	8/61	4/64	23/209
(+)ssRNA	<i>Hepeviridae</i>	<i>Paslahepevirus</i>	Hepatitis-E-Virus	0/42	1/42	1/61	0/64	2/209
	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Morbillivirus</i>	Masernvirus	1/42	0/42	0/61	0/64	1/209
	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Echovirus, Coxsackievirus	1/42	0/42	1/61	1/64	3/209
	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	Humanes Immundefizienz- Virus	1/42	2/42	5/61	0/64	8/209
dsRNA, segmen- tiert	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	0/42	0/42	1/61	0/64	1/209
ss/ds DNA	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	Hepatitis-B-virus	1/42	1/42	0/61	0/64	2/209
(-)ssDNA, zirkulär	<i>Anelloviridae</i>	<i>Alphatorquevirus</i>	Torque-teno-Virus	0/42	2/42	2/61	1/64	5/209
	<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Roseolovirus</i>	Humanes Betaherpesvirus 6	0/42	0/42	0/61	1/64	1/209
dsDNA	<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Epstein-Barr-Virus	0/42	0/42	0/61	2/64	2/209
	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Gammapapillomavirus</i>	Papillomavirus	0/42	1/42	0/61	2/64	3/209
dsDNA, zirkulär	<i>Polyomaviridae</i>	<i>Alphapolyomavirus</i>	Polyomavirus	0/42	0/42	1/61	1/64	2/209
Σ				9/42	15/42	21/61	12/64	57/209

Die retrospektive Sequenzierung ergab den Nachweis von Hepatitis-B-Virus (n=2), Hepatitis-C-Virus (n=1), Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) (n=8) und Herpesviren (n=3) im Liquor. Diese virämischen Viren sind dafür bekannt, dass sie ZNS-Symptome hervorrufen können. Es kann sich aber auch um Blutkontaminationen handeln. Dies wäre auch für das Torque-teno-Virus (n=5) möglich. EBV-, HHV-6- und HIV-Sequenzen können zusätzlich von endogenen Genomabschnitten stammen. Diese Befunde wurden nicht weiter untersucht.

Aufgrund der wiederholten Detektion von Rotavirus- (n=1), Papillomavirus- (n=3) und Polyomavirus-Sequenzen (n=2), auch in Kontrollen, wurden diese von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Es wurden keine Sequenzen gegen das JC-Polyomavirus entdeckt. Eine Infektion mit Enteroviren hätte durch die zuvor erfolgte Panel-Testung ausgeschlossen werden sollen. Die hohe Diversität dieser Viren könnte zu Primer-Fehlpaarungen im verwendeten diagnostischen Assay und somit zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben. Die nt-Identität zur nächsten bekannten Referenz betrug 93,4%-95,5%. Es ist auch möglich, dass die Sensitivität der HTS-basierten Diagnostik höher war. Diese Virusfunde wurden nicht weiter untersucht.

Der Nachweis von WNV und HPgV-1 wird in den Abschnitten 4.4. und 4.5. ausführlich behandelt.

Seltene ZNS-Erreger: HEV und Masernvirus

Die retrospektive Sequenzierung führte zur Identifizierung von Masernvirus-Sequenzen in einem Pool. Die Überprüfung der Aufzeichnungen der in diesen Pool aufgenommenen Patienten bestätigte eine Masernvirus-Infektion.

In einem Pool wurde eine HEV-Sequenz nachgewiesen. Mittels RT-qPCR wurde in einer Einzelprobe virale Nukleinsäure bestätigt (ct-Wert: 39,12; $6,15 \times 10^3$ iU/mL). Eine vollständige Genomsequenz wurde, wie in Kapitel 4.3. genauer beschrieben, erstellt. Eine phylogenetische Analyse ergab, dass es sich um den HEV-Genotyp 3c handelte (Abbildung 22A, Abschnitt 4.3.). In diesem Fall war zuvor keine HEV-Infektion bekannt. Diese wurde erst durch die retrospektive Sequenzierung identifiziert. In einem weiteren Pool wurde ebenfalls eine HEV-Sequenz detektiert. Bei keiner der Einzelproben in diesem Pool konnte jedoch virale Nukleinsäure in der spezifischen RT-qPCR nachgewiesen werden.

Toskana Virus

Eine einzelne Sequenz wurde dem TOSV durch die Auswertungspipeline zugeordnet. Eine RT-PCR für Phleboviren bestätigte virale RNA im Nukleinsäure-Extrakt. Virale Nukleinsäure wurde auch in einer zweiten, Säulen-basierten Extraktion nachgewiesen. Die Sequenzierung der Einzelprobe ergab wenig genomische Informationen, so dass die virale Nukleinsäure mit einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten *Capture*-Kit angereichert wurde. Verbleibende genomische Lücken wurden durch sequenzspezifische RT-PCRs (Tabelle A2) und Sanger-Sequenzierung geschlossen.

Im Jahr 2020 wurde Liquor eines Enzephalitis-Patienten nach negativer Paneluntersuchung zur HTS-Diagnose eingesandt. Bei der Sequenzierung wurden TOSV-Sequenzen identifiziert. In der Zwischenzeit entwickelte der Patient infektionsspezifische Symptome, was zu einer gezielten Anfrage der behandelnden Ärzte führte. Die Routinediagnostik bestätigte die TOSV-Infektion. Bei der retrospektiven Sequenzierung wurde Liquor des Patienten mit derselben Auftragsnummer untersucht. Für den Pool (acht Einzelproben) wurden insgesamt 17.775.678 Sequenzen generiert, aber keine TOSV-Sequenzen identifiziert.

Ein dritter Fall wurde 2022 über die Routinediagnostik nach gezielter Anfrage der behandelnden Ärzte identifiziert. Für die ersten beiden Fälle wurde eine vollständige Genomsequenz erstellt. Für diesen Fall wurden das komplette S-Segment und teilweise die M- und L-Segmente sequenziert.

Eine phylogenetische Analyse ergab eine enge Verwandtschaft mit mediterranen TOSV-Sequenzen. Alle Patienten gaben an, zuvor in den Mittelmeerraum gereist zu sein. Je eine Sequenz wurde den TOSV-Linien A, B bzw. C zugeordnet (Abbildung 15). Die Sequenz des Falles aus dem Jahr 2019 ist dabei besonders auffällig, da sie in allen Segmenten nur zu ~80% identisch zur nächsten bekannten TOSV-Sequenz ist (Tabelle 22). Der Patient berichtete, dass er sich zuvor in Kroatien aufgehalten hatte.

Tabelle 22. Nukleotid-Identität zur nächsten bekannten NCBI-Referenz und deren Ursprung.

Segment	Fall 2019	Fall 2020	Fall 2022
S	79,8% MN940423.1 (Italien)	99,5% MK422500.1 (Schweiz, importiert aus Italien ²⁴⁸)	99,2% EU327772.1 (Italien)
M	79,3% KM507329.1 (Italien)	99,3% MK422499.1 (Schweiz, importiert aus Italien ²⁴⁸)	*95,7% EU003176.1 (Italien)
L	79,1% ON165937.1 (Algerien)	99,6% MK422498.1 (Schweiz, importiert aus Italien ²⁴⁸)	**95,1% ON375791.1 (Italien)

*55,5% Genomabdeckung; **85,2% Genomabdeckung.

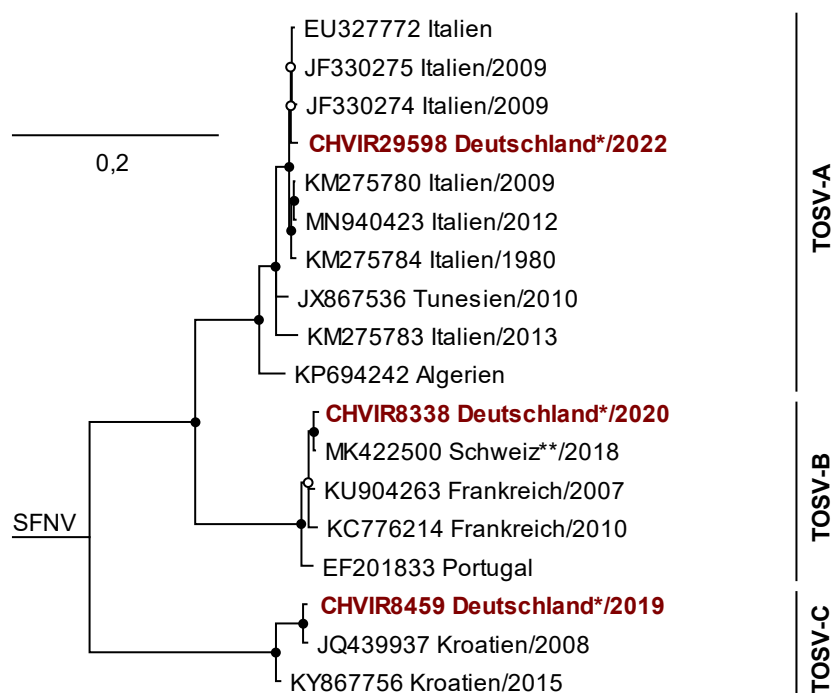


Abbildung 15. Phylogenetische Analyse der kodierenden Region des TOSV S-Segmentes. Die Berechnung erfolgte mit dem MrBayes²²⁹ PlugIn in Geneious Prime (v2022.0.1) unter Verwendung des Substitutionsmodells GTR+G und einer Million Wiederholungen. SFNV (EF201832.1) wurde als Außengruppe und für das Rooten des Baumes verwendet. *Bootstrap*-Werte von $\geq 70\%$ sind durch einen weißen Kreis, Werte von $\geq 90\%$ durch einen schwarzen Kreis dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Sequenzen sind rot hervorgehoben. TOSV, Toskana-Virus, SFNV, Sandmückenfiebertyp Neapel; *, importierte Infektion; **, importierte Infektion²⁴⁸.

4.2.2. Akute Enzephalitis-Fälle

Durch die Anwendung der etablierten Methode für die Diagnostik akuter, ungeklärter Enzephalitiden wurden zahlreiche Pathogene identifiziert. Im Folgenden werden zwei Fälle genauer beschrieben.

Cosavirus in einem Kind mit akuter, schlaffer Paralyse

Teile dieses Kapitels wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Schneider, J., Engler, M., Hofmann, J., Selinka, H. C., Jones, T. C., Drosten, C., Diedrich, S., Corman, V. M. & Böttcher, S. Molecular detection of cosaviruses in a patient with acute flaccid paralysis and in sewage samples in Germany. *Virus Res* 297, 198285 (2021).

Ein dreijähriger Junge wurde mit Fieber und akuter, schlaffer Lähmung hospitalisiert. Das Kind musste über mehrere Wochen beatmet werden, da die akute, schlaffe Lähmung auch das Atmungssystem beeinträchtigte. Die Reiseanamnese beinhaltete eine wochenlange Pakistan-Reise. Es war nicht möglich den Impfstatus des Kindes, besonders im Hinblick auf Poliomyelitis, zu ermitteln. Es erfolgte eine breite diagnostische Untersuchung zum Ausschluss der folgenden Erreger: Enteroviren (einschließlich Poliovirus), Parechovirus, AdV, verschiedener Herpesviren, lymphozytäres Choriomeningitis Mammarenavirus und FSME sowie bakterieller Erreger, die das Guillain-Barre-Syndrom auslösen können. Das Institut für Virologie erhielt Liquor und Stuhl für die Erreger-Identifikation mittels HTS. Während keine viralen Sequenzen im Liquor detektiert wurden, konnte ein partielles HCoV Genom aus der Stuhlprobe generiert werden. Um die Genomlücken zu schließen, wurden *hemi-nested* PCR-Primer entwickelt und die resultierenden Amplifikate Sanger-sequenziert. Die Vollgenomsequenz wurde unter der Accession Nummer MT094379.1 veröffentlicht.

Für die Bestimmung der Viruslast wurden eine spezifische RT-qPCR und ein *in vitro* Transkript etabliert. Es war nicht möglich virales Genom in drei Liquorproben nachzuweisen. Dagegen wurde eine abfallende Viruslast im Stuhl beobachtet. Vier Tage nach Symptombeginn wurde eine Viruslast von $2,6 \times 10^6$ cp/μL ermittelt, wobei 9 Tage später nur noch $3,9 \times 10^4$ cp/μL nachweisbar waren (Abbildung 16).

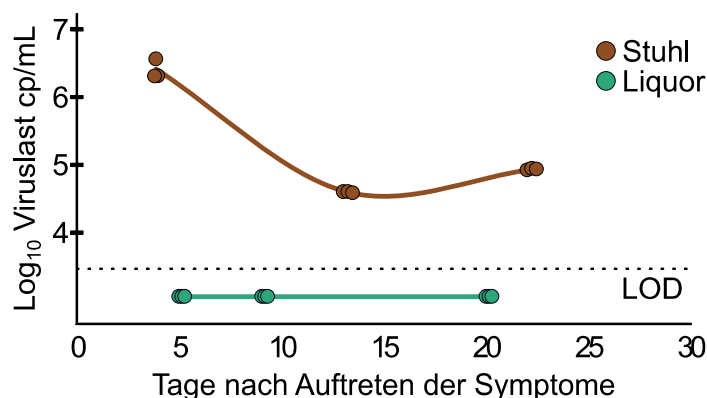


Abbildung 16. Viruslast im Liquor und Stuhl nach Auftreten der Symptome. ⁷³, modifiziert. LOD, *limit of detection* - Nachweisgrenze.

Für die Genom-Charakterisierung wurde zunächst eine SimPlot-Analyse durchgeführt. Diese zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu Sequenzen der Spezies CoSV-D. Eine typische Genomorganisation wurde beobachtet (Abbildung A1). Eine Rekombinations-Analyse mittels RDP4²³³ zeigte keine Hinweise auf eine mögliche Rekombination (nicht gezeigt). Eine phylogenetische Analyse der kodierenden Region bestätigte die nahe Verwandtschaft zu anderen CoSV-D Sequenzen (Abbildung 17).

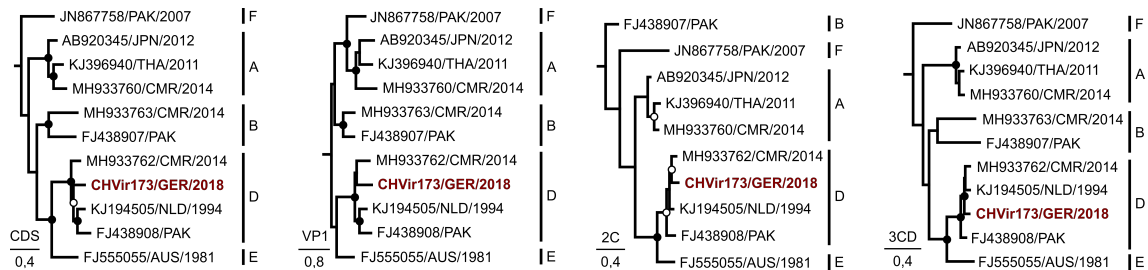


Abbildung 17. Maximum-Likelihood-Analyse der neuen HCoV-Sequenz und Vertretern bekannter Spezies.⁷³, modifiziert. Die vier Bäume zeigen die Phylogenien der kodierenden Region (CDS) und der Regionen VP1, 2C und 3CD. Die neuen HCoV-Sequenz ist hervorgehoben. Die Sequenznamen setzen sich aus GenBank Accession-Nummer, Herkunftsland und -jahr zusammen. Cardiovirus (EU681179, nicht gezeigt) wurde als Außengruppe und zum Rooten der Bäume verwendet. *Bootstrap*-Werte an Knoten mit $\geq 90\%$ sind durch schwarze Punkte und Werte $\geq 75\%$ mit weißen Punkten dargestellt (5000 Wiederholungen).

Laut ICTV Kriterien wird ein neuartiges CoSV als neue Spezies behandelt, wenn sich deren Sequenz auf AA-Ebene zu mehr als 35% in der VP1- bzw. mehr als 10% in der 2C- und 3CD-Region von bekannten CoSV unterscheidet und die typische CoSV-Genomorganisation besitzt⁶⁴. Das neuartige HCoV wurde mit bekannten Referenzen auf AA-Ebene verglichen. Dabei zeigte sich eine AA-Identität von über 90% in der 2C, 3C und 3D Region (CoSV-D), lediglich in der VP1-Region wurde eine Divergenz über 35% beobachtet (Tabelle 23).

Tabelle 23. Vergleich der AA-Identität der neuen HCoV-Sequenz zu Referenzsequenzen.

Genom-Abschnitt	% AA-Identität zu CoSV Spezies ^a				
	A ^b	B ^c	D ^d	E ^e	F ^f
2C	73,2-75,4	66,0-67,3	94,4-98,4	88,5-98,8	65,1
3C	58,1-60,6	54,2-63,5	94,6-96,6	76,8-96,6	53,7
3D	68,6-69,9	70,6-71,0	94,8-95,2	77,3-96,3	66,5
VP1	34,2-38,2	39,7-40,0	56,4-63,7	44,0-48,0	38,2

^a Berechnet mit Geneious Prime (v11). Einschließlich der GenBank Accession-Nummern: ^b AB920345, GU968209, KJ396940, MG571817, MG571818, JN867756, JN867759, FJ438902, MH933760, FJ438903, ^c FJ438907, MH933763, ^d FJ438908, KJ194505, MH933762, ^e FJ555055, MH933761, MH933764, MH933765, ^f JN867758. AA, Aminosäuren; CoSV, Cosavirus.

Dobrava-Belgrad-Virus im ZNS

Liquorproben eines Herztransplantierten Patienten mit neurologischen Auffälligkeiten wurden für die HTS-Diagnostik eingesendet. Dabei wurden DOBV-Sequenzen identifiziert und daher weitere archivierte Proben untersucht. Eine spezifische RT-qPCR bestätigte virale RNA im Liquor über 36 Tage und im Serum über 46 Tage. Virale RNA wurde ebenfalls in einem Trachealsekret und einer Bronchoalveolären Lavage (BAL) nachgewiesen. Die höchste Viruslast ($4,6 \times 10^6$ cp/mL) wurde dabei in einer Liquorprobe gemessen, die am Tage der Hospitalisierung entnommen wurde (Abbildung 18A). Auch in einer FFPE Hirnbiopsie wurde virale Nukleinsäure detektiert (ct-Wert: 34,7). Der Patient starb im weiteren Verlauf.

IgM- und IgG-Antikörper wurden im Serum nachgewiesen, jedoch nicht in den Liquorproben (Abbildung 18B). Ein Immunoblot war reaktiv für DOBV und Hantaan-Virus IgM-/IgG-Antikörper, jedoch nicht gegen PUUV-Antikörper (nicht gezeigt). Für einige Proben waren lediglich RNA-Extrakte verfügbar und somit keine serologischen Untersuchungen möglich. Daten zur möglichen Exposition oder dem Symptombeginn lagen nicht vor.

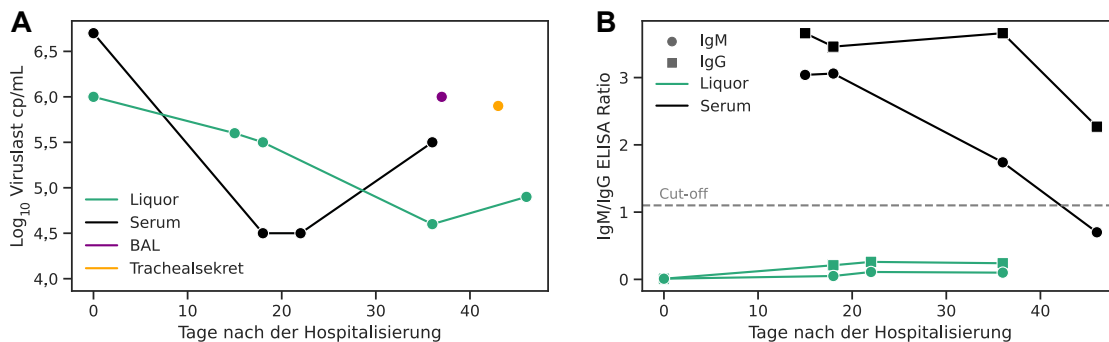


Abbildung 18. Übersicht über DOBV-Viruslast (A) und -Antikörper (B) in verschiedenen Probenotypen. BAL, Bronchoalveoläre Lavage; Ig, Immunglobulin.

Es konnten Vollgenomsequenzen aller Genom-Segmente für Liquor, Serum, BAL sowie Hirnbiopsie generiert werden. Eine phylogenetische Analyse zu Referenzsequenzen ergab, dass es sich bei diesem Virusstamm um den DOBV-Genotyp Kurkino handelt, der eine nahe Verwandtschaft zu Sequenzen aus Nagetieren aufzeigt (Abbildung 19). Das S- und M-Segment zeigten die höchste nt-Identität (~97% GQ205406.1, GQ205411.1) zu Sequenzen aus Brandenburg, Landkreis Ostprignitz-Ruppin. Die ähnlichste Referenz für das L-Segment war JQ026206.1 mit ~90% nt-Identität. Diese stammt aus einem humanen Fall aus Mecklenburg-Vorpommern.

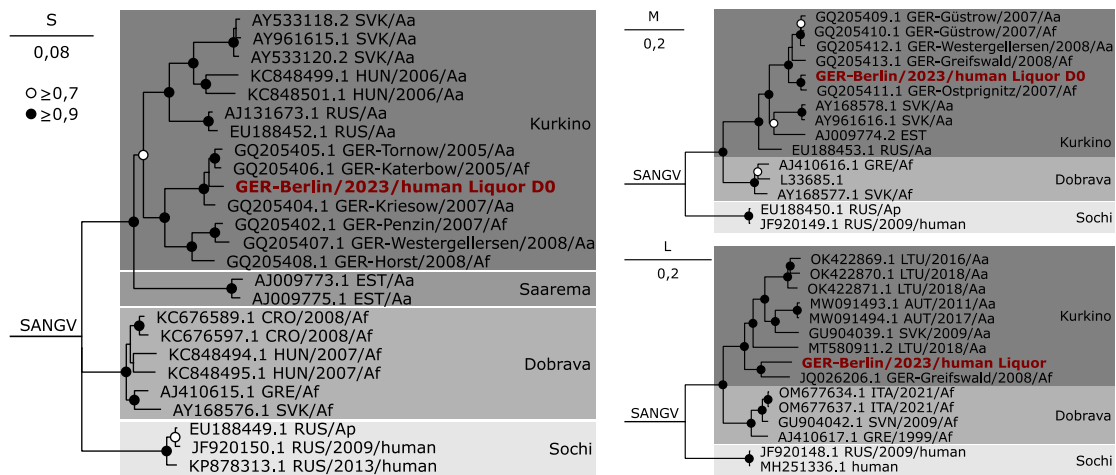


Abbildung 19. Phylogenetische Analyse der kodierenden Region des S-, M- und L-Segmentes der DOBV-Sequenz des Patienten zu Referenzsequenzen. Die Berechnung erfolgte mit dem MrBayes²²⁹ Plugin in Geneious Prime (v2022.0.1) unter Verwendung des Substitutionsmodells GTR+G für das S-Segment, GTR+I+G für das M- und L-Segment sowie vier Million Wiederholungen. *Bootstrap*-Werte von $\geq 70\%$ sind durch einen weißen Kreis, Werte von $\geq 90\%$ durch einen schwarzen Kreis dargestellt. Sangassou-Virus (JQ082301-3.1) wurde als Außengruppe und für das Rooten des Baumes verwendet (nicht gezeigt). Referenzsequenzen^{249,250} beinhalten die Accession-Nummer, Herkunftsland, Beprobungsjahr sowie Wirt, wenn bekannt. Aa, *Apodemus agrarius*; Af, *Apodemus flavicollis*; Ap, *Apodemus ponticus*; D, Tag; SANGV, Sangassou-Virus.

Um das Vorhandensein von viralen Subpopulationen zwischen den Kompartimenten zu untersuchen, wurde eine Konsensussequenz für eine Serumprobe (Tag (D) der Hospitalisierung, D0) erstellt. Es wurden keine Varianten mit einer Häufigkeit von $\geq 10\%$ entdeckt. Im Gegensatz dazu wurden in einer Liquorprobe desselben Tages zwei Varianten innerhalb der kodierenden Region detektiert: M-Segment: A110R resultierend in E37E/G, L-Segment: G3445R resultierend in V1449I/V und weitere in der UTR (S-Segment: n=4, M-Segment: n=1).

In der Genomsequenz einer Liquorprobe (D0), Serumprobe (D18) und BAL-Probe (D43) wurden jeweils sieben Unterschiede zur Referenzsequenz (Serum D0) nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurden in einer Hirnbiopsie 11 Unterschiede festgestellt (Abbildung A2). Beide Liquorproben teilten drei Genompositionen mit einer Veränderung zur Referenzsequenz. Während in der ersten Liquorprobe (D0) an diesen Positionen noch eine gemischte Population nachweisbar war, hatte sich in der darauffolgenden Probe (D36) an zwei Positionen eine Variante durchgesetzt. Dies wurde auch für eine Position im Vergleich der ersten Liquorprobe (D0) und der FFPE Hirnbiopsie beobachtet (S-Segment UTR: T145Y > T145C). In der zweiten Serumprobe (D18) wurde ebenfalls eine gemischte Population beobachtet, während in der zweiten Liquorprobe (D36) ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) an der gleichen Position nachgewiesen wurde (S-Segment UTR: A105M > A105C, Abbildung A2). Auffallend ist, dass sich die Mutationen innerhalb des S-Segments auf die UTR konzentrierten. Insgesamt 18/38 (47,4%) der festgestellten Mutationen wurden innerhalb des M-Segments festgestellt (Abbildung A2).

4.3. Hepatitis-E-Virus als seltener Erreger des zentralen Nervensystems

Teile dieses Kapitels wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Melchert, J., Radbruch, H., Hanitsch, L. G., Baylis, S. A., Beheim-Schwarzbach, J., Bleicker, T., Hofmann, J., Jones, T. C., Drosten, C. & Corman, V. M. Whole genome sequencing reveals insights into hepatitis E virus genome diversity, and virus compartmentalization in chronic hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 168, 105583 (2023).

Gezielte Anreicherung viraler Sequenzen

Für genomische Analysen, besonders bei Patienten mit atypischer Symptomatik (z. B. neurologische Symptome), ist es sinnvoll, einen Ansatz für die Vollgenomsequenzierung zu implementieren. Im Folgenden wurde die Anreicherungs-Effizienz für verschiedene herausfordernde Probenmaterialien, am Beispiel HEV, untersucht. Anschließend wurde diese Methode auf Probenmaterial einer chronischen HEV-Infektion mit ZNS-Symptomatik angewandt, um eine Kompartimentalisierungsanalyse zu ermöglichen und eine mögliche Ribavirin-Resistenz zu untersuchen. Das verwendete HEV-Capture Design wurde von Dr. Victor Corman (Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) erstellt und umfasst Sequenzen aller HEV-Genotypen. Dabei wurde die HVR nicht inkludiert (Abbildung 20).

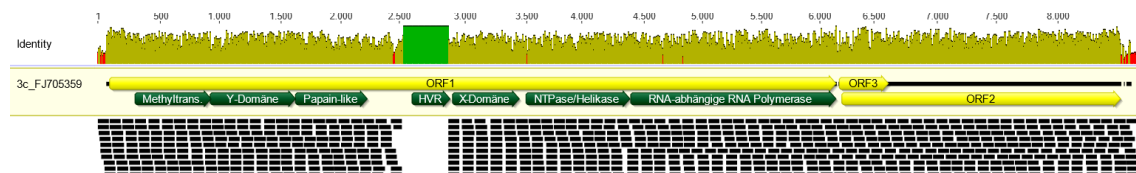


Abbildung 20. HEV-Genomorganisation und Genomabdeckung durch die hergestellten Capture-Sonden. Die ORFs des HEV-Genom sind durch gelbe Pfeile dargestellt. Nicht-Strukturproteine und HVR sind durch grüne Pfeile angedeutet. Alle Sonden (schwarz) wurden mit der 'highest-sensitivity' Einstellung in Geneious Prime (v2022.0.1) gegen die Referenzsequenz FJ705359.1 (gelb hinterlegt, Genotyp 3c) aligniert. HVR, Hypervariable Region; ORF, offener Leserahmen.

Es wurden Proben untersucht, die die in Kapitel 4.1.7. angesprochenen Sequenzier-Herausforderungen beinhalten. Dabei handelte es sich um eine Liquorprobe mit niedriger Viruslast; eine FFPE-Probe, bei der aufgrund der zehnjährigen Lagerung bei Raumtemperatur und Fixierung ein starker Degradation der Nucleinsäuren zu erwarten war; eine Blutspende, bei der ein divergenter HEV-Genotyp zu erwarten war; eine Kamel-Serumprobe aus dem Jahr 1983 und Gewebeproben einer chronischen HEV-Infektion. Durch gezielte Anreicherung viraler Sequenzen wurden (fast) vollständige Genome für alle untersuchten Proben generiert. Jedoch wurde eine geringere oder keine Abdeckung für die HVR-Region festgestellt. Dies wurde erwartet, da dieser Genomabschnitt nicht im *Baits*-Design inkludiert war (Abbildung 20). In allen Proben war das Verhältnis von viralen zu gesamten Sequenzen stark verbessert, bis zu 16.381-fach. Eine detaillierte Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse ist in Abbildung 21 sowie

Tabelle A3 gegeben. Die generierten Sequenzen wurden unter den Genbank Accession Nummern OQ567729-35 veröffentlicht.

I Geringe Viruskonzentration

Im Rahmen der retrospektiven Analyse von Liquores (Kapitel 4.2.1.) wurde ein HEV-positiver Liquor (Fall 1) identifiziert. Die Probe wies einen ct-Wert von 39,12 und eine Konzentration von $6,15 \times 10^3$ IU/mL auf. Durch die native Sequenzierung wurde nur ein Teil (66,5%) des Genoms sequenziert. In zwei unabhängigen Versuchen wurde diese Sequenzier-Bibliothek angereichert. In beiden Versuchen wurden die Ratios von viralen zu totalen Sequenzen enorm gesteigert (bis zu 16.381-fach (Abbildung 21 A, Tabelle A3)). Jedoch gelang es nicht, ein Vollgenom zu generieren. Hierfür wurden sequenzspezifische PCRs (Tabelle A2) entwickelt und die resultierenden PCR-Amplifikate Sanger sequenziert. Dabei wurden unterschiedliche HVR-Varianten identifiziert, die sich in einer Länge von 131 nt unterschieden. Es standen keine weiteren Proben oder klinische Daten für weitere Analysen zur Verfügung.

II Degradierete Nukleinsäuren

Degradierete Nukleinsäuren z. B. durch Fixierung oder ungeeignete Transport-/ Lagerbedingungen können die Sequenzierung stark beeinträchtigen²⁵¹. Im Folgenden wurde die virale Nukleinsäure aus einer FFPE-Leberprobe (Fall 2), die für ~10 Jahre bei Raumtemperatur gelagert wurde, sowie einem ~40 Jahre alten Kamel Serum (Fall 4) angereichert. Die Ratio viraler zu totalen Sequenzen wurde um das 1.344- und 2.484-fache erhöht (Abbildung 21 B und D, Tabelle A3). Wie erwartet, war es für beide Proben nicht möglich die gesamte HVR-Region anzureichern, da dieser Genomabschnitt nicht Teil des Bait-Designs war.

III Neuartige Erreger

Um die Flexibilität der Anreicherungs-methode im Hinblick auf neuartige Viren zu beurteilen, wurde eine HEV-positive Blutspende (Fall 3) untersucht, bei der die PCR-basierte Genotypisierung fehlschlug²⁵². Des Weiteren wurde eine ~40 Jahre alte Kamelserum-Probe (Fall 4) untersucht, für die zuvor nur ein partielles Genom generiert werden konnte²⁵³.

Bereits durch die native Sequenzierung wurden Vollgenomsequenzen generiert. Nach Anreicherung wurde das Ratio viraler zu totaler Sequenzen auch hier um ein Vielfaches erhöht, jedoch ohne Abdeckung der HVR (Abbildung 21 C und D, Tabelle A3). Die für die Blutspende und die Kamelserum-Probe generierten Sequenzen wurden mit HEV-Referenzgenomen verglichen. Die höchste nt- und AA-Identität lag dabei zum Genotyp 3 bzw. 7 vor. Aufgrund der hohen nt-Distanz von ~20% können diese als neuer Subtyp angesehen werden (Tabelle 24). Jedoch gibt das ICTV hierfür keine festen Werte an.

Tabelle 24. Nukleotid- und AA- Identität (%) von HEV-Genomen, die aus dem Blutspender und dem Kamel gewonnen wurden, zu Referenzsequenzen für ausgewählte genomische Regionen.

Genotyp	ORF1				ORF2	
	Methyltransferase*		RNA-abhängige RNA-Polymerase*		AA121-413*	
	BS	K	BS	K	BS	K
1 ^a	75,9-77,9	76,2-77,5	73,6-74,3	74,8-75,6	78,6-79,5	78,6-79,9
	85,6-86,7	87,3-89,0	85,6-86,4	86,9-87,9	95,2-95,8	93,8-94,6
2 ^b	76,2	77,0	72,9	74,8	78,3	79,9
	86,7	91,7	85,4	86,0	96,9	94,9
3 ^c	77,5-82,1	74,8-79,2	76,0-79,6	75,5-78,2	78,2-81,7	77,4-80,6
	91,2-95,0	91,2-96,1	89,3-92,4	88,9-92,2	96,9-98,3	93,2-94,6
4 ^d	74,2-77,0	75,3-78,1	74,3-75,8	73,6-74,9	77,3-79,0	79,0-80,9
	90,1-91,7	92,3-93,9	86,2-87,7	85,8-87,3	95,2-96,6	92,9-94,3
5 ^e	74,8	75,9	75,2	74,7	79,1	79,3
	89,0	91,2	86,4	85,6	96,0	94,1
6 ^f	76,4-77,7	74,6-75,3	73,9-75,7	74,4-74,7	78,4-79,1	77,7-78,5
	87,8-89,5	90,1-92,8	84,2-87,5	84,6-86,2	96,6	93,2
7 ^g	75,9-76,1	79,4-81,2	74,4-75,7	80,9-81,2	78,6-79,1	81,4-81,9
	91,2-91,7	96,7-97,2	88,1-88,9	94,3-94,9	96,0	95,8-96,0
8 ^h	76,8-77,4	77,3-77,9	76,5-77,0	76,6-77,5	78,9-80,1	80,1-80,9
	92,3-92,8	96,1-96,7	88,1-88,3	91,0-91,2	96,0	95,8

Die nt-Identität ist über der AA-Identität gegeben. Berechnet mit Geneious Prime (v2022.0.1), einschließlich der GenBank Accession Nummern: ^a M73218, X98292, AY230202, AY204877, JF443721, ^b KX578717, ^c AB248521, AB290312, AB290313, AB369687, AB369689, AF082843, AF455784, AP003430, AY115488, EU360977, FJ705359, FJ998008, JQ013793, JQ013794, JQ953664, KP294371, KU513561, KY436898, MF444074, MF959764, MF959765, MK050463, MT920909, MW002523, ^d AB197673, DQ279091, AB074915, AJ272108, AY723745, AB220974, AB108537, ^e AB573435, ^f AB602441, AB856243, ^g KJ496143, KJ496144, ^h KX387865, KX387866, KX387867. ²⁵⁴, modifiziert. *, entsprechend der Annotation von FJ705359.1; BS, Blutspender; K, Kamel; ORF, offener Leserahmen.

IV Hoher Wirtsgenom-Hintergrund

Insbesondere Gewebeproben zeichnen sich durch einen hohen Wirtsgenom-Hintergrund aus. Obwohl dieser durch die gezielte Abreicherung von rRNA reduziert werden kann (Kapitel 4.1.1.), ist diese Methodik bisher nur für wenige Spezies möglich. Hier wurde eine Duodenum-, Leber- und Medulla oblongata-Probe sequenziert, die während einer Autopsie entnommen wurden. Die Patientin (Fall 5) hatte eine chronische HEV-Infektion und entwickelte kurz vor ihrem Tod ZNS-Symptome. Die native Illumina-Sequenzierung ergab ein vollständiges Genom für die Medulla oblongata-Probe, ein nahezu vollständiges Genom (99,9%) für die Duodenum-Probe, aber nur ein Teilgenom für die Leberprobe (43,0%). Durch gezielte Anreicherung viraler Sequenzen gelang es, ein vollständiges Genom für die Duodenum- und Medulla oblongata-Probe und ein nahezu vollständiges Genom für die Leberprobe (99,7%) zu generieren. Die HVR wurde vollständig sequenziert, jedoch wurde eine geringere Coverage im Vergleich zum restlichen Genom beobachtet (Abbildung 21 E-G).

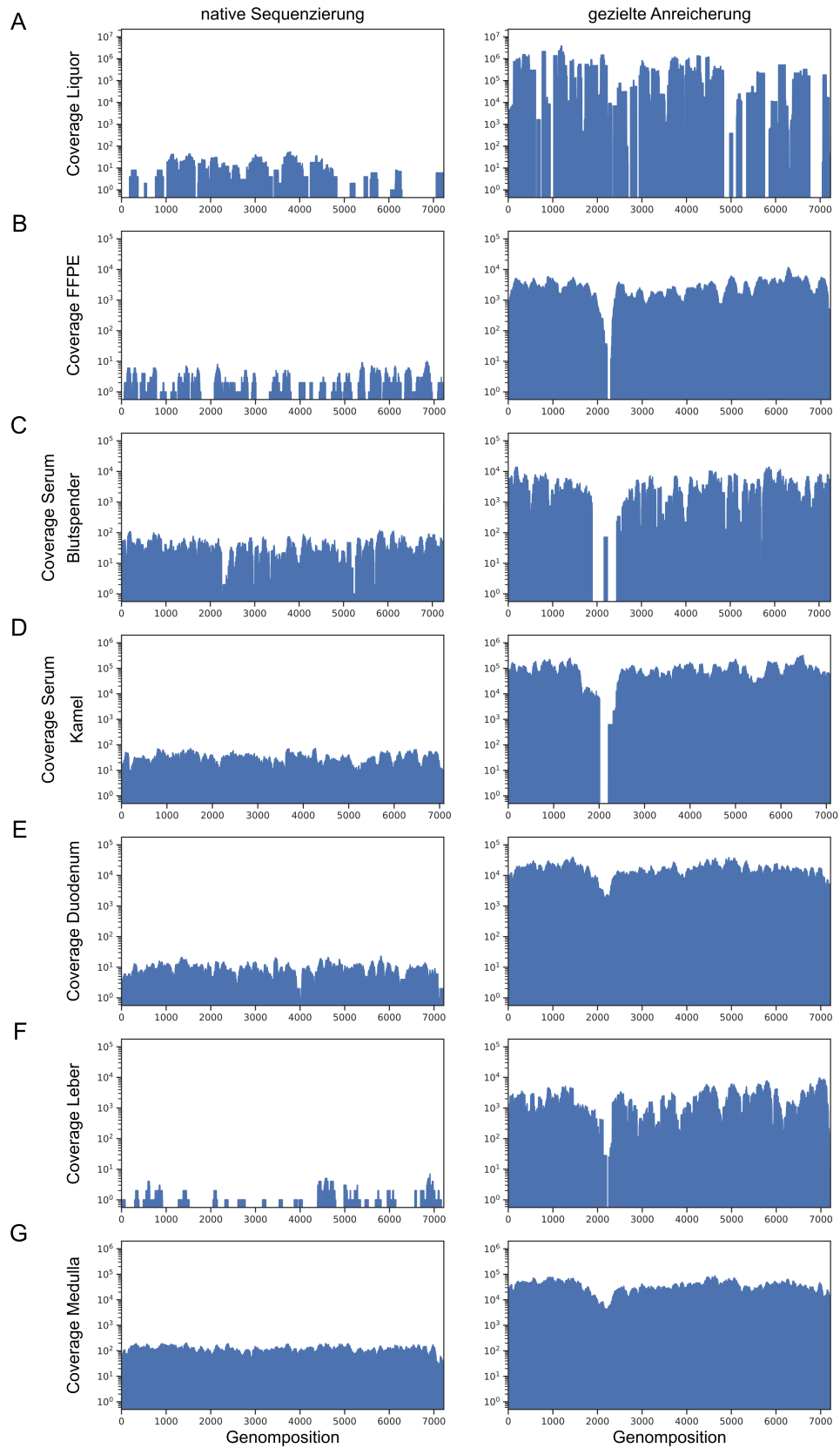


Abbildung 21. Genomabdeckung und Coverage für verschiedene HEV-Proben nach der nativen Sequenzierung (links) und gezielter Anreicherung (rechts). ²⁵⁴, modifiziert. Die Anzahl generierter und viraler Sequenzen sowie Genomabdeckung sind im Detail in Tabelle A3 aufgeführt.

Eine phylogenetische Analyse der generierten Sequenzen zeigte, dass es sich bei der Liquorprobe, FFPE-Probe sowie den Gewebeproben um den Genotyp 3c handelte. Die Sequenzen aus dem Blutspender und dem Kamel Serum zeigten eine basale Verwandtschaft zu den Genotypen 3ra bzw. 7 (Abbildung 22).

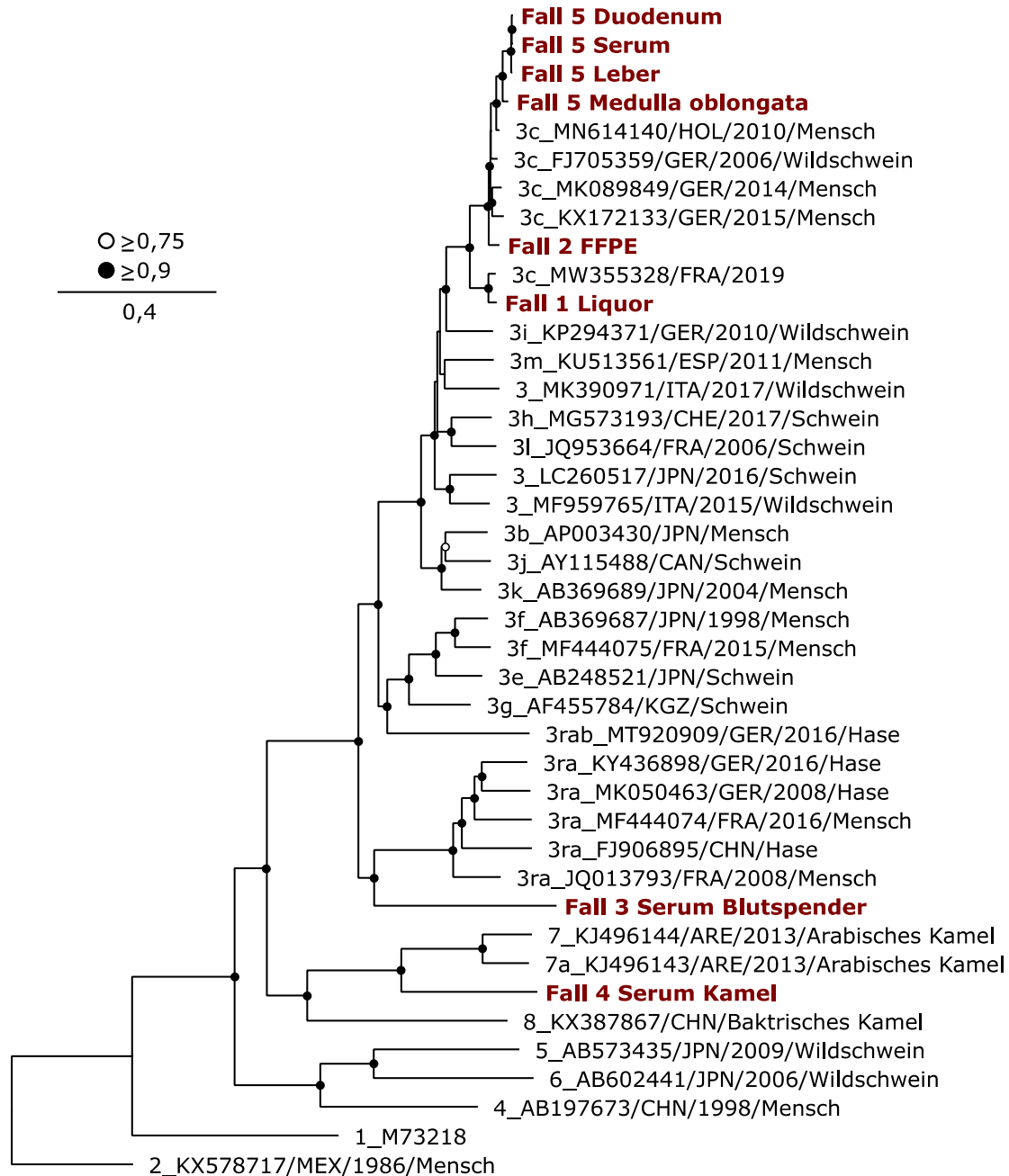


Abbildung 22. Phylogenetischer Stammbaum der kompletten kodierenden Region von HEV. Die Berechnung erfolgte mit dem MrBayes²²⁹ (v3.2.6) Plugin in Geneious unter Verwendung des Substitutionsmodells GTR+I+G mit 500.000 Wiederholungen. Als Außengruppe diente KX578717 (Genotyp 2). Schwarze Kreise an Knotenpunkten zeigen *Bootstrap*-Werte von $\geq 90\%$ und weiße Kreise $\geq 75\%$ an. Die in dieser Arbeit erzeugten Sequenzen sind rot hervorgehoben. Die Bezeichnungen umfassen den (Sub-)Genotyp, die GenBank-Nummer, das Land, das Jahr der Probennahme und den Wirt, sofern verfügbar. ²⁵⁴, modifiziert.

Multiplexing von Proben in einer *Capture*-Reaktion

Für die Anreicherung von viralen Sequenzen können mehrere Proben in einer Reaktion bearbeitet werden. Dabei ist zu beachten, dass nicht garantiert werden kann, ob und wie erfolgreich die einzelnen Proben angereichert werden und wie sich die angereicherten Sequenzen quantitativ auf die Proben verteilen. Um dies zu untersuchen, wurden jeweils fünf Sequenzier-Bibliotheken von HEV-positiven Seren vereinigt und gezielt angereichert. Die Viruslast der einzelnen Proben reichte von $2,9 \times 10^4$ bis $2,7 \times 10^8$ cp/mL. Bei allen Proben war das Verhältnis von viralen zu total generierten Sequenzen stark erhöht (27- bis 6.278-fach). Die Anzahl generierter Sequenzen pro Probe variierte bis zum 69-fachen (Abbildung 23).

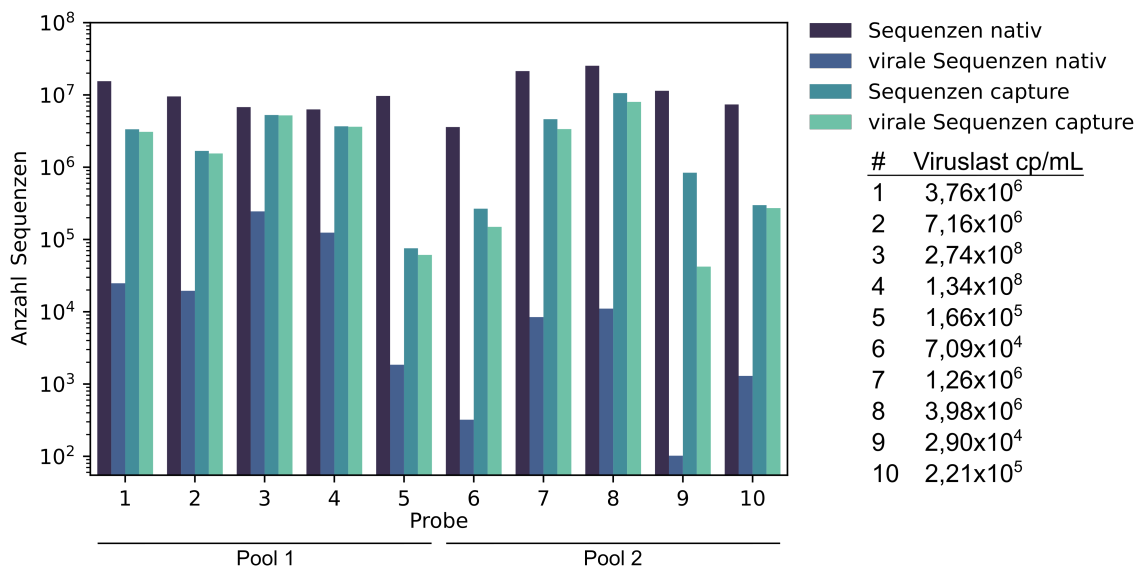


Abbildung 23. Anzahl totaler und viraler Sequenzen vor und nach gezielter Anreicherung am Beispiel von zehn HEV positiven Serumproben. Für zehn Serumproben mit einer HEV-Viruslast zwischen $2,9 \times 10^4$ - $2,7 \times 10^8$ cp/mL wurden Sequenzier-Bibliotheken erstellt und nativ mittels Illumina NextSeq sequenziert. Anschließend wurden je fünf Sequenzier-Bibliotheken in einem Pool vereinigt. Virale Moleküle wurden mittels HEV *Capture*-Kit angereichert. Die angereicherten Sequenzier-Bibliotheken wurden ebenfalls mittels Illumina NextSeq sequenziert. Dargestellt ist die Anzahl viraler bzw. totaler generierter Sequenzen vor und nach gezielter Anreicherung pro Probe.

Kompartimentalisierung und Ribavirin-Resistenz in einer chronischen HEV-Infektion mit ZNS-Symptomatik

Die in diesem Kapitel unter 'IV Hoher Wirtsgenom-Hintergrund' untersuchten Gewebeprobe stammen von einer chronischen HEV-Infektion, die zeitweise mit Ribavirin behandelt wurde. Jedoch wurde die Infektion durch diese Therapie nicht eliminiert. Die Patientin wurde schließlich mit neurologischen Symptomen und einer Enzephalitis in ein Krankenhaus eingeliefert. Nach dem Tod wurde eine Autopsie durchgeführt und Organproben wurden für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Virale RNA wurde in allen 24 Organproben detektiert. Die geringste Viruslast wurde im Leber-Lymphknoten (ct-Wert: 38,16; $4,7 \times 10^3$ iU/mL) und die höchste Viruslast in der Medulla oblongata (ct-Wert: 27,93; $5,6 \times 10^6$ iU/mL) gemessen (Abbildung 24). Eine 72 Tage vor der Autopsie entnommene Serumprobe wurde ebenfalls in die Studie aufgenommen.

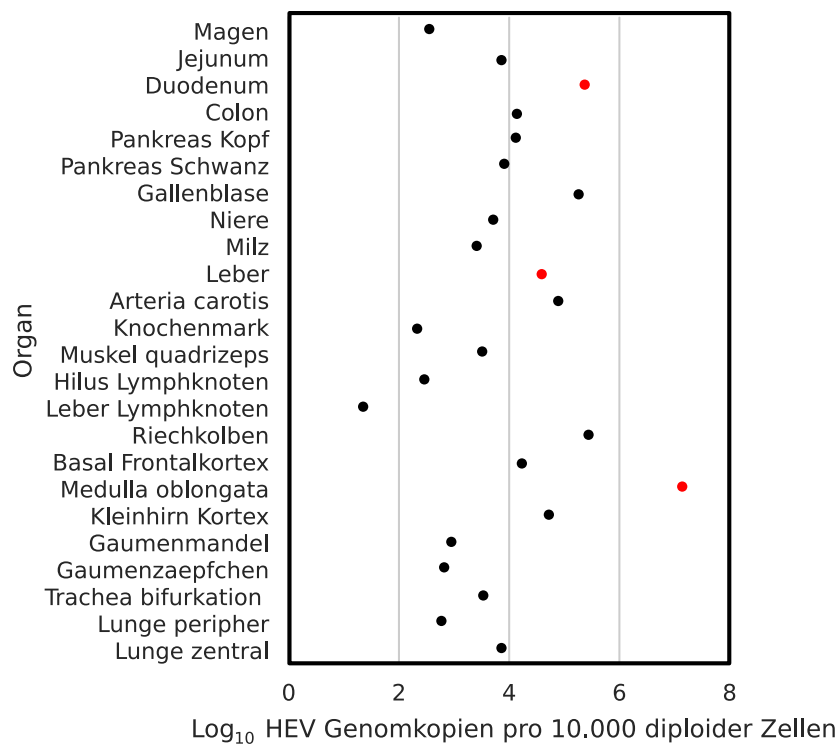


Abbildung 24. HEV-Viruslast in verschiedenen Autopsieproben. Die sequenzierten und hier analysierten Proben sind rot hervorgehoben.

Ein Vergleich der generierten Konsensussequenzen deutete auf das Vorhandensein multipler Viruspopulationen hin. Die HEV-Population der Medulla oblongata, einer ZNS-Probe, wies 329 Unterschiede zur Leberprobe auf (Abbildung 25). Darüber hinaus zeigte diese Probe in beiden Sequenzier-Ansätzen eine Insertion (3 nt) in der 3'UTR auf, die in den anderen Proben/Ansätzen nicht beobachtet wurde. Die Genom-Unterschiede verteilten sich dabei über das gesamte Genom (Abbildung A3). Ein Vergleich der Konsensussequenzen der nativen Sequenzierung sowie nach sequenzspezifischer Anreicherung zeigte nur geringe Unterschiede. So waren die Sequenzen beider Ansätze für die Medulla oblongata-Probe identisch, für die Duodenum-Probe wurden jedoch 12 Unterschiede festgestellt (Abbildung 25).

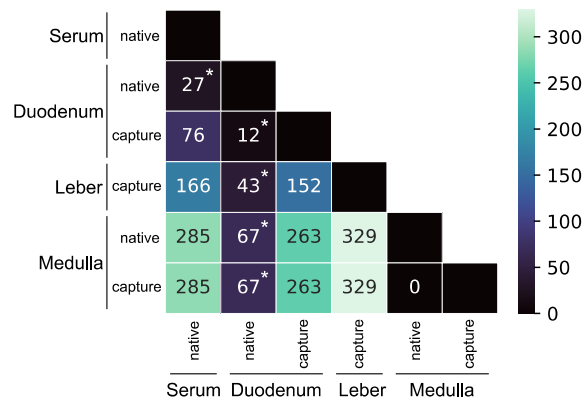


Abbildung 25. Anzahl der Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Probenotypen und Sequenzieransätzen. Dargestellt ist die Anzahl der detektierten Unterschiede auf Konsensusebene zwischen den Kompartimenten für die native Sequenzierung und nach gezielter Anreicherung viraler Sequenzen (*capture*)²⁵⁴. Konsensussequenzen wurden mit der 75% 'Highest-Quality'-Einstellung in Geneious Prime (v2022.0.1) erstellt. *, Nur Genompositionen mit einer *Coverage* von mindestens 30 Sequenzen wurden berücksichtigt.

Anschließend wurde untersucht, ob Ribavirin-Resistenzen in den verschiedenen Proben vorlagen und ob es Unterschiede zwischen den verschiedenen Kompartimenten gab. Aufgrund der geringen *Coverage* nach der nativen Sequenzierung (Abbildung 21 E und F) war dies nicht für die Leberprobe und nur teilweise für die Duodenum-Probe möglich. Multiple Mutationen, die mit einer Ribavirin-Resistenz in Verbindung gebracht werden (A723V, K1398R, V1479I, P25S, A64T, P95S und S82N¹²³) wurden detektiert. Der Anteil der Mutationen war vergleichbar zwischen den Sequenzier-Ansätzen, jedoch unterschiedlich für die verschiedenen Kompartimente. Lediglich A723V (89,1% nativ, 99,0% *capture*), P95S (96,6% nativ, 98,3% *capture*) und S82N (100% nativ, 99,9% *capture*) wurden als dominierende Variante im ZNS nachgewiesen sowie P25S (4,1% nativ, 5,4% *capture*) und A64T (5,7% nativ, 2% *capture*) in einer Minderheit (Abbildung 26).

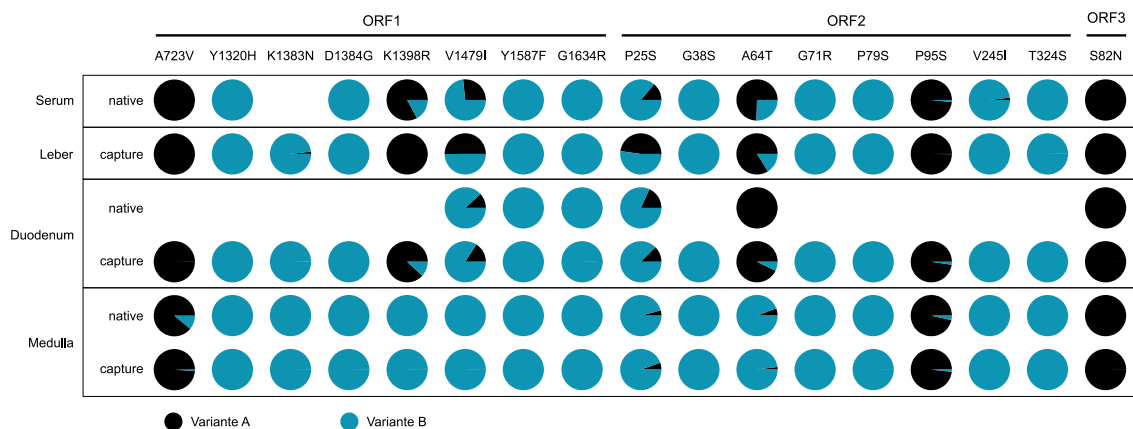


Abbildung 26. Anteil viraler Sequenzen mit Ribavirin-Resistenzmutation. Dargestellt sind Genompositionen, die mit einer Ribavirin-Resistenz in Verbindung gebracht werden und der Anteil von Sequenzen mit entsprechender Mutation (schwarz)¹²³, pro Probenotyp und Sequenziermethode. Es werden nur Mutationen mit einer Abdeckung von mindestens 10 Sequenzen gezeigt.

Die wichtigsten Ergebnisse dieses Kapitels sind in Abbildung 27 grafisch dargestellt.

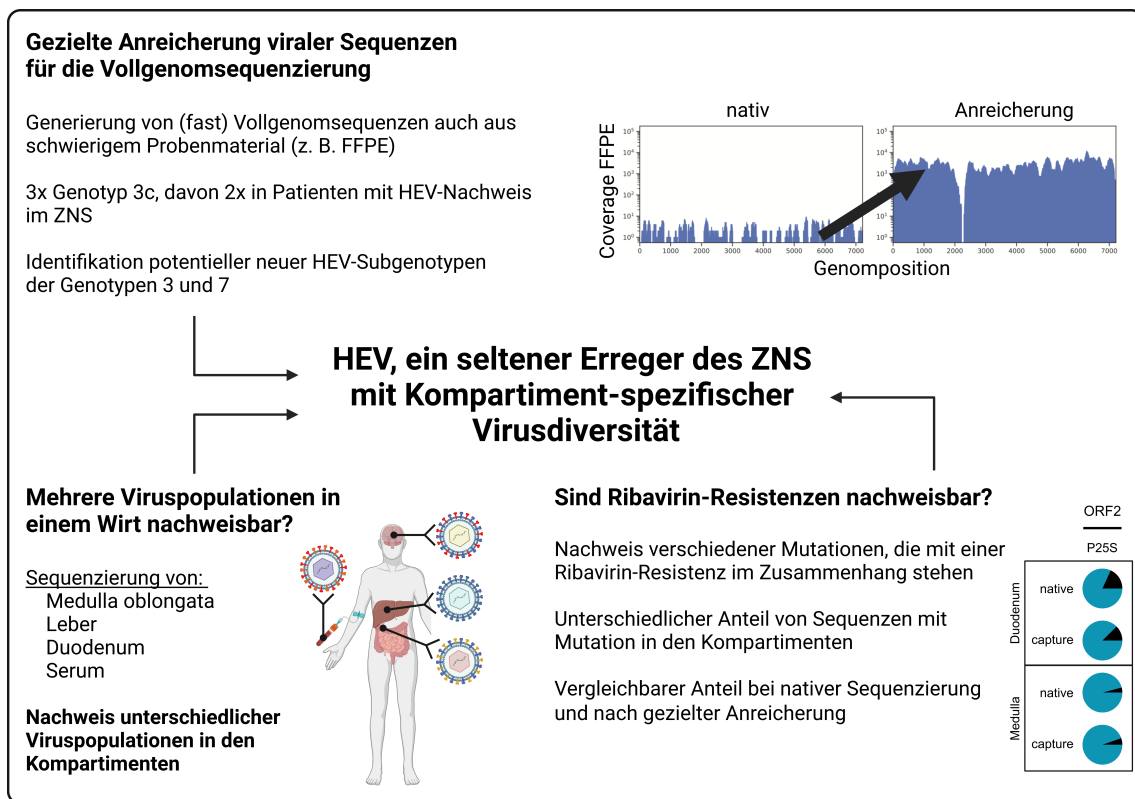


Abbildung 27. Zusammenfassung der Ergebnisse der HEV-Untersuchungen in dieser Arbeit. Insbesondere die Sequenzierung von Patientenmaterial ist mit verschiedenen Herausforderungen verbunden, darunter eine geringe Viruslast oder ein hoher Wirtsgenom-Hintergrund. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein HEV-spezifisches *Capture*-Kit für verschiedene Probenarten und Fragestellungen eingesetzt. Virale Sequenzen wurden erfolgreich angereichert. Durch die vollständige Genomsequenzierung und anschließende Analysen wurden die Genotypen bestimmt. Zwei Sequenzen gehörten zu potenziellen neuen Subgenotypen der HEV-Genotypen 3 bzw. 7. Die virale Diversität in einer chronischen HEV-Infektion wurde eingehend untersucht. Mit Hilfe des *Capture*-Kits wurden vollständige Genomsequenzen generiert. Ein Sequenzvergleich zeigte das Vorhandensein unterschiedlicher Viruspopulationen in den verschiedenen Kompartimenten, insbesondere im ZNS. In diesen Proben wurden verschiedene Mutationen nachgewiesen, die mit einer Ribavirin-Resistenz assoziiert sind. Der Anteil der viralen Sequenzen, die diese Mutationen enthielten, war in den einzelnen Kompartimenten unterschiedlich. Beim Vergleich der beiden Sequenzierungsansätze (native Sequenzierung und nach gezielter Anreicherung der viralen Sequenzen) war der Anteil jedoch vergleichbar. FFPE, Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet; HEV, Hepatitis-E-Virus, ZNS, zentrales Nervensystem.

4.4. West-Nil-Virus als neuartiger Enzephalitis-Erreger in Berlin, Deutschland

Teile dieses Kapitels wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Ruscher, C.*, Patzina-Mehling, C.*, **Melchert, J.***, Graff, S. L., McFarland, S. E., Hieke, C., Kopp, A., Prasser, A., Tonn, T., Schmidt, M., Isner, C., Drosten, C., Werber, D., Corman, V. M. & Junglen, S. Ecological and clinical evidence of the establishment of West Nile virus in a large urban area in Europe, Berlin, Germany, 2021 to 2022. **Eurosurveillance** 28, 2300258 (2023). (*, geteilte Erstautorenschaft)

Schneider, J.*, Bachmann, F.*, Choi, M., Kurvits, L., Schmidt, M. L., Bergfeld, L., Meier, I., Zuchowski, M., Werber, D., Hofmann, J., Ruprecht, K., Eckardt, K., Jones, T. C., Drosten, C. & Corman, V. M. Autochthonous West Nile virus infection in Germany: Increasing numbers and a rare encephalitis case in a kidney transplant recipient. **Transbound Emerg Dis** 69, 221–226 (2022). (*, geteilte Erstautorenschaft)

Das WNV wurde 2018 erstmals bei Vögeln in Deutschland nachgewiesen. Dies warf die Fragen auf, ob sich das Virus auch als endemischer Erreger beim Menschen etablieren wird und welche Bedeutung dieses Virus als ZNS-Erreger einnehmen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 13 humane WNV-Fälle untersucht. Vier Patienten wurden im Rahmen der retrospektiven Liquor Studie nachgewiesen. Fünf Infektionen wurden durch die Routinediagnostik aufgrund der spezifischen WNV-Anfrage der behandelnden Ärzte identifiziert. Weitere vier Fälle wurden durch das Blutspende-Screening des Deutschen Roten Kreuzes erfasst. Eine Zusammenfassung der Patienten und Ergebnisse ist in Tabelle 25 dargestellt.

Generierte WNV-Sequenzen wurden zeitnah über die Website <https://civnb.info/charite-wnv/> zur Verfügung gestellt und in einem phylogenetischen Kontext dargestellt (Abbildung 28).

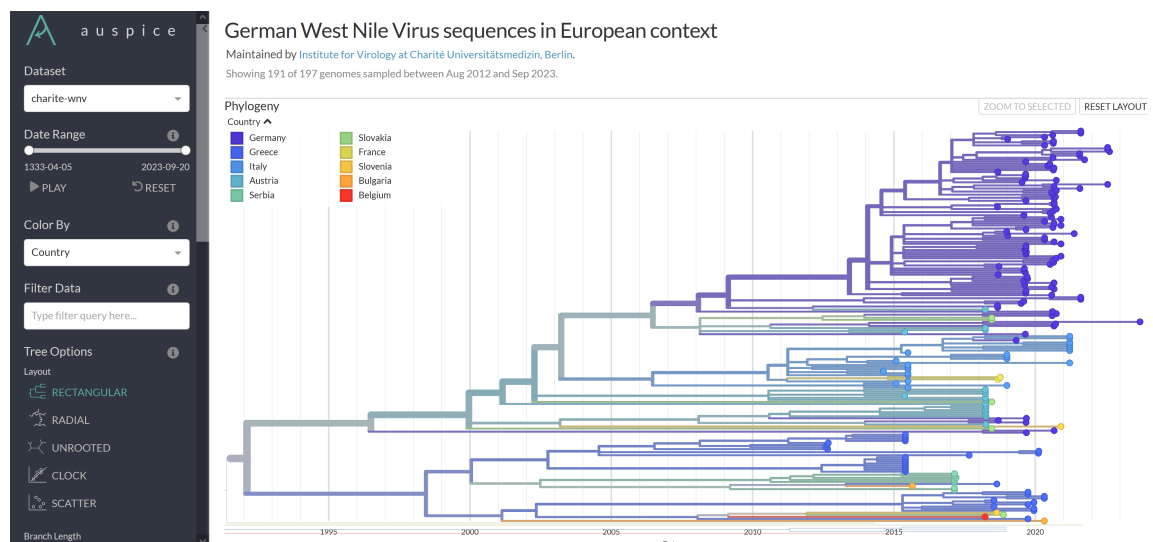


Abbildung 28. WNV im phylogeographischen Kontext. Auf der Webseite <https://civnb.info/charite-wnv/> wurden die im Rahmen dieser Arbeit generierten WNV-Sequenzen zeitnah zur Verfügung gestellt und in einem phylogeographischen Kontext dargestellt (abgefragt am 21.10.2023).

Tabelle 25. Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen WNV-Fälle.

#	Jahr	Detektion	Geschlecht	Alter	Wohnort in Bundesland	Neurologische Symptome	Reise-anamnese*	Sero-konversion	Vollgenom-sequenz	autochthone Infektion	WNV Linie	Accession Nummer / Proben-ID
1	2018	Routine	M	54	Berlin	ja	ja (Italien)	nein	ja	nein	2	MH910045
2	2020	Routine	M	33	Berlin	ja	nein	ja	partiell	ja	2	MW072297
3	2021	Blutspende	M	k.A.	Brandenburg	k.A.	nein	n.d.	ja	ja	2	MZ964751
4	2021	Blutspende	W	56	Berlin	ja	nein	ja	ja	ja	2	MZ964752
5	2021	Routine	M	77	Berlin	ja	nein	ja	ja	ja	2	MZ964753
6	2021	retrospektiv	M	34	k.A.	ja	k.A.	n.d.	ja	ja	2	OP810565
7	2021	Blutspende	k.A.	k.A.	Brandenburg	k.A.	k.A.	n.d.	ja	ja	2	CHVir43437
8	2021	Blutspende	k.A.	k.A.	Berlin	k.A.	k.A.	n.d.	ja	ja	2	CHVir43438
9	2022	retrospektiv	W	71	k.A.	ja	k.A.	n.d.	nein	unklar	k.A.	2203311
10	2022	retrospektiv	W	79	k.A.	ja	ja (Mallorca)	n.d.	partiell	unklar	k.A.	2202464
11	2022	retrospektiv	M	65	k.A.	ja	k.A.	n.d.	nein	unklar	k.A.	2202420
12	2022	Routine/ retrospektiv	M	41	Berlin	ja	k.A.	n.d.	ja	ja	2	CHVir29548
13	2023	Routine	M	80	Berlin	ja	k.A.	n.d.	ja	ja	2	CHVir44016

*außerhalb Deutschlands; k.A., keine Angabe; M, Männlich; W, Weiblich; n.d.; nicht durchgeführt aufgrund fehlender Folge- oder Serumproben.

Gibt es undiagnostizierte WNV-Infektionen?

Um die Rolle des WNV in Berlin zu untersuchen und festzustellen, ob es nicht diagnostizierte Fälle gibt, wurden Liquorproben von Enzephalitis-Patienten unbekannter Ursache retrospektiv aufgearbeitet (Kapitel 4.2.1.). Insgesamt 1676 Liquorproben aus den Jahren 2019-2022, die in den Monaten Juni bis Oktober entnommen wurden, wurden mittels HTS und spezifischer RT-qPCR getestet.

In den Jahren 2019 und 2020 wurde dabei keine WNV-RNA detektiert. Insgesamt 671 Proben von 638 Patienten der beiden Jahre wurden zusätzlich per ELISA auf Anti-WNV IgM-Antikörper getestet, jedoch ohne Nachweis.

In der 2021-Kohorte wurde WNV-RNA in drei Pools detektiert. Nach Auflösung der Pools wurden drei positive Einzelproben identifiziert. Diese wurden einem einzigen Patienten entnommen, daher war WNV im Liquor des Patienten über einen Zeitraum von 24 Tagen nachweisbar. Nach Rücksprache mit den behandelnden Ärzten berichteten diese, dass der Patient zusätzlich zu den neurologischen Symptomen eine Myositis entwickelt hatte. In einer FFPE-Muskelbiopsie wurde anschließend ebenfalls WNV-RNA nachgewiesen (ct-Wert: 36,96). Für diesen Fall konnte eine Vollgenomsequenz generiert werden (Accession-Nummer: OP810565).

In der 2022-Kohorte wurde virale RNA in weiteren vier Patienten per PCR nachgewiesen (ct-Werte der Pools: 36,71-38,02). Virale Sequenzen wurde dagegen in keinem der entsprechenden Pools identifiziert (generierte Sequenzen: 3,2 - 18,4 Millionen). Einer der vier Patienten wurde parallel auch über die Routinediagnostik per spezifischer WNV PCR-Anfrage des behandelnden Arztes identifiziert. Liquorproben der positiven Fälle wurden zusätzlich per indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) getestet. Dabei wurden in einem Fall (2022) IgM- und IgG-Antikörper nachgewiesen. Für drei weitere Patienten (1x 2021, 2x 2022) wurden IgG-Antikörper nachgewiesen.

Eine Berliner Kleingartenkolonie befindet sich in der Umgebung eines WNV-Falls (MZ964753, 2021). Um zu untersuchen, ob es weitere unentdeckte WNV-Infektionen ohne neurologische Beteiligung gab, führte das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) dort 2021 Befragungen durch. Freiwillige hatten die Möglichkeit, ihr Blut auf WNV-Antikörper untersuchen zu lassen. Insgesamt 105 Proben wurden mittels ELISA auf NS1-IgG-Antikörper und mittels IFT auf Anti-WNV IgM/IgG-Antikörper untersucht. Eine Probe stammte wahrscheinlich von einem Probanden mit einer WNV-Infektion, da sowohl im ELISA IgG- als auch im IFT IgM- (grenzwertig) und IgG-Antikörper (>1:100) nachgewiesen wurden. Zehn Probanden zeigten ein Signal im IFT, das im ELISA nicht bestätigt werden konnte. Die übrigen 94 Proben zeigten keine Reaktivität.

Sind humane Infektionen eher reiseassoziiert oder lokal akquiriert?

Um festzustellen, ob es sich bei den WNV-Infektionen um reiseassoziierte oder lokal erworbene Infektionen handelte, wurde zusätzlich zu den humanen Fällen auch die WNV-Vielfalt in Berliner Stechmücken untersucht. Die Arbeitsgruppe um Dr. Sandra Junglen (Charité – Universitätsmedizin Berlin) hat in Zusammenarbeit mit dem LaGeSo Berliner Mücken gefangen. Positive Mücken aus den Jahren 2021 (n=2), 2022 (n=4) und 2023 (n=2) wurden sequenziert. Eine phylogenetische Analyse zeigte eine enge Verwandtschaft der WNV-Sequenzen von Menschen und Stechmücken zu anderen Berliner WNV-Sequenzen aus den Vorjahren (Abbildung 29). Alle im Rahmen dieser Arbeit generierten Sequenzen gehörten der WNV-Linie 2 an. Durch die Vollgenomsequenzierung und den Vergleich zu Referenzsequenzen aus Vögeln und Mücken konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen außer einer Sequenz um autochthone Infektionen handelt. Der erste WNV-Fall (2018) gab an, sich zuvor in Italien aufgehalten zu haben. Die Sequenz des Patienten zeigt eine hohe Verwandtschaft zu WNV-Sequenzen aus Italien (Abbildung 29, MH910045). Daher ist in diesem Fall eine in Italien akquirierte und nach Deutschland importierte Infektion wahrscheinlich.

Der Vergleich zu verfügbaren Berliner Referenzsequenzen aus Vögeln und Mücken zeigte, dass es eine stabile Berliner WNV-Population gibt. WNV-Sequenzen von sieben der acht Mücken und aus fünf humanen Fällen fallen in diese Berliner Klade. Diese beinhaltet auch Referenzsequenzen aus den Jahren 2018, 2019 sowie 2021. Sequenzen in dieser Klade zeigten zwei stille Mutationen: A7722G und A8133G. Letztere wurden auch in einer nicht-Berliner Sequenz detektiert: Sequenz LR743451 stammt aus einem Vogel, der 2019 in Magdeburg beprobt wurde. In keiner anderen deutschen Sequenz konnten diese Mutationen nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist eine weitere stille Mutation: T2397C. Sie wurde nachgewiesen in zwei Berliner Fällen (MZ964753, 2021 / CHVir25948, 2022), einer Mücke (OQ725906, 2022) sowie einem Vogel (OX442296, 2020). Laut Ermittlung des LaGeSo befinden sich der Fangort der Mücke sowie der vermutliche Infektionsort des Patienten #5 in räumlicher Nähe zueinander.

Der Wohnort zweier Blutspender (MZ964751, CHVir43437) liegt in Brandenburg. Deren WNV-Sequenzen zeigten eine nahe Verwandtschaft zu Referenzsequenzen aus Lutherstadt Wittenberg (Brandenburg). Die Sequenz eines Berliner Falls von 2023 (CHVir44016) unterschied sich deutlich von anderen Berlin Sequenzen und zeigte eine nähere Verwandtschaft zu Sequenzen aus Sachsen und Sachsen-Anhalt. Es ist unklar, ob sich der Patient zum Zeitpunkt der Infektion außerhalb Berlins aufgehalten hat. Auch eine der beiden Mücken-Sequenzen (Abbildung 29, M2313) aus 2023 zeigte eine nähere Verwandtschaft zu Sequenzen aus Sachsen und Sachsen-Anhalt.

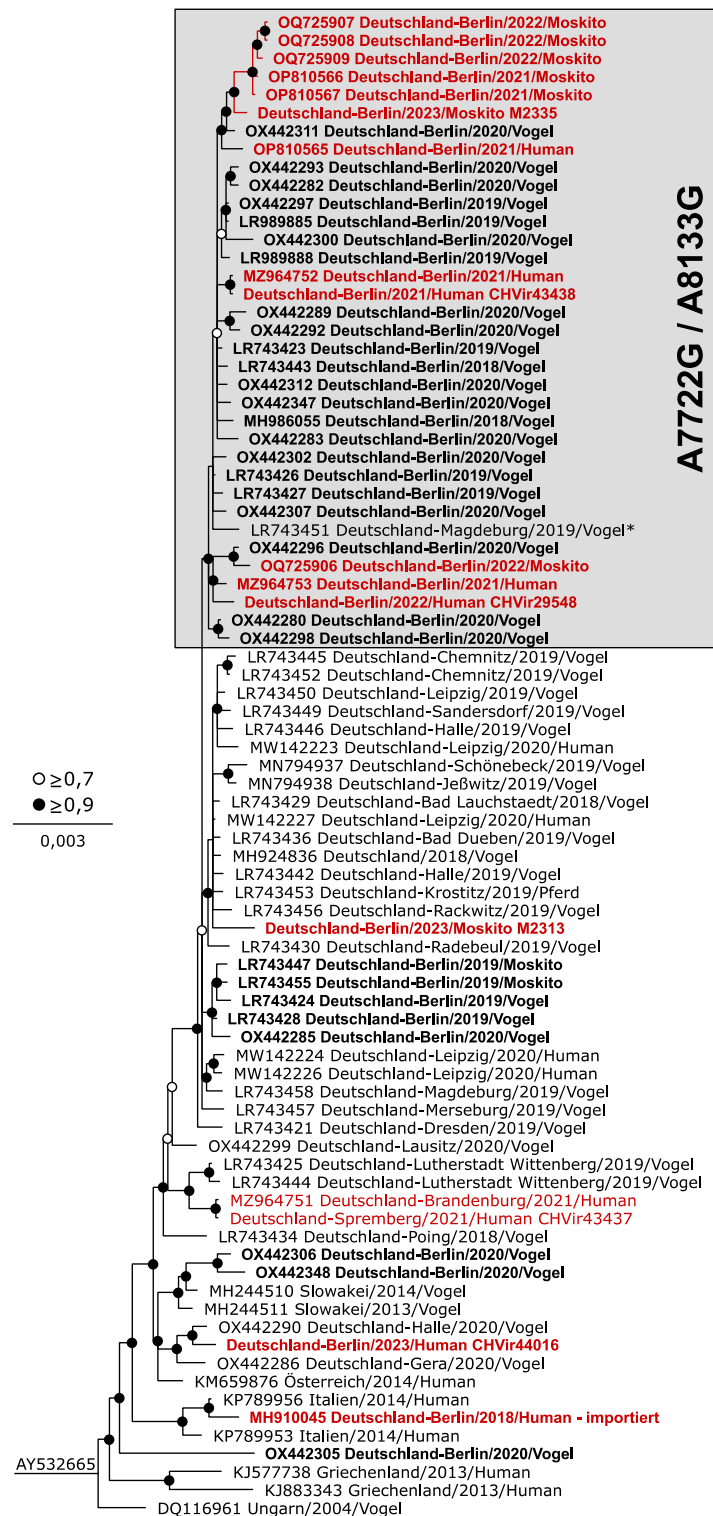


Abbildung 29. Phylogenetische Beziehung der kodierenden Region von WNV-Sequenzen der Linie 2²⁵⁵. Dieser Stammbaum wurde unter Verwendung des MrBayes²²⁹ PlugIn in Geneious Prime (v2022.0.1), dem Substitutions-Modell GTR+I+G und einer Million Wiederholungen berechnet. AY532665.1 wurde als Außengruppe und für das Rooten des Baums verwendet. Support-Werte an Knoten mit $\geq 90\%$ sind durch schwarze Punkte und Werte $\geq 70\%$ mit weißen Punkten dargestellt. Sequenzen aus Berlin sind fett hervorgehoben. Sequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurden, sind rot hervorgehoben. Grau hervorgehoben sind Sequenzen, die die stillen Mutationen A7722G und A8133G besitzen. *, diese Sequenz hat nur die Mutation A8133G.

Amplikon- und Capture-basierte Sequenzierung des WNV

In Kapitel 4.3. wurden die Vorteile der *Capture*-basierten Sequenzierung am Beispiel HEV dargestellt. Im Vergleich dazu bietet der Amplikon-basierte Ansatz den Vorteil, dass dieser innerhalb weniger Tage etabliert und modifiziert werden kann. Darüber hinaus ermöglicht der Amplikon-basierte Ansatz Laboren ohne Zugang zu HTS die Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte. Nach Auftreten der ersten humanen WNV-Fälle in Deutschland wurden *hemi-nested* Primer Sets entwickelt (Tabelle A4). Diese basieren auf einem Alignment von 78 WNV-Sequenzen der Linie 2 und wurden für die Sequenzierung von Patientenproben (Serum, Liquor, Urin) sowie homogenisierter Mücken verwendet. Die resultierenden Amplifikate wurden mittels Sanger oder Oxford Nanopore sequenziert. Insbesondere die letztere Option ermöglichte die Generierung von Vollgenomsequenzen innerhalb eines Tages (Abbildung 30) und somit die zeitnahe Aussage, ob es sich um eine importierte oder autochthone Infektion handelt.

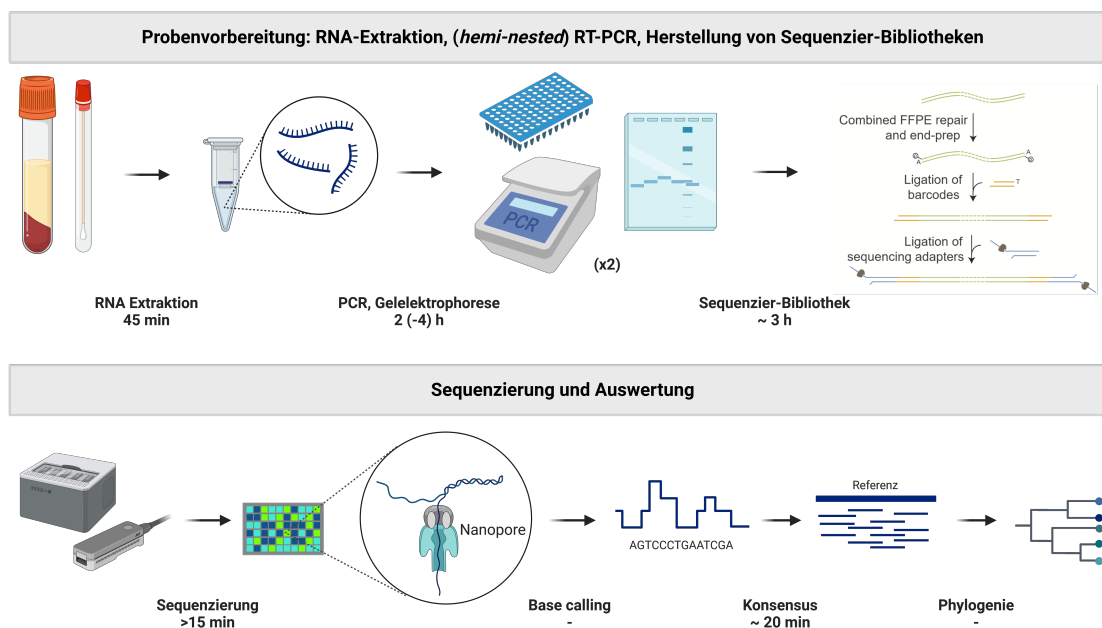


Abbildung 30. Schematischer Überblick des Arbeitsablaufes der Amplikon-Sequenzierung mittels Oxford Nanopore. Für die Amplikon-Vollgenomsequenzierung wird zunächst virale Nukleinsäure extrahiert. Diese wird dann mittels RT-PCR amplifiziert, und die daraus resultierenden PCR-Produkte werden mittels Agarosegel visualisiert. Falls erforderlich, kann eine zweite PCR-Amplifikation durchgeführt werden. Die Amplikons werden anschließend für die Sequenzierung vorbereitet. Mittels Oxford Nanopore Sequenzierung wird die resultierende Sequenzier-Bibliothek auf einem MinION oder GridION sequenziert. Bereits nach wenigen Minuten können die ersten Sequenzen ausgewertet und einer phylogenetischen Analyse unterzogen werden. Der gesamte Arbeitsablauf kann innerhalb eines Werktags erfolgen. Erstellt mit BioRender.com.

Die Amplikon-basierte Nanopore Sequenzierung ermöglichte die zuverlässige Generierung von Vollgenomsequenzen auch von schwierigem Probenmaterial (Urin, Mücken) sowie Probenmaterial mit geringer Viruslast. Der Sequenzier-Erfolg der nativen, Amplikon-basierten und angereicherten Sequenzierung ist am Beispiel von fünf Proben in Abbildung 31 dargestellt. Dabei handelte es sich um zwei Serumproben (25907, 25908), eine Urinprobe (25910) und zwei

Mücken-Pools (MP18, MP35). Die gezielte Anreicherung (Mitte) erfolgte dabei jeweils für die Sequenzier-Bibliothek der nativen Sequenzierung (links).

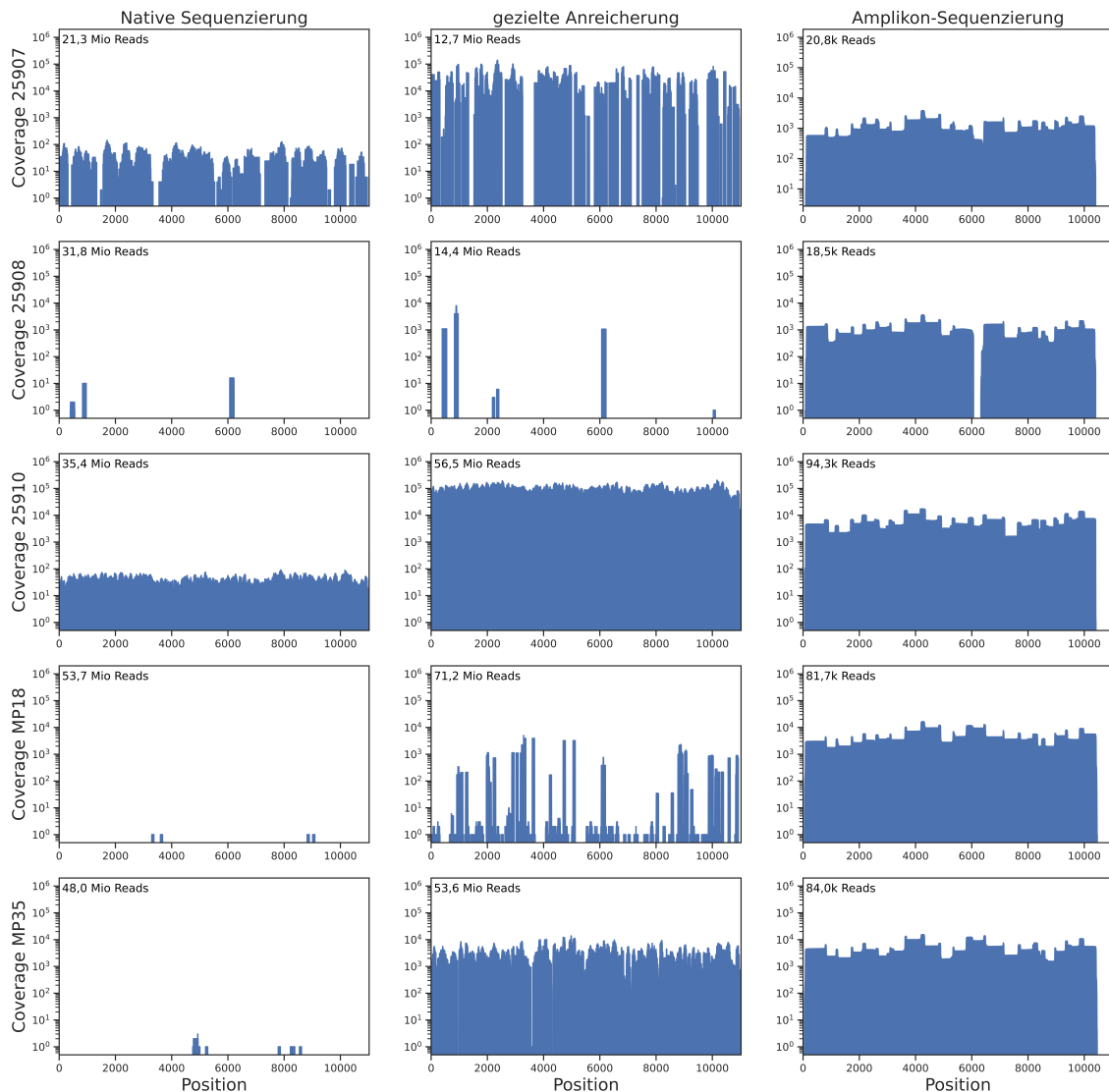


Abbildung 31. WNV-Genomabdeckung nach nativer Sequenzierung, gezielter Anreicherung viraler Sequenzen und Amplikon-Sequenzierung. Sequenziert wurden Patientenproben (25907-Serum (ct-Wert: 30,53), 25908-Serum (ct-Wert: 37,16), 25910-Urin (ct-Wert: 32,83)) und Mückenpool-Proben (MP18 (ct-Wert: 37,65), MP35 (ct-Wert: 31,64)). Dargestellt sind die Ergebnisse nach nativer Sequenzierung (Illumina, links), nach gezielter Anreicherung viraler Sequenzen (Illumina, Mitte) sowie die Amplikon-Sequenzierung (Oxford Nanopore, rechts). Die Anreicherung viraler Sequenzen erfolgte stets aus der Sequenzier-Bibliothek, die links dargestellt ist. Die Gesamtanzahl generierter Sequenzen pro Probe ist entsprechend in der Grafik hinterlegt.

Eine grafische Zusammenfassung der WNV-spezifischen Fragestellungen und Ergebnisse dieses Kapitels ist in Abbildung 32 gegeben.

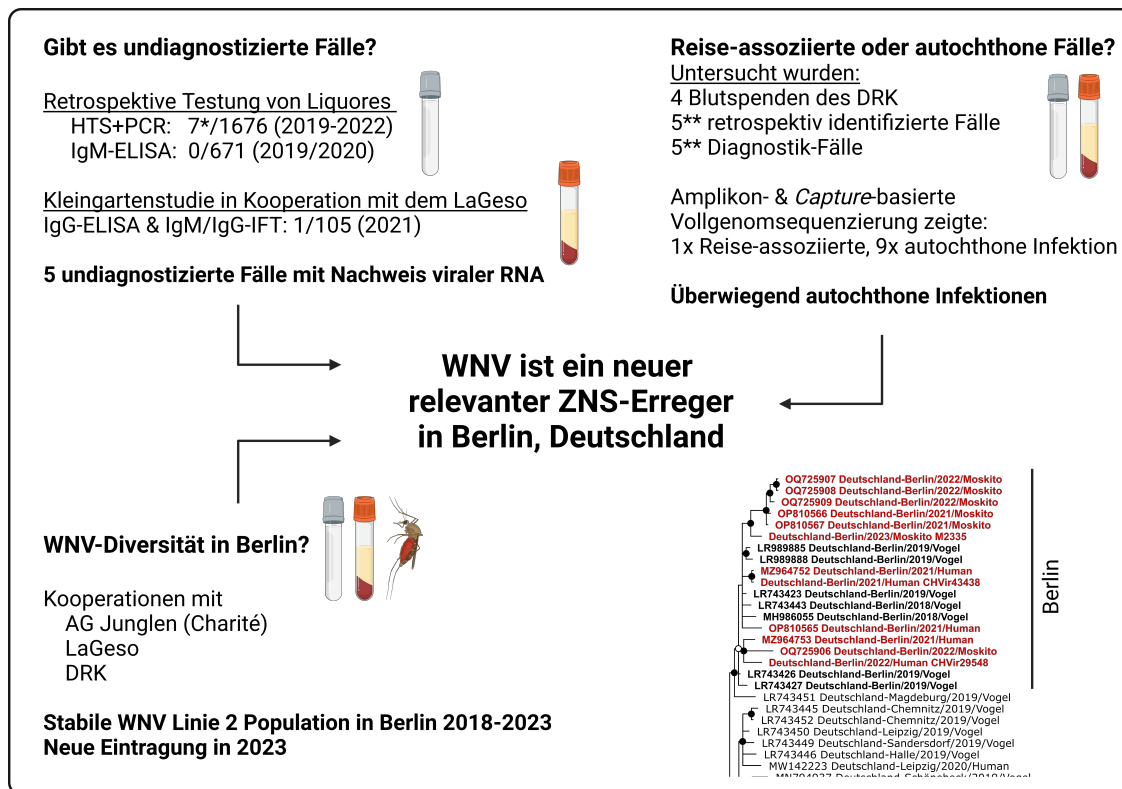


Abbildung 32. Zusammenfassung der Fragestellungen und Ergebnisse der WNV-Untersuchungen in dieser Arbeit. Nach den ersten WNV-Nachweisen bei Vögeln und Pferden stellte sich die Frage, ob es beim Menschen undiagnostizierte Fälle gibt. Bei einer retrospektiven Analyse von Liquorproben mittels HTS und RT-qPCR wurde WNV-RNA in sieben Proben von fünf Enzephalitis-Patienten nachgewiesen. In einer zusätzlichen serologischen Studie wurden in Liquorproben aus den Jahren 2019-2020 keine Antikörper nachgewiesen. Eine serologische Untersuchung von Blutproben von Kleingärtnern ergab eine weitere mögliche WNV-Infektion. Es stellte sich die Frage, ob es sich bei diesen Infektionen um autochthone oder importierte Infektionen handelt. Da die Viruslast in diesen Proben sehr gering war, wurden zwei Ansätze zur Vollgenomsequenzierung etabliert: die gezielte Anreicherung mittels Capturing und Amplikon-Sequenzierung. Diese Methoden ermöglichten es, die mögliche Infektionsquelle für 10 der 13 untersuchten menschlichen Fälle zu bestimmen. Nur der erste humane Fall (2018) wies eine reiseassoziierte Infektion auf. Um die WNV-Diversität weiter zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit dem LaGes0, dem Deutschen Roten Kreuz und der Arbeitsgruppe um Dr. Sandra Junglen (Charité - Universitätsmedizin Berlin) die Virusvarianten in Blutspenden und Mücken untersucht. Es zeigte sich, dass sich in den Jahren 2018-2023 eine stabile Population der WNV-Linie 2 in Berlin etabliert hat. Interessanterweise scheint es im Jahr 2023 einen neuen Eintrag des Virus aus Sachsen/-Anhalt zu geben. *, für einen Patienten wurde WNV-RNA in drei Liquores detektiert; **, ein Patient wurde über die retrospektive Testung sowie Routinediagnostik identifiziert; DRK, Deutsches Rotes Kreuz; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; LaGes0, Landesamt für Gesundheit und Soziales; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; WNV, West-Nil-Virus; ZNS, zentrales Nervensystem. Erstellt mit BioRender.com.

4.5. Pegiviren, die am häufigsten nachgewiesen Viren

Pegiviren in Enzephalitis-Fällen ungeklärter Ursache - eine retrospektive Untersuchung

Humane Pegiviren waren die am häufigsten per HTS nachgewiesenen Viren in dieser Arbeit. In der retrospektiven Testung (Kapitel 4.2.1.) wurden HPgV-1-Sequenzen in 23/209 Pools (11,0%) identifiziert. Um die Sensitivität zu erhöhen und die Detektion zu bestätigen, wurde zusätzlich eine spezifische PCR-Untersuchung aller Pools durchgeführt. Dabei wurde HPgV-1-RNA in 19 Pools bestätigt. In keinem zusätzlichen Pool wurde HPgV-1-RNA nachgewiesen. In einem Pool, der nicht durch PCR bestätigt wurde, gelang die Sequenzierung von 38,9% des Genoms. Die 5'UTR wurde dabei nicht abgedeckt. Daher können Primer-Fehlbindungen nicht ausgeschlossen werden, die für den Ausfall der PCR ursächlich sein könnten. Das Teilgenom zeigte die höchste nt-Ähnlichkeit zur NCBI Genbank Referenz MZ420568.1 (91,78%, Genotyp 2). Um die Sensitivität der verwendeten RT-qPCR zu ermitteln, wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Dabei ergab sich eine untere Nachweisgrenze von 17,5 Kopien pro Reaktion (95% Konfidenzintervall: 7,9-173,6 Kopien pro Reaktion, Abbildung A4).

Für das Jahr 2022 wurden zusätzlich alle negativen ME/E-Panel der Monate Januar bis Juli (n=542) per RT-qPCR untersucht. Dadurch wurde HPgV-1-RNA in acht (8/67, 11,9%) weiteren Pools identifiziert. Virale RNA wurde somit in insgesamt 27 (1,2%) der 2218 untersuchten Liquorproben nachgewiesen. Die Viruslast der Liquorproben betrug dabei zwischen $1,6 \times 10^3$ und $3,3 \times 10^5$ cp/mL. Von vier Patienten wurden je zwei Liquore positiv getestet. Diese wurden im Abstand von bis zu 141 Tagen abgenommen (0, 1, 12, 141 Tage). 10/23 (43,5%) der Patienten waren weiblich. Das Durchschnittsalter (erste Probenahme) lag bei 43,7 Jahren (Median: 43,4) und reichte von 9,6 bis 78,6 Jahren. Für 23 Proben wurde ein Teil der 5'UTR Region sequenziert. Für 23 Proben konnte ein Teil der 5'UTR sequenziert werden. Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass 22 Sequenzen dem Genotyp 2 zugehörig sind. Nur eine Sequenz (1902550) wurde dem Genotyp 1 zugeordnet (Abbildung 33). Die meisten der HPgV-1 positiven Liquorproben hatten makroskopisch sichtbare Einblutungen (Abbildung 10, Kapitel 4.1.5.). Ohne zusätzliche Serumproben war es jedoch nicht möglich, eine mögliche Kompartimentalisierung zu analysieren, um den Nachweis von HPgV-1 durch Blutkontamination auszuschließen. Da zusätzlich für viele Patienten keine weiteren Informationen verfügbar waren, wurden diese Fälle nicht weiter untersucht.

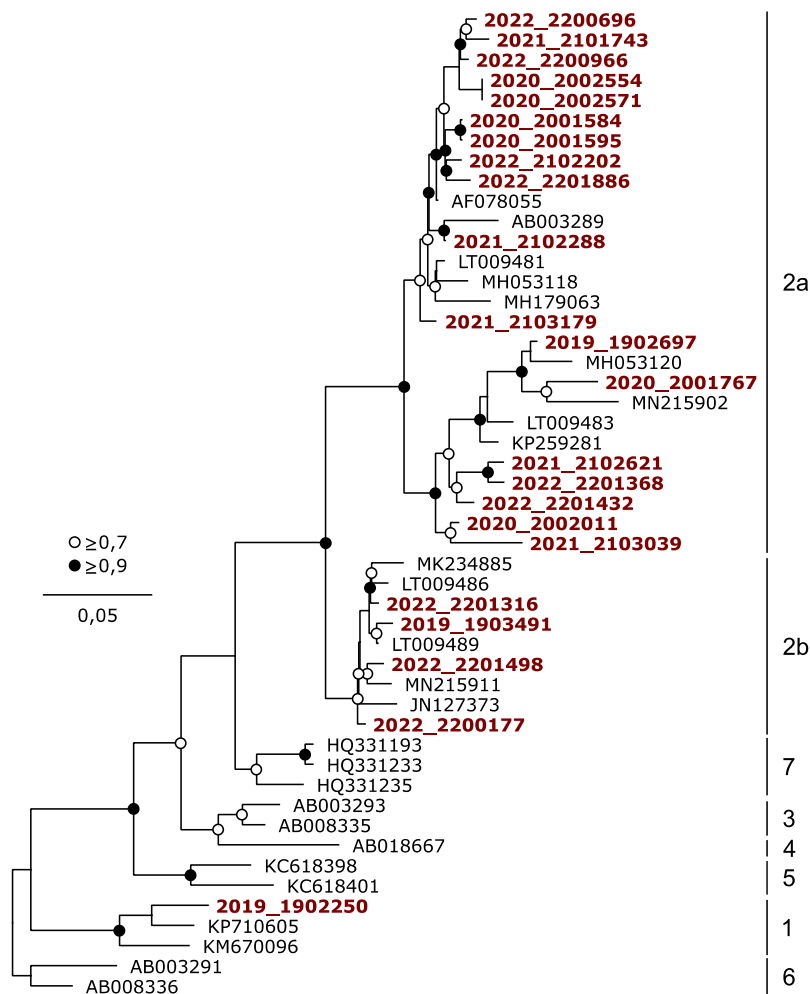


Abbildung 33. Phylogenetische Analyse der partiellen 5'UTR der identifizierten HPgV-1-Fälle und Referenzsequenzen. Die Sequenzen (326 nt) wurden mittels MAFFT (v7.450) in Geneious Prime (v2022.0.1) aligniert. Die Berechnung erfolgte anschließend mittels FastTree (v2.1.11) PlugIn. Support-Werte von $\geq 70\%$ sind durch einen weißen Kreis, Werte von $\geq 90\%$ durch einen schwarzen Kreis dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Sequenzen sind rot hervorgehoben. Referenzsequenzen wurden nach der Klassifizierung von Feng et al. sowie Cebriá-Mendoza et al. ausgewählt^{156,256}. Die Proben 2002554 & 2002571 sowie 2001584 & 2001595 stammen jeweils vom gleichen Patienten.

Pegiviren in akuten Enzephalitis-Fällen der Routinediagnostik

Um weitere HPgV-1-Infektionen zu erfassen, werden seit Mai 2023 Liquor- und Serumproben, die zur breiten Routinediagnostik eingesandt werden, auch auf HPgV-1-RNA untersucht. Gleichzeitig können Ärzte bei unklaren Enzephalitis-Fällen eine HTS-Diagnostik anfordern. Zusätzlich zu den HPgV-1-Befunden in der retrospektiven Studie wurde so bei 13 Patienten mit neurologischen Symptomen virale Nukleinsäure im Liquor und/oder Serum nachgewiesen. Die Viruslast im Serum war dabei stets höher als im Liquor. Die HPgV-1-Viruslast in Liquorproben der retrospektiven Testung war signifikant höher als in Liquorproben der diagnostischen Fälle. Sie war ebenfalls signifikant niedriger als in den Serumproben der diagnostischen Proben (Abbildung 34). Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei der retrospektiven Testung im Blut zirkulierende Viren aufgrund einer Kontamination, z. B. bei der Lumbalpunktion, nachgewiesen worden sind.

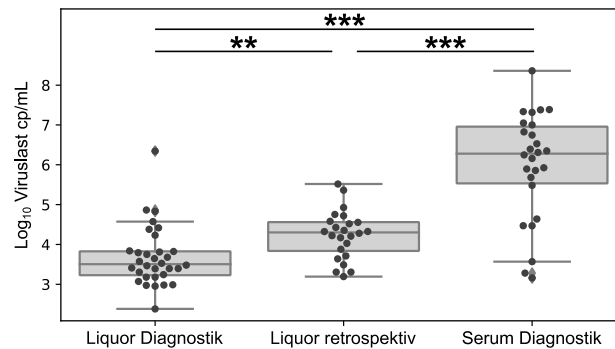


Abbildung 34. HPgV-1-Viruslast in Liquor- und Serumproben. Liquorproben sind aufgeteilt in akute diagnostische Fälle und retrospektiv untersuchte Proben. Die retrospektiv untersuchten Liquorproben (Mitte) zeigten makroskopische Blutbeimengungen. Mann-Whitney-U-Test: **, $p = <0,01$; ***, $p = <0,001$.

Im Folgenden werden vier Patienten näher betrachtet. Zum Zeitpunkt des Auftretens der Symptome waren die Patienten (zwei Frauen, zwei Männer) durchschnittlich 59,5 Jahre alt (Spanne 57-70) und hatten eine mehrjährige chronische immunsuppressive Therapie hinter sich. Bei jeweils zwei Patienten war die Grunderkrankung eine rheumatoide Arthritis bzw. eine Nierentransplantation. Virale RNA wurde in allen Fällen über einen längeren Zeitraum nachgewiesen. Bei Patient #2 wurde in der ersten verfügbaren Liquorprobe keine virale RNA nachgewiesen, aber in einer neun Tage später entnommenen Folgeprobe. Der Abstand zwischen der ersten und der letzten Liquorprobe betrug durchschnittlich 220 Tage (Spanne 9-696 Tage), wobei bei allen Patienten HPgV-1-RNA in der letzten Liquorprobe nachgewiesen wurde. Interessanterweise enthielten die beiden letzten Serumproben von Patient #4, die im Abstand von 25 Tagen entnommen wurden, keine nachweisbare HPgV-1-RNA mehr. Für die Patienten gab es nur wenige Zeitpunkte, sodass unklar bleibt, ob es auch einen Zeitraum ohne Virusnachweis gab (Abbildung 35).

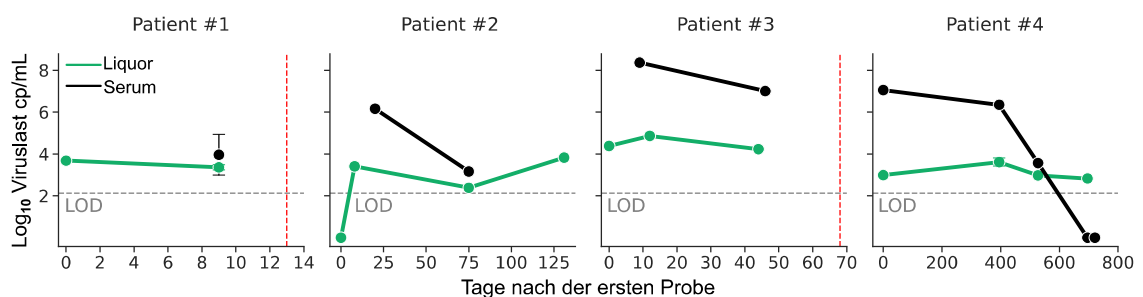


Abbildung 35. Longitudinale Kinetik der HPgV-1-Viruslast in Liquor- und Serumproben. Rote vertikale Linien kennzeichnen den Todestag. LOD, *limit of detection* - Nachweisgrenze.

Alle Patienten hatten pathologische Liquorbefunde, die mit einer viralen ZNS-Infektion vereinbar waren und zeigten charakteristische Anomalien in der Magnetresonanztomographie (MRT). Zwei der vier vorgestellten Patienten starben und es wurde eine Autopsie durchgeführt. Bemerkenswert ist, dass die im MRT auffälligen Hirnregionen auch bei der Autopsie makroskopische Veränderungen zeigten. In diesen Regionen wurde HPgV-1-RNA mittels RT-qPCR nachgewiesen. Die demografischen, klinischen, radiologischen, virologischen und Liquor-Befunde der Patienten sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26. Demografische, klinische, radiologische, virologische und Liquor-Befunde bei Patienten mit HPgV-1 assoziierter Enzephalomyelitis.
Patientendaten wurden von Franziska Scheibe, Eberhard Siebert sowie Klemens Ruprecht zur Verfügung gestellt.

Patient	Patient #1	Patient #2	Patient #3	Patient #4
Alter (Dekade) bei Symptombeginn, Geschlecht	70-80, W	50-60, M	50-60, M	60-70, W
Immunsuppressive Erkrankung	rheumatoide Arthritis, idiopathische Lungenfibrose	rheumatoide Arthritis	Nierentransplantat wegen pANCA-assoziiierter Vaskulitis	Zystische Nierenerkrankung mit Nierentransplantation
Immunsuppressive Therapien (Behandlungsdauer in Jahren; Zeitraum zwischen letzter Anwendung und Auftreten der Symptome)	Methotrexat (unbekannt) Abatacept (unbekannt)	Prednisolon (4; 0) Cyclophosphamid (0,5; 4) Methotrexat (3,5; 0) Rituximab (3,5; 0)	Methylprednisolon (5; 0) Mycophenolatmofetil (5; 0) Tacrolimus (5; 0)	Methylprednisolon (0,5; 16) Mycophenolatmofetil (8,5; 7) Everolimus (8; 7,5) Belatacept (7; 0)
Klinische Symptome	Sehstörungen auf beiden Augen, Müdigkeit, Gangstörungen, Epilepsie, Bewusstseinsstörungen bis zum Koma, Dysphagie, sensomotorische spastische Tetraparese, respiratorische Insuffizienz mit Tracheostomie und invasiver Beatmung	Sehstörungen auf beiden Augen, Gangstörung, Schwindel, Dysosmie, Dysphagie, sensorische Ataxie, distal-akzentuierte sensomotorische spastische Paraparese, Muskelschwund, Harn- und Stuhlinkontinenz	Sehstörungen auf beiden Augen, Übelkeit, Erbrechen, Gangstörung, Schwindel, kognitive Beeinträchtigung/ Bewusstseinsstörung, Dysphagie, beinbetonte sensomotorische spastische Tetraparese, Myalgie, respiratorische Insuffizienz mit nicht-invasiver Beatmung	Sehbehinderung auf beiden Augen, kognitive Beeinträchtigung/ Bewusstseinsstörung, Dysphagie, spastische sensomotorische Tetraparese mit Kribbelparästhesie und einschießenden Schmerzen, respiratorische Insuffizienz mit Tracheostomie und invasiver Beatmung
intensivmedizinische Betreuung	ja	nein	ja	ja
Liquorbefunde bei der Diagnose	Weißer Blutkörperchen 27/µL, Glukose 82 mg/dL, Laktat 35,6 mg/dL, Protein 639,6 mg/L, intrathekale IgG-Synthese 20%, Liquor-spezifische OCB	Weißer Blutkörperchen 49/µL, Glukose 55 mg/dL, Laktat 28,8 mg/dL, Protein 992,2 mg/L, keine Liquor-spezifische OCB	Weißer Blutkörperchen 7/µL, Glukose 63 mg/dL, Laktat 33,3 mg/dL, Protein 287,5 mg/L, intrathekale IgG-Synthese 40%, Liquor-spezifische OCB	Weißer Blutkörperchen 5/µL, Glukose 52 mg/dL, Laktat 19 mg/dL, Protein 427 mg/L, intrathekale IgG-Synthese 16%, Liquor-spezifische OCB

Patient	Patient #1	Patient #2	Patient #3	Patient #4
Neurofilament-Leichtketten Liquor (Referenzbereich < 829-2400 pg/mL)	49.411 pg/mL	7.761 pg/mL	16.886 pg/mL	6.128 pg/mL
Neurofilament-Leichtketten Serum (Referenzbereich < 23,3-30,9 pg/mL)	358 pg/mL	27,6 pg/mL	309 pg/mL	809 pg/mL
MRT-Befunde	T2-Hyperintensität des Chiasmas und der Sehnervenbahnen, fortschreitende ubiquitäre schwache FLAIR-Hyperintensität der weißen Substanz, fortschreitende kleine Herde mit eingeschränkter Diffusivität innerhalb der Bahnen der weißen Substanz (Corpus callosum, aufsteigende und absteigende, insbesondere Pyramidenbahnen mit Akzentuierung von Anomalien in inneren Kapseln, mesenzephalen Stielen und Pyramiden), T2-Hyperintensität des gesamten Rückenmarks mit axialem Schwerpunkt in anterolateralen Bahnen und posterioren Säulen, fokale Kontrastverstärkung der mittleren dorsalen Säule	T2-Hyperintensität der Sehnerven, des Chiasmas und der Sehnervenbahnen, fortschreitende schwache ubiquitäre FLAIR-Hyperintensität der weißen Substanz, fortschreitende T2-Hyperintensität der Pyramiden ohne Diffusionseinschränkung, leicht reduzierte Diffusivität des kortikospinalen Trakts innerhalb der inneren Kapsel, leichte T2- und DWI-Anomalie des Spleniums, langstreckige T2-Hyperintensität fast des gesamten Rückenmarks, die vorwiegend die hinteren Säulen betrifft, geringere Beeinträchtigung des anterolateralen Trakts, multifokale Kontrastmittelanreicherung des Rückenmarks und fokale Anreicherung der splenialen Läsion	T2-Hyperintensität der Sehnerven und des Chiasmas, subtile T2-Hyperintensität der Pyramiden, langstreckige T2-Hyperintensität fast des gesamten Rückenmarks, die vorwiegend die hinteren Säulen betrifft, geringerer Befall der anterolateralen Bahnen, weder eingeschränkte Diffusivität noch Kontrastverstärkung	T2-Hyperintensität der Sehnerven, des Chiasmas und der Sehnervenbahnen, T2-Hyperintensität des Rückenmarks in langen Segmenten (C0-Th2), die die hinteren Säulen und die anterolateralen Bahnen betreffen, weder eingeschränkte Diffusivität noch Kontrastverstärkung noch Pyramiden-Hyperintensität, leichte T1-Verkürzung der Pallida- und Dentatumkerne, höchstwahrscheinlich aufgrund von Gadoliniumablagerungen nach mehreren MRTs im Zusammenhang mit Niereninsuffizienz
HPgV-1-Detektion	HTS-basierte Diagnostik	HTS-basierte Diagnostik	HTS-basierte Diagnostik	HPgV-1 PCR

Patient	Patient #1	Patient #2	Patient #3	Patient #4
Nukleotid-Identität (Serum) zur nächsten bekannten Referenz	93,2% LT009487.1	91,9% MT184940.1	94,2% D87255.1	92,8% OQ791475.1
HPgV-1 im Serum (cp/mL)	1,9x10 ³ - 4,4x10 ⁴	1,4x10 ³ - 1,5x10 ⁶	1,0x10 ⁷ - 2,3x10 ⁸	2,2x10 ⁶ - 1,1x10 ⁷
HPgV-1 im Liquor (cp/mL)	1,5x10 ³ - 2,9x10 ³	2,4x10 ² - 6,7x10 ³	1,7x10 ⁴ - 7,3x10 ⁴	9,7x10 ² - 5,6x10 ³
Detektion weiterer Viren	Toque-teno Virus	nein	HHV-4 (Serum)	HHV-4 (Liquor)
Behandlungsversuch a) durchgeführt, wenn ja Medikament und Dosierungsschema, klinisches Ansprechen	a) nein (post mortem Diagnose) b) -	a) ja, mit Interferon alpha-2a 3 Mio/IE dreimal wöchentlich für drei Monate (Abbruch wegen grippeähnlicher Symptome), nein b) Tocilizumab 162 mg s.c. wöchentlich und Prednisolon 10 mg/d p.o. bei rheumatoider Arthritis, ja	a) ja, mit Ribavirin 1000 mg/d p.o. für 6 Wochen bis zum Tod, nein b) Reduzierung der Immunsuppression durch Absetzen von Mycophenolatmofetil und Dosisreduzierung von Methylprednisolon von 8 mg/d auf 6 mg/d p.o. zum Schutz der Nierentransplantation, keine	a) keine, nein b) niedrig dosiertes Methyl-Prednisolon 6 mg/d p.o. und Azathioprin 50 mg/d p.o. zum Schutz des Nierentransplantats
b) sonst Anpassung der Immunsuppression, klinisches Ansprechen				
Krankheitsverlauf	fortschreitende Krankheit, Tod	partielle klinische Remission (Verbesserung von Bettlägerigkeit zu Selbstmobilisierung, in der Lage, mit Hilfe zu gehen, vollständige Wiederherstellung der Feinmotorik der Hände)	fortschreitende Krankheit, Tod	partielle klinische Remission (Entwöhnung vom Beatmungsgerät, Dekanation, Verbesserung der Muskelkraft in den Armen, bleibt an den Rollstuhl gebunden)
Nachbeobachtungszeit (Monate) a) seit den ersten Symptomen b) seit der ersten Diagnose	a) 7 b) 0	a) 30 b) 9	a) 17 b) 2	a) 25 b) 12

DWI, *diffusion weighted imaging*; FLAIR, *Fluid-attenuated inversion recovery*; HHV-4, Humanes Herpesvirus 4; HPgV-1, humanes Pegivirus-1; HTS, Hochdurchsatz-Sequenzierung; IE, Internationale Einheit pro Milliliter; IgG, Immunglobulin G; M, männlich; MRTs, Magnetresonanztomographien; OCB, oligoklonale Banden; pANCA, perinukleäre anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; p.o., peroral; s.c., subkutan; W, weiblich.

Alle verfügbaren Proben wurden sequenziert. Falls erforderlich, wurde virale Nukleinsäure mit Hilfe des PgV-*Capture* Kits angereichert. Für drei Patienten gelang es Vollgenomsequenzen aus Serum und Liquor zu generieren. Für Patient #2 gelang dies nur aus Serum. Ähnlich den Ergebnissen der retrospektiven Untersuchung war auch bei diesen Patienten Genotyp 2a am häufigsten vertreten (3/4, 75%). Patient #4 war mit Genotyp 1 infiziert (Abbildung 36).

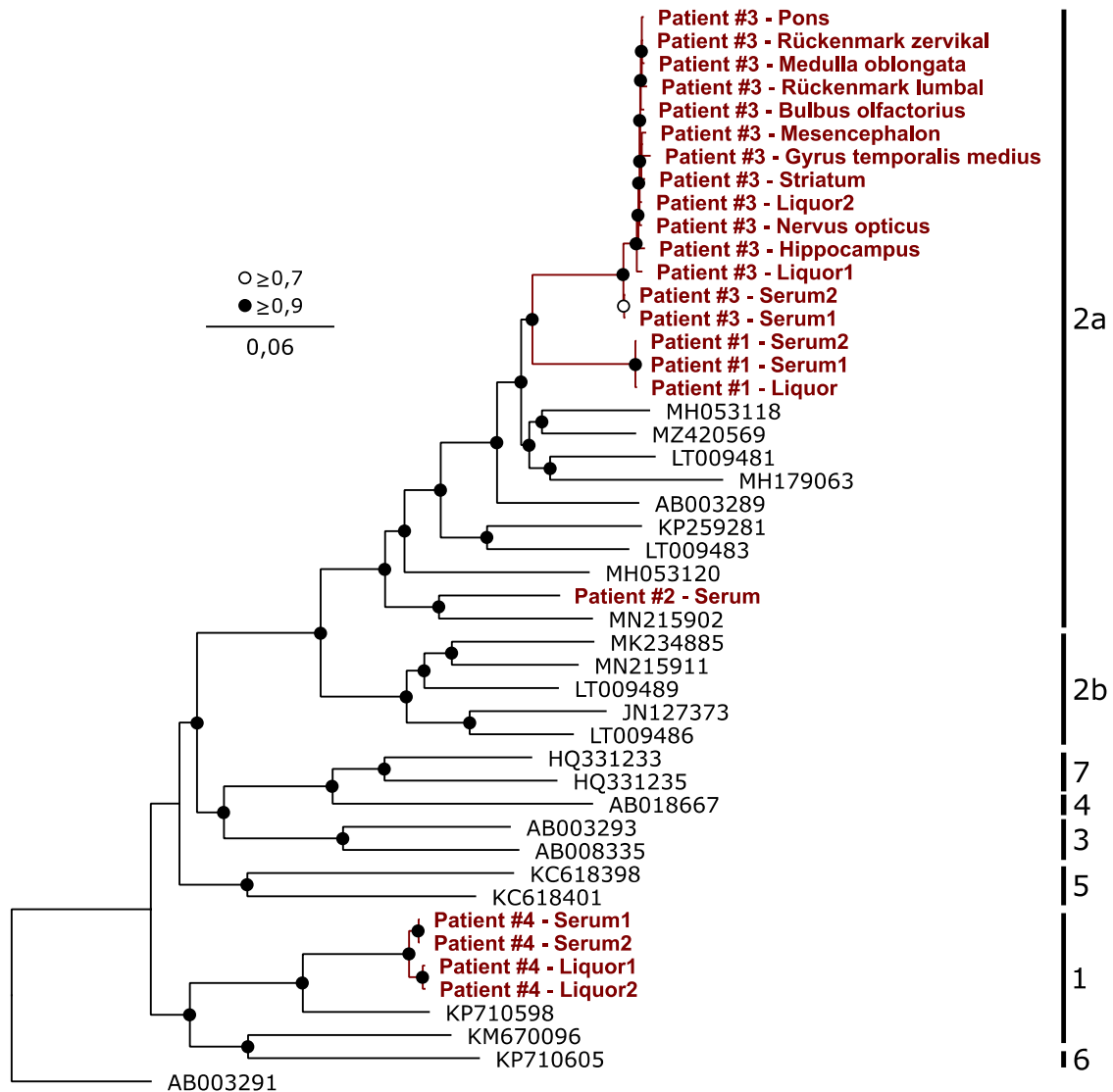


Abbildung 36. Phylogenetische Analyse der kodierenden Region humaner Pegiviren.

Die Berechnung erfolgte mit dem MrBayes²²⁹ Plugin in Geneious Prime (v2022.0.1) unter Verwendung des Substitutionsmodells GTR+I+G sowie 500.000 Wiederholungen. *Bootstrap*-Werte von $\geq 90\%$ sind durch einen schwarzen Kreis dargestellt, Werte $\geq 70\%$ durch einen weißen Kreis. Genotyp 6 (AB003291) wurde als Außengruppe und für das Rooten des Baumes verwendet. Referenzen-Sequenzen wurden nach der Klassifizierung von Feng et al. sowie Cebriá-Mendoza et al. gewählt^{156,256}. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Sequenzen sind rot hervorgehoben.

4. Ergebnisse

Die Sequenz der ersten verfügbaren Serumprobe wurde als patientenspezifische Referenz verwendet, und weitere Konsensussequenzen eines Patienten wurden mit dieser verglichen. Ein Vergleich der generierten Konsensussequenzen aus Liquor und Serum zeigte bei drei Patienten eine hohe Anzahl von SNPs und AA-Austauschen. Bei Patient #4 wurden mehr als 202 SNPs und 45 AA-Unterschiede im Vergleich zum ersten Serum festgestellt (Abbildung 37).

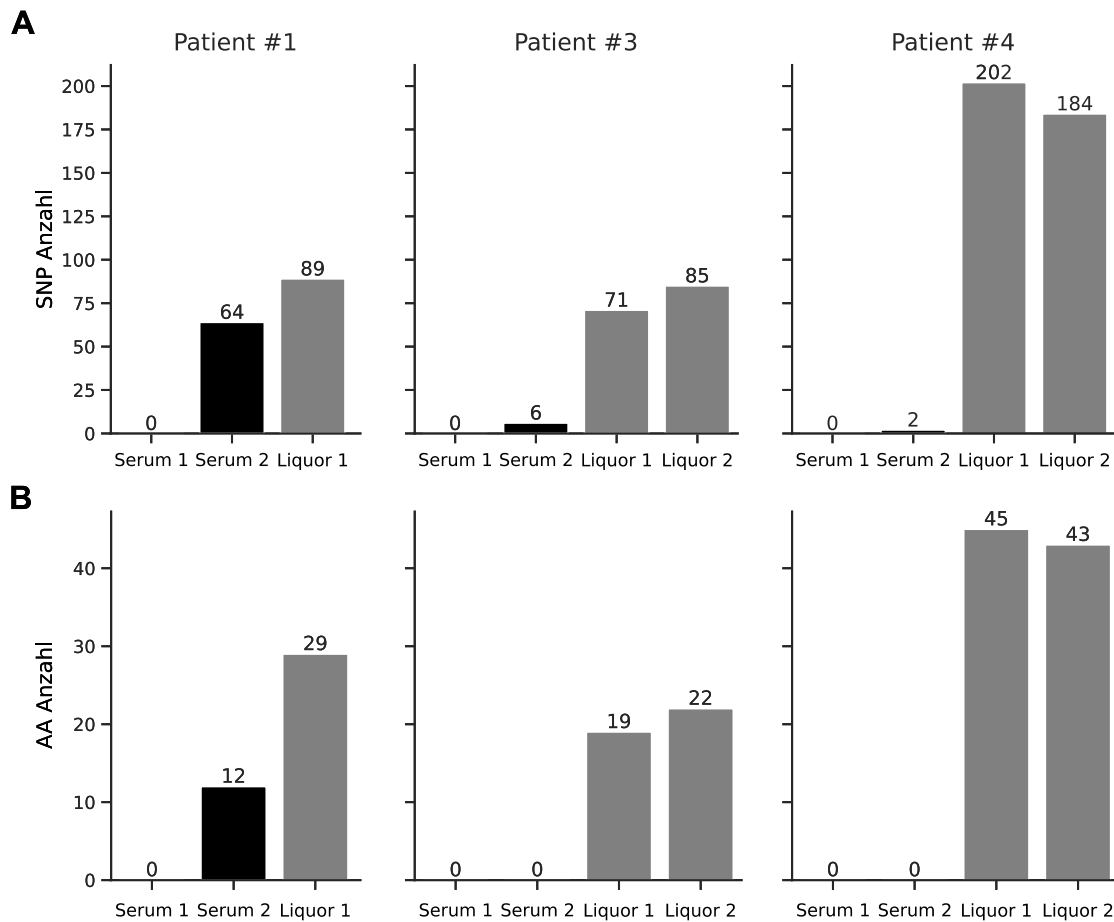


Abbildung 37. Kompartimentalisierung von HPgV-1. Dargestellt ist die Anzahl der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, A) und Aminosäure-Substitutionen (AA, B) für drei HPgV-1-Patienten. Genom-Unterschiede wurden mittels Geneious Prime (v2022.0.1) berechnet. Die Unterschiede wurden im Vergleich zur Konsensussequenz der ersten verfügbaren Serumprobe pro Patient ermittelt.

Pegivirus-Diversität innerhalb eines Patienten

Im Folgenden sollte die Virusdiversität innerhalb eines Patienten untersucht werden. Diese konnte für Patient #3 vertiefend analysiert, da aufgrund der durchgeführten Autopsie 44 Gewebeproben zur Verfügung standen. Virale RNA wurde in 39/44 (88,6%) Geweben detektiert. Liquor und Serum wurden im Abstand von 12 und 38 Tagen zueinander untersucht. Die Viruslast im Serum war höher als im Liquor. In Proben des ZNS ($7,0 \times 10^3$ - $7,4 \times 10^5$ cp/10.000 diploider Zellen) und des peripheren Nervensystems (PNS) ($4,7 \times 10^3$ - $1,2 \times 10^6$ cp/10.000 diploider Zellen) war die Viruslast signifikant höher als in den restlichen Geweben ($8,8 \times 10^1$ - $6,6 \times 10^4$ cp/10.000 diploider Zellen, Abbildung 38).

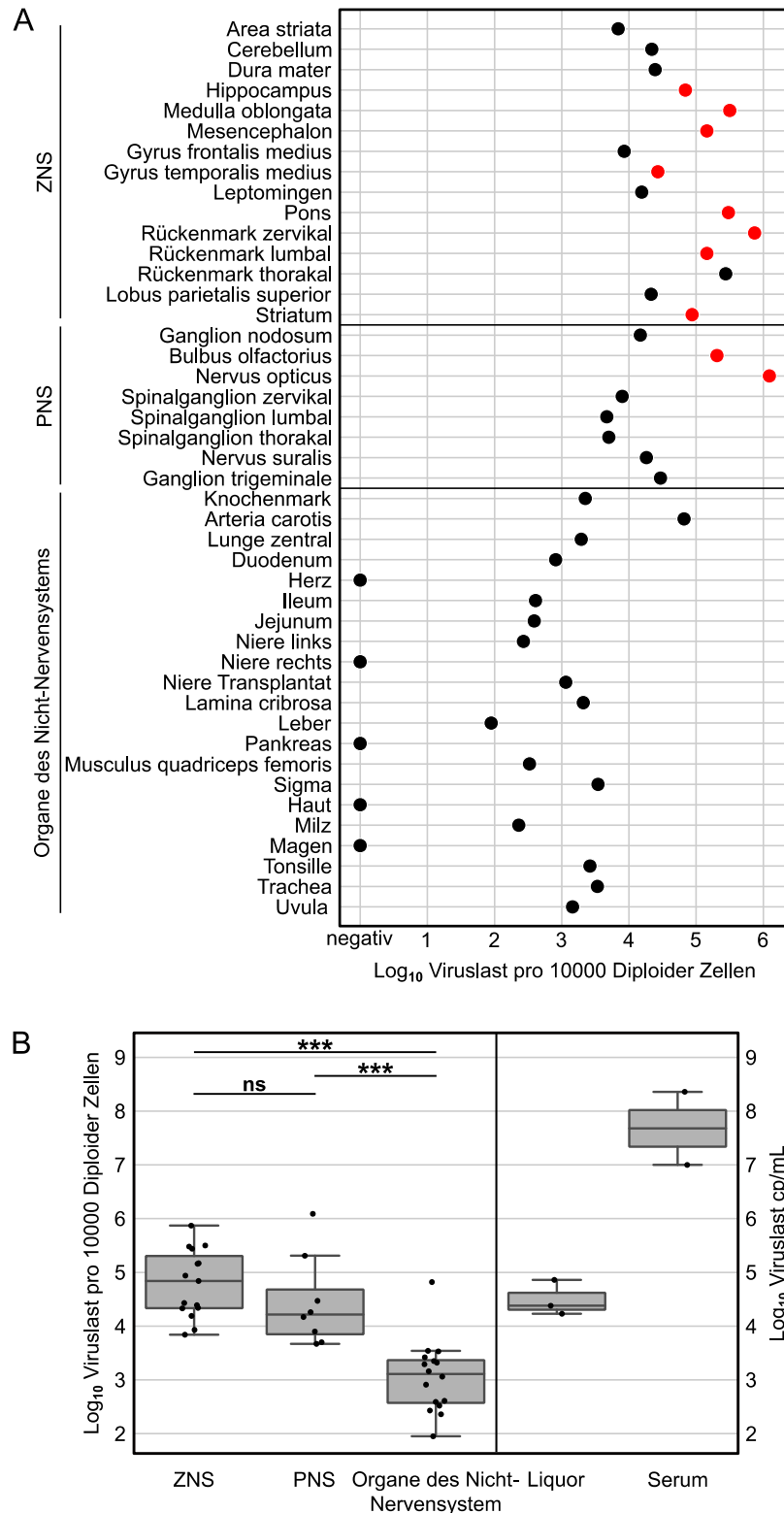


Abbildung 38. HPgV-1-Viruslast in Autopsiegeweben. In 39 von 44 postmortalen Gewebeproben des Patienten #3 wurde HPgV-1-RNA nachgewiesen. Gewebeproben, die für die Analyse der Virusdiversität verwendet wurden, sind rot hervorgehoben (A). Die höchsten Viruslasten wurden in ZNS- und in PNS-Proben festgestellt, vor allem in den Regionen mit den stärksten MRT-Anomalien (Sehnerv, Hirnstamm (Mesencephalon, Pons, Medulla oblongata) und zervikales Rückenmark) im Vergleich zu Geweben außerhalb des Nervensystems und im Vergleich zu den Viruslasten von Liquor und Serum (B). Mann-Whitney-U-Test: ***, $p = <0,001$; ns, nicht signifikant ($p = >0,05$). PNS, peripheres Nervensystem; ZNS, zentrales Nervensystem.

4. Ergebnisse

Ein im Rahmen dieser Arbeit etabliertes PgV-Capture Kit wurde für die Anreicherung viraler Sequenzen verwendet. Zuvor wurde bei Gewebeproben rRNA abgereichert. Die Vollgenomsequenzierung von peripheren Gewebeproben war nicht erfolgreich, sodass diese nicht in die Analyse eingeschlossen wurden. Für 14 Proben wurde eine Konsensussequenz erstellt. Die Genomabdeckung musste dabei mindestens 75% innerhalb der kodierenden Region sowie 30 Sequenzen pro Position betragen. Die individuellen Genomabdeckungen sind in Abbildung A5 dargestellt. Mutationen mit einer Frequenz von $\geq 25\%$ wurden in der Konsensussequenz berücksichtigt. Die Konsensussequenz für das erste Serum diente als Referenz für die nachfolgenden Analysen.

Ein Vergleich aller für Patient #3 erstellten Konsensussequenzen ergab insgesamt 441 Genompositionen, die sich von der Referenz (Serum 1) unterschieden. Insgesamt 109 Genompositionen wiesen einen Unterschied innerhalb der kodierenden Region in mindestens zwei Proben auf. Dabei wurden zahlreiche Mutationen detektiert, die innerhalb des ZNS vorkamen, jedoch nicht im Serum (Abbildung 39). Die Konsensussequenzen zweier Serumproben, die im Abstand von 38 Tagen abgenommen wurden, unterschieden sich in sechs Positionen. Alle anderen Proben unterschieden sich an mindestens 44 Genompositionen. Zwischen den Konsensussequenzen der beiden Serumproben, die im Abstand von 38 Tagen entnommen wurden, wurden keine AA-Substitutionen festgestellt (Abbildung A6).

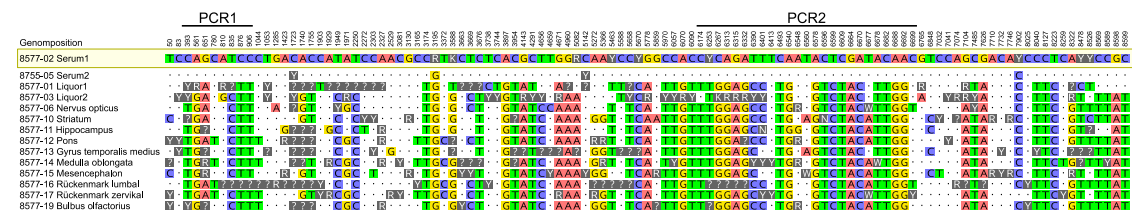


Abbildung 39. Genomunterschiede in den untersuchten Proben. Zusammenfassung von Genompositionen innerhalb der CDS, die bei mindestens zwei Proben einen Unterschied zur Konsensussequenz der ersten Serumprobe (gelb hervorgehoben) aufwiesen. Markiert sind Genombereiche die durch zwei PCR-Fragmente weiter untersucht wurden. Konsensussequenzen wurden mit der 75% 'Highest-Quality'-Einstellung in Geneious Prime erstellt. Nur Genompositionen mit einer Coverage von mindestens 30 Sequenzen wurden berücksichtigt. ?, Genomabdeckung <30 Sequenzen; ., identisch zur Referenz; K=T oder G; R=A oder G; S=C oder G; W=A oder T; Y=C oder T.

Die höchste Anzahl von nt- und AA-Unterschieden wurde zwischen den Striatum- und den Serumproben festgestellt (119 und 122 nt-, 37 AA-Austausche, Abbildung A6). Um die Existenz einiger dieser Mutationen und Varianten zu bestätigen, wurden zwei sequenzspezifische PCRs entwickelt (Abbildung 39) und die daraus resultierenden PCR-Amplikons einer Sanger-Sequenzierung unterzogen. Wie erwartet wurde nur ein Teil der uneindeutigen Genompositionen (Ambiguitäten) mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Der überwiegende Anteil von Mutationen wurde jedoch bestätigt.

Deletionen im NS5A

Bei der Analyse der Rohdaten wurden genomische Regionen identifiziert, in denen einige der generierten Sequenzen Deletionen und in seltenen Fällen Insertionen aufwiesen. Diese konzentrierten sich insbesondere auf die NS5A-Region bei den Patienten #1, #3 und #4 (Abbildung 40 A). PCR-2 (Abbildung 39) umfasste diese Region. Die Existenz dieser Deletions-Varianten wurde zusätzlich überprüft, da sie in der Sanger-Sequenzierung zunächst nicht detektiert wurden. Dafür wurden die PCR-Amplifikate einer Serumprobe, des Nervus opticus (Abbildung 40 B) sowie des Striatum (Abbildung 40 C) mittels Oxford Nanopore sequenziert. Die zuvor beobachteten Deletionen konnten bestätigt werden. Für den Nervus opticus wurde eine zusätzliche Deletion identifiziert (Abbildung 40 B).

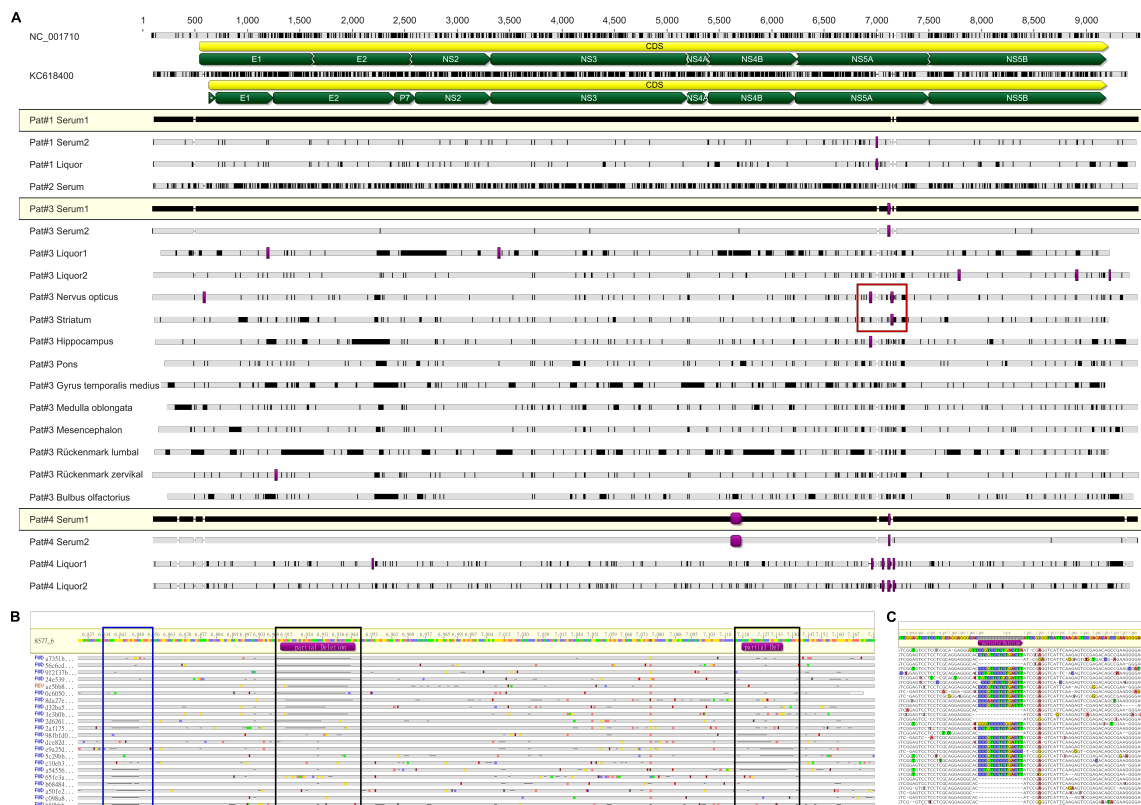


Abbildung 40. Genomorganisation der HPgV-1-Referenzen NC_001710²⁵⁷ und KC618400²⁵⁸ und Sequenzvergleich der generierten HPgV-1-Sequenzen dieser Arbeit. Die Sequenzen eines Patienten werden jeweils mit der ersten Serumprobe des Patienten verglichen (gelb markiert). Referenzsequenzen und die Sequenz aus einer Serumprobe von Patient #2 werden mit der Referenz von Patient #1 verglichen. SNPs, Genomstellen mit gemischten Populationen (Ambiguitäten) und Genomregionen ohne Abdeckung sind schwarz hervorgehoben. Detektierte Genomregionen mit Deletionen oder Insertionen sind pink markiert (A). Oxford Nanopore Sequenzen eines PCR-Produkts für den Nervus opticus (B) und das Striatum (C) der in (A) rot markierten Region. Ein schwarzer Rahmen markiert Genombereiche, in denen zuvor Deletionen detektiert wurden. Ein blauer Rahmen markiert eine zusätzliche Genomregion mit Deletion für die Nervus opticus Probe die erst durch die Amplikon-Sequenzierung identifiziert wurde (B).

Charakteristika einer HPgV-1-Enzephalitis

HPgV-1-Patienten, die über die (HTS-)Diagnostik identifiziert wurden, zeigten auffällige Gemeinsamkeiten. In Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen innerhalb der Charité - Universitätsmedizin Berlin aus der Neurologie (Prof. Dr. Klemens Ruprecht, Dr. Franziska Scheibe), Radiologie (Prof. Dr. Eberhardt Siebert), Neuropathologie (Dr. Helena Radbruch, Dr. Jenny Meinhardt) und Virologie (Dr. Victor Corman, diese Arbeit) sowie auf Basis dieser multidisziplinären Untersuchung wurden die folgenden Parameter für die Diagnose einer HPgV-1-Enzephalitis als wegweisend definiert:

- I. entzündliches Liquorsyndrom,
- II. gehobenes Alter,
- III. Immunsuppression,
- IV. MRT-Anomalien entlang der vorderen Sehbahn, insbesondere Hyperintensitäten entlang der Sehnerven, des Chiasmas und der Sehbahn, aber auch entlang der zentralen sensorischen und motorischen Bahnen im Gehirn und Rückenmark,
- V. Nachweis von HPgV-1-RNA im Liquor (/Hirngewebe) ohne Hinweise auf Einblutung mit optionalem Nachweis der Kompartimentalisierung durch Sequenzierung.

Drei Fälle wurden mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten HTS-Diagnostik nachgewiesen. In einem vierten Fall wurde die HPgV-1-PCR-Testung direkt von den behandelnden Ärzten initiiert, da der Patient exakt dem Bild einer HPgV-1-Enzephalitis entsprach. Durch die etablierte HTS-Diagnostik und das eingeführte Routinescreening aller Liquor- und Serumeinsendungen wurden insgesamt 13 HPgV-1-Infektionen identifiziert. Die Untersuchung und Bewertung dieser Fälle ist zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation noch nicht abgeschlossen.

Vollgenomsequenzierung zum Ausschluss von Kompartimentalisierung

Eine HPgV-1-Infektion wurde durch das implementierte Routinescreening von aktuellen Liquor- und Serum-Einsendungen detektiert. Dieser Fall warf zunächst Fragen auf, da die Symptome und Laborparameter der Person nicht zum klinischen Bild der HPgV-1-Enzephalitis passten. Die Vollgenomsequenzierung einer Serum- und Liquorprobe ergab nahezu identische Konsensussequenzen. An sieben Positionen wurde entweder im Serum oder im Liquor eine gemischte Population nachgewiesen, die nicht im Widerspruch zur Mehrheit in der anderen Probe stand. Aufgrund der geringen Sequenzierentiefe (min./max./Mittelwert *Coverage*: Serum 0/36/13,8; Liquor 0/185/47,2) handelt es sich hier vermutlich um einen technischen Bias. Daher ist in diesem Fall eine Blutkontamination des Liquors wahrscheinlich.

Eine grafische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieses Kapitels ist in Abbildung 41 gegeben.

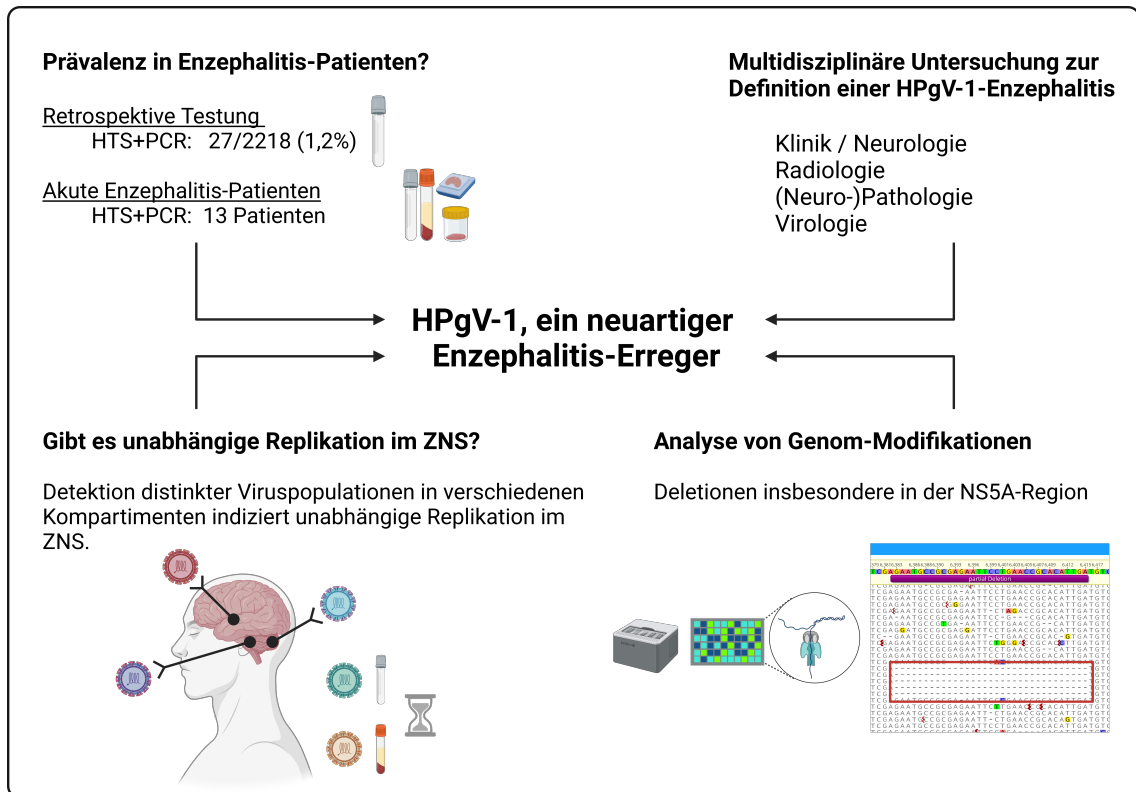


Abbildung 41. Zusammenfassung der durchgeführten HPgV-1-Untersuchungen. Aufgrund des zahlreichen Nachweises von HPgV-1-Sequenzen in der retrospektiven Liquoruntersuchung wurde eine spezifische RT-qPCR etabliert. In 27 der 2218 untersuchten Einzelproben (1,2%) wurde virale RNA nachgewiesen. Die etablierte HTS-Diagnostik und das durchgeführte Screening aller eingesendeten Liquor- und Serumproben für die virologische Diagnostik führten zur Identifizierung von insgesamt 13 HPgV-1-Fällen. Eine multidisziplinäre Untersuchung führte zur Charakterisierung des Bildes einer HPgV-1-Enzephalitis. Die Vollgenomsequenzierung ergab bei drei der vorgestellten Patienten den Nachweis unterschiedlicher Viruspopulationen, die eine unabhängige Replikation im ZNS vermuten lassen. Es konnten Genomveränderungen, insbesondere Deletionen innerhalb der NS5A-Region, nachgewiesen werden. Erstellt mit BioRender.com. HPgV-1, humanes Pegivirus 1; HTS, Hochdurchsatz-Sequenzierung; NS, Nicht-Strukturprotein; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; ZNS, zentrales Nervensystem.

5. Diskussion

5.1. Hochdurchsatz-Sequenzierung für die Diagnostik viraler Enzephalitis-Fälle

Eine Enzephalitis ist eine schwerwiegende Erkrankung des ZNS. Initiale Untersuchungen liefern Hinweise, ob eine bakterielle, virale oder autoimmune Ursache zugrunde liegt. Dennoch erweist sich die Diagnostik aufgrund multipler Faktoren schwierig, zeit- und kostenintensiv. Bis heute bleibt die Mehrheit der Enzephalitis-Fälle ohne Erregernachweis²⁵⁹. Initiales Ziel dieser Arbeit war es, einen HTS-basierten Arbeitsablauf zu etablieren, um die Diagnostik viraler Enzephalitiden zu unterstützen. Dieser sollte auf Liquorproben von Patienten mit Enzephalitis ungeklärter Ursache angewendet werden, um mögliche kausale Viren zu identifizieren. Des Weiteren sollten Sequenziermethoden etabliert werden, um die Generierung von Virusvollgenomen und weiterführende genomische Analysen zu ermöglichen.

Initiale Experimente dienten der Optimierung des technischen Arbeitsablaufes und um den Nachweis von RNA- und DNA-Viren zu ermöglichen. Die Teilnahme an Ringversuchen bestätigte die generelle Funktionalität und Sensitivität der etablierten Methodik. Proben mit geringer Viruslast wurden zuverlässig detektiert. Durch den gleichzeitigen Nachweis von RNA- und DNA-Viren mit nur einer Art der Präparation wurde ein Arbeitstag und somit wertvolle Zeit eingespart. Auf diese Weise können Ergebnisse innerhalb von drei Tagen nach dem Probeneingang bereitgestellt werden.

Die Anwendung der etablierten Methode führte zur Aufklärung einiger diagnostischer Fälle. Besonders hervorzuheben ist die retrospektive Identifizierung einer DOBV-Infektion. In diesem Fall wurde das ursächliche Pathogen erst durch den Einsatz der HTS-basierten Diagnostik identifiziert. Aber auch in der akuten HTS-Diagnostik wurden mehrere ursächliche Pathogene identifiziert, insbesondere HPgV-1. Dies unterstreicht den Nutzen der HTS-basierten Diagnostik. Als nicht-zielgerichtete Methode ist HTS unabhängig von der Krankengeschichte der Patienten sowie dem Wissen und der Erfahrung der behandelnden Ärzte. Darüber hinaus ist die HTS-basierte Diagnostik in der Lage, auch sehr divergente Viren zu identifizieren, die in der PCR-basierten Diagnostik beispielsweise aufgrund von Primer-Fehlpaarungen zu falsch-negativen Ergebnissen²⁶⁰ geführt hätten.

Retrospektive Liquor Studie

Labor Berlin erhält jährlich ~1000 Liquorproben zur Untersuchung auf 14 der häufigsten Enzephalitis- und Meningitis-Erreger. Etwa 90% der durchgeführten Paneluntersuchungen bleiben ohne Erregernachweis. Auch in ähnlichen Studien wurden in der Mehrheit der untersuchten Proben keine ursächlichen Pathogene identifiziert^{6,22,261,262}. In dieser Arbeit wurden insgesamt 1676 Liquorproben retrospektiv per HTS untersucht. Dies erfolgte insbesondere im

Hinblick auf nicht identifizierte WNV-Infektionen, aber auch um zu verstehen, ob es andere häufige virale Erreger gibt.

Die Untersuchung führte zur Identifizierung von viralen Erregern, insbesondere HEV, TOSV, WNV sowie HPgV-1. Die generelle Funktionsweise der Testung wurde auch durch den Nachweis bekannter HIV- und HCV-Infektionen bestätigt. Die Mehrzahl der untersuchten Pools blieb jedoch ohne Nachweis. Dies kann unter anderem zurückzuführen sein auf:

- I. eine unzureichende Sequenziertiefe für die einzelne Probe oder geringe Viruslast,
- II. eine späte Entnahme der Liquorprobe und somit dem Verpassen des diagnostischen Fensters^{263,264},
- III. längere Lagerzeiten bei +4 °C oder -20 °C sowie Gefrier-Auftau-Zyklen²⁶⁵,
- IV. eine nicht-virale Ursache der Enzephalitis.

Kontaminationen

Verschiedene Arten von Kontaminationen, einschließlich Laborkontaminationen, Indexblutungen und Kreuzkontaminationen, führen fälschlicherweise zum Nachweis von viraler Nukleinsäure. Dies kann zu einem falsch-positiven Ergebnis führen²⁶⁶. Der Nachweis eines Norway Luteo-like Virus 4 warf die Frage auf, ob es sich dabei um einen neuen, zoonotischen Erreger handeln könnte, da dieses Virus zuvor in Zecken beschrieben wurde. Eine sorgfältige Überprüfung mit Hilfe einer speziell für diese Sequenz generierten RT-qPCR ergab jedoch, dass es sich um virale Nukleinsäure von der Silikamembran der Extraktionssäule handelte. Pettersson et al., die das Luteo-like Virus beschrieben, verwendeten ebenfalls eine Säulen-basierte Extraktionsmethode²⁴⁷. Aufgrund der hohen Identität zwischen den Sequenzen ist es möglich, dass die Autoren eine Kontamination beschrieben haben.

Bei der anfänglichen Verwendung einer Positivkontrolle (Cavally-Virus Zellkulturüberstand) wurden durch die erhöhte Sequenziertiefe mit Hilfe der NextSeq-Plattform zusätzliche Viren im Eluat identifiziert. Daher wurde die Verwendung des Cavally-Virus Zellkulturüberstandes als Positivkontrolle beendet. Die Sequenzierung von Liquorproben, einhergehend mit einem geringen Wirtsgenom-Hintergrund, ermöglicht die Detektion geringster Kontaminationen. Asplund et al.²⁶⁶, zeigten in intensiven Untersuchungen die Häufigkeit von Kontaminationen durch verschiedene Extraktionsmethoden und Kit-Komponenten, von denen auch im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche beobachtet wurden, einschließlich Sewage-associated circular DNA Virus oder Aviäres Leukosevirus.

Insbesondere bei neuartigen Viren ist zunächst unklar, ob diese als Kontamination eingetragen wurden, zufällige Beibefunde sind oder tatsächlich kausal für die Pathogenese sind. Die Etablierung spezifischer Bestätigungsassays ist kosten- und zeitintensiv. Abbildung 12 in Kapitel 4.1.5. gibt einen Leitfaden zum Umgang mit Kontaminationen bzw. potentiell kausaler Erreger. Von besonderer Bedeutung ist die Beurteilung der Virusfunde durch geschulte Virologen. Die Etablierung und Führung einer Kontaminations-Datenbank ist eine hilfreiche Maßnahme für die schnelle Identifizierung oder den Ausschluss potentieller Erreger. Bei der gemeinsamen Nutzung von Geräten, Laboren und Sequenziergeräten muss die Prozessierung von Proben zwingend

dokumentiert werden, um auch rückwirkend eine Einschätzung über Kontaminationsquellen zu ermöglichen. Bei Säulen-basierten Extraktionen kann man regelmäßig bestimmte Kontaminations-Sequenzen nachweisen und diese nach vorheriger Charakterisierung schnell identifizieren und ausschließen. Eluate aus automatisierten Extraktionsrobotern weisen diese nicht auf. Allerdings können hier *cross run*- und *intra run*-Kontaminationen auftreten. Kontaminationen können durch Aerosolbildung oder durch Nukleinsäure-Moleküle entstehen, die sich zuvor im Gerät (z. B. in Schläuchen) abgesetzt haben. Um diese als solche zu erkennen, ist es notwendig zu wissen, welche Proben vorher/gleichzeitig bearbeitet wurden.

In der Vergangenheit mussten Publikationen zurückgezogen werden, die das Murine Leukämievirus, das *Xenotropic murine leukemia virus-related Virus* sowie das National Institutes of Health–Chongqing-Virus als humanpathogene Viren beschrieben, aber schließlich auf Verunreinigung zurückzuführen waren^{267–270}. Eine besondere Herausforderung stellen virale, endogene Elemente dar. Etwa 8% des menschlichen Genoms besteht aus endogenen, retroviralen Elementen¹⁷⁸. Auch andere Viren können Teile ihres Genoms in das menschliche Genom integrieren, unter anderem HHV-6, EBV und Bornaviren^{271–273}. Wenn nur eine geringe Anzahl viraler Sequenzen nachgewiesen werden, stellen sich die folgenden Fragen:

- I. Ist die Viruslast in der Probe unter dem Detektionslimit und ggf. deswegen eine durchgeführte PCR ohne Nachweis?
- II. Gibt es eine aktive, virale Replikation?
- III. Handelt es sich um endogene Elemente?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten weiterführende Analysen durchgeführt werden. So kann eine gleichmäßige Verteilung von Sequenzen über das virale Genom für eine aktive Replikation sprechen. Konzentrieren sich die Sequenzen auf einen Bereich, so kann dies auf endogene Elemente hindeuten²⁷⁴.

Limitationen

Im Rahmen dieser Arbeit bestätigte sich, dass auch die HTS-basierte Diagnostik mit Einschränkungen verbunden ist. Wie bei der PCR-basierten Diagnostik sind die Auswahl des richtigen Probenmaterials und der Zeitpunkt der Abnahme entscheidend. Virale Erreger sind im Liquor oft nur für kurze Zeit oder gar nicht nachweisbar^{15,275–277}. Daher ist es wünschenswert, mehr als einen Probentyp für die Diagnostik zu erhalten²⁷⁸. Wenn keine viralen Nukleinsäuren nachgewiesen werden, kann eine virale Infektion jedoch nicht per se ausgeschlossen werden. Die Anzahl viraler pro Million generierter Sequenzen kann für ein Virus und den gleichen Probentyp stark variieren (Abbildung 8, Kapitel 4.1.4). Jedoch kann anhand der generierten Daten eine grobe Richtlinie (Mindestanzahl generierter Sequenzen) festgelegt werden, um einen Nachweis sicherzustellen. Diese variiert für verschiedene Pathogene. Für die initiale Diagnosestellung reichen jedoch schon wenige detektierte virale Sequenzen aus. Die Bestätigung viraler Nukleinsäure kann daraufhin durch eine spezifische PCR erfolgen. Jedoch bedeutet der Nachweis viraler Nukleinsäure nicht zwangsläufig eine Kausalität der Symptome. Insbesondere bei neuen oder neuartigen Erregern muss diese bewiesen werden.

Gezielte Anreicherung viraler Sequenzen

Die Detektion viraler Nukleinsäure in Patientenmaterial ist entscheidend für die Diagnosestellung, anschließende Untersuchungen und Therapieentscheidungen. Insbesondere für klinisches Material kann die Erstellung von Vollgenomsequenzen herausfordernd sein. Jedoch ermöglicht die Vollgenomsequenzierung:

- I. eine zuverlässigere Genotypisierung als PCR-basierte Methoden²⁵⁴,
- II. die Erkennung von Virusvarianten und dadurch ggf. Aussagen über die Pathogenität^{117,279,280},
- III. die Detektion von Resistenzmutationen, die zum Versagen einer antiviralen Therapie führen könnten^{123,124},
- IV. die Untersuchung der Virusdiversität in einem Wirt und Analyse von Kompartimentalisierung²⁵⁴, insbesondere im Hinblick auf die Unterscheidung unabhängiger Replikation, da der Nachweis von Replikations-Intermediaten, zum Beispiel aufgrund von Blutbeimengungen, nicht ausreichend ist,
- V. eine Unterscheidung autochthoner und importierter Infektionen und damit einhergehende Surveillance und Risikobewertung²⁸¹,
- VI. die Erkennung von Deletionen, Insertionen, Rekombinationen, die einen Fitnessvorteil oder eine erhöhte Transmission verursachen könnten²⁸²,
- VII. eine Erkennung von Transmissions-Ketten und Clustern²⁸³.

Capturing

In dieser Arbeit wurden *Capture*-basierte Ansätze für die Vollgenomsequenzierung von u. a. HPgV-1 und ausgewählten Arboviren (WNV, TOSV) etabliert und für verschiedene Fragestellungen eingesetzt. Der Einsatz von *Capture*-Systemen erhöhte die Genomabdeckung sowie -tiefe und ermöglichte so phylogenetische Studien. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur viralen Diversität durchgeführt, die mit nativer Sequenzierung allein nicht möglich gewesen wären.

In dieser Dissertation wurde eine HEV-Vollgenomsequenz aus einem Kamelserum aus dem Jahr der Erstbeschreibung (1983²⁸⁴) erstellt. Trotz der geringen Viruslast wurden die viralen Sequenzen erfolgreich angereichert. Dies war auch bei einer Blutspende erfolgreich, bei der eine Genotypisierung zuvor nicht möglich war²⁵². Beide Sequenzen waren nur zu ~80% nt-identisch zur nächsten bekannten Referenzsequenz. Auch ein TOSV mit ähnlicher Distanz zu bekannten Referenzen wurde erfolgreich angereichert. Dies zeigt die Flexibilität der Methode in Bezug auf neue/verwandte Krankheitserreger. Darüber hinaus können weitere Basenunterschiede durch Anpassung der Temperatur während der Hybridisierung und der anschließenden Waschschriffe ermöglicht werden.

Eine Einschränkung dieser Methode bleibt bestehen: die Viruslast. Es müssen Nukleinsäuremoleküle in der Sequenzier-Bibliothek vorhanden sein, die das gesamte Genom abdecken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode speziell für die Vollgenomsequenzierung von bekannten Virusinfektionen eingesetzt. In Zukunft kann diese Methode jedoch auch zur Erregerdetektion verwendet werden. Syndrom-/Symptom-spezifische *Capture*-Kits können konstruiert werden, um geringste Mengen viraler Nukleinsäuren anzureichern und zu sequenzieren. Es gab bereits Versuche die gesamte oder eine sehr breite Virusdiversität innerhalb eines Designs abzubilden, jedoch mit mäßigem Erfolg bei der Generierung von Vollgenomsequenzen^{202,210}.

Amplikon-Sequenzierung

Während das Design von *Capture*-Systemen in wenigen Tagen abgeschlossen ist, erfordert die Synthese von *Capture-Baits* mehrere Monate. Dahingegen kann der Amplikon-basierte Ansatz innerhalb weniger Tage etabliert werden. So benötigt das Design der Primer wenige Stunden und die Synthese bzw. Lieferzeit wenige Tage. Der Amplikon-basierte Ansatz ermöglicht es Laboren ohne Zugang zu HTS, die resultierenden Produkte mittels Sanger-Sequenzierung zu sequenzieren. Nach Auftreten der ersten deutschen WNV-Fälle wurden *hemi-nested* Vollgenom-Primer entwickelt. Die anschließende Amplikon-basierte Sequenzierung ermöglichte die Generierung von Vollgenomsequenzen innerhalb eines Tages mittels Oxford Nanopore Sequenzierung und somit die schnelle Aussage über mögliche autochthone WNV-Infektionen. Die Amplifizierung aus schwierigem Probenmaterial (Mücke) sowie Proben mit geringer Viruslast gelang zuverlässig. Der Amplikon-Ansatz ermöglichte die Sequenzierung für Proben, bei denen sowohl die native Sequenzierung als auch *Capture*-basierte Anreicherung keine Vollgenomsequenz erzielten.

Die Amplikon-basierte Sequenzierung ist insbesondere durch eine zweite Amplifizierung sehr sensitiv. Dieser Ansatz ist schneller und günstiger als die *Capture*-basierte Sequenzierung. Jedoch ist dieser Ansatz, im Gegensatz zur *Capture*-basierten Sequenzierung, nur für Viren mit geringer Virusdiversität möglich. So wäre eine PCR-basierte Vollgenomsequenzierung für HPgV oder Enteroviren nahezu undenkbar.

5.2. Detektion und Kausalität von Pathogen

Toskana Virus

Das TOSV ist die häufigste Ursache einer viralen Enzephalitis in den Sommermonaten in Italien²⁸⁵. Es gehört zu den häufigsten Erregern, nach Entero- und Herpesviren, in weiteren Ländern des Mittelmeerraumes²⁸⁶. Laut SurvStat wurden von 2017-2022 sieben TOSV-Infektionen in Deutschland gemeldet (<https://survstat.rki.de>, Abfrage 24.11.2023). Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei TOSV-Infektionen untersucht. Je eine Infektion wurde über die retrospektive Testung oder gezielte Anfrage des behandelnden Arztes nachgewiesen. Für eine Probe wurde zunächst eine HTS-basierte Diagnostik zur Erregeridentifizierung angefordert. Während dabei TOSV detektiert wurde, erfolgte parallel die spezifische Anfrage des behandelnden Arztes. Die Virus-Varianten wurden den Genotypen TOSV-A, -B und -C zugeordnet und zeigten die höchste Identität zu Referenzsequenzen aus dem Mittelmeerraum. Darüber hinaus hatten alle Patienten eine Reiseanamnese, sodass es sich sehr wahrscheinlich um importierte Infektionen handelte.

In Deutschland wird seit mehreren Jahren der Hauptvektor *Phlebotomus spp.* beobachtet. Insbesondere in Süddeutschland scheint dieser in den letzten Jahren eine stabile, überwinterte Population aufgebaut zu haben¹⁰². Es ist daher möglich, dass in den kommenden Jahren erste autochthone TOSV-Infektionen identifiziert werden. Retrospektive Untersuchungen von Meningoenzephalitis-Patienten in Süddeutschland identifizierten TOSV-Infektionen, jedoch handelte es sich auch hier bisher ausschließlich um reiseassoziierte Fälle^{103,287}. Es ist empfehlenswert, die Vektoren zu überwachen und in Regionen, in denen diese bereits endemisch sind, Blutspenden zu testen. Bei Enzephalitis-Patienten in den betreffenden Regionen sollte eine TOSV-Testung während der Hauptsaison in Betracht gezogen werden, wenn erste Tests ohne Befund bleiben.

Cosaviren

Nach Einlieferung eines jungen Kindes mit akuter, schlaffer Lähmung erfolgte eine ausgedehnte Diagnostik, die kein potentiell ursächliches Pathogen identifizierte. Erst die Sequenzierung führte zur Detektion eines HCoV-D im Stuhl des Patienten. Dies führte zur Frage, ob das HCoV-D ursächlich für die Erkrankung des Kindes war. Der Nachweis von HCoV erfolgte aus Stuhl, jedoch nicht aus Liquor, sodass kein direkter Zusammenhang mit der ZNS-Symptomatik gezogen werden kann. Die hohe Viruslast zu Beginn der Symptomatik und die darauf folgende, abfallende Viruskinetik sprechen für eine akute, nicht persistierende Infektion. Der Nachweis von viraler RNA nach dem Verzehr von kontaminiertem Schweinefleisch, dem einzigen anderen bekannten Wirt⁸¹, erscheint unwahrscheinlich. Der fehlende Nachweis von HCoV im Liquor, schließt die Kausalität als ursächliches Pathogen nicht aus. Auch für andere Picornaviren, wie Enterovirus 71, ist der Nachweis aus Liquor anspruchsvoll^{276,288}. Zudem waren Liquorproben nur an Tag 5, 9 und 20 nach Symptombeginn verfügbar. Der prolongierte Nachweis im Stuhl ist für zahlreiche Viren beschrieben^{60,289,290}. Mehrere Studien untersuchten das Vorkommen von HCoV in Kohorten von

Patienten mit gastrointestinalen Symptomen sowie in Fällen akuter, schlaffer Lähmung im Zusammenhang zu gesunden Kontrollgruppen und fanden dabei vergleichbare Detektionsraten^{65,68,74,77}. Moghaddam et al. gelang es unlängst, HCoSV zum ersten Mal im Liquor von zwei Kindern mit aseptischer Meningitis und Enzephalitis nachzuweisen⁷⁹. Eine geringe Manifestationsrate wurde bereits für andere Vertreter der Familie *Picornavirales* beobachtet, zum Beispiel Poliovirus oder Enteroviren^{275,276}. Dies spricht also nicht gegen eine Rolle von HCoSV als humanpathogenes Virus. Jedoch ist es zwingend notwendig, weitere Studien durchzuführen, die die Rolle von HCoSV allgemein und einzelner Spezies als Pathogen untersuchen. HCoSV sollten insbesondere in die Routinediagnostik für Fälle mit akuter, schlaffer Lähmung aufgenommen werden.

Dobrava-Belgrad-Virus als neuer Enzephalitis-Erreger

Die etablierte HTS-Diagnostik führte bei einem Herztransplantations-Patienten zum Nachweis einer DOBV-Infektion. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der weltweit erste Nachweis einer DOBV-Infektion des ZNS. Darüber hinaus gelang es, das erste vollständige DOBV Vollgenom aus einer humanen Infektion zu generieren. Der anhaltende Nachweis im Serum (46 Tage) sowie Liquor (36 Tage) des Patienten weist auf eine mögliche chronische Infektion hin. Die Analyse der Konsensussequenzen im Serum und im ZNS wies auf unterschiedliche Viruspopulationen in den Kompartimenten hin. Bereits am Tag der Hospitalisierung wurden in einer Serum- und Liquorprobe Genomunterschiede nachgewiesen. Unterschiede wurden auch in einer Hirnbiopsie im Vergleich zum Serum sowie BAL nachgewiesen. Diese Befunde weisen auf eine unabhängige Replikation des Virus im ZNS hin. Hantaviren gehören zum Genus *Hantavirus* innerhalb der Familie *Bunyaviridae*. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt hauptsächlich durch das Einatmen von Staub, der mit Speichel, Kot oder Urin infizierter Tiere kontaminiert ist²⁹¹. Zu den humanpathogenen Vertretern in Deutschland gehören das Puumala-Virus (PUUV), DOBV, Tula-Virus sowie das Seoul-Virus (SEOV)²⁹²⁻²⁹⁴. Mit bis zu ~3000 gemeldeten Fällen zählen Hantaviren zu den häufigsten Zoonosen in Deutschland. Diese Infektionen werden hauptsächlich durch das PUUV und DOBV (Genotyp Kurkino) verursacht²⁹⁵. Die geografische Verbreitung hängt eng mit dem Gebiet ihres jeweiligen Nagetierwirts, der Wühlmaus (*Myodes glareolus*) und der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) zusammen. Im nordöstlichen Teil Deutschlands werden Hantavirus-Infektionen normalerweise durch das DOBV verursacht, im südwestlichen Teil überwiegend durch das PUUV^{292,296}. Für die ebenfalls in Deutschland vorkommenden Hantaviren PUUV und SEOV sind in seltenen Fällen Infektionen des ZNS beschrieben worden²⁹⁷⁻³⁰⁰. Infektionen durch PUUV werden hauptsächlich im Südwesten Deutschlands in den Monaten April bis Juli gemeldet. Im Gegensatz dazu werden Infektionen durch DOBV vor allem im Nordosten Deutschlands von Oktober bis Dezember gemeldet²⁹². Die Hospitalisierung des Patienten erfolgte im Januar. Es kann vermutet werden, dass sich die Infektion zur DOBV-Hauptsaison ereignete. Aufgrund der retrospektiven Identifizierung der DOBV-Infektion war es nicht möglich, den Patienten zu möglichen Expositionen zu befragen. Die enge Verwandtschaft der viralen Sequenz mit Sequenzen aus Nagetieren aus Brandenburg deutet auf eine lokal erworbene Infektion hin.

Aufgrund der Ergebnisse sollte zukünftig das DOBV in die Differentialdiagnostik von Enzephalitis Patienten ungeklärter Ursache eingeschlossen werden, insbesondere im Zeitraum Oktober - Januar.

5.3. Kompartiment-spezifische Virusdiversität in einer chronischen Hepatitis-E-Virusinfektion

Die Anzahl gemeldeter HEV-Infektionen nimmt in Deutschland konstant zu. In 2023 wurden 4360 Fälle gemeldet (<https://survstat.rki.de>, Abfrage am 05.02.2024). HEV-Infektionen sind häufig asymptomatisch und selbstlimitierend. Sie können jedoch zu chronischen Infektionen führen, insbesondere bei immungeschwächten Patienten. Eine ZNS-Beteiligung während der HEV-Infektion wird zunehmend beschrieben^{301–305}. Die antiviralen Wirkstoffe Ribavirin und pegyliertes Interferon alpha werden verwendet, um das Virus zu eliminieren. In den letzten Jahren wurden vermehrt Mutationen identifiziert, die mit einer Ribavirin-Resistenz in Verbindung gebracht werden und zum Versagen der Behandlung führen können^{123,124}.

In dieser Arbeit wurde eine chronische HEV-Infektion untersucht. Die Patientin entwickelte kurz vor ihrem Tod neurologische Symptome und musste aufgrund einer Enzephalitis ins Krankenhaus eingeliefert werden. Die Patientin wurde zuvor mit Ribavirin behandelt, jedoch konnte die Infektion nicht eliminiert werden. Es stellte sich die Frage, ob eine Resistenz vorlag, die eventuell zum Therapieversagen beigetragen haben könnte. Es wurde eine Autopsie durchgeführt. In allen 24 Gewebeproben, einschließlich mehrerer ZNS-Proben, wurde virale RNA nachgewiesen. Die native Sequenzierung der Gewebeproben ergab zunächst nur für die Medulla oblongata-Probe (ZNS) eine vollständige Genomsequenz mit ausreichender Abdeckung für weitere Analysen. Unter Verwendung eines spezifischen Anreicherungssystems gelang die (fast) vollständige Genomsequenzierung auch für eine Leber- und eine Duodenumprobe. Eine Analyse der Konsensussequenzen zeigte zahlreiche Unterschiede zwischen den Proben, ein Hinweis auf eine unabhängige Replikation in den verschiedenen Kompartimenten. Multiple Mutationen, die mit einer Ribavirin-Resistenz in Verbindung gebracht werden, wurden in der Patientin nachgewiesen. Anzahl und Häufigkeit unterschieden sich zwischen den Proben. Ein weiterer Hinweis auf unabhängige Replikation. Das Vorliegen verschiedener Viruspopulationen innerhalb eines Patienten mit unterschiedlicher Zusammensetzung von Resistenzmutationen erschwert die Behandlungsmöglichkeiten. So ist es möglich, dass die Verabreichung antiviraler Mittel zur Selektion von Populationen mit Resistenzen führt, auch wenn diese zuvor nur in geringen Anteilen vorhanden waren³⁰⁶. Die Kompartimentalisierung von HEV im ZNS kann eine weitere Herausforderung für die erfolgreiche Behandlung darstellen, da antivirale Medikamente wie Ribavirin möglicherweise nicht alle Kompartimente in ausreichender Menge erreichen³⁰⁷. Die Sequenzierung und Analyse der viralen Diversität vor Beginn der Therapie kann das Vorhandensein von Resistenzmutationen untersuchen und Aussagen über einen möglichen Therapieerfolg ermöglichen.

5.4. West-Nil-Virus als neuartiger Erreger in Deutschland

Die Einschleppung oder das Auftreten neuer und neuartiger Viren kann zahlreiche Ursachen haben³⁰⁸. Nach dem Eintrag des WNV in die USA hat sich dieses innerhalb von vier Jahren von der Ost- bis zur Westküste verbreitet und ist dort nun eine der häufigsten Ursachen viraler Enzephalitis³⁰⁹. Seit Mitte der 1990er Jahre wird WNV in Europa, insbesondere im Mittelmeerraum, beobachtet³¹⁰. In 2018 wurden mehr als 2000 autochthone, humane Infektionen im Mittelmeerraum gemeldet¹³³. In Deutschland wurde das Virus erstmals 2018 in Vögeln detektiert³¹¹. Insbesondere in den folgenden Jahren war es wichtig zu verstehen, ob es sich bei den ersten humanen Fällen um autochthone oder importierte Infektionen handelte. Für die Generierung von WNV-Vollgenomsequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit ein Amplikon-basierter und ein Anreicherungs-Sequenzieransatz etabliert. Diese ermöglichten die Sequenzierung auch aus schwierigem Probenmaterial (Mücke) und Patientenmaterial mit geringer Viruslast. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 13 humane WNV-Fälle untersucht, für neun wurde das vollständige Genom sequenziert. Eine anschließende phylogenetische Analyse zeigte, dass es sich bei einem der ersten humanen Fälle im Jahr 2018 noch um eine importierte Infektion aus Italien handelte. Die folgenden Infektionen wurden lokal akquiriert. Wie bereits zuvor für Deutschland beschrieben, handelte es sich auch hier um WNV Linie 2¹³⁸. Des Weiteren zeigten die generierten Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu Sequenzen aus Berliner Mücken und Vögeln der Vorjahre. Eine phylogeographische Analyse zeigte, dass sich eine stabile Berliner WNV-Population entwickelte.

Insgesamt wurden bisher 64 WNV-Infektionen in Deutschland gemeldet, einschließlich importierter Infektionen (<https://survstat.rki.de/>, Abfrage am 10.03.2024). Der überwiegende Anteil (10/13) der untersuchten Fälle in dieser Arbeit waren Patienten mit neurologischen Symptomen. Da WNV nur in etwa 20% der Infektionsfälle milde Symptome auslöst und nur ~1% eine neurologische Beteiligung aufweist³¹², kann von einer hohen Zahl nicht identifizierter Fälle ausgegangen werden. Um die Untererfassung humaner WNV-Infektionen zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit dem LaGeSo Blutproben von Probanden einer Kleingartenkolonie untersucht. Obwohl einige Proben ein IgG-Signal im IFT zeigten (10/105, 9,5%), wurde nur in einer Probe ein erhöhtes Signal in der ELISA-Testung (1/105, 0,95%) festgestellt, sodass es sich hier wahrscheinlich um eine WNV-Infektion handelt. Im Folgenden sollte weiter ausgeschlossen werden, dass es sich um unspezifische Signale handelt³¹³. Es sollte eine Befragung der Teilnehmer erfolgen, um zu klären, ob ein vermeintliches WNV-Signal im IFT durch eine Infektion oder Impfung eines weiteren Flavivirus hervorgerufen wurde (z. B. FSME- oder Gelbfieber-Impfung). Zusätzlich könnte ein Neutralisations-Test Aufschluss geben, ob es sich um WNV-spezifische Antikörper handelt.

Retrospektive Untersuchungen per Serologie, PCR sowie HTS zeigten, dass zwischen 2019-2022 vier WNV-Infektionen mit ZNS Beteiligung nicht diagnostiziert wurden. Größere Seroprävalenz-Studien, zum Beispiel über Blutspendedienste, sind notwendig, um genauer zu erfassen, wie hoch die Zahl nicht detektierter WNV-Fälle in Deutschland ist.

Die Vollgenomsequenzierung ermöglicht die Erkennung von Clustern. So zeigten Ziegler et al., dass es mehrere WNV-Einschleppungen nach Deutschland gab¹³⁸. In den letzten Jahren scheint sich jedoch eine stabile WNV-Population in Berlin aufrechtzuerhalten. Der Sequenzvergleich aus Menschen, Vögeln und Mücken legt eine lokale Transmission nahe. Die endemische Zirkulation der WNV-Linie 2 in Berlin wird höchstwahrscheinlich durch die Überwinterung von infizierten, erwachsenen Stechmücken aufrechterhalten. Dies wird durch den Nachweis eng verwandter WNV-Sequenzen in Mücken gestützt, die in zwei aufeinanderfolgenden Sommersaisons am selben Ort beprobt wurden.

Die Sequenzierung eines WNV-Patienten aus dem Jahr 2023 zeigte eine nähere Verwandtschaft zu WNV-Sequenzen aus Vögeln aus Sachsen und Sachsen-Anhalt. Es ist nicht bekannt, ob sich der Patient zum Infektionszeitpunkt außerhalb Berlins aufgehalten hat. Die Sequenzierung von WNV-positiven Mücken des gleichen Jahres zeigte sowohl eine typische Sequenz der Berliner Population, als auch eine nahe Verwandtschaft zu Sequenzen aus Sachsen/Sachsen-Anhalt. Dies könnte bedeuten, dass es zuletzt neue Eintragungen von WNV-Populationen nach Berlin gab. Wahrscheinlich erfolgt die Eintragung über WNV-positive Vögel³¹⁴.

Die zeitnahe Veröffentlichung der Fälle und Sequenzen über ProMed-Mail (Archiv-Nummer: 20201012.7843802; 20210901.8620709) und <https://civnb.info/charite-wnv/> sollte zum Verständnis beitragen und insbesondere die Wahrnehmung, zum Beispiel behandelnder Ärzte, erhöhen.

5.5. Pegiviren als neuartige Enzephalitis-Erreger

Humane Pegiviren in der retrospektiven Testung

In den letzten Jahren wurden HPgV-1 vermehrt im ZNS nachgewiesen. Diese Funde beruhen überwiegend auf der Verwendung von HTS aus Liquor und Hirngewebe^{166–170,172,315,316}. Tabelle A5 enthält eine Zusammenfassung der bisherigen HPgV-Nachweise im ZNS. Humane Pegiviren waren die am häufigsten nachgewiesenen Viren in der retrospektiven Untersuchung. Das Virus wurde in 11% der mittels HTS untersuchten Pools (23/209) und in 1,2% der mittels HTS und RT-qPCR untersuchten Einzelproben (27/2218) detektiert. Bislang haben zwei Studien das Vorkommen von HPgV bei Enzephalitis-Fällen in größeren Gruppen untersucht. Carmona et al. konnten das Virus bei 4% (20/500) der Patienten mit unbekannter Ursache detektieren, während Hardie et al. das Virus bei 15% (insgesamt 15/100, davon 8/46 ohne bekannte Ursache) der Patienten mit teils bekannter Ursache nachwiesen^{169,317}. Daraufhin erfolgten in beiden Studien keine weiteren Untersuchungen im Hinblick auf z. B. Blutkontamination. Die Mehrzahl der HPgV-1 positiven Liquorproben in der retrospektiven Studie wies makroskopisch sichtbare Einblutungen auf. Für die meisten Patienten fehlten bildgebende Verfahren. Daher war die Beurteilung dieser Fälle durch Neurologen/Radiologen nicht möglich. Ohne eine vergleichende Analyse einer dazugehörigen Serumprobe und eine anschließende Kompartimentalisierungs-Untersuchung kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei diesen Nachweisen tatsächlich um eine HPgV-1-Enzephalitis handelt. Ursächlich könnte auch der Nachweis der im

Blut zirkulierenden Population, z. B. aufgrund einer Störung der Blut-Hirn-Schranke oder einer Kontamination bei der Lumbalpunktion sein²⁴³. Perspektivisch sollten daher Serumproben der Patienten in die Untersuchung einbezogen werden.

Die generierten HPgV-1-Sequenzen wurden überwiegend dem Genotyp 2 zugeordnet. Dies ist der in Europa und Deutschland dominierende Genotyp³¹⁸. Nur eine Sequenz zeigte eine enge Verwandtschaft mit dem Genotyp 1, der hauptsächlich in Afrika, aber auch in Deutschland vorkommt^{318,319}. Für vier Pools konnte keine Einzelprobe festgestellt werden, obwohl hier bis zu 40% des Genoms abgedeckt wurden. Dies ist vermutlich auf Primer-Fehlpaarungen in der 5'UTR PCR zurückzuführen. Unter Verwendung des etablierten *Capture*-Kits sollte eine Vollgenomsequenz für diese Proben generiert werden, um die PCR-basierte Methode gegebenenfalls zu optimieren. Allerdings werden sowohl bei der retrospektiven Untersuchung als auch bei der Diagnostik akuter Fälle zwei Strategien zum Nachweis von HPgV-1-Infektionen eingesetzt: zielgerichtete RT-qPCR und nicht zielgerichtete HTS. Daher sollten Infektionen in mindestens einem Ansatz nachgewiesen werden.

Humane Pegiviren in akuten Enzephalitis-Fällen

Um akute HPgV-1-Infektionen zu identifizieren, wurden zwei Strategien implementiert. Zum einen können Ärzte bei ungeklärten Enzephalitis-Fällen eine HTS-Untersuchung anfordern und zum anderen werden seit Anfang 2023 alle eingesandten Liquor- und Serumproben mittels RT-qPCR auf das Vorhandensein von HPgV-1-RNA untersucht. Dadurch konnten insgesamt 13 akute HPgV-1-Infektionen ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Patienten im Detail betrachtet. Drei Patienten wurden über die nicht zielgerichtete HTS-Diagnostik identifiziert. Der vierte Fall wurde anhand der beschriebenen HPgV-1 Enzephalitis-Merkmale identifiziert und durch die Anforderung einer gezielten RT-qPCR bestätigt. Virale RNA war in drei der vier Patienten über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Dabei war die Viruslast konstant und im Serum höher als im Liquor. Für die vorgestellten Patienten standen nur wenige Proben zur Verfügung. Daher kann kein Infektionszeitraum bestimmt werden, wobei es für Patient #2 eine erste Liquorprobe ohne detektierbare Viruslast gab. Eine Viruseleminierung konnte nur in einem Fall gezeigt werden. In zwei Serumproben, die im Abstand von 25 Tagen genommen wurden, konnte wiederholt keine virale RNA detektiert werden. Interessanterweise war dies im Liquor weiterhin möglich. Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass zwischen den Probenahmen ein längerer Zeitraum liegt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es einen Zeitraum ohne virale Replikation gab. Der kontinuierliche Nachweis bei allen vier Patienten deutet jedoch auf eine echte virale Replikation im Liquor hin und macht einen Nachweis aufgrund einer Blutkontamination unwahrscheinlich. Wie bei der retrospektiven Studie, war auch hier die Mehrheit (3/4, 75%) der Patienten mit dem Genotyp 2 infiziert.

Die Analyse der Virusdiversität bei drei Patienten zeigte, dass sich die Viruspopulation im Serum deutlich von der Population im Liquor/ZNS unterscheidet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es eine unabhängige und eigenständige Replikation des Virus im ZNS gibt. Der Vergleich von Viruspopulationen aus verschiedenen Hirnregionen zeigte für Patient #3, dass sich

Populationen auch innerhalb des Hirngewebes abgrenzen lassen. Dies deutet auf separate, sich unabhängig replizierende Infektionsherde innerhalb des ZNS hin. Die Populationen scheinen trotz ihrer Nähe zueinander (z. B. Medulla oblongata - Pons - Mesencephalon) nicht in direktem Austausch zu stehen. Ungeklärt bleibt, ob Ähnliches auch in peripheren Organen (zum Beispiel Leber, Lunge, Milz, Niere) beobachtet werden kann. Trotz gezielter Anreicherung viraler Sequenzen, konnte aus diesen Organen nicht genug Genominformation generiert werden, um weitere Virusdiversitäts-Analysen zu ermöglichen.

Die überraschend hohe Virusdiversität insbesondere in sehr nahe gelegenen ZNS-Regionen, könnte durch einen technischen Bias hervorgerufen worden sein. Um dies auszuschließen, wurden verschiedene Assays zur Bestätigung durchgeführt (native Sequenzierung, Anreicherung viraler Sequenzen, spezifische RT-PCR, Sanger- und Oxford Nanopore Sequenzierung). Mutationen sowie Deletionen wurden dabei zum größten Teil bestätigt. Zukünftig sollte Probenmaterial dennoch im Doppel- oder Dreifachansatz prozessiert werden, um einen technischen Bias weiter auszuschließen. Auffällig waren Deletionen, insbesondere im NS5A-Genombereich, die für drei der vier untersuchten Patienten beobachtet wurden. Appel et al., zeigten für HCV, dass dieser Genombereich, insbesondere die C-terminale Domäne III, für die Assemblierung infektiöser Viruspartikel entscheidend ist³²⁰. Unklar ist, ob diese Deletionen einen Einfluss auf den Tropismus oder die Fitness des Virus haben. Möglicherweise helfen die Deletionen dem Immunsystem zu entgehen, etwa indem sie defekte, interferierende Viruspartikel erzeugen³²¹. Ähnlich wie bei vielen anderen viralen Enzephalitiden sind die genauen Mechanismen, die der Neuroinvasivität und Neurovirulenz der HPgV-1-Enzephalitis zugrunde liegen, derzeit unbekannt. Es ist jedoch bekannt, dass bestimmte, normalerweise nicht pathogene Viren mit hoher Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung, z. B. das JC-Polyomavirus, bei chronisch immunsupprimierten Patienten, neuroinvasiv und neurovirulent werden können³²². Weiterhin sind die Zielzellen des HPgV-1 innerhalb des ZNS bisher unklar. Dabei könnte es sich sowohl um neuronale Zellen als auch um (ZNS-spezifische) Immunzellen handeln. Doan et al., konnte zeigen, dass Astrozyten und Mikroglia experimentell infizierbar sind³²³.

Der (langanhaltende) Nachweis unterschiedlicher Viruspopulationen in den Kompartimenten ist ein starker Hinweis auf einen spezifischen ZNS-Tropismus. Darüber hinaus ist das Auftreten, sich stark voneinander abgrenzender, Viruspopulationen in relativ kurzer Zeit bemerkenswert und könnte das Ergebnis einer spezifischen Anpassung von HPgV-1 an das ZNS oder das Ergebnis eines unterschiedlichen Immundrucks in den Kompartimenten sein. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Patienten reichen jedoch nicht aus, um eine detaillierte Schlussfolgerung zu ziehen. Unabhängig davon kann der Nachweis unterschiedlicher Populationen zukünftig klinisch relevant sein. Die Unterscheidung von Blutkontaminationen des Liquors und ZNS-Infektionen kann im Hinblick geeigneter antiviraler oder immunmodulatorischer Therapien (die das ZNS erreichen) von Bedeutung sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise darauf, dass eine HPgV-1-Infektion des ZNS bei chronisch immunsupprimierten Patienten mit einer ausgeprägten und schweren Form der Enzephalomyelitis einhergehen kann. Hauptmerkmal ist die Beteiligung der zentralen visuellen

und sensomotorischen Bahnen mit charakteristischen Mustern im MRT und einer ZNS-spezifischen Viruspopulation. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit kürzlich publizierten Fallserien, in denen über eine mögliche kausale Rolle von HPgV-1 bei zwei Fällen von Leukoenzephalitis und vier Fällen von Sehnervenentzündung und Myelitis berichtet wurde. Alle diese Patienten waren chronisch immungeschwächt, entweder aufgrund einer Organtransplantation, Tumor- oder Autoimmunerkrankung^{166,316}. Diese Fallserie bekräftigt die Merkmale einer HPgV-1-Enzephalitis. Jedoch sind weitere Studien erforderlich, um das gesamte klinische Spektrum der HPgV-1-Enzephalitis besser definieren zu können. Bis dahin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier beschriebenen Fälle das Endstadium der Erkrankung in der besonders gefährdeten Kohorte der immungeschwächten Patienten darstellen. Denkbar ist, dass es weniger schwere Krankheitsverläufe bei immunkompetenten Patienten gibt und diese mit mildereren Symptomen und einer besseren Prognose einhergehen.

6. Ausblick

HTS ist eine sensitive und nicht zielgerichtete Methode für die Diagnostik von Patienten mit viraler Enzephalitis. Aufgrund sinkender Sequenzierkosten bei zunehmender Sequenziertiefe sollte die HTS-basierte Diagnostik in den nächsten Jahren in die Routinediagnostik aufgenommen werden. Spätestens wenn erste PCR-Testungen ohne Erregernachweis bleiben, sollte diese Methode als unterstützende Maßnahme eingesetzt werden.

Anreicherung viraler Nukleinsäure

Die *Capture*-basierte Anreicherung viraler Nukleinsäure soll auch für weitere Pathogene etabliert werden. Es ist geplant, Symptom- bzw. Syndrom-spezifische *Bait*-Sets zu etablieren. Ein Enzephalitis-Panel könnte dabei aus den in Tabelle A1 aufgeführten Erregern bestehen. Des Weiteren ist die Anreicherung viraler RNA aus dem RNA-Eluat, exemplarisch für HEV, vorgesehen. Dies soll die Sensitivität erhöhen und die bekannten Limitationen des bisherigen Ansatzes umgehen.

Retrospektive Liquor Studie

Die Studie wird weitergeführt. Zukünftig werden alle positiven und negativen ME/E-Panels in die Studie aufgenommen, um das Vorhandensein weiterer Viren, z. B. im Liquor mit HSV-Nachweis, zu untersuchen. Dies dient auch der weiteren Etablierung von HTS als Routinediagnostik und der Qualitätssicherung der etablierten Diagnostik. Perspektivisch sollen auch Serumproben in die Studie einbezogen werden, um Virusdiversitäts-Analysen zu ermöglichen.

West-Nil-Virus

Auch in den folgenden Jahren sollen WNV-positive Blutspenden, Mücken sowie neurologische Fälle untersucht werden, um ein Verständnis über zirkulierende Virusstämme zu erlangen und die Eintragung neuer Varianten zu verfolgen.

Eine Folgeuntersuchung in der Kleingartenkolonie sowie die gezielte WNV-Testung bei "Kopfschmerz-Patienten" (Neuroambulanzen) können dazu beitragen die Untererfassung unerkannter und milder WNV-Infektionen besser zu verstehen.

Humanes Pegivirus-1

Um das HPgV-1 als Enzephalitis-Erreger weiter zu charakterisieren, werden im Anschluss an diese Arbeit weitere Liquores sowie Hirngewebe untersucht. Dazu liegt Hirngewebe aus verschiedenen Regionen vor^{324,325}. Um die Detektionsrate von HPgV-1 im Liquor weiter zu untersuchen, werden Liquores von Enzephalitis-Patienten bekannter Ursache getestet. Dafür stehen Liquores zur Verfügung, die in der ME/E-Paneltestung einen Erregernachweis erbracht haben.

Zusätzlich wurde damit begonnen, Liquor- und Serum-Einsendung von Patienten mit

neurologischen Symptomen routinemäßig auf HPgV-1 zu testen. Dies soll helfen, offene Fragen zur HPgV-Enzephalitis zu beantworten, inklusive:

- I. Wie oft ist HPgV-1 im Serum +/- Liquor bei Patienten mit neurologischen Symptomen detektierbar?
- II. Ist der Nachweis von HPgV-1 im ZNS, aber nicht im Serum, möglich/häufig?
- III. Wie oft können wir distinkte virale Populationen im ZNS nachweisen?
- IV. Ist der Nachweis von HPgV-1 höher bei Patienten mit Transplantat-Anamnese bzw. (chronischer) Immunsuppression?

Es wäre wünschenswert, eine HPgV-1-Zellkultur zu etablieren, um unter anderem die folgenden Fragen zu untersuchen:

- I. Sind Zellen des ZNS empfänglich(er) für die HPgV-1-Infektion?
- II. Sind Virusvarianten, die in dieser Arbeit sequenziert wurden, (neuro)virulenter als andere?
- III. Sind Mutationen in der NS5A-Region daran beteiligt, dass das Virus die BHS überwindet?
- IV. Können Mutationen und Deletionen im NS5A beobachtet werden, wenn eine Serum-Variante in einer ZNS-Zellkultur passagiert wird?
- V. Ist Genotyp 2 neuroinvasiver/-virulenter als andere Genotypen oder liegt ein Bias vor, da dies der häufigste Genotyp in Europa ist?

Es sind Experimente zur Infektion von Organoiden geplant, die zum Verständnis beitragen können, wie sich das Virus im ZNS ausbreitet und welche Zellen hauptsächlich infiziert werden.

7. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Erstautorenschaften (* gleichberechtigte Erstautoren):

Melchert, J., Radbruch, H., Hanitsch, L. G., Baylis, S. A., Beheim-Schwarzbach, J., Bleicker, T., Hofmann, J., Jones, T. C., Drosten, C. & Corman, V. M. Whole genome sequencing reveals insights into hepatitis E virus genome diversity, and virus compartmentalization in chronic hepatitis E. **J. Clin. Virol.** 168, 105583 (2023).

Ruscher, C.*, Patzina-Mehling, C.*, **Melchert, J.***, Graff, S. L., McFarland, S. E., Hieke, C., Kopp, A., Prasser, A., Tonn, T., Schmidt, M., Isner, C., Drosten, C., Werber, D., Corman, V. M. & Junglen, S. Ecological and clinical evidence of the establishment of West Nile virus in a large urban area in Europe, Berlin, Germany, 2021 to 2022. **Eurosurveillance** 28, 2300258 (2023).

Schneider, J.*, Bachmann, F.*, Choi, M., Kurvits, L., Schmidt, M. L., Bergfeld, L., Meier, I., Zuchowski, M., Werber, D., Hofmann, J., Ruprecht, K., Eckardt, K., Jones, T. C., Drosten, C. & Corman, V. M. Autochthonous West Nile virus infection in Germany: Increasing numbers and a rare encephalitis case in a kidney transplant recipient. **Transbound Emerg Dis** 69, 221–226 (2022).

Schneider, J., Engler, M., Hofmann, J., Selinka, H. C., Jones, T. C., Drosten, C., Diedrich, S., Corman, V. M. & Böttcher, S. Molecular detection of cosaviruses in a patient with acute flaccid paralysis and in sewage samples in Germany. **Virus Res** 297, 198285 (2021).

Publikationen mit Bezug zu HTS, Virus-Entdeckung/-Charakterisierung sowie Diagnostik:

Radke, J., Meinhardt, J., Aschman, T., Chua, R. L., Farztdinov, V., Lukassen, S., Ten, F. W., Friebel, E., Ishaque, N., Franz, J., Huhle, V. H., Mothes, R., Peters, K., Thomas, C., Schneeberger, S., Schumann, E., Kawelke, L., Jünger, J., Horst, V., Streit, S., Manitus, R. von, Körtvélyessy, P., Vielhaber, S., Reinhold, D., Hauser, A. E., Osterloh, A., Enghard, P., Ihlow, J., Elezkurtaj, S., Horst, D., Kurth, F., Müller, M. A., Gassen, N. C., **Melchert, J.**, Jechow, K., Timmermann, B., Fernandez-Zapata, C., Böttcher, C., Stenzel, W., Krüger, E., Landthaler, M., Wyler, E., Corman, V., Stadelmann, C., Ralsler, M., Eils, R., Heppner, F. L., Müllender, M., Conrad, C. & Radbruch, H. Proteomic and transcriptomic profiling of brainstem, cerebellum and olfactory tissues in early- and late-phase COVID-19. **Nat. Neurosci.** 1–12 (2024).

Corman, V. M., Preusse, C., **Melchert, J.**, Benveniste, O., Koll, R., Goebel, H.-H., Jones, T. C., Drosten, C., Schara-Schmidt, U., Leonard-Louis, S., Stenzel, W. & Radke, J. Deep RNA sequencing of muscle tissue reveals absence of viral signatures in dermatomyositis. **Free Neuropathol.** 5, (2023).

Aschman, T., Wyler, E., Baum, O., Hentschel, A., Rust, R., Legler, F., Preusse, C., Meyer-Arndt, L., Büttnerova, I., Förster, A., Cengiz, D., Alves, L. G. T., **Schneider, J.**, Kedor, C., Bellmann-Strobl, J., Sanchin, A., Goebel, H.-H., Landthaler, M., Corman, V., Roos, A., Heppner, F. L., Radbruch, H., Paul, F., Scheibenbogen, C., Dengler, N. F. & Stenzel, W. Post-COVID exercise intolerance is associated with capillary alterations and immune dysregulations in skeletal muscles. **Acta Neuropathol. Commun.** 11, 193 (2023).

Veith, T., Bleicker, T., Eschbach-Bludau, M., Brünink, S., Mühlemann, B., **Schneider, J.**, Beheim-Schwarzbach, J., Rakotondranary, S. J., Ratovonamana, Y. R., Tsagnangara, C., Ernest, R., Randriantafika, F., Sommer, S., Stetter, N., Jones, T. C., Drosten, C., Ganzhorn, J. U. & Corman, V. M. Non-structural genes of novel lemur adenoviruses reveal codivergence of virus and host. **Virus Evol.** (2023).

Bojkova, D., Zöller, N., Tietgen, M., Steinhorst, K., Bechtel, M., Rothenburger, T., Kandler, J. D., **Schneider, J.**, Corman, V. M., Ciesek, S., Rabenau, H. F., Wass, M. N., Kippenberger, S., Göttig, S., Michaelis, M. & Cinatl, J. Repurposing of the antibiotic nitroxoline for the treatment of mpox. **J. Med. Virol.** 95, (2023).

Mothes, R., Pascual-Reguant, A., Koehler, R., Liebeskind, J., Liebheit, A., Bauherr, S., Philipsen, L., Dittmayer, C., Laue, M., Manitus, R. von, Elezkurtaj, S., Durek, P., Heinrich, F., Heinz, G. A., Guerra, G. M., Obermayer, B., Meinhardt, J., Ihlow, J., Radke, J., Heppner, F. L., Enghard, P., Stockmann, H., Aschman, T., **Schneider, J.**, Corman, V. M., Sander, L. E., Mashreghi, M.-F., Conrad, T., Hocke, A. C., Niesner, R. A., Radbruch, H. & Hauser, A. E. Distinct tissue niches direct lung immunopathology via CCL18 and CCL21 in severe COVID-19. **Nat Commun** 14, 791 (2023).

7. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Bojkova, D., Bechtel, M., Rothenburger, T., Steinhorst, K., Zöller, N., Kippenberger, S., **Schneider, J.**, Corman, V. M., Uri, H., Wass, M. N., Knecht, G., Khaykin, P., Wolf, T., Ciesek, S., Rabenau, H. F., Michaelis, M. & Jr., J. C. Drug Sensitivity of Currently Circulating Mpox Viruses. **New Engl J Med** (2022).

El-Duah, P., Sylverken, A. A., Owusu, M., Amoako, Y. A., Yeboah, R., Gorman, R., Nyarko-Afriyie, E., **Schneider, J.**, Jones, T. C., Bonney, J., Adade, T., Yeboah, E. S., Binger, T., Corman, V. M., Drosten, C. & Phillips, R. O. Genetic characterization of varicella-zoster and HIV-1 viruses from the cerebrospinal fluid of a co-infected encephalitic patient, Ghana. **Viol J** 19, 122 (2022).

Tasiame, W., El-Duah, P., Johnson, S. A. M., Owiredu, E., Bleicker, T., Veith, T., **Schneider, J.**, Emikpe, B., Foltise, R. D., Burimuah, V., Akyereko, E., Drosten, C. & Corman, V. M. Rabies virus in slaughtered dogs for meat consumption in Ghana: A potential risk for rabies transmission. **Transbound Emerg Dis** 69, e71–e81 (2022).

Schilling-Loeffler, K., Viera-Segura, O., Corman, V. M., **Schneider, J.**, Gadicherla, A. K., Schotte, U. & Johne, R. Cell Culture Isolation and Whole Genome Characterization of Hepatitis E Virus Strains from Wild Boars in Germany. **Microorg** 9, 2302 (2021).

Aschman, T., **Schneider, J.**, Greuel, S., Meinhardt, J., Streit, S., Goebel, H.-H., Büttnerova, I., Elezkurtaj, S., Scheibe, F., Radke, J., Meisel, C., Drosten, C., Radbruch, H., Heppner, F. L., Corman, V. M. & Stenzel, W. Association Between SARS-CoV-2 Infection and Immune-Mediated Myopathy in Patients Who Have Died. **Jama Neurol** 78, 948–960 (2021).

Greuel, S., Ihlow, J., Dragomir, M.-P., Streit, S., Corman, V. M., Haberbosch, L., Winkler, D., Meinhardt, J., Aschman, T., **Schneider, J.**, Trotsyuk, I., Kunze, C. A., Maurer, L., Radbruch, H., Heppner, F. L., Horst, D. & Elezkurtaj, S. COVID-19: Autopsy findings in six patients between 26 and 46 years of age. **Int J Infect Dis** 108, 274–281 (2021).

Jones, T. C., Biele, G., Mühlemann, B., Veith, T., **Schneider, J.**, Beheim-Schwarzbach, J., Bleicker, T., Tesch, J., Schmidt, M. L., Sander, L. E., Kurth, F., Menzel, P., Schwarzer, R., Zuchowski, M., Hofmann, J., Krumbholz, A., Stein, A., Edelmann, A., Corman, V. M. & Drosten, C. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. **Science** New York N Y 373, eabi5273 (2021).

Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C., Franz, J., Thomas, C., Mothes, R., Laue, M., **Schneider, J.**, Brünink, S., Greuel, S., Lehmann, M., Hassan, O., Aschman, T., Schumann, E., Chua, R. L., Conrad, C., Eils, R., Stenzel, W., Windgassen, M., Rößler, L., Goebel, H.-H., Gelderblom, H. R., Martin, H., Nitsche, A., Schulz-Schaeffer, W. J., Hakrrouch, S., Winkler, M. S., Tampe, B., Scheibe, F., Körtvélyessy, P., Reinhold, D., Siegmund, B., Kühl, A. A., Elezkurtaj, S., Horst, D., Oesterhelweg, L., Tsokos, M., Ingold-Heppner, B., Stadelmann, C., Drosten, C., Corman, V. M., Radbruch, H. & Heppner, F. L. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. **Nat Neurosci** 24, 168–175 (2021).

Widera, M., Mühlemann, B., Corman, V. M., Toptan, T., Beheim-Schwarzbach, J., Kohmer, N., **Schneider, J.**, Berger, A., Veith, T., Pallas, C., Bleicker, T., Goetsch, U., Tesch, J., Gottschalk, R., Jones, T. C., Ciesek, S. & Drosten, C. Surveillance of SARS-CoV-2 in Frankfurt am Main from October to December 2020 Reveals High Viral Diversity Including Spike Mutation N501Y in B.1.1.70 and B.1.1.7. **Microorg** 9, 748 (2021).

Sylverken, A. A., El-Duah, P., Owusu, M., **Schneider, J.**, Yeboah, R., Ayisi-Boateng, N. K., Gorman, R., Adu, E., Kwarteng, A., Frimpong, M., Binger, T., Aryeetey, S., Asamoah, J. A., Amoako, Y. A., Amuasi, J. H., Beheim-Schwarzbach, J., Owusu-Dabo, E., Adu-Sarkodie, Y., Obiri-Danso, K., Corman, V. M., Drosten, C. & Phillips, R. Transmission of SARS-CoV-2 in northern Ghana: insights from whole-genome sequencing. **Arch Virol** 166, 1385–1393 (2021).

Muller, N., Kunze, M., Steitz, F., Saad, N. J., Mühlemann, B., Beheim-Schwarzbach, J. I., **Schneider, J.**, Drosten, C., Murajda, L., Kochs, S., Ruscher, C., Walter, J., Zeitlmann, N. & Corman, V. M. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Outbreak Related to a Nightclub, Germany, 2020. **Emerg Infect Dis** 27, 645–648 (2021).

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., **Schneider, J.**, Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., Veer, B. van der, Brink, S. van den, Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. & Drosten, C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance** 25, 2000045 (2020).

Böhmer, M. M., Buchholz, U., Corman, V. M., Hoch, M., Katz, K., Marosevic, D. V., Böhm, S., Woudenberg, T., Ackermann, N., Konrad, R., Eberle, U., Treis, B., Dangel, A., Bengs, K., Fingerle, V., Berger, A., Hörmansdorfer, S., Ippisch, S., Wicklein, B., Grahl, A., Pörtner, K., Müller, N., Zeitlmann, N., Boender, T. S., Cai, W., Reich, A., Heiden, M. an der, Rexroth, U., Hamouda, O., **Schneider, J.**, Veith, T., Mühlemann, B., Wölfel, R., Antwerpen, M., Walter, M., Protzer, U., Liebl, B., Haas, W., Sing, A., Drosten, C. & Zapf, A. Investigation of a COVID-19 outbreak in Germany resulting from a single travel-associated primary case: a case series. **Lancet Infect Dis** 20, 920–928 (2020).

Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., **Schneider, J.**, Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C. & Wendtner, C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature** 581, 465–469 (2020).

Weitere Publikationen:

Schneider, J., Hoffmann, B., Fevola, C., Schmidt, M. L., Imholt, C., Fischer, S., Ecke, F., Hörnfeldt, B., Magnusson, M., Olsson, G. E., Rizzoli, A., Tagliapietra, V., Chiari, M., Reusken, C., Bužan, E., Kazimirova, M., Stanko, M., White, T. A., Reil, D., Obiegala, A., Meredith, A., Drexler, J. F., Essbauer, S., Henttonen, H., Jacob, J., Hauffe, H. C., Beer, M., Heckel, G. & Ulrich, R. G. Geographical Distribution and Genetic Diversity of Bank Vole Hepaciviruses in Europe. **Viruses** 13, 1258 (2021).

Bockmayr, T., Erdmann, G., Treue, D., Jurmeister, P., **Schneider, J.**, Arndt, A., Heim, D., Bockmayr, M., Sachse, C. & Klauschen, F. Multiclass cancer classification in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue by DigiWest multiplex protein analysis. **Laboratory Investigation J Technical Methods Pathology** 100, 1288–1299 (2020).

Inder, S., Bates, M., Labhrai, N. N., McDermott, N., **Schneider, J.**, Erdmann, G., Jamerson, T., Flores, A. N., Prina-Mello, A., Thirion, P., Manecksha, P. R., Cormican, D., Finn, S., Lynch, T. & Marignol, L. Multiplex profiling identifies clinically relevant signalling proteins in an isogenic prostate cancer model of radioresistance. **Sci Rep-uk** 9, 17325 (2019).

Wernike, K., Wylezich, C., Höper, D., **Schneider, J.**, Lurz, P. W. W., Meredith, A., Milne, E., Beer, M. & Ulrich, R. G. Widespread occurrence of squirrel adenovirus 1 in red and grey squirrels in Scotland detected by a novel real-time PCR assay. **Virus Res** 257, 113–118 (2018).

Gedvilaite, A., Tryland, M., Ulrich, R. G., **Schneider, J.**, Kurmauskaitė, V., Moens, U., Preugschas, H., Calvignac-Spencer, S. & Ehlers, B. Novel polyomaviruses in shrews (Soricidae) with close similarity to human polyomavirus 12. **J Gen Virol** 98, 3060–3067 (2017).

Nainys, J., Timinskas, A., **Schneider, J.**, Ulrich, R. G. & Gedvilaite, A. Identification of Two Novel Members of the Tentative Genus Wukipolyomavirus in Wild Rodents. **Plos One** 10, e0140916 (2015)

Drexler, J. F., Corman, V. M., Lukashev, A. N., Brand, J. M. A. van den, Gmyl, A. P., Brünink, S., Rasche, A., Seggewiß, N., Feng, H., Leijten, L. M., Vallo, P., Kuiken, T., Dotzauer, A., Ulrich, R. G., Lemon, S. M., Drosten, C., Akoua-Koffi, C. G., Ameneiros, R. S., Goodman, S. M., Godlevska, E. V., Tungaluna, G.-C. G., Görföl, T., Hassanin, A., Koivogui, L., Krüger, D. H., Lakim, M. B., Lavrenchenko, L., Leroy, E. M., Matthee, S., Meulen, J. ter, Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S., Preiser, W., Pereira, M. J. R., Reusken, C. B. E. M., **Schneider, J.**, Schmidt-Chanasit, J., Fichet-Calvet, E., Seebens-Hoyer, A., Gloza-Rausch, F., Setién, A. A., Tschapka, M., Wells, K., Wegner, T. & Wilkinson, D. A. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 112, 15190–15195 (2015).

8. Beiträge an wissenschaftlichen Konferenzen

Vorträge

2024 Gesellschaft für Virologie

Virological findings in pegivirus encephalomyelitis, a distinct viral CNS infection in chronically immunosuppressed patients

2022 DZIF Diagnostic Symposium

Whole genome sequencing of human Hepatitis E virus using targeted enrichment

2022 International Symposium on Zoonoses Research

Sequencing approaches for Hepatitis E virus to address current challenges and reveal insight into virus evolution and intra-host virus diversity

2021 International Symposium on Zoonoses Research

Autochthonous West Nile virus infections in Berlin, Germany

2019 Gesellschaft für Virologie

Detection of Cosavirus in a patient with acute flaccid paralysis and in sewage samples in Germany

Poster

2023 Gesellschaft für Virologie

Autochthonous and travel-associated West Nile virus and Toscana virus infections in Berlin, Germany, 2018-2022

2021 Junior Scientist Zoonosis Meeting

Role of rare and zoonotic viruses in encephalitis cases of unknown origin in Berlin, Germany, 2019-2020

2019 International Symposium on Zoonoses Research

Genome sequencing of West Nile Virus, Europe (1. Posterpreis)

9. Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht enthalten.

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Virale Enzephalitis - Neue Diagnostik und neuartige Erreger“ selbstständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

.....

Julia Melchert

11. Anhang

Tabelle A1. Bekannte, seltene und potentielle virale Enzephalitis-Erreger.
Potentielle Erreger sind hervorgehoben.

Familie	Genus	ICTV Spezies	Virus	Referenz
(-) ssRNA				
Anelloviridae	Alphatorquevirus	Torque teno virus	Torque-Teno-Virus	326–328
Arenaviridae	Mammarenavirus	Mammarenavirus lassaense	Lassavirus	329
Arenaviridae	Mammarenavirus	Mammarenavirus choriomeningitidis	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus	330
Bornaviridae	Orthobornavirus	Orthobornavirus sciuri	Bunthörnchen-Bornavirus 1	331
Hantaviridae	Orthohantavirus	Orthohantavirus andesense	Andesvirus	332
Hantaviridae	Orthohantavirus	Orthohantavirus dobravaense	Dobrava-Belgrad-Virus	diese Arbeit
Hantaviridae	Orthohantavirus	Orthohantavirus hantanense	Hantaanvirus	333
Hantaviridae	Orthohantavirus	Orthohantavirus puumalaense	Puumalavirus	334
Orthomyxoviridae	Alphainfluenzavirus	Alphainfluenzavirus influenzae	Influenza-A-Virus	335
Orthomyxoviridae	Betainfluenzavirus	Betainfluenzavirus influenzae	Influenza-B-Virus	336
Orthomyxoviridae	Thogotovirus	Thogotovirus dhorienense	Dhori-Virus	337
Paramyxoviridae	Henipavirus	Henipavirus hendraense	Hendra-Virus	338
Paramyxoviridae	Henipavirus	Henipavirus nipahense	Nipah-Virus	339
Paramyxoviridae	Morbillivirus	Morbillivirus hominis	Masernvirus	340
Paramyxoviridae	Orthorubulavirus	Orthorubulavirus laryngotracheitidis	Parainfluenzavirus 2, 3	341,342
Paramyxoviridae	Orthorubulavirus	Orthorubulavirus parotitidis	Mumpsvirus	343
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus encephalitis	California-Encephalitis-Virus	344
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus cacheense	Cache-Valley-Virus	345
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus jamestownense	Inkoo-Virus	346
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus jamestownense	Jamestown-Canyon-Virus	347
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus lacrosseense	La-Crosse-Enzephalitis-Virus	348
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus khatangaense	Snowshoe-hare Virus	349
Peribunyaviridae	Orthobunyavirus	Orthobunyavirus tahynaense	Ťahyňa-Virus	350
Phenuiviridae	Bandavirus	Bandavirus heartlandense	Heartland-Virus	351
Phenuiviridae	Bandavirus	Bandavirus dabiense	Schweres-Fieber-mit-Thrombozytopenie-Syndrom-Virus	352
Phenuiviridae	Phlebovirus	Phlebovirus riftense	Riftalfieber-Virus	353
Phenuiviridae	Phlebovirus	Phlebovirus siciliaense	Sizilianisches Sandmückenfiebertvirus	354
Phenuiviridae	Phlebovirus	Phlebovirus toscanaense	Toskana-Virus	355
Pneumoviridae	Metapneumovirus	Metapneumovirus hominis	human Metapneumovirus	356
Pneumoviridae	Orthopneumovirus	Orthopneumovirus hominis	Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus	357

11. Anhang

Familie	Genus	ICTV Spezies	Virus	Referenz
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Ledantevirus</i>	<i>Ledantevirus ledantec</i>	Le-Dantec-Virus	358
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Lyssavirus australis</i>	Australisches Fledermaus-Lyssavirus	359
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Lyssavirus duvenhage</i>	Duvenhage-Virus	360
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Lyssavirus hamburg</i>	Europäisches Fledermaus-Lyssavirus 1	361
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Lyssavirus helsinki</i>	Europäisches Fledermaus-Lyssavirus 2	362
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Lyssavirus mokola</i>	Mokola-Virus	363
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	<i>Lyssavirus rabies</i>	Rabiesvirus	364
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i>	<i>Vesiculovirus chandipura</i>	Chandipura-Vesiculovirus	365
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i>	<i>Vesiculovirus indiana</i>	Vesicular stomatitis Indiana Virus	366
(+) ssRNA				
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Mamastrovirus</i>	Humanes Astrovirus	367
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	-	Humanes Astrovirus MLB 1/2	368
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	-	Humanes Astrovirus VA/HMO	369
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	<i>Norwalkvirus</i>	Norovirus	370
<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	<i>Betacoronavirus 1</i>	Humanes Coronavirus OC43	371
<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2	372
<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	<i>Hepacivirus hominis</i>	Hepatitis-C-Virus	373
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	-	Alkhumra-Virus	374
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus denguei</i>	Dengue-Virus	375
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus ilheusense</i>	Ilheus-Virus	376
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus japonicum</i>	Japanische-Enzephalitis-Virus	377
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus kyasanurensense</i>	Kyasanur-Forest-Disease-Virus	378
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus nilense</i>	West-Nil-Virus, Kunjin-Virus	281,379
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus loupingi</i>	Louping-ill-Virus	380
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus murrayense</i>	Murray-Valley-Enzephalitis-Virus	381
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus omskense</i>	Omsk-hämorrhagisches-Fieber-Virus	382
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus powassanense</i>	Powassan-Virus	383
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus ilheusense</i>	Rocio-Virus	384
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus louisense</i>	St.-Louis-Enzephalitis-Virus	385
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus encephalitis</i>	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus	386
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus usutuense</i>	Usutu-Virus	387,388
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	<i>Orthoflavivirus zikaense</i>	Zika-Virus	389
Flaviviridae	Pegivirus	Pegivirus hominis	Humanes Pegivirus-1	316, diese Arbeit
<i>Hepeviridae</i>	<i>Paslahepevirus</i>	<i>Paslahepevirus balayani</i>	Hepatitis-E-Virus	254,390

Familie	Genus	ICTV Spezies	Virus	Referenz
<i>Matonaviridae</i>	<i>Rubivirus</i>	<i>Rubivirus rubellae</i>	Rötelnvirus	391
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A</i>	Coxsackievirus A	392
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A</i>	Enterovirus 71	393
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus B</i>	Coxsackievirus B3, B4	394,395
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus C</i>	Poliovirus	396
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus D</i>	Enterovirus D68	397
<i>Picornaviridae</i>	<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus</i>	humane Parechoviren	398
<i>Retroviridae</i>	<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Primate T-lymphotropic virus 1</i>	Humanes T-lymphotropes Virus	399
<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	<i>Human immunodeficiency virus 1/2</i>	Humanes-Immundefizienz-Virus 1/2	400,401
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Chikungunya virus</i>	Chikungunya-Virus	402
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>	Eastern-Equine-Encephalomyelitis-Virus	403
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Everglades virus</i>	Everglades-Virus	404,405
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Semliki Forest virus</i>	Semliki-Forest-Virus	406
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Tonate virus</i>	Tonate-Virus	407
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>	Venezuelan-Equine-Encephalomyelitis-Virus	408
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Western equine encephalitis virus</i>	Western-Equine-Encephalomyelitis-Virus	409
ssDNA, zirkulär				
<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus</i>	-	Humanes Circovirus	410
<i>Circoviridae</i>	<i>Cyclovirus</i>	-	Cyclovirus	411,412
dsDNA				
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Human mastadenovirus B</i>	Adenovirus 2,3, 7, 11, 26	413-416
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Cytomegalovirus humanbeta5</i>	Humanes Cytomegalievirus	417
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Lymphocryptovirus humangamma4</i>	Epstein-Barr-Virus	418
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Rhadinovirus</i>	<i>Rhadinovirus humangamma8</i>	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus	419
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Roselovirus</i>	<i>Roseolovirus humanbeta6a</i>	Humanes Herpesvirus 6A	420
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Roselovirus</i>	<i>Roseolovirus humanbeta6b</i>	Humanes Herpesvirus 6B	420
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Roselovirus</i>	<i>Roseolovirus humanbeta7</i>	Humanes Herpesvirus 7	420
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Simplexvirus</i>	<i>Simplexvirus humanalpha1</i>	Herpes simplex virus 1	421
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Simplexvirus</i>	<i>Simplexvirus humanalpha2</i>	Herpes simplex virus 2	422,423
<i>Orthoherpesviridae</i>	<i>Varicellovirus</i>	<i>Varicellovirus humanalpha3</i>	Varizella-Zoster-Virus	424
<i>Parvoviridae</i>	<i>Bocavirus</i>	<i>Bocaparvovirus primate</i>	Humanes Bocavirus	425
<i>Parvoviridae</i>	<i>Erythroparvovirus</i>	<i>Erythroparvovirus primate1</i>	Parvovirus B19	426
<i>Parvoviridae</i>	<i>Tetraparvovirus</i>	<i>Tetraparvovirus primate1</i>	Humanes Parvovirus 4	261
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Betapolyomavirus</i>	<i>Betapolyomavirus hominis</i>	BK-Polyomavirus	427
<i>Polyomaviridae</i>	<i>Betapolyomavirus</i>	<i>Betapolyomavirus secu hominis</i>	JC-Polyomavirus	428

11. Anhang

Familie	Genus	ICTV Spezies	Virus	Referenz
<u>dsRNA (segmentiert)</u>				
<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	<i>Great Island virus</i>	Kemerovo-Virus	429
<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	430
<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Seadornavirus</i>	<i>Banna virus</i>	Banna-Virus	431,432
<i>Spinareoviridae</i>	<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado tick fever coltivirus</i>	Colorado-Zeckenfieber-Virus	433
<i>Spinareoviridae</i>	<i>Coltivirus</i>	<i>Eyach coltivirus</i>	Eyach-Virus	434

Tabelle A2. Weitere Oligonukleotide für die RT-PCR.

Primer	Sequenz (5'→3')
TOSV, diese Arbeit	
TOSV_L_59_Fw	AACCAGCTCCTGCAAGAGC
TOSV_L_193_Rev	CTCTCAAAGGGTTGTATTGTGGATCC
TOSV_L_239_Fw	GAGTGTTCTGCTCAAAATCTGAC
TOSV_L_253_Fw	CAAAATCTGACCCTCTTCAAGCATG
TOSV_L_1750_Rev	TTGAAGACAGTTGAGTTACTTAGCTC
TOSV_L_1813_Fw	TGGAGACCTCATGGTGACAGACT
TOSV_L_2818_Rev	CGACTGAACTATTCTCTCATCAGC
TOSV_L_2824_Rev	CAATCACCGACTGAACTATTCTCTC
TOSV_L_3212_Fw	GGAAGCTATTCAAAGCATACCATGG
TOSV_L_3232_Fw	GTGAAAGCAGGGAGCCATGGA
TOSV_L_3310_Fw	CTCCATTTACCTCCTCTCTACTAC
TOSV_L_3328_Fnest	TCTACTACATTCTCTGCATCAAGAGT
TOSV_L_3581_Fw	CTCCAATACTGACTTTGTTATGGA
TOSV_L_3613_Rev	TCCACCTAATTGTGGGTCTAACATG
TOSV_L_4463_Fw	CAACCTGGCTGAGTTTGAAGC
TOSV_L_4474_Fnest	GCTGAGTTTGAAGCATTGATTCCA
TOSV_L_4483_Rev	GAATCACATTGAACCTTCCCTTGTC
TOSV_L_5290_Fw	TGCCATCACACCTGACAGCA
TOSV_L_5316_Fnest	GTTACTGTCTCGAATTGCTCAAACC
TOSV_L_5333_Rev	TCACACCAAGCCTTCAGGCT
TOSV_L_5904_Rev	TCCTATCTATCGGCTCTGCTTC
TOSV_L_5905_fw	AGAGAGATTTATTGAAGCAGAGCC
TOSV_L_5927_Fnest	GATATGATGCTTGATGAAGGGATGG
TOSV_L_6324_Rev	ACAGCCTATGATTTTCACTAATTGCC
TOSV_M_105_Fw	ATTCAGCAGTGGGGAACAGCA
TOSV_M_149_Fnest	CAGTTCTCATACCAACCTAGGGGAC
TOSV_M_402_Fw	ACTGCAGCCTTCTTGAGAGGA
TOSV_M_417_Fnest	GAGAGGAAGCCATTCTGGACAG

Primer	Sequenz (5'->3')
TOSV_M_1244_Rev	GCCAAGTTCACATAAAAGAAGGCTGA
TOSV_M_1272_Fw	CTTTTATGTGAACTTGGCAGGCC
TOSV_M_1323_Fnest	CATGTCTTGTCCGAGGACTGTG
TOSV_M_1779_Rev	CCCAGACTCCGTTGACATTAACCTC
TOSV_M_1581_Fw	CCAGGCAAGAGTACAATGAAGATC
TOSV_M_1609_Fnest	TCTTATGCTACAAATCAGAGAGTGG
TOSV_M_1957_Fw	CCATGGTCCTAAAGTGGTCTATGC
TOSV_M_1975_Fnest	GCCACAGCTTGTAGCCATGG
TOSV_M_2038_Rev	ATACATATGTCTACTCAAACCTATCTCGC
TOSV_M_2664_Rev	GATGAATTGTTTCTCACTATCCTTGAG
TOSV_M_2647_Fw	GGTCCTATAGGCTCTGAATCCTG
TOSV_M_2662_Fnest	CTGAATCCTGCTTAATCCTGAAAGG
TOSV_M_2958_Fw	AATGTCAATCCTTCATGCCTCTATG
TOSV_M_2961_Fnest	TCAATCCTTCATGCCTCTATGTCC
TOSV_M_2991_Rev	GCTACACACCTGAAGACCTTAAAACC
TOSV_M_3477_Rev	CCAATGTGAGGCGTATAGAAGC
TOSV_M_3723_Fw	TACTGCACTGTTCTCCACTTCTC
TOSV_M_3755_Rev	TCTTTTGCTAAGCCCGCAGTC
TOSV_S_35_Rev	TCTAGACAGCCATGCAATCCAG
TOSV_S_62_Rnest	AGAGTTGTCATCCTAAAGTCTAGATCTGG
TOSV_S_496_Rev	AACTTCTGGTTAAAGCCTCTGGAC
TOSV_S_629_Rev	GGAGACATCTGTGTGGTTCAAGC
TOSV_S_634_Fw	CTTTAGCAACTGATCTGGTGA CTCT
TOSV_S_673_Rnest	CACCAGATCAGTTGCTAAAGCCT
TOSV_S_934_Fw	AGCAAGGACAGCATGAAACAGG
TOSV_S_1032_Fw	GGTTGGCAAGTGAGCTGCC
TOSV_S_1046_Rev	CCTTGGCAGCTCACTTGCC
TOSV_S_1608_Fw	GTCATAGCCTCTGGCTTGTTCC
TOSV_S_1645_Rev	GATGTGAAAATGATGATTGTGCTGAACC
TOSV_S_1790_Fw	CAAAAGCTATCAACATGTCAGACG

Primer	Sequenz (5'->3')
TOSV_8338M_28_Fw	CACAAAGAAGGTGCTTATGTTTATTGC
TOSV_8338M_294_Rnest	CGTAGTTGTGCATCATAGCTCC
TOSV_8338M_315_Rev	GATCTCAACCCTCTTGTCATCACC
TOSV_8338M_3711_Fw	CGACTACTGCACCGTTCTCC
TOSV_8338M_3723_Fnest	ACCGTTCTCCATTTCTCAAGGC
TOSV_8338M_4118_Rev	GATTCAGACCTGCCTAACGGAG
TOSV_8459L_31_Fw	GAGGCCCAAATATGGAAAGAATCC
TOSV_8459M_378_Rev	CTCAAGAAGGCTGCAGTTCTG
TOSV_8459L_615_Rev	TAGCAATCTTGTTTCTGGCTGC
TOSV_8459S_955_Fw	AGGATATGAAAGCCGTTAAGTGGC
TOSV_8459L_1734_Fw	ATGAAGTTCCTTGCCACTCCTC
TOSV_8459L_1764_Fw	GGCTGCAGATGATTTCTGTCTG
TOSV_8459L_2088_Rev	CAACTGATCAAGGAATCTCCAAGG
TOSV_8459M_3478_Fw	ATTAACACTACAGGAGAGGTGAGAGC
TOSV_8459M_3947_Rev	GCCTAGAGCTAGGAATCCAAG
TOSV_8459M_3'_Rev	GGATATCACACAAAGACCGGTGC
HEV, diese Arbeit	
HEV_4187_546_Fw	ATGTTGCGGAGGCCATGGC
HEV_4187_593_Fw	GATGACACGCTTATATGCTGCAC
HEV_4187_1109_Rev	CGTCCTCCGAAGCATTCCA
HEV_4187_1289_Fw	TTGAGAAGTCTGGCCGTGACT
HEV_4187_1307_Fw	CTACATCCCCGGTCGTCAGC
HEV_4187_1847_Rev	CAGGGGTGAGCTCATAAGTGAG
HEV_4187_2208_Fw	TGCGCCGGCTGATGTTCC
HEV_4187_2741_Rev	AGGCGTCAAAGCTGAGGCT
HEV_4187_2744_Rev	CCCAGGCGTCAAAGCTGAG
HEV_4187_2777_Fw	TGGGAGCGTAACCATCGCC
HEV_4187_2804_Fw	GACGAGCTTTACCTGACTGACC
HEV_4187_3296_Rev	CAACGATGGGTAACATGCCACCA
HEV_4187_3869_Fw	GCTTGAGCAGGGCTTGCTGT

Primer	Sequenz (5'->3')
HEV_4187_3887_Fw	TGTATATGCCGCAAGAGCTCA
HEV_4187_4103_Rev	ACCATGGCCTCAACCAGCTC
HEV_4187_4484_Fw	TAACTTCTCCCTTGGTCTCGAGT
HEV_4187_4715_Rev	GTAGTCGCTGCAGAGAACCAC
HEV_4187_4727_Rev	GGCTCTGACGGTAGTCGCT
HEV_4187_4794_Fw	GGTTGATTACCGCCCTATCGG
HEV_4187_4805_Fw	GCCCTATCGGGTTGTATGCTG
HEV_4187_5362_Rev	GGATTGCGGAACGACATCGG
HEV_4187_5616_Fw	TGTTGCTTCGGGTAATAATCTGG
HEV_4187_5910_Rev	ATAATGGAGGCGCTCACTAGG
HEV_4187_5922_Rev	CAGCCCTGGTTACGATAATGGAG
HEV_4187_6016_Fw	GTTTGGTGATGCTCTGTATCCATGG
HEV_4187_6357_Rev	TCGCCATTGGCTGAAACGAC
HEV_4187_6360_Rev	GGCTCGCCATTGGCTGAAAC
HEV_4187_6648_Fw	CCCGATGTATGTCTCGGATACTG
HEV_4187_7071_Rev	TTCAGCAATAGTAGACTGGAAGGC
HEV_4187_7077_Rev	CTGAAGTTCAGCAATAGTAGACTG

Tabelle A3. Ergebnisse vor und nach der gezielten Anreicherung für verschiedene Probenmaterialien.

Fall	Probentyp	Viruslast (iU/mL)	HEV ct-Wert	Native Sequenzierung				gezielte Anreicherung				Ratio
				Sequenz- länge (bp)	generierte Sequenzen	% Genom- Abdeckung	virale / Million Sequenzen	Sequenz- länge (bp)	generierte Sequenzen	% Genom- bdeckung	virale / Million Sequenzen	
1	Liquor	6,15x10 ³	39,12	2x150	9.575.048	66,5	48,8	2x150	7.733.824	55,5	799.392	16.381
								2x75	44.070.996	66,1	441.568	9.049
2	FFPE Leber	n.d.	35,52	2x75	34.557.074	67,6	5,8	2x75	33.796.976	98,9	7.794	1.344
3	Blutspender Serum	4,18x10 ⁴	35,79	2x75	27.045.670	99,1	129,0	2x75	970.624	92,4	320.421	2.484
4	Kamel Serum	6,96x10 ³	40	2x75	28.635.560	100	104,2	2x75	26.039.638	97,1	309.451	2.970
5a	Serum	2,46x10 ⁶	28,10	2x75	14.056.152	100	392,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5b	Duodenum	1,74x10 ⁶	29,62	2x75	29.731.142	99,9	27,8	2x75	6.244.990	100	240.635	8.656
5c	Leber	1,86x10 ⁶	29,52	2x75	13.832.632	43,0	5,5	2x75	5.558.934	99,0	34.899	6.345
5d	Medulla oblongata	5,62x10 ⁸	27,93	2x75	29.976.926	100	368,0	2x75	3.707.602	100	915.092	2.487

FFPE, Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet; HEV, Hepatitis-E-Virus; n.d., nicht durchgeführt. ²⁵⁴, modifiziert.

Tabelle A4. Oligonukleotide für die WNV-Vollgenomsequenzierung. ²⁸¹, diese Arbeit.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendung
WNV_fw1_76	CAATTAACACAGTGCGAGCTGT	Erste und zweite Runde
WNV_rev1_877	ATCCATCCAATGACCGCTGC	Erste Runde
WNV_rnest1_826	AGTATCCATGATTCTGTCTTCACCAG	Zweite Runde
WNV_fw2_673	GAAGACATTGACTGCTGGTGCA	Erste Runde
WNV_rev2_1240	CCACAACGCCTTGCTTGCA	Erste und zweite Runde
WNV_fnest2_781	ACATGGAGAAAGTACACTGGCCA	Zweite Runde
WNV_fw3_1120	AATGATGAACATGGAAGCAGCCA	Erste Runde
WNV_rev3_1768	GAGAACTCAACAGGAATCGCTCC	Erste und zweite Runde
WNV_fnest3_1165	GTTACCTAGCTTCGGTCAGYG	Zweite Runde
WNV_fw4_1603	TGGTGCGAAGTCCTTCCTGG	Erste Runde
WNV_rev4_2227	AATCCCAAGCAGTGTCTCCAAG	Erste und zweite Runde
WNV_fnest4_1711	GTTTGAAGAACCTCATGCCACCA	Zweite Runde
WNV_fw5_2086	AGCCAACTCGAAGGTCTTGATTG	Erste Runde
WNV_rev5_2668	CTCATCCTTAATGGCTTCCCACAT	Erste und zweite Runde
WNV_fnest5_2121	CCGTTTGGTGACTCTTACATCGTG	Zweite Runde
WNV_fw6_2506	ATTGATATTGGCAGGCAAGAGC	Erste Runde
WNV_rev6_3124	GGCCAGGTGCATGATTTGACTTC	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest6_2575	CTGGATGGATCGTTACAAGTTCTACC	Zweite Runde
WNV_fw7_2971	GGATTGACAAGCACTCGCATGT	Erste Runde
WNV_rev7_3670	CGCAGGACATCAGTGTACGTAAT	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest7_3073	GCATAGTGATCTGTCGTACTIONGGA	Zweite Runde
WNV_fw8_3549	CAACGCCGACATGATTGATCCT	Erste Runde
WNV_rev8_4315	AACATRAGTCCGGCRATGGTCAT	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest8_3608	GAGGTCCTTCGCAAGAGGTG	Zweite Runde
WNV_fw9_4141	GGCTTGCCTCATCTGCCTAG	Erste Runde
WNV_rev9_4885	CGACAATCATTTGGACCTCATCATG	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest9_4183	AGTGTTCAATCCAATGATACTTGACAG	Zweite Runde
WNV_fw10_4738	TGGAGCCGGAGTGATGGTAG	Erste Runde
WNV_rev10_5362	ACGATCTCATTTCCACTGTGCTC	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest10_4810	GAGTGGTGAAGGACGTCTGGATC	Zweite Runde

Oligonukleotid	Sequenz (5'->3')	Verwendung
WNV_fw11_5251	CCAAATCATCAAGGAGGCCATCA	Erste Runde
WNV_rev11_6019	GCCCTCCATARCAATACTCATCACC	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest11_5314	TGCTGCTGAGATGTCTGAGG	Zweite Runde
WNV_fw12_5794	GAACAGAAAGTCCTATGAGACAGAGT	Erste Runde
WNV_rev12_6535	CCACATACATCGTGTCCAACGC	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest12_5887	AGGCAAGCAGAGTGATCGAYA	Zweite Runde
WNV_rnest12_6484	CATTCTCCCGAGCACCTCAAC	Zweite Runde
WNV_fw13_6334	CCTCGAACCAACACGATTCTTG	Erste Runde
WNV_rev13_7139	GAACAAYGCACTGGCTTGGAC	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest13_6412	AGGTGGGCGGATGCYAGAG	Zweite Runde
WNV_fw14_6952	GGCTGGACAARACCAAGAATGACA	Erste Runde
WNV_rev14_7727	CCTTCGTCATGTGGTTGAGTCT	Erste und zweite Runde
WNV_Fnest14_7103	CCTTTGCTGAAACATCTAATCACGT	Zweite Runde
NS5_fw1_7761	GATGGCTCTCGTGTCTMTCCA	Erste und zweite Runde
NS5_rev1_8589	TGCCCGCGTTCCACTTCC	Erste Runde
NS5_Rnest1_8460	CGTGGCTCACCCARTACATCTC	Zweite Runde
NS5_fw2_8280	CGTCAAGTGCCGAGGTWGAAG	Erste und zweite Runde
NS5_rev2_8811	ATCGTGGTCACATTGGTGATRGTGTC	Erste Runde
NS5_Rnest2_8721	TTCATAGCTTCCGTGRTAGTTCCA	Zweite Runde
NS5_fw3_8526	GTGAACATGACAAGCCAGGTGC	Erste Runde
NS5_rev3_9108	GCTCCTCATCCACCATYTCCA	Erste und zweite Runde
NS5_Fnest3_8595	AGGAAGATGTCAACTTGGGAAGTG	Zweite Runde
NS5_fw4_9063	AGGAGCGATGTTTGAAGAACAGA	Erste und zweite Runde
NS5_fw4_9638	TTGGTGAAGGTGTTYAGGGCGTA	Erste Runde
NS5_Rnest4_9524	GACTTTGTGTCGGTAKGTGAGCTC	Zweite Runde
NS5_fw5_9330	GGGTAGGAAGAACTCAGGAGGAG	Erste Runde
NS5_rev5_10103	ATTAAAGCAGCAGCCACATCTG	Erste und zweite Runde
NS5_Fnest5_9438	CAGGCTGGGACACMCGCA	Zweite Runde
NS5_fw6_9866	CTTCGCCACATCACTMCACTTCC	Erste Runde
NS5_Fnest6_9941	GGTGGTATGAYTGGCAGCAGG	Zweite Runde

Tabelle A5. Ergebnisse der Literaturrecherche von HPgV-1 ZNS-Nachweisen.

Referenz	HPgV-1-Nachweis	Detektionsmethode	Immuno-histochemie	Geschlecht, Alter (Jahre)	Viruslast	Immunsuppression	Outcome	Kommentar	Genotyp, Accession Nummer
Kriesel et al. ³¹⁵	1 (Hirn/Liquor)	HTS	monoklonale Antikörper wiesen HPgV-1 in keinem der untersuchten Hirngewebe spezifisch nach	W: >60	1,7-2,4x 10 ⁶ cp/g, 1,1x10 ⁶ cp/mL (Liquor)	MS	post-mortem Analyse	Negativstrang im Hirngewebe nachgewiesen	Genotyp 2, JN127373
Liu et al. ¹⁷¹	1 (Liquor)	RT-(q)PCR	n.d.	M: 32	6,5 log cp/mL (Liquor)	HIV-Infektion mit zerebraler Toxoplasmose und Pilzenzephalitis	n.d.	-	Genotyp 3, KF234774–KF234782
Fridholm et al. ¹⁶⁸	1 (Liquor/Serum)	Lawrence Livermore pan-microbial array, HTS	n.d.	W: 25	Ct 32,1 (Liquor), Ct 23,4 (Serum)	Radiofrequenz-Katheterablation für das Wolf-Parkinson-White-Syndrom, elektive Cholezystektomie wegen früherer Gallensteinanfalle	erholt	-	Genotyp 2, KP259281
Hardie et al. ¹⁶⁹	4 (Liquor/Serum)	RT-PCR, HTS	n.d.	W: 29, 40, 43 M: 43	8,81-10,56 log cp/mL (Serum), 4,68-5,84 log cp/mL (Liquor)	HIV-assoziierte neurokognitive Störung	n.d.	PCR-Screening: 15/100 Liquores, davon 8/46 mit Enzephalitis bekannter Ursache	2x Genotyp 2, 2x Genotyp 5 (basierend auf 366 bp 5'UTR)
Bukowska-Osko et al. ¹⁶⁷	3-4 (3 Liquor/ 4 Serum)	RT-qPCR, HTS (Amplikon)	n.d.	W: 28, 55 M: 20	n.d.	Nicht bekannt	erholten sich ohne neurologische Folgeschäden	Kompartimentalisierung, Liquor PCR-Screening: 0/41 bekannter Ursache, 0/52 Ursache unbekannt/ autoimmun	-

Referenz	HPgV-1-Nachweis	Detektionsmethode	Immuno-histochemie	Geschlecht, Alter (Jahre)	Viruslast	Immunsuppression	Outcome	Kommentar	Genotyp, Accession Nummer
Balcom et al. ¹⁶⁶	2 (Hirn)	RT-qPCR, HTS	Ja, Western Blot mit anti-human HPgV-1 NS5A (Abcam 1037)	W: 51,61	n.d.	1) Zell-Lymphom, vor 15 Jahren diagnostiziert 2) Autopsie ergab Lungenadenokarzinom und das Fehlen von Hirnmetastasen	post-mortem Analyse	87 nt Deletion in der NS2-Genomregion	Genotyp 1/2 MH179063– MH179065
Tuddenham et al. ¹⁷²	1 (Hirn, Liquor, Serum)	RT-qPCR, HTS	n.d.	W: 29	n.d.	keine (3 Monate nach Geburt)	Nach einer Cyclophosphamid-Immunsuppression erholte sich der Patient und wurde zur Rehabilitation entlassen.	-	Genotyp 5 MN417332
Valyraki et al. ³¹⁶	4 (Liquor/Serum)	pan-microorganism DNA- und RNA-basierte Sequenzierung, MetaMIC	n.d.	W: 46, 67 M: 40, 46	2,3-5,4 log ₁₀ cp/mL (Liquor), 6,2-7,4 log ₁₀ cp/mL (Serum)	1) Lebertransplantation 2) B-Zelllymphom + Stammzelltransplantat 3) Hodgkinlymphom 4) Herztransplantation	1) erblindet & bettlägerig 2) erblindet & bettlägerig 3) erblindet, Lähmung mit Hilfsmitteln 4) an den Rollstuhl gebunden	Nachweis über zwei Jahre im Liquor	n.d.
Carmona et al. ³¹⁷	1 (Liquor)	HTS, RT-(q)PCR	n.d.	M: 65	n.d.	entwickelte 13 Tage nach einer Lebertransplantation Enzephalitis	retrospektive Testung	PCR-Screening: 50/200 Liquores	Genotyp 2 OR639931

HIV, ; Humanes Immundefizienz-Virus; HPgV-1, humanes Pegivirus 1; HTS, Hochdurchsatz-Sequenzierung; M, männlich; MS, Multiple Sklerose; n.d., nicht durchgeführt; NS, Nicht-Strukturprotein; nt, Nukleotid; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; RT-(q)PCR, Reverse-Transkriptase (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion; W, Weiblich.

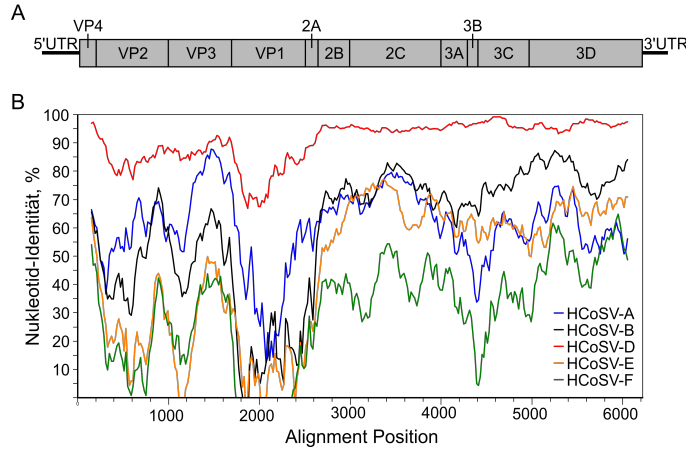


Abbildung A1. Genomorganisation der neuen HCoSV-Sequenz (A) und nt-Identität im Vergleich zu Referenzsequenzen der Spezies HCoSV-A, -B, -D, -E und -F (B). ⁷³, modifiziert. Die Darstellung wurde mittels SimPlot (v3.5.1) mit einer Fenstergröße von 300 bp und einer Schrittweite von 20 nt erstellt. HCoSV, humanes Cosavirus; UTR, Untranslatierte Region.

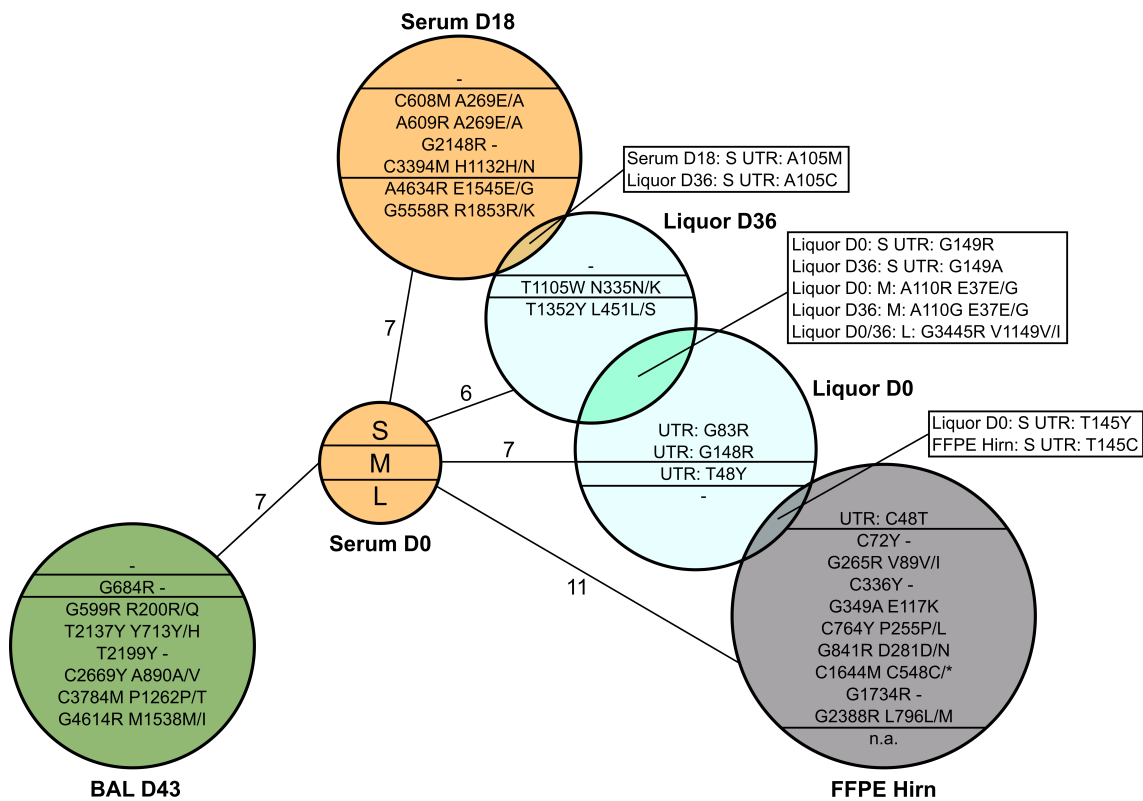


Abbildung A2. Kompartimentalisierung des DOBV innerhalb eines Patienten.

Dargestellt sind Mutationen mit einer Häufigkeit von $\geq 10\%$ und daraus resultierende AA-Substitutionen innerhalb der viralen Populationen verschiedener Kompartimente im Vergleich zur Konsensussequenz, die für die Serumprobe zum Zeitpunkt der Hospitalisierung (D0) generiert wurde. Nur Genompositionen mit einer Coverage von mindestens 30 Sequenzen wurden analysiert. Varianten geringer Qualität oder innerhalb der letzten sieben Nukleotide einer Sequenz wurden nicht gewertet. Zahlen an den Strichen geben die Anzahl von SNPs im Vergleich zur Referenz an. -, keine Mutation / kein AA-Austausch; *, Stop-Codon; n.a., nicht auswertbar aufgrund geringer Genomabdeckung; BAL, Bronchoalveoläre Lavage; D, Tag; FFPE, Formalinfixiert, Paraffin-eingebettet. M=A oder C; R=A oder G; W=A oder T; Y=C oder T.

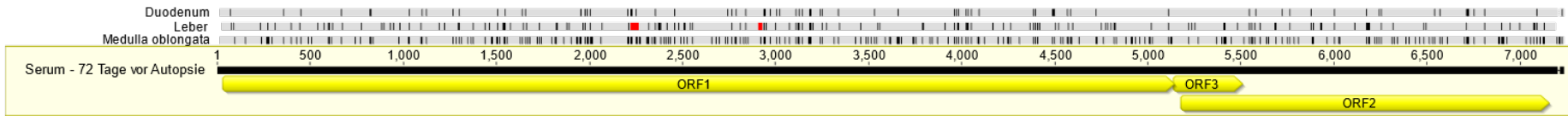


Abbildung A3. Hepatitis-E-Virusdiversität innerhalb eines Patienten.

Dargestellt ist ein Alignment der HEV-Konsensussequenzen, die für das Duodenum, die Leber, die Medulla oblongata sowie eine Serumprobe erstellt wurden. Letztere wurde als Referenzsequenz verwendet, und abweichende Genompositionen sind schwarz hervorgehoben. HEV-Genomregionen ohne Sequenzinformation sind rot hervorgehoben. ORF, offener Leserahmen.

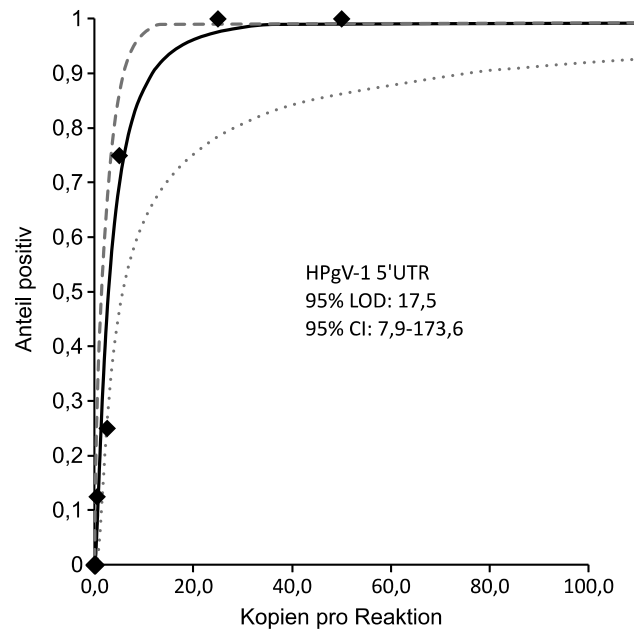


Abbildung A4. Analytische Sensitivität der HPgV-1 RT-qPCR. Die Nachweiswahrscheinlichkeit ist für verschiedene Konzentrationen eines *in vitro* Transkripts aufgetragen. Die Rauten stellen die Ergebnisse von acht parallelen Messungen dar. Durchgezogene Linie, vorhergesagter Anteil positiver Ergebnisse bei einer bestimmten *in vitro* Transkript Konzentration; gestrichelte Linien, 95%-Konfidenzintervall für die Vorhersage. LOD, *limit of detection* - Nachweisgrenze; CI, Konfidenzintervall.

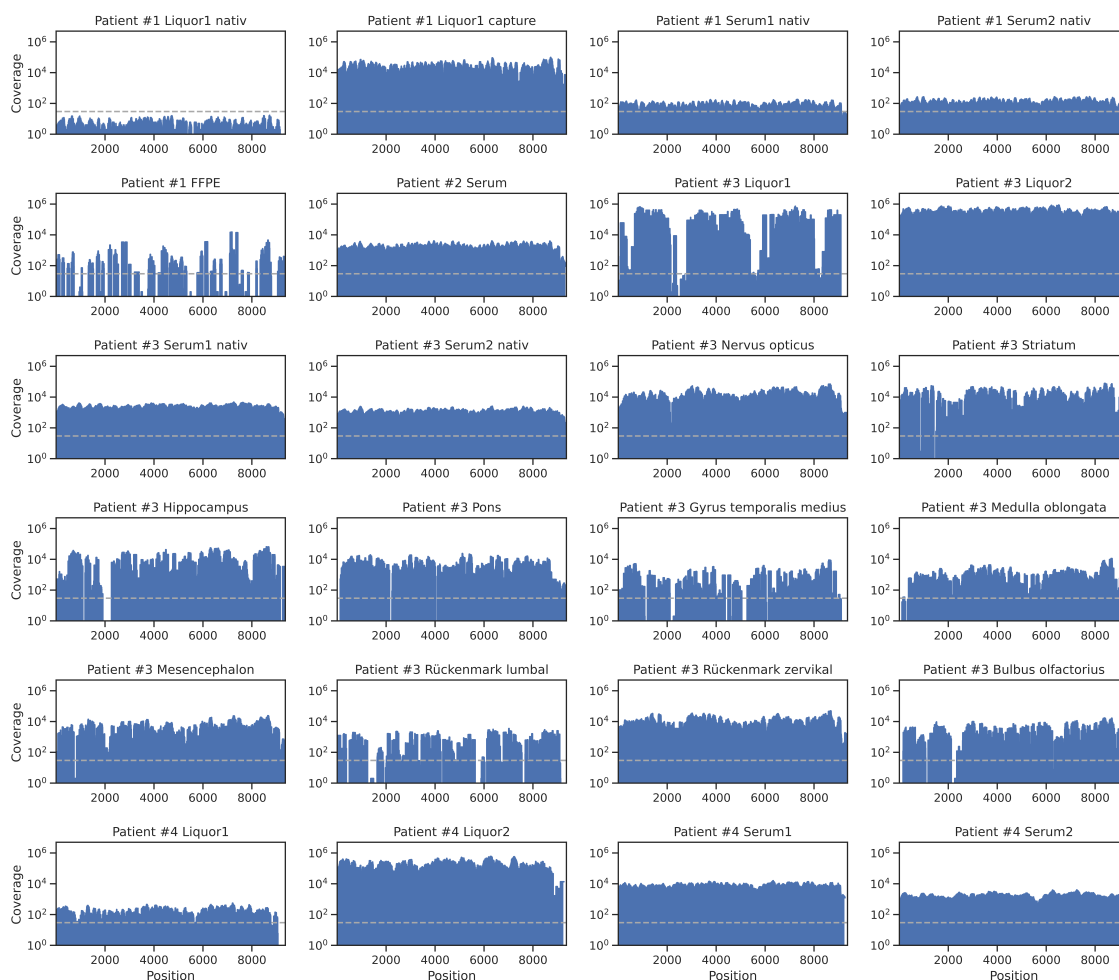


Abbildung A5. Genomabdeckung für verschiedene HPgV-1-Proben. Die gestrichelte Linie indiziert den Cut-off-Wert von 30, der für die Generierung von Konsensussequenzen angewendet wurde. Alle generierten Sequenzen für zwei FFPE-Proben von Patient #1 wurden in der entsprechenden Abbildungen zusammengefasst. Wenn nicht anders angegeben wurden die Sequenzen der nativen Sequenzierung sowie nach gezielter Anreicherung viraler Sequenzen zusammengefasst. FFPE, Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet.

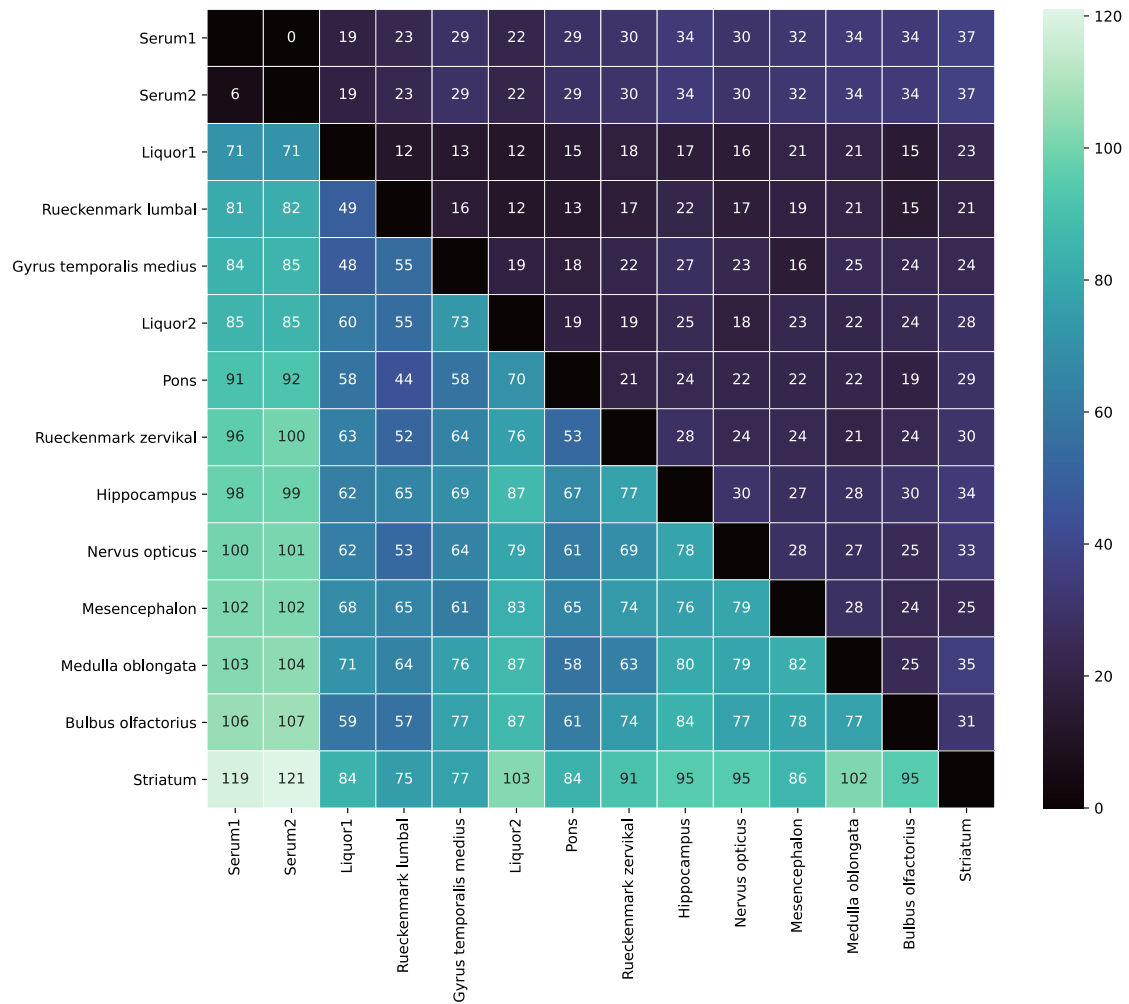


Abbildung A6. Heatmap der nt- und AA-Unterschiede innerhalb der kodierenden Region zwischen den verschiedenen HPgV-1-Proben für Patient #3. Nukleotid-Unterschiede sind unterhalb und AA-Unterschiede oberhalb der Diagonalen dargestellt. Konsensussequenzen wurden mit der '75% Highest-Quality' Einstellung in Geneious Prime (v2022.0.1) erstellt. Nur Genompositionen mit einer Coverage von mindestens 30 Sequenzen wurden berücksichtigt.

In vitro Transkripte und Zielregionen**Cosavirus (5'UTR und 3D)**

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAAACGACGGCCAGTGAATATGCTGGATGGTCACGTTGGAGACTGCATGTG
 GCAGTCTTGAAACGTGTGGTTTGACGTCTAACCATATGGCAGTGGGTGGAGTACTGCAAAGATGTCACCGTGCTT
 TACACGGTTTTTGAACCCACACCGGCTGTTTGGCGCTTGCAGGACAGTAGGTTATTTCTTTTAAATCTTCTTTTC
 TAGCTGTGCAGGCTCTTTCTGCACAGACGGAGTGATACTCCCGTTCCCTTCTTGACAGCTACCAAACATTTTTAAAA
 GATGAAATCAGACCAATTGAAAAAGTAAAAGCAGGAAAAACCAGAATAATAGATGTCACCTCTTGGACCATGTTTT
 GGCTTTCAGAATTGTTCTAGGTAGGTTTATGGCATACTTTCATAATAACTATGGCTTAAATCTTGGCTCAGCTGTTGG
 GTGCGATCCTGACGTTGGTCATAGCTGTTTCTGTGTG

Pegivirus (5'UTR)

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAAACGACGGCCAGTGAATCCCCGGCACTGGGTGCAAGCCCCAGAAACCG
 ACGCCTATCTAAGTAGACGCAATGACTCGGCGCCGACTCGGCGACCGGCCAAAAGGTGGTGGATGGGTGATGAC
 AGGGTTGGTAGGTCGTAATCCCGGTCACCTGGTAGCCACTATAGGTGGGTCTTAAGAGAAGGTTAAGATTCCTC
 TTGTGCCTGCGGCGAGACCGCGCACGGTCCACAGGTGTTGGCCCTACCGGTGTGAATAAGGGCCCGACGTCAGG
 CTCGTCGTTAAACCGAGCCCGTCACCCACCTGGGCAAACGACGCCACGTACGGTCCACGTCGCCCTTCAATGTC
 TCTCTTGACCAATAGGCTTAGCCGGCGAGTTGACAAGGACCAGTGGTGACTGGAGGTTGGAGAGTGACTCCAAGC
 CCTGCCCTTCCCGGTGGGCGGGAAATGCATGGGGCCACCCAGCTCCGCGGGCGGCCTGCAGCCGGGGTAGCCC
 AAGAATCCTTCGGGTGAGGGCGGGTGGCATTTCCTTTTTCTATACCATCATGGCAGTCCCTCTGCTCCTTCTCGTG
 GTTGAGGCCGGGCCATCTTGGCTTCGGCCACCCACGCTTGTGCGAGCGAATGGGCAATATTTCTCACAAATTGTT
 GCGCCCCGAGGATATTGGGTTCTGCCTGGAAGGTGGATGCCTGGTAGCCTTAGGGTGCACGATTTGCACTGACC
 GATGCTGGCCACTGTATCAGGCGGGTTTGGCTGTGCGGCCTGGCAAGTCCGCGGCCAACTGGTGGGGGAGCTG
 GGGAGCCTTACGGGCCCTTGTGCGTCTCGGCCTACGTGGCTGGGATCTTGGGCCTGGGAGAGGTGACTCGGG
 TGTCTAACGGTCGGGGTTCGCGTTGACGCGTCCGGTCTACCCGGTGCCCAACCTGACGTGTGCTGTGCGAGTGTG
 AGTCATAGCTGTTTCTGTGTG

Hepatitis E Virus (RNA-abhängige RNA-Polymerase und ORF2/3)

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAAACGACGGCCAGTGAATTTGTAACAAATTCACCACAGGGGAGACCATTG
 CCCACGGTAAGGTCGGCCAGGGCATCTCGGCTTGGAGCAAGACCTTCTGTGCCCTGTTTGGTCCGTGGTTTCGTG
 CTATTGAAAAAGAAATACTAGCCCTGCTCCCGCTAATATTTTCTACGGCGACGCATACGAGGAGTCTGTGTTGCC
 GCCGCTGTGTCGGGGGCAGGTTCAAGCATGGTATTTGAGAATGATTTTTTACAGATTTGATAGCACCCAAAATAACTT
 CTCCTTGGTCTCGAGTGTGTAGTCATGGAGGAATGTGGCATGCCCCAGTGGCTAATCCGGTTGTACCATTTGGTT
 CGGTCGGCCTGGATCTTACAGGCGCCGAAGGAGTCTCTTAAGGGATTTTGAAGAAGCATTCTGGTGAGCCTGGC
 ACCCTCCTTTGGAACACTGTCTGGAACATGGCGATCATAGCACACTGCTATGAATTTCTGATTTTAGGGTTGCCCG
 TTTCAAGGGAGATGATTCGGTGGTCCCGGCCAGCCGTCTGGCCCGCTCGTGGGCGGCGCAGCGCGGTGCCG
 GCAGTGGTTTCTGGGGTGACAGGGTTGATTCTCAGCCCTTCGCCCTCCCTATATTATCCAACCAACCCCTTTGC
 CGCCGATGTGCTACCGCAATCCGGGGCTGGAGCTCGCCCTCGACAGGTCATAGCTGTTTCTGTGTG

unveröffentlichte Vollgenomsequenzen

Unveröffentlichte Vollgenomsequenzen werden in einem privaten GitHub-Repository bereitgestellt und auf berechnete Anfrage zugänglich gemacht.

12. Abkürzungsverzeichnis

(+) / (-)	positive / negative Orientierung
AA	Aminosäure/n
AdV	Adenovirus
B2M	Beta-2-Microglobulin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
bwa	Burrows-Wheeler Alignment tool
CoSV	Cosavirus
cp	<i>copies</i> , Kopien
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , Cerebral Spinalflüssigkeit
D	Tag
DENV	Dengue-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOBV	Dobrava-Belgrad-Virus
ds	doppelsträngig
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin eingebettet
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus
h	Stunde
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HCoSV	humanes Cosavirus / humane Cosaviren
HEV	Hepatitis-E-Virus
HHV	Humanes Herpesvirus / Humane Herpesviren
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPgV	humanes Pegivirus / humane Pegiviren
HSV	Herpes-simplex-Virus
HTS	<i>high-throughput sequencing</i> , Hochdurchsatz-Sequenzierung
HVR	hypervariablen Region
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
Ig	Immunglobulin
IFT	Immunfluoreszenztest
iU	<i>international Unit</i> , Internationale Einheit
kb/kbp	Kilobasen/Kilobasenpaare

LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
ME/E	Meningitis/Enzephalitis
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NS	Nicht-Strukturprotein
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PgV	Pegivirus
PNS	peripheres Nervensystem
PUUV	Puumala-Virus
rRNA	ribosomale RNA
RFA	RNase freies Wasser
RNA	Ribonukleinsäure
RT-(q)PCR	Reverse-Transkriptase (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SEOV	Seoul-Virus
SFV/SFNV	Sandmückenfiebertivirus / Typ: Neapel
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
ss	<i>single-stranded</i> , einzelsträngig
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TOSV	Toskana-Virus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WNV	West-Nil-Virus
ZNS	zentrales Nervensystem

13. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Diagnostik entzündlicher ZNS-Erkrankungen.	10
Abbildung 2. Detektion von WNV in Vögeln und Pferden in den Jahren 2018-2023 in Deutschland.....	16
Abbildung 3. Vereinfachte, schematische Darstellung der Oxford Nanopore Sequenzierung..	20
Abbildung 4. Schematische Darstellung der Anreicherung viraler Nukleinsäure.	21
Abbildung 5. Grafische Zusammenfassung der Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit.	24
Abbildung 6. Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit designten <i>in vitro</i> Transkriptes für HCoV.....	37
Abbildung 7. Virale Sequenzen pro Million generierter Sequenzen für verschiedene Viren und Extraktionsmethoden.....	45
Abbildung 8. Nachweis viraler Sequenzen pro Million generierter Sequenzen in Abhängigkeit des ct-Wertes für verschiedene Erreger und Probenotypen (A) und für individuelle Erreger (B). 48	
Abbildung 9. Schematischer Überblick über den Arbeitsablauf und mögliche Kontaminationsquellen.	50
Abbildung 10. Gefrorene Liquorproben.	50
Abbildung 11. Genomabdeckung des Norway Luteo-like Virus 4.	51
Abbildung 12. Schematische Darstellung zum Arbeitsablauf bei der Detektion viraler Nukleinsäure zum Ausschluss potentieller Kontaminationen.....	53
Abbildung 13. Schematischer Arbeitsablauf der HTS-Diagnostik.	53
Abbildung 14. Schematische Zusammenfassung des HTS-Arbeitsablaufs und möglicher Schnittstellen für die gezielte Anreicherung viraler Nukleinsäuren oder die Abreicherung von Wirtsgenom.	55
Abbildung 15. Phylogenetische Analyse der kodierenden Region des TOSV S-Segmentes. ...	59
Abbildung 16. Viruslast im Liquor und Stuhl nach Auftreten der Symptome.....	60
Abbildung 17. Maximum-Likelihood-Analyse der neuen HCoV-Sequenz und Vertretern bekannter Spezies.....	61
Abbildung 18. Übersicht über DOBV-Viruslast (A) und -Antikörper (B) in verschiedenen Probenotypen.	62
Abbildung 19. Phylogenetische Analyse der kodierenden Region des S-, M- und L-Segmentes der DOBV-Sequenz des Patienten zu Referenzsequenzen.	63
Abbildung 20. HEV-Genomorganisation und Genomabdeckung durch die hergestellten <i>Capture</i> -Sonden.	64
Abbildung 21. Genomabdeckung und Coverage für verschiedene HEV-Proben nach der nativen Sequenzierung (links) und gezielter Anreicherung (rechts).	67
Abbildung 22. Phylogenetischer Stammbaum der kompletten kodierenden Region von HEV. 68	
Abbildung 23. Anzahl totaler und viraler Sequenzen vor und nach gezielter Anreicherung am Beispiel von zehn HEV positiven Serumproben.....	69
Abbildung 24. HEV-Viruslast in verschiedenen Autopsieproben.....	70

Abbildung 25. Anzahl der Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Probenotypen und Sequenzieransätzen.....	71
Abbildung 26. Anteil viraler Sequenzen mit Ribavirin-Resistenzmutation.	71
Abbildung 27. Zusammenfassung der Ergebnisse der HEV-Untersuchungen in dieser Arbeit.	72
Abbildung 28. WNV im phylogeographischen Kontext.....	73
Abbildung 29. Phylogenetische Beziehung der kodierenden Region von WNV-Sequenzen der Linie 2.....	77
Abbildung 30. Schematischer Überblick des Arbeitsablaufes der Amplikon-Sequenzierung mittels Oxford Nanopore.	78
Abbildung 31. WNV-Genomabdeckung nach nativer Sequenzierung, gezielter Anreicherung viraler Sequenzen und Amplikon-Sequenzierung.....	79
Abbildung 32. Zusammenfassung der Fragestellungen und Ergebnisse der WNV-Untersuchungen in dieser Arbeit.....	80
Abbildung 33. Phylogenetische Analyse der partiellen 5'UTR der identifizierten HPgV-1-Fälle und Referenzsequenzen.	82
Abbildung 34. HPgV-1-Viruslast in Liquor- und Serumproben.....	83
Abbildung 35. Longitudinale Kinetik der HPgV-1-Viruslast in Liquor- und Serumproben.	83
Abbildung 36. Phylogenetische Analyse der kodierenden Region humaner Pegiviren.	87
Abbildung 37. Kompartimentalisierung von HPgV-1.....	88
Abbildung 38. HPgV-1-Viruslast in Autopsiegeweben.	89
Abbildung 39. Genomunterschiede in den untersuchten Proben.	90
Abbildung 40. Genomorganisation der HPgV-1-Referenzen und Sequenzvergleich der generierten HPgV-1-Sequenzen dieser Arbeit.....	91
Abbildung 41. Zusammenfassung der durchgeführten HPgV-1-Untersuchungen.....	93
Abbildung A1. Genomorganisation der neuen HCoV-229E-Sequenz (A) und nt-Identität im Vergleich zu Referenzsequenzen der Spezies HCoV-229E-A, -B, -D, -E und -F (B).....	128
Abbildung A2. Kompartimentalisierung des DOBV innerhalb eines Patienten.....	128
Abbildung A3. Hepatitis-E-Virusdiversität innerhalb eines Patienten.	129
Abbildung A4. Analytische Sensitivität der HPgV-1 RT-qPCR.	130
Abbildung A5. Genomabdeckung für verschiedene HPgV-1-Proben.....	131
Abbildung A6. Heatmap der nt- und AA-Unterschiede innerhalb der kodierenden Region zwischen den verschiedenen HPgV-1-Proben für Patient #3.....	132

14. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der humanpathogenen Herpesviren.	12
Tabelle 2. Spezifikationen ausgewählter Illumina Sequenziergeräte.	18
Tabelle 3. Technisches Equipment.	25
Tabelle 4. Chemikalien.	27
Tabelle 5. Puffer.	28
Tabelle 6. Kommerzielle Kits.	28
Tabelle 7. Verbrauchsmaterialien.	30
Tabelle 8. Oligonukleotide für die Reverse Transkriptase (RT)-PCR und anschließende Sanger-Sequenzierung.	31
Tabelle 9. Oligonukleotide und Sonden für die Detektion und Quantifizierung.	32
Tabelle 10. Software und verwendete Software-Pakete.	33
Tabelle 11. Standardprotokoll für die RT-PCR mittels SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase.	35
Tabelle 12. Standard Temperaturprofil einer RT-PCR mittels SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase.	36
Tabelle 13. Standardprotokoll für die RT-qPCR mittels SuperScript™ III OneStep Kit.	37
Tabelle 14. Standard Temperaturprofil einer RT-qPCR mittels SuperScript™ III OneStep Kit.	37
Tabelle 15. Standardprotokoll für die RT-qPCR mittels Qiagen OneStep Kit.	38
Tabelle 16. Standard Temperaturprofil einer RT-qPCR mittels Qiagen OneStep Kit.	38
Tabelle 17. Zusammenfassung der Ergebnisse für verschiedene Fragmentierungszeiten sowie Pufferkonzentrationen und der resultierenden Anzahl viraler Sequenzen.	44
Tabelle 18. Anteil von rRNA und Globin mRNA Sequenzen vor und nach der gezielten Abreicherung in Muskelproben.	44
Tabelle 19. Ergebnisse des Alphavirus-Ringversuchs.	47
Tabelle 20. Überblick über die Gesamtstruktur der ausgewerteten ME/E-Panels und die Anzahl der untersuchten Proben.	56
Tabelle 21. Übersicht der mittels HTS detektierten Pathogene auf Poolebene.	57
Tabelle 22. Nukleotid-Identität zur nächsten bekannten NCBI-Referenz und deren Ursprung.	59
Tabelle 23. Vergleich der AA-Identität der neuen HCoV-229E-Sequenz zu Referenzsequenzen.	61
Tabelle 24. Nukleotid- und AA- Identität (%) von HEV-Genomen, die aus dem Blutspender und dem Kamel gewonnen wurden, zu Referenzsequenzen für ausgewählte genomische Regionen ..	66
Tabelle 25. Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen WNV-Fälle.	74
Tabelle 26. Demografische, klinische, virologische und Liquor-Befunde bei Patienten mit HPgV-1 assoziierter Enzephalomyelitis.	84
Tabelle A1. Bekannte, seltene und potentielle virale Enzephalitis-Erreger.	115
Tabelle A2. Weitere Oligonukleotide für die RT-PCR.	119

Tabelle A3. Ergebnisse vor und nach der gezielten Anreicherung für verschiedene Probenmaterialien.	123
Tabelle A4. Oligonukleotide für die WNV-Vollgenomsequenzierung.....	124
Tabelle A5. Ergebnisse der Literaturrecherche von HPgV-1 ZNS-Nachweisen.....	126

15. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Drost für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Virologie zu schreiben, das spannende Projekt und die stetige Betreuung bedanken. Desweiteren möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Haike Antelmann für die Betreuung bedanken.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Rainer Ulrich von ganzem Herzen bedanken. Du hast meine erste (lang ersehnte!) Virologie-Vorlesung gehalten. Ich werde nie vergessen, wie du damals sagtest: "Wer in der Forschung arbeiten will, der muss bereit sein, auf einem Feldbett im Labor zu schlafen, wenn ein neues Virus auftaucht!". Danke, dass Du mich über die Jahre betreut hast: bei meiner Bachelor- und Masterarbeit sowie unzähligen Praktika. Die Art und Weise, wie Du dein Netzwerk aufgebaut hast und wie du bis heute mit all deinen Ehemaligen in Kontakt bleibst, hat mich sehr beeindruckt. Aus der Zeit bei Dir sind viele Freundschaften entstanden, die bis heute andauern. Keiner von uns wird je wieder eine Maus/Ratte sehen können, ohne kurz die Art zu bestimmen und zu überlegen, ob noch etwas Platz im Gefrierfach ist. Vielen Dank dafür! Nicht zuletzt, weil du mich auch mit Christian und Victor bekannt gemacht und damit den Grundstein für diese Arbeit gelegt hast.

Ich möchte mich bei all unseren Kooperationspartnerinnen und Kooperationspartnern bedanken, die uns mit Proben versorgt haben und an vielen spannenden Projekten mitgearbeitet haben.

Mein Dank geht an alle Menschen am Institut, die unsere Arbeit in den letzten Jahren so besonders gemacht haben. Jeder Tag begann mit einem herzlichen GUTEEEN MOOOORGEEEN - sei es Marina, Olivia, Naemi, Ilija, Lea oder Winston. Es gab immer so viele Menschen, mit denen wir kleine und große Probleme schnell lösen konnten. Viele tolle Projekte und Freundschaften sind im Laufe der Jahre entstanden, für die ich sehr dankbar bin.

Ich könnte nicht glücklicher sein über unsere Freundschaft - Marie & Tals & Beate!

Niemand hätte mich besser, kritischer oder sarkastischer einarbeiten können als ihr, Tobi und Fabi! Danke für die tollen Jahre! Darauf eine Schokomilch (wenn sie nicht gestohlen wurde)!

The one&only Jörni, the beary best - Que?

Besonders bedanken möchte ich mich bei den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Corman und Jones. Ich danke so vielen für die kleinen und großen Dinge: die vielen Gespräche, die Mittagspausen, die Kaffeerunden und allen, die Proben in der Hand hatten - sei es beim Probeneingang, Extraktion, PCR, Sero, Library Prep oder Bioinformatik: Barbs, Verena, Sebastian, Till, Lara, Tiina, Annawah, Patricia, Jule, Tatjana, Jenny, Sarah, Petra, Ece, Felix, Angeliqua & Gustavo, Andres, Phil - Danke!

Terry, mit dir habe ich jemanden gefunden, der genauso verrückt ist wie ich. Ich danke dir von ganzem Herzen für: all den Kaffee; die Pasta; das Brot; das Lachen; "mein" Büro; die vielen Bücher; Harry Lorayne; für das Anerkennen meiner vielen Fehlschläge beim Plotten; die langen Nächte, in denen wir gemeinsam die Pipeline repariert haben; Rotterdam; für alles, was du mir beigebracht hast; 'Column'; das Korrekturlesen so vieler Dokumente; das Zwingen, Englisch zu sprechen und so vieles mehr! Ein großer Teil dieser Arbeit wurde in deiner Wohnung geschrieben. Danke, dass du das möglich gemacht hast. Aber - wo ist Waldo?

Mein zweitgrößter Dank geht an Dich, Victor. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können. Ich danke dir für all die Zeit, die du mir gewidmet hast - und das trotz Familie und Einsatz an vorderster Front während der Pandemie. Wenn an einem Samstagabend um 22 Uhr das Telefon klingelt und ich deinen Namen sehe, ziehe ich mir schon die Jacke an. Und wenn wir in der Nacht vom 23. auf den 24. Dezember die neueste Variante sequenzieren, ist das genau das, was ich mir gewünscht habe, seit ich zum ersten Mal von Viren gehört habe! Danke für all die tollen Projekte, an denen wir gemeinsam arbeiten. Danke für deine kritische Art Dinge zu hinterfragen, deine immer konstruktive Kritik, deinen Blick für das große Ganze! Ich wünsche mir so sehr, dass es genauso weitergeht!

In all den Jahren gab es nur drei Tage, an denen ich nicht gerne dabei war. Das ist wahrscheinlich ein Rekord in der Welt der Doktoranden.

Aber mein größter Dank geht an dich, Paul! Danke für mehr als 13 wunderbare Jahre und dafür, dass du mich so liebst, wie ich bin. Danke, für all das Gute, dass du in mein Leben bringst. Danke, dass du meine große Liebe zur Virologie erträgst. Auch wenn das bedeutet, dass ich viel zu wenig bei dir und unserer Familie bin.

16. Referenzen

1. Granerod, J., Tam, C. C., Crowcroft, N. S., Davies, N. W. S., Borchert, M. & Thomas, S. L. Challenge of the unknown. *Neurology* 75, 924–932 (2010).
2. Nicolosi, A., Hauser, W. A., Beghi, E. & Kurland, L. T. Epidemiology of Central Nervous System Infections in Olmsted County, Minnesota, 1950-1981. *J Infect Dis* 154, 399–408 (1986).
3. Pönkä, A. & Pettersson, T. The incidence and aetiology of central nervous system infections in Helsinki in 1980. *Acta Neurol Scand* 66, 529–535 (1982).
4. Wang, H., Zhao, S., Wang, S., Zheng, Y., Wang, S., Chen, H., Pang, J., Ma, J., Yang, X. & Chen, Y. Global magnitude of encephalitis burden and its evolving pattern over the past 30 years. *J Infection* 84, 777–787 (2022).
5. Boucher, A., Herrmann, J. L., Morand, P., Buzel , R., Crabol, Y., Stahl, J. P. & Mailles, A. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. *M decine Et Maladies Infect* 47, 221–235 (2017).
6. George, B. P., Schneider, E. B. & Venkatesan, A. Encephalitis Hospitalization Rates and Inpatient Mortality in the United States, 2000-2010. *Plos One* 9, e104169 (2014).
7. Granerod, J., Ambrose, H. E., Davies, N. W., Clewley, J. P., Walsh, A. L., Morgan, D., Cunningham, R., Zuckerman, M., Mutton, K. J., Solomon, T., Ward, K. N., Lunn, M. P., Irani, S. R., Vincent, A., Brown, D. W., Crowcroft, N. S. & Group, on behalf of the U. H. P. A. (HPA) A. of E. S. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect. Dis.* 10, 835–844 (2010).
8. Koskiniemi, M., Korppi, M., Mustonen, K., Rantala, H., Muttillainen, M., Herrg rd, E., Ukkonen, P. & Vaheri, A. Epidemiology of encephalitis in children. A prospective multicentre study. *Eur. J. Pediatr.* 156, 541–545 (1997).
9. Bennetto, L. & Scolding, N. Inflammatory/post-infectious encephalomyelitis. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatry* 75, i22 (2004).
10. Sonnevile, R., Klein, I., Broucker, T. de & Wolff, M. Post-infectious encephalitis in adults: Diagnosis and management. *J. Infect.* 58, 321–328 (2009).
11. Meyding-Lamad , U. Virale Meningoenzephalitis. at <https://dgn.org/leitlinie/virale-meningoenzephalitis>
12. DeBiasi, R. L. & Tyler, K. L. Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 903–925 (2004).
13. Hsu, D. C., Chumpolkulwong, K., Corley, M. J., Hunsawong, T., Inthawong, D., Schuetz, A., Imerbsin, R., Silsorn, D., Nadee, P., Sopanaporn, J., Phuang-Ngern, Y., Klungthong, C., Reed, M., Fernandez, S., Ndhlovu, L. C., Paul, R., Lugo-Roman, L., Michael, N. L., Modjarrad, K. & Vasani, S. Neurocognitive impact of Zika virus infection in adult rhesus macaques. *J. Neuroinflammation* 19, 40 (2022).

14. Tiège, X. D., Héron, B., Lebon, P., Ponsot, G. & Rozenberg, F. Limits of Early Diagnosis of Herpes Simplex Encephalitis in Children: A Retrospective Study of 38 Cases. *Clin. Infect. Dis.* 36, 1335–1339 (2003).
15. Grygorczuk, S., Dunaj-Małyszko, J., Czupryna, P., Sulik, A., Toczyłowski, K., Siemieniako-Werszko, A., Żebrowska, A., Pancewicz, S. & Moniuszko-Malinowska, A. The Detectability of the Viral RNA in Blood and Cerebrospinal Fluid of Patients with Tick-Borne Encephalitis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9332 (2022).
16. Crepin, P., Audry, L., Rotivel, Y., Gacoin, A., Caroff, C. & Bourhy, H. Intravitam Diagnosis of Human Rabies by PCR Using Saliva and Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1117–1121 (1998).
17. Swinnen, B., Saegeman, V., Beuselinck, K., Wouters, A., Cypers, G., Meyfroidt, G. & Schrooten, M. Predictive value of JC virus PCR in cerebrospinal fluid in the diagnosis of PML. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 95, 114859 (2019).
18. Kuhle, J., Gosert, R., Bühler, R., Derfuss, T., Sutter, R., Yaldizli, Ö., Radue, E.-W., Ryschkewitsch, C., Major, E. O., Kappos, L., Frank, S. & Hirsch, H. H. Management and outcome of CSF-JC virus PCR-negative PML in a natalizumab-treated patient with MS. *Neurology* 77, 2010–2016 (2011).
19. Trujillo-Gómez, J., Tsokani, S., Arango-Ferreira, C., Atehortúa-Muñoz, S., Jimenez-Villegas, M. J., Serrano-Tabares, C., Veroniki, A.-A. & Florez, I. D. Biofire FilmArray Meningitis/Encephalitis panel for the aetiological diagnosis of central nervous system infections: A systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis. *eClinicalMedicine* 44, 101275 (2022).
20. Berkhout, A., Cheng, D. R., McNab, S., Lee, L., Daley, A. J. & Clifford, V. Clinical and Health System Impact of Biofire Filmarray Meningitis/Encephalitis Routine Testing of CSF in a Pediatric Hospital: An Observational Study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 42, 281–285 (2023).
21. Tyler, K. L. Acute Viral Encephalitis. *New Engl J Med* 379, 557–566 (2018).
22. Granerod, J. & Crowcroft, N. S. The epidemiology of acute encephalitis. *Neuropsychol. Rehabilitation* 17, 406–428 (2007).
23. Davison, K. L., Crowcroft, N. S., Ramsay, M. E., Brown, D. W. G. & Andrews, N. J. Viral Encephalitis in England, 1989–1998: What Did We Miss? - Volume 9, Number 2—February 2003 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg. Infect. Dis.* 9, 234–240 (2003).
24. Tunkel, A. R., Glaser, C. A., Bloch, K. C., Sejvar, J. J., Marra, C. M., Roos, K. L., Hartman, B. J., Kaplan, S. L., Scheld, W. M., Whitley, R. J. & American, I. D. S. of. The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 47, 303–327 (2008).
25. Ayala-Nunez, N. V. & Gaudin, R. A viral journey to the brain: Current considerations and future developments. *PLoS Pathog.* 16, e1008434 (2020).
26. Koyuncu, O. O., Hogue, I. B. & Enquist, L. W. Virus Infections in the Nervous System. *Cell Host Microbe* 13, 379–393 (2013).

27. Swanson, P. A. & McGavern, D. B. Viral diseases of the central nervous system. *Curr. Opin. Virol.* 11, 44–54 (2015).
28. Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., Espinosa, D. A., Biering, S. B., Patana, M., Ratnasiri, K., Wang, C., Beatty, P. R. & Harris, E. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep.* 26, 1598-1613.e8 (2019).
29. Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., Luo, H., Nakatsuka, A. & Nerurkar, V. R. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* 385, 425–433 (2009).
30. Moses, A. V., Bloom, F. E., Pauza, C. D. & Nelson, J. A. Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10474–10478 (1993).
31. Salimi, H., Cain, M. D., Jiang, X., Roth, R. A., Beatty, W. L., Sun, C., Klimstra, W. B., Hou, J. & Klein, R. S. Encephalitic Alphaviruses Exploit Caveola-Mediated Transcytosis at the Blood-Brain Barrier for Central Nervous System Entry. *mBio* 11, e02731-19 (2020).
32. Tabor-Godwin, J. M., Ruller, C. M., Bagalso, N., An, N., Pagarigan, R. R., Harkins, S., Gilbert, P. E., Kiosses, W. B., Gude, N. A., Cornell, C. T., Doran, K. S., Sussman, M. A., Whitton, J. L. & Feuer, R. A Novel Population of Myeloid Cells Responding to Coxsackievirus Infection Assists in the Dissemination of Virus within the Neonatal CNS. *J. Neurosci.* 30, 8676–8691 (2010).
33. Cain, M. D., Salimi, H., Gong, Y., Yang, L., Hamilton, S. L., Heffernan, J. R., Hou, J., Miller, M. J. & Klein, R. S. Virus entry and replication in the brain precedes blood-brain barrier disruption during intranasal alphavirus infection. *J. Neuroimmunol.* 308, 118–130 (2017).
34. Gluska, S., Zahavi, E. E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S. & Perlson, E. Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLoS Pathog.* 10, e1004348 (2014).
35. Spatola, M. & Pasquier, R. A. D. Immune system's role in viral encephalitis. *Rev. Neurol.* 170, 577–583 (2014).
36. Lindsey, N. P., Staples, J. E., Lehman, J. A. & Fischer, M. Medical Risk Factors for Severe West Nile Virus Disease, United States, 2008–2010. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 179–184 (2012).
37. Montgomery, R. R. Age-related alterations in immune responses to West Nile virus infection. *Clin Exp Immunol* 187, 26–34 (2017).
38. Taylor, K. G., Woods, T. A., Winkler, C. W., Carmody, A. B. & Peterson, K. E. Age-Dependent Myeloid Dendritic Cell Responses Mediate Resistance to La Crosse Virus-Induced Neurological Disease. *J Virol* 88, 11070–11079 (2014).
39. Rouse, B. T. & Sehrawat, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 514–526 (2010).
40. Zhang, S.-Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., Segal, D., Sancho-Shimizu, V., Lorenzo, L., Puel, A., Picard, C., Chappier, A., Plancoulaine, S., Titeux, M.,

- Cognet, C., Bernuth, H. von, Ku, C.-L., Casrouge, A., Zhang, X.-X., Barreiro, L., Leonard, J., Hamilton, C., Lebon, P., Héron, B., Vallée, L., Quintana-Murci, L., Hovnanian, A., Rozenberg, F., Vivier, E., Geissmann, F., Tardieu, M., Abel, L. & Casanova, J.-L. TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science* 317, 1522–1527 (2007).
41. ICTV Family Orthoherpesviridae.
<https://ictv.global/report/chapter/orthoherpesviridae/orthoherpesviridae>
42. Looker, K. J., Magaret, A. S., May, M. T., Turner, K. M. E., Vickerman, P., Gottlieb, S. L. & Newman, L. M. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS ONE* 10, e0140765 (2015).
43. Tunbäck, P., Bergström, T., Claesson, B. A., Carlsson, R.-M. & Löwhagen, G.-B. Early acquisition of herpes simplex virus type 1 antibodies in children—A longitudinal serological study. *J. Clin. Virol.* 40, 26–30 (2007).
44. Bauer, G. R., Khobzi, N. & Coleman, T. A. Herpes simplex virus type 2 seropositivity and relationship status among U.S. adults age 20 to 49: a population-based analysis. *BMC Infect. Dis.* 10, 359 (2010).
45. Wutzler, P., Doerr, H. W., Färber, I., Eichhorn, U., Helbig, B., Sauerbrei, A., Brandstädt, A. & Rabenau, H. F. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations—relevance for the incidence of genital herpes. *J. Méd. Virol.* 61, 201–207 (2000).
46. Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W., & Kimmig, P. *Mikrobiologische Diagnostik*, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage: 333-351.
47. Cohen, J. I. Herpes Zoster. *N. Engl. J. Med.* 369, 255–263 (2013).
48. Griffiths, P. & Reeves, M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 759–773 (2021).
49. M., Z. D., S., M. A., S., S. S., M., F. L., Meei-Li, H., Anna, W., P., R. M., Long, N., Rena, B., Ashley, M. R. & Lawrence, C. A Population-Based Study of Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *N. Engl. J. Med.* 352, 768–776 (2005).
50. Ablashi, D. V., Berneman, Z. N., Kramarsky, B., Whitman, J., Asano, Y. & Pearson, G. R. Human herpesvirus-7 (HHV-7): current status. *Clin. Diagn. Virol.* 4, 1–13 (1995).
51. Niederman, J. C., Miller, G., Pearson, H. A., Pagano, J. S. & Dowaliby, J. M. Infectious Mononucleosis — Epstein–Barr-Virus Shedding in Saliva and the Oropharynx. *N. Engl. J. Med.* 294, 1355–1359 (1976).
52. Cohen, J. I. Herpesvirus latency. *J. Clin. Investig.* 130, 3361–3369 (2020).
53. Chaumont, H., Roze, E., Tressières, B., Lazarini, F. & Lannuzel, A. Central nervous system infections in a tropical area: influence of emerging and rare infections. *Eur. J. Neurol.* 27, 2242–2249 (2020).
54. Jmor, F., Emsley, H. C., Fischer, M., Solomon, T. & Lewthwaite, P. The incidence of acute encephalitis syndrome in Western industrialised and tropical countries. *Virol. J.* 5, 134 (2008).
55. Hasbun, R., Rosenthal, N., Balada-Llasat, J. M., Chung, J., Duff, S., Bozzette, S., Zimmer, L. & Ginocchio, C. C. Epidemiology of Meningitis and Encephalitis in the United States, 2011–2014. *Clin. Infect. Dis.* 65, 359–363 (2017).

56. Whitley, R. J., Soong, S., Dolin, R., Galasso, G. J., Ch'ien, L. T. & Alford, C. A. Adenine Arabinoside Therapy of Biopsy-Proved Herpes Simplex Encephalitis — National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study. *N. Engl. J. Med.* 297, 289–294 (1977).
57. ICTV Genus Enterovirus.
<https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/enterovirus>
58. Tseng, C.-C., Chang, L.-Y. & Li, C.-S. Detection of airborne viruses in a pediatrics department measured using real-time qPCR coupled to an air-sampling filter method. *J. Environ. Heal.* 73, 22–8 (2010).
59. Dick, E. C., Jennings, L. C., Mink, K. A., Wartgow, C. D. & Inborn, S. L. Aerosol Transmission of Rhinovirus Colds. *J. Infect. Dis.* 156, 442–448 (1987).
60. Chung, P. W., Huang, Y. C., Chang, L. Y., Lin, T. Y. & Ning, H. C. Duration of enterovirus shedding in stool. *J. Microbiol., Immunol., Infect. Wei mian yu gan ran za zhi* 34, 167–70 (2001).
61. Gosert, R., Heininger, U. & Hirsch, H. H. Enterovirus detection in patients with acute gastroenteritis in Switzerland. *J. Méd. Virol.* 90, 685–691 (2018).
62. Hellferscee, O., Tempia, S., Walaza, S., Variava, E., Dawood, H., Wolter, N., Madhi, S. A., Plessis, M. du, Cohen, C. & Treurnicht, F. K. Enterovirus genotypes among patients with severe acute respiratory illness, influenza-like illness, and asymptomatic individuals in South Africa, 2012–2014. *J. Méd. Virol.* 89, 1759–1767 (2017).
63. Chen, B.-S., Lee, H.-C., Lee, K.-M., Gong, Y.-N. & Shih, S.-R. Enterovirus and Encephalitis. *Front. Microbiol.* 11, 261 (2020).
64. ICTV Genus Cosavirus.
<https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/cosavirus>
65. Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Slikas, E., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M. M., Angez, M., Wang, C., Shafer, R. W., Zaidi, S. & Delwart, E. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proc National Acad Sci* 105, 20482–20487 (2008).
66. Dai, X. Q., Hua, X. G., Shan, T. L., Delwart, E. & Zhao, W. Human cosavirus infections in children in China. *J. Clin. Virol.* 48, 228–229 (2010).
67. Khamrin, P., Chaimongkol, N., Malasao, R., Suantai, B., Saikhruang, W., Kongsricharoern, T., Ukarapol, N., Okitsu, S., Shimizu, H., Hayakawa, S., Ushijima, H. & Maneekarn, N. Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. *Virus Genes* 44, 244–246 (2012).
68. Stöcker, A., Souza, B. F. de C. D., Ribeiro, T. C. M., Netto, E. M., Araujo, L. O., Corrêa, J. I., Almeida, P. S., Mattos, A. P. de, Ribeiro, H. da C., Pedral-Sampaio, D. B., Drosten, C. & Drexler, J. F. Cosavirus Infection in Persons with and without Gastroenteritis, Brazil - Volume 18, Number 4—April 2012 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 656–659 (2012).

69. Maan, H. S., Chowdhary, R., Shakya, A. K. & Dhole, T. N. Genetic diversity of cosaviruses in nonpolio acute flaccid paralysis cases of undefined etiology, Northern India, 2010–2011. *J. Clin. Virol.* 58, 183–187 (2013).
70. Coutinho, C. R. M., Cardoso, J. F., Siqueira, J. A. M., Machado, R. S., Júnior, W. D. das C., Tavares, F. N. & Gabbay, Y. B. Diversity of picornaviruses detected in diarrheal samples from children in Belém, Brazilian Amazon (1982–2019). *J. Méd. Virol.* 95, e28873 (2023).
71. Daprà, V., Montanari, P., Rassu, M., Calvi, C., Galliano, I. & Bergallo, M. Prevalence of human Cosavirus and Saffold virus in young children with gastroenteritis in Northern Italy. *Minerva Pediatr.* 75, 376–380 (2023).
72. Ferraro, G. B., Mancini, P., Divizia, M., Suffredini, E., Libera, S. D., Iaconelli, M. & Rosa, G. L. Occurrence and Genetic Diversity of Human Cosavirus in Sewage in Italy. *Food Environ. Virol.* 10, 386–390 (2018).
73. Schneider, J., Engler, M., Hofmann, J., Selinka, H. C., Jones, T. C., Drosten, C., Diedrich, S., Corman, V. M. & Böttcher, S. Molecular detection of cosaviruses in a patient with acute flaccid paralysis and in sewage samples in Germany. *Virus Res* 297, 198285 (2021).
74. Yang, Y., Ju, A., Xu, X., Cao, X. & Tao, Y. A novel type of cosavirus from children with nonpolio acute flaccid paralysis. *Virol. J.* 13, 169 (2016).
75. Yu, J.-M., Ao, Y.-Y., Li, L.-L. & Duan, Z.-J. Identification of a novel cosavirus species in faeces of children and its relationship with acute gastroenteritis in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 550–554 (2017).
76. Menage, L., Yodmeeklin, A., Khamrin, P., Kumthip, K. & Maneekarn, N. Prevalence of human cosavirus and saffold virus with an emergence of saffold virus genotype 6 in patients hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2014–2016. *Infect., Genet. Evol.* 53, 1–6 (2017).
77. Cristanziano, V. D., Weimer, K., Böttcher, S., Sarfo, F. S., Dompok, A., Cesar, L.-G., Knops, E., Heger, E., Wirtz, M., Kaiser, R., Norman, B., Phillips, R. O., Feldt, T. & Eberhardt, K. A. Molecular Characterization and Clinical Description of Non-Polio Enteroviruses Detected in Stool Samples from HIV-Positive and HIV-Negative Adults in Ghana. *Viruses* 12, 221 (2020).
78. Prevost, B., Lucas, F. S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L. & Wurtzer, S. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environ. Int.* 79, 42–50 (2015).
79. Moghaddam, F. S., Ghaderi, M., Parsania, M., Mozhgani, S.-H. & Arjmand, R. First Human Cosavirus Detection From Cerebrospinal Fluid in Hospitalized Children With Aseptic Meningitis and Encephalitis in Iran. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 40, e459–e461 (2021).
80. Nix, W. A., Khetsuriani, N., Peñaranda, S., Maher, K., Venczel, L., Cselkó, Z., Freire, M. C., Cisterna, D., Lema, C. L., Rosales, P., Rodriguez, J. R., Rodriguez, W., Halkyer, P., Ronveaux, O., Pallansch, M. A. & Oberste, M. S. Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. *J. Gen. Virol.* 94, 2017–2028 (2013).

81. Okitsu, S., Khamrin, P., Hanaoka, N., Thongprachum, A., Takanashi, S., Fujimoto, T., Mizuguchi, M., Shimizu, H., Hayakawa, S., Maneekarn, N. & Ushijima, H. Cosavirus (family Picornaviridae) in pigs in Thailand and Japan. *Arch. Virol.* 161, 159–163 (2016).
82. Rust, R. S. Human Arboviral Encephalitis. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19, 130–151 (2012).
83. ICTV Genus Orthoflavivirus.
<https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>
84. Im, J., Baek, J.-H., Durey, A., Kwon, H., Chung, M.-H. & Lee, J.-S. Geographic distribution of Tick-borne encephalitis virus complex. *J. Vector Borne Dis.* 57, 14 (2020).
85. Kaiser, R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994–98A prospective study of 656 patients. *Brain* 122, 2067–2078 (1999).
86. Mantke, O. D., Vaheri, A., Ambrose, H., Koopmans, M., Ory, F. de, Zeller, H., Beyrer, K., Windorfer, A., Niedrig, M. & Diseases, E. N. for D. of I. V. D. (ENIVD) W. G. for V. C. Analysis of the surveillance situation for viral encephalitis and meningitis in Europe. *Eurosurveillance* 13, 7–8 (2008).
87. World Health Organization. Tick-borne encephalitis. https://www.who.int/health-topics/tick-borne-encephalitis#tab=tab_1
88. Robert Koch Institut. Schutzimpfung gegen FSME (Früh-sommer-Meningo-enzephalitis).
<https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/ImpfungenAZ/FSME/FSME.html>
89. Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., Briese, T., Buchmeier, M. J., Calisher, C. H., Charrel, R. N., Choi, I. R., Clegg, C. S., Torre, J. C. de la, Delwart, E., DeRisi, J. L., Bello, P. L. D., Serio, F. D., Digiaro, M., Dolja, V. V., Drosten, C., Druciarek, T. Z., Du, J., Ebihara, H., Elbeaino, T., Gergerich, R. C., Gillis, A. N., Gonzalez, J.-P. J., Haenni, A.-L., Hepojoki, J., Hetzel, U., Hò, T., Hóng, N., Jain, R. K., Vuren, P. J. van, Jin, Q., Jonson, M. G., Junglen, S., Keller, K. E., Kemp, A., Kipar, A., Kondov, N. O., Koonin, E. V., Kormelink, R., Korzyukov, Y., Krupovic, M., Lambert, A. J., Laney, A. G., LeBreton, M., Lukashevich, I. S., Marklewitz, M., Markotter, W., Martelli, G. P., Martin, R. R., Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H.-P., Navarro, B., Ng, T. F. F., Nunes, M. R. T., Palacios, G., Pawęska, J. T., Peters, C. J., Plyusnin, A., Radoshitzky, S. R., Romanowski, V., Salmenperä, P., Salvato, M. S., Sanfaçon, H., Sasaya, T., Schmaljohn, C., Schneider, B. S., Shirako, Y., Siddell, S., Sironen, T. A., Stenglein, M. D., Storm, N., Sudini, H., Tesh, R. B., Tzanetakis, I. E., Uppala, M., Vapalahti, O., Vasilakis, N., Walker, P. J., Wáng, G., Wáng, L., Wáng, Y., Wèi, T., Wiley, M. R., Wolf, Y. I., Wolfe, N. D., Wú, Z., Xú, W., Yang, L., Yāng, Z., Yeh, S.-D., Zhāng, Y.-Z., Zhèng, Y., Zhou, X., Zhū, C., Zirkel, F. & Kuhn, J. H. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch. Virol.* 163, 2295–2310 (2018).
90. Maia, C., Ayhan, N., Cristóvão, J. M., Pereira, A. & Charrel, R. Human seroprevalence of Toscana virus and Sicilian phlebovirus in the southwest of Portugal. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 137–141 (2022).
91. Martínez, J., García, S., Walter, S., Prieto, R. G., Lacomba, D., Marín-García, P., Gil-de-Miguel, Á. & González-Escalada, A. Seroprevalence against toscana virus in Spain: The case of the autonomous community of Madrid. *J. Vector Borne Dis.* 0, 0 (2022).

92. Benbetka, C., Hachid, A., Benallal, K. E., Khardine, F. A., Ayhan, N., Bouredjoul, N., Boulehal, W. M., Bellila, D., Khaldi, A. & Charrel, R. Epidemiology, Isolation, and Genetic Characterization of Toscana Virus in Algerian Patients Displaying Neurological Infection, 2016–2018. *IJID Reg.* 7, 193–198 (2023).
93. Alwassouf, S., Christodoulou, V., Bichaud, L., Ntais, P., Mazeris, A., Antoniou, M. & Charrel, R. N. Seroprevalence of Sandfly-Borne Phleboviruses Belonging to Three Serocomplexes (Sandfly fever Naples, Sandfly fever Sicilian and Salehabad) in Dogs from Greece and Cyprus Using Neutralization Test. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 10, e0005063 (2016).
94. Ayhan, N., Alten, B., Ivovic, V., Martinkovic, F., Kasap, O. E., Ozbel, Y., Lamballerie, X. de & Charrel, R. N. Cocirculation of Two Lineages of Toscana Virus in Croatia. *Front. Public Heal.* 5, 336 (2017).
95. Özbel, Y., Oğuz, G., Arserim, S. K., Kasap, Ö. E., Karaoglu, B., Yilmaz, A., Emanet, N., Günay, F., Hacıoğlu, S., Demirok, M. C., Töz, S., Alten, B., Nalçacı, M., Özkul, A. & Ergünay, K. The initial detection of Toscana virus in phlebotomine sandflies from Turkey. *Méd. Vet. Entomol.* 34, 402–410 (2020).
96. Saadawi, W., Abozaid, F., Almukhtar, M., Annajar, B. & Shaibi, T. Seroprevalence study of Toscana virus in Yafran area, Libya. *J. Vector Borne Dis.* 0, 0 (2022).
97. Ayhan, N. & Charrel, R. N. An update on Toscana virus distribution, genetics, medical and diagnostic aspects. *Clin Microbiol Infect* 26, 1017–1023 (2020).
98. Punda-Polić, V., Jerončić, A., Mohar, B. & Kraljević, K. Š. Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of Croatia. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E200–E203 (2012).
99. Valassina, M., Meacci, F., Valensin, P. E. & Cusi, M. G. Detection of neurotropic viruses circulating in Tuscany: The incisive role of Toscana virus. *J. Méd. Virol.* 60, 86–90 (2000).
100. Renzi, A., Caciolli, S., Nicoletti, L., Bartolozzi, D., Balducci, M., Traini, E., Leoncini, F., Baldereschi, M., Paci, P., Padovani, P., Ciufolini, M. G. & Verani, P. Central Nervous System Involvement during Infection by Phlebovirus Toscana of Residents in Natural Foci in Central Italy (1977–1988). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 429–434 (1991).
101. Braitto, A., Corbisiero, R., Corradini, S., Marchi, B., Sancasciani, N., Fiorentini, C. & Ciufolini, M. G. Evidence of Toscana virus infections without central nervous system involvement: A serological study. *Eur. J. Epidemiology* 13, 761–764 (1997).
102. Oerther, S., Jöst, H., Heitmann, A., Lühken, R., Krüger, A., Steinhausen, I., Brinker, C., Lorentz, S., Marx, M., Schmidt-Chanasit, J., Naucke, T. & Becker, N. Phlebotomine sand flies in Southwest Germany: an update with records in new locations. *Parasites Vectors* 13, 173 (2020).
103. Dersch, R., Sophocleous, A., Cadar, D., Emmerich, P., Schmidt-Chanasit, J. & Rauer, S. Toscana virus encephalitis in Southwest Germany: a retrospective study. *Bmc Neurol* 21, 495 (2021).
104. World Health Organization. Hepatitis E. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>.

- 105.** Smith, D. B., Izopet, J., Nicot, F., Simmonds, P., Jameel, S., Meng, X.-J., Norder, H., Okamoto, H., Poel, W. H. M. van der, Reuter, G. & Purdy, M. A. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J Gen Virol* 101, 692–698 (2020).
- 106.** Klink, P., Harms, D., Altmann, B., Dörffel, Y., Morgera, U., Zander, S., Bock, C. T. & Hofmann, J. Molecular characterisation of a rabbit Hepatitis E Virus strain detected in a chronically HEV-infected individual from Germany. *One Heal.* 16, 100528 (2023).
- 107.** Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Kawakami, M., Sonoda, Y., Suzuki, T., Yamamoto, S., Shigemoto, K., Ashida, K., Sato, Y. & Okamoto, H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* 180, 59–69 (2014).
- 108.** Corman, V. M., Hilgensloh, L., Voigt, U., Marklewitz, M., Siebert, U., Drosten, C. & Drexler, J. F. Hepatitis E Virus Infection in European Brown Hares, Germany, 2007-2014. *Emerg Infect Dis* 25, 1233–1235 (2019).
- 109.** Santos-Silva, S., López-López, P., Gonçalves, H. M. R., Rivero-Juarez, A., Poel, W. H. M. V. der, Nascimento, M. S. J. & Mesquita, J. R. A Systematic Review and Meta-Analysis on Hepatitis E Virus Detection in Farmed Ruminants. *Pathogens* 12, 550 (2023).
- 110.** Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y. M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J., Bai, R., Wernery, R., Wernery, U. & Yuen, K.-Y. New Hepatitis E Virus Genotype in Camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis* 20, 1044–1048 (2014).
- 111.** Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Cao, K.-Y., Wernery, U., Schountz, T., Chiu, T. H., Tsang, A. K. L., Wong, P.-C., Wong, E. Y. M. & Yuen, K.-Y. New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis* 22, 2219–2221 (2016).
- 112.** Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R. G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P. & Hofmann, J. An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. *J. Viral Hepat.* 21, 447–456 (2014).
- 113.** Nguyen, H. T., Torian, U., Faulk, K., Mather, K., Engle, R. E., Thompson, E., Bonkovsky, H. L. & Emerson, S. U. A naturally occurring human/hepatitis E recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. *J. Gen. Virol.* 93, 526–530 (2012).
- 114.** Ankavay, M., Montpellier, C., Sayed, I. M., Saliou, J.-M., Wychowski, C., Saas, L., Duvet, S., Aliouat-Denis, C.-M., Farhat, R., d’Autume, V. de M., Meuleman, P., Dubuisson, J. & Cocquerel, L. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci. Rep.* 9, 6243 (2019).
- 115.** Takahashi, M., Yamada, K., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Tanaka, T. & Okamoto, H. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus

- (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch. Virol.* 153, 1703 (2008).
- 116.** Huzly, D., Umhau, M., Bettinger, D., Cathomen, T., Emmerich, F., Hasselblatt, P., Hengel, H., Herzog, R., Kappert, O., Maassen, S., Schorb, E., Schulz-Huotari, C., Thimme, R., Unmüssig, R., Wenzel, J. J. & Panning, M. Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Eurosurveillance* 19, (2014).
- 117.** Schemmerer, M., Wenzel, J. J., Stark, K. & Faber, M. Molecular epidemiology and genotype-specific disease severity of hepatitis E virus infections in Germany, 2010–2019. *Emerg. Microbes Infect.* 11, 1754–1763 (2022).
- 118.** Fritz-Weltin, M., Isenmann, N., Frommherz, E., Niedermeier, L., Csernalabics, B., Boettler, T., Neumann-Haefelin, C., Endres, D., Panning, M. & Berger, B. Acute CNS infections – Expanding the spectrum of neurological manifestations of hepatitis E virus? *J Neurol Sci* 423, 117387 (2021).
- 119.** Abravanel, F., Pique, J., Couturier, E., Nicot, F., Dimeglio, C., Lhomme, S., Chiabrando, J., Saune, K., Péron, J.-M., Kamar, N., Evrard, S., Valk, H. de, Cintas, P., Izopet, J. & group, H. study. Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *J. Infect.* 77, 220–226 (2018).
- 120.** Rahmig, J., Grey, A., Berning, M., Schaefer, J., Lesser, M., Reichmann, H., Puetz, V., Barlinn, K. & Siepmann, T. Disseminated inflammation of the central nervous system associated with acute hepatitis E: a case report. *Bmc Neurol* 20, 391 (2020).
- 121.** Jha, A. K., Kumar, G., Dayal, V. M., Ranjan, A. & Suchismita, A. Neurological manifestations of hepatitis E virus infection: An overview. *World J. Gastroenterol.* 27, 2090–2104 (2021).
- 122.** Kamar, N., Janick, S., Jean-Michel, M., Leila, O., Jean-Marie, P., Joëlle, G., Olivier, C., Laure, E., Florence, A., Marie, D., Dominique, D., Jean-Pierre, V., Jacques, I. & Lionel, R. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *New Engl J Med* 358, 811–817 (2008).
- 123.** Todt, D., Gisa, A., Radonic, A., Nitsche, A., Behrendt, P., Suneetha, P. V., Pischke, S., Bremer, B., Brown, R. J. P., Manns, M. P., Cornberg, M., Bock, C. T., Steinmann, E. & Wedemeyer, H. In vivo evidence for ribavirin-induced mutagenesis of the hepatitis E virus genome. *Gut* 65, 1733–1743 (2016).
- 124.** Todt, D., Meister, T. L. & Steinmann, E. Hepatitis E virus treatment and ribavirin therapy: viral mechanisms of nonresponse. *Curr Opin Virol* 32, 80–87 (2018).
- 125.** Ciota, A. T. West Nile virus and its vectors. *Curr. Opin. Insect Sci.* 22, 28–36 (2017).
- 126.** Jourdain, E., Toussaint, Y., Leblond, A., Bicout, D. J., Sabatier, P. & Gauthier-Clerc, M. Bird Species Potentially Involved in Introduction, Amplification, And Spread of West Nile Virus in A Mediterranean Wetland, The Camargue (Southern France). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 15–33 (2007).
- 127.** Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O’Leary, D. R. & Campbell, G. L. *Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease - Volume 11, Number*

- 8-August 2005 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1167–1173 (2005).
- 128.** Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W. & Paul, J. H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* s1-20, 471–492 (1940).
- 129.** May, F. J., Davis, C. T., Tesh, R. B. & Barrett, A. D. T. Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* 85, 2964–2974 (2011).
- 130.** Ciota, A. T. & Kramer, L. D. Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus. *Viruses* 5, 3021–3047 (2013).
- 131.** Sejvar, J. J. West nile virus: an historical overview. *Ochsner J.* 5, 6–10 (2003).
- 132.** Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E. & Rios, M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Res Int* 2015, 376230 (2015).
- 133.** European Centre for Disease Prevention and Control. WNV Historical data by year. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical>
- 134.** Hernández-Triana, L. M., Jeffries, C. L., Mansfield, K. L., Carnell, G., Fooks, A. R. & Johnson, N. Emergence of West Nile Virus Lineage 2 in Europe: A Review on the Introduction and Spread of a Mosquito-Borne Disease. *Front. Public Heal.* 2, 271 (2014).
- 135.** Camp, J. V. & Nowotny, N. The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak? *Expert Rev Anti-infe* 18, 1–10 (2020).
- 136.** Kampen, H., Holicki, C. M., Ziegler, U., Groschup, M. H., Tews, B. A. & Werner, D. West Nile Virus Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) in Germany. *Viruses* 12, 493 (2020).
- 137.** Pietsch, C., Michalski, D., Münch, J., Petros, S., Bergs, S., Trawinski, H., Lübbert, C. & Liebert, U. G. Autochthonous West Nile virus infection outbreak in humans, Leipzig, Germany, August to September 2020. *Eurosurveillance* 25, 2001786 (2020).
- 138.** Ziegler, U., Santos, P. D., Groschup, M. H., Hattendorf, C., Eiden, M., Höper, D., Eisermann, P., Keller, M., Michel, F., Klopffleisch, R., Müller, K., Werner, D., Kampen, H., Beer, M., Frank, C., Lachmann, R., Tews, B. A., Wylezich, C., Rinder, M., Lachmann, L., Grünewald, T., Szentiks, C. A., Sieg, M., Schmidt-Chanasit, J., Cadar, D. & Lühken, R. West Nile Virus Epidemic in Germany Triggered by Epizootic Emergence, 2019. *Viruses* 12, 448 (2020).
- 139.** Ziegler, U., Bergmann, F., Fischer, D., Müller, K., Holicki, C. M., Sadeghi, B., Sieg, M., Keller, M., Schwehn, R., Reuschel, M., Fischer, L., Krone, O., Rinder, M., Schütte, K., Schmidt, V., Eiden, M., Fast, C., Günther, A., Globig, A., Conraths, F. J., Staubach, C., Brandes, F., Lierz, M., Korbelt, R., Vahlenkamp, T. W. & Groschup, M. H. Spread of West Nile Virus and Usutu Virus in the German Bird Population, 2019–2020. *Microorg* 10, 807 (2022).
- 140.** Yeung, M. W., Shing, E., Nelder, M. & Sander, B. Epidemiologic and clinical parameters of West Nile virus infections in humans: a scoping review. *BMC Infect. Dis.* 17, 609 (2017).
- 141.** Petersen, L. R., Brault, A. C. & Nasci, R. S. West Nile Virus: Review of the Literature. *JAMA* 310, 308–315 (2013).
- 142.** Robert Koch Institut. West Nil Virus. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/W/WestNilFieber/West-Nil-Fieber_Ueberblick.html

- 143.** Paul-Ehrlich-Institut. Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln-Anordnung von Maßnahmen, die das Risiko der Übertragung einer in Deutschland erworbenen West-Nil-Virus (WNV)-Infektion durch Blutkomponenten zur Transfusion (zelluläre Blutzubereitungen und therapeutische Frischplasmen) und durch Stammzellzubereitungen zur hämatopoetischen Rekonstitution minimieren können - Vom 18. März 2020. at <https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/newsroom/bundesanzeiger/veroeffentlichungen/2020/banz-at-04-06-2020-b6.html>
- 144.** Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Leary, T. P., Dawson, G. J., Desai, S. M., Schlauder, G. G., Muerhoff, A. S., Erker, J. C., Buijk, S. L. & Chalmers, M. L. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc National Acad Sci* 92, 3401–3405 (1995).
- 145.** Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Pilot-Matias, T. J., Dawson, G. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 69, 5621–5630 (1995).
- 146.** Adams, N. J., Prescott, L. E., Jarvis, L. M., Lewis, J. C., McClure, M. O., Smith, D. B. & Simmonds, P. Detection in chimpanzees of a novel flavivirus related to GB virus-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol* 79, 1871–1877 (1998).
- 147.** Sibley, S. D., Lauck, M., Bailey, A. L., Hyeroba, D., Tumukunde, A., Weny, G., Chapman, C. A., O'Connor, D. H., Goldberg, T. L. & Friedrich, T. C. Discovery and Characterization of Distinct Simian Pegiviruses in Three Wild African Old World Monkey Species. *Plos One* 9, e98569 (2014).
- 148.** Quan, P.-L., Firth, C., Conte, J. M., Williams, S. H., Zambrana-Torrel, C. M., Anthony, S. J., Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Kuzmin, I. V., Niezgod, M., Osinubi, M. O. V., Recuenco, S., Markotter, W., Breiman, R. F., Kalemba, L., Malekani, J., Lindblade, K. A., Rostal, M. K., Ojeda-Flores, R., Suzan, G., Davis, L. B., Blau, D. M., Ogunkoya, A. B., Castillo, D. A. A., Moran, D., Ngam, S., Akaibe, D., Agwanda, B., Briese, T., Epstein, J. H., Daszak, P., Rupprecht, C. E., Holmes, E. C. & Lipkin, W. I. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc National Acad Sci* 110, 8194–8199 (2013).
- 149.** Kapoor, A., Simmonds, P., Cullen, J. M., Scheel, T. K. H., Medina, J. L., Giannitti, F., Nishiuchi, E., Brock, K. V., Burbelo, P. D., Rice, C. M. & Lipkin, W. I. Identification of a Pegivirus (GB Virus-Like Virus) That Infects Horses. *J Virol* 87, 7185–7190 (2013).
- 150.** Chandriani, S., Skewes-Cox, P., Zhong, W., Ganem, D. E., Divers, T. J., Blaricum, A. J. V., Tennant, B. C. & Kistler, A. L. Identification of a previously undescribed divergent virus from the Flaviviridae family in an outbreak of equine serum hepatitis. *Proc National Acad Sci* 110, E1407–E1415 (2013).
- 151.** Epstein, J. H., Quan, P.-L., Briese, T., Street, C., Jabado, O., Conlan, S., Khan, S. A., Verdugo, D., Hossain, M. J., Hutchison, S. K., Egholm, M., Luby, S. P., Daszak, P. & Lipkin, W. I. Identification of GBV-D, a Novel GB-like Flavivirus from Old World Frugivorous Bats (*Pteropus giganteus*) in Bangladesh. *Plos Pathog* 6, e1000972 (2010).

- 152.** Kapoor, A., Simmonds, P., Scheel, T. K. H., Hjelle, B., Cullen, J. M., Burbelo, P. D., Chauhan, L. V., Duraisamy, R., Leon, M. S., Jain, K., Vandegrift, K. J., Calisher, C. H., Rice, C. M. & Lipkin, W. I. Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. *Mbio* 4, e00216-13 (2013).
- 153.** Baechlein, C., Grundhoff, A., Fischer, N., Alawi, M., Hoeltig, D., Waldmann, K.-H. & Becher, P. Pegivirus Infection in Domestic Pigs, Germany - Volume 22, Number 7-July 2016 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg Infect Dis* 22, 1312–1314 (2016).
- 154.** Muerhoff, A. S., Smith, D. B., Leary, T. P., Erker, J. C., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'-untranslated and coding region sequences. *J Virol* 71, 6501–6508 (1997).
- 155.** Tucker, T. J. & Smuts, H. E. GBV-C/HGV genotypes: Proposed nomenclature for genotypes 1–5. *J. Med. Virol.* 62, 82–83 (2000).
- 156.** Feng, Y., Zhao, W., Feng, Y., Dai, J., Li, Z., Zhang, X., Liu, L., Bai, J., Zhang, H., Lu, L. & Xia, X. A Novel Genotype of GB Virus C: Its Identification and Predominance among Injecting Drug Users in Yunnan, China. *Plos One* 6, e21151 (2011).
- 157.** Anggorowati, N., Yano, Y., Subronto, Y. W., Utsumi, T., Heriyanto, D. S., Mulya, D. P., Rinonce, H. T., Widasari, D. I., Lusida, M. I., Soetjipto & Hayashi, Y. GB virus C infection in Indonesian HIV-positive patients. *Microbiol. Immunol.* 57, 298–308 (2013).
- 158.** Muerhoff, A. S., Simons, J. N., Leary, T. P., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J., Dawson, G. J., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol* 25, 379–384 (1996).
- 159.** Kapoor, A., Kumar, A., Simmonds, P., Bhuvu, N., Chauhan, L. S., Lee, B., Sall, A. A., Jin, Z., Morse, S. S., Shaz, B., Burbelo, P. D. & Lipkin, W. I. Virome Analysis of Transfusion Recipients Reveals a Novel Human Virus That Shares Genomic Features with Hepaciviruses and Pegiviruses. *Mbio* 6, e01466-15 (2015).
- 160.** Scallan, M. F., Clutterbuck, D., Jarvis, L. M., Scott, G. R. & Simmonds, P. Sexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus. *J. Med. Virol.* 55, 203–208 (1998).
- 161.** Bhattarai, N. & Stapleton, J. T. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol* 20, 124–130 (2012).
- 162.** Tanaka, E., Kiyosawa, K., Shimoda, K., Hino, K., Tacke, M., Schmolke, S., Engel, A. M. & Hess, G. Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J Viral Hepatitis* 5, 153–159 (1998).
- 163.** Gutierrez, R. A., Dawson, G. J., Knigge, M. F., Melvin, S. L., Heynen, C. A., Kyrk, C. R., Young, C. E., Carrick, R. J., Schlauder, G. G., Surowy, T. K., Dille, B. J., Coleman, P. F., Thiele, D. L., Lentino, J. R., Pachucki, C. & Mushahwar, I. K. Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *J. Med. Virol.* 53, 167–173 (1997).

- 164.** Chang, C. M., Stapleton, J. T., Klinzman, D., McLinden, J. H., Purdue, M. P., Katki, H. A. & Engels, E. A. GBV-C Infection and Risk of NHL among U.S. Adults. *Cancer Res* 74, 5553–5560 (2014).
- 165.** Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie) Gesamtnovelle 2017. Preprint at <https://www.bundesaerztekammer.de/themen/medizin-und-ethik/wissenschaftlicher-beirat/stellungnahmen-richtlinien-jahresberichte/haemotherapie-transfusionsmedizin/richtlinie-zur-gewinnung-von-blut-und-blutbestandteilen-und-zur-anwendung-von-blutprodukten-richtlinie-haemotherapie> (2017)
- 166.** Balcom, E. F., Doan, M. A. L., Branton, W. G., Jovel, J., Blevins, G., Edguer, B., Hobman, T. C., Yacyshyn, E., Emery, D., Box, A., Landeghem, F. K. H. van & Power, C. Human pegivirus-1 associated leukoencephalitis: Clinical and molecular features. *Ann Neurol* 84, 781–787 (2018).
- 167.** Bukowska-Oško, I., Perlejewski, K., Pawełczyk, A., Rydzanicz, M., Pollak, A., Popiel, M., Cortés, K. C., Paciorek, M., Horban, A., Dzieciatkowski, T., Radkowski, M. & Laskus, T. Human Pegivirus in Patients with Encephalitis of Unclear Etiology, Poland. *Emerg Infect Dis* 24, 1785–1794 (2018).
- 168.** Fridholm, H., Sørensen, L. Ø., Rosenstjerne, M. W., Nielsen, H., Sellebjerg, F., Andersen, Å. B. & Fomsgaard, A. Human pegivirus detected in a patient with severe encephalitis using a metagenomic pan-virus array. *J Clin Virol* 77, 5–8 (2016).
- 169.** Hardie, D. & Smuts, H. Human pegivirus-1 in the CSF of patients with HIV-associated neurocognitive disorder (HAND) may be derived from blood in highly viraemic patients. *J Clin Virol* 91, 58–61 (2017).
- 170.** Li, C.-X., Burrell, R., Dale, R. C., Kesson, A., Blyth, C. C., Clark, J. E., Crawford, N., Jones, C. A., Britton, P. N. & Holmes, E. C. Diagnosis and analysis of unexplained cases of childhood encephalitis in Australia using metagenomic next-generation sequencing. *Biorxiv* 2021.05.10.443367 (2021).
- 171.** Liu, Z., Zhang, Y., Wei, F., Xu, M., Mou, D., Zhang, T., Li, W., Chen, D. & Wu, H. Detection of GB virus C genomic sequence in the cerebrospinal fluid of a HIV-infected patient in China: a case report and literature review. *Epidemiol Infect* 144, 106–112 (2016).
- 172.** Tuddenham, R., Eden, J.-S., Gilbey, T., Dwyer, D. E., Jennings, Z., Holmes, E. C. & Branley, J. M. Human Pegivirus in brain tissue of a patient with encephalitis. *Diagn Microb Infect Dis* 96, 114898 (2019).
- 173.** Kobayashi, M., Tanaka, E., Nakayama, J., Furuwatari, C., Katsuyama, T., Kawasaki, S. & Kiyosawa, K. Detection of GB virus-C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J. Med. Virol.* 57, 114–121 (1999).
- 174.** Tucker, T. J., Smuts, H. E., Eedes, C., Knobel, G. D., Eickhaus, P., Robson, S. C. & Kirsch, R. E. Evidence that the GBV-C/hepatitis G virus is primarily a lymphotropic virus. *J. Med. Virol.* 61, 52–8 (2000).

- 175.** Bailey, A. L., Lauck, M., Mohns, M., Peterson, E. J., Beheler, K., Brunner, K. G., Crosno, K., Mejia, A., Mutschler, J., Gehrke, M., Greene, J., Ericson, A. J., Weiler, A., Lehrer-Brey, G., Friedrich, T. C., Sibley, S. D., Kallas, E. G., III, S. C., Rogers, J., Goldberg, T. L., Simmons, H. A. & O'Connor, D. H. Durable sequence stability and bone marrow tropism in a macaque model of human pegivirus infection. *Sci Transl Med* 7, 305ra144 (2015).
- 176.** Wan, Z., Liu, J., Hu, F., Shui, J., Li, L., Wang, H., Tang, X., Hu, C., Liang, Y., Zhou, Y., Cai, W. & Tang, S. Evidence that the second human pegivirus (HPgV-2) is primarily a lymphotropic virus and can replicate independent of HCV replication. *Emerg Microbes Infect* 9, 485–495 (2020).
- 177.** Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738 (1953).
- 178.** Consortium, I. H. G. S., Research, W. I. for B. R., Center for Genome, Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Centre, T. S., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Showkeen, R., Sims, S., Center, W. U. G. S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Institute, U. D. J. G., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.-F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Center, B. C. of M. H. G. S., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Center, R. G. S., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., UMR-8030, G. and C., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Biotechnology, D. of G. A., Institute of Molecular, Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Center, G. S., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Center, B. G. I. G., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Biology, M. S. C., The Institute for Systems, Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Center, S. G. T., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Technology, U. of O. A. C. for G., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Genetics, M. P. I. for M., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., Center, C. S. H. L., Lita Annenberg Hazen Genome, McCombie, W. R., Bastide, M. de la,

- Dedhia, N., Biotechnology: G. R. C. for, Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H.-C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G. R., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F. A., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S.-P., Yeh, R.-F., Health: S. management: N. H. G. R. I., US National Institutes of, Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Center: S. H. G., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Center: U. of W. G., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Medicine: D. of M. B., Keio University School of, Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Dallas: U. of T. S. M. C. at, Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Energy: O. of S., US Department of, Patrinos, A., Trust: T. W. & Morgan, M. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921 (2001).
- 179.** Whole Genome Sequencing Veritas. <https://www.prnewswire.com/news-releases/veritas-genetics-launches-999-whole-genome-and-sets-new-standard-for-genetic-testing-300230258.html>
- 180.** Sequencing the Human Genome. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
- 181.** Mardis, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 9, 387–402 (2008).
- 182.** Adriaenssens, E. M., Roux, S., Brister, J. R., Karsch-Mizrachi, I., Kuhn, J. H., Varsani, A., Yigang, T., Reyes, A., Lood, C., Lefkowitz, E. J., Sullivan, M. B., Edwards, R. A., Simmonds, P., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Krupovic, M. & Dutilh, B. E. Guidelines for public database submission of uncultivated virus genome sequences for taxonomic classification. *Nat. Biotechnol.* 41, 898–902 (2023).
- 183.** Datta, S., Budhaliya, R., Das, B., Chatterjee, S., Vanlalhmua & Veer, V. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. *World J. Virol.* 4, 265 (2015).
- 184.** Illumina. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Preprint at https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- 185.** Oxford Nanopore Technologies - History. <https://nanoporetech.com/about-us/history>
- 186.** Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., Cowley, L., Bore, J. A., Koundouno, R., Dudas, G., Mikhail, A., Ouédraogo, N., Afrough, B., Bah, A., Baum, J. H. J., Becker-Ziaja, B., Boettcher, J. P., Cabeza-Cabrerizo, M., Camino-Sánchez, Á., Carter, L. L., Doerrbecker, J., Enkirch, T., Dorival, I. G., Hetzelt, N., Hinzmann, J., Holm, T., Kafetzopoulou, L. E., Koropogui, M., Kosgey, A., Kuisma, E., Logue, C. H., Mazzarelli, A.,

- Meisel, S., Mertens, M., Michel, J., Ngabo, D., Nitzsche, K., Pallasch, E., Patrono, L. V., Portmann, J., Repits, J. G., Rickett, N. Y., Sachse, A., Singethan, K., Vitoriano, I., Yemanaberhan, R. L., Zekeng, E. G., Racine, T., Bello, A., Sall, A. A., Faye, O., Faye, O., Magassouba, N., Williams, C. V., Amburgey, V., Winona, L., Davis, E., Gerlach, J., Washington, F., Monteil, V., Jourdain, M., Bererd, M., Camara, A., Somlare, H., Camara, A., Gerard, M., Bado, G., Baillet, B., Delaune, D., Nebie, K. Y., Diarra, A., Savane, Y., Pallawo, R. B., Gutierrez, G. J., Milhano, N., Roger, I., Williams, C. J., Yattara, F., Lewandowski, K., Taylor, J., Rachwal, P., Turner, D. J., Pollakis, G., Hiscox, J. A., Matthews, D. A., Shea, M. K. O., Johnston, A. McD., Wilson, D., Hutley, E., Smit, E., Caro, A. D., Wölfel, R., Stoecker, K., Fleischmann, E., Gabriel, M., Weller, S. A., Koivogui, L., Diallo, B., Keïta, S., Rambaut, A., Formenty, P., Günther, S. & Carroll, M. W. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530, 228–232 (2016).
- 187.** Bruncker, K., Jaswant, G., Thumbi, S. M., Lushasi, K., Lugelo, A., Czupryna, A. M., Ade, F., Wambura, G., Chuchu, V., Steenson, R., Ngeleja, C., Bautista, C., Manalo, D. L., Gomez, Ma. R. R., Chu, M. Y. J. V., Miranda, M. E., Kamat, M., Rysava, K., Espineda, J., Silo, E. A. V., Aringo, A. M., Bernales, R. P., Adonay, F. F., Tildesley, M. J., Marston, D. A., Jennings, D. L., Fooks, A. R., Zhu, W., Meredith, L. W., Hill, S. C., Poplawski, R., Gifford, R. J., Singer, J. B., Maturi, M., Mwatondo, A., Biek, R. & Hampson, K. Rapid in-country sequencing of whole virus genomes to inform rabies elimination programmes. *Wellcome Open Res.* 5, 3 (2020).
- 188.** Wasswa, F. B., Kassaza, K., Nielsen, K. & Bazira, J. MinION Whole-Genome Sequencing in Resource-Limited Settings: Challenges and Opportunities. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 9, 52–59 (2022).
- 189.** Johnson, S. S., Zaikova, E., Goerlitz, D. S., Bai, Y. & Tighe, S. W. Real-Time DNA Sequencing in the Antarctic Dry Valleys Using the Oxford Nanopore Sequencer. *J. Biomol. Tech. : JBT* 28, 2–7 (2017).
- 190.** Payne, A., Holmes, N., Rakyan, V. & Loose, M. BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics* 35, 2193–2198 (2019).
- 191.** Munro, R., Santos, R., Payne, A., Forey, T., Osei, S., Holmes, N. & Loose, M. minoTour, real-time monitoring and analysis for nanopore sequencers. *Bioinformatics* 38, 1133–1135 (2021).
- 192.** Technologies, O. N. Oxford Nanopore Store. <https://store.nanoporetech.com/eu/>
- 193.** Mikheyev, A. S. & Tin, M. M. Y. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 1097–1102 (2014).
- 194.** Sahlin, K., Sipos, B., James, P. L. & Medvedev, P. Error correction enables use of Oxford Nanopore technology for reference-free transcriptome analysis. *Nat. Commun.* 12, 2 (2021).
- 195.** Delahaye, C. & Nicolas, J. Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PLoS ONE* 16, e0257521 (2021).
- 196.** Zhang, R., Li, Z., Li, G., Tie, Y., Li, X., Gao, Y., Duan, Q., Wang, L., Zhao, L., Fan, G., Bai, X., Wang, R., Chen, Z., Wang, J., Wu, Y., Zhao, M., Feng, Z., Wang, J. & Ma, X. A highly

- sensitive one-tube nested quantitative real-time PCR assay for specific detection of *Bordetella pertussis* using the LNA technique. *Int. J. Infect. Dis.* 93, 224–230 (2020).
- 197.** Cheng, W. Y., Liu, W.-X., Ding, Y., Wang, G., Shi, Y., Chu, E. S. H., Wong, S., Sung, J. J. Y. & Yu, J. High Sensitivity of Shotgun Metagenomic Sequencing in Colon Tissue Biopsy by Host DNA Depletion. *Genom., Proteom. Bioinform.* (2022).
- 198.** Kazantseva, J., Malv, E., Kaleda, A., Kallastu, A. & Meikas, A. Optimisation of sample storage and DNA extraction for human gut microbiota studies. *BMC Microbiol.* 21, 158 (2021).
- 199.** Fomsgaard, A. S., Rasmussen, M., Spiess, K., Fomsgaard, A., Belsham, G. J. & Fonager, J. Improvements in metagenomic virus detection by simple pretreatment methods. *J. Clin. Virol. Plus* 2, 100120 (2022).
- 200.** Shiwa, Y., Baba, T., Sierra, M. A., Kim, J., Mason, C. E. & Suzuki, H. Evaluation of rRNA depletion methods for capturing the RNA virome from environmental surfaces. *BMC Res. Notes* 16, 142 (2023).
- 201.** Quick, J., Grubaugh, N. D., Pullan, S. T., Claro, I. M., Smith, A. D., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T. F., Beutler, N. A., Burton, D. R., Lewis-Ximenez, L. L., Jesus, J. G. de, Giovanetti, M., Hill, S. C., Black, A., Bedford, T., Carroll, M. W., Nunes, M., Alcantara, L. C., Sabino, E. C., Baylis, S. A., Faria, N. R., Loose, M., Simpson, J. T., Pybus, O. G., Andersen, K. G. & Loman, N. J. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.* 12, 1261–1276 (2017).
- 202.** Wylezich, C., Calvelage, S., Schlottau, K., Ziegler, U., Pohlmann, A., Höper, D. & Beer, M. Next-generation diagnostics: virus capture facilitates a sensitive viral diagnosis for epizootic and zoonotic pathogens including SARS-CoV-2. *Microbiome* 9, 51 (2020).
- 203.** O’Flaherty, B. M., Li, Y., Tao, Y., Paden, C. R., Queen, K., Zhang, J., Dinwiddie, D. L., Gross, S. M., Schroth, G. P. & Tong, S. Comprehensive viral enrichment enables sensitive respiratory virus genomic identification and analysis by next generation sequencing. *Genome Res.* 28, 869–877 (2018).
- 204.** Brown, J. R., Roy, S., Ruis, C., Romero, E. Y., Shah, D., Williams, R. & Breuer, J. Norovirus Whole-Genome Sequencing by SureSelect Target Enrichment: a Robust and Sensitive Method. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2530–2537 (2016).
- 205.** Singanallur, N. B., Anderson, D. E., Sessions, O. M., Kamaraj, U. S., Bowden, T. R., Horsington, J., Cowled, C., Wang, L.-F. & Vosloo, W. Probe capture enrichment next-generation sequencing of complete foot-and-mouth disease virus genomes in clinical samples. *J Virol Methods* 272, 113703 (2019).
- 206.** Wylie, T. N., Wylie, K. M., Herter, B. N. & Storch, G. A. Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture. *Genome Res.* 25, 1910–1920 (2015).
- 207.** Schilling-Loeffler, K., Viera-Segura, O., Corman, V. M., Schneider, J., Gadicherla, A. K., Schotte, U. & Johne, R. Cell Culture Isolation and Whole Genome Characterization of Hepatitis E Virus Strains from Wild Boars in Germany. *Microorg* 9, 2302 (2021).

- 208.** Duncavage, E. J., Magrini, V., Becker, N., Armstrong, J. R., Demeter, R. T., Wylie, T., Abel, H. J. & Pfeifer, J. D. Hybrid Capture and Next-Generation Sequencing Identify Viral Integration Sites from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *J. Mol. Diagn.* 13, 325–333 (2011).
- 209.** Consortium, V. H. F., Metsky, H. C., Siddle, K. J., Gladden-Young, A., Qu, J., Yang, D. K., Brehio, P., Goldfarb, A., Piantadosi, A., Wohl, S., Carter, A., Lin, A. E., Barnes, K. G., Tully, D. C., Corleis, B., Hennigan, S., Barbosa-Lima, G., Vieira, Y. R., Paul, L. M., Tan, A. L., Garcia, K. F., Parham, L. A., Oda, I., Eromon, P., Folarin, O. A., Goba, A., Simon-Lorière, E., Hensley, L., Balmaseda, A., Harris, E., Kwon, D. S., Allen, T. M., Runstadler, J. A., Smole, S., Bozza, F. A., Souza, T. M. L., Isern, S., Michael, S. F., Lorenzana, I., Gehrke, L., Bosch, I., Ebel, G., Grant, D. S., Happi, C. T., Park, D. J., Gnirke, A., Sabeti, P. C. & Matranga, C. B. Capturing sequence diversity in metagenomes with comprehensive and scalable probe design. *Nat Biotechnol* 37, 160–168 (2019).
- 210.** Briese, T., Kapoor, A., Mishra, N., Jain, K., Kumar, A., Jabado, O. J. & Lipkin, W. I. Virome Capture Sequencing Enables Sensitive Viral Diagnosis and Comprehensive Virome Analysis. *mBio* 6, e01491-15 (2015).
- 211.** Kibbe, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35, W43–W46 (2007).
- 212.** Jarvis, L., Davidson, F., Hanley, J., Yap, P., Ludlam, C. & Simmonds, P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 348, 1352–1355 (1996).
- 213.** Marklewitz, M., Dutari, L. C., Paraskevopoulou, S., Page, R. A., Loaiza, J. R. & Junglen, S. Diverse novel phleboviruses in sandflies from the Panama Canal area, Central Panama. *J Gen Virol* 100, 938–949 (2019).
- 214.** Silver, N., Best, S., Jiang, J. & Thein, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *Bmc Mol Biol* 7, 33 (2006).
- 215.** Kramski, M., Meisel, H., Klempa, B., Krüger, D. H., Pauli, G. & Nitsche, A. Detection and Typing of Human Pathogenic Hantaviruses by Real-Time Reverse Transcription-PCR and Pyrosequencing. *Clin Chem* 53, 1899–1905 (2007).
- 216.** Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J. & Hill, V. R. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65–71 (2006).
- 217.** MacKenzie, J., Wilson, K. S., Perry, J., Gallagher, A. & Jarrett, R. F. Association Between Simian Virus 40 DNA and Lymphoma in the United Kingdom. *Jnci J National Cancer Inst* 95, 1001–1003 (2003).
- 218.** Eiden, M., Vina-Rodriguez, A., Hoffmann, B., Ziegler, U. & Groschup, M. H. Two New Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays with Unique Target Sites for the Specific and Sensitive Detection of Lineages 1 and 2 West Nile Virus Strains. *J Vet Diagn Invest* 22, 748–753 (2010).
- 219.** Schubert, M., Lindgreen, S. & Orlando, L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Res. Notes* 9, 88 (2016).

-
- 220.** Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760 (2009).
- 221.** Buchfink, B., Reuter, K. & Drost, H.-G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nat. Methods* 18, 366–368 (2021).
- 222.** Magoč, T. & Salzberg, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963 (2011).
- 223.** Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772 (2012).
- 224.** Kluyver, T., Ragan-Kelley, B., Pérez, F., Granger, B., Bussonnier, M., Frederic, J., Kelley, K., Hamrick, J., Grout, J., Corlay, S., Ivanov, P., Avila, D., Abdalla, S., Willing, C. & team, J. development. Jupyter Notebooks – a publishing format for reproducible computational workflows. *Positioning and Power in Academic Publishing: Players, Agents and Agendas* IOS Press, 87–90 (2016).
- 225.** Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066 (2002).
- 226.** Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780 (2013).
- 227.** Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Comput. Sci. Eng.* 9, 90–95 (2007).
- 228.** Li, H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 34, 3094–3100 (2018).
- 229.** Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755 (2001).
- 230.** McKinney, W. Data structures for statistical computing in python. *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* 445, (2010).
- 231.** Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microb. Genom.* 3, e000132 (2017).
- 232.** Rossum, G. V. & Jr, F. L. D. Python 3 Reference Manual. (CreateSpace, 2009).
- 233.** Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A. & Muhire, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1, vev003 (2015).
- 234.** Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M. & Li, H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10, giab008 (2021).
- 235.** Waskom, M. seaborn: statistical data visualization. *J. Open Source Softw.* 6, 3021 (2021).
- 236.** Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. *J. Virol.* 73, 152–160 (1999).

- 237.** Yoo, A. B., Jette, M. A. & Grondona, M. Job Scheduling Strategies for Parallel Processing, 9th International Workshop, JSSPP 2003, Seattle, WA, USA, June 24, 2003. Revised Paper. *Lect. Notes Comput. Sci.* 44–60 (2003).
- 238.** Corman, V. M., Preusse, C., Melchert, J., Benveniste, O., Koll, R., Goebel, H.-H., Jones, T. C., Drosten, C., Schara-Schmidt, U., Leonard-Louis, S., Stenzel, W. & Radke, J. Deep RNA sequencing of muscle tissue reveals absence of viral signatures in dermatomyositis. *Free Neuropathol.* 5, (2023).
- 239.** Brister, J. R., Ako-adjei, D., Bao, Y. & Blinkova, O. NCBI Viral Genomes Resource. *Nucleic Acids Res.* 43, D571–D577 (2015).
- 240.** Käfer, S., Paraskevopoulou, S., Zirkel, F., Wieseke, N., Donath, A., Petersen, M., Jones, T. C., Liu, S., Zhou, X., Middendorf, M., Junglen, S., Misof, B. & Drosten, C. Re-assessing the diversity of negative strand RNA viruses in insects. *PLoS Pathog.* 15, e1008224 (2019).
- 241.** Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321 (2010).
- 242.** Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1641–1650 (2009).
- 243.** Petzold, A., Sharpe, L. T. & Keir, G. Spectrophotometry for cerebrospinal fluid pigment analysis. *Neurocritical Care* 4, 153–162 (2006).
- 244.** Reiber, H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) - A concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 122, 189–203 (1994).
- 245.** Erlwein, O., Robinson, M. J., Dustan, S., Weber, J., Kaye, S. & McClure, M. O. DNA Extraction Columns Contaminated with Murine Sequences. *Plos One* 6, e23484 (2011).
- 246.** Ali, M., Hameed, S. & Tahir, M. Luteovirus: insights into pathogenicity. *Arch Virol* 159, 2853–2860 (2014).
- 247.** Pettersson, J. H.-O., Shi, M., Bohlin, J., Eldholm, V., Brynildsrud, O. B., Paulsen, K. M., Andreassen, Å. & Holmes, E. C. Characterizing the virome of Ixodes ricinus ticks from northern Europe. *Sci Rep-uk* 7, 10870 (2017).
- 248.** Tschumi, F., Schmutz, S., Kufner, V., Heider, M., Pigny, F., Schreiner, B., Capaul, R., Achermann, Y. & Huber, M. Meningitis and epididymitis caused by Toscana virus infection imported to Switzerland diagnosed by metagenomic sequencing: a case report. *Bmc Infect Dis* 19, 591 (2019).
- 249.** Klempa, B., Avsic-Zupanc, T., Clement, J., Dzagurova, T. K., Henttonen, H., Heyman, P., Jakab, F., Kruger, D. H., Maes, P., Papa, A., Tkachenko, E. A., Ulrich, R. G., Vapalahti, O. & Vaheri, A. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics. *Arch. Virol.* 158, 521–529 (2013).
- 250.** Lee, S.-H., No, J. S., Kim, W.-K., Gajda, E., Perec-Matysiak, A., Kim, J.-A., Hildebrand, J., Yanagihara, R. & Song, J.-W. Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of

- Orthohantaviruses in Small Mammals in Western Poland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 103, 193–199 (2020).
- 251.** Ahlfen, S. von, Missel, A., Bendrat, K. & Schlumpberger, M. Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLoS ONE* 2, e1261 (2007).
- 252.** Baylis, S. A., O’Flaherty, N., Burke, L., Hogema, B. & Corman, V. M. Identification of rabbit hepatitis E virus (HEV) and novel HEV clade in Irish blood donors. *J Hepatol* (2022).
- 253.** Rasche, A., Saqib, M., Liljander, A. M., Bornstein, S., Zohaib, A., Renneker, S., Steinhagen, K., Wernery, R., Younan, M., Gluecks, I., Hilali, M., Musa, B. E., Jores, J., Wernery, U., Drexler, J. F., Drosten, C. & Corman, V. M. Hepatitis E Virus Infection in Dromedaries, North and East Africa, United Arab Emirates, and Pakistan, 1983–2015. *Emerg Infect Dis* 22, 1249–1252 (2016).
- 254.** Melchert, J., Radbruch, H., Hanitsch, L. G., Baylis, S. A., Beheim-Schwarzbach, J., Bleicker, T., Hofmann, J., Jones, T. C., Drosten, C. & Corman, V. M. Whole genome sequencing reveals insights into hepatitis E virus genome diversity, and virus compartmentalization in chronic hepatitis E. *J. Clin. Virol.* 168, 105583 (2023).
- 255.** Santos, P. D., Günther, A., Keller, M., Homeier-Bachmann, T., Groschup, M. H., Beer, M., Höper, D. & Ziegler, U. An advanced sequence clustering and designation workflow reveals the enzootic maintenance of a dominant West Nile virus subclade in Germany. *Biorxiv* 2022.10.05.509209 (2022).
- 256.** Cebriá-Mendoza, M., Bracho, M. A., Arbona, C., Larrea, L., Díaz, W., Sanjuán, R. & Cuevas, J. M. Exploring the Diversity of the Human Blood Virome. *Viruses* 13, 2322 (2021).
- 257.** Linnen, J., Jr., J. W., Zhang-Keck, Z.-Y., Fry, K. E., Krawczynski, K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J. W.-K., Young, L., Jr., M. P., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J.-C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Hess, G., Fong, S. K. H., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H. & Kim, J. P. Molecular Cloning and Disease Association of Hepatitis G Virus: A Transfusion-Transmissible Agent. *Science* 271, 505–508 (1996).
- 258.** Ghai, R. R., Sibley, S. D., Lauck, M., Dinis, J. M., Bailey, A. L., Chapman, C. A., Omeja, P., Friedrich, T. C., O’Connor, D. H. & Goldberg, T. L. Deep sequencing identifies two genotypes and high viral genetic diversity of human pegivirus (GB virus C) in rural Ugandan patients. *J. Gen. Virol.* 94, 2670–2678 (2013).
- 259.** Kupila, L., Vuorinen, T., Vainionpää, R., Hukkanen, V., Marttila, R. J. & Kotilainen, P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology* 66, 75–80 (2006).
- 260.** Whiley, D. M. & Sloots, T. P. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J. Clin. Virol.* 34, 104–107 (2005).
- 261.** Benjamin, L. A., Lewthwaite, P., Vasanthapuram, R., Zhao, G., Sharp, C. P., Simmonds, P., Wang, D. & Solomon, T. Human Parvovirus 4 as Potential Cause of Encephalitis in Children, India - Volume 17, Number 8—August 2011 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1484–1487 (2011).

- 262.** Kawada, J., Okuno, Y., Torii, Y., Okada, R., Hayano, S., Ando, S., Kamiya, Y., Kojima, S. & Ito, Y. Identification of Viruses in Cases of Pediatric Acute Encephalitis and Encephalopathy Using Next-Generation Sequencing. *Sci. Rep.* 6, 33452 (2016).
- 263.** Kupila, L., Vuorinen, T., Vainionpää, R., Marttila, R. J. & Kotilainen, P. Diagnosis of Enteroviral Meningitis by Use of Polymerase Chain Reaction of Cerebrospinal Fluid, Stool, and Serum Specimens. *Clin. Infect. Dis.* 40, 982–987 (2005).
- 264.** Brink, M., Welinder-Olsson, C. & Hagberg, L. Time window for positive cerebrospinal fluid broad-range bacterial PCR and *Streptococcus pneumoniae* immunochromatographic test in acute bacterial meningitis. *Infect. Dis.* 47, 869–877 (2015).
- 265.** Halfon, P., Khiri, H., Gerolami, V., Bourliere, M., Feryn, J. M., Reynier, P., Gauthier, A. & Cartouzou, G. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J. Hepatol.* 25, 307–311 (1996).
- 266.** Asplund, M., Kjartansdóttir, K. R., Mollerup, S., Vinner, L., Fridholm, H., Herrera, J. A. R., Friis-Nielsen, J., Hansen, T. A., Jensen, R. H., Nielsen, I. B., Richter, S. R., Rey-Iglesia, A., Matey-Hernandez, M. L., Alquezar-Planas, D. E., Olsen, P. V. S., Sicheritz-Pontén, T., Willerslev, E., Lund, O., Brunak, S., Mourier, T., Nielsen, L. P., Izarzugaza, J. M. G. & Hansen, A. J. Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: a linkage study of 700 sequencing libraries. *Clin Microbiol Infec* 25, 1277–1285 (2019).
- 267.** Lombardi, V. C., Ruscetti, F. W., Gupta, J. D., Pfof, M. A., Hagen, K. S., Peterson, D. L., Ruscetti, S. K., Bagni, R. K., Petrow-Sadowski, C., Gold, B., Dean, M., Silverman, R. H. & Mikovits, J. A. Detection of an Infectious Retrovirus, XMRV, in Blood Cells of Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Science* 326, 585–589 (2009).
- 268.** Lo, S.-C., Pripuzova, N., Li, B., Komaroff, A. L., Hung, G.-C., Wang, R. & Alter, H. J. Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15874–15879 (2010).
- 269.** Schlaberg, R., Choe, D. J., Brown, K. R., Thaker, H. M. & Singh, I. R. XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16351–16356 (2009).
- 270.** Naccache, S. N., Hackett, J., Delwart, E. L. & Chiu, C. Y. Concerns over the origin of NIH-CQV, a novel virus discovered in Chinese patients with seronegative hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E976–E976 (2014).
- 271.** Aswad, A., Aimola, G., Wight, D., Roychoudhury, P., Zimmermann, C., Hill, J., Lassner, D., Xie, H., Huang, M.-L., Parrish, N. F., Schultheiss, H.-P., Venturini, C., Lager, S., Smith, G. C. S., Charnock-Jones, D. S., Breuer, J., Greninger, A. L. & Kaufer, B. B. Evolutionary history of endogenous Human Herpesvirus 6 reflects human migration out of Africa. *Mol. Biol. Evol.* 38, msaa190- (2020).
- 272.** Feschotte, C. Bornavirus enters the genome. *Nature* 463, 39–40 (2010).
- 273.** Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O’Shiro, E. & Kieff, E. Persistence of the Entire Epstein-Barr Virus Genome Integrated into Human Lymphocyte DNA. *Science* 226, 1322–1325 (1984).

- 274.** Kennedy, G. & Sugden, B. EBNA-1, a Bifunctional Transcriptional Activator. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6901–6908 (2003).
- 275.** Rocchi, G. & Andreoni, G. Detection of polioviruses in human cerebrospinal fluid. *Arch. für die gesamte Virusforsch.* 25, 359–362 (1968).
- 276.** Pérez-Vélez, C. M., Anderson, M. S., Robinson, C. C., McFarland, E. J., Nix, W. A., Pallansch, M. A., Oberste, M. S. & Glodé, M. P. Outbreak of Neurologic Enterovirus Type 71 Disease: A Diagnostic Challenge. *Clin. Infect. Dis.* 45, 950–957 (2007).
- 277.** Luca, A. de, Cingolani, A., Linzalone, A., Ammassari, A., Murri, R., Giancola, M. L., Maiuro, G. & Antinori, A. Improved detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1343–1346 (1996).
- 278.** Cvjetković, I. H., Radovanov, J., Kovačević, G., Turkulov, V. & Patić, A. Diagnostic value of urine qRT-PCR for the diagnosis of West Nile virus neuroinvasive disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 107, 115920 (2023).
- 279.** Nayak, G., Bhuyan, S. K., Bhuyan, R., Sahu, A., Kar, D. & Kuanar, A. Global emergence of Enterovirus 71: a systematic review. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 11, 78 (2022).
- 280.** Beasley, D. W. C., Li, L., Suderman, M. T. & Barrett, A. D. T. Mouse Neuroinvasive Phenotype of West Nile Virus Strains Varies Depending upon Virus Genotype. *Virology* 296, 17–23 (2002).
- 281.** Ruscher, C., Patzina-Mehling, C., Melchert, J., Graff, S. L., McFarland, S. E., Hieke, C., Kopp, A., Prasser, A., Tonn, T., Schmidt, M., Isner, C., Drosten, C., Werber, D., Corman, V. M. & Junglen, S. Ecological and clinical evidence of the establishment of West Nile virus in a large urban area in Europe, Berlin, Germany, 2021 to 2022. *Eurosurveillance* 28, 2300258 (2023).
- 282.** Jones, T. C., Schneider, J., Mühlemann, B., Veith, T., Beheim-Schwarzbach, J., Tesch, J., Schmidt, M. L., Walper, F., Bleicker, T., Isner, C., Pfäfflin, F., Werner, R. N., Corman, V. M. & Drosten, C. Genetic variability, including gene duplication and deletion, in early sequences from the 2022 European monkeypox outbreak. *Biorxiv* 2022.07.23.501239 (2022).
- 283.** Böhmer, M. M., Buchholz, U., Corman, V. M., Hoch, M., Katz, K., Marosevic, D. V., Böhm, S., Woudenberg, T., Ackermann, N., Konrad, R., Eberle, U., Treis, B., Dangel, A., Bengs, K., Fingerle, V., Berger, A., Hörmansdorfer, S., Ippisch, S., Wicklein, B., Grahl, A., Pörtner, K., Müller, N., Zeitlmann, N., Boender, T. S., Cai, W., Reich, A., Heiden, M. an der, Rexroth, U., Hamouda, O., Schneider, J., Veith, T., Mühlemann, B., Wölfel, R., Antwerpen, M., Walter, M., Protzer, U., Liebl, B., Haas, W., Sing, A., Drosten, C. & Zapf, A. Investigation of a COVID-19 outbreak in Germany resulting from a single travel-associated primary case: a case series. *Lancet Infect Dis* 20, 920–928 (2020).
- 284.** Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P. & Poleschuk, V. F. Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology* 20, 23–31 (1983).

- 285.** Braitto, A., Ciufolini, M. G., Pippi, L., Corbisiero, R., Fiorentini, C., Gistri, A. & Toscano, L. Phlebotomus-transmitted Toscana Virus Infections of the Central Nervous System: A Seven-year Experience in Tuscany. *Scand. J. Infect. Dis.* 30, 505–508 (1998).
- 286.** Charrel, R. N., Gallian, P., Navarro-Marí, J.-M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M. P., Tenorio, A. & Lamballerie, X. de. Emergence of Toscana Virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 11, 1657–1663 (2005).
- 287.** Wenzel, M., Afzali, A. M., Hoffmann, D., Zange, S., Georgi, E. & Hemmer, B. Toscana virus meningoencephalitis in Upper Bavaria. *Deutsches Ärzteblatt Int* 119, 546–547 (2022).
- 288.** Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Berginc, N., Ladhani, S., Susi, P., Christiansen, C., McKenna, J., Allen, D., Makiello, P., McAllister, G., Carmen, M., Zakikhany, K., Dyrdak, R., Nielsen, X., Madsen, T., Paul, J., Moore, C., Eije, K. von, Piralla, A., Carlier, M., Vanoverschelde, L., Poelman, R., Anton, A., López-Labrador, F. X., Pellegrinelli, L., Keeren, K., Maier, M., Cassidy, H., Derdas, S., Savolainen-Kopra, C., Diedrich, S., Nordbø, S., Buesa, J., Bailly, J.-L., Baldanti, F., MacAdam, A., Mirand, A., Dudman, S., Schuffenecker, I., Kadambari, S., Neyts, J., Griffiths, M. J., Richter, J., Margaretto, C., Govind, S., Morley, U., Adams, O., Krokstad, S., Dean, J., Pons-Salort, M., Prochazka, B., Cabrerizo, M., Majumdar, M., Nebbia, G., Wiewel, M., Cottrell, S., Coyle, P., Martin, J., Moore, C., Midgley, S., Horby, P., Wolthers, K., Simmonds, P., Niesters, H. & Fischer, T. K. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol.* 101, 11–17 (2018).
- 289.** Kapusinszky, B., Minor, P. & Delwart, E. Nearly Constant Shedding of Diverse Enteric Viruses by Two Healthy Infants. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3427–3434 (2012).
- 290.** Pinsky, B. A., Mix, S., Rowe, J., Ikemoto, S. & Baron, E. J. Long-term Shedding of Influenza A Virus in Stool of Immunocompromised Child - Volume 16, Number 7—July 2010 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1165–1167 (2010).
- 291.** Witkowski, P. T., Perley, C. C., Brocato, R. L., Hooper, J. W., Jürgensen, C., Schulzke, J.-D., Krüger, D. H. & Bücker, R. Gastrointestinal Tract As Entry Route for Hantavirus Infection. *Front. Microbiol.* 8, 1721 (2017).
- 292.** Faber, M., Krüger, D. H., Auste, B., Stark, K., Hofmann, J. & Weiss, S. Molecular and epidemiological characteristics of human Puumala and Dobrava-Belgrade hantavirus infections, Germany, 2001 to 2017. *Eurosurveillance* 24, 1800675 (2019).
- 293.** Hofmann, J., Kramer, S., Herrlinger, K. R., Jeske, K., Kuhns, M., Weiss, S., Ulrich, R. G. & Krüger, D. H. Tula Virus as Causative Agent of Hantavirus Disease in Immunocompetent Person, Germany - Volume 27, Number 4—April 2021 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg Infect Dis* 27, 1234–1237 (2021).
- 294.** Hofmann, J., Heuser, E., Weiss, S., Tenner, B., Schoppmeyer, K., Esser, J., Klier, C., Drewes, S., Ulrich, R. G. & Krüger, D. H. Early Release - Autochthonous Ratborne Seoul Virus Infection in Woman with Acute Kidney Injury - Volume 26, Number 12—December 2020 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* *Emerg. Infect. Dis.* 26, 3096–3099 (2020).

- 295.** Hofmann, J., Loyen, M., Faber, M. & Krüger, D. H. Hantavirus-Erkrankungen: Ein Update. *Dmw - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 147, 312–318 (2022).
- 296.** Hofmann, J., Meier, M., Enders, M., Führer, A., Ettinger, J., Klempa, B., Schmidt, S., Ulrich, R. G. & Kruger, D. H. Hantavirus disease in Germany due to infection with Dobrava–Belgrade virus genotype Kurkino. *Clin Microbiol Infec* 20, O648–O655 (2014).
- 297.** Ahlm, C., Lindén, C., Linderholm, M., Alexeyev, O. A., Billheden, J., Elgh, F., Fagerlund, M., Zetterlund, B. & Settergren, B. Central nervous system and ophthalmic involvement in nephropathia epidemica (European type of haemorrhagic fever with renal syndrome). *J. Infect.* 36, 149–155 (1998).
- 298.** Hautala, N., Partanen, T., Kubin, A.-M., Kauma, H. & Hautala, T. Central Nervous System and Ocular Manifestations in Puumala Hantavirus Infection. *Viruses* 13, 1040 (2021).
- 299.** Xie, D., Xu, W., Xian, Y., Yuan, X., Huang, Z., You, J. & Bi, X. Rare case of intracranial hemorrhage associated with seoul virus infection diagnosed by metagenomic next-generation sequencing. *J. Clin. Lab. Anal.* 35, e23616 (2021).
- 300.** Liu, E., Lv, S., Yi, P., Feng, L., Deng, X., Xia, H. & Xu, Y. Central nervous system infection with Seoul Orthohantavirus in a child after hematopoietic stem cell transplantation: a case report. *Virol J* 19, 75 (2022).
- 301.** Deroux, A., Brion, J. P., Hyerle, L., Belbezier, A., Vaillant, M., Mosnier, E., Larrat, S., Morand, P. & Pavese, P. Association between hepatitis E and neurological disorders: Two case studies and literature review. *J Clin Virol* 60, 60–62 (2014).
- 302.** Dalton, H. R., Eijk, J. J. J. van, Cintas, P., Madden, R. G., Jones, C., Webb, G. W., Norton, B., Pique, J., Lutgens, S., Devooght-Johnson, N., Woolson, K., Baker, J., Saunders, M., Househam, L., Griffiths, J., Abravanel, F., Izopet, J., Kamar, N., Alfen, N. van, Engelen, B. G. M. van, Hunter, J. G., Eijk, A. A. van der, Bendall, R. P., Mclean, B. N. & Jacobs, B. C. Hepatitis E virus infection and acute non-traumatic neurological injury: A prospective multicentre study. *J. Hepatol.* 67, 925–932 (2017).
- 303.** Murkey, J. A., Chew, K. W., Carlson, M., Shannon, C. L., Sirohi, D., Sample, H. A., Wilson, M. R., Vespa, P., Humphries, R. M., Miller, S., Klausner, J. D. & Chiu, C. Y. Hepatitis E virus-associated meningoencephalitis in a lung transplant recipient diagnosed by clinical metagenomic sequencing. *Open Forum Infect. Dis.* 4, ofx121- (2017).
- 304.** Pasha, S. A., Pasha, S. A., Suhasini, T. & Rao, D. A. Hepatitis E Virus-Associated Acute Encephalitic Parkinsonism. *J. Assoc. Physicians India* 66, 92–3 (2018).
- 305.** Wang, Y., Wang, S., Wu, J., Jiang, Y., Zhang, H., Li, S., Liu, H., Yang, C., Tang, H., Guo, N., Peppelenbosch, M. P., Wei, L., Pan, Q. & Zhao, J. Hepatitis E virus infection in acute non-traumatic neuropathy: A large prospective case-control study in China. *EBioMedicine* 36, 122–130 (2018).
- 306.** Gerhardt, F., Maier, M., Liebert, U. G., Platzbecker, U., Wang, S.-Y., Papp, C. P., Bock, C. T., Berg, T. & Bömmel, F. van. Early Detection of Hepatitis E Virus Ribavirin Resistance Using Next-Generation Sequencing. *Antimicrob Agents Ch* 64, (2019).

- 307.** Colombo, G., Lorenzini, L., Zironi, E., Galligioni, V., Sonvico, F., Balducci, A. G., Pagliuca, G., Giuliani, A., Calzà, L. & Scagliarini, A. Brain distribution of ribavirin after intranasal administration. *Antivir Res* 92, 408–414 (2011).
- 308.** Hui, E. K.-W. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes Infect.* 8, 905–916 (2006).
- 309.** DeBiasi, R. L. & Tyler, K. L. West Nile virus meningoencephalitis. *Nat. Clin. Pr. Neurol.* 2, 264–275 (2006).
- 310.** Zannoli, S. & Sambri, V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorg* 7, 184 (2019).
- 311.** Ziegler, U., Lühken, R., Keller, M., Cadar, D., Grinten, E. van der, Michel, F., Albrecht, K., Eiden, M., Rinder, M., Lachmann, L., Höper, D., Vina-Rodriguez, A., Gaede, W., Pohl, A., Schmidt-Chanasit, J. & Groschup, M. H. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antivir Res* 162, 39–43 (2018).
- 312.** Hart, J., Tillman, G., Kraut, M. A., Chiang, H.-S., Strain, J. F., Li, Y., Agrawal, A. G., Jester, P., Gnann, J. W., Whitley, R. J. & Team, N. C. A. S. G. W. N. V. 210 P. West Nile virus neuroinvasive disease: neurological manifestations and prospective longitudinal outcomes. *BMC Infect. Dis.* 14, 248 (2014).
- 313.** Chan, K. R., Ismail, A. A., Thergarajan, G., Raju, C. S., Yam, H. C., Rishya, M. & Sekaran, S. D. Serological cross-reactivity among common flaviviruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 975398 (2022).
- 314.** García-Carrasco, J.-M., Muñoz, A.-R., Olivero, J., Figuerola, J., Fa, J. E. & Real, R. Gone (and spread) with the birds: Can chorotype analysis highlight the spread of West Nile virus within the Afro-Palaeartic flyway? *One Heal.* 17, 100585 (2023).
- 315.** Kriesel, J. D., Hobbs, M. R., Jones, B. B., Milash, B., Nagra, R. M. & Fischer, K. F. Deep Sequencing for the Detection of Virus-Like Sequences in the Brains of Patients with Multiple Sclerosis: Detection of GBV-C in Human Brain. *Plos One* 7, e31886 (2012).
- 316.** Valyraki, N., Maillart, E., Pourcher, V., Shor, N., Tran, S., Motte, M. B. de la, Houiller, C., Domont, F., Morvan, E., Touat, M., Amador, M. D. M., Aboab, J., Mathon, B., Hesters, A., Vignal-Clermont, C., Dehais, C., Bonnin, S., Lafitte, F., Villain, N., Varnous, S., Gout, O., Eloit, M., Rodriguez, C. & Deschamps, R. Human pegivirus identified in severe myelitis and optic neuritis in immunocompromised patients: A pathogenic role for a forgotten virus? *Rev Neurol* (2022).
- 317.** Carmona, R. de C. C., Cilli, A., Costa, A. C. da, Reis, F. C., Leal, É., Santos, F. C. P. dos, Machado, B. C., Lopes, C. S., Afonso, A. M. S. & Timenetsky, M. do C. S. T. Pegivirus Detection in Cerebrospinal Fluid from Patients with Central Nervous System Infections of Unknown Etiology in Brazil by Viral Metagenomics. *Microorganisms* 12, 19 (2023).
- 318.** Neibecker, M., Schwarze-Zander, C., Rockstroh, J. K., Spengler, U. & Blackard, J. T. Evidence for extensive genotypic diversity and recombination of GB virus C (GBV-C) in Germany. *J. Méd. Virol.* 83, 685–694 (2011).

- 319.** Yu, Y., Wan, Z., Wang, J.-H., Yang, X. & Zhang, C. Review of human pegivirus: Prevalence, transmission, pathogenesis, and clinical implication. *Virulence* 13, 323–340 (2022).
- 320.** Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U. & Bartenschlager, R. Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. *Plos Pathog* 4, e1000035 (2008).
- 321.** Vignuzzi, M. & López, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus–host interaction. *Nat. Microbiol.* 4, 1075–1087 (2019).
- 322.** Cortese, I., Reich, D. S. & Nath, A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and the spectrum of JC virus-related disease. *Nat. Rev. Neurol.* 17, 37–51 (2021).
- 323.** Doan, M. A. L., Roczkowsky, A., Smith, M., Blevins, G., Landeghem, F. K. H. van, Gelman, B. B., Branton, W. G., Stapleton, J. T., Hobman, T. C. & Power, C. Infection of Glia by Human Pegivirus Suppresses Peroxisomal and Antiviral Signaling Pathways. *J Virol* 95, e01074-21 (2021).
- 324.** Greuel, S., Ihlow, J., Dragomir, M.-P., Streit, S., Corman, V. M., Haberbosch, L., Winkler, D., Meinhardt, J., Aschman, T., Schneider, J., Trotsyuk, I., Kunze, C. A., Maurer, L., Radbruch, H., Heppner, F. L., Horst, D. & Elez Kurtaj, S. COVID-19: Autopsy findings in six patients between 26 and 46 years of age. *Int J Infect Dis* 108, 274–281 (2021).
- 325.** Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C., Franz, J., Thomas, C., Mothes, R., Laue, M., Schneider, J., Brünink, S., Greuel, S., Lehmann, M., Hassan, O., Aschman, T., Schumann, E., Chua, R. L., Conrad, C., Eils, R., Stenzel, W., Windgassen, M., Rößler, L., Goebel, H.-H., Gelderblom, H. R., Martin, H., Nitsche, A., Schulz-Schaeffer, W. J., Hakrrouch, S., Winkler, M. S., Tampe, B., Scheibe, F., Körtvélyessy, P., Reinhold, D., Siegmund, B., Kühl, A. A., Elez Kurtaj, S., Horst, D., Oesterhelweg, L., Tsokos, M., Ingold-Heppner, B., Stadelmann, C., Drosten, C., Corman, V. M., Radbruch, H. & Heppner, F. L. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021).
- 326.** Neri, L., Spezia, P. G., Suraci, S., Macera, L., Scribano, S., Giusti, B., Focosi, D., Maggi, F. & Giannecchini, S. Torque teno virus microRNA detection in cerebrospinal fluids of patients with neurological pathologies. *J. Clin. Virol.* 133, 104687 (2020).
- 327.** Ikuta, Y., Oba, K., Nai, E., Katori, T., Hashino, M., Inamine, Y., Matsunaga, S., Yamaoka, Y., Sekizuka, T., Ryo, A. & Kuroda, M. Aseptic meningitis caused by torque teno virus in an infant: a case report. *J. Méd. Case Rep.* 13, 302 (2019).
- 328.** Kang, Y.-J., Zhou, M.-F., Huang, W., Deng, C., Yan, G. & Lu, Z.-H. Identification of a novel torque teno mini virus in cerebrospinal fluid from a child with encephalitis. *Virol. Sin.* 32, 541–544 (2017).
- 329.** Cummins, D., Bennett, D., Fisher-Hoch, S. P., Farrar, B., Machin, S. J. & McCormick, J. B. Lassa fever encephalopathy: clinical and laboratory findings. *J. Trop. Med. Hyg.* 95, 197–201 (1992).
- 330.** Bonthius, D. J. Lymphocytic Choriomeningitis Virus: An Underrecognized Cause of Neurologic Disease in the Fetus, Child, and Adult. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19, 89–95 (2012).

- 331.** Tappe, D., Schmidt-Chanasit, J. & Beer, M. Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 373, 1880–1881 (2015).
- 332.** Talamonti, L., Padula, P. J., Canteli, M. S., Posner, F., Marczeski, F. P. & Weller, C. Hantavirus pulmonary syndrome: encephalitis caused by virus Andes. *J. NeuroVirology* 17, 189–192 (2011).
- 333.** Baek, S.-H., Shin, D.-I., Lee, H.-S., Lee, S.-H., Kim, H.-Y., Shin, K. S., Lee, S. Y., Han, H.-S., Han, H. J. & Lee, S.-S. Reversible Splenium Lesion of the Corpus Callosum in Hemorrhagic Fever with Renal Failure Syndrome. *J. Korean Méd. Sci.* 25, 1244–1246 (2009).
- 334.** Krause, R., Aberle, S., Haberl, R., Daxböck, F. & Wensch, C. Puumala Virus Infection with Acute Disseminated Encephalomyelitis and Multiorgan Failure - Volume 9, Number 5—May 2003 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 9, 603–605 (2003).
- 335.** Meijer, W. J., Linn, F. H. H., Wensing, A. M. J., Leavis, H. L., Riel, D. van, GeurtsvanKessel, C. H., Wattjes, M. P. & Murk, J.-L. Acute influenza virus-associated encephalitis and encephalopathy in adults: a challenging diagnosis. *JMM Case Rep.* 3, e005076 (2016).
- 336.** Ak, Ö., Biteker, F., Cag, Y., Öcal, G., Benzonana, N., Ciblak, M. A. & Özer, S. Influenza B-associated encephalopathy in two adults. *J. Infect. Chemother.* 18, 961–964 (2012).
- 337.** Butenko, A. M., Leshchinskaia, E. V., Semashko, I. V., Donets, M. A. & Mart'ianova, L. I. Dhori virus--a causative agent of human disease. 5 cases of laboratory infection. *Vopr. Virusol.* 32, 724–9 (1987).
- 338.** Playford, E. G., McCall, B., Smith, G., Slinko, V., Allen, G., Smith, I., Moore, F., Taylor, C., Kung, Y.-H. & Field, H. E. Human Hendra Virus Encephalitis Associated with Equine Outbreak, Australia, 2008 - Volume 16, Number 2—February 2010 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 16, 219–223 (2010).
- 339.** Tan, C.-T. & Chua, K.-B. Nipah virus encephalitis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 10, 315–320 (2008).
- 340.** Miller, D. L. Frequency of Complications of Measles, 1963. *Br. Méd. J.* 2, 75 (1964).
- 341.** Sugai, K., Tsukagoshi, H., Nojima, I., Fujiwara, K., Kodera, A., Kimura, N., Tsuchimoto, K., Sekimoto, K., Kitada, K., Takahashi, N., Araki, T., Fujii, Y., Miyaji, Y., Ikeda, M., Kozawa, K., Noda, M., Kuroda, M. & Kimura, H. Severe acute encephalopathy related to human parainfluenza virus type 2 infection in an infant: a case report. *JMM Case Rep.* 2, (2015).
- 342.** McCarthy, V. P., Zimmerman, A. W. & Miller, C. A. Central nervous system manifestations of parainfluenza virus type 3 infections in childhood. *Pediatr. Neurol.* 6, 197–201 (1990).
- 343.** Atkinson, R. E., Kent, S. & Fidler, K. Mumps encephalitis with brainstem involvement: significant morbidity and diagnostic dilemmas. *Arch. Dis. Child.* 96, A54 (2011).
- 344.** Fauvel, M., Artsob, H., Calisher, C. H., Davignon, L., Chagnon, A., Skvorc-Ranko, R. & Belloncik, S. California group virus encephalitis in three children from Quebec: clinical and serologic findings. *Can. Méd. Assoc. J.* 122, 60–2, 64 (1980).
- 345.** Sexton, D. J., Rollin, P. E., Breitschwerdt, E. B., Corey, G. R., Myers, S. A., Dumais, M. R., Bowen, M. D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Nichol, S. T., Peters, C. J. & Ksiazek, T. G. Life-Threatening Cache Valley Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* 336, 547–550 (1997).

- 346.** Putkuri, N., Kantele, A., Levanov, L., Kivistö, I., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A. & Vapalahti, O. Acute Human Inkoo and Chatanga Virus Infections, Finland - Volume 22, Number 5—May 2016 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 810–817 (2016).
- 347.** Waldman, R. J., Calisher, C. H., Shabino, C. L. & Grimstad, P. R. A Case of Encephalitis in a Human Associated with a Serologic Rise to Jamestown Canyon Virus *. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 1238–1244 (1982).
- 348.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). La Crosse virus neuroinvasive disease - Missouri, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59, 869–71 (2010).
- 349.** Meier-Stephenson, V., Langley, J. M., Drebot, M. & Artsob, H. Encephalitis in the summer: a case of snowshoe hare (California serogroup) virus infection in Nova Scotia. *Can. Commun. Dis. Rep. Relev. des Mal. Transm. au Can.* 33, 23–6 (2007).
- 350.** Mravcová, K., Camp, J. V., Hubálek, Z., Šikutová, S., Vaux, A. G. C., Medlock, J. M. & Rudolf, I. Ťahyňa virus—A widespread, but neglected mosquito-borne virus in Europe. *Zoonoses Public Heal.* 70, 371–382 (2023).
- 351.** Liu, S., Kannan, S., Meeks, M., Sanchez, S., Girone, K. W., Broyhill, J. C., Martines, R. B., Bernick, J., Flammia, L., Murphy, J., Hills, S. L., Burkhalter, K. L., Laven, J. J., Gaines, D. & Hoffmann, C. J. Early Release - Fatal Case of Heartland Virus Disease Acquired in the Mid-Atlantic Region, United States - Volume 29, Number 5—May 2023 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 29, 992–996 (2023).
- 352.** Cui, N., Liu, R., Lu, Q.-B., Wang, L.-Y., Qin, S.-L., Yang, Z.-D., Zhuang, L., Liu, K., Li, H., Zhang, X.-A., Hu, J.-G., Wang, J.-Y., Liu, W. & Cao, W.-C. Severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus-related human encephalitis. *J. Infect.* 70, 52–59 (2015).
- 353.** Alrajhi, A. A., Al-Semari, A. & Al-Watban, J. Rift Valley Fever Encephalitis - Volume 10, Number 3—March 2004 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 554–555 (2004).
- 354.** Lesho, E. P., Ludwig, G. V. & Wortmann, G. Encephalitis and Sandfly Fever (Sicilian) Virus Infection. *Infect. Dis. Clin. Pr.* 12, 352–354 (2004).
- 355.** Veater, J., Mehedi, F., Cheung, C. K., Nabarro, L., Osborne, J., Wong, N., Wiselka, M. & Tang, J. W. Toscana virus meningo-encephalitis: an important differential diagnosis for elderly travellers returning from Mediterranean countries. *BMC Geriatr.* 17, 193 (2017).
- 356.** Fok, A., Mateevici, C., Lin, B., Chandra, R. V. & Chong, V. H. T. Encephalitis-Associated Human Metapneumovirus Pneumonia in Adult, Australia - Volume 21, Number 11—November 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2074–2076 (2015).
- 357.** Park, A., Suh, S., Son, G.-R., Lee, Y. H., Seo, H. S., Eun, B.-L., Lee, N.-J. & Seol, H.-Y. Respiratory syncytial virus-related encephalitis: magnetic resonance imaging findings with diffusion-weighted study. *Neuroradiology* 56, 163–168 (2014).

- 358.** Widen, S. G., Wood, T. G., Holmes, E. C., Vasilakis, N., Tesh, R. B., Walker, P. J., Blasdel, K. R., Guzman, H. & Firth, C. Ledantavirus: A Proposed New Genus in the Rhabdoviridae has a Strong Ecological Association with Bats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 405–410 (2015).
- 359.** Samaratunga, Searle & Hudson. Non-rabies Lyssavirus human encephalitis from fruit bats: Australian bat Lyssavirus (pteropid Lyssavirus) infection. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24, 331–335 (1998).
- 360.** Paweska, J. T., Blumberg, L. H., Liebenberg, C., Hewlett, R. H., Grobbelaar, A. A., Leman, P. A., Croft, J. E., Nel, L. H., Nutt, L. & Swanepoel, R. Fatal Human Infection with Rabies-related Duvenhage Virus, South Africa - Volume 12, Number 12—December 2006 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 12, 1965–1967 (2006).
- 361.** Regnault, B., Evrard, B., Plu, I., Dacheux, L., Troadec, E., Cozette, P., Chrétien, D., Duchesne, M., Vallat, J.-M., Jamet, A., Leruez, M., Pérot, P., Bourhy, H., Eloit, M. & Seilhean, D. First Case of Lethal Encephalitis in Western Europe Due to European Bat Lyssavirus Type 1. *Clin. Infect. Dis.* 74, 461–466 (2021).
- 362.** Fooks, A. R., McElhinney, L. M., Pounder, D. J., Finnegan, C. J., Mansfield, K., Johnson, N., Brookes, S. M., Parsons, G., White, K., McIntyre, P. G. & Nathwani, D. Case report: Isolation of a European bat lyssavirus type 2a from a fatal human case of rabies encephalitis. *J. Méd. Virol.* 71, 281–289 (2003).
- 363.** Kemp, G. E., Fabiyi, A., Moore, D. L., Osunkoya, B. O. & Familusi, J. B. A Fatal Human Infection with Mokola Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21, 959–963 (1972).
- 364.** Mahadevan, A., Suja, M. S., Mani, R. S. & Shankar, S. K. Perspectives in Diagnosis and Treatment of Rabies Viral Encephalitis: Insights from Pathogenesis. *Neurotherapeutics* 13, 477–492 (2016).
- 365.** Rao, B., Basu, A., Wairagkar, N. S., Gore, M. M., Arankalle, V. A., Thakare, J. P., Jadi, R. S., Rao, K. & Mishra, A. A large outbreak of acute encephalitis with high fatality rate in children in Andhra Pradesh, India, in 2003, associated with Chandipura virus. *Lancet* 364, 869–874 (2004).
- 366.** Quiroz, E., Moreno, N., Peralta, P. H. & Tesh, R. B. A Human Case of Encephalitis Associated with Vesicular Stomatitis Virus (Indiana Serotype) Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 312–314 (1988).
- 367.** Schibler, M., Brito, F., Zanella, M.-C., Zdobnov, E. M., Laubscher, F., L'Huillier, A. G., Ambrosioni, J., Wagner, N., Posfay-Barbe, K. M., Docquier, M., Schiffer, E., Savoldelli, G. L., Fournier, R., Lenggenhager, L., Cordey, S. & Kaiser, L. Viral Sequences Detection by High-Throughput Sequencing in Cerebrospinal Fluid of Individuals with and without Central Nervous System Disease. *Genes-basel* 10, 625 (2019).
- 368.** Sato, M., Kuroda, M., Kasai, M., Matsui, H., Fukuyama, T., Katano, H. & Tanaka-Taya, K. Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing. *J. Clin. Virol.* 78, 66–70 (2016).
- 369.** Brown, J. R., Morfopoulou, S., Hubb, J., Emmett, W. A., Ip, W., Shah, D., Brooks, T., Paine, S. M. L., Anderson, G., Virasami, A., Tong, C. Y. W., Clark, D. A., Plagnol, V., Jacques, T.

- S., Qasim, W., Hubank, M. & Breuer, J. Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis Official Publ Infect Dis Soc Am* 60, 881–888 (2015).
- 370.** Ito, S., Takeshita, S., Nezu, A., Aihara, Y., Usuku, S., Noguchi, Y. & Yokota, S. Norovirus-associated encephalopathy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 651–652 (2006).
- 371.** Sofia, M., R., B. J., Graham, D. E., Glenn, A., Alex, V., Waseem, Q., K., C. W., Michael, H., Vincent, P., Marc, D., S., J. T., J., T. P. & Judith, B. Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 375, 497–498 (2016).
- 372.** Islam, M. A., Cavestro, C., Alam, S. S., Kundu, S., Kamal, M. A. & Reza, F. Encephalitis in Patients with COVID-19: A Systematic Evidence-Based Analysis. *Cells* 11, 2575 (2022).
- 373.** Forton, D. M., Thomas, H. C. & Taylor-Robinson, S. D. Central Nervous System Involvement in Hepatitis C Virus Infection. *Metab. Brain Dis.* 19, 383–391 (2004).
- 374.** Zaki, A. M. Isolation of a flavivirus related to the tick-borne encephalitis complex from human cases in Saudi Arabia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 179–181 (1997).
- 375.** Borawake, K., Prayag, P., Wagh, A. & Dole, S. Dengue encephalitis. *Indian J. Crit. Care Med. : Peer-Rev., Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* 15, 190–193 (2011).
- 376.** Milhim, B. H. G. A., Estofolete, C. F., Rocha, L. C. da, Liso, E., Brienze, V. M. S., Vasilakis, N., Terzian, A. C. B. & Nogueira, M. L. Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. *Viruses* 12, 957 (2020).
- 377.** Kabilan, L., Vrati, S., Vrati, S., Ramesh, S., Srinivasan, S., Appaiahgari, M. B., Arunachalam, N., Thenmozhi, V., Kumaravel, S. M., Samuel, P. P. & Rajendran, R. Japanese encephalitis virus (JEV) is an important cause of encephalitis among children in Cuddalore district, Tamil Nadu, India. *J. Clin. Virol.* 31, 153–159 (2004).
- 378.** Holbrook, M. R. Kyasanur forest disease. *Antivir. Res.* 96, 353–362 (2012).
- 379.** Charles, P. G., Leydon, J., O’Grady, K. A. & Speed, B. R. A case of Kunjin virus encephalitis in a traveller returning from the Northern Territory. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 25, 155–7 (2001).
- 380.** Walkington, J., Hulgur, M., Yates, D. & Eynon, C. A. A Case of Refractory Seizures Caused by an Unusual Zoonosis. *J. Intensiv. Care Soc.* 14, 65–66 (2013).
- 381.** Niven, D. J., Afra, K., Iftinca, M., Tellier, R., Fonseca, K., Kramer, A., Safronetz, D., Holloway, K., Drebot, M. & Johnson, A. S. Fatal Infection with Murray Valley Encephalitis Virus Imported from Australia to Canada, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 280–283 (2017).
- 382.** Wagner, E., Shin, A., Tukhanova, N., Turebekov, N., Nurmakhanov, T., Sutyagin, V., Berdibekov, A., Maikanov, N., Lezdinsh, I., Shapiyeva, Z., Shevtsov, A., Freimüller, K., Peintner, L., Ehrhardt, C. & Essbauer, S. First Indications of Omsk Haemorrhagic Fever Virus beyond Russia. *Viruses* 14, 754 (2022).
- 383.** Piantadosi, A., Rubin, D. B., McQuillen, D. P., Hsu, L., Lederer, P. A., Ashbaugh, C. D., Duffalo, C., Duncan, R., Thon, J., Bhattacharyya, S., Basgoz, N., Feske, S. K. & Lyons, J. L. Emerging Cases of Powassan Virus Encephalitis in New England: Clinical Presentation, Imaging, and Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis.* 62, 707–713 (2016).

- 384.** Medeiros, D. B. A., Nunes, M. R. T., Vasconcelos, P. F. C., Chang, G.-J. J. & Kuno, G. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in São Paulo state. *J. Gen. Virol.* 88, 2237–2246 (2007).
- 385.** May, F. J., Li, L., Zhang, S., Guzman, H., Beasley, D. W. C., Tesh, R. B., Higgs, S., Raj, P., Jr, R. B., Randle, Y., Chandler, L. & Barrett, A. D. T. Genetic variation of St. Louis encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 89, 1901–1910 (2008).
- 386.** Hemmer, C. J., Littmann, M., Löbermann, M., Lafrenz, M., Böttcher, T. & Reisinger, E. C. Tickborne Meningoencephalitis, First Case after 19 Years in Northeastern Germany - Volume 11, Number 4—April 2005 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 11, 633–634 (2005).
- 387.** Pecorari, M., Longo, G., Gennari, W., Grottole, A., Sabbatini, A. M., Tagliazucchi, S., Savini, G., Monaco, F., Simone, M. L., Lelli, R. & Rumpianesi, F. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August–September 2009. *Eurosurveillance* 14, (2009).
- 388.** Santini, M., Vilibic-Cavlek, T., Barsic, B., Barbic, L., Savic, V., Stevanovic, V., Listes, E., Gennaro, A. D. & Savini, G. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. *J. NeuroVirology* 21, 92–97 (2015).
- 389.** Soares, C. N., Brasil, P., Carrera, R. M., Sequeira, P., Filippis, A. B. de, Borges, V. A., Theophilo, F., Ellul, M. A. & Solomon, T. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. *J. Clin. Virol.* 83, 63–65 (2016).
- 390.** Kamar, N., Bendall, R. P., Peron, J. M., Cintas, P., Prudhomme, L., Mansuy, J. M., Rostaing, L., Keane, F., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H. R., Kamar, N., Bendall, R. P., Peron, J. M., Cintas, P., Prudhomme, L., Mansuy, J. M., Rostaing, L., Keane, F., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H. R., Kamar, N., Bendall, R. P., Peron, J. M., Cintas, P., Prudhomme, L., Mansuy, J. M., Rostaing, L., Keane, F., Ijaz, S., Izopet, J. & Dalton, H. R. Hepatitis E Virus and Neurologic Disorders. *Emerg Infect Dis* 17, 173–179 (2011).
- 391.** Sherman, F. E., Michaels, R. H. & Kenny, F. M. Acute Encephalopathy (Encephalitis) Complicating Rubella: Report of Cases With Virologic Studies, Cortisol-Production Determinations, and Observations at Autopsy. *JAMA* 192, 675–681 (1965).
- 392.** Eyckmans, T., Wollants, E., Janssens, A., Schoemans, H., Lagrou, K., Wauters, J. & Maertens, J. Coxsackievirus A16 Encephalitis during Obinutuzumab Therapy, Belgium, 2013 - Volume 20, Number 5—May 2014 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 20, 913–915 (2014).
- 393.** Kuo, C.-Y., Ku, C.-L., Lim, H.-K., Hsia, S.-H., Lin, J.-J., Lo, C.-C., Ding, J.-Y., Kuo, R.-L., Casanova, J.-L., Zhang, S.-Y., Chang, L.-Y. & Lin, T.-Y. Life-Threatening Enterovirus 71 Encephalitis in Unrelated Children with Autosomal Dominant TLR3 Deficiency. *J. Clin. Immunol.* 42, 606–617 (2022).
- 394.** Brunner, J., Litwicki, A., Aliani, S. & Gärtner, B. Coxsackie Virus B 4 Encephalitis in a 7 Year Old Boy. *Klin. Pädiatrie* 216, 297–299 (2004).

- 395.** Ronellenfitch, S., Tabatabai, J., Böttcher, S., Diedrich, S., Frommhold, D., Schubert-Bast, S., Poeschl, J. & Schnitzler, P. First report of a Chinese strain of coxsackie B3 virus infection in a newborn in Germany in 2011: a case report. *J. Méd. Case Rep.* 8, 164 (2014).
- 396.** Jennings, G. H., Hamilton-Paterson, J. L. & MacCallum, F. O. Polio encephalitis Due to Poliomyelitis Virus. *Br. Méd. J.* 2, 210 (1949).
- 397.** Kreuter, J. D., Barnes, A., McCarthy, J. E., Schwartzman, J. D., Oberste, M. S., Rhodes, C. H., Modlin, J. F. & Wright, P. F. A Fatal Central Nervous System Enterovirus 68 Infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 793–796 (2011).
- 398.** Britton, P. N., Dale, R. C., Nissen, M. D., Crawford, N., Elliott, E., Macartney, K., Khandaker, G., Booy, R., Jones, C. A. & Investigators, P.-A. Parechovirus Encephalitis and Neurodevelopmental Outcomes. *Pediatrics* 137, e20152848 (2016).
- 399.** Crawshaw, A. A., Dhasmana, D., Jones, B., Gabriel, C. M., Sturman, S., Davies, N. W. S. & Taylor, G. P. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-associated encephalopathy: an under-recognised cause of acute encephalitis? Case series and literature review. *J. Neurol.* 265, 871–879 (2018).
- 400.** Giangaspero, F., Scanabissi, E., Baldacci, M. C. & Betts, C. M. Massive neuronal destruction in human immunodeficiency virus (HIV) encephalitis. *Acta Neuropathol.* 78, 662–665 (1989).
- 401.** Wood, B. R., Klein, J. P., Lyons, J. L., Milner, D. A., Phillips, R. E., Schutten, M., Folkerth, R. D., Ciarlini, P., Henrich, T. J. & Johnson, J. A. HIV-2 Encephalitis: Case Report and Literature Review. *AIDS Patient Care STDs* 26, 383–387 (2012).
- 402.** Nelson, J., Waggoner, J. J., Sahoo, M. K., Grant, P. M. & Pinsky, B. A. Encephalitis Caused by Chikungunya Virus in a Traveler from the Kingdom of Tonga. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3459–3461 (2014).
- 403.** Lindsey, N. P., Staples, J. E. & Fischer, M. Eastern Equine Encephalitis Virus in the United States, 2003–2016. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 1472–1477 (2018).
- 404.** Ehrenkranz, N. J., Sinclair, M. C., Buff, E. & Lyman, D. O. The Natural Occurrence of Venezuelan Equine Encephalitis in the United States. *N. Engl. J. Med.* 282, 298–302 (1970).
- 405.** Burkett-Cadena, N. D., Fish, D., Weaver, S. & Vittor, A. Y. Everglades virus: an underrecognized disease-causing subtype of Venezuelan equine encephalitis virus endemic to Florida, USA. *J. Méd. Éntomol.* 60, 1149–1164 (2023).
- 406.** Willems, W. R., Kaluza, G., Boschek, C. B., Bauer, H., Hager, H., Schütz, H.-J. & Feistner, H. Semliki Forest Virus: Cause of a Fatal Case of Human Encephalitis. *Science* 203, 1127–1129 (1979).
- 407.** Hommel, D., Heraud, J. M., Hulin, A. & Talarmin, A. Association of Tonate Virus (Subtype IIIB of the Venezuelan Equine Encephalitis Complex) with Encephalitis in a Human. *Clin. Infect. Dis.* 30, 188–190 (2000).
- 408.** Zárate, M. L., Scherer, W. F. & Dickerman, R. W. [Venezuelan equine encephalitis virus as a human infection determinant. Description of a fatal case occurring in Jaltipan, Ver., in 1965]. *Rev. Investig. en salud publica* 30, 296–302 (1970).

- 409.** Delfraro, A., Burgueño, A., Morel, N., González, G., García, A., Morelli, J., Pérez, W., Chiparelli, H. & Arbiza, J. Fatal Human Case of Western Equine Encephalitis, Uruguay - Volume 17, Number 5—May 2011 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 952–954 (2011).
- 410.** Pérot, P., Fourgeaud, J., Rouzaud, C., Regnault, B., Rocha, N. D., Fontaine, H., Pavéc, J. L., Dolidon, S., Garzaro, M., Chrétien, D., Morcrette, G., Molina, T. J., Ferroni, A., Leruez-Ville, M., Lortholary, O., Jamet, A. & Eloit, M. Early Release - Circovirus Hepatitis Infection in Heart-Lung Transplant Patient, France - Volume 29, Number 2—February 2023 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg Infect Dis* 29, 286–293 (2023).
- 411.** Phan, T. G., Mori, D., Deng, X., Rajindrajith, S., Ranawaka, U., Ng, T. F. F., Bucardo-Rivera, F., Orlandi, P., Ahmed, K. & Delwart, E. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. *Virology* 482, 98–104 (2015).
- 412.** Tan, L. V., Doorn, H. R. van, Nghia, H. D. T., Chau, T. T. H., Tu, L. T. P., Vries, M. de, Canuti, M., Deijis, M., Jebbink, M. F., Baker, S., Bryant, J. E., Tham, N. T., BKrong, N. T. T. C., Boni, M. F., Loi, T. Q., Phuong, L. T., Verhoeven, J. T. P., Crusat, M., Jeeninga, R. E., Schultsz, C., Chau, N. V. V., Hien, T. T., Hoek, L. van der, Farrar, J. & Jong, M. D. de. Identification of a New Cyclovirus in Cerebrospinal Fluid of Patients with Acute Central Nervous System Infections. *mBio* 4, e00231-13 (2013).
- 413.** West, T. E., Papasian, C. J., Park, B. H. & Parker, S. W. Adenovirus Type 2 Encephalitis and Concurrent Epstein-Barr Virus Infection in an Adult Man. *Arch. Neurol.* 42, 815–817 (1985).
- 414.** Okamoto, K., Fukuda, M., Shigemi, R. & Takaoka, T. [Two cases of acute encephalitis/encephalopathy associated with adenovirus type 3 infection]. *hattatsu Brain Dev.* 36, 487–91 (2004).
- 415.** Kim, K. S. & Gohd, R. S. Acute Encephalopathy in Twins due to Adenovirus Type 7 Infection. *Arch. Neurol.* 40, 58–59 (1983).
- 416.** Osamura, T., Mizuta, R., Yoshioka, H. & Fushiki, S. Isolation of adenovirus type 11 from the brain of a neonate with pneumonia and encephalitis. *Eur. J. Pediatr.* 152, 496–499 (1993).
- 417.** Prösch, S., Schielke, E., Reip, A., Meisel, H., Volk, H.-D., Einhäupl, K. M. & Krüger, D. H. Human Cytomegalovirus (HCMV) Encephalitis in an Immunocompetent Young Person and Diagnostic Reliability of HCMV DNA PCR Using Cerebrospinal Fluid of Nonimmunosuppressed Patients. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3636–3640 (1998).
- 418.** Misra, U., Maurya, P., Kalita, J. & Kumar, B. Epstein Barr virus encephalitis: Clinical diversity and radiological similarity. *Neurol. India* 59, 605 (2011).
- 419.** Said, J. W., Tasaka, T., Vos, S. de & Koeffler, H. P. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus type 8 encephalitis in HIV-positive and -negative individuals. *AIDS* 11, 1119–1122 (1997).
- 420.** Ongrádi, J., Ablashi, D. V., Yoshikawa, T., Stercz, B. & Ogata, M. Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals. *J. NeuroVirology* 23, 1–19 (2017).

421. Bradshaw, M. J. & Venkatesan, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics* 13, 493–508 (2016).
422. Fernandez-Gerlinger, MP., Greffe, S., Meffre, A., Grenet, J., Au, S., Bojanova, M., Rouveix, E. & Rozenberg, F. HSV-2 meningoencephalitis in an immunocompetent young man: what is the pathogenesis and what is the treatment? *J. Clin. Virol.* 69, 40–43 (2015).
423. Oztekin, A., Turhan, O., Mutlu, D., Inan, D., Colak, D. & Yalcin, A. N. A rare case of HSV-2 encephalitis. *Le Infez. Med.* 13, 192–5 (2005).
424. Kleinschmidt-Demasters, B. K., Amlie-Lefond, C. & Gilden, D. H. The patterns of varicella zoster virus encephalitis. *Hum. Pathol.* 27, 927–938 (1996).
425. Mori, D., Ranawaka, U., Yamada, K., Rajindrajith, S., Miya, K., Perera, H. K. K., Matsumoto, T., Dassanayake, M., Mitui, M. T., Mori, H., Nishizono, A., Söderlund-Venermo, M. & Ahmed, K. Human Bocavirus in Patients with Encephalitis, Sri Lanka, 2009–2010 - Volume 19, Number 11—November 2013 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1859–1862 (2013).
426. Watanabe, T. & Kawashima, H. Acute encephalitis and encephalopathy associated with human parvovirus B19 infection in children. *World J. Clin. Pediatr.* 4, 126 (2015).
427. Chittick, P., Williamson, J. C. & Ohl, C. A. BK Virus Encephalitis. *Ann. Pharmacother.* 47, 1229–1233 (2013).
428. Wüthrich, C., Dang, X., Westmoreland, S., McKay, J., Maheshwari, A., Anderson, M. P., Ropper, A. H., Viscidi, R. P. & Koralknik, I. J. Fulminant JC virus encephalopathy with productive infection of cortical pyramidal neurons. *Ann. Neurol.* 65, 742–748 (2009).
429. Libíková, H., Heinz, F., Ujházyová, D. & Stünzner, D. Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases. *Méd. Microbiol. Immunol.* 166, 255–263 (1978).
430. Iturriza-Gómara, M., Auchterlonie, I. A., Zaw, W., Molyneaux, P., Desselberger, U. & Gray, J. Rotavirus Gastroenteritis and Central Nervous System (CNS) Infection: Characterization of the VP7 and VP4 Genes of Rotavirus Strains Isolated from Paired Fecal and Cerebrospinal Fluid Samples from a Child with CNS Disease. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4797–4799 (2002).
431. Jaafar, F. M., Attoui, H., Mertens, P. P. C., Micco, P. de & Lamballerie, X. de. Structural organization of an encephalitic human isolate of Banna virus (genus Seadornavirus, family Reoviridae). *J. Gen. Virol.* 86, 1147–1157 (2005).
432. Attoui, H., Jaafar, F. M., Micco, P. de & Lamballerie, X. de. Coltiviruses and Seadornaviruses in North America, Europe, and Asia - Volume 11, Number 11—November 2005 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1673–1679 (2005).
433. Spruance, S. L. & Bailey, A. Colorado Tick Fever: A Review of 115 Laboratory Confirmed Cases. *Arch. Intern. Med.* 131, 288–293 (1973).
434. Chastel, C. [Erve and Eyach: two viruses isolated in France, neuropathogenic for man and widely distributed in Western Europe]. *Bull. l'Acad. nationale Med.* 182, 801–9; discussion 809-10 (1998).