

**Differentialdiagnostik von pockentypischen
Hautveränderungen mittels Metagenomanalyse und
VAmpSeq**

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

Dipl.-Biol.

Annika Brinkmann

2020, Berlin

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2015 und Dezember 2019 am Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene (ZBS 1) des Robert Koch-Instituts in Berlin unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas Nitsche angefertigt. Prof. Dr. Rupert Mutzel übernahm die Begutachtung seitens des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Gutachter 1. Prof. Dr. Andreas Nitsche

Gutachter 2. Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 23.06.2020

DECLARATION

Gemäß § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007 des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin versichere ich hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „*Differentialdiagnostik von pockentypischen Hautveränderungen mittels Metagenomanalyse und VAmPSeq*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Abstract

The Consultant Laboratory for Poxviruses of the Robert Koch Institute in Berlin annually receives numerous samples of patients with pox-like skin lesions, some of which cannot be diagnosed as ortho-, para- or molluscipoxviruses. Therefore, the causative agent of many pox-like skin lesions remains unknown.

There are several methods for the diagnostics and differential diagnostics of pox-like skin lesions, including the gold standard Polymerase Chain Reaction (PCR) and High-Throughput Sequencing (HTS). While PCR offers sensitive and specific screening for individual pathogens, the total DNA or RNA of a sample can be analyzed with HTS, including all abundant pathogens.

Since 2014, several laboratories were having access to the MinION, a hand-held sequencing device which made the analysis of DNA molecules in real-time scenarios possible. However, the new technology has several drawbacks, including the low sensitivity and the quality of the generated sequences.

In this study, 49 patient samples, previously sent to the Consultant Laboratory for the diagnostics of poxviruses, were analyzed with Illumina HTS to identify the causative agents of the pox-like skin lesions. Further, a novel multiplex method for the diagnostics of the pox-like skin lesions was developed. The novel method, VAmplSeq (Virus Amplification based Sequencing) is a high-multiplex PCR followed by MinION sequencing. The method combines the advantages of PCR (sensitivity) as well as HTS (simultaneous, unspecific screening) and offers the possibility of screening for numerous pathogens. Additionally, the VAmplSeq method was complemented by a second method (PAmpSeq – Pox Amplification based Sequencing) to offer the subsequent full genome sequencing of orthopoxviruses. Furthermore, a graphical user interface (GUI) was developed for the real-time analysis during MinION sequencing, which can be used without any knowledge in bioinformatics (VAmplSeeker and PAmpSeeker).

The 49 patient samples of this study were analyzed with Illumina HTS and the VAmplSeq method, and sequences of herpes simplex virus type 1, Molluscum contagiosum virus type 1 and type 2 and Orf virus were identified with both methods. Additionally, a novel (para)poxvirus was identified with Illumina HTS, and Epstein Barr virus and parvovirus B19 were identified with the VAmplSeq method.

With the development of the VAmplSeq method, the simultaneous screening of several pathogens within a short time span has been made possible, and the method has already been used for several applications in the laboratory. This study shows that HTS for pathogen detection can be replaced in many cases by the VAmplSeq method, which is faster, more sensitive and less expensive.

Zusammenfassung

Jährlich erreichen das Konsiliarlabor für Pockenviren des Robert Koch-Instituts zahlreiche Proben von Patienten mit pockentypischen und pockenähnlichen Hautveränderungen zur Diagnostik von Ortho-, Para- und Molluscipockenviren. Nicht immer können die eingesandten Proben eindeutig diagnostiziert werden und der Ursprung der pockentypischen Hautläsionen bleibt unklar.

Für die Diagnostik von Viren gibt es verschiedene molekularbiologische Methoden. Während mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifisch auf einzelne Erreger gescreent werden kann, wird mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS) ein unspezifischer Blick in die gesamte DNA und RNA der untersuchten Probe und damit alle darin enthaltenen Erreger ermöglicht. Seit 2014 hat der MinION in vielen Laboren Einzug gehalten, ein handtellergroßer Hochdurchsatz-Sequenzierer, welcher die Analyse von DNA-Molekülen in Echtzeit ermöglicht. Diese Technologie hat völlig neue Möglichkeiten in der Erregerdiagnostik eröffnet, jedoch sind die Sensitivität der Methode und die Qualität der generierten Sequenzen noch immer gering.

In dieser Studie wurden 49 Patientenproben mittels Illumina HTS sowie mit einer neu entwickelten Methode (VAmplSeq) auf die verursachenden Erreger der pockenähnlichen Hautläsionen untersucht. Dabei handelt es sich bei der VAmplSeq (Virus Amplification based Sequencing)-Methode um eine Multiplex-PCR mit anschließender MinION-Sequenzierung. Dies kombiniert die Vorteile der PCR (Sensitivität, Spezifität) und der HTS (ungerichtetes, simultanes Screening) und ermöglicht eine sensitive und simultane Diagnostik und Differentialdiagnostik von pockenähnlichen Hautläsionen. Ergänzend wurde die VAmplSeq-Methode weiterentwickelt (PAmplSeq – Pox Amplification based Sequencing), um neben der Detektion von Viren auch eine Vollgenomsequenzierung von Orthopockenviren zu ermöglichen. Für die Analyse in Echtzeit während der MinION-Sequenzierung wurde eine Oberflächenanwendung entwickelt (VAmplSeeker und PAmplSeeker), um die Interpretation der generierten Daten auch ohne bioinformatische Kenntnisse zu ermöglichen.

Mittels Illumina HTS und der VAmplSeq-Methode konnten in den Patientenproben Herpes simplex-Virus Typ 1, Molluscum-contagiosum-Virus Typ 1 und Typ 2 sowie Orf-Virus diagnostiziert werden. Zudem konnte mit der Illumina HTS ein neuartiges (Para)pockenvirus, mit der VAmplSeq-Methode in weiteren Proben das Epstein-Barr-Virus und Parvovirus B19 identifiziert werden.

Mit der VAmplSeq-Methode konnte damit in dieser Arbeit ein neues diagnostisches Verfahren entwickelt werden, welches es ermöglicht, auf mehrere Erreger in kurzer Zeit zu screenen und welches bereits für zahlreiche Anwendungen im Laboralltag weiterentwickelt wurde.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Abstract.....	II
Zusammenfassung.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Pockenviren und virale Hautinfektionen.....	1
1.2. Diagnostik und Differentialdiagnostik von pockentypischen Hautveränderungen	3
1.2.1. Krankheitsverlauf der Infektion mit Pockenviren	3
1.2.2. Differentialdiagnostik pockenähnlicher Hautveränderungen	4
1.2.3. Labordiagnostik pockenähnlicher Hautveränderungen.....	6
1.3. Second Generation Sequencing.....	7
1.4. Third Generation Sequencing.....	9
1.5. Virale Metagenomik.....	11
1.5.1. Mikrobiome der Haut.....	11
1.6. Target Enrichment.....	13
1.7. Bioinformatische Datenanalyse.....	13
1.7.1. Bioinformatische Analyse von Illumina-Daten.....	14
1.7.2. Bioinformatische Analyse von MinION-Daten	15
1.8. Zielsetzung der Dissertation	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Material.....	18
2.1.1. Studienproben.....	18
2.1.2. Primer und PCR-Protokolle	21
2.1.3. Probenvorbereitung, PCR.....	24
2.1.4. Illumina Library und Sequenzierung.....	25
2.1.5. MinION Library und Sequenzierung	25
2.1.6. Software und Tools.....	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. Probenvorbereitung	27
2.2.2. Illumina Library-Präparation und Sequenzierung.....	27
2.2.3. Illumina-Datenauswertung.....	27
2.2.4. Entwicklung VAmplSeq PCR.....	28
2.2.5. Bestimmung der Sensitivität.....	30
2.2.6. Entwicklung PAmplSeq PCR.....	30
2.2.7. MinION Library-Präparation und Sequenzierung.....	31
2.2.8. MinION Datenauswertung.....	32
2.2.9. Entwicklung VAmplSeeker und PAmplSeeker.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Metagenomische Analyse.....	33
3.1.1. Zusammensetzung der Metagenome.....	33
3.1.2. Analyse des Viroms durch Nukleotid-Alignments	35
3.1.3. Analyse des Viroms durch Aminosäure-Alignments.....	37
3.1.4. Detektion eines neuartigen Eichhörnchen-Pockenvirus	39
3.1.5. Fungale Metagenomanalyse	41
3.1.6. Protisten und Parasiten.....	42
3.1.7. Analyse des Bakterioms mittels Illumina-Sequenzierung	43
3.1.8. Analyse des Bakterioms mittels 16S PCR und MinION-Sequenzierung.....	45
3.1.9. Vergleich des Illumina-Mikrobioms mit 16S MinION-Sequenzierung.....	47
3.2. Entwicklung und Bewertung der VAmplSeq-Methode	49
3.2.1. <i>In silico</i> -Sensitivität der VAmplSeq-Methode	50
3.2.2. Entwicklung des PCR-Protokolls für die VAmplSeq-Methode.....	52
3.2.3. Sensitivität der VAmplSeq-Methode	53
3.2.4. Kinetik der VAmplSeq-MinION-Sequenzierung.....	55
3.2.5. Sequenzierung von mit <i>barcodes</i> ligierten Proben	58
3.3. Ergebnisse des Screenings der Patientenproben mittels VAmplSeq-Methode.....	59

3.4.	PAmpliSeq – VAmplSeq Whole Genome Sequencing	60
3.4.1.	<i>In silico coverage</i> der PAmpliSeq-Amplikons	60
3.4.2.	Protokoll-Entwicklung der PAmpliSeq-PCR	63
3.4.3.	<i>In vitro coverage</i> PAmpliSeq	64
3.4.4.	Vergleich Illumina Vollgenom-Sequenzierung mit PAmpliSeq-Methode	67
3.4.5.	Kinetik der PAmpliSeq-Vollgenom-Sequenzierung	69
3.5.	Echtzeit-Auswertung mittels VAmplSeeker und PAmpliSeeker	70
3.5.1.	Echtzeit-Analyse mit dem VAmplSeeker	71
3.5.2.	Echtzeit-Analyse mit dem PAmpliSeeker	73
3.6.	VAmplSeq – weitere Anwendungen	74
4.	Diskussion	77
4.1.	Diagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen	77
4.2.	Sensitivität der Illumina-Sequenzierung	78
4.3.	Sensitivität der VAmplSeq-Methode	80
4.3.1.	<i>In silico</i> Sensitivität der VAmplSeq-Methode	80
4.3.2.	<i>In vitro</i> -Sensitivität der VAmplSeq-Methode	81
4.3.3.	Sensitivität der VAmplSeq-Methode beim Screening der Patientenproben	81
4.4.	Spezifität der Illumina-Sequenzierung	82
4.4.1.	Detektion eines neuartigen Eichhörnchen-Pockenvirus	83
4.5.	Spezifität der VAmplSeq-Methode	84
4.6.	Bioinformatische Analyse von Illumina-Daten	86
4.7.	Bioinformatische Datenanalyse mittels VAmplSeeker und PAmpliSeeker	88
4.8.	Kontaminationen in der Illumina-Sequenzierung	89
4.9.	Kontaminationen bei der VAmplSeq-Methode	91
4.10.	Diagnostik pockenähnlicher Hautveränderungen – Studienproben	91
4.10.1.	Viren	91
4.10.2.	Bakteriome	92
4.10.3.	MinION-16S-Sequenzierung	93
4.10.4.	Fungiome	94
4.10.5.	Nicht diagnostizierte Proben	94
4.11.	Vollgenomsequenzierung mittels PAmpliSeq	95
4.12.	Zusammenfassung	96
5.	Ausblick – VAmplSeq als Tool in der Routinediagnostik	97
	Referenzen	100
	Supplements	112
	Abbildungen	114
	Tabellen	116
	Liste Publikationen	117

1. Einleitung

1.1. Pockenviren und virale Hautinfektionen

Die Pockenviren sind eine Familie von doppelsträngigen DNA (dsDNA)-Viren mit komplexen Genomen von bis zu 365 kbp Länge, darunter zahlreiche Spezies mit Humanpathogenität [1, 2]. Infektionen mit pockentypischen Hautläsionen beim Menschen werden durch zahlreiche Spezies der Genera *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Molluscipoxvirus* und *Yatapoxvirus* ausgelöst [3]. Der wohl bekannteste Vertreter der Orthopockenviren ist das Variolavirus, welches die humanen, „echten“ Pocken oder Blattern verursacht. Bei einer Letalität zwischen 20 % und 60 % war das Variolavirus noch Mitte des 20. Jahrhunderts in 33 Ländern endemisch und für mehr als 2 Millionen jährliche Todesfälle verantwortlich [4]. Seit 1980 ist das Variolavirus aufgrund einer globalen Impfkampagne extinkt, und Variolaviren werden offiziell nur noch in zwei Instituten zu Forschungszwecken gelagert (Centers for Disease Control, CDC, in Atlanta, USA, sowie am State Research Center of Virology and Biotechnology, VECTOR in Koltsovo, Russland). Dennoch kann das Vorhandensein nicht registrierter Virus-Stocks in weiteren Laboren und eine vorsätzliche Wiederverbreitung des Virus nicht ausgeschlossen werden [5-7].

Nach Abschluss der Eradikationskampagne und der zunehmend fehlenden Immunität in der Bevölkerung gegen das Variolavirus und damit auch einer fehlenden Kreuzprotektion gegen weitere Orthopockenviren wurden zunehmend Infektionen mit Affenpockenviren und Kuhpockenviren berichtet [8, 9]. Die Infektion mit Affenpocken beim Menschen ist einer Infektion mit den Variolaviren ähnlich, verläuft mit einer Letalität von bis zu 11 % jedoch milder [10, 11]. Im Gegensatz zum Variolavirus, welches ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen wird, sind Affenpockenviren zoonotisch [12]. Das Affenpockenvirus ist endemisch in Nagetieren in Zentral- und Westafrika; die erste humane Infektion wurde 1970 in der Demokratischen Republik Kongo (DRC) diagnostiziert, weitere Einzelfälle und kleinere Ausbrüche folgten [12, 13]. Erst seit einigen Jahrzehnten nimmt die Anzahl der registrierten Affenpockeninfektionen in Afrika exponentiell zu; in der DRC werden bereits mehr als 1000 jährliche Fälle diagnostiziert [9]. In Nigeria kam es 2017/2018 zu einem Ausbruch mit 132 bestätigten Fällen, nachdem in der Region seit 1978 keine Infektionen mit Affenpocken mehr registriert wurden [14, 15]. In den USA (2003), Israel (2018), dem Vereinigten Königreich (2018) und Singapur (2019) wurden humane Infektionen durch den Import von infizierten Nagetieren (USA) bzw. durch Reiserückkehrer berichtet [16-18].

Ein weiterer prominenter Vertreter der Orthopockenviren ist das Kuhpockenvirus. Bereits 1796 zeigte der britische Arzt Edward Jenner, dass die Inokulation mit Kuhpockenviren vor einer späteren Infektion mit Variolaviren schützt [19]. Obwohl ursprünglich mit klinischen Erkrankungen von Kühen und Melkerinnen assoziiert, sind Nagetiere der natürliche

Reservoirwirt der Viren [20, 21]. In den vergangenen Jahrzehnten wurden überwiegend in Europa zahlreiche Infektionen bei Menschen berichtet; die Übertragung des Virus erfolgte in den meisten Fällen durch den Kontakt mit Haustieren, insbesondere Katzen und Ratten [22-25]. Direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragungen sind nicht bekannt. Kuhpockenviren haben im Vergleich zu Variolaviren und Affenpockenviren eine geringe Pathogenität. Die Infektionen sind meist lokal begrenzt und selbstlimitierend; generalisierte und fatale Verläufe wurden jedoch bei immunsupprimierten Patienten berichtet [26-28].

Ursprung und natürlicher Wirt des als Impfstoff in der Variolavirus-Eradikationskampagne verwendeten Vacciniavirus sind nicht bekannt. Sequenzierungen und phylogenetische Analysen von Genomen verschiedener Orthopockenviren sowie historischer Variola-Impfstoffe deuten darauf hin, dass das Virus durch wiederholte Arm-zu-Arm-Übertragungen und kommerzielle Anzuchten aus dem Pferdepockenvirus, einem heute nicht mehr in der Natur vorkommenden Orthopockenvirus, hervorgegangen ist [29-31]. Natürliche Infektionen mit dem Vacciniavirus bei Menschen, Rindern, Nagetieren, Affen und Pferden wurden ausschließlich in Argentinien, Uruguay, Kolumbien und vor allem Brasilien diagnostiziert [32-36]. Vermutlich wurden die Vacciniaviren als Impfstoff über Arm-zu-Arm-Übertragungen nach Brasilien eingebracht und auf Nagetiere übertragen, welche heute als Reservoir für das Virus dienen [37-39].

Neben den Orthopockenviren sind die Molluscipockenviren ein weiteres Genus der *Poxviridae*, welche Pocken-Effloreszenzen hervorrufen können. Infektionen mit dem Molluscum-contagiosum-Virus treten global bei Kindern und jungen Erwachsenen auf und verursachen Läsionen an Gesicht, Oberkörper und Extremitäten [3]. Wie bei den Variolaviren ist der Mensch der alleinige Wirt des Molluscum-contagiosum-Virus; die Übertragung erfolgt durch direkten Hautkontakt [40]. Dabei kommt es im immunkompetenten Wirt zur Ausbildung von lokalisierten, selbst-limitierenden Papeln, seltener Noduli oder gutartigen Tumoren (Dellwarzen) [41].

Das Orf-Virus gehört zu den Parapockenviren, ein weiteres Genus in der Familie der *Poxviridae*. Die Übertragung der zoonotischen Viren erfolgt durch direkten Kontakt mit Schafen oder Ziegen; die Infektion verursacht lokalisierte Papeln und Noduli an den Händen und Armen, welche in frühen Stadien von lokalen Infektionen mit Orthopockenviren nur schwer unterscheidbar sein können [3, 42]. Ein weiteres zu den Parapocken gehörendes zoonotisches Virus ist das Pseudokuhpockenvirus, welches bei Kontakt mit infizierten Kühen übertragen wird und den sogenannten Melkerknoten verursacht [41].

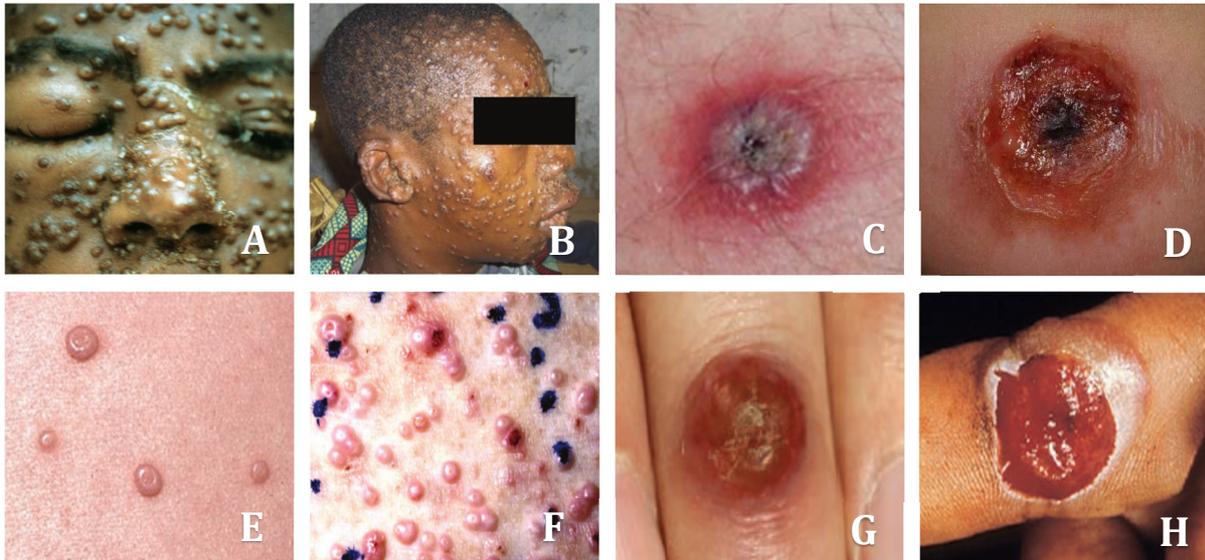


Abbildung 1: (A) Konfluente Pusteln im Gesicht eines mit Variola major infizierten Mannes [41]; (B) Vesikel und Pusteln im Gesicht eines mit Affenpocken infizierten Mannes [10]; (C) Vacciniavirus-Pustel nach Impfung [43]; (D) Kuhpockenvirus-Läsion (Konsiliarlabor für Pockenviren, Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene 1); (E) Typische Papeln durch eine Infektion mit dem Molluscum-contagiosum-Virus [41]; (F) Läsionen bei einem immunsupprimierten Patienten bei Infektion mit dem Molluscum-contagiosum-Virus, Ausbildung von hämorrhagischen Krusten [44]; (G) Humane Infektion mit dem Orf-Virus nach Kontakt mit Schafen [41]; (H) Melkerknoten verursacht durch das Pseudokuhpockenvirus [41].

1.2. Diagnostik und Differentialdiagnostik von pockentypischen Hautveränderungen

1.2.1. Krankheitsverlauf der Infektion mit Pockenviren

Die Manifestation einer Orthopockenvirus-Infektion durch Variolaviren, Affenpockenviren, Kuhpockenviren und Vacciniaviren geht mit charakteristischen Hauteffloreszenzen einher, welche zentrifugal am gesamten Körper (Variolaviren, Affenpockenviren) oder lokal begrenzt (Vacciniaviren, Kuhpockenviren) auftreten können [10, 11]. Die Hautläsionen treten etwa 3 Tage (Vacciniaviren), 7 Tage (Kuhpockenviren) und 14 Tage (Variolaviren, Affenpockenviren) nach der Infektion auf und durchlaufen die charakteristischen Stadien Macula (Farbveränderung ohne Substanzunterschied), Papula (Papel oder Knötchen, tastbare Erhabenheit), Vesicula (flüssigkeitsgefüllte Bläschen) und Pustula (Pusteln, Eiteransammlung in epidermalemem Hohlraum), gefolgt von der Bildung einer Kruste und einer anschließenden Vernarbung [11, 41]. Ein wichtiges charakteristisches Merkmal zur Diagnostik ist die synchrone Progression der Läsionen bei der Variola- und Affenpockenvirus-Infektion [41]. Begleitende Symptome sind hohes Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen (Variolaviren, Affenpockenviren) oder grippeähnliche Krankheitserscheinungen (Vacciniaviren, Kuhpockenviren). Die Manifestation einer Affenpockenvirus-Infektion ähnelt den echten Pocken durch Variolaviren, verläuft jedoch milder und geht mit einer Lymphadenopathie einher [10]. Bei fatalen Verläufen einer Infektion mit Variolaviren kann es zu hämorrhagischen Ulzerationen sowie Blutungen in Binde- und Schleimhaut sowie dem Intestinaltrakt kommen [45].

Infektionen mit dem Orf-Virus und dem Molluscum-contagiosum-Virus verlaufen meist mild, lokal begrenzt, selbstlimitierend und ohne begleitende Krankheitssymptome. Die durch Orf-Viren und Pseudokuhpockenviren verursachten Läsionen sind klinisch identisch. Nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen kommt es zur Ausbildung von Papeln, gefolgt von Pusteln und Noduli [46]. Die charakteristischen Noduli können dabei einen Durchmesser von bis zu 6 cm erreichen [47].

Nach einer Infektion mit dem Molluscum-contagiosum-Virus kommt es nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen bis mehreren Monaten zur Ausbildung der Hautveränderungen. Bei immunkompetenten Patienten bilden sich durchschnittlich 10-20 glatte, genabelte Papulen mit einer Größe von 1 mm bis 1 cm. Die Rückbildung erfolgt spontan nach mehreren Monaten bis zu mehreren Jahren [48]. Zu Beginn der Regressionsphase kann es zu einer Schwellung und Rötung der Läsionen kommen [49]. Bei immunsupprimierten Patienten, z.B. bei einer HIV-Infektion, kann es zur Ausbildung von größeren Läsionen (Giant Molluscum contagiosum) oder zu einer Konfluenz kommen [50, 51].

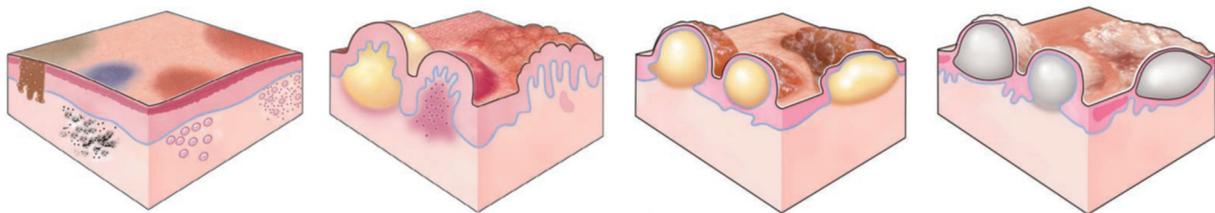


Abbildung 2: Die durch Orthopockenviren verursachten Hautläsionen durchlaufen die charakteristischen Stadien Macula, Papula, Vesicula und Pustula [41]. Bei der Macula handelt es sich um eine nicht tastbare Farbveränderung ohne Erhebung, bei der Papula kommt es zu einem tastbaren Substanzunterschied der Hautoberfläche. Die Vesicula ist ein mit Serum oder Blut gefüllter, meist transparenter Hohlraum der Dermis oder Epidermis. Bei Pustulen handelt es sich um mit Eiter gefüllte Hohlräume.

1.2.2. Differentialdiagnostik pockenähnlicher Hautveränderungen

Die klinische Identifizierung der durch Infektionen mit Erregern verursachten Hautveränderungen ist in den verschiedenen Stadien nicht immer eindeutig. Zur Differentialdiagnostik gehören daher zahlreiche virale und bakterielle Erreger.

Die Spezies der humanen Herpesviren (dsDNA) können die gesamte Haut und Schleimhaut infizieren. Kutane Infektionen mit Herpes Simplex Virus Typ 1 sowie Varizella-Zoster-Virus (Herpes Simplex Virus Typ 3) präsentieren sich gewöhnlich als gruppierte Vesikel [3]. Bei der primären Infektion kann jedoch ein maculopapulärer Hautausschlag auftreten [52]. Die durch das Varizella-Zoster-Virus verursachten und als Windpocken bzw. Gürtelrose bekannten Erkrankungen können in ihrer Morphologie und Distribution Infektionen mit Affenpockenviren ähneln, zudem können sich die Vesikel hämorrhagisch entwickeln [53]. Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (Humanes Herpesvirus Typ 4) können ebenfalls mit einem maculopapulärem

Hautausschlag an Rücken, Arm und Gesicht einhergehen [54]. Die humanen Herpesviren 6 und 7 können das „3-Tage-Fieber“ (Exanthema subitum) verursachen, welches von einzelnen oder konfluenten Macula und Papeln von bis zu 5 mm Durchmesser am Rücken begleitet wird [41]. Infektionen mit Papillomaviren (dsDNA) manifestieren sich als Warzen oder Zellkarzinome auf der gesamten Haut und Schleimhaut, können in ihrer Progression jedoch auch als Papeln auftreten [41]. Mehr als 120 Spezies der humanen Papillomaviren sind bekannt [55].

Weitere in der Differentialdiagnostik zu berücksichtigende Viren, welche einen gruppierten oder konfluenten Hautausschlag mit Rötung (*rash*) hervorrufen, sind Enteroviren (single-stranded RNA – ssRNA) (Hand-Fuß-Mund-Krankheit), das Parvovirus B19 (ssDNA), das Masernvirus (ssRNA) sowie das Rötelnvirus (ssRNA). Bei Reiserückkehrern aus den Tropen mit einem *rash* ist zudem eine Infektion mit den RNA-Viren Dengue-Virus, Zika-Virus, Chikungunya-Virus, West-Nil-Virus oder weiteren hämorrhagischen Fieber-Viren möglich [40].

Auch zahlreiche bakterielle Erreger können pockenähnliche Hautveränderungen hervorrufen, unter anderem *Bacillus anthracis* (Milzbrand), *Bartonella henselae* (Cat Scratch Disease), durch Rickettsien hervorgerufene *spotted fever*, *Staphylococcus aureus* (Impetigo) sowie *Treponema pallidum* (Syphilis) [41].

Zur weiteren Differenzialdiagnostik gehören Insektenbisse und -stiche, parasitäre Infektionen, Immunerkrankungen, endokrine Störungen, metabolische Erkrankungen, Allergien, Krebserkrankungen sowie Reaktionen auf die Einnahme von Drogen [41].

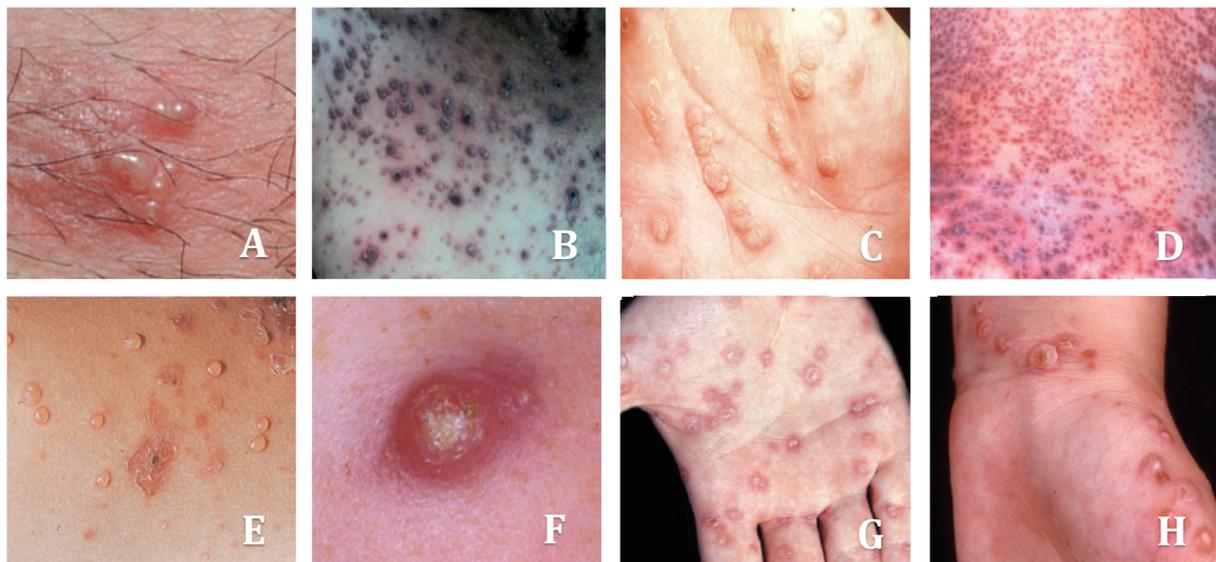


Abbildung 3: (A) Typische durch Herpes Simplex Virus Typ 1 verursachte Vesikel; (B) Hämorrhagischer Verlauf einer Varizella-Zoster-Infektion [53]; (C) Kutane Infektion mit humanem Papillomavirus (Typ 7) [56]; (D) *rash* ausgelöst durch Dengue hämorrhagisches Fieber-Virus [41]; (E) *Staphylococcus aureus* (Impetigo) [41]; (F) Cat Scratch Disease (*Bartonella henselae*); *Treponema pallidum* (sekundäre Syphilis) [41]; (H) Insektenbisse

1.2.3. Labordiagnostik pockenähnlicher Hautveränderungen

Pockenviren und Erreger der Differentialdiagnostik können mit direkten oder indirekten Labormethoden nachgewiesen werden [57]. Als Probenmaterial für den direkten Nachweis eignen sich Abstriche, Vesikelflüssigkeit oder Krusten, für den indirekten Nachweis Serum [11]. Klassische Diagnostikmethoden für Pockenviren beruhen auf der Anzucht der Viren aus dem Probenmaterial in Zellkultur oder Hühnerembryos [58]. Die charakteristischen zytopathischen Effekte bzw. Läsionen auf der Chorioallantoismembran können Hinweise auf eine Infektion mit Pockenviren geben, eine Unterscheidung der Pockenvirus-Spezies ist jedoch schwierig.

Zu den indirekten Methoden gehört der serologische Nachweis von pockenspezifischen Antikörpern durch Methoden wie das Immunfluoreszenz-Assay oder ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [59]. Akute Infektionen sind jedoch mit dieser Methode schwer nachweisbar, da Antikörper frühestens bei Beginn der Symptomatik gebildet werden und eine Verlaufs-Untersuchung notwendig ist [57].

Eine Methode zum direkten Nachweis von viraler Nukleinsäure und zur Speziesunterscheidung auf DNA-Ebene stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dar [60]. Hierbei wird mit der Verwendung von zur Zielregion komplementären Primern eine spezifische Region der viralen Nukleinsäure in einer Probe mithilfe einer DNA-Polymerase amplifiziert [61]. Bei RNA-Viren ist die vorangehende enzymatische Umschreibung der RNA in DNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) notwendig [62, 63]. Anschließend kann der exponentiell vervielfältigte Sequenzabschnitt in einer Gelelektrophorese oder real-time mit der Messung von Fluoreszenzsignalen (qPCR) nachgewiesen werden [64, 65]. Dabei ist theoretisch nur ein einziges virales Genom für den Nachweis in einer komplexen Probe notwendig. Die PCR ist damit höchst spezifisch und sensitiv; es können jedoch auch generische Primer für den Nachweis von viralen Genera oder Familien verwendet werden [66-68]. Eine Möglichkeit zur simultanen Detektion mehrerer Spezies in einer Probe stellt die Multiplex-PCR dar. Hierbei können verschiedene Primer für unterschiedliche Spezies in einem PCR-Ansatz kombiniert werden [69-71]. Jedoch ist die mögliche Anzahl an Primerpaaren begrenzt, da die generierten Amplikons entweder durch ihre Größe im Gel, durch fluoreszenzmarkierte Sonden oder durch unterschiedliche Schmelztemperaturen differenziert werden müssen.

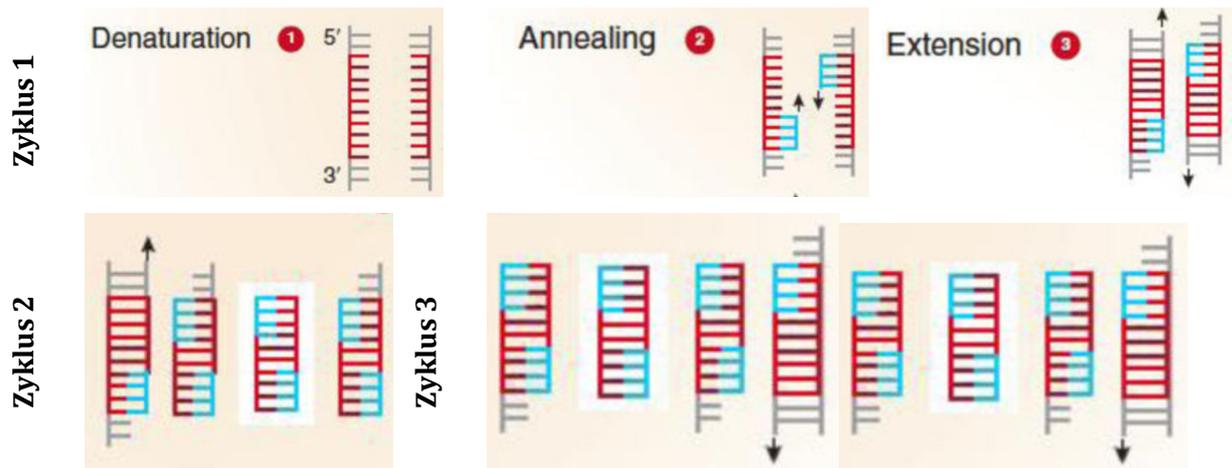


Abbildung 4: Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) ermöglicht die Vervielfältigung einer spezifischen viralen DNA-Sequenz in einer komplexen Probe und damit deren Nachweis. Für die PCR-Reaktion werden eine *template* DNA, spezifische Oligonukleotide (Primer), Nukleotide und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt. In einem PCR-Zyklus wird die Doppelstrang-DNA in ihre einzelnen Stränge denaturiert (Denaturierung). Spezifische Oligonukleotide (Primer) binden dann an die komplementäre Sequenz in der zu amplifizierenden DNA (Annealing). Im Extensionsschritt werden die zum DNA *template* komplementären Nukleotide durch eine DNA-Polymerase entlang der DNA-Orientierung 5'-3' inkorporiert. Der Zyklus wird bis zu 45-mal wiederholt, sodass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des spezifischen DNA-Abschnittes kommt. RNA-Viren können durch eine der PCR vorangehende Umschreibung der RNA in DNA nachgewiesen werden. Abbildung aus [61].

1.3. Second Generation Sequencing

300 Mio. US Dollar und 15 Monate Arbeitszeit mussten investiert werden, um 1999 das erste humane „draft“ Genome von 3,2 Giga-Basen Länge im Rahmen des Human Genome Projects sequenzieren zu können [72]. Die Entwicklung von Sequenzier-Plattformen, wie dem Illumina (San Diego, CA), machte es nur zehn Jahre später möglich, individuelle humane Genome für erstmals unter \$100,000 zu sequenzieren [73]. Weitere zehn Jahre später ist 2019 die Vision des \$1000-Genoms Realität und tausende humane Genome wurden im Rahmen zahlreicher Forschungsprojekte sequenziert [73-76].

Möglich wurde dies durch die Entwicklung der Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS) oder des Next Generation Sequencing (NGS). Hierbei handelt es sich um eine Technologie, die eine massive parallele und ungerichtete Sequenzierung der gesamten DNA einer Probe ermöglicht [77]. Auch zahlreiche virale Genome konnten mit dieser Methode sequenziert werden, darunter auch Genome zuvor nicht bekannter Erreger [78]. Neue Technologien, wie der Illumina NovaSeq, generieren in nur einem Lauf innerhalb weniger Tage bis zu 20 Milliarden Sequenzen und 50 Tera-Basenpaare [79].

In der nun fast 15-jährigen Entwicklung der Technologie des NGS hat sich vor allem der „Sequencing by Synthesis“ (SBS)-Ansatz durchgesetzt, mit Illumina als der marktführenden Plattform. Hierbei handelt es sich um eine DNA-Polymerase-abhängige und zyklisch reversible Termination (CRT)-Methode [80]. Ähnlich wie bei der Sanger-Sequenzierung kommen hier Fluorophor-markierte Terminator-Desoxynukleotide (dNTPs) zum Einsatz, welche bei der

Synthese aufgrund ihrer fehlenden 3'Hydroxygruppe (OH) reversibel blockiert sind und somit keine Elongation ermöglichen. Bei jedem Zyklus der Sequenzierung kann somit das Fluoreszenzsignal des in den DNA-Doppelstrang inkorporierten Nukleotids detektiert werden, und der nächste Zyklus beginnt, indem die OH-Gruppe regeneriert und die Inkorporation des nächsten dNTPs ermöglicht wird [80].

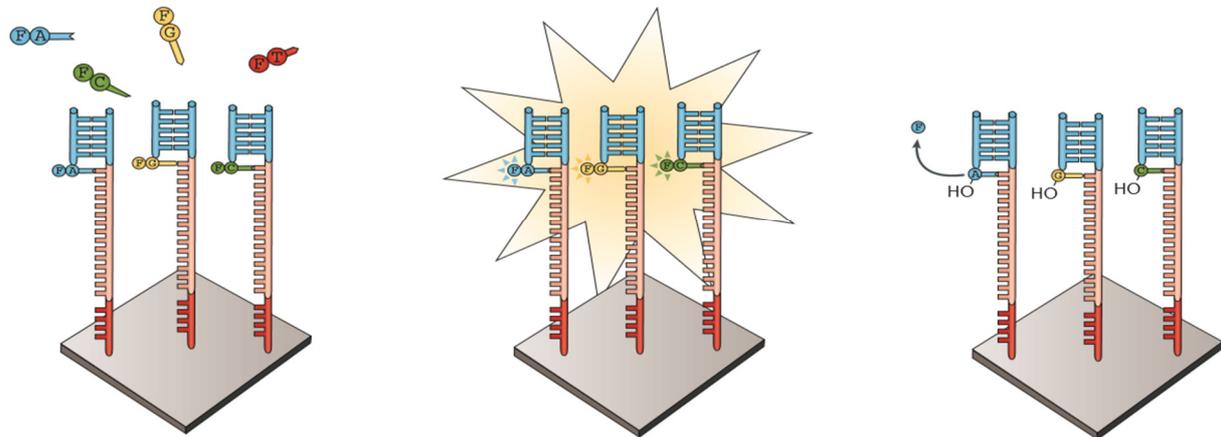


Abbildung 5: Darstellung der *Cyclic Reversible Termination*-Methode. Je Sequenzier-Zyklus werden die 3'OH blockierten und spezifisch Fluoreszenz-markierten dNTPs komplementär an den zu sequenzierenden DNA-Strang gebunden. Nach jedem Zyklus wird das Fluoreszenzsignal detektiert und die 3'OH-Gruppe regeneriert, sodass sich der Zyklus wiederholen kann. Abbildung aus [80].

Die beschriebene Sequenzierung und Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgt hierbei hochparallel. So werden nicht wie bei der Sanger-Methode einzelne, sondern bis zu 20 Milliarden (Illumina NovaSeq) DNA-Fragmente sequenziert. Charakteristisch ist hierbei die geringe Länge der Sequenzen oder *reads*, welche 50-250 Basen beträgt.

Für die Sequenzierung wird die extrahierte und aufgereinigte DNA einer Probe zunächst in kurze Abschnitte fragmentiert, ein Prozess, der mechanisch oder enzymatisch erfolgt [81]. Bei der in der Illumina *Library*-Präparation (Vorbereitung der DNA einer Probe für die Sequenzierung) häufig angewandten enzymatischen Methode handelt es sich um eine Tagmentation, bei der eine Transposase die DNA schneidet und gleichzeitig die für anschließende Cluster-Bildung und Sequenzierung notwendigen Adapter-Sequenzen in den DNA-Doppelstrang integriert [82].

Aus den ligierten DNA-Fragmenten werden anschließend Cluster generiert. Dieser Schritt erfolgt bereits auf der *flow cell*, einem Glas-Substrat mit milliardenfachen *nanowell*-Strukturen, auf der die Sequenzierung erfolgt. Die Oberfläche der *nanowells* auf der *flow cell* ist dabei mit Primern beschichtet, welche komplementär zu den an die DNA ligierten Adaptern sind. In einem als *bridge amplification* bezeichneten Prozess bindet dann der an ein einzelnes DNA-Fragment ligierte Adapter an den komplementären Primer der *flow cell*, von dem ausgehend eine DNA-abhängige DNA-Polymerase einen Doppelstrang synthetisiert [83]. Auch die nicht gebundenen, freien, Adapter-ligierten Enden des DNA-Doppelstrangs binden anschließend in einer Brücken-

Formation an umliegende, an die *flow cell* gebundene Primer. So entsteht nach mehreren Amplifikations-Zyklen auf jedem *nanowell* ein klonales Cluster eines spezifischen DNA-Fragments. An jedes klonale Fragment bindet nach Abschluss der Cluster-Bildung der Primer für die Sequenzierung, und nach Inkorporation der Fluoreszenz-markierten dNTPs kann für jedes Cluster ein intensives spezifisches Fluoreszenz-Signal detektiert werden [84].

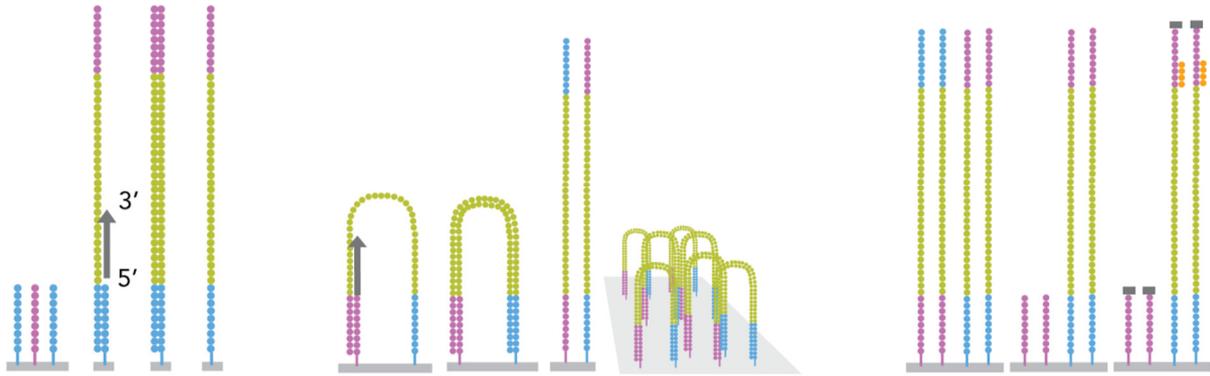


Abbildung 6: Ablauf der Cluster-Generierung durch *bridge amplification*. Im ersten Schritt hybridisiert ein DNA-Einzelstrang komplementär mit einem an die *flow cell* gebundenen Primer und es wird ein DNA-Doppelstrang synthetisiert. Das DNA-Template dissoziiert anschließend und die *bridge amplification* beginnt. Dabei hybridisiert das freie Ende des DNA-Stranges mit einem zweiten, an die *flow cell* gebundenen Primer, und unter einer Brückenbildung wird erneut ein Zweitstrang synthetisiert. Beide Enden des neu synthetisierten Doppelstranges hybridisieren an benachbarte Primer, und nach mehreren Zyklen entsteht somit ein Cluster an klonalen DNA-Fragmenten. Nach Abschluss der Cluster-Bildung wird der jeweilige *reverse*-Strang entfernt und der Sequenzierprimer bindet an das 3'-Ende des *forward*-Stranges. Die Sequenzierung beginnt. Abbildung von www.illumina.com.

1.4. Third Generation Sequencing

Neben der HTS oder Second Generation Sequencing-Technologie, welche im Hochdurchsatz massiv parallel Sequenzen mit maximal 600 Basen Länge generiert, handelt es sich beim Third Generation Sequencing um Plattformen, welche die Komposition einzelner DNA-Moleküle von bis zu 2 Megabasen Länge Polymerase-unabhängig analysieren können [85, 86].

Seit 2014 findet sich der MinION von Oxford Nanopore Technologies inner- und auch außerhalb vieler Labore, ein mobiler, handtellergrößer Sequenzierer [87]. Während beim HTS die generierten Sequenzen geringer Länge nach der Sequenzierung mittels bioinformatischer Methoden zu kontinuierlichen Sequenzen assembliert werden müssen und dabei komplexe oder repetitive Genomregionen problematisch und häufig nicht rekonstruierbar sind, kann der MinION gesamte Gene oder Genome zusammenhängend analysieren [88]. Neben der Länge der generierten Sequenzen und der Mobilität des Gerätes hat der MinION gegenüber der SBS-Methode einen weiteren Vorteil: Die Sequenzierung erfolgt in Echtzeit und generierte Daten können schon in den ersten Minuten analysiert werden [89]. Auch die Präparation der *Library* erfolgt ohne zeitaufwändige Amplifikations- und Cluster-Generierungsschritte innerhalb von

nur 60 min; neuere Kits für die Anwendung im Feld ermöglichen die Präparation in nur 10 min [90, 91].

Die Entwicklung der MinION-Sequenzierung hat damit völlig neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Detektion von Pathogenen sowie der Untersuchung von viralen Ausbrüchen eröffnet. So konnten während des Ebolavirus-Ausbruchs 2014 in Westafrika oder während eines Lassavirus-Ausbruchs in Nigeria 2018 zahlreiche virale Genome in Echtzeit und in Laboratorien mit geringer Ausstattung sequenziert werden [92-94]. Dies ermöglichte neben der Virusdetektion detaillierte Analysen der Genome zur phylogenetischen Einordnung und zur Aufklärung der Infektionsketten. Auch in der Antarktis und im Weltraum wurden bereits Sequenzierungen durchgeführt [95, 96].

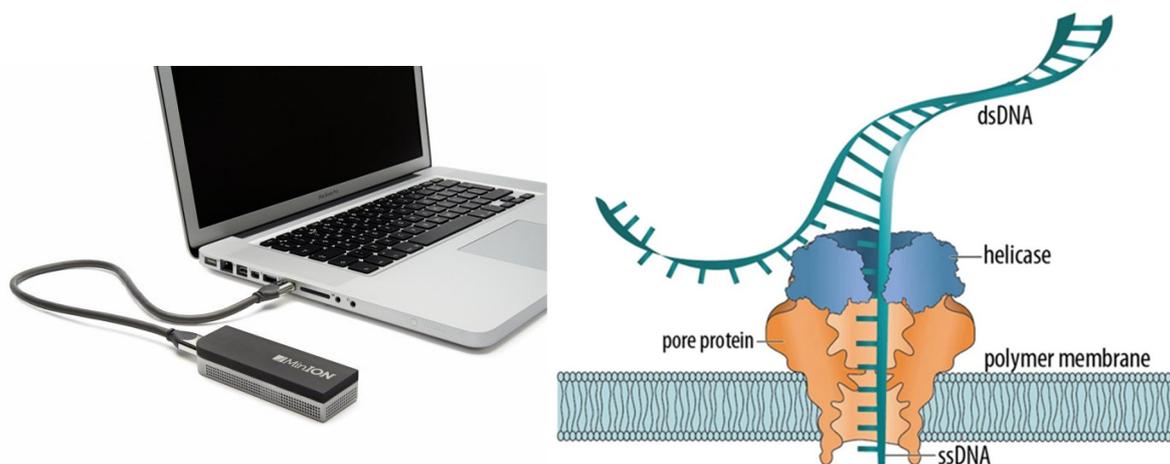


Abbildung 7: Der MinION von Oxford Nanopore Technologies ist ein handtellergroßer, mobiler Sequenzierer, welcher in Echtzeit die Sequenz eines DNA-Moleküls analysieren kann. Ein einzelner Strang einer doppelsträngigen, Adapter-ligierten DNA wird mithilfe eines Motorproteins durch eine Nanopore innerhalb der MinION *flow cell* geleitet. Die sich in der Pore befindende DNA-Sequenz wird durch eine spezifische Spannungsänderung an der *flow cell* interpretiert. Abbildung aus [96].

Für die MinION-Sequenzierung wird zunächst ein Adapter an die DNA einer Probe ligiert. Dieser Adapter wird benötigt, um die doppelsträngige DNA mit einer biologischen Nanopore, welche in die Membran der MinION *flow cell* integriert ist, in Kontakt zu bringen. Eine *flow cell* besteht aus 512 solcher Nanoporen, durch welche elektrischer Strom geleitet wird. Bei der Adaptervermittelten und durch ein Motorprotein ermöglichten Translokation des DNA-Stranges durch die Pore kommt es zu messbaren Änderungen der Spannung, welche abhängig ist von den Basen, welche sich in der Pore befinden [87, 97]. Die Technologie kann dabei mehr als 1000 Signale der Spannungsänderungen als spezifische Nukleotide interpretieren. Die Fehlerfreiheit einer solchen Interpretation beträgt dabei mittlerweile bis zu 95 % und der Output mehrere Millionen Sequenzen.

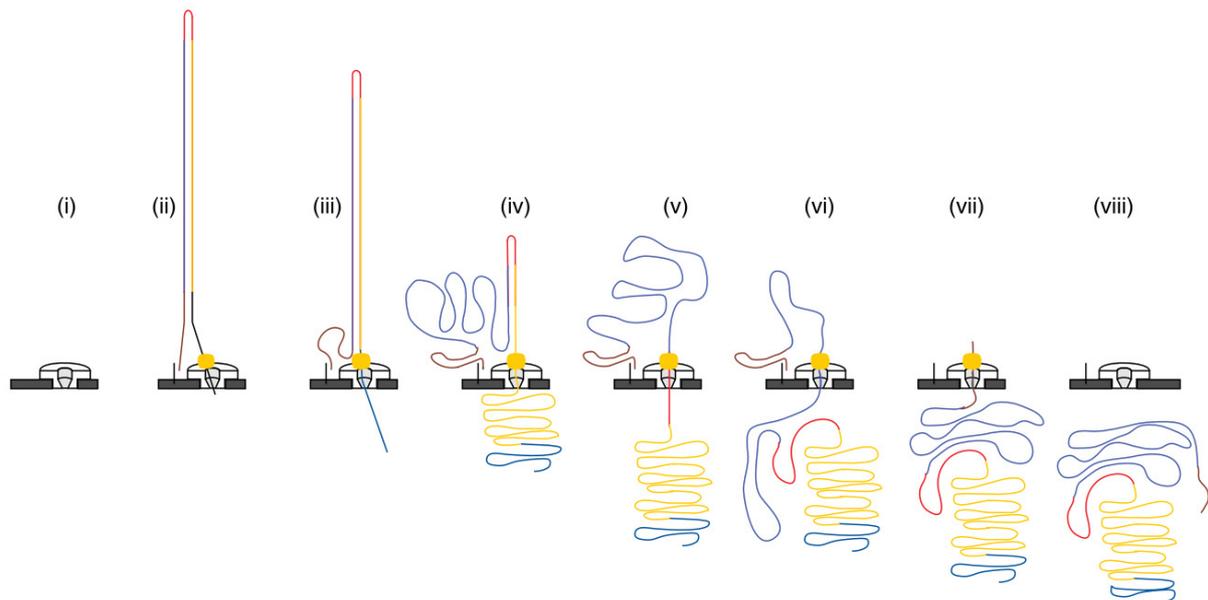


Abbildung 8: Sequenzierung von Doppelstrang-DNA (2D-Sequenzierung) durch die Nanopore: (i) einzelne Nanoporen in der Membran der *flow cell* des MinION; (ii) dsDNA mit einem *lead*-Adapter (blau), einem Motorprotein (gelb) und einem *hairpin*-Adapter (rot) wird in Kontakt mit der Nanopore gebracht. (iii) Die Translokation durch die Nanopore beginnt mit dem *lead*-Adapter, (iv) gefolgt vom *template*-Strang, (v) *hairpin*-Adapter, (vi) dem komplementären Strang, (vii) und dem *trailing*-Adapter; (viii) die Nanopore ist bereit für die Sequenzierung eines weiteren DNA-Moleküls. Abbildung aus [98].

1.5. Virale Metagenomik

Die Metagenomik ist die Analyse der Gesamtheit aller Genome einer mikrobiellen Gemeinschaft einer Probe, generiert aus einer *shotgun*-HTS [99, 100]. Dabei sind der Auswahl des zu analysierenden Habitats keine Grenzen gesetzt, und Metagenome wurden von Ozeanen, Erde, Abwasser und zahlreichen Lebewesen analysiert [101-103].

Die virale Metagenomik ist die Gesamtheit aller Genome der sequenzierten Viren in einer Probe [104]. Die *shotgun*-Sequenzierung ermöglicht, neben dem Screening von klinischen Proben auf eine Vielzahl von spezifischen Pathogenen, auch einen unspezifischen Blick auf die Gesamtheit aller Viren und damit die ungerichtete Detektion von neuartigen Erregern [78, 105, 106]. So hat die Sequenzierung von Patientenmaterial zur Detektion von Viren bei Krankheiten unklarer Genese geführt, darunter das Bas-Congo-Virus aus einem Ausbruch hämorrhagischen Fiebers in Zentralafrika, Lujo-Arena-Virus in Südafrika und ein neuartiges Bornavirus aus mehreren Fällen einer Enzephalitis in Deutschland [107-109]. Auch die MinION-Sequenzierung wurde bereits für die Metagenomanalyse und zur Detektion von Dengue-Virus, Chikungunya-Virus und Influenza-Virus aus Patientenproben angewendet [110-112].

1.5.1. Mikrobiome der Haut

Die Oberfläche der Haut ist von einer Vielzahl unterschiedlicher Viren, Bakterien und Fungi besiedelt, welche in ihrer Gesamtheit das Mikrobiom der Haut bilden. Das Mikrobiom der Haut

spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen, der Ausbildung des Immunsystems und dem Aufbau von Stoffwechselprodukten [113, 114].

Die Zusammensetzung des Haut-Mikrobioms unterscheidet sich signifikant zwischen verschiedenen Individuen, Zeitpunkten, äußeren Einflüssen und verschiedenen Körperregionen. So besiedelt *Propionibacterium spp.* überwiegend talgige (*sebaceous*) Körperregionen wie das Gesicht, *Staphylococcus spp.* eher feuchtere Körperregionen wie die Armbeuge [115].

Neben den Bakterien ist die Haut von verschiedenen Fungi besiedelt, darunter *Malassezia spp.*, *Aspergillus spp.* und *Cryptococcus spp.*

Zahlreiche Viruspezies der *Microviridae* und *Siphoviridae* (Bakteriophagen), *Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae* und *Circoviridae* konnten in humanen Haut-Mikrobiomen detektiert werden und bilden das gesunde, asymptomatische Haut-Mikrobiom [115-117]. Unter anderem konnten durch die Metagenomsequenzierung 396 verschiedene Papillomaviren auf humaner Haut detektiert werden, deren Rolle in Krankheit und Gesundheit unklar ist [118]. Zu Hauterkrankungen kommt es häufig erst, wenn die Hautbarriere nicht mehr intakt ist oder wenn das Gleichgewicht zwischen kommensalen Erregern und Pathogenen gestört ist [115].

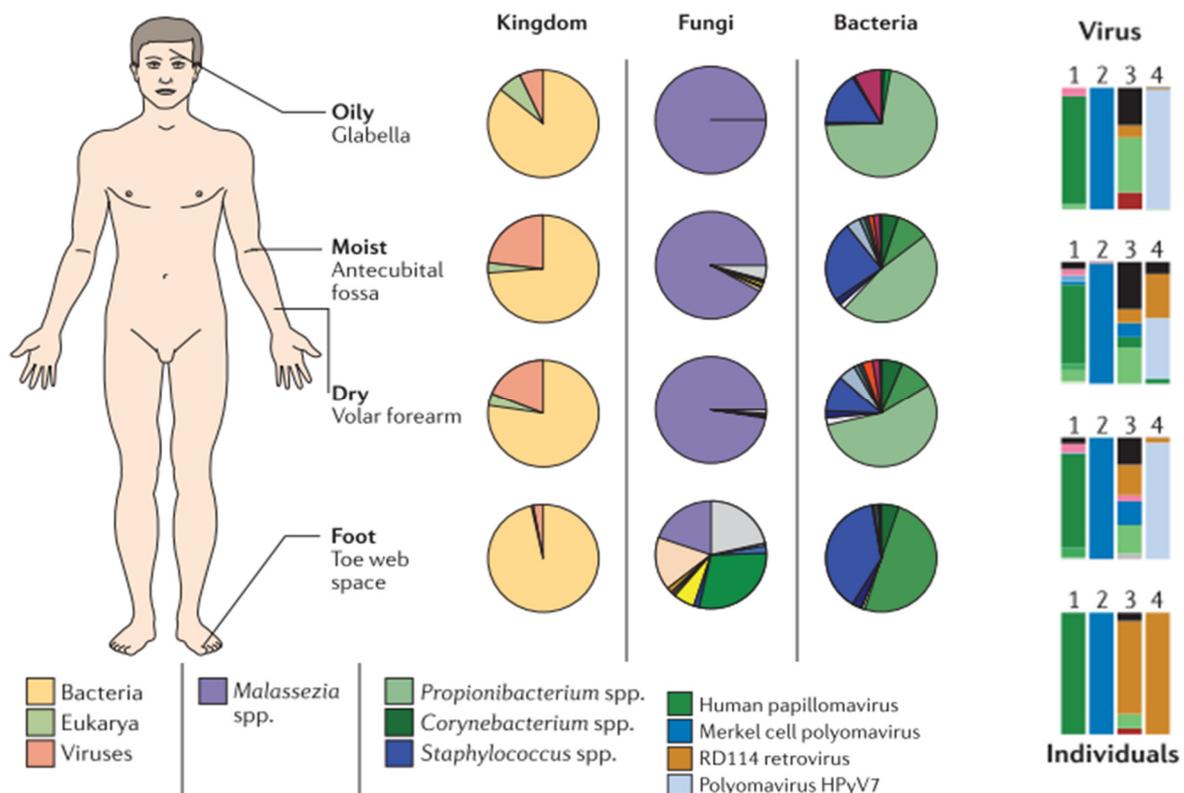


Abbildung 9: Das Mikrobiom der humanen Haut ist aus verschiedenen Bakterien, Eukaryoten und Viren zusammengesetzt. Dabei unterscheidet sich die Zusammensetzung des Mikrobioms zwischen Individuen und Körperregionen. Abbildung aus [115].

1.6. Target Enrichment

Neben den positiven Entwicklungen und Möglichkeiten sowohl der Illumina- als auch der MinION-Sequenzierung im Bereich der Erregerdiagnostik haben beide Plattformen einen entscheidenden Nachteil – ihre geringe Sensitivität. Im Vergleich zum Goldstandard der Nukleinsäure-basierten Detektion, der PCR, kann eine geringe virale Konzentration in einer Probe daher meist nicht detektiert werden. Während bei einer PCR meist nur wenige Genomäquivalente in einem Reaktionsansatz durch die spezifische Amplifikation vermehrt und nachgewiesen werden können, besteht ein HTS-Datensatz neben den gesuchten Genomen aus einem hohen Anteil von Hintergrund-DNA, darunter die DNA des beprobten Patienten sowie des gesamten Mikrobioms. Zahlreiche Labormethoden wurden entwickelt, um das Verhältnis zwischen viraler DNA/RNA und Hintergrund-DNA/-RNA in einer Probe zu Gunsten des Erregers zu verbessern. Ein Ansatz ist die Anreicherung der viralen Partikel bei gleichzeitiger Abreicherung des Hintergrundmaterials [119, 120]. Dabei können virale Partikel, z.B. durch Ultrazentrifugation, angereichert werden und die DNA des Hintergrundes durch DNA-Verdau oder Filtration verringert werden.

Ein Ansatz zur Anreicherung der viralen DNA ist die Hybridisierung (*Capture*) von viraler DNA in einer Probe durch komplementäre *probes* vor oder nach der *Library*-Präparation [121-124]. Dabei handelt es sich jedoch um eine gezielte Anreicherung, da die Sequenz der zu hybridisierenden DNA bekannt sein muss.

Bei einer Anreicherung der viralen DNA/RNA durch spezifische oder *random* Primer, z.B. bei der SISPA (*sequence-independent single primer amplification*) werden spezifische, mit *random* Hexameren verlinkte Adapter während der cDNA-Synthese in die synthetisierte DNA eingebracht [125]. Mit zu den Adaptersequenzen komplementären Primern kann die virale cDNA dann amplifiziert werden. Die Methode wurde bereits sowohl für zahlreiche Illumina-Sequenzierungen als auch für MinION-Sequenzierungen verwendet. So konnten vor der MinION-Sequenzierung die Genome von Chikungunya-Virus, Ebola-Virus und Hepatitis-C-Virus angereichert werden und eine Sequenzierung der vollen Genome ermöglicht werden [86].

Für die Anreicherung von viraler Zikavirus-RNA aus Patientenproben für die MinION-Sequenzierung wurden spezifische Primer für das gesamte Genom entwickelt und vor der Sequenzierung in einer PCR eingesetzt [126]. Damit eignet sich die Methode jedoch ausschließlich zur spezifischen Anreicherung von viraler DNA oder RNA.

1.7. Bioinformatische Datenanalyse

Bei der HTS einer Patientenprobe entstehen große Datenmengen und die Information eines solchen Datensatzes muss mit bioinformatischen Methoden analysiert werden. Je nach

Sequenzier-Plattform und -Methode können für eine einzelne Patientenprobe mehrere Milliarden Sequenzen mit nur wenigen hundert Basenpaaren Länge generiert werden.

Im Gegensatz zur PCR, welche durch die Verwendung einzelner oder mehrerer spezifischer Primer eine zuvor formulierte Hypothese bestätigt oder auch widerlegt, eröffnet die HTS einen kompletten Einblick in das gesamte Metagenom eines beprobten Individuums. Dazu gehören neben eventuell pathogenen Erregern auch kommensale Viren, Bakterien und Fungi sowie das Genom des Wirtes und Kontaminationen aus Reagenzien oder dem Labor. Die Analyse eines solchen Datensatzes erfordert nicht nur eine hohe Computer-Kapazität, sondern ebenso sowohl bioinformatische als auch klinische Fachkenntnisse.

1.7.1. Bioinformatische Analyse von Illumina-Daten

Um die bioinformatische Analyse zu vereinfachen und auch Anwendern aus allen Forschungsfeldern und auch ohne bioinformatische Kenntnisse zugänglich zu machen, wurden unzählige Tools, Workflows und Pipelines entwickelt, von denen einige mithilfe einer Grafischen Oberflächenanwendung (*Graphical User Interface*, GUI) anwendbar sind.

Workflows für die bioinformatische Sequenzanalyse sind meist eine Abfolge verschiedener Schritte zur Bearbeitung des Datensatzes, darunter das Qualitätstrimming, die Subtraktion der Sequenzen der Wirts-DNA, ein *de novo assembly*, ein Sequenz-Alignment gegen eine Referenzdatenbank und die anschließende taxonomische Zuordnung und Visualisierung der Ergebnisse.

Die Bearbeitung beginnt obligatorisch mit einer Bewertung der Qualität und einem *trimming*-Schritt durch Programme wie FastQC und Trimmomatic, bei welchem *reads* mit geringer Qualität und Länge sowie Adapter-Sequenzen entfernt werden [127, 128]. Anschließend beinhalten viele Workflows eine Subtraktion der Hintergrund-DNA einer Probe (bei Viromanalysen z.B. humane oder bakterielle DNA), um die Gesamtanzahl an Sequenzen zu reduzieren und die *downstream*-Prozesse zu vereinfachen. Das Sequenz-Alignment ist eine Methode, um einzelne Nukleotide oder Aminosäuren zweier DNA- oder Aminosäure-Sequenzen linear und paarweise so anzuordnen, dass die Übereinstimmung zwischen den beiden Sequenzen an möglichst vielen Positionen vollständig oder ähnlich ist. Dabei kommen Alignment-Tools wie BWA (Burrows-Wheeler Alignment Tool) oder Bowtie2 zum Einsatz [129, 130].

Es konnte gezeigt werden, dass die optionale *de novo*-Assemblierung, um aus den kurzen Sequenzen längere, kontinuierliche Sequenzen (*Contigs*) zu generieren, die Sensitivität bei der Identifizierung von viralen Sequenzen erhöhen kann. Häufig verwendete Programme sind SPAdes oder VELVET [131, 132].

Alignment-Programme wie BLAST, DIAMOND, Kraken und Usearch sind die wichtigsten Komponenten im bioinformatischen Workflow zur Identifizierung von viralen Sequenzen [133-

136]. Diese Programme ermöglichen das Alignment von mehreren Millionen Sequenzen mit Referenzdatenbanken, z.B. des humanen Genoms oder bakteriellen und viralen Genomen innerhalb weniger Stunden. Dabei wird unterschieden in Nukleinsäure-Alignments, welche die Nukleotid-Sequenzen eines Datensatzes mit einer DNA-Datenbank aligniert, oder Aminosäure-Alignments, bei denen die Nukleotid-Sequenzen in alle sechs möglichen Aminosäure-Sequenzen umgeschrieben und gegen eine Aminosäure-Referenzdatenbank aligniert wird. Dabei ist das Aminosäure-Alignment wesentlich sensitiver als ein Alignment auf Nukleotidebene und kann divergente und mutierte Virusgenome detektieren. Da Kommandozeilen-Programme für die Analyse von NGS-Daten Fachkenntnisse in der Bioinformatik voraussetzen, wurden komplette Workflows und Pipelines für die automatische Auswertung entwickelt, darunter RIEMS (Reliable Information Extraction from Metagenomic Sequence datasets), PAIPLine (Pipeline for the Automatic Identification of Pathogens) und Genome Detective [137-139].

1.7.2. Bioinformatische Analyse von MinION-Daten

Im Vergleich zur Illumina-Sequenzierung, bei der Milliarden *reads* kurzer Länge sequenziert werden, werden bei der MinION-Sequenzierung weit weniger, dafür aber längere Sequenzen generiert. Die bioinformatischen Tools und Workflows, welche für die Auswertung von Illumina-Datensätzen entwickelt wurden, sind für die Auswertung von MinION-Datensätzen nur bedingt geeignet. Ein wichtiges Merkmal, welches bei den für die Illumina-Sequenzierung entwickelten Workflows zu Problemen führen kann, ist die noch immer recht hohe Fehlerquote der durch die MinION generierten Sequenzen. Diese konnte mittlerweile jedoch von rund 30 % auf etwa 10-5 % reduziert werden [88, 140].

Eine häufig für die Auswertung einer MinION-Sequenzierung genutzte Plattform ist EPI2ME, ein von Oxford Nanopore Technologies entwickeltes online-Programm [141]. Dieses bietet unterschiedliche Methoden zur Analyse der generierten Sequenzen, darunter 16S-Analysen, spezifische Genom-Alignments oder die Erregersuche (What's in my Pot (WIMP)). Da diese Programme jedoch nur online nutzbar sind, sind Nutzer und Institute mit Datenschutz-Richtlinien oder fehlender Netzwerkverbindung vor Herausforderungen gestellt. Programme wie Guppy von Oxford Nanopore Technologies für das Alignment der Sequenzen an Referenzdatenbanken sind aufgrund einer fehlenden Oberflächenanwendung bislang nur für Nutzer mit bioinformatischen Kenntnissen nutzbar [142].

1.8. Zielsetzung der Dissertation

Die HTS und Metagenomik haben völlig neue Möglichkeiten für die Erreger-Diagnostik eröffnet. Besonders der ungerichtete, hypothesenfreie Blick der Methode hat zur Detektion neuartiger Viren geführt und Krankheiten unbekannter Ursache aufgeklärt. Mit der Markteinführung des MinION von Oxford Nanopore Technologies 2014 wurde die dritte Generation der Sequenzierung zahlreichen Laboren finanziell und logistisch zugänglich gemacht. Dennoch ist die Technologie noch nicht etabliert und weist einige Schwachpunkte auf:

- Die Sensitivität der Illumina- und MinION-Sequenzierung ist niedrig
- Das Screening mehrerer Proben erfordert die Generierung großer, mit hohem Zeitaufwand und hohen Kosten verbundener Datenmengen
- Die Sequenzierung von humaner DNA in Patientenproben ist ethisch und rechtlich bedenklich
- Die Auswertung der generierten Daten erfordert bioinformatische Kenntnisse
- Es gibt keine Software für eine offline-Analyse in Echtzeit während der MinION-Sequenzierung

Ziel dieser Dissertation ist es, mittels Illumina- und MinION-Sequenzierung 49 Proben von Patienten mit pockenähnlichen Hautveränderungen, welche an das Konsiliarlabor für Pockenviren des Robert Koch-Instituts eingesandt wurden, zu diagnostizieren. Dabei sollen vier Teilprojekte bearbeitet werden:

1. Illumina-Sequenzierung der 49 Patientenproben zur Diagnostik und Bewertung der Möglichkeiten und Limitationen für die Erregerdiagnostik mittels HTS
2. Entwicklung der Methode einer multiplex-PCR-basierten Anreicherung für die simultane Detektion von mehreren Erregern, welche pockenähnliche Hautveränderungen hervorrufen können, in Kombination mit der MinION-Sequenzierung (VAmplSeq: Virus Amplification based Sequencing)
3. Entwicklung der Methode einer multiplex-PCR-basierten Anreicherung für die Vollgenomsequenzierung von Orthopockenviren mittels MinION-Sequenzierung (PAmplSeq: Poxvirus Amplification based Sequencing)
4. Entwicklung einer grafischen Oberflächenanwendung (GUI) für die offline-Analyse der generierten Daten während einer MinION-Sequenzierung in Echtzeit, welche ohne bioinformatische Kenntnisse anwendbar ist (VAmplSeeker und PAmplSeeker)

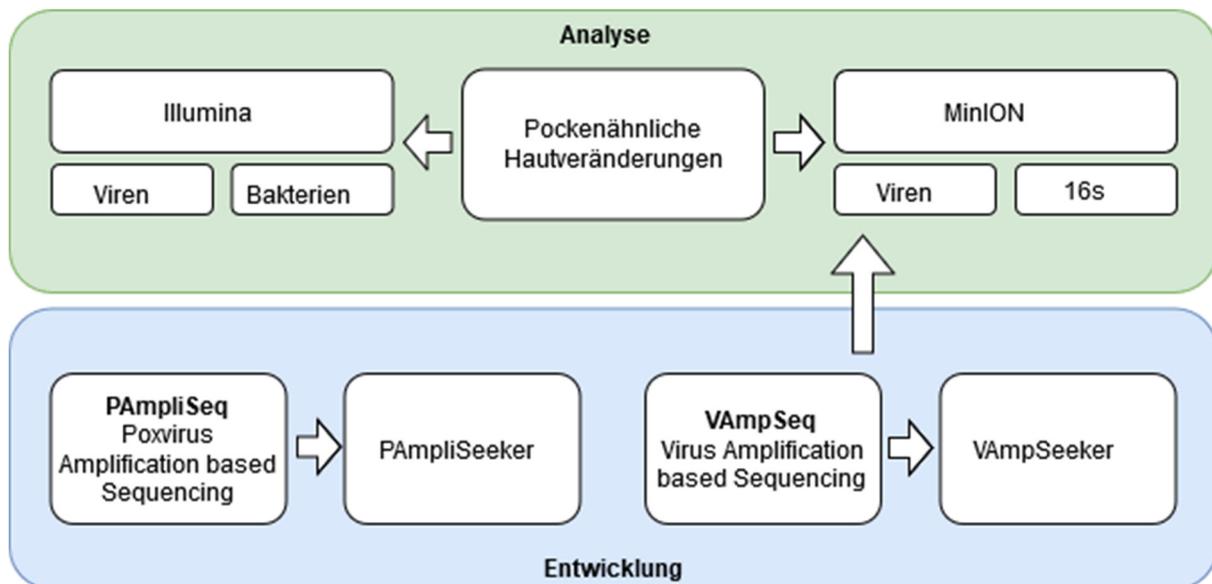


Abbildung 10: Workflow der Dissertation: Schwerpunkt der Arbeit ist das Erreger-Screening von 49 Proben von Patienten mit pockenähnlichen Hautveränderungen mittels Illumina-Sequenzierung und die Entwicklung der VAmPSeq-Methode mit automatisierter Echtzeit offline-Auswertung der Daten (VAmPSeeker) während der MinION-Sequenzierung. Neben Viren werden die Proben auch auf bakterielle Infektionen untersucht (Illumina: Shotgun, MinION: 16S). Für detailliertere Analysen nach dem Erreger-Screening wird die PAmpSeq-Methode zur Vollgenom-Sequenzierung von Orthopockenviren entwickelt.

Die Dissertation soll damit am Beispiel der Diagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen die Nutzung der HTS bewerten und weiterentwickeln. Besonders die Entwicklung einer neuen PCR-basierten Anreicherungsmethode in Kombination mit der MinION-Sequenzierung und die automatisierte offline-Auswertung in Echtzeit soll ein Gesamtpaket für die Erregerdiagnostik mittels Sequenzierung bieten und die oben genannten Schwachstellen umgehen und verbessern.



Abbildung 11: Virus Amplification based Sequencing – VAmPSeq. Die Methode beruht auf einer multiplex-PCR mit bis zu 1000 Virus-spezifischen Primern und einer anschließenden MinION-Sequenzierung. Nach nur wenigen Sekunden der Sequenzierung können Ergebnisse mit dem VAmPSeeker analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Studienproben

49 Proben von Patienten und Haustieren mit pockentypischen oder pockenähnlichen Hautveränderungen, welche an das Konsiliarlabor für Pockenviren (Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene, Hochpathogene Viren (ZBS 1), Robert Koch-Institut) zur Diagnostik eingesandt wurden, wurden in die Studie mit einbezogen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Patientenproben und relevante Informationen (Probenbezeichnung, Probenursprung, Beschreibung der Läsionen durch den behandelnden Arzt, angeforderte Diagnostik, Tierkontakt). Abbildung 12 (Patienten) und Abbildung 13 (Haustiere) zeigt alle vorhandenen Bilder der Hauteffloreszenzen.

Tabelle 1: Übersicht der Patientenproben

ID Nummer	Probenbezeichnung Konsiliarlabor	Probenursprung	Angeforderte Diagnostik	Beschreibung	Tierkontakt
1	P-16-003-001-01	Abstrich	OPV	Läsionen an Gesicht und Kopfbereich, Fieber	Katze
2	P-16-003-001-02	Kruste			
3	P-16-023-001-01	Abstrich	PPV	Ulzerationen Handrücken, teilweise hämorrhagische Abszesse	Katze, Schweine
4	P-16-039-001-01	Abstrich	PPV	Ulzerationen Finger und Hand, Kontakt mit verstorbenem Lamm	Schafe
5	P-15-056-001-02	Abstrich	PPV	Hautveränderungen Ellenbogen	Pferde, Hühner, Kühe
6	P-15-056-001-03	Gewebe			
7	P-15-093-001-01	Kruste	OPV, PPV	Läsionen im Gesicht	
8	P-15-050-001-02	Abstrich	OPV, PPV	Über mehrere Wochen Läsionen an Körper	Katze
9	P-15-050-001-03	Kruste			
10	P-14-25-001-01	Kruste	OPV, PPV	Exanthem an Unterarm mit zunehmender Ausdehnung auf Extremitäten, wassergefüllte Bläschen. Fieber, Husten, Rhinitis, weicher Stuhlgang	Hund
12	P-11-40-001-01	Kruste	OPV, PPV	Läsionen Oberschenkel	
13	P-13-29-001-01	na	OPV, PPV	Läsionen an Körper	
14	P-12-46-001-01	na	OPV, PPV	Läsionen Gesicht, Rücken	
15	P-14-072-001-06	Kruste	OPV	Bläschen Oberlippe, Fieber, zurückliegende Kuhpockeninfektion, Behandlung mit Antibiotika	Hund, Katze
16	P-14-072-001-07	Abstrich			

Tabelle 1: Übersicht der Patientenproben, fortführend

17	P-17-67-001-01	Gewebe	OPV	Läsionen Hand, Auslandsaufenthalt Sri Lanka	Katze
19	P-18-008-001-01	Abstrich	PPV		Kühe, Kaninchen
20	P-18-016-001-01	Abstrich	PPV	Bläschen, zunehmende Vergrößerung	
22	P-18-023-001-03	Kruste	OPV	Nekrotisierende Läsion	Hund, Katze
23	P-18-024-001-01	Biopsie	OPV	Hautveränderung nach Schnittverletzung	Arbeit in Metzgerei
24	P-18-025-001-01	Biopsie	OPV		
25	P-18-029-001-01	Abstrich	MOCV		
26	P-18-029-001-02	Abstrich			
27	P-18-030-001-02	Kruste	OPV, PPV	Pusteln, Rötung, schwarze Nekrose	Hund, Katze
28	P-18-031-001-01	Abstrich	OPV, PPV		
29	P-18-033-001-02	Abstrich	OPV, PPV, HSV	Läsionen am Finger	Kühe
30	P-18-048-001-01	Abstrich	PPV	Erythematöse Knoten im Gesicht, Verkrustungen	Kälber
32	P-18-074-001-01	Abstrich	MOCV		
33	P-18-086-001-01	Abstrich	MOCV		
34	P-18-087-001-01	Abstrich	MOCV, OPV	Blase Handteller	
35	P-18-002-001-01	Abstrich	PPV	Verdacht auf Orf-Virus	Schafe
36	P-18-007-001-01	Abstrich	OPV	Katze	
37	P-18-037-001-01	Biopsie	OPV	Eichhörnchen	
43	P-15-103-001-01	Kruste	OPV	Katze, Schuppige knopfartige Veränderungen in der Achselgegend	
44	P-15-82-001-01	Kruste	OPV	Hamster, Dermatitis mit verkrustenden Herden am gesamten Körper, Behandlung mit Antibiotika	
45	P-15-21-001-01	Kruste	OPV	Katze	
46	P-16-019-001-01	Kruste	OPV	Hund, pockenähnliche Läsionen	
47	P-18-92-001-01	Abstrich	OPV, MOCV, PPV		
48	P-18-92-001-02	Abstrich			
49	P-18-98-001-01	Abstrich	OPV		Rind
50	P-18-98-002-01	Kruste			
51	P-19-003-001-01	Abstrich	OPV	Läsionen Handgelenk, exozytischer Plaque	Schafe, Katzen, Geflügel
52	P-19-003-001-02	Kruste			
58	P-17-61-001-05	Abstrich		Blasenbildung mit Erosion, Behandlung mit Antibiotika	Pferde
59	P-17-61-001-06	Gewebe			
61	P-17-97-001-01	Abstrich	OPV	Ulzerationen Nase	Katze
62	P-17-97-001-02	Kruste			
63	P-17-85-001-01	Biopsie	OPV		Katzen, Hunde, arbeitet mit Ziegenmilch
64	P-18-35-001-01	Blasensekret	OPV	Blase an Hand nach Kontakt mit erkrankten Kaninchen	Zwei verstorbene Kaninchen

1, 2 (P-16-003-001)



3 (P-16-023-001-01)



3 (P-16-023-001-01)



4 (P-16-039-001-01)



5,6 (P-15-056-001)



7 (P-15-093-001-01)



8, 9 (P-15-050-001-02)



10 (P-14-25-001-01)



12 P-11-40-001-01



13 (P-13-29-001-01)



14 (P-12-46-001-01)



22 (P18-023-001-03)



23 (P18-024-001-01)



58, 59 (P-17-61-001-05)



58, 59 (P-17-61-001-05)



63 (P-17-85-001-01)



63 (P-17-85-001-01)



29 (P18-033-001-02)



Abbildung 12: Bilder der Patientenproben



Abbildung 13: Bilder Patientenproben Tiere

2.1.2. Primer und PCR-Protokolle

Für die multiplex-PCR der VampSeq-Methode wurden 58 Primer für die Amplifikation von 36 Virusspezies entwickelt.

Tabelle 2: Primer für das VampSeq-Assay für Hauteffloreszenzen

Virusspezies	Primernamen	Sequenz 5' -> 3'	Amplikon-Länge	Target-Gen
CoxsackieA10	CoxA10_F	TgTgCAACAgAgCTATTATCTACTTg	370	Polyprotein
CoxsackieA16	CoxA10_R	AgTTCCCAACAgTgAgCTgg		
	CoxA16_F	CCCTgAATgCggCTAATCCT	182	Polyprotein
	CoxA16_R	TggCCAATCCAATAgCTATATgg		
HSV1	HSV_1_2_F	CATCATCCAggCCCACAACC	291	UL30
HSV2	HSV_1_2_R	gTgAACCCgTACACCgAgTT		
	HSV12_gB_F	TggTCTTCAAggAgAACATCgC	256	gB
	HSV12_gB_R	TCCATgTCggTCTCgTggTC		
	HSV12_F_UL27	CCCTggTCAgCTTTCggTAC	294	UL27
	HSV12_R_UL27	gCTgTCCTTgATCTCgTggC		
VZV	HHV3_F	AACAACAgAAgCCgCgTCTA	340	ORF28
	HHV3_R	CgCTCAATAACCTCAACgCg		
EBV	HHV4_F	CTTCACAggACATgCCgACAAA	350	BLLF1
	HHV4_R	TCTCgggTgCCTTggAgAATATA		
CMV	CMV_F	AgggAACTCgTAgACgTCCA	485	UL54
	CMV_R	AATCggCgAGTATCTgCTgg		
HHV6	HHV6_F	gCACAAGAggCTgCCAAATC	454	U39
	HHV6_R	ACggTAAACATTTTgCAGAgCC		
HHV7	HHV7_F	ggACTCCTCCCTCTgTTggA	328	U48
	HHV7_R	AATTTgCACgTCCggTTgg		
HHV8	HHV8_F	CTAACgCggATggATCCCTC	237	ORF27
	HHV8_R	gACgATATgTgCgCCCCATA		
HPV1	HPV1_F	ggTTTTTggCAgTTTggggTg	321	E1

Tabelle 2: Primer für das VampSeq-Assay für Hauteffloreszenzen fortführend

	HPV1_R	TgCTgTgCAATCCACTCCAA		
HPV2/57	HPV_2_57_F	ACAggAATACCCATACCTCAgC	234	E6
	HPV_2_57_R	TCgTCgCAATgTAggTCAACA		
HPV3/10/28	HPV3_10_28_F	gATggACAggAAgTggCACA	260	E1
	HPV3_10_28_R	ggTCCCgATTCCgTATCCAC		
HPV4	HPV_4_F	ACCTTggACgACTTCTgCAg	380	E6
	HPV_4_R	CTgCAATAgCCCCTCCACAA		
HPV6/11/13	HPV6_11_13_F	TgTgCAGgACCTAAAACgAAAg	200	E1
	HPV6_11_13_R	AgCTTCCACTTCAGAATAgCCAT		
HPV7	HPV7_F	CAAAgTTCTgCAgCggCTTT	323	E1
	HPV7_R	ATCCgCCTCATTTCTgCCAA		
HPV16	HPV16_F	AgATgATgCTACAgTgCCCT	317	E1
	HPV16_R	CCTCgTCCTCgTgCAAAC		
HPV18	HPV18_F	AgCAAgggAACATggCATAACA	310	E2
	HPV18_R	TgTCCCATgTTCCTgCATCA		
HPV31	HPV31_F	gCgTTgTCAGTATCAAAGgCC	267	E1
	HPV31_R	TCCACAACAgTACATTggCCA		
HPV32	HPV32_F	AATgTggCAAaATCgCACC	308	E1
	HPV32_R	TgTCAgCACgTTgggCATAT		
HPV33	HPV33_F	TAgTgggggTgggggATgATT	374	E1
	HPV33_R	TgCTACTgTTAACCTgTTTTTgCT		
Masernvirus	Measles_F	gCgATgTggATATTTggCgAA	316	P
	Measles_R	CgAgCACATTgggTTgCAC		
MOCV	MC_L1_F	CAAgACACAgggCTCgACTT	333	MC037R
	MC_L1_R	ATgATCTCCAggACCAggCT		
OPV	OPV_F2	TgCTTggTATAAaggAgCCCAATT	176	Hämagglutinin
	OPV_R3	gCACATACATAAgTACCggCATC		
	OPV_F	CCgTTgTTACgTTgTTATgCgT	324	B5R
	OPV_R1	TTTCTTCgCAACgAAAATATTTTgTTTC		
Parvovirus B19	Parvo_F	ACCAgggTAgATCAAAAAATgCg	375	NS1
	Parvo_R	AgAgCTTTCACCACCACCTgC		
PPV	ORF_FL_F	TgATCgCgTCgTAgAgCTTC	420	Envelope
	ORF_FL_R	TCAAaggCggTggAATggAAA		
Rötelnvirus	Rubella_F	TCggCAGTTgggTAAgAgAC	300	p150
	Rubella_R	CCgTCCTgTggAggCACA		

Tabelle 3: Primer und Sonden für spezifische konventionelle PCRs und real-time PCRs

Virus	Primer, Sonde	Sequenz 5'-> 3'
16s	V1_V2 F	AgMgTTYgATYMTggCTCag
	V1_V2 R	TgCTgCCTCCCgTAggAGT
Epstein-Barr-Virus	EBV F	CCCAACACTCCACCACACC
	EBV R	TCTTAggAgCTgTCCgAggg
	EBV FAM	FAM-CACACACTACACACACCCACCCgTC-BBQ
Herpes Simplex Virus ½	HSV1/2 F	TgTgggACATMggCCAgA
	HSV1 R	gCTTgATCTTgTCggTTATAATCC
	HSV2 R	TTgACCTTgTCggTgATgATg
	HSV1/2 FAM	FAM-CAgAAgCgCAgCAAg-MGB
Humanes Herpesvirus 5	CMV F	gCACCATCCTCCTCTTCCT
	CMV R	ggCCTCTgATAACCAAgCC
	CMV FAM	FAM-CCTCCTgAgCACCCXTC
Molluscum-contagiosum-Virus	MOCV FAM	FAM-CCACACggAACgAgAA-MGB
	MOCV F	CAAgTACAACCTCgTggCgTTTT
	MOCV R	CCTACACggAACgAATgCTTTg
Orf-Virus	PPV	TCgATgCggTgCAACAC
	PPV	gCggCgTNTTCTTCTCggAC
	PPV FAM	FAM-TgCggTAgAAgCC-NFQ
Orthopockenviren	rpo F	CTgTAgTTATAAACgTTCCgTgTg
	rpo R	TTATCATACgCATTACCATTTcga
	rpo FAM	FAM-TAgAgATTC-MGB
Eichhörnchenpocken-virus	Squirrelpox F	CggCgTCAAgTCCAAgTACT
	Squirrelpox R	CgCATCACTgTCgCgTAATg
	Squirrelpox FAM	FAM-gCAgCgTgCgTCAggTCTTCT-BHQ1
Varizella-Zoster-Virus	VZV F	CgAgTCAgCCTgACgATCTA
	VZV R	CggAgggAATTgAAAgAT
	VZV FAM	FAM-CgTgTTCCCgTCCCACCATgAXT

Tabelle 4: Reaktionsansatz eines Standardprotokolls für die qPCR

Reagens	Volumen pro Probe (µl)
MgCl ₂ 50 mM	1,5
Puffer 10X	2,5
dNTP 2,5 mM	1
Primer F	0,75
Primer R	0,75
Sonde	0,75
Taq-Polymerase 5 U/µl	0,2
DNA	5
H ₂ O	13,5

Tabelle 5: Temperaturprofil einer Standard-qPCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	300	1
	95	15	45
Annealing	60	30	45

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die 16S-PCR

Reagens	Volumen pro Probe (µl)
MgCl ₂ 50 mM	1
Puffer 10X	2,5
dNTP 2,5 mM	2
Primer V1_V2_BF	0,75
Primer V1_V2_R	0,75
Taq-Polymerase 5 U/µl	0,5
DNA	3
H ₂ O	14,5

Tabelle 7: Temperaturprofil der 16S-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	120	1
	95	60	35
Annealing	65	45	35
Elongation	72	60	35
	72	120	1

2.1.3. Probenvorbereitung, PCR

Tabelle 8: Reagenzien, Kits und Geräte für die Probenvorbereitung und PCRs

Bezeichnung	Hersteller
100bp GeneRuler DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
50x TAE Elektrophoresepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
6x Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ABI 7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammer Biometra Horizon 58	Analytik Jena, Jena, D
NEBNext® Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
PCR-H2O	Sigma-Aldrich, Buchs, CH
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
Random Hexamere	Metabion, Planegg/Steinkirchen, D
SERVA DNA Stain Clear G	BIORAD Laboratories, Berkeley, CA, USA
SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 8: Reagenzien, Kits und Geräte für die Probenvorbereitung und PCRs, fortführend

Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
UltraPure Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4. Illumina Library und Sequenzierung

Tabelle 9: Reagenzien und Kits für die Illumina Library-Präparation und Sequenzierung

Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer	Agilent
IDT® for Illumina Nextera DNA Unique Dual Indexes	Illumina, San Diego, CA, USA
KAPA Library Quantification Kit	Roche, Basel, CH
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit	Illumina, San Diego, CA, USA
MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycle)	Illumina, San Diego, CA, USA

2.1.5. MinION Library und Sequenzierung

Tabelle 10: Reagenzien, Kits und Geräte für die MinION Library-Präparation und Sequenzierung

Bezeichnung	Hersteller
1,5 ml Eppendorf DNA LoBind tubes	Eppendorf, Hamburg, D
1D Genomic DNA by Ligation (SQK-LSK109)	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
1D Native barcoding genomic DNA (1-12 EXP-NBD103)	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
1D Native barcoding genomic DNA 13-24 (1-12 EXP-NBD103)	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Agencourt AMPureXP Beads	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
DynaMag™-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol Rotipuran	Carl Roth, Karlsruhe, D
Flowcell	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002)	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Flow Cell Wash Kit (EXP-WSH003)	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
LongAmp Taq 2X Master Mix	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MinION	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
MinIT	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
NEB Blunt/TA Ligase Master Mix	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
NEBNext End repair/dA-tailing Module	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
NEBNext FFPE Repair Mix (M6630)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
NEBNext Quick Ligation Module	New England Biolabs, Frankfurt am Main, D
Nuclease-free water	Sigma-Aldrich, Buchs, CH
PCR barcoding (96) genomic DNA (SQK-LSK109)	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK

2.1.6. Software und Tools

Tabelle 11: Software, Tools und Libraries

Software	Hersteller
Blast	NCBI, National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA
DIAMOND	Universität Tübingen, D
Geneious 11.1.5	Biomatters Limited, Auckland, NZ
Image Lab v5.2.1	BIORAD Laboratories, Berkeley, CA, USA
MinKNOW	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
CFX Maestro™	BIORAD Laboratories, Berkeley, CA, USA
Guppy v3.2.4.	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
MALT	Universität Tübingen, D
MEGAN	Universität Tübingen, D
Python 3.7.4.	Python Software Foundation, Wilmington, DE, USA
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
SPAdes	Center for Algorithmic Biotechnology, St. Petersburg, Russia
Trimmomatic	Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, D
EPI2ME	Oxford Nanopore Technologies Limited, Oxford, UK
Molecular Imager GelDoc XR+	BIORAD Laboratories, Berkeley, CA, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Probenvorbereitung

Die Patientenproben für die Validierung der VAmplSeq-Methode und die Illumina-Sequenzierungen wurden je nach Probenmaterial unterschiedlich bearbeitet. Die Haut- und Rachenabstriche wurden in 200 µl PBS 30 min inkubiert und anschließend gevortext. Biopsien, Krusten und Gewebe wurden in 200 µl PBS mit 5-10 Keramik-Beads homogenisiert. Seren und Urin wurden mit PBS 1:10 auf 200 µl verdünnt. 100 µl der Proben wurden anschließend mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) ohne *carrier*-RNA extrahiert und in 100 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die extrahierte RNA wurde anschließend mittels SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) mit Random Hexameren in einzelsträngige cDNA, darauffolgend für die Illumina-Sequenzierung mit dem NEBNext® Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module (NEB) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend über Agencourt AMPureXP Beads (Beckman Coulter) aufgereinigt und 3 µl Einzelstrang-cDNA in den VAmplSeq, PAmplSeq, 16s und spezifischen PCRs bzw. 20 µl Doppelstrang-cDNA für die Metagenomsequenzierung eingesetzt.

2.2.2. Illumina Library-Präparation und Sequenzierung

Jeweils 20 µl doppelsträngige, aufgereinigte cDNA wurden für die Metagenomsequenzierung eingesetzt. Die Proben wurden mit dem Nextera XT DNA Sample Preparation Kit bearbeitet (Illumina). Die DNA-Konzentration der Proben wurde hierbei zunächst mit dem Qubit Fluorometer (Invitrogen) bestimmt. Die Proben wurden anschließend fragmentiert (enzymatische Tagmentierung) und die Größenverteilung der fragmentierten DNA sowie Qualität und Konzentration mit dem Bioanalyzer (Agilent Technologies) bestimmt. Um mehrere Proben in einem Sequenzierlauf zu kombinieren, wurde das Nextera Index Kit verwendet, welches die DNA der jeweiligen Probe neben dem Sequenzieradapter mit zwei eindeutig identifizierbaren *barcodes* ligiert. Um eine ausreichend hohe Konzentration von DNA für die Sequenzierung zu erlangen, wurde die DNA mit Adapter-spezifischen Primern amplifiziert (8 Zyklen) und die Libraries mit den Agencourt AMPure XP Beads (Beckman Coulter) aufgereinigt. Die präparierten Libraries wurden anschließend mit dem KAPA Library Quantification Kit (Roche) quantifiziert und äquimolar im *paired-end mode* auf dem Illumina MiSeq sequenziert (MiSeq Reagent Kit v3).

2.2.3. Illumina-Datenauswertung

Die FastQ-Dateien aus der MiSeq-Sequenzierung wurden auf Qualität (PHRED 33 und Größe (> 30 bp) getrimmt (Trimmomatic) [128]. Abbildung 14 zeigt den Ablauf der Metagenomanalyse. Dabei wurden zunächst alle humanen Sequenzen mittels eines referenzbasierten Sequenz-

Alignments subtrahiert (Bowtie2) [143]. Anschließend wurden die FastQ-Sequenzen mit spezifischen Referenz-Datenbanken aligniert. Die viralen, bakteriellen und fungalen RefSeq-Datenbanken (NCBI GenBank; 01.04.2019) wurden mit dem Programm DUST von Regionen mit geringer Komplexität befreit sowie Duplikate und fehlerhafte Referenzen entfernt. Für Nukleotid-basierte Alignments wurde das Programm MALT, für Aminosäure-basierte Alignments das Programm DIAMOND verwendet [133]. Die mittels Alignment taxonomisch zugeordneten *reads* wurden mittels SPAdes zu *contigs* assembliert [131]. Alle taxonomisch eingeordneten Sequenzen wurden mittels NCBI Blast verifiziert. Zur Visualisierung der Ergebnisse und der weiteren Analyse wurden die Programme MEGAN sowie Geneious 11.5.1 verwendet [144].

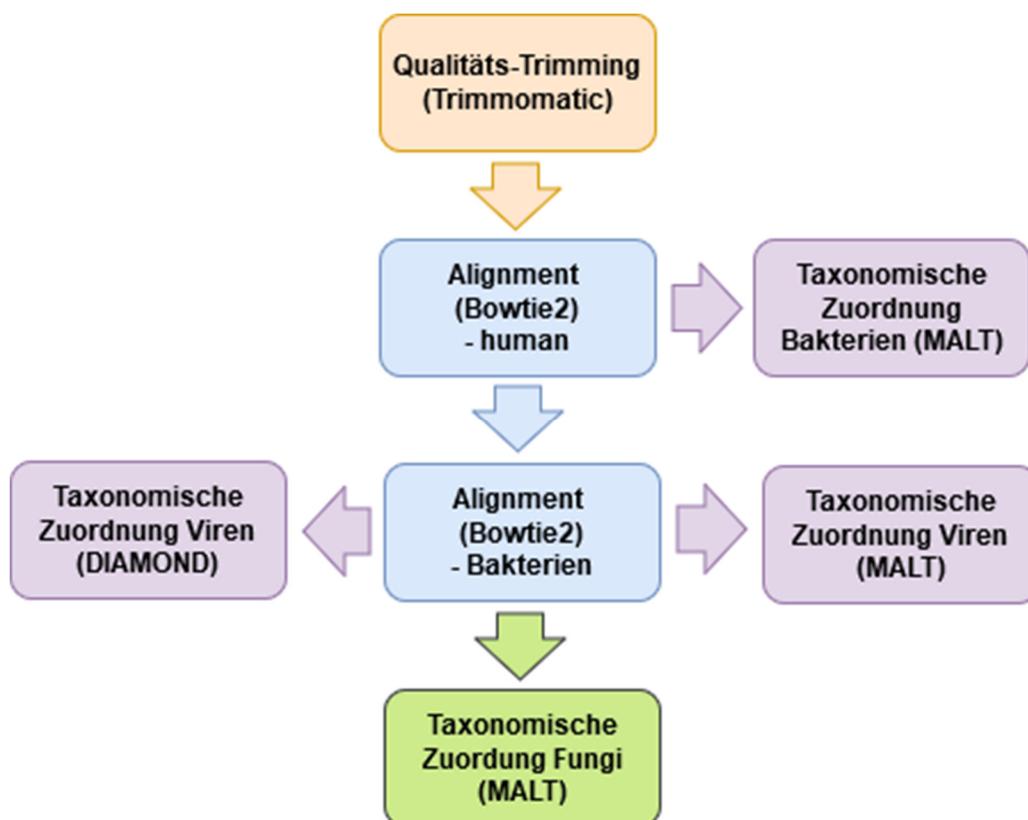


Abbildung 14: Workflow der Illumina Datenauswertung. Die Sequenzen der Illumina-Sequenzierung wurden nach Qualität getrimmt, die Sequenzen mit Übereinstimmung zu Referenzen der humanen (und bakteriellen) Datenbank subtrahiert und die verbliebenen Sequenzen mittels Nukleotid- und Aminosäure-Alignment taxonomisch zugeordnet.

2.2.4. Entwicklung VampSeq PCR

Die viralen Targets für die Diagnostik und Differentialdiagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen wurden nach der wissenschaftlichen Veröffentlichung „Viral Skin Diseases“ vom Ramdass et al. zusammengestellt [40]. Die Primer für die VampSeq multiplex-PCR wurden mittels Primer3 entwickelt [145]. Dabei wurde auf ähnliche Schmelztemperaturen sowie Amplikongrößen geachtet. Die Ausbildung von Homodimeren, Heterodimeren und Hairpin-

Strukturen wurde für alle Primer und Primerkombinationen mit Primer3 errechnet. Die Primer wurden anschließend äquimolar gepoolt und verschiedene virale Targets mit unterschiedlichen PCR-Reaktionsbedingungen (Reagens-Konzentrationen, Primer-Konzentration, Annealingtemperatur und -zeit, Elongationszeit) amplifiziert. Die Reaktionsergebnisse wurden mittels Gelelektrophorese und anschließender MinION-Sequenzierung bewertet, wobei die Reaktionsbedingungen mit der sensitivsten Detektionsgrenze bzw. dem höchsten Sequenz-Output gewählt wurden. Zur weiteren Optimierung der PCR wurden unterschiedliche Konzentrationen und Kombinationen der Reagenzien eingesetzt und die Amplifikation verschiedener viraler Targets mittels einer auf dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen basierenden Schmelzkurven-PCR bewertet. Tabelle 12 zeigt eine an die Taguchi-Methode angelehnte Reaktionsmatrix [146]. Die ermittelte beste Kombination an Reagenzien ist in Tabelle 13, das Temperaturprofil in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 12: Pipettiermatrix für die Optimierung der VAmplSeq-multiplex-PCR

Reagens	Volumen pro Probe (µl) Reaktion											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MgCl ₂ 50mM	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2	0,5	1	2
Buffer 10X	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
dNTP 2,5 mM	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
Primerpool 100nM je Primer	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Taq-Polymerase 5 U/µl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DNA	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
EvaGreen	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H ₂ O	12,4	11,9	10,9	11,4	10,9	9,9	11,4	10,9	9,9	10,4	9,9	8,9

Tabelle 13: Reagens-Mastermix für die VAmplSeq multiplex-PCR

Reagens	Volumen pro Probe (µl)
MgCl ₂ 50mM	1
Puffer 10X	4
dNTP 2,5 mM	2
VAmplSeq Primerpool 100 nM je Primer	1,6
Taq-Polymerase 5 U/µl	1
DNA	3
H ₂ O	12,4

Tabelle 14: Temperaturprofil für die VAmplSeq multiplex-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94	120	1
	94	20	45
Annealing	65	30	45
Elongation	72	20	45
	72	120	1

2.2.5. Bestimmung der Sensitivität

Zur Bestimmung der Detektionslimits für den Nachweis verschiedener Viren mittels VAmplSeq-Methode wurde die virale DNA/cDNA zusammen mit einem quantifizierten Plasmid-Standard in einer spezifischen qPCR gemessen. Die Produkte der Amplifikation einer spezifischen qPCR wurden dazu mittels TOPO-TA-Klonierung in ein Plasmid kloniert. Die Konzentration der Plasmide wurde anschließend photometrisch bestimmt und auf 10^6 Kopien/ μl verdünnt. Die zu bestimmenden Positivkontrollen wurden dann gegen die definierten Konzentrationen des Plasmids von 10^6 – 10^0 gemessen und die Konzentration der zu bestimmenden Probe von der ermittelten Standardgerade abgelesen.

2.2.6. Entwicklung PAmplSeq PCR

Für das Design der PAmplSeq-Primer wurde der Algorithmus der AmpliSeq-Pipeline von Thermo Fisher verwendet. Dieser Algorithmus berechnet die beste Kombination aus Primern, deren resultierende Amplikons eine bestimmte Referenz abdecken. Als Referenz wurde Ratpox09 (Accession No. LN864565.1) verwendet und die entwickelten Primer in zwei Pools bestellt. Die Optimierung des PCR-Protokolls erfolgte durch die Kombination verschiedener Reagenskonzentrationen und Thermobedingungen mit anschließender Sequenzierung. Hierbei wurden insbesondere die Annealingtemperatur und die Elongationszeit variiert, um eine möglichst hohe Abdeckung des Virusgenoms zu erlangen. Aufgrund der hohen Primerzahl der entwickelten Pools (856 Primer) befindet sich in dieser Arbeit keine Materialliste der Primer, kann jedoch auf Nachfrage angefordert werden.

Tabelle 15: Mastermix für die PAmplSeq PCR

Reagens	Volumen pro Probe (μl)
MgCl ₂ 50mM	2
Buffer 10X	5
dNTP 2,5 mM	5
PAmpliSeq Primerpool 100 nM je Primer	5
Taq-Polymerase 5 U/ μl	2
DNA	3
H ₂ O	3

Tabelle 16: Temperaturprofil für die PAmpliSeq PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94	120	1
	94	20	45
Annealing	55	30	45
Elongation	72	80	45
	72	120	1

2.2.7. MinION Library-Präparation und Sequenzierung

Für die Präparation der Libraries für die MinION-Sequenzierung wurde das 1D Genomic DNA Kit by Ligation (Oxford Nanopore Technologies) verwendet. Dafür wurde die DNA aus den PCR-Reaktionen zunächst mit Agencourt AMPure XP Beads aufgereinigt. Anschließend wurden im „End Repair und dA-Tailing“ mit dem NEBNext End repair/dA-tailing Module und dem NEBNext FFPE Repair Mix die 3'-Enden der aufgereinigten DNA mit einem deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP) versehen, um im darauffolgenden Schritt die spezifischen *barcode*-Adapter an die A-Überhänge ligieren zu können. Dafür wurde das 1D Native barcoding genomic DNA Kit 1-12 und 13-24 sowie für größere Probenmengen das PCR *barcode* (96) genomic DNA Kit verwendet. Die mit *barcodes* ligierten Libraries wurden anschließend mit den Sequenzier-Adaptoren ligiert und auf der MinION Flow Cell R9.4.1 sequenziert. Je nach Probenmenge je *flow cell* wurden dabei für VAmpliSeq-Sequenzierungen etwa 200.000 Sequenzen, für PAmpliSeq-Sequenzierungen etwa 1.000.000 Sequenzen sequenziert. Um die MinION *flow cells* mehrmals verwenden zu können, wurden diese nach und vor der Sequenzierung mit dem *Flow cell Wash* Kit enzymatisch von DNA befreit. Die Proben für das Patientenscreening wurden ausschließlich auf nicht gebrauchten *flow cells* sequenziert, um Kontaminationen zu ausschließen.

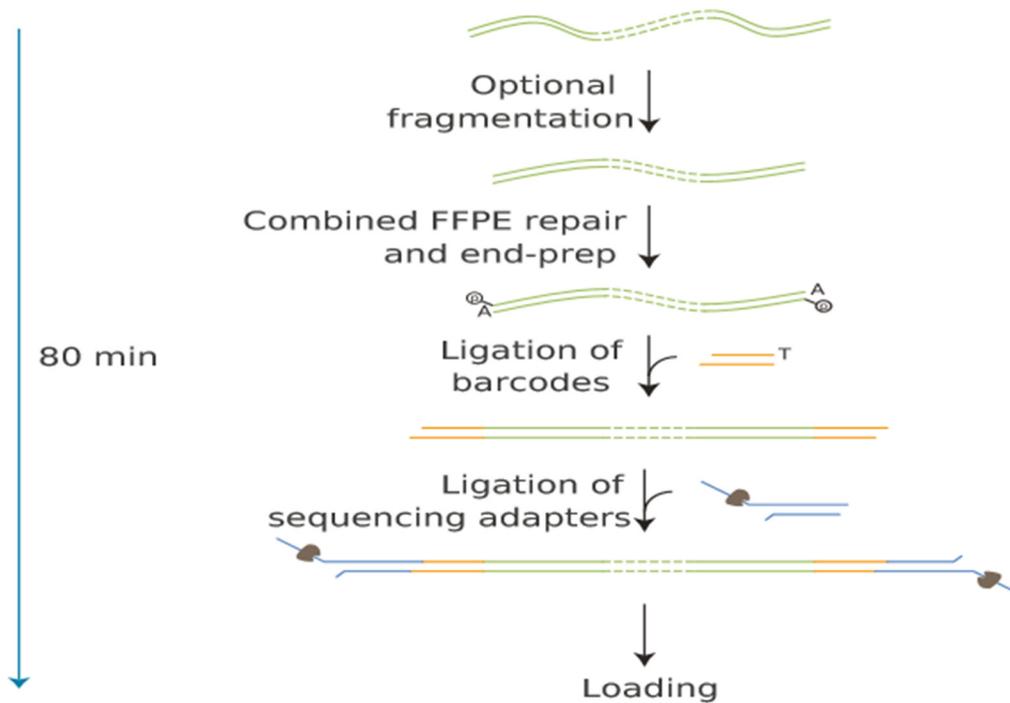


Abbildung 15: Grafische Darstellung der MinION Library-Präparation. Die Amplikons werden mittels magnetischer Beads aufgereinigt, mit dAMPs versehen und anschließend mit spezifischen *barcodes* und Sequenzieradaptern ligiert. (Abbildung von <https://nanoporetech.com>).

2.2.8. MinION Datenauswertung

Die Sequenzierung und das *basecalling* der erzeugten „Squiggle“-Signale erfolgte auf dem MinIT, ein für den MinION präkonfiguriertes Computer-Modul mit der nötigen Software für die MinION-Sequenzierung. Die resultierenden FastQ-Dateien wurden zunächst mit Geneious 11.1.5 mit dem Geneious-internen Trimming-Tool von *barcodes* und Adapter befreit und die Sequenzen anschließend mit den spezifischen, durch die Primer definierten Genomreferenzen aligniert. Die Konsensus-Sequenz eines solchen Sequenz-Assemblies wurde mit NCBI Blast validiert. Die Assemblierung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Guppy [142]. Des Weiteren wurden die generierten Daten mit dem in dieser Arbeit entwickelten VAmpliSeeker- und PAmpliSeeker-Programm analysiert.

2.2.9. Entwicklung VAmpliSeeker und PAmpliSeeker

Um eine von externen Programmen wie Geneious und EPI2ME unabhängige sowie eine offline-Auswertung der Sequenzierung in Echtzeit zu ermöglichen, welches auch für Nutzer ohne bioinformatische Kenntnis nutzbar ist, wurde ein Auswertetool mit grafischem User-Interface (GUI) entwickelt. Das Programm wurde mit Python 3 entwickelt und beruht auf den Libraries tkinter, Matplotlib sowie dem Programm Guppy (Oxford Nanopore), welches für das *Basecalling* und Referenz-Alignment verwendet wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Metagenomische Analyse

Die Zusammensetzung des Metagenoms, der Gesamtheit aller Genome der sequenzierten Probe, wurde analysiert und das Vorhandensein von Sequenzen viralen, bakteriellen und fungalen Ursprungs untersucht.

3.1.1. Zusammensetzung der Metagenome

Die 49 Patientenproben wurden auf dem Illumina MiSeq sequenziert und mittels bioinformatischer Analyse auf das Vorhandensein von Sequenzen pathogenen Ursprungs untersucht. Abbildung 16 zeigt die Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Kategorien. Je Probe wurden durchschnittlich $3,35 \cdot 10^6$ Sequenzen generiert (Min $1,58 \cdot 10^5$, Max $1,41 \cdot 10^7$).

Alle Sequenzen wurden nach Qualität gefiltert (PHRED 33) und von Illumina-spezifischen Adaptoren befreit. Anschließend wurden die Sequenzen mit einem referenzbasierten Alignment mittels Bowtie2 den Kategorien Human, Bacteria, Virus, Fungi und „Andere“ (keine definitive Zuordnung) zugeordnet. Der Gruppe der Protisten sowie einer Datenbank mit weiteren parasitären Erregern konnten keine Sequenzen zugeordnet werden.

Da für die Illumina-Sequenzierung während der Probenvorbereitung keine spezifische Anreicherung oder Abreicherung erfolgt war, bestand ein großer Anteil der generierten Sequenzen aus humanem Hintergrund (Mittelwert 86 %). Davon ausgenommen waren die Proben 37–46, welche tierischen Ursprung haben (durchschnittlich 22 % Sequenzen humanen Ursprungs). Eine weitere Ausnahme stellten die Proben 20 (21 % Sequenzen humanen Ursprungs), 26 (39 % Sequenzen humanen Ursprungs), 28 (12 % Sequenzen humanen Ursprungs) und 32 (19 % Sequenzen humanen Ursprungs) dar, deren größter Anteil an Sequenzen der Kategorie „Andere“ zugeordnet wurde.

Nur 1 % der Gesamtsequenzen wurde durchschnittlich je Probe einem bakteriellen Ursprung zugeordnet. Eine Ausnahme stellte die Probe 28 mit 23 % Sequenzen bakteriellen Ursprungs dar.

Nur 0,8 % der Gesamtsequenzen ließen sich durchschnittlich den Viren zuordnen. Mit 30 % Sequenzen viralen Ursprungs lag die Probe 32 über dem Durchschnitt.

Ein noch geringerer Anteil der Gesamtsequenzen mit nur 0,004 % wurde der Domäne der Fungi zugeordnet.

Zu der Kategorie „Andere“ konnten durchschnittlich 17 % der Sequenzen je Probe zugeordnet werden. Sequenzen in dieser Kategorie konnten überwiegend aus nicht charakterisierten Bakterien, Viren und Fungi bestehen oder wurden durch das wenig sensitive Bowtie2-Mapping nicht erfasst.

Die höchsten Konzentrationen von Sequenzen viralen und bakteriellen Ursprungs fanden sich in den Proben mit dem Ursprung Abstrich (n = 24; 1,9 % für bakterielle und 1,5 % für virale Sequenzen), gefolgt von Biopsien (n=4; 0,24 % bakterielle und 0,003 % virale Sequenzen), Krusten (n = 15; 0,2 % bakterielle, 0,002 % virale Sequenzen) und Gewebe (n=3; 0,02 % bakterielle und 0,003 % virale Sequenzen).

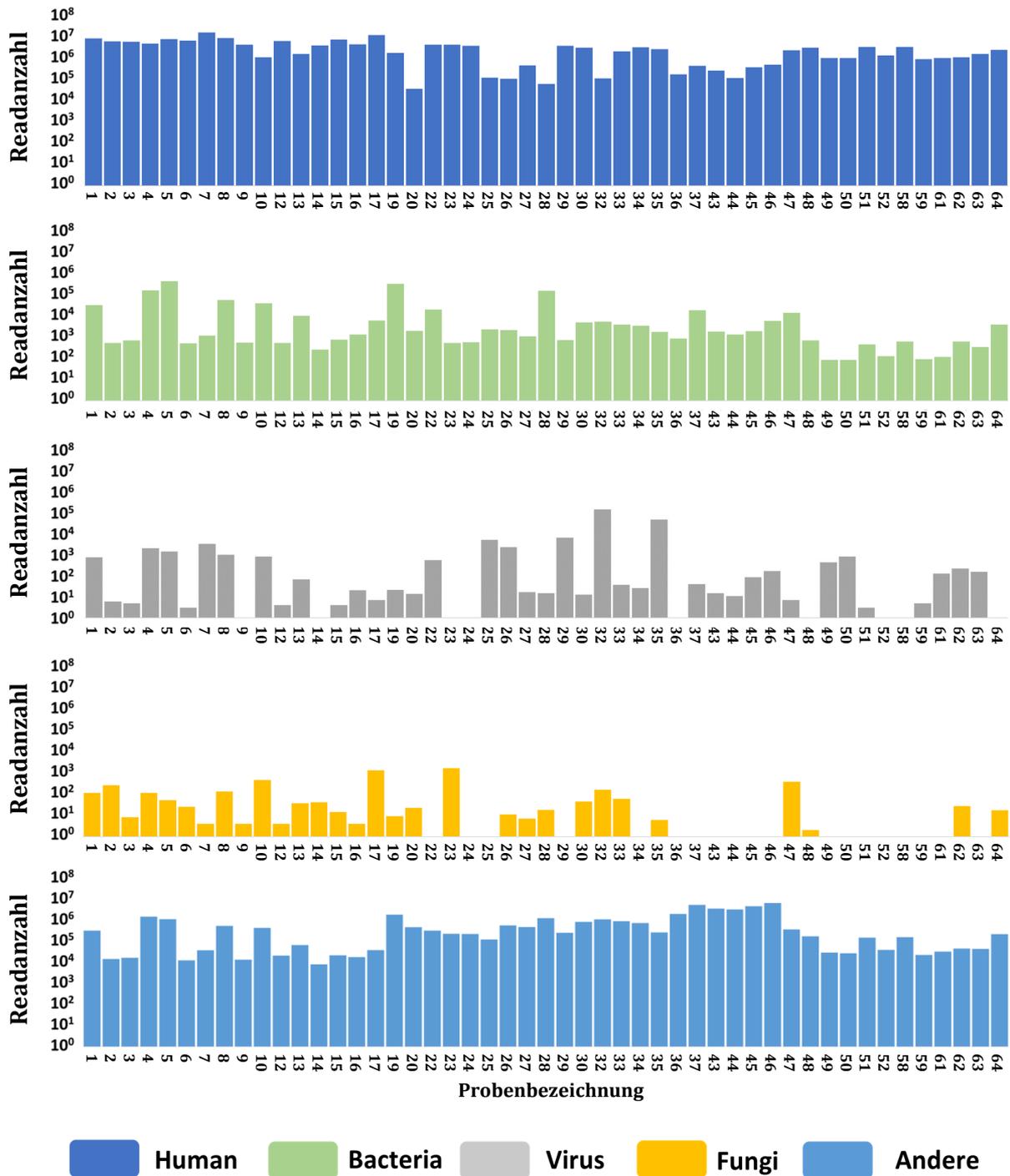


Abbildung 16: Sequenzanzahlen der Illumina-Sequenzierung nach Einteilung in humane, bakterielle, virale und fungale Reads. Ein Großteil der Datensätze besteht aus Sequenzen humanen Ursprungs (86 %). Die Konzentration von bakteriellen, viralen und fungalen Sequenzen ist hingegen gering (1,0 %, 0,8 % und 0,004 %). 17% des Gesamtdatensatzes lassen sich keiner der Kategorien zuordnen.

3.1.2. Analyse des Viroms durch Nukleotid-Alignments

Der Anteil und die taxonomische Zuordnung der viralen *reads* in den 49 Patientenproben erfolgte durch das Programm MALT (MEGAN Alignment Tool), welches ein Nukleotid-Alignment der viralen Sequenzen zu einer zuvor definierten Referenz-Datenbank durchführt. Abbildung 18 zeigt die Zuordnung der Sequenzen zu den verschiedenen Virus-Genera und -Spezies. Gezeigt werden in der Darstellung nur Proben, bei denen für mindestens ein Virus > 1 *read* identifiziert werden konnte. Als Vergleichsproben wurde zusätzlich zu den 49 Patientenproben der Abstrich von Arm, Bein und Kopf einer asymptomatischen Person sowie ein Pool von Arm-Abstrichen mehrerer (n=10) Personen sequenziert. Armbeuge, Bein und Kopf stellen dabei unterschiedliche Hautareale (feucht, trocken, talgig) dar, deren mikrobielle Zusammensetzung sich deutlich voneinander unterscheidet. Ein großer Anteil der viralen Sequenzen ist der Ordnung der *Caudovirales* zugeordnet, welche ausschließlich Viren umfasst, die Bakterien und Archaeen als Wirte nutzen und nicht humanpathogen sind.

Den Patientenproben 7 (3.657 Sequenzen, 0,03 % Sequenzen viralen Ursprungs), 29 (7.226 Sequenzen, 1,34 % Sequenzen viralen Ursprungs), 49 (468 Sequenzen, 0,05 % Sequenzen viralen Ursprungs), 50 (867 Sequenzen, 0,09 % Sequenzen viralen Ursprungs), 61 (131 Sequenzen, 0,01 % Sequenzen viralen Ursprungs) und 62 (238 Sequenzen, 0,02 % Sequenzen viralen Ursprungs) konnten Sequenzen des humanen Herpes Simplex Virus 1 (HSV1) zugeordnet werden (Tabelle 17 und Abbildung 17). Proben 49 und 50 sowie Proben 61 und 62 stammen dabei jeweils von demselben Patienten und haben den Ursprung Abstrich und Kruste. Alle HSV1-positiven Proben konnten per qPCR bestätigt werden. Hierbei sind die CT-Werte mit den Konzentrationen der HSV1-Sequenzen in den Illumina-Datensätzen korrelierbar, der Anteil der viralen Sequenzen am Gesamtdatensatz stieg mit abnehmendem CT. Bei einer weiteren Probe (Probe 2) wurde ein CT von 37 für HSV1 gemessen. Hier waren bereits keine HSV1-Sequenzen im Gesamtdatensatz auffindbar und die Diagnose einer Herpesinfektion mittels Illumina-Sequenzierung war nicht möglich.

Tabelle 17: HSV1-positive Proben der Illumina-Sequenzierung und CT-Werte der durchgeführten qPCR. Je niedriger der CT, desto mehr virale *reads* befinden sich in dem Datensatz.

Probe	Sequenzanzahl gesamt (Virus)	Anteil der viralen Sequenzen am Gesamtdatensatz (%)	CT
29	7226	1,34	17,9
50	867	0,09	20,8
7	3657	0,03	22,0
49	468	0,05	22,4
61	131	0,01	22,7
62	238	0,02	23,8
2	0	0	37,0

Molluscum-contagiosum-Virus (MOCV) wurde in drei der Proben detektiert, Probe 25 (5.500 Sequenzen und 3,5 % Sequenzen viralen Ursprungs), Probe 26 (2.559 Sequenzen und 1 % Sequenzen viralen Ursprungs) sowie Probe 32 (167.213 Sequenzen und 30,5 % Sequenzen viralen Ursprungs). Dabei stammten Probe 25 und 26 von dem gleichen Patienten und hatten den Ursprung Abstrich und Kruste.

Durch qPCR bestätigt werden konnte dabei nur die Probe 32 (CT 20,8). Nach Assemblierung der viralen Sequenzen aus Probe 25 und 26 zeigte sich, dass es sich hierbei im Gegensatz zu Probe 32 (MOCV Typ 1) um MOCV Typ 2 handelt, welcher eher selten und meist bei immunsupprimierten Patienten auftritt. Dieser Typ wird durch die im Konsiliarlabor für Pockenviren verwendete spezifische qPCR für MOCV nicht abgedeckt, da weder die Sonde noch der R-Primer aufgrund mehrerer *mismatches* und einer Deletion im Genom des MOCV 2 komplementär zur Zielregion und damit keine Amplifikation möglich war.

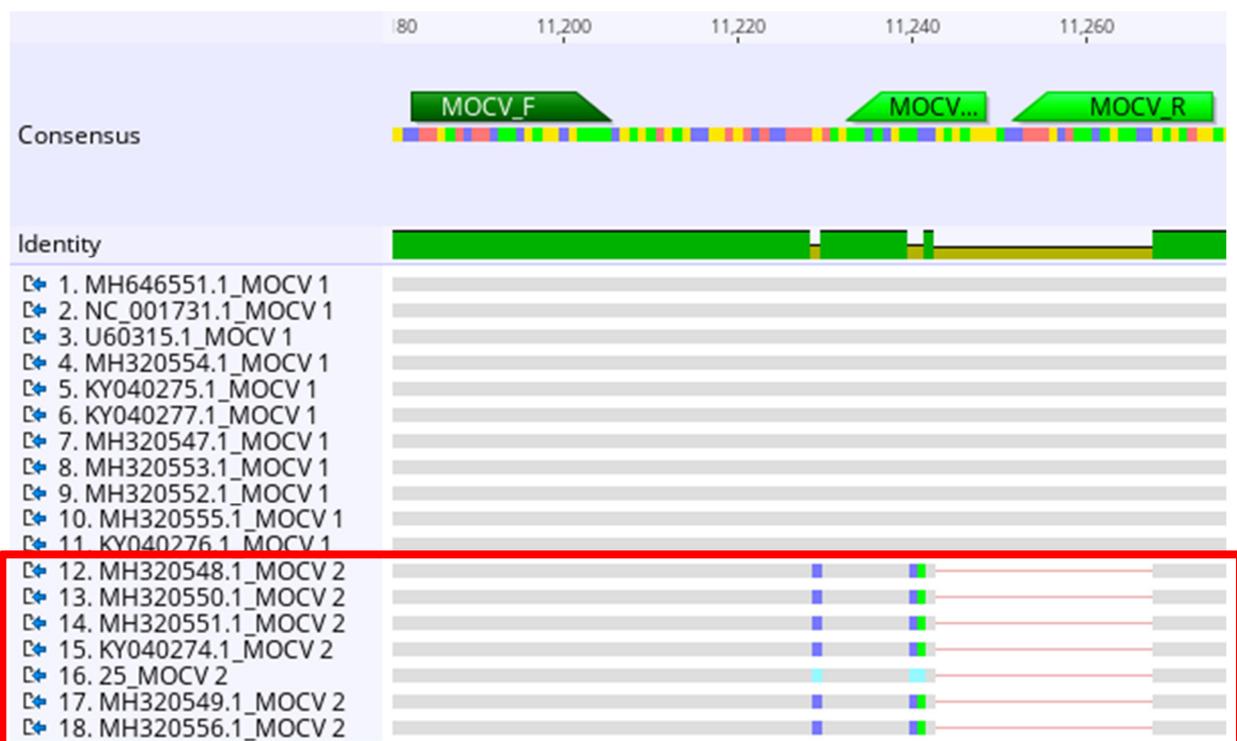


Abbildung 17: Zahlreiche Stämme des MOCV wurden in den vergangenen Jahren sequenziert. Das Sequenz-Alignment zeigt, dass die spezifische PCR für MOCV nur für Viren des Typ 1 möglich ist, da weder die Sonde noch der R-Primer mit der Zielregion des MOCV Typ 2 komplementär sind.

Als weitere positive Probe konnte die Probe 35 bestimmt werden. Hier fanden sich 53.340 Sequenzen von Orf-Virus (2,0 % Sequenzen viralen Ursprungs), bestätigt mit qPCR (CT 20,8).

Des Weiteren zu nennen ist der hohe Anteil von Sequenzen des Merkelzell-Polyomavirus in der Vergleichsprobe Arm-Abstrich-Pool (780 Sequenzen, 0,007 % Sequenzen viralen Ursprungs). HSV1, MOCV1 sowie Orf-Virus ließen sich weder in den Abstrichen asymptomatischer Haut noch in der Negativkontrolle finden.

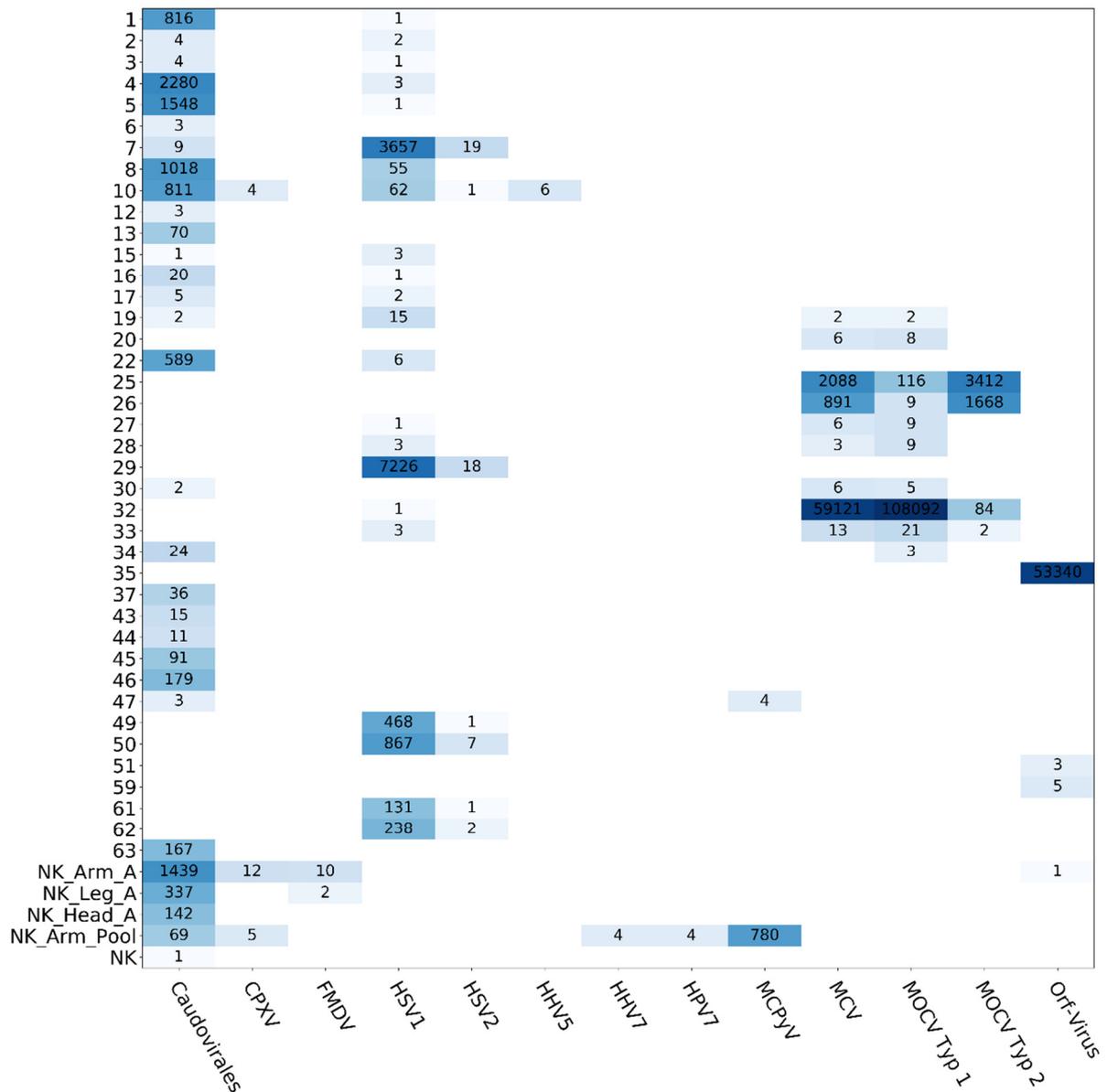


Abbildung 18: Virom-Analyse der Patientenproben basierend auf einem Alignment der reads mit einer Nukleotid-Referenz-Datenbank. Gezeigt werden nur Proben, bei denen für mindestens ein Virus > 1 read identifiziert werden konnte. Der größte Anteil der viralen Sequenzen lässt sich den Bakteriophagen zuordnen (Caudovirales). Sequenzen des Ursprungs Herpes Simplex Virus Typ 1, Molluscum-contagiosum-Virus Typ 1 und 2 sowie Orf-Virus wurden detektiert. FMDV: Foot-and-Mouth-Disease-Virus; CPXV: Kuhpockenvirus; HSV1: humanes Herpes Simplex Virus Typ 1; HSV2: humanes Herpes Simplex Virus Typ 2; CMV: humanes Herpes Virus Typ 5; HHV7: humanes Herpesvirus Typ 7; HPV7: humanes Papillomavirus Typ 7; MCPyV: Merkelzell-Polyomavirus; MOCV: Molluscum-contagiosum-Virus.

3.1.3. Analyse des Viroms durch Aminosäure-Alignments

Da die Ergebnisse einer Virom-Analyse mittels Nukleotid-Alignment sehr spezifisch sind und divergente, mutierte oder neuartige Viren mit dieser Methode nicht detektiert werden können, wurde zusätzlich eine Analyse auf Grundlage eines Aminosäure-Alignments durchgeführt. Abbildung 19 zeigt die Zuordnung der Sequenzen zu den verschiedenen Virus-Genera und -Spezies. Gezeigt werden in der Darstellung nur Proben, bei denen für mindestens ein Virus > 1 read identifiziert werden konnte.

Hierzu wurde das Programm DIAMOND verwendet, welches die Illumina-Sequenzen in die entsprechende Aminosäuresequenz umkodiert und anschließend mit einer Aminosäure-Referenz-Datenbank vergleicht. Diese Methode hat den Vorteil, wesentlich sensitiver zu sein als ein Nukleotid-Alignment, jedoch ist auch die Detektion von falsch-positiven Ergebnissen wahrscheinlicher.

Die im Nukleotid-Alignment detektierten Sequenzen von Viren konnten auch im Aminosäure-Alignment detektiert werden, mit Ausnahme des MCPyV, welches nur mittels Nukleotid-Alignment nachweisbar war. Zusätzlich konnten jedoch weitere virale Sequenzen zugeordnet werden. In den Abstrichen asymptomatischer Haut konnten verschiedene, divergente Papillomaviren gefunden werden.

Im Vergleich zum Nukleotid-Alignment konnten im Aminosäure-Alignment weniger virale *reads* zugeordnet werden.

Zusätzlich konnten in Probe 43 einige nicht eindeutig klassifizierbare Pockenvirus-Sequenzen detektiert werden, welche verschiedenen Spezies der Orthopockenviren, jedoch auch den Parapockenviren und Molluscipockenviren zugeordnet wurden. Bei dieser Probe handelte es sich um eine Katze, welche mit knopfartigen Hautveränderungen tierärztlich behandelt wurde.

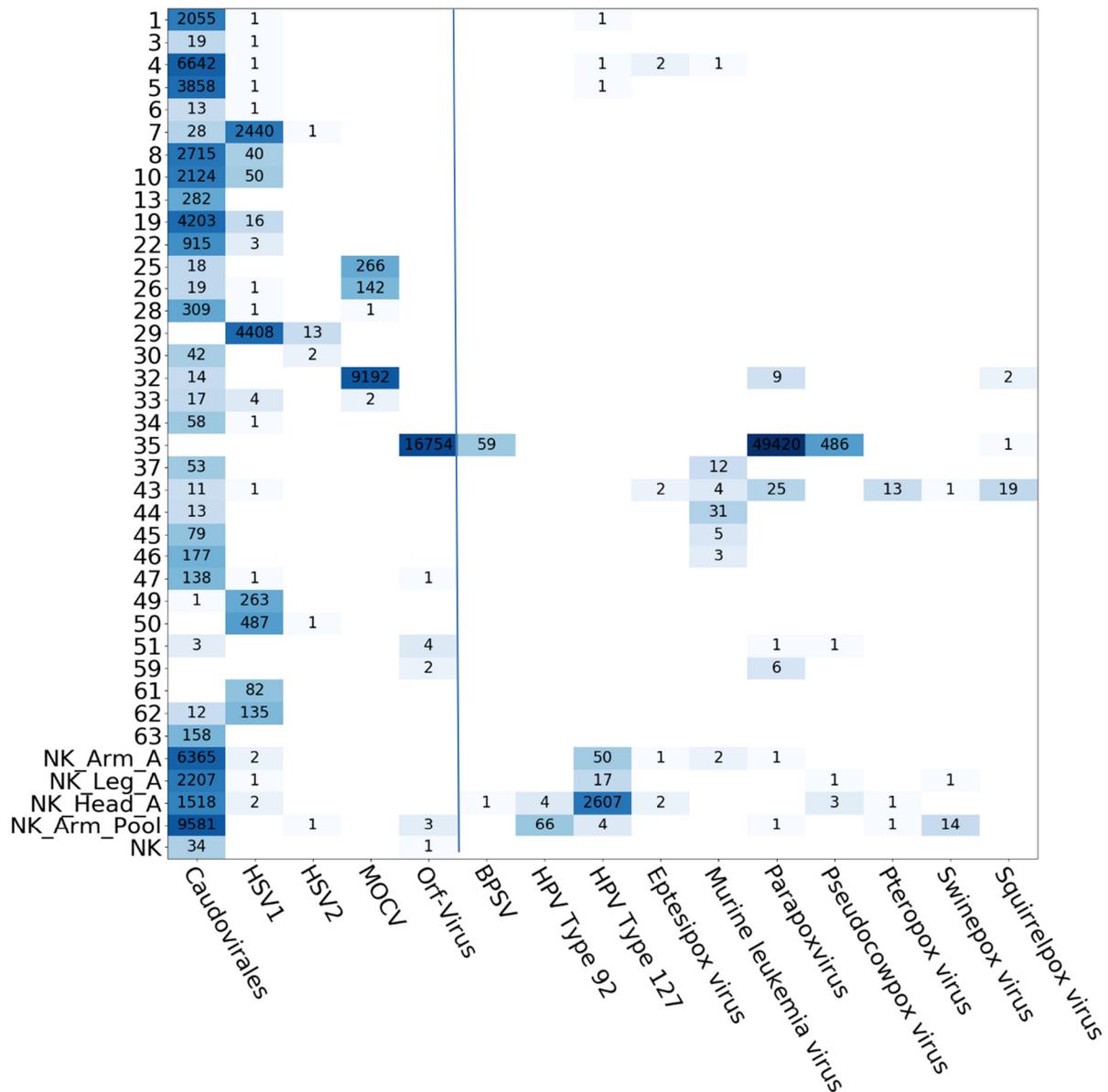


Abbildung 19: Virom-Analyse der Patientenproben basierend auf Aminosäure-Alignments. Alle viralen Sequenzen, welche durch das Nukleinsäure-Alignment detektiert wurden, lassen sich auch im Aminosäure-Alignment finden (linker Bereich Abbildung 19). Zusätzlich wurden durch das sensitivere Alignment Sequenzen mit nur etwa 80 % Übereinstimmung zur nächsten Referenz (Squirrelpox virus UK) detektiert. HSV1: humanes Herpes Simplex Virus Typ 1; HSV2: humanes Herpes Simplex Virus Typ 2; MOCV: Molluscum-contagiosum-Virus; BPSV: Bovines Papular Stomatitis Virus; HPV: humanes Papillomavirus.

3.1.4. Detektion eines neuartigen Eichhörnchen-Pockenvirus

Insgesamt konnten 267 Sequenzen dem neuartigen Virus zugeordnet werden, welche zu einem *Contig* von 604 bp Länge assembliert werden konnten. Diese Konsensus-Sequenz zeigte die höchste Übereinstimmung zu Squirrelpoxvirus strain red Squirrel UK (Accession No. HE601899) mit 80,14 % Identität auf Nukleotidebene (ID nt), Bovine papular stomatitis virus (Accession No. KM875471) mit 79,27 ID nt, Pseudocowpoxvirus (Accession No. GQ329670) mit 78,24 ID nt und Orf-Virus (Accession No. MG712417) mit 77,37 ID nt.

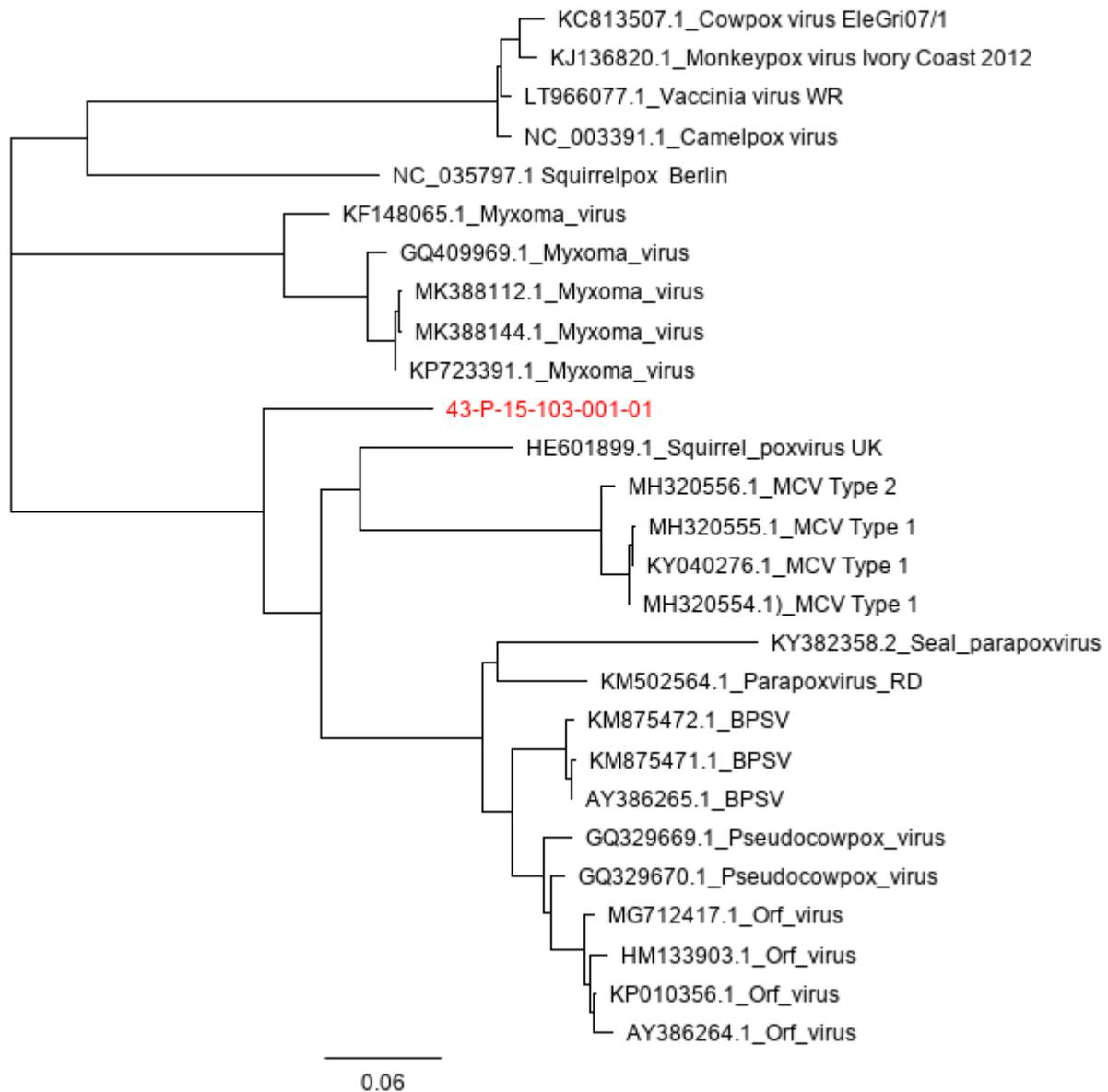


Abbildung 20: Neighbor-Joining Tree der Squirrelpoxvirus-ähnlichen Sequenz aus Probe 43 und allen GenBank-Referenzen mit Sequenzübereinstimmung. Die Sequenzen aus Probe 43 zeigen die größte phylogenetische Verwandtschaft zu Squirrelpoxvirus UK.

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde eine spezifische qPCR entwickelt und die Ursprungprobe sowie neu extrahiertes Material positiv getestet. Zusätzlich wurde das Ursprungsmaterial (Kruste) auf verschiedenen Zelllinien kultiviert. Nach der ersten bzw. zweiten Passage konnten deutliche zytopathische Effekte beobachtet werden, und das Material wurde erneut mit der spezifischen qPCR positiv getestet (Abbildung 21).

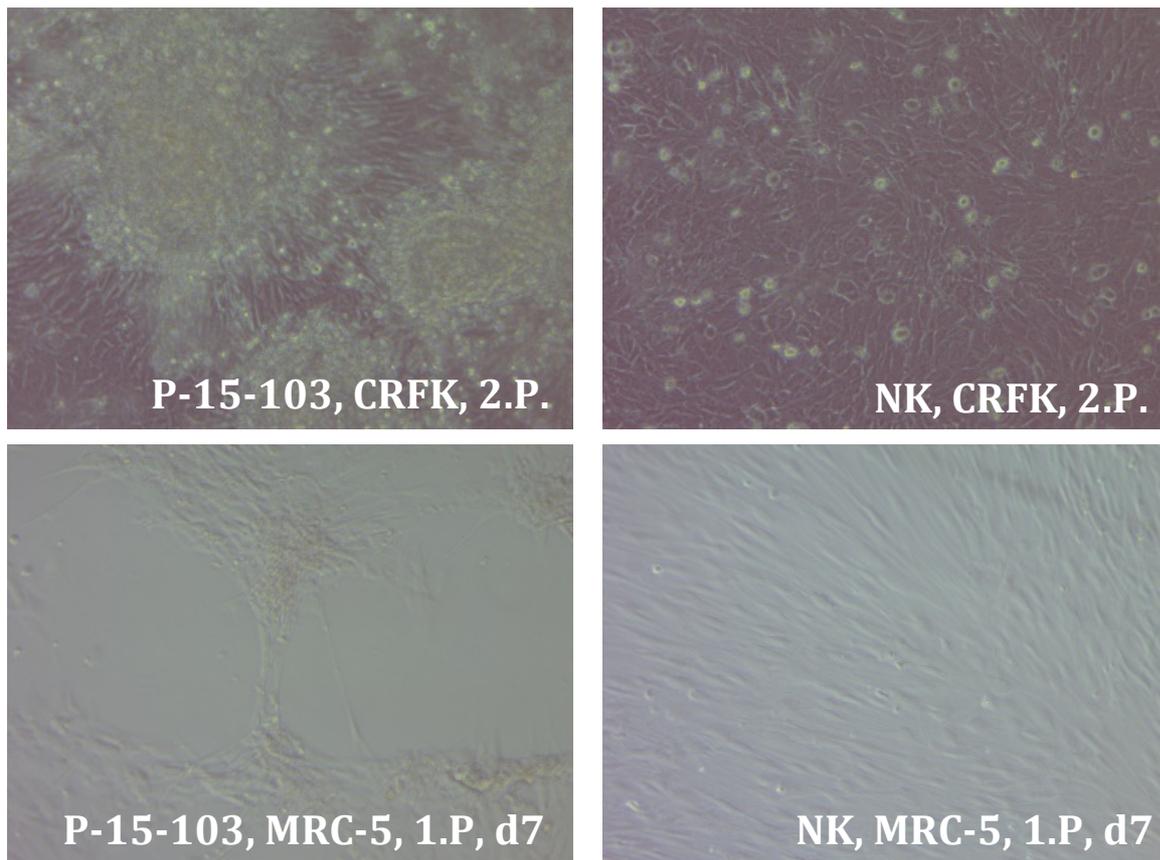


Abbildung 21: Zytopathische Effekte bei Inkubation mit dem Patientenmaterial der Probe 43 auf unterschiedlichen Zelllinien nach einer bzw. zwei Passagen.

3.1.5. Fungale Metagenomanalyse

Neben viralen Pathogenen wurden auch Erreger der Domäne Fungi als mögliche Ursache der Hautläsionen in Betracht gezogen. Hierzu wurde ebenfalls ein Nukleotid-Alignment der Illumina-Sequenzen zu einer Fungi-Referenz-Datenbank durchgeführt (Abbildung 22).

Da die gesunde Hautflora von zahlreichen Fungi besiedelt ist, fanden sich daher besonders in den Vergleichsproben der Abstriche gesunder (asymptomatischer Haut) eine große Vielfalt an Spezies. Insbesondere *Malassezia restricta* ließ sich in vielen der Patienten- und Vergleichsproben finden.

Sequenzen des Ursprungs des pathogenen Dermatophyten *Trichophyton rubrum* (1.617 Sequenzen; 0,04 % Sequenzen fungalen Ursprungs) konnten der Patientenprobe 23 zugeordnet werden.

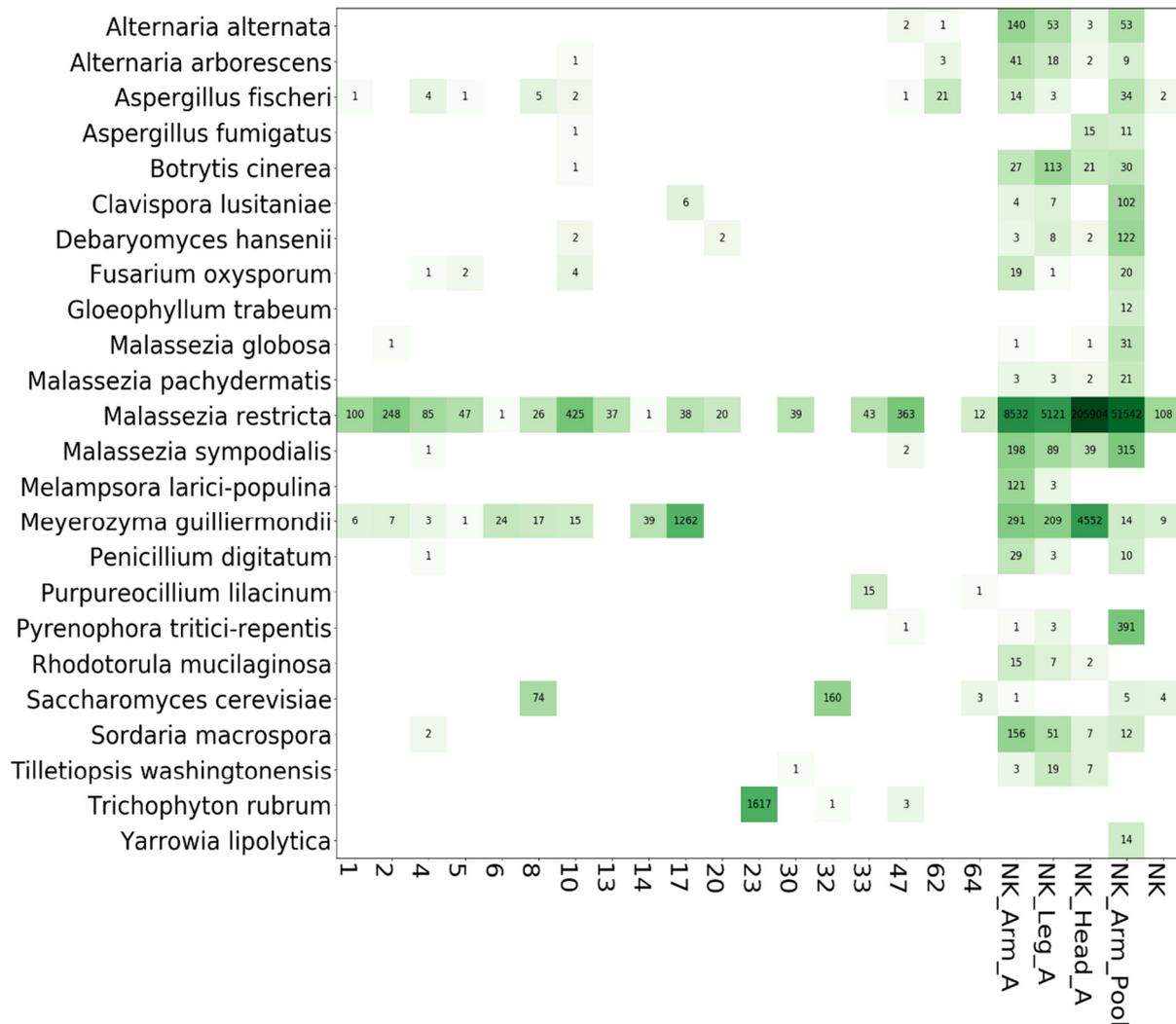


Abbildung 22: Analyse des fungalen Metagenoms. In vielen der Patientenproben befanden sich Sequenzen von *Malassezia restricta*, in Probe 23 Sequenzen von *Trichophyton rubrum*. Aufgrund der hohen Diversität der Fungi werden nur Proben mit Sequenz-Anzahlen > 10 gezeigt.

3.1.6. Protisten und Parasiten

In den Patientenproben konnten keine Sequenzen bestimmt werden, welche auf das Vorhandensein von Parasiten und/oder Protisten hinweisen.

3.1.7. Analyse des Bakterioms mittels Illumina-Sequenzierung

Auch das Bakteriom der 49 Patientenproben wurde mittels Illumina-Sequenzierung analysiert. Aufgrund des sehr niedrigen Anteils von bakteriellen Sequenzen in einigen Datensätzen wurden jedoch nur 28 der 49 Patientenprobe in die Analyse mit einbezogen. Abbildung 23 zeigt den Anteil der Sequenzen bakteriellen Ursprungs sowie das relative Verhältnis der einzelnen Bakterien in den Klassen, Genera und Spezies.

Die Einordnung der Illumina-Sequenzen bakteriellen Ursprungs aus den zugehörigen Klassen auf das Spezies- und sogar Genera-Level war nicht immer eindeutig. Als Beispiel konnten bei Probe 8 etwa 80 % der Sequenzen der Klasse *Gammaproteobacteria* zugeordnet werden, nur noch etwa 50 % konnten bereits dem Genus *Pseudomonas* und jeweils nur noch 10 % den Spezies *P. mendocina* und *P. koreensis* zugeordnet werden. Durchschnittlich wurden je Probe 52.086 Sequenzen der Klasse, 51.271 Sequenzen dem Genus und 31.248 Sequenzen der Bakterienspezies zugeordnet.

Die Proben asymptomatischen Ursprungs bestanden überwiegend aus *Cutibacterium acnes* und *Micrococcus luteus*, welche Besiedler der gesunden Hautflora sind. Im Gegensatz dazu bestand das bakterielle Mikrobiom der Probe 5 (303.084 Sequenzen), Probe 17 (3.217 Sequenzen), Probe 22 (24.719 Sequenzen), Probe 32 (1.122 Sequenzen) und Probe 34 (2.741 Sequenzen) überwiegend aus Staphylokokken, darunter *Staphylococcus epidermidis* (Probe 22 und Probe 34), *S. aureus* (Probe 5, Probe 17) und *Staphylococcus lugdunensis* (Probe 32). Probe 32 wurde dabei bereits als MOCV-positiv identifiziert. 1.444 Sequenzen von *Pseudomonas aeruginosa* befanden sich in Probe 13. Der Datensatz der Probe 28 bestand überwiegend aus Sequenzen der Spezies *Acinetobacter lwoffii* (201.746 Sequenzen). Als einzige Probe konnten aus Probe 3 Sequenzen von *Fingoldia magna* (435 Sequenzen) generiert werden. Probe 37 konnte als *Escherichia coli* (9.713 Sequenzen) klassifiziert werden. Auch in den Negativkontrollen ließen sich mehrere bakterielle Spezies finden.

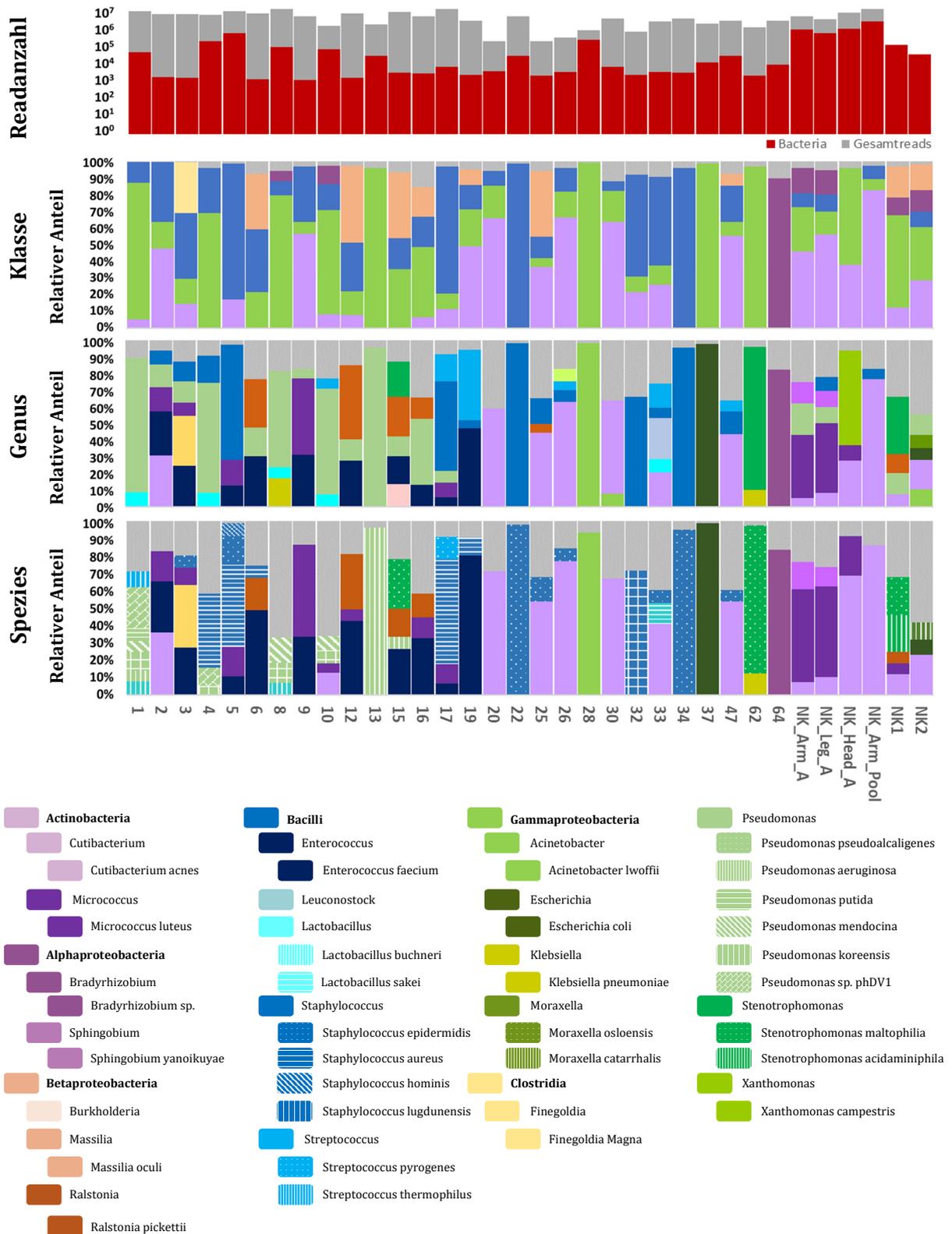


Abbildung 23: Mikrobiom-Analyse der bakteriellen Zusammensetzung der Patientenproben basierend auf Illumina-Sequenzen. Die Abstriche der asymptomatischen Haut bestanden überwiegend aus *Cutibacterium acnes* und *Micrococcus luteus*. In den Patientenproben konnten Sequenzen von *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter lwoffii* und *Finegoldia magna* detektiert werden.

3.1.8. Analyse des Bakterioms mittels 16S PCR und MinION-Sequenzierung

Um zu untersuchen, ob die MinION-Technologie neben der Virus-Diagnostik mittels VAmPSeq auch für die Diagnostik von Bakterien geeignet ist, wurde mit den 49 Patientenproben eine 16S-PCR durchgeführt und das Ergebnis der Reaktion anschließend auf dem MinION sequenziert. Da es durch die 16S-PCR zu einer Anreicherung der bakteriellen DNA kommt, wurden im Gegensatz zur Illumina-Sequenzierung für insgesamt 45 der 49 Patientenproben Sequenzen generiert (Mittelwert 5.525 Sequenzen).

Abbildung 24 zeigt die Einordnung der generierten Sequenzen in die bakteriellen Klassen, Genera und Spezies. Ein großer Anteil der Sequenzen wurde der Klasse der *Betaproteobacteria*, *Bacilli* und *Actinobacteria* zugeordnet. Auf Genus-Level kam es zu einer Aufteilung in viele unterschiedliche Genera, welche bei einem Anteil von < 5% an den Gesamtsequenzen in der Abbildung grafisch als „Other“ dargestellt sind (Abbildung 24). Die Sequenzen aus Probe 3 konnten als *Fingoldia magna* klassifiziert werden, Proben 4, 6, 17 und 43 als *Staphylococcus aureus*. Probe 34 konnte als *Staphylococcus epidermidis* identifiziert werden. Die Probe 13 konnte als *Pseudomonas aeruginosa*, Probe 37 als *Escherichia coli* klassifiziert werden. Sequenzen, welche aus Probe 28 generiert wurden, konnten als *Acinetobacter baumannii* eingruppiert werden. Proben 36 und 45 konnten als *Staphylococcus felis* identifiziert werden.

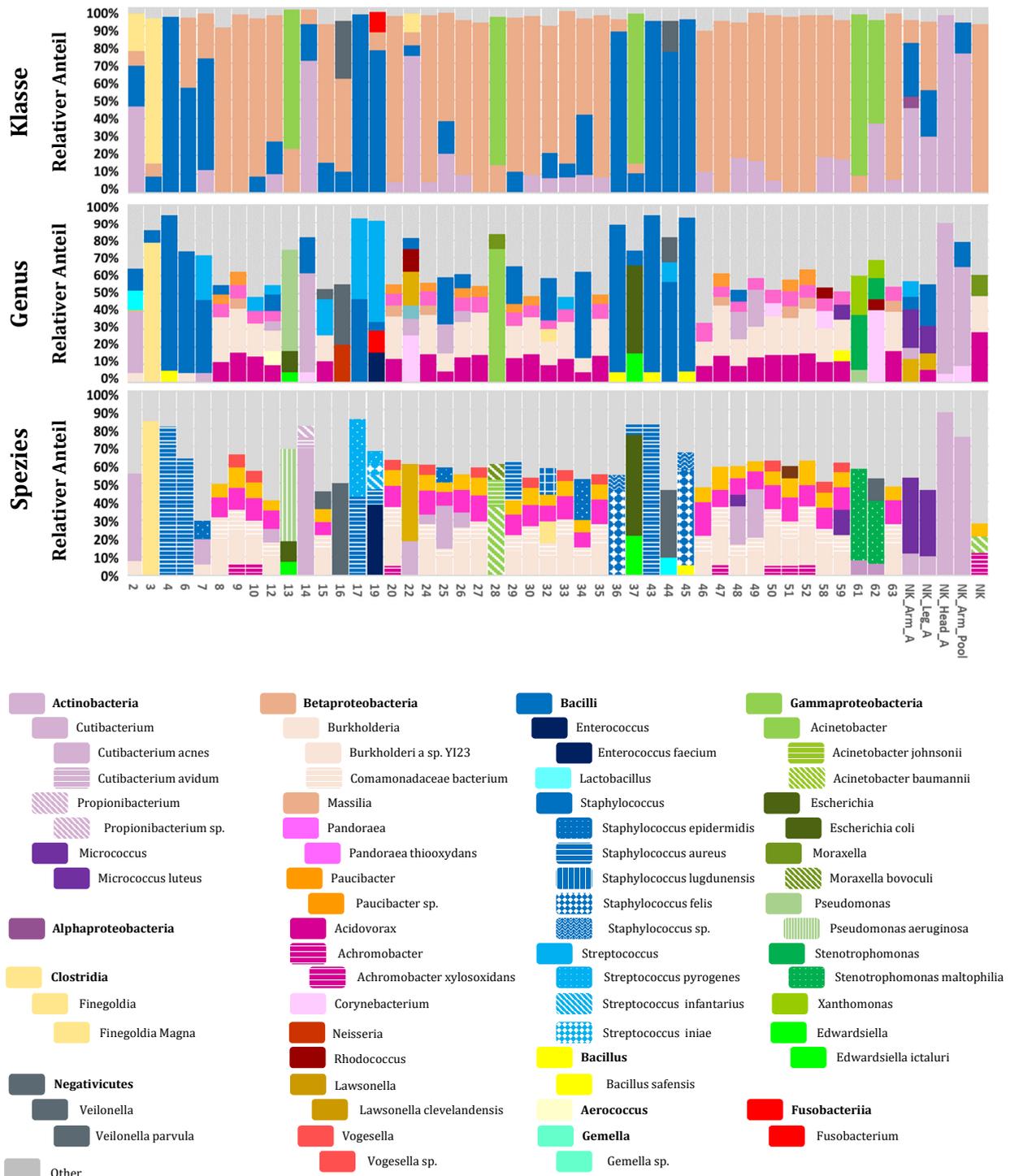


Abbildung 24: Mikrobiom-Analyse der bakteriellen Zusammensetzung der Patientenproben basierend auf einer MinION-16s-Sequenzierung. Übereinstimmend zur Illumina-Sequenzierung konnte in den Proben *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* und *F. magna* sowie *Acinetobacter baumannii* detektiert werden.

3.1.9. Vergleich des Illumina-Mikrobioms mit 16S MinION-Sequenzierung

Die Verteilung der Sequenzen bakteriellen Ursprungs bei den beiden Sequenzierungen war nur bedingt vergleichbar (Abbildung 25). So wurde der größte Anteil der Sequenzen der Klasse der *Betaproteobacteria* zugeordnet, während diese Klasse in der Analyse der Illumina-Sequenzierung kaum vertreten war. Einige Übereinstimmungen gab es bei den Einordnungen auf Spezies-Ebene. So konnte Probe 17 ebenfalls als *Staphylococcus aureus* und Probe 34 als *Staphylococcus epidermidis* identifiziert werden. Ebenfalls konnte übereinstimmend Probe 13 als *Pseudomonas aeruginosa*, Probe 37 als *Escherichia coli* sowie die Probe 3 als *Fingoldia magna* klassifiziert werden. Sequenzen, welche aus Probe 28 generiert wurden, konnten ebenfalls als *Acinetobacter*, auf Spezies-Level jedoch als *Acinetobacter baumannii* eingruppiert werden.

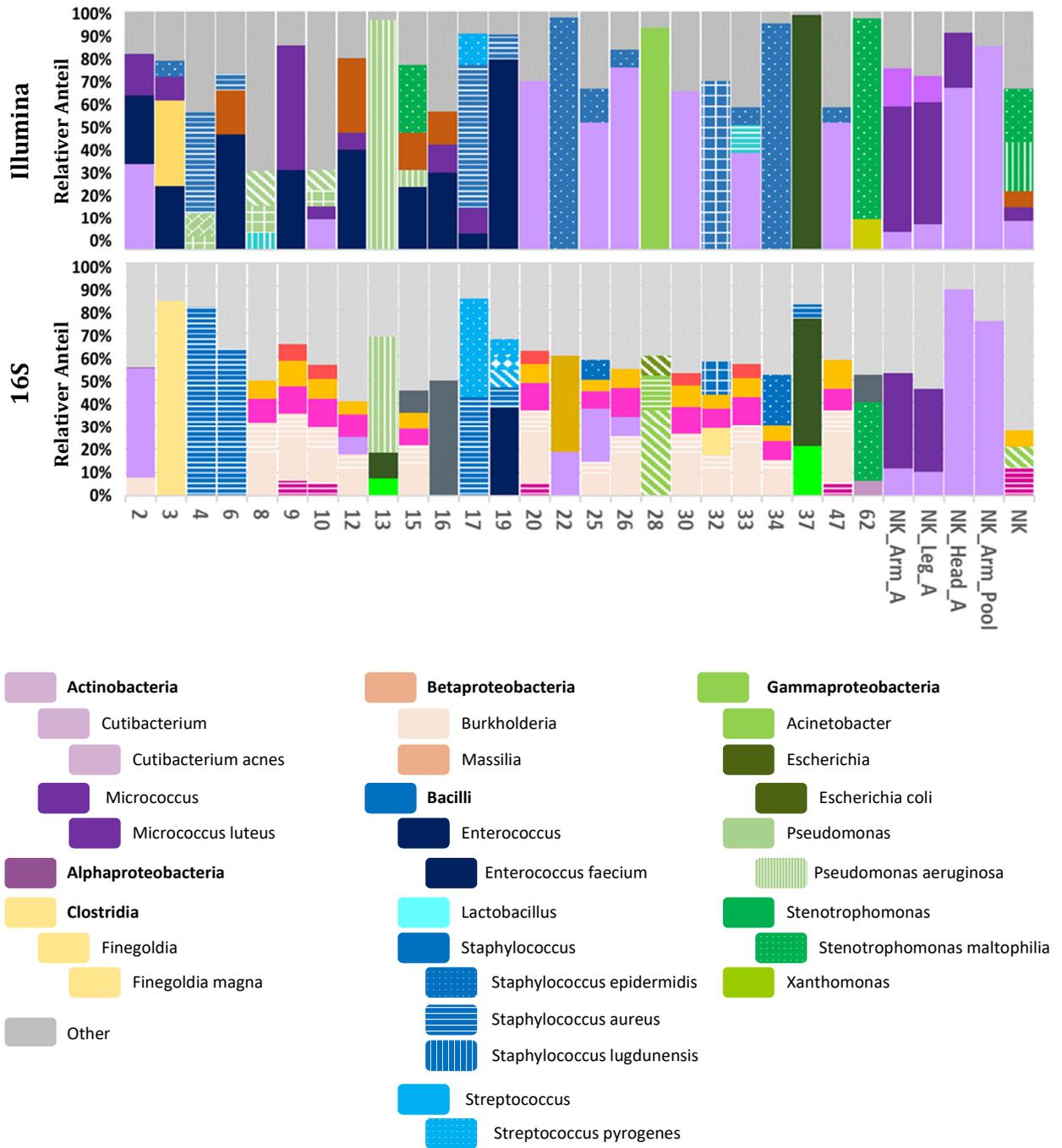


Abbildung 25: Vergleich der Mikrobiom-Analyse mittels Illumina-Sequenzierung und 16S-Sequenzierung. Übereinstimmend sind *S. aureus* in Probe 17, *S. epidermidis* in Probe 34, *P. aeruginosa* in Probe 13, *E. coli* in Probe 37, *Fingoldia magna* in Probe 3, sowie *Acinetobacter* in Probe 28.

3.2. Entwicklung und Bewertung der VAmPSeq-Methode

Im Abschnitt der Metagenomanalyse wurde gezeigt, dass mittels Illumina-Sequenzierung verschiedene Viren in den Patientenproben diagnostiziert werden konnten, darunter das HSV1, MOCV und Orf-Virus.

Jedoch hat die Illumina-Sequenzierung einige relevante Nachteile: Sie ist zeitaufwendig (mehrere Tage bis Wochen) und mit hohen Kosten verbunden; die bioinformatische Auswertung erfordert eine hohe Rechenkapazität und bioinformatische Kenntnisse und generiert Unmengen von Daten. Auch kann die Sequenzierung der gesamten DNA in einer Probe mit einer Problematik im Bereich des Datenschutzes einhergehen (Sequenzierung humaner DNA).

Um diese Nachteile zu umgehen und dennoch den Vorteil des „offenen Blicks“ der Metagenomanalyse nutzen zu können, wurde die VAmPSeq (Virus Amplification based Sequencing) Methode entwickelt.

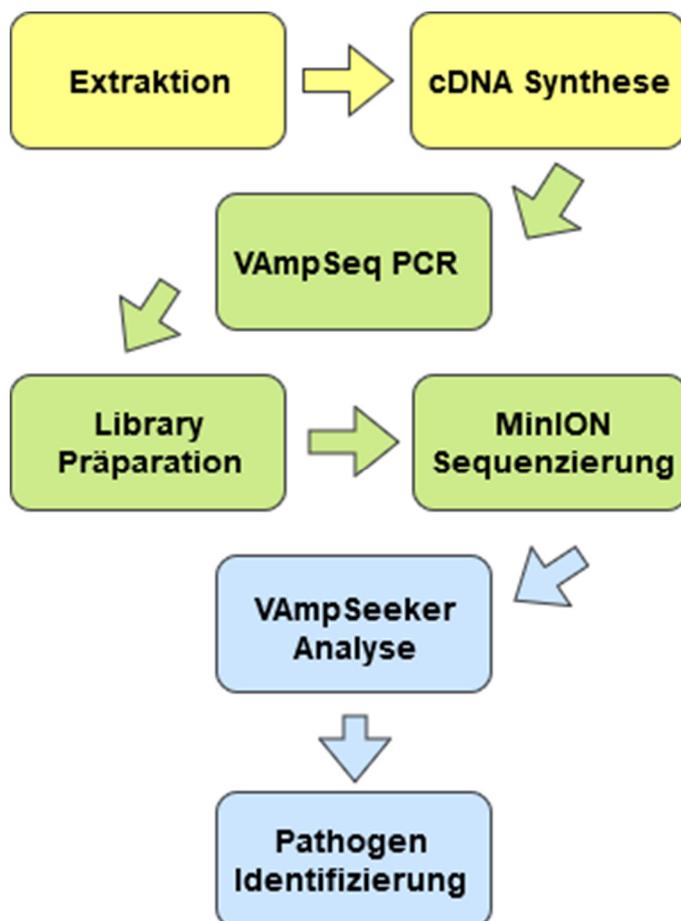


Abbildung 26: Die entwickelte VAmPSeq-Methode für die Detektion von Viren, welche pockenähnliche Hautveränderungen hervorrufen können, basiert auf einer multiplex-PCR. Nach der Extraktion des Patientenmaterials und der Umschreibung der RNA in DNA wird die zu detektierende virale DNA mit der entwickelten VAmPSeq-multiplex-PCR in nur einer Reaktion amplifiziert. Die Reaktion wird aufgereinigt, mit einem Sequenzieradapter ligiert und dann auf dem MinION sequenziert. Schon nach wenigen Sekunden der Sequenzierung können mit der real-time Analyse die ersten viralen *reads* mit dem VAmPSeeker detektiert und der in der Probe vorhandene Erreger identifiziert werden.

3.2.1. *In silico*-Sensitivität der VAmPSeq-Methode

Für die VAmPSeq-multiplex-PCR wurden 58 Primer entwickelt, welche 36 Virus-Spezies amplifizieren können. Um die Sensitivität des Primerpools *in silico* bewerten zu können, wurden die ΔG -Werte für die Ausbildung von Homodimeren, Heterodimeren und *hairpins* sowie die Schmelztemperaturen aller Primer berechnet. Zudem wurde die spezifische Bindung der Primer auf ihre viralen Zielregionen unter Berücksichtigung einzelner Nukleotid-*mismatches* betrachtet. Dazu wurden die entsprechenden Primer an alle Zielreferenzen in GenBank aligniert und die Anzahl an *mismatches* zwischen Primer und Zielregion bestimmt. Dabei zeigte sich, dass für die Target-Viren nahezu alle Referenzen mit höchstens einem *mismatch* je Primerpaar abgedeckt wurden (Abbildung 27).

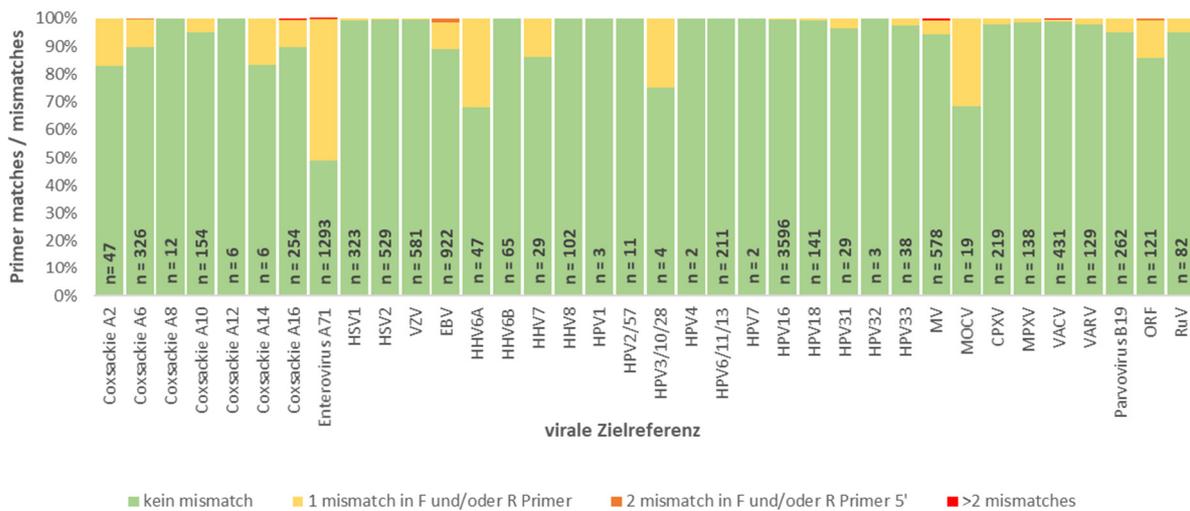


Abbildung 27: *In silico*-Bindung der Primer an die für die jeweilige Virusspezies in NCBI GenBank verfügbaren Referenzen unter Berücksichtigung einer oder mehrerer Primer-*mismatches* zur Zielregion.

Die Schmelztemperatur (TM) der Primer entsprach durchschnittlich 54,1 °C (min 52,2 °C, max. 55,8 °C) (Abbildung 28). Da alle Primer bei einer VAmPSeq-PCR unter gleichen Annealingtemperaturen inkubiert wurden, war die größte Differenz zwischen zwei Primern (3,6 °C) nicht optimal, da diese nicht mehr als 2 °C betragen sollte. Dies betraf je einen Primer für das Rötelnvirus und das Coxsackievirus A16. Während die Amplifikation und Sequenzierung von Coxsackievirus A4, A10 und A16, welche durch das gleiche Primerpaar amplifiziert wurden, erfolgreich gezeigt werden konnte (Tabelle 19), konnte von allen eingesetzten Viren das Rötelnvirus als einziges Virus nicht amplifiziert werden. Die Amplifikation von HSV1 und HSV2 (TM 55,7 °C) hingegen konnte erfolgreich gezeigt werden.

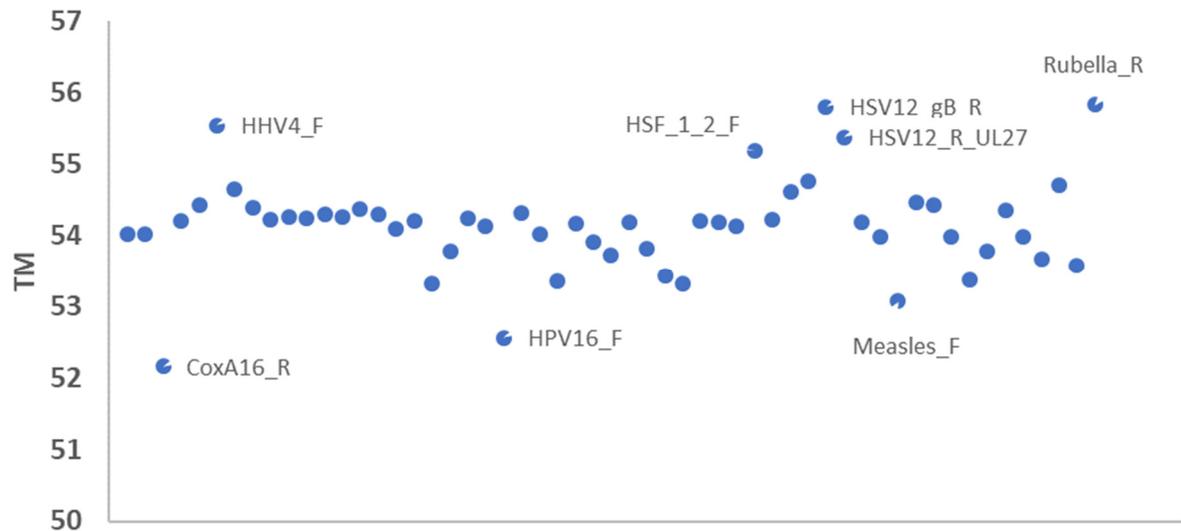


Abbildung 28: Schmelztemperatur (TM) der einzelnen Primer des VampSeq-Assays. Die Schmelztemperatur der Primer entspricht durchschnittlich 54,1 °C (min 52,2 °C, max. 55,8 °C).

Die Stabilität der Bindung von Basenpaaren wird in Bezug auf *hairpins* und Homodimere sowie Heterodimere häufig als ΔG -Wert präsentiert. Je negativer der ΔG ist, desto mehr Energie muss aufgebracht werden, um die Bindungen von Basenpaaren in *hairpins* oder Primerdimere zu lösen. Generell sind bei der Ausbildung von *hairpins* Werte bis zu -2 kcal/mol und bei Dimeren Werte bis -9 kcal/mol tolerierbar. Aufgrund der hohen Anzahl von Primern konnte beim Design der VampSeq-Primer nicht in allen Fällen die Ausbildung von *hairpins* und Dimeren vermieden werden. Für Homodimere war jedoch der ΔG -Wert maximal -7,4 kcal/mol, bei *hairpins* maximal -534 cal/mol und lag damit unter der Toleranzgrenze (-9 kcal/mol bzw. 2 kcal/mol) (Abbildung 29 und Abbildung 30).

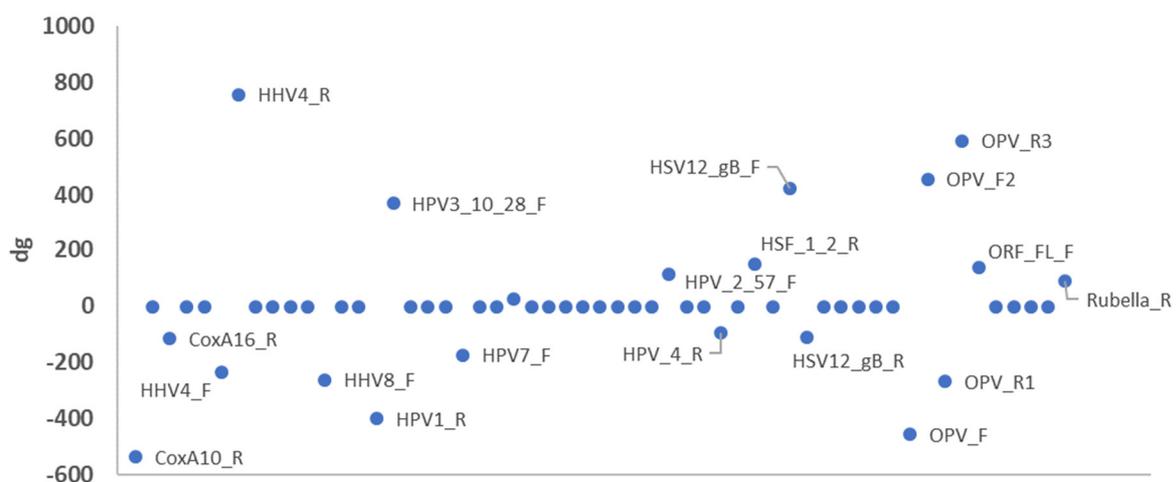


Abbildung 29: ΔG -Werte für die Ausbildung von Hairpin-Strukturen.

Abbildung 30 zeigt die ΔG -Werte für die Heterodimere aller Primerkombinationen. Auch hier konnte die Ausbildung von Dimeren der Primer nicht vermieden werden, betrug aber maximal -8,2 kcal/mol.

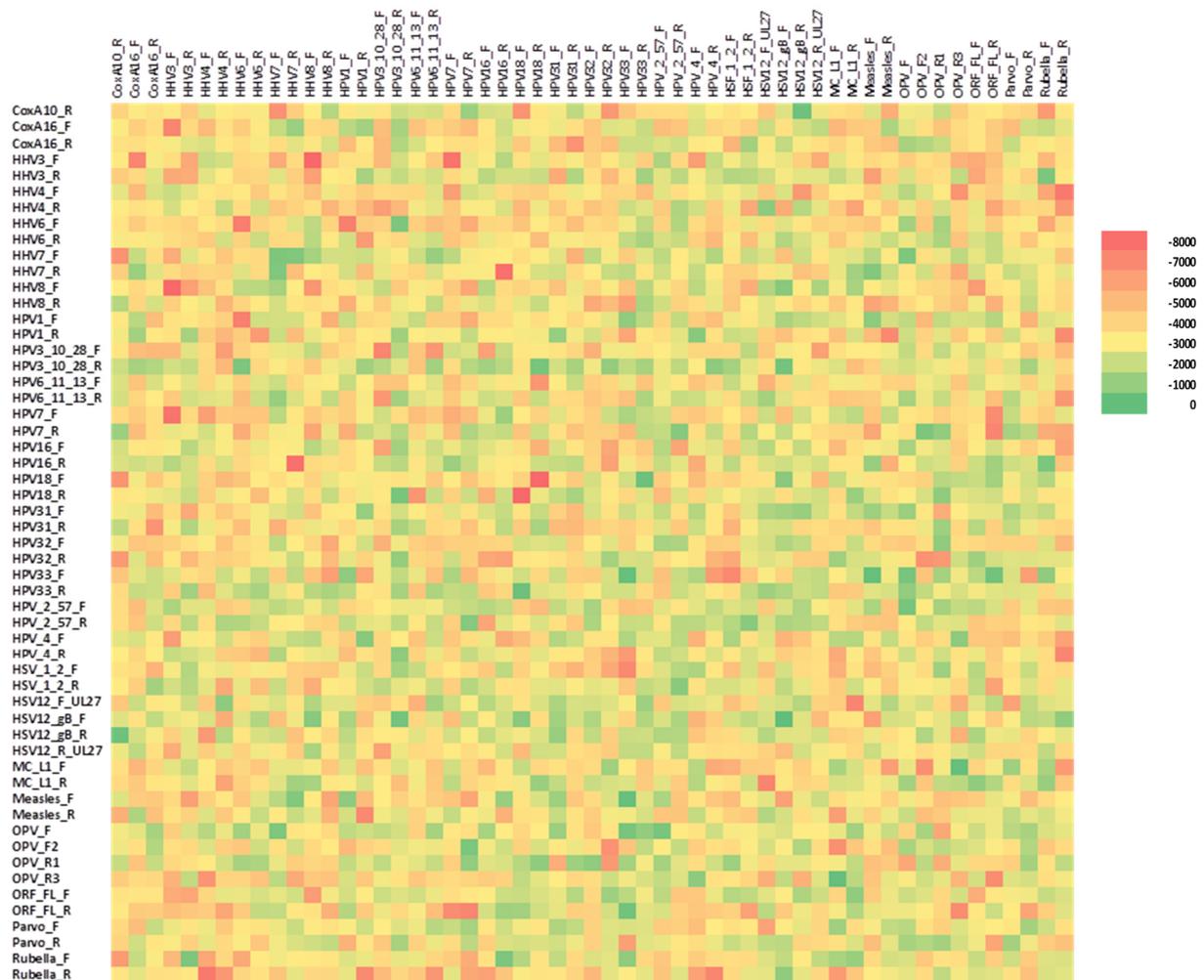


Abbildung 30: ΔG -Werte für die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren aller Primerkombinationen. Nur wenige der Primerkombinationen haben einen ΔG -Wert < -7 kcal/mol.

3.2.2. Entwicklung des PCR-Protokolls für die VAmPSeq-Methode

Durch die Kombination verschiedener Konzentrationen der PCR-Reagenzien und einer qPCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse wurde die Zusammensetzung an Reagenzien ermittelt, welche die Amplifikation aller eingesetzten viralen Targets ohne eine unspezifische Amplifikation ermöglicht. Anschließend wurde das ermittelte Protokoll durch die Titration einzelner Reagenzien optimiert, um eine möglichst hohe Konzentration der Amplikons nach Beendigung der PCR zu ermöglichen (Tabelle 12). Die Ergebnisse wurden anschließend durch eine MinION-Sequenzierung der Reaktionsansätze nach der PCR bestätigt.

Abbildung 31 zeigt die Schmelzkurvenanalyse bei der Amplifikation der Viren HSV1, Varizella-Zoster-Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV), HHV7, MOCV, PPV sowie VACV, CPXV und MPXV

mit dem ermittelten PCR-Protokoll in einzelnen Reaktionsansätzen. Dabei können die PCR-Amplikons durch ihre charakteristische Schmelztemperatur unterschieden werden.

Es wird deutlich, dass es bei der Amplifikation der Viren und der anschließenden Schmelzkurvenanalyse zu keiner unspezifischen Amplifikation kam und nur die spezifischen viralen Zielregionen amplifiziert wurden. In den Negativkontrollen kam es zu einer Dimerbildung der Primer, welche als Peak der Schmelzkurve mit geringer T_M sichtbar war.

Im Vergleich zu einer konventionellen PCR bestand der ermittelte PCR-Ansatz aus einer hohen Konzentration von Puffer, dNTPs, Primern und Taq-Polymerase. Der Annealingschritt der PCR erfolgte bei einer hohen Temperatur von 65°C, um Primerdimere und unspezifische Bindungen zu reduzieren. Die ermittelte beste Kombination an Reagenzien ist in Tabelle 13 und das Temperaturprofil in Tabelle 14 im Abschnitt Material und Methoden angegeben,

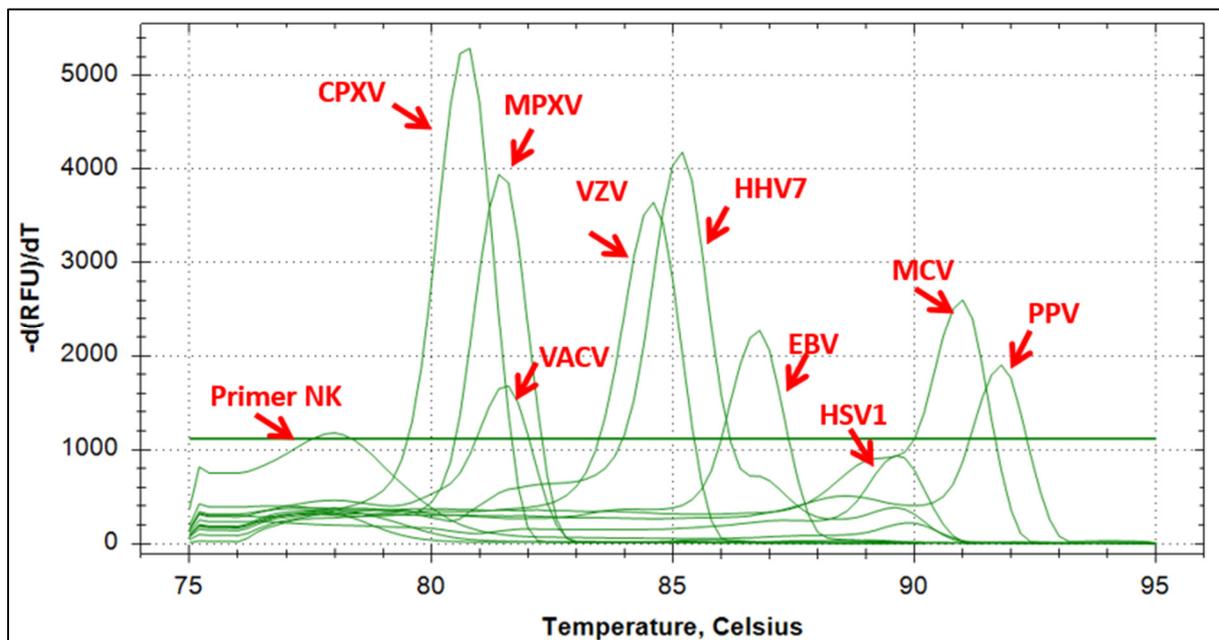


Abbildung 31: Die beste Zusammensetzung der PCR-Reagenzien wurde mittels qPCR bestimmt. Dabei können die einzelnen viralen Ziele der VAmPSeq-multiplex-PCR durch eine anschließende Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden.

3.2.3. Sensitivität der VAmPSeq-Methode

Um die Sensitivität der VAmPSeq-Methode experimentell zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen der Target-Viren HSV1, HSV2, VZV, EBV, humanes Herpes Virus Typ 5 (CMV), MOCV, PPV, CPXV, VACV und MPXV mit der VAmPSeq-Methode bearbeitet. Bestimmt wurden das Detektionslimit der Methode für die verschiedenen Viren und die niedrigste Konzentration der Viren, bei der das Virus durch die VAmPSeq-Methode nachweisbar ist. Die Messungen wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt.

Das Detektionslimit lag für mindestens eine von drei Reaktionen für alle Viren bei höchstens 28,3 Genomäquivalenten je Reaktion (Tabelle 18). Als Beispiel ist HSV1 mittels VAmPSeq in

einer Konzentration von nur 0,5 Genomäquivalenten je Reaktion detektierbar, jedoch nur in einer von drei Reaktionen. In einer Konzentration von fünf Genomäquivalenten je Reaktion ist HSV1 bereits in drei von drei Reaktionen detektierbar. Damit erwies sich die VAmPSeq Methode für einige der Viren als sensitiver als die spezifischen qPCRs. So konnten bei HSV1, MOCV, CPXV und MPXV in der Konzentration des ermittelten Detektionslimits mittels VAmPSeq-Methode nach der Sequenzierung virale *reads* nachgewiesen werden, bei den spezifischen qPCR hingegen nicht. Die Sequenzierzeit betrug für die ermittelten Ergebnisse für alle Proben eine Stunde.

Die Konzentration der viralen Reads nach der VAmPSeq-PCR und MinION-Sequenzierung an den Gesamtreads betrug zwischen 88 % (VZV) und 97 % (EBV, CPXV, VACV). Die VAmPSeq-Methode war damit nicht nur sensitiv, sondern auch spezifisch, d.h. es kam zu keiner Amplifikation unspezifischer Regionen. Bei VZV lag der Anteil der spezifischen viralen *reads* nur bei 88 %, jedoch handelt es sich bei der Probe um eine Patientenprobe, bei welcher eine Doppelinfektion mit VZV und dem humanen Herpesvirus 6B nachgewiesen wurde.

Bei näherer Betrachtung handelte es sich bei den Sequenzen des Hintergrundes ebenfalls um virale Sequenzen, welche jedoch überdurchschnittlich viele Fehler in der Nukleotidsequenz aufwiesen, oder Dimere aus viralen Sequenzen, welche bei der MinION-Sequenzierung entstehen können. Mit der verwendeten bioinformatischen Analyse eines Referenz-Alignments konnten diese Sequenzen nicht identifiziert werden.

Tabelle 18: Detektionslimit verschiedener Viren mit der VAmPSeq-Methode im Vergleich zu spezifischen qPCRs

	Detektionslimit (GE/Reaktion)	Positive Reaktionen	CT qPCR	Virale Amplikon/<i>reads</i> gesamt
HSV1	0,5	1/3	40,0	0,89
HSV2	2,6	1/3	35,2	0,96
VZV	8,3	2/3	36,7	0,88* / 0,96
EBV	18,1	1/3	34,0	0,97
CMV	10,4	2/3	37,0	0,96 / 0,93
MOCV	18,6	2/3	40,0	0,90
PPV	20,5	1/3	34,2	0,93
CPXV	26,6	3/3	40,0	0,96 / 0,96 / 0,97
VACV	28,3	3/3	38,5	0,97 / 0,96 / 0,97
MPXV	21,5	1/3	40,0	0,95

* Doppelinfektion HHV6B

Da die Quantifizierung nicht für alle Viren des VAmPSeq-Assays möglich war und die Methode auch an unverdünnten Proben unterschiedlichen Ursprungs getestet werden sollte, wurden unquantifizierte Proben unterschiedlichen Ursprungs VAmPSeq-sequenziert (Tabelle 19). Dabei konnte die VAmPSeq-Methode für weitere Viren, darunter das humane Herpesvirus 6A (HHV6A), humane Herpesvirus 6B (HHV6B), humane Herpesvirus 7 (HHV7), Coxsackievirus A4,

Coxsackievirus A10, Coxsackievirus A16, die humanen Papillomaviren (HPV) HPV 2, HPV 6, HPV 16, HPV 28, HPV 57, das Masernvirus sowie Parvovirus B19 bestätigt werden. Als einziges Virus konnte das Rötelnvirus nicht amplifiziert und/oder sequenziert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die VAmPSeq-Methode auch für unverdünnte Proben unterschiedlichen Ursprungs geeignet war (Serum, Hautabstrich, Rachenabstrich, Urin, Gewebe). Auch Doppelinfektionen in einer Probe konnten mit VAmPSeq diagnostiziert werden (Hautabstrich HHV6B), obwohl hier die Konzentration an viralen *reads* geringer war, was sich wiederum auf die Sensitivität auswirken konnte.

Tabelle 19: Weitere durch VAmPSeq amplifizierte/sequenzierte Viren aus Patientenproben (nicht quantifiziert)

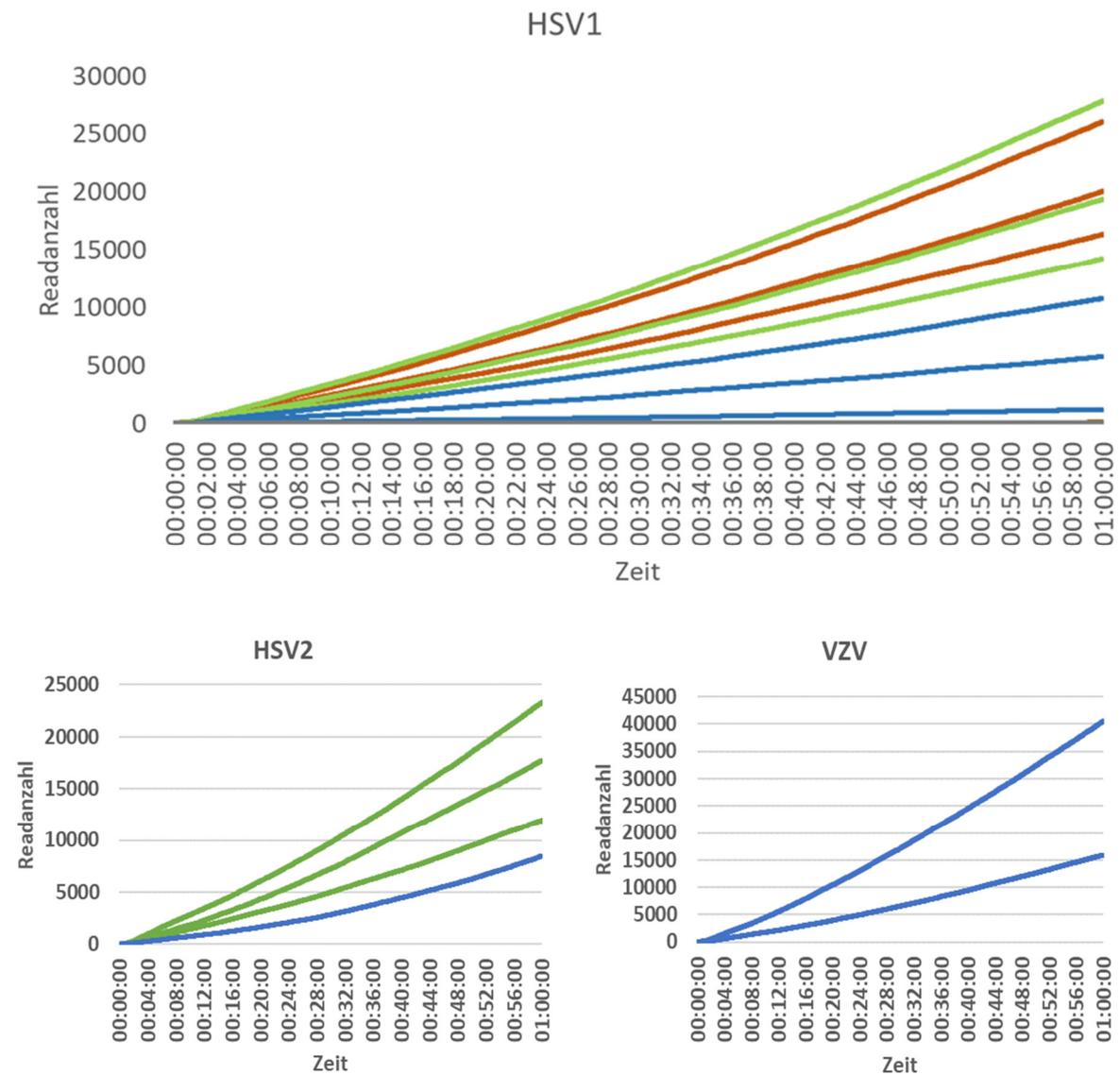
Virus	Proben- bezeichnung	Proben- ursprung	<i>Reads</i> gesamt	Virale <i>reads</i> Amplikon	Amplikon/ <i>Reads</i> gesamt
EBV	na	Serum	112.000	34.280	0,30
EBV	P-19-C-K.	Rachenabstrich	6.876	6.257	0,90
VZV	P-19-R.F.	Hautabstrich	69.389	65.322	0,94
HHV6A	17-01167.02	Rachenabstrich	25.146	19.965	0,79
HHV6B	17-01059.03	Rachenabstrich	20.418	16.590	0,81
HHV6B*	na	Hautabstrich	98.623	17.921	0,18
HHV7	18-00113.02	Rachenabstrich	13.365	362	0,02
Coxsackievirus A4	17-00410.03	Rachenabstrich	15.303	11.236	0,73
Coxsackievirus A10	na	Abstrich	57.914	55.114	0,95
Coxsackievirus A16	na	Abstrich	62.270	60.070	0,96
HPV 2	R5382	Abstrich	46.041	44.226	0,96
HPV 6	R6246	Abstrich	66.127	65.122	0,98
HPV 16	R5670	Abstrich	104.337	101.801	0,97
HPV 28	18-00346.02	Rachenabstrich	8.893	6.438	0,72
HPV 28	18-00346.03	Urin	11.480	8.015	0,69
HPV 57	R5123	Abstrich	52.252	41.367	0,79
Masernvirus	17-00189.03	Rachenabstrich	25.776	18.847	0,73
Masernvirus	17-00189.04	Urin	23.485	20.760	0,88
Parvovirus B19	P-19-13	Gewebe	54.756	33.971	0,62
Rötelnvirus	na	Serum	0	0	0

*Doppelinfektion mit VZV

3.2.4. Kinetik der VAmPSeq-MinION-Sequenzierung

Abbildung 32 zeigt die zeitabhängige Generierung von viralen Sequenzen bei der VAmPSeq-Sequenzierung. Sequenziert wurden verschiedene mit dem VAmPSeq-Assay amplifizierte Viren in jeweils der Konzentration des Detektionslimits (bezeichnet als Verdünnungsstufe 10^0) sowie den Konzentrationen 10^1 . Für VZV und CPXV wurde nur in der Konzentration 10^0 sequenziert, für HSV1 in den Konzentrationen 10^2 – 10^3 sowie Negativkontrollen.

Die Kinetik der Sequenzierung unterschied sich dabei für jedes Virus, war dabei aber hauptsächlich von der Qualität der MinION *flow cell* abhängig. So wurden für jedes Virus und jede *flow cell* nach einer Stunde Sequenzierzeit mindestens 2.000, maximal 40.000 Sequenzen sequenziert. Die Konzentration der viralen Sequenzen im Gesamtdatensatz betrug dabei 88 %-97 % (vergleiche Illumina: 2 % virale Sequenzen im Gesamtdatensatz bei einer Viruskonzentration von ca. 10^4). Die Konzentration der viralen Sequenzen am Gesamtdatensatz ist dabei für alle eingesetzten Konzentrationen hoch, die Anzahl an Gesamtsequenzen erniedrigt sich jedoch mit abnehmender Konzentration der eingesetzten Viren.



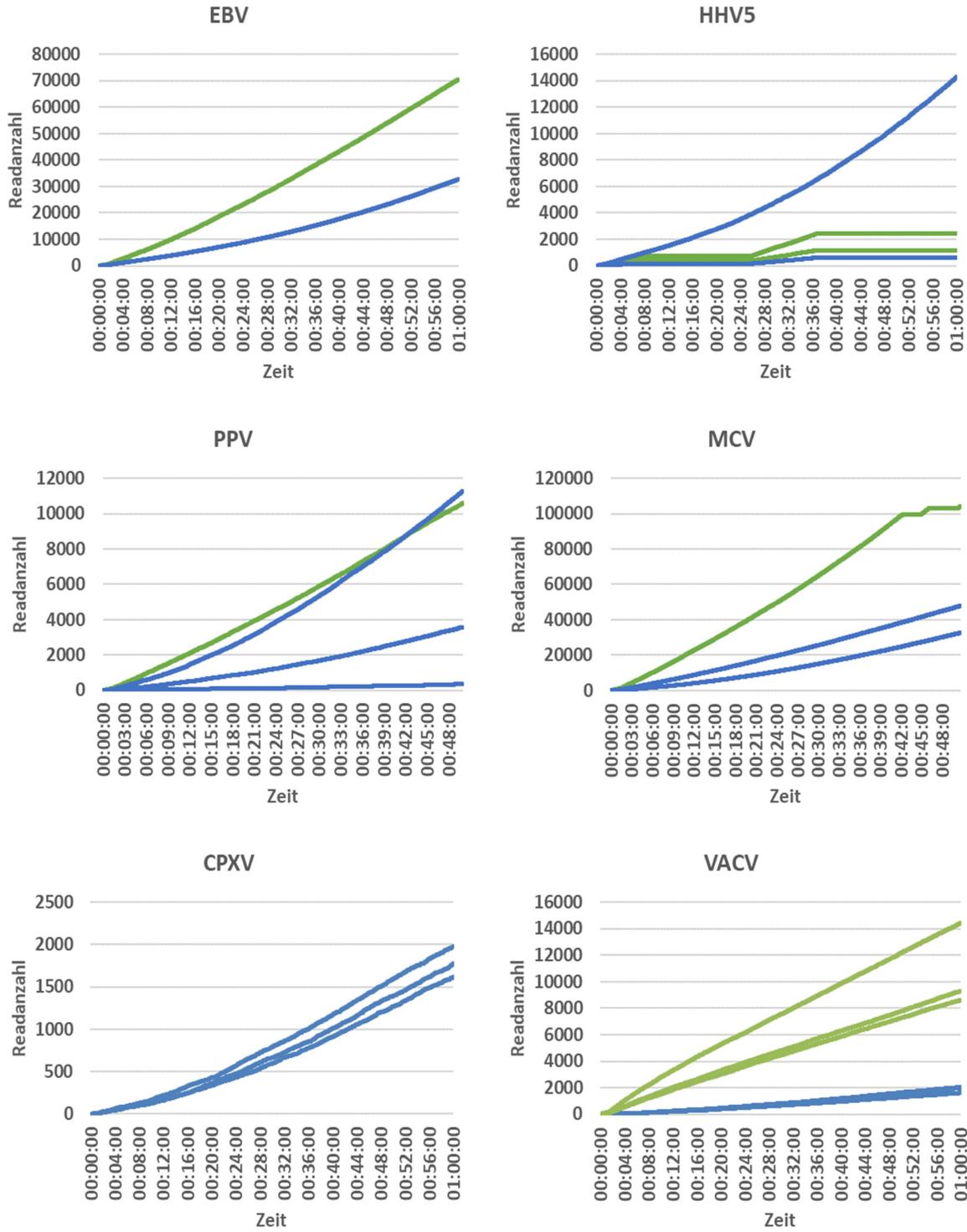


Abbildung 32: Kinetiken der VAmPSeq-Sequenzierungen von viralen Targets in den Konzentration (GE/ μ l): 10², 10¹, 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, NK

3.2.5. Sequenzierung von mit *barcodes* ligierten Proben

Wie bei der Illumina-Sequenzierung ist es bei der MinION-Sequenzierung möglich, mehrere Proben in einem Lauf mit *barcodes* zu markieren, welche dann anschließend bioinformatisch voneinander getrennt werden. So können auf einer MinION *flow cell* nicht nur einzelne Proben, sondern bis zu 96 Proben gleichzeitig sequenziert werden.

Um zu untersuchen, ob mehrere Proben für die VAmPSeq-Methode in einem Lauf kombiniert werden können oder ob es dabei zu Kontaminationen innerhalb des Laufs kommt, wurden verschiedene durch VAmPSeq bearbeitete Proben in unterschiedlichen Konzentrationen gepoolt, auf einer *flow cell* sequenziert und anschließend wieder bioinformatisch in die einzelnen *barcodes* und damit Proben aufgetrennt.

Tabellen 20 und 21 zeigen die Ergebnisse von zwei MinION-Sequenzierungen, bei denen die VAmPSeq-Reaktionen von HSV2, EBV und CMV (Lauf 1) sowie von HSV1, HSV2, EBV, CMV und PPV (Lauf 2) mit *barcodes* markiert, gepoolt und anschließend auf je einer *flow cell* sequenziert wurden.

Es zeigte sich, dass es bei der Zuordnung der Sequenzen zu jedem *barcode* zu einer Fehlerrate von 0,013 %–0,514 % kam. So wurde bei Lauf 1 HSV2 mit dem *barcode* 3 ligiert und zusammen mit EBV und CMV auf einer *flow cell* sequenziert. Dabei wurde HSV2 in der niedrigsten und CMV in der höchsten Konzentration eingesetzt. Bei Lauf 2 konnte eine Kontaminationsrate von 0,033 %–6,9 % (PPV, niedrigste Konzentration) falsch zugeordneter *reads* gezeigt werden.

Somit ist die Kombination mehrerer *barcode*-ligierter Proben auf einem Lauf möglich, jedoch kann es bei niedrig konzentrierten Proben zu Kontaminationen durch hoch konzentrierte Proben kommen.

Tabelle 20: Sequenzierung mehrerer Proben mit *barcodes* in einem Lauf; Lauf 1

Virus	BC	Korrekt zugeordnet <i>reads</i>	Falsch zugeordnete <i>reads</i> (%)			
			Gesamt	BC 3	BC 6	BC 7
HSV2	3	32.120	0,514		0,100	0,417
EBV	6	123.594	0,216	0,053		0,164
CMV	7	310.087	0,013	0,008	0,005	

Tabelle 21: Sequenzierung mehrerer Proben mit *barcodes* in einem Lauf; Lauf 2

Virus	BC	Korrekt zugeordnete <i>reads</i>	Falsch zugeordnete <i>reads</i> (%)					
			Gesamt	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 11
HSV2	2	28.581	0,619		0,283	0,483	0,133	0,003
HSV1	3	18.856	0,382	0,074		0,265	0,037	0,005
EBV	4	98.044	0,033	0,008	0,036		0,022	0,002
CMV	5	45.316	0,221	0,024	0,090	0,190		0,007
PPV	11	1.334	6,972	0,300	2,624	5,172	1,499	

3.3. Ergebnisse des Screenings der Patientenproben mittels VAmPSeq-Methode

Die 49 Patientenproben wurden mit der entwickelten VAmPSeq-Methode bearbeitet. Dabei konnten alle zuvor in der Metagenom-Analyse und mit qPCR bestätigten Viren auch mit der VAmPSeq-Methode nachgewiesen werden (Abbildung 33). Im Gegensatz zur Illumina-Sequenzierung konnten die ersten viralen *reads* zur Identifikation schon nach wenigen Sekunden Sequenzierzeit detektiert werden; insgesamt wurden 1.000.955 *reads* sequenziert.

Zusätzlich konnte im Gegensatz zur Illumina-Sequenzierung HSV1 in Probe 2 detektiert und mit qPCR bestätigt werden (CT 37). EBV wurde in Probe 12 und 14 detektiert, Parvovirus B19 in Probe 14. Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht mit einer qPCR bestätigt werden. Die VAmPSeq-Sequenzierung wurden bei diesen Proben wiederholt, jedoch konnten nur erneut in Probe 12 Sequenzen von EBV und in Probe 14 Sequenzen von Parvovirus B19 detektiert werden.

2	2383	5	18	2	32	5	13
3	18		1	1	2		
5	25		1		2	4	
7	11205	25	7		2		1
10	22		4		2	2	2
11	17		1	1	2		
12	44		7296	1	6		3
13	21		1		4	1	1
14	31		1430	514	5	1	
16	4		2		5	19	
22	20		4	2	3		
24	31	1	3		7		3
25	27		2		3344	1062	1
26	12		2		1392	510	3
29	5529	83			2		1
31	27	1	4		8	1	2
32	12		1		5200	43	
35	11		1				2200
37	38	1	3		6	1	2
49	13953	108	5	2	9		2
50	10517	80	3		11	2	1
58	26		3		3		
59	18		4		9		3
61	13016	145	2	12	6		3
62	6483	101	1		4		1
63	28	2	6	1	7	1	2
NK PCR	17				1	7	1
NK Library							

Abbildung 33: Ergebnisse des VAmPSeq-Screenings der 49 Patientenproben. Gezeigt werden nur Proben, bei denen für mindestens eins der gezeigten Viren > 10 Sequenzen detektiert werden konnten. Zusätzlich zu den in der Illumina-Sequenzierung detektierten Viren (HSV1: 7, 29, 49, 50, 61, 62; MOCV Typ 1 (32) und MOCV Typ 2 (25, 26; Orf-Virus: 35) konnte in Probe 2 HSV1, in Probe 12 EBV und in Probe 14 EBV und Parvovirus

B19 detektiert werden. In vielen der Patientenproben wurden des Weiteren einige Sequenzen von HSV1, MOCV, EBV und Orf-Virus detektiert, wobei es sich um Kontaminationen innerhalb des Laufes handeln kann.

3.4. PAmpliSeq – VAmpliSeq Whole Genome Sequencing

Obwohl die VAmpliSeq-Methode zu Virusdiagnostik wesentlich sensitiver und weniger zeitaufwendig ist als die Illumina-Sequenzierung, hat die Methode den Nachteil, nur kurze Regionen der Zielgenome zu amplifizieren. Für die weitere Charakterisierung eines Virus, z.B. für phylogenetische Analysen oder Resistenzbestimmungen, ist es jedoch von Vorteil, längere Sequenzabschnitte bzw. komplette Genome zu sequenzieren. Daher wurde die VAmpliSeq-Methode weiterentwickelt, um die Vollgenomsequenzierung von Orthopockenviren, insbesondere bei geringer Konzentration, für die MinION-Sequenzierung zu ermöglichen. Das entwickelte VAmpliSeq Assay – PAmpliSeq (Poxvirus Amplification based Sequencing) – soll mit insgesamt 856 Primern große Anteile bzw. komplette Genome verschiedener Spezies der Orthopockenviren amplifizieren und anschließend sequenzieren können.

3.4.1. *In silico* coverage der PAmpliSeq-Amplikons

Um zu ermitteln, ob die PAmpliSeq-Methode alle Kuhpocken-Spezies sowie weitere Orthopockenviren amplifizieren kann, wurde ein Genom-Alignment aller 317 Genome der Orthopockenviren in GenBank (Stand 01.08.2019) errechnet und die *in silico*-Abdeckung durch die möglichen Amplikons des PAmpliSeq-Primer-Pools bestimmt. Dabei wurden die Primer mit dem jeweiligen Referenzgenom aligniert, wobei höchstens ein Mismatch je Primer berücksichtigt wurde. Die Längen der resultierenden Amplikons der *in silico* gebundenen Primer wurden berechnet und dabei eine Amplikonlänge von mindestens 100 und höchstens 800 bp berücksichtigt. Die *coverage* der bestimmten Amplikons zu den entsprechenden Referenzen wurden anschließend berechnet (Abbildung 34).

Es zeigte sich, dass alle Genome der Kuhpockenviren, Vacciniaviren, Affenpockenviren und Variolaviren mit mindestens 63,7 % und höchstens 99,8 % *in silico* durch die errechneten Amplikons abgedeckt waren.

Die höchste *in silico*-Abdeckung wurde bei den Kuhpockenviren der Variolavirus (VARV)-ähnlichen phylogenetischen Klade erreicht (98 %-99,8 % des Gesamtgenoms). Bei Referenzen der Cowpox (CPXV)-ähnlichen Klade 1 wurde eine Abdeckung des Gesamtgenoms von 83,4 %-88,9 % erreicht. Eine Abdeckung der Gesamtgenome durch die *in silico*-Amplikons wurde bei den Kuhpocken der CPXV-ähnlichen Klade 2 erreicht (63,7 %-89,4 %).

Obwohl für das Design der PAmpliSeq-Primer ein Kuhpocken-Referenzgenom verwendet wurde, waren auch die Referenzgenome der meisten Vaccinia-Genome zu großen Teilen *in silico* mit Amplikons abgedeckt. Hier zeigte sich eine relativ Abdeckung von 76,2 %-86,8 %, mit Ausnahme der Referenzen CEyV1 und CEyV2 (Accession No. MG012795.1 und MG012796.1).

Die Genome der Affenpockenviren waren ebenfalls zu 70,0 %-74,8 % *in silico* abgedeckt. Auch bei den Variolaviren zeigte sich eine hohe Abdeckung des Gesamtgenoms von 83,9 % bis 86,8 %. Eine sehr geringe bzw. keine Abdeckung hingegen zeigte sich bei den Orthopockenviren-Spezies Akhmeta-Virus (47,5 %), Raccoonpox-Virus (4,0 %), Skunkpox-Virus (1,7 %) und Volepox-Virus (0,9 %). Weitere zu den Orthopockenviren gehörende Spezies waren mit 90,0 % (Camelpox-Virus), 84,7 % (Buffalopox-Virus), 86,3 % (Ectromelia-Virus), 78,9 % (Horsepox-Virus), 91,0 % (Taterapox-Virus) und 73,1 % (Orthopoxvirus Abatino) abgedeckt.

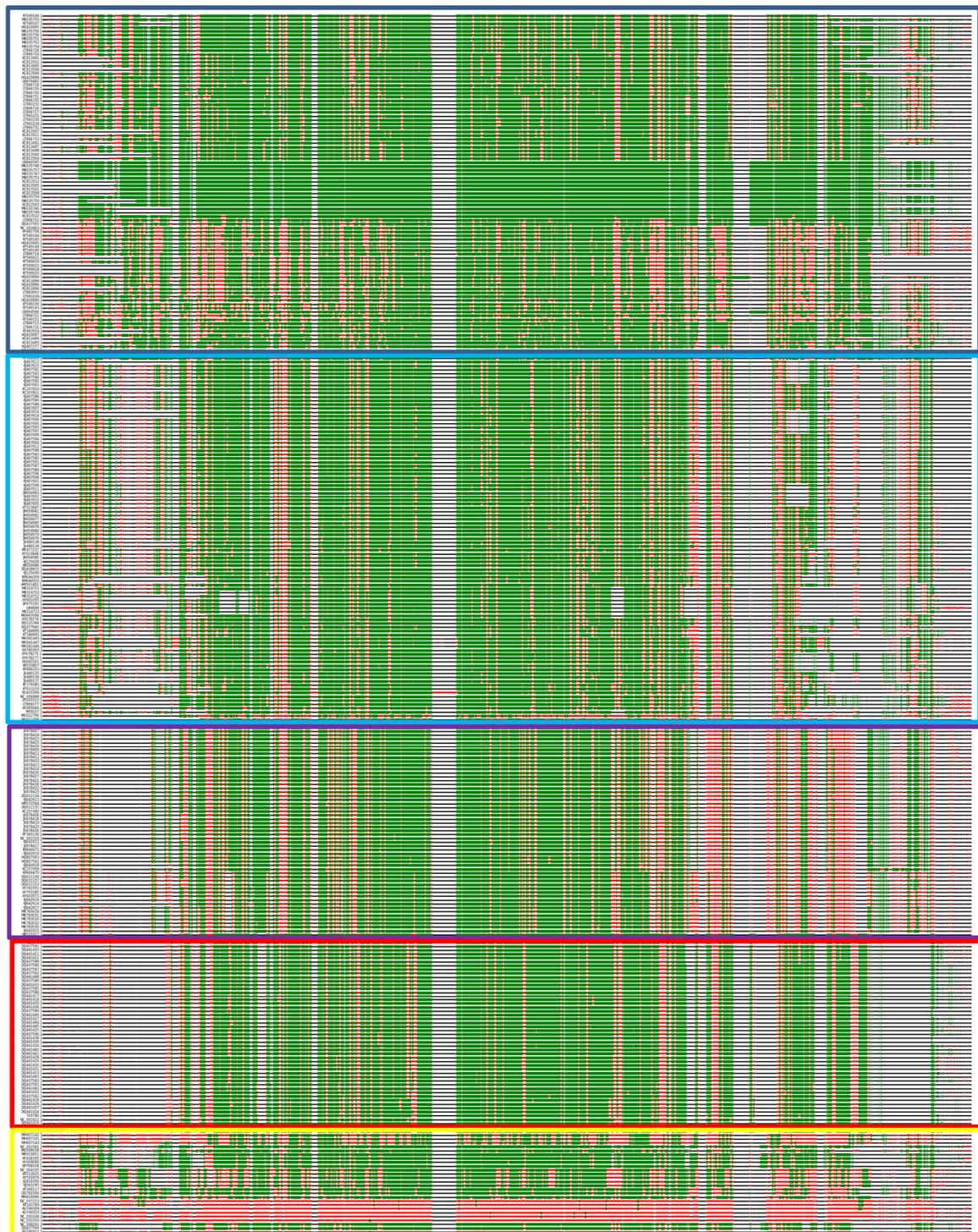


Abbildung 34: Alignment aller Genome der Orthopockenviren (GenBank: 01.08.2019). *In silico*-Abdeckung aller Referenzen durch die Amplikons der PAmpliSeq-Primer-Pools bei höchstens einem *mismatch* je Primer und einer Amplikonlänge von 100–800 bp. Im Alignment: CPXC, VACV, MPXV, VARV, weitere Orthopockenviren.

3.4.2. Protokoll-Entwicklung der PAmpliSeq-PCR

Um in nur einem PCR-Ansatz möglichst komplette Genome verschiedener Orthopockenviren amplifizieren zu können, musste zunächst ein optimiertes PCR-Protokoll entwickelt werden. Hierzu wurde das PCR-Protokoll eines bereits entwickelten VAmpliSeq-multiplex-Assays für Hämorrhagische Fieber-Viren mit vergleichbarer Primeranzahl angepasst.

Um eine Primer-Bindung mit einem oder mehreren *mismatches* je Primer zur Zielsequenz zu tolerieren, wurde insbesondere die Annealingtemperatur variiert. Zudem wurde die Elongationstemperatur verlängert, um die Amplifikation von längeren, einzelne Primer überspringenden Amplikons zu ermöglichen.

Bei der PAmpliSeq-PCR mit einer Annealingtemperatur von 55 °C und einer Elongationszeit von 80 s und anschließender MinION-Sequenzierung wurde die höchste Abdeckung der generierten Amplikons zu den Genomen in der PCR eingesetzten Kuhpocken- und Affenpockenviren ermittelt (95 % und 98 % *coverage*, Sequenzierdauer 1 h, Tabelle 22). Somit konnte eine Erhöhung der *coverage* des Genoms um 38 % bzw. 22 % erreicht werden (Standardprotokoll VAmpliSeq mit 65 °C Annealingtemperatur und 30 s Elongation).

Wie bei der VAmpliSeq-PCR wurde ein zu einem konventionellen PCR-Protokoll ungewöhnliches Protokoll entwickelt, mit hoher Konzentration an Puffer, dNTPs, Primer und Taq-Polymerase.

Tabelle 22: Vergleich verschiedener Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten für die Entwicklung eines Protokolls für VAmpliSeq-Methode

Virus	Temp (°C)	Elongation (s)	<i>reads</i>	<i>Coverage length</i>
MPXV Tai	55	30	33.342	0,75
MPXV Tai	55	30	51.893	0,76
MPXV Tai	60	30	32.780	0,63
MPXV Tai	60	30	29.900	0,65
MPXV Tai	65	30	52.289	0,57
CPXV HumGra	55	30	45.759	0,86
CPXV HumGra	55	30	63.762	0,85
CPXV HumGra	60	30	35.229	0,81
CPXV HumGra	65	30	38.270	0,76
MPXV Tai	50	30	89.548	0,73
MPXV Tai	55	30	198.888	0,82
MPXV MFS	50	30	12.120	0,49
MPXV MFS	55	30	71.330	0,74
CPXV EleGri07	50	30	6.612	0,42
CPXV EleGri07	55	30	102.608	0,80
MPXV Tai	55	20	143.576	0,88
CPXV HumGra	55	20	69.795	0,93
MPXV Tai	55	40	111.534	0,92
CPXV HumGra	55	40	53.104	0,94
MPXV Tai	55	80	119.959	0,95
CPXV HumGra	55	80	76.903	0,98

3.4.3. *In vitro coverage* PAmpliSeq

Um die PAmpliSeq-Methode experimentell zu validieren, wurden verschiedene Spezies der Orthopockenviren (MPXV, CPXV, VACV und CMLV) mit den PAmpliSeq-Primern amplifiziert und anschließend auf dem MinION sequenziert. Dabei wurde die *coverage* der Genome mit den generierten Amplikons sowie die Übereinstimmung auf Nukleinsäureebene des sequenzierten, assemblierten Genoms zum Referenzgenom berechnet. Abbildung 35 zeigt die *in silico* und *in vitro coverage* über die Gesamtgenome. Hierbei werden bei der *in silico coverage* nicht nur mögliche Amplikons mit höchstens einem *mismatch*, sondern zusätzlich mit keinem und zwei *mismatches* dargestellt. Die Farbgebung ist dabei auf je 500 bp bezogen.

Für alle Viren und Konzentrationen konnte nach der Sequenzierung von 1 Mio. *reads* eine hohe Genomabdeckung von 97,9 %–99,7 % erreicht werden (Tabelle 23). Dabei waren die *coverage*-Werte teilweise höher als die *in silico coverage*-Werte (+13,3 % *coverage* für MPXV und +7,6 % *coverage* für VACV). Für CMLV sowie die beiden Stämme und Konzentrationen von CPXV betrug die Abweichung der *coverage* zur *in silico coverage* +4,4 %, +4,3 % sowie +0,5 %. Es ist möglich, dass durch die Reaktionsbedingungen der PAmpliSeq-PCR teilweise mehr als zwei *mismatches* je Primer toleriert werden oder es zur Amplifizierung von längeren (> 800 bp) Amplikons kommt. Diese Regionen sind jedoch unterdurchschnittlich mit *reads* abgedeckt, was wiederum zu einer schlechteren Qualität der entsprechenden Region führt.

Bei der Referenz MPXV Ivory Coast 2012 hybridisierten die PAmpliSeq-Primer *in silico* mit keinem oder nur einem *mismatch* je Primer an etwa 84,5 % des Referenzgenoms. An vielen Regionen des Referenzgenoms kam es hingegen zu keiner Primerbindung mit weniger als zwei *mismatches* zur Referenz, sodass 15,5 % des Genoms *in silico* nicht mit Amplikons abgedeckt war. Einen Kontrast dazu stellte die *in vitro coverage* dar. Hier kam es zu einer *coverage* über das Referenzgenom von 97,9 % bei insgesamt 1 Mio. sequenzierter *reads*. Die *in vitro coverage* des 5'- und 3'-Endes des Referenzgenoms entsprach der errechneten *in silico coverage* (keine *coverage*). Ab der Region von ca. 165.000 bp zeigte sich *in silico* keine, *in vitro* jedoch eine fast durchgängige *coverage*. Jedoch war diese Region durchschnittlich mit weniger *reads* abgedeckt als der Rest des Genoms (0–100-fach). Dies beeinflusste wiederum die Übereinstimmung des sequenzierten Genoms zur Referenz (< 95 % auf Nukleinsäureebene).

Bei der PAmpliSeq-Sequenzierung der Kuhpocken EleGri07/01 und HumGra07/01 mit einem CT von 30 bzw. 28 entsprach die *in silico coverage* mit nur 0,3 % Unterschied der *in vitro coverage*. Auch hier waren Regionen, die *in silico* keine *coverage* haben, unterdurchschnittlich mit *reads* abgedeckt. Das CPXV-Genom mit dem CT von 28 hatte eine leicht höhere *coverage* (fold) und Nukleotid-Übereinstimmung zur Referenz.

Bei der PAmpliSeq-Sequenzierung des VACV Western Reserve zeigte sich eine höhere *in vitro coverage* als *in silico* errechnet wurde (98 % bzw. 91 %). Ähnlich verhielt es sich bei CMLV CP19 (93,9 % und 98,2 %).

Alle assemblierten Genome zeigten eine hohe Übereinstimmung auf Nukleinsäureebene zu den Referenzgenomen (98,3 %–99,7 %). Hierbei kam es bei den PAmpliSeq-sequenzierten Genomen überwiegend zu Fehlern in Homopolymer-Regionen oder in Regionen mit geringer *coverage*.

Tabelle 23: Genomabdeckung der mit PAmpliSeq MinION sequenzierten Viren

Virus	Ct rpo	<i>In silico coverage</i> (%)	<i>In vitro coverage</i> (%)	ID Referenz (%)
MPXV Ivory Coast 2012	30	84,5	97,9	99,3
CPXV EleGri C001	30	95,4	99,7	99,5
CPXV HumGra C002	28	99,2	99,7	99,7
VACV Western Reserve	28	91,4	98,0	98,3
CMLV CP19	28	93,8	98,2	98,3

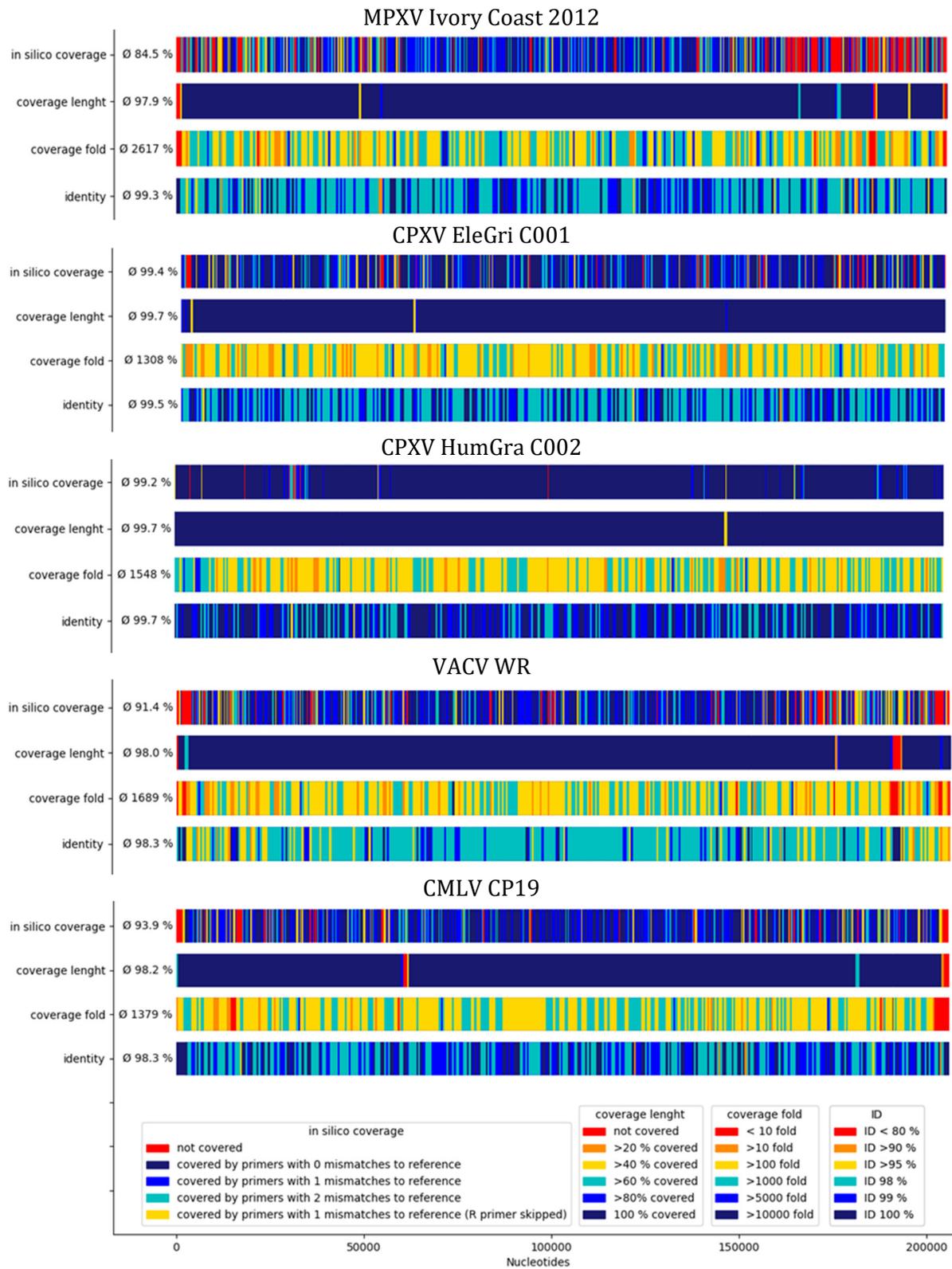


Abbildung 35: *In silico coverage*, Abdeckung über das gesamte Genom (*coverage length*), die Tiefe der Abdeckung (*coverage fold*) und Nukleotid-Identität (*identity*) von MPXV Ivory Coast, CPXV EleGri, CPXV HumGra, VACV Western Reserve und CMLV CP19.

3.4.4. Vergleich Illumina Vollgenom-Sequenzierung mit PAmpliSeq-Methode

Um die PAmpliSeq-Methode zu validieren, wurden die generierten *reads* nach Amplifikation und Sequenzierung verschiedener Viren mit derselben Anzahl von *reads* einer Illumina-Sequenzierung derselben Probe verglichen (Tabelle 24, Abbildung 36).

Hier zeigte sich deutlich der Vorteil einer PAmpliSeq-Sequenzierung: Während eine Illumina-Sequenzierung mehrere Tage oder sogar Wochen benötigt, werden bei der PAmpliSeq-Sequenzierung schon nach wenigen Stunden ausreichend *reads* generiert, um eine hohe *coverage* der Referenzgenome zu erreichen. Bei allen PAmpliSeq-sequenzierten Proben konnte eine *coverage* von mindestens 99,2 % erreicht werden. Bei den Illumina-sequenzierten Proben konnte bei nur zwei Proben eine *coverage* von >90 % erreicht werden, bei drei weiteren Proben wurde eine *coverage* von 47,4 %, 16,6 % und nur 6,6 % erreicht. Auch die gering konzentrierte Probe (CPXV Cepad 332) mit einem CT von 32 konnte mit PAmpliSeq mit hoher *coverage* sequenziert werden (99,6 %, Illumina 16,6 %).

Tabelle 24: Coverage und Identity der PAmpliSeq-sequenzierten Proben im Vergleich zur Illumina-Sequenzierung

Sample ID	Virus	CT rpo	<i>In silico</i> coverage (%)	<i>In vitro</i> coverage (%)	ID Referenz (%)	Illumina <i>in vitro</i> coverage (%)
P-08-16-001-01	Ectromelia-Virus	18	80,2	99,2	99,4	6,6
P-09-77-001-01	CPXV HumLue09/1	16	87,7	99,9	99,6	94,4
P-09-02-001-01	CPXV Cepad 332	22	99,5	100	99,7	92,5
P-09-04-001-01	CPXV Cepad 332	32	99,5	99,6	99,5	16,6
P-09-13-001-01	CPXV HumKre08/1	14	99,5	100	99,7	47,4

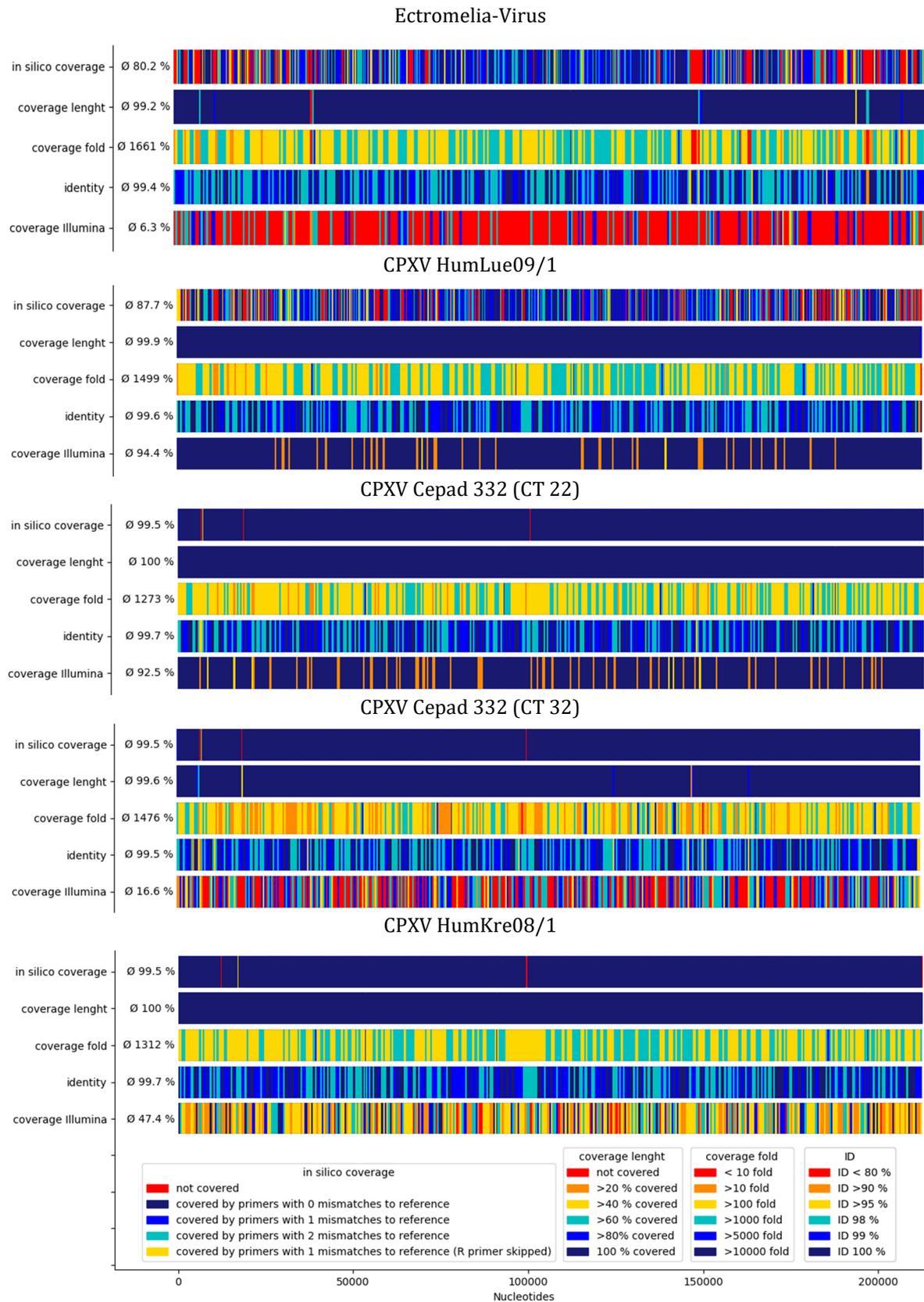


Abbildung 36: *In silico coverage*, Abdeckung über das gesamte Genom (*coverage length*), die Tiefe der Abdeckung (*coverage fold*), die Nukleotid-Identität (*identity*) und die Illumina-coverage von Ectromelia-Virus, CPXV HumLue, CPXV Cepad (CT 22), CPXV Cepad (CT 32) und CPXV HumKre08/1.

3.4.5. Kinetik der PAmpliSeq-Vollgenom-Sequenzierung

Abbildung 37 zeigt die *coverage* von CPXV, VACV, MPXV und CMLV nach der Sequenzierung von je 1.000, 10.000, 50.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000 und 1.000.000 *reads*. Für alle Viren war die *coverage* nach 1.000 Sequenzen durchschnittlich < 10 . Bei 10.000 sequenzierten *reads* war ein Anteil der Genome bereits mit einer *coverage* zwischen 10 und 100 abgedeckt, bei 50.000 *reads* die kompletten Genome. Bei einer Sequenzanzahl von 200.000 war ein großer Anteil der Genome bereits 100- bis 1.000-fach abgedeckt. Ab dieser Anzahl von Sequenzen ändert sich die *coverage* über das Gesamtgenom kaum noch, während die Tiefe der *coverage* kontinuierlich ansteigt.

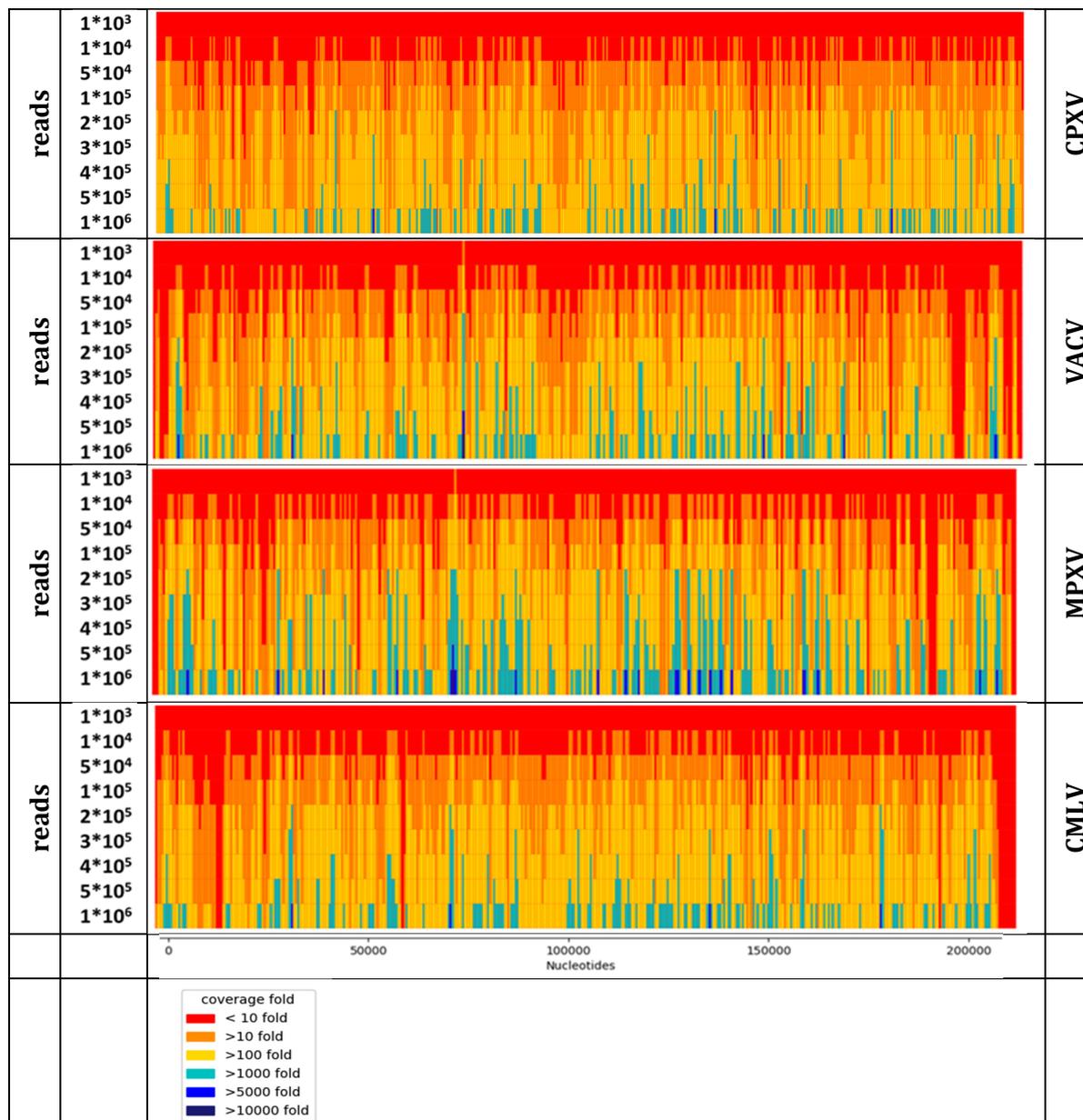


Abbildung 37: Die *fold coverage* von CPXV, VACV, MPXV und CMLV bei 1.000–1.000.000 sequenzierten *reads*.

3.5. Echtzeit-Auswertung mittels VAmpliSeeker und PAmpliSeeker

Obwohl die MinION-Sequenzierung in Echtzeit erfolgt, beruht die Analyse der generierten Daten standardmäßig auf dem online-Tool EPI2ME von Oxford Nanopore. Diese Auswertung ist jedoch nicht nur unter Aspekten des Datenschutzes bedenklich, außerdem ist auch keine Analyse ohne Internetverbindung möglich.

Um diese Lücke zu schließen und die VAmpliSeq- und PAmpliSeq-Methode als Gesamtpaket ohne weitere Abhängigkeiten und bioinformatische Kenntnisse nutzen zu können, wurde eine grafische Oberflächenanwendung – der VAmpliSeeker – entwickelt. Mit diesem ist eine Offline-Analyse der generierten Daten möglich. Der VAmpliSeeker ist dabei spezifisch für das VAmpliSeq-Assay für pockenähnliche Hautveränderungen anwendbar und der PAmpliSeeker für das PAmpliSeq-Assay für die Sequenzierung von Orthopockenvirus-Vollgenomen. Als zusätzliche Funktion kann das Tool mithilfe der Guppy-Software von Oxford Nanopore ein Offline-Basecalling der generierten Fast5 (Squiggle-Daten) durchführen und außerdem *demultiplexen*, d.h. die Einordnung der durch *barcodes* markierten Sequenzen vornehmen. Da die MinION-Sequenzierung in den Laboren und im Feld häufig unter Einsatz eines Laptops erfolgt und eine Nutzung von externen Rechenservern mit hoher Kapazität aufgrund der Ortsunabhängigkeit des MinIONs schwierig ist, ist auch der VAmpliSeeker über einen Standard-Laptop mit Windows anwendbar.

Der Workflow des VAmpliSeekers ist in Abbildung 38 dargestellt. Bei der MinION-Sequenzierung werden die *Squiggle*-Signale in Nukleotid-Sequenzen übersetzt, welche in einzelne FastQ-Files mit einer zuvor definierten Anzahl von Sequenzen (Standard = 4.000) gespeichert werden. Sobald die erste FastQ-File geschrieben wird, beginnt die VAmpliSeeker-Analyse. Dabei werden die Sequenzen mittels Guppy-Alignment mit einer hinterlegten Referenzdatenbank aligniert. Sobald bei der Sequenzierung eine weitere FastQ-File generiert wird, wiederholt sich der Ablauf und die Darstellung des Ergebnisses wird aktualisiert.

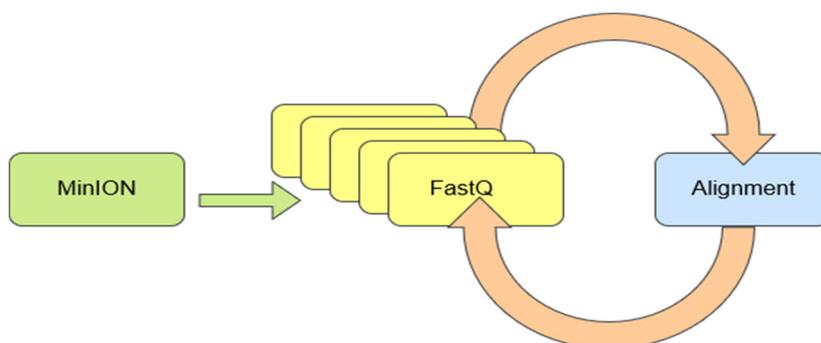


Abbildung 38: Während der MinION-Sequenzierung werden die generierten Daten mittels VAmpliSeeker oder PAmpliSeeker in Echtzeit ausgewertet. Sobald eine neue FastQ-File generiert wird, wird diese gegen eine Referenzdatenbank und das Ergebnis tabellarisch (VAmpliSeq) oder grafisch (PAmpliSeeker) aktualisiert.

Der Workflow beim PAmpliSeeker ist ähnlich. Hier wird zuvor mit den ersten generierten Sequenzen die Orthopockenvirus-Referenz mit der höchsten Übereinstimmung zu den sequenzierten *reads* ermittelt. Als Ergebnis wird die *coverage* über das gesamte Referenz-Genom dargestellt. Die Sequenzierung kann beendet werden, sobald die gewünschte *coverage* und Sequenziertiefe über das Genom erreicht ist.

3.5.1. Echtzeit-Analyse mit dem VAmpliSeeker

Um den VAmpliSeeker zu validieren, wurden insgesamt 296.000 mit der VAmpliSeq-Methode generierte Sequenzen generiert und in Echtzeit ausgewertet. Die sequenzierte Probe setzte sich dabei aus den mit *barcodes* ligierten Positivkontrollen HSV1, HSV2, EBV, CMV, MOCV, CMLV und MPXV zusammen. Das *demultiplexen* der *barcodes* sowie das Alignment und die Ergebnisausgabe erfolgte dabei in Echtzeit.

Abbildung 39 zeigt die Benutzeroberfläche des VAmpliSeekers mit dem Ergebnis der Sequenzierung nach 17 min für den *barcode* 01 (HSV1). Insgesamt wurden 44.680 *reads* HSV1 durch den VAmpliSeeker zugeordnet. Einige *reads* von CMV (15), MOCV (12), HSV2 (8), MPXV (5), CMLV (3), VZV (3) sowie CPXV (3) wurden falsch zugeordnet. 5.418 Sequenzen konnten insgesamt nicht zugeordnet werden.

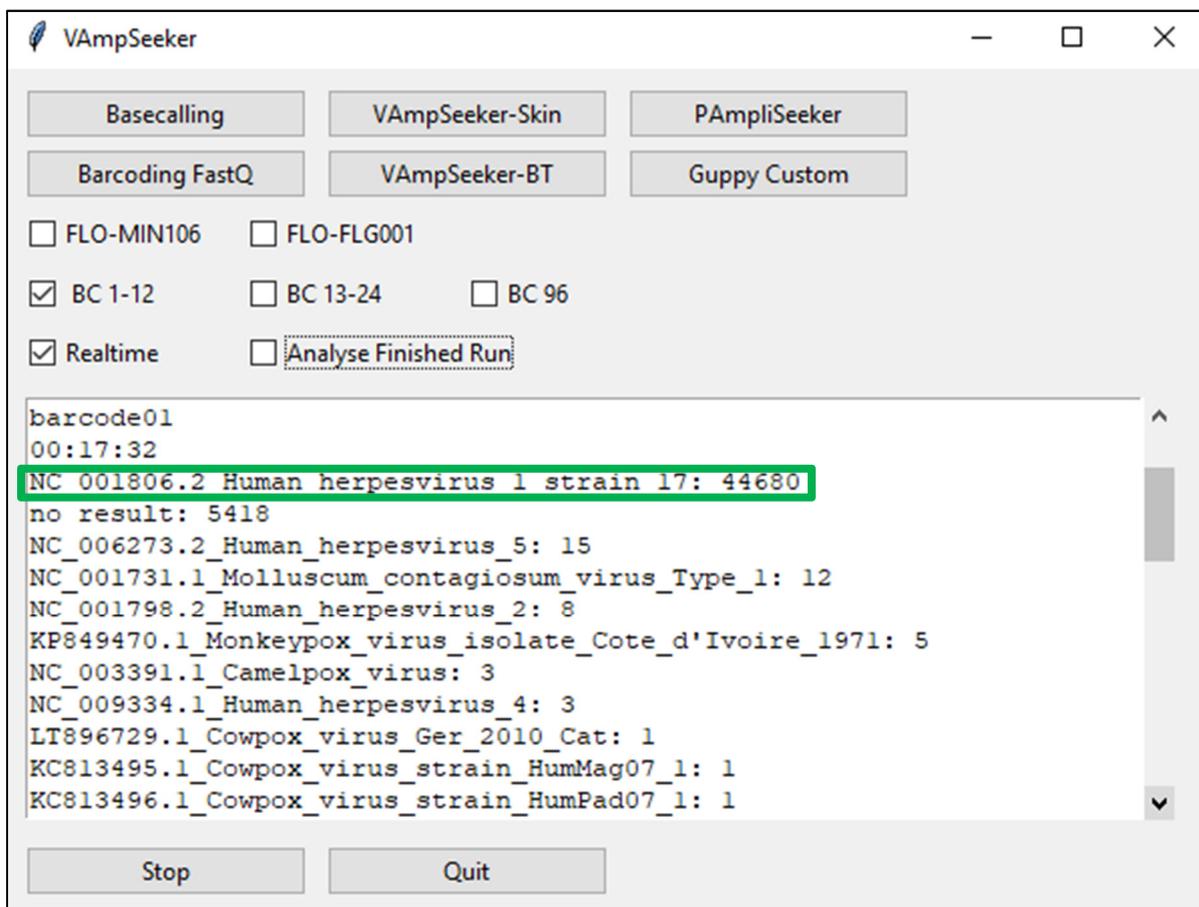


Abbildung 39: Oberfläche des VAmpliSeekers und Ergebnis der gemessenen Proben für *barcode* 01 (HSV1). Insgesamt konnten nach 17 min Sequenzierzeit 44.860 Sequenzen von HSV1 zugeordnet werden.

Für CPXV (barcode 10) konnten insgesamt 18.905 von 20.355 *reads* zugeordnet werden. Da in der Referenzdatenbank jedoch gegen mehrere Kuhpockenvirusgenome aligniert wurde, wurden die Sequenzen unterschiedlichen Kuhpockenstämmen zugeordnet.

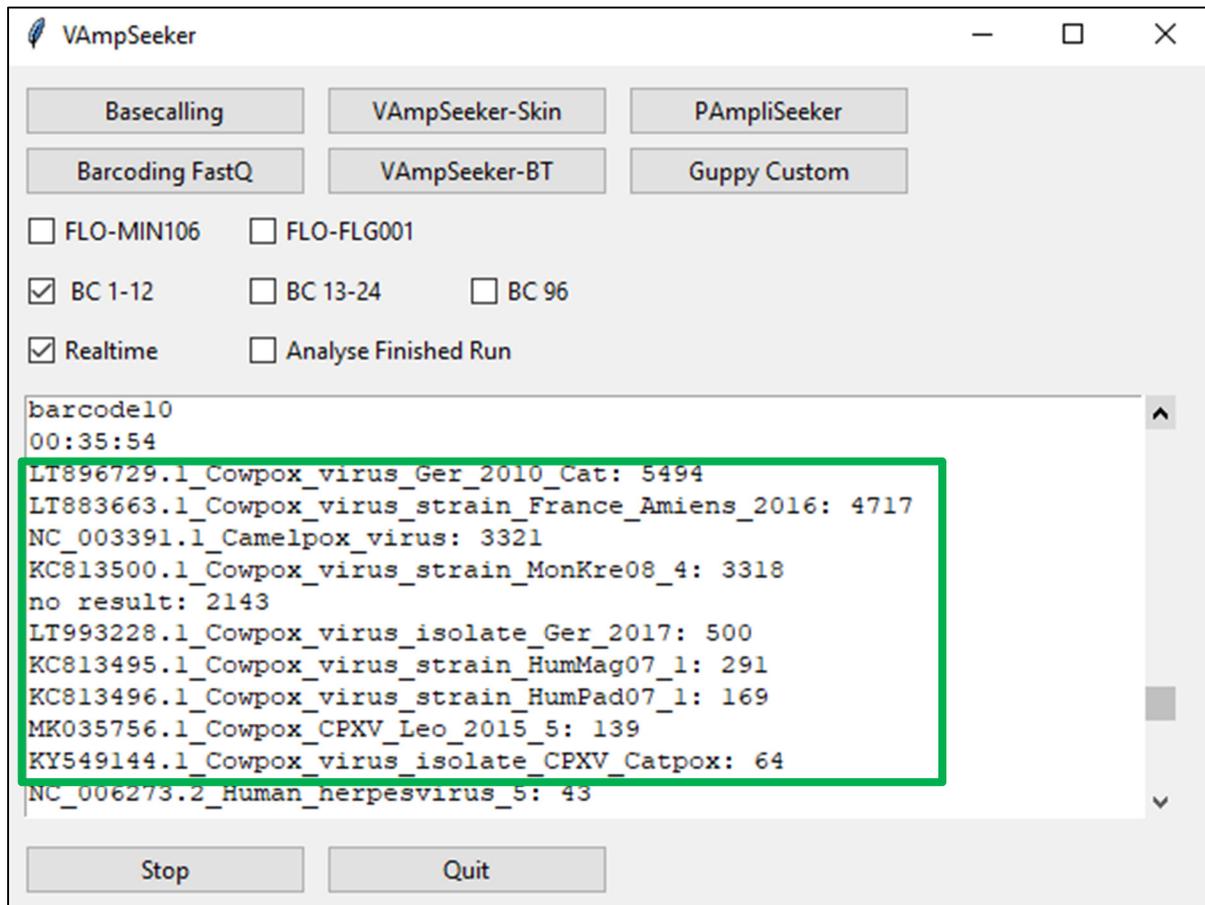


Abbildung 40: Ergebnisausgabe bei einer VAmplifier-Sequenzierung von CPXV durch den VAmplifier. Insgesamt wurden nach 35 min Sequenzierung 18.905 Sequenzen von CPXV zugeordnet. Die Sequenzen wurden unterschiedlichen CPXV-Referenzen der Datenbank zugeordnet.

Alle Ergebnisse des VAmplifiers wurden anschließend mit einem Geneious Alignment verglichen (Tabelle 25). Dabei stimmten die zugeordneten *reads* durch die beiden Programme nahezu überein.

Tabelle 25: Ergebnisse des VAmplifiers im Vergleich zu einer Geneious-Auswertung

Positivkontrolle	<i>reads</i> gesamt	Durch VAmplifier zugeordnete virale <i>reads</i>	Durch Geneious <i>mapping</i> zugeordnete virale <i>reads</i>
HSV1	50.148	44.680	45.258
HSV2	30.714	27.710	28.001
EBV	44.901	31.912	31.805
CMV	53.548	51.663	51.677
MOCV Typ 1	51.139	48.925	48.876
CMLV	14.706	11.583	11.297
MPXV	20.020	17.081	16.633
CPXV	20.355	139 -5.494	7.043

3.5.2. Echtzeit-Analyse mit dem PAmpliSeeker

Um den PAmpliSeeker zu validieren, wurden die Positivkontrollen CMLV (*barcode 01*), MPXV (*barcode 02*) und CPXV (*barcode 03*) auf einer *flow cell* sequenziert. Dabei wurden innerhalb von 27 min 208.000 *reads* generiert.

Als beste Referenzen wurden für *barcode01* KP768318.1 CMLV strain 0408151v, für *barcode02* DQ011155.1 MPXV strain Zaire und für *barcode03* KC813510.1 CPXV strain HumGra071 bestimmt. Dieses Ergebnis stimmte mit den Stämmen der eingesetzten Viren überein.

Die Ausgabe des letzten aktualisierten Ergebnisses erfolgte 12 min nach Generierung der letzten FastQ-File und damit nahezu in Echtzeit mit nur leichter Verzögerung.

Für CMLV wurden 74.592 *reads*, für MPXV 51.869 *reads* und für CPXV 43.053 *reads* sequenziert. 41.338 *reads* konnten keinem *barcode* zugeordnet werden.

Für alle drei generierten Sequenzen konnte die *coverage* der sequenzierten Amplikons zu den ermittelten Referenzgenomen grafisch dargestellt werden. Abbildung 41 zeigt die *coverage* nach 27 min Sequenzierung für CMLV (A), MPXV (B) und CPXV (C) und die keinen *barcodes* zugeordneten *reads* (D).

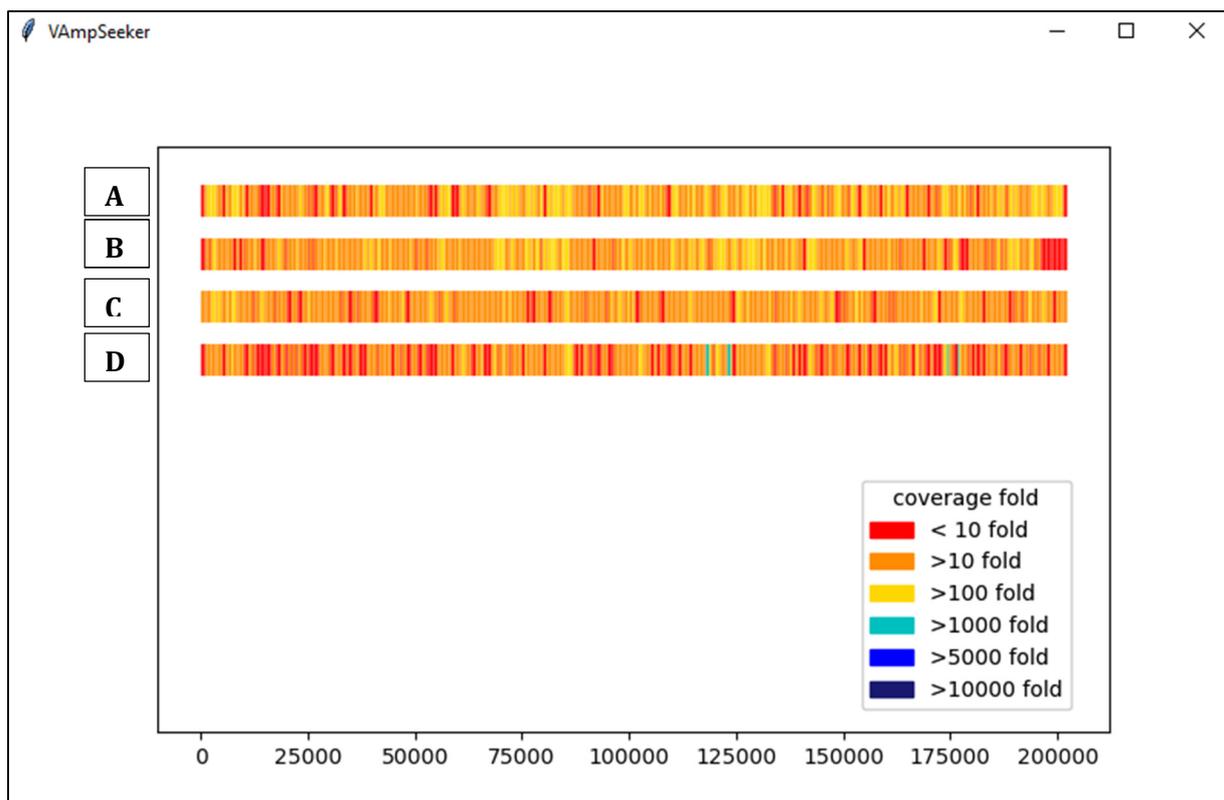


Abbildung 41: Ergebnis des PAmpliSeekers (A) Camel poxvirus (B) Affenpockenvirus (C) Kuhpockenvirus (D) Sequenzen ohne *barcodes*

Ähnlich wie für die VAmPSeq-Methode für pockenähnliche Hautveränderungen wurde das hämorrhagische Fieber (HF)-Assay *in silico* bewertet. Dabei wurde berechnet, wieviele Primerpaare mit 0-2 *mismatches* an alle Referenzen eines Genotyps einer Virusspezies binden.

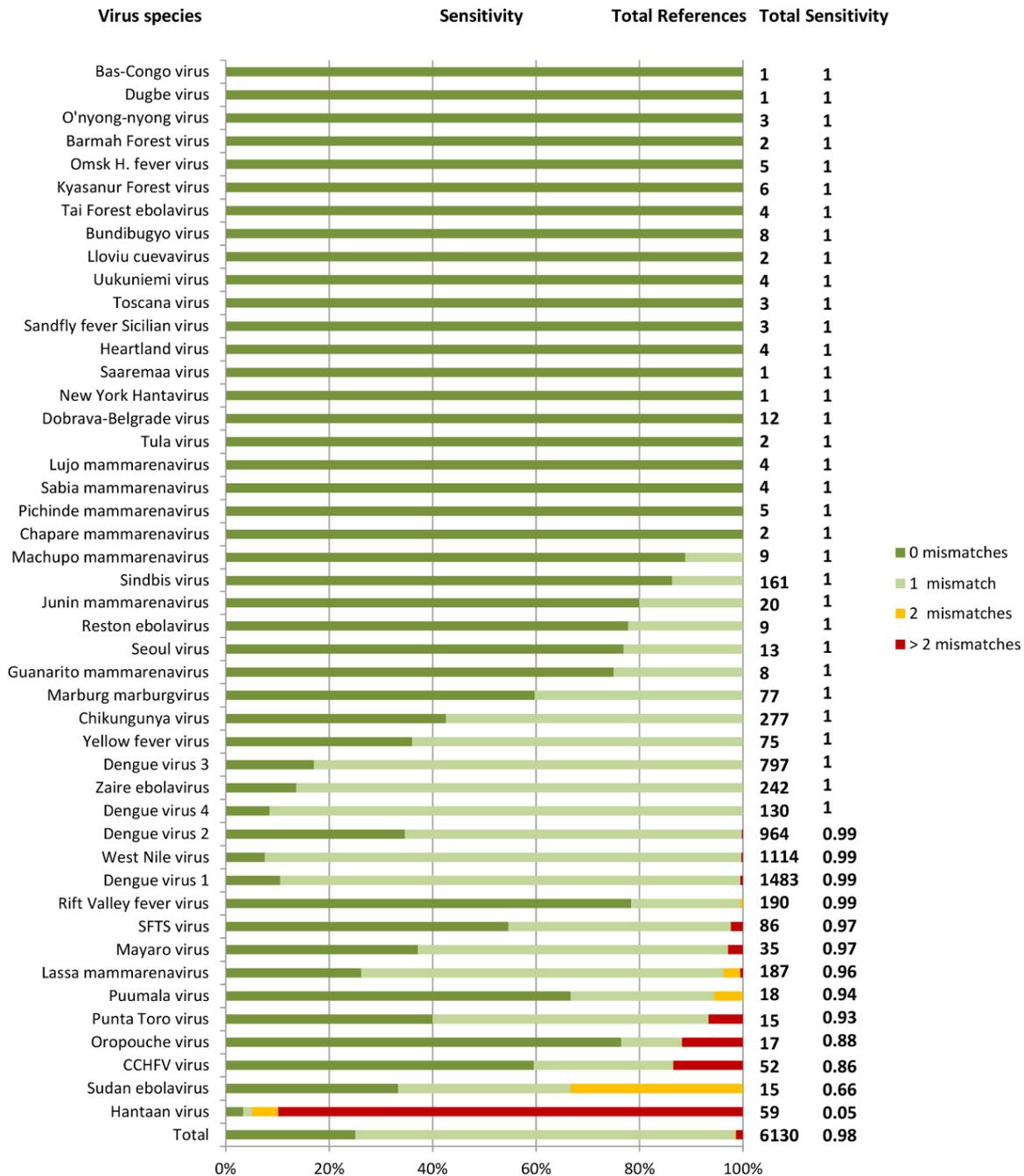


Abbildung 43: Sensitivität der VAmPSeq-Methode für hämorrhagische Fiebertypen in Bezug auf die *mismatches* zwischen den spezifischen Primern und allen Zielreferenzen [147].

Für das HF VAmPSeq-Assay wurden mehrere Viren in Konzentrationen bis zur Detektionsgrenze mit der Methode bearbeitet und mit einer HTS verglichen (ION Torrent Personal Genome Machine, PGM).

Für alle Viren (Gelbfieber-Virus, Krim-Kongo hämorrhagisches Fiebertvirus, Rift-Valley-Fieber-Virus, Ebola-Virus, Chikungunya-Virus und Junin-Virus) wurde dabei eine Detektionsgrenze der Methode von mindestens 10^1 Genomäquivalenten/ μl erreicht.

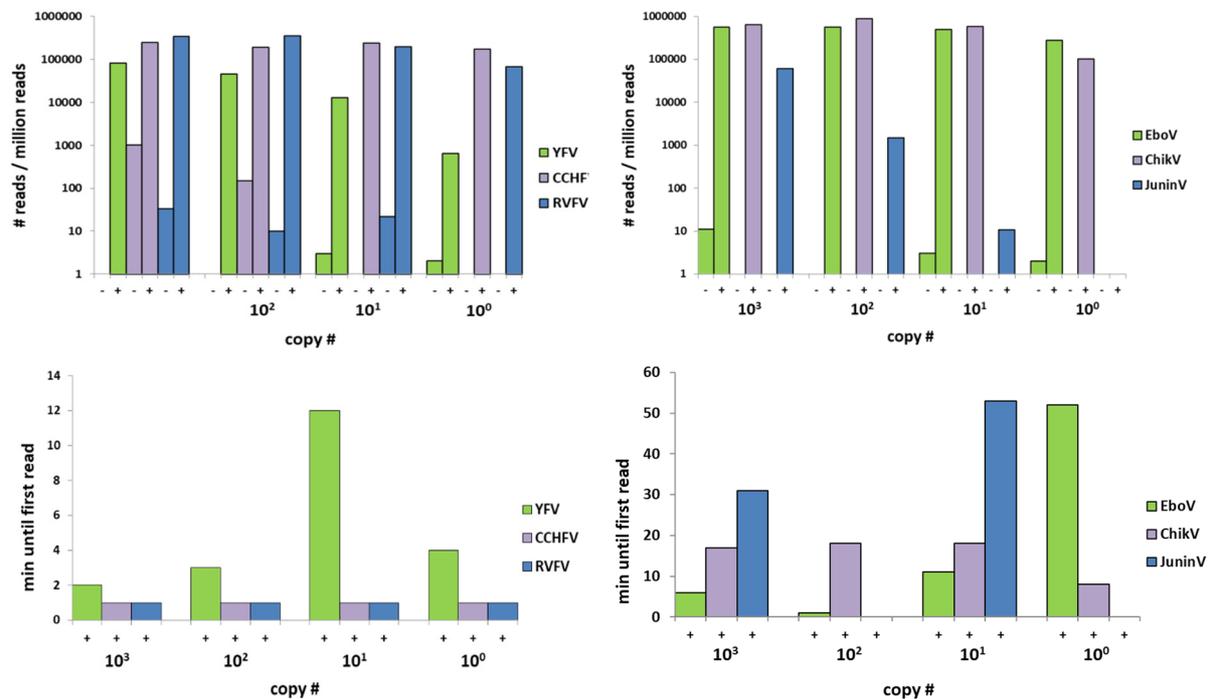


Abbildung 44: Detektionslimits der VampSeq-Methode am Beispiel der Viren Gelbfieber-Virus (YFV), Krim-Kongo hämorrhagisches Fieber-Virus (CCHFV), Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV), Ebola-Virus (EboV), Chikungunya-Virus (ChikV) und Junin-Virus (JuninV). Die Viren wurden mit dem HF-Primerpool amplifiziert und auf dem PGM und MinION sequenziert (+). Die Daten wurden mit einer shotgun-Sequenzierung der gleichen Proben verglichen (-) [147].

Des Weiteren wurde die VampSeq-Methode an Proben von Patienten getestet, welche Symptome eines hämorrhagischen Fiebers zeigten. Die Proben wurden dazu mit dem VampSeq-HF-Assay amplifiziert und auf dem MinION sequenziert. CCHFV konnte in allen Proben nach nur wenigen Minuten detektiert werden.

#	Origin	Virus identified	Virus load ¹	Viral reads	Total reads	Time to first viral read	Processing time ²
1	Turkey, Ankara	CCHFV-Kelkit06	1.96×10^6	39	3860	9 min	189 min
2	Turkey, Ankara	CCHFV-Kelkit06	5.20×10^7	4	1244	1 min	181 min
3	Turkey, Ankara	CCHFV-Kelkit06	1.90×10^6	97	8025	1 min	181 min

¹ (ge/ml)

² includes all specimen processing steps until definitive diagnosis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006075.t002>

Abbildung 45: Detektion von CCHFV nach Amplifizierung mit dem VampSeq-HF-Assay und Sequenzierung auf dem MinION. Sequenzen des Virus konnten schon nach wenigen Minuten Sequenzierung detektiert werden. [147]

4. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, 49 Proben von Patienten mit pockenähnlichen Hautveränderungen, welche negativ für Orthopockenviren getestet wurden, zu diagnostizieren. Dabei stand die Entwicklung einer neuen Methode im Vordergrund (VAmpSeq: Virus Amplification based Sequencing) zur Diagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen und einer ergänzenden Methode (PAmpSeq: Poxvirus Amplification based Sequencing) zur Vollgenomsequenzierung von Orthopockenviren, inklusive einer grafischen Oberflächenanwendung (GUI) für die offline-Analyse der generierten Daten. Zusätzlich wurden die Patientenproben mittels Illumina sequenziert und analysiert.

4.1. Diagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen

Für die Diagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen gibt es neben klassischen Methoden wie der Anzucht des Probenmaterials auf Zellkulturen oder Hühnerembryos sowie serologischen Nachweisen verschiedene molekularbiologische Methoden [57]. Dazu gehört als Goldstandard vieler Labore die PCR und zunehmend die HTS mittels Illumina oder MinION.

Beide Nukleinsäure-basierten Methoden haben sowohl signifikante Vor- als auch Nachteile. Dazu gehören vor allem:

- **Sensitivität:** Die PCR ist eine der sensitivsten Diagnostik-Methoden und ermöglicht in der Theorie den Nachweis von nur einem viralen Genomäquivalent in einer Probe. Für die Detektion eines Virus in einer mittels Illumina oder dem MinION sequenzierten Probe muss die Konzentration des Virus hingegen hoch sein, um Sequenzen viralen Ursprungs nachweisen zu können.
- **Spezifität:** Die PCR ist eine Methode für den spezifischen Nachweis, die Sequenz eines viralen Genoms muss bekannt sein und wird gezielt mit spezifischen Primern amplifiziert. Die HTS hingegen ist eine Methode, bei der die gesamte DNA/RNA einer Probe ohne vorherige Hypothese analysiert werden kann. Bei der HTS kann es daher zu einer Generierung von Daten und Informationen kommen, welche mit rechtlichen und ethischen Problematiken verbunden sind, wie die Sequenzierung des humanen Genoms.
- **Bioinformatische Auswertung:** Die bioinformatische Auswertung von Daten einer Sequenzierung erfordert bioinformatische Kenntnisse und eine hohe Computer-Kapazität. Zudem kann die Sequenzierung inklusive Auswertung mehrere Tage oder Wochen benötigen. Es werden hohe Datenmengen generiert, deren Handhabung und Speicherung eine Herausforderung darstellt. Zusätzlich beruht die Auswertung von MinION-Daten in Echtzeit häufig auf Programmen, welche nur online genutzt werden können.

- **Kontaminationen:** Es ist bekannt, dass es bei der HTS häufig zu Kontaminationen aus Reagenzien, vorherig sequenzierten Proben oder innerhalb eines Laufes kommen kann.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine neue Methode zu entwickeln, welche die Vorteile der HTS und PCR kombiniert und deren Nachteile eliminiert.

4.2. Sensitivität der Illumina-Sequenzierung

Die geringe Sensitivität ist ein Nachteil der Metagenomsequenzierung. Im Gegensatz zu einer PCR, bei der es theoretisch möglich ist, die DNA/RNA eines einzelnen Virus auch in einem komplexen DNA-/RNA-Hintergrund anzureichern und nachzuweisen, stellt die virale DNA/RNA in der Metagenomsequenzierung nur einen Bruchteil der gesamten DNA/RNA in der Gesamtprobe dar. Besonders bei Proben mit einem hohen Zellhintergrund, wie humanem Gewebe, ist der Anteil der humanen DNA/RNA im Verhältnis zur viralen DNA/RNA hoch, sodass in der Sequenzierung eine sehr hohe Anzahl von *reads* generiert werden muss, um ausreichend Sequenzen zur Detektion oder zur Assemblierung von längeren viralen Sequenzabschnitten zu erhalten [148]. Der Anteil von viralen *reads* in sequenzierten klinischen Proben wurde in zahlreichen Studien bestimmt und beträgt beispielsweise nur 0,008 % (EBV, Blut), 0,0003 % (Lassavirus, Blut) und 0,3 % (Zika Virus, Fruchtwasser) [149-151].

Auch die Ergebnisse in Tabelle 17 zeigen, mit welcher Tiefe sequenziert werden muss, um ausreichend virale Sequenzen aus einer humanen Probe sequenzieren zu können. Bei einem CT-Wert von 23,8, entsprechend etwa 10^4 Viruskopien, müssten bereits 500.000 *reads* sequenziert werden, um 1.000 virale Sequenzen zu generieren. Ist die Verteilung der Sequenzen linear, müssten bei einem CT-Wert von 30 bereits 50.000.000 *reads* sequenziert werden, um 1.000 virale Sequenzen zu generieren. In einem Review von Simner et al. wurde berechnet, dass zur erfolgreichen Diagnostik eines viralen Erregers aus klinischen Proben der Anteil der viralen *reads* zwischen 0,00001 % und 0,7 % liegen muss [152]. Die Sensitivität der HTS ist damit stark abhängig von der Menge der generierten Sequenzen.

Abbildung 45 zeigt, wieviele virale Sequenzen sich in dem Gesamtdatensatz einer Metagenomanalyse einer Sequenzierung von Proben aus Gewebe, Serum, Urin, Faeces und verschiedenen Abstrichen bei unterschiedlichen CT-Werten finden lassen [153]. Obwohl von allen untersuchten Proben 92 % korrekt diagnostiziert werden konnten, ist der Anteil von viralen Sequenzen bei vielen Datensätzen der Proben gering. Bei der Sequenzierung von Serum werden bei einem CT-Wert von 15 für das entsprechende Virus nur etwa zehn virale Sequenzen in 1 Mio. Sequenzen detektiert. Es ist jedoch bekannt, dass es bei verschiedenen molekularbiologischen Laboranalysen von Serum zu einer Inhibierung in den *downstream*-Prozessen kommen kann [154, 155]. Urin, respiratorische Abstriche und Hautabstriche konnten

bei der Patientenprobe 2 um eine akute oder latente Infektion oder eine Laborkontamination mit HSV1 handelt. In einer Studie, bei der 48 HSV1-positive Patientenproben mittels qPCR gemessen wurden, konnten ausschließlich niedrige CT-Werte von 14,4–26,1 ermittelt werden [159]. Die niedrige Sensitivität der HTS bei der Diagnostik von infektiösen Hauterkrankungen kann daher auch als Vorteil gesehen werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

4.3. Sensitivität der VAmPSeq-Methode

Wie bei der Illumina-Sequenzierung ist die Sensitivität der Virusdetektion bei der MinION-Sequenzierung gering. Nur wenige Studien berichten von einer Detektion von viralen Erregern aus Patienten- oder Umweltproben. Dazu gehört die Detektion von Ebolavirus (10^5 Kopien/ μ l Blut), Ross-River-Virus (10^4 Kopien/ μ l Mücken-Homogenisat) sowie Porcine Reproductive and Respiratory Virus (PRRSV) (10^4 Kopien/ μ l Serum) [86, 160, 161]. Die Sequenzierung von geringeren viralen Konzentrationen erfolgte mit vorheriger spezifischer Amplifikation des Genoms, darunter Influenza-, Ebola- und Lassa-Virus [92, 94, 162, 163].

Mit der VAmPSeq-Methode ist es möglich, eine Amplikon-basierte Virusdetektion für mehrere virale Erreger gleichzeitig durchzuführen.

4.3.1. *In silico* Sensitivität der VAmPSeq-Methode

Um eine hohe Sensitivität der VAmPSeq-Methode zu gewährleisten, musste zunächst die möglichst beste Kombination von Primern gefunden werden. Dafür musste bei der Entwicklung der Primer darauf geachtet werden, dass alle Primer ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und keine Hairpin-, Homodimer- und Heterodimer-Strukturen ausbildeten [164, 165].

Bei der Entwicklung des Primerpools für das VAmPSeq-Assay für pockenähnliche Hautveränderungen konnte bei einigen Primern die *in silico*-Ausbildung von Primerdimeren nicht vermieden werden, jedoch wurde für keine Primerkombination ein ΔG -Wert $< -7,4$ kcal/mol berechnet. Damit lagen alle Werte unter der Toleranzgrenze von -9 kcal/mol.

Man kann annehmen, dass bei der Amplifikation mit einer sehr hohen Anzahl von Primern die Sensitivität der VAmPSeq-Methode wohl auch durch noch stärkere Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Primern nicht beeinflusst wird. So bilden einige der 906 Primer des VAmPSeq-Assays für hämorrhagische Fieber-Viren Heterodimere mit ΔG -Werten weit unter -10 kcal/mol [147]. In experimentellen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Primer auch im Pool eine Amplifikation der entsprechenden viralen Positivkontrollen in einer Konzentration von 1-10 Genomäquivalenten/Reaktion ermöglichten.

Zudem müssen für eine hohe Sensitivität die Primer ohne *mismatches* zur Zielregion komplementär binden. Einzelne *mismatches* zwischen der Primer- und Zielsequenz können toleriert werden, sollten sich aber nicht am 3'-Ende des Primers befinden, um ein *mispriming*

der Polymerase zu verhindern [166]. Besonders bei Viren-Spezies, von denen es divergente Genotypen gibt, ist es häufig problematisch Primerpaare zu entwickeln, welche alle Genotypen amplifizieren können [167, 168]. Dies ist vor allem bei RNA-Viren der Fall [169, 170]. Die Divergenz der viralen Genotypen innerhalb einer Spezies der Diagnostik und Differentialdiagnostik von pockenähnlichen Hautveränderungen ist jedoch gering.

4.3.2. *In vitro*-Sensitivität der VAmPSeq-Methode

Mit einer quantifizierten Verdünnungsreihe wurde das Detektionslimit der VAmPSeq-Methode für verschiedene Viren bestimmt. Für sechs der Viren erwies sich die Methode als ähnlich sensitiv oder sensitiver und für vier Viren als weniger sensitiv im Vergleich zu den etablierten qPCRs.

Da alle Primer des VAmPSeq-Assays in einer einzigen Reaktion verwendet wurden, war es nahezu unmöglich, für alle Primerpaare die optimalen PCR-Konditionen zu ermitteln. Eine Titration von einzelnen Primern und Reagenzien, wie es bei konventionellen PCRs die Regel ist, war bei der hohen Primeranzahl der VAmPSeq-PCRs nicht möglich. Zudem waren bei Hautabstrichen von akuten Infektionen mit Hauterregern hohe Viruskonzentrationen zu erwarten, sodass eine weitere Erhöhung der Sensitivität des Assays nicht unbedingt erforderlich war [153, 159, 171, 172].

4.3.3. Sensitivität der VAmPSeq-Methode beim Screening der Patientenproben

Zusätzlich zu den mit der Illumina-Sequenzierung detektierten viralen *reads* von Orf-Virus, MOCV und HSV1 konnten in jeweils einer Probe Sequenzen von HSV1, EBV sowie EBV und Parvovirus B19 identifiziert werden. Diese Ergebnisse konnten bis auf HSV1 (CT 37) nicht mit spezifischen qPCRs bestätigt werden. Es war daher fraglich, ob es sich dabei um Kontaminationen oder Viruskonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze handelte.

EBV kann bei 80 % aller Kinder und 95 % aller Erwachseneren latent in den peripheren Blut-Gedächtnis-B-Zellen gefunden werden [54, 173]. Die Infektion erfolgt über die Epithelzellen und B-Lymphozyten des respiratorischen Trakts und die Verbreitung über das lymphoretikuläre System [174]. Die Entstehung von Tumoren des lymphatischen Systems und Epithels sowie die Ausbildung einer infektiösen Mononukleose (Pfeiffer-Drüsenfieber) wurde mit Infektionen mit EBV in Zusammenhang gebracht [175, 176]. Bei der infektiösen Mononukleose kann es zur Ausbildung eines Exanthems oder einem *rash* kommen [177]. Eine weitere mit EBV in Zusammenhang gebrachte Erkrankung im Kindesalter ist das Gianotti-Crosti-Syndrom, bei dem es zur Ausbildung einer Lymphadenopathie und einer papulären Eruption der Haut kommen kann [178]. Die Ausbildung von Exanthem, *rash* oder Eruption ist dabei auf die Antwort des Immunsystems auf die virale Infektion zurückzuführen; eine aktive Replikation des Virus in der

Haut konnte in nur wenigen Fällen nachgewiesen werden. Die Diagnostik beruht daher auf Antikörpernachweisen oder dem Nachweis von viraler DNA im Serum [179-182]. Ein wie in dieser Studie verwendeter Hautabstrich ist daher für die Diagnostik nicht optimal.

Auch in Probe 14 konnten mittels VAmPSeq-Methode EBV und Parvovirus B19 detektiert werden. Parvovirus B19 steht mit zahlreichen Erkrankungen in Zusammenhang, darunter das mit einem *rash* des Gesichtes einhergehende Erythema infectiosum (Ringelröteln) [183]. Beim „Gloves and Socks Syndrome“ kommt es zur Ausbildung von Papulen, Vesikeln und Bullae an Händen und Füßen [184]. Antikörper lassen sich bei bis zu 85 % der Bevölkerung nachweisen; die Infektion verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch [185, 186]. Auch bei Infektion mit Parvovirus B19 beruht die Diagnostik auf Nachweisen von Antikörpern oder DNA in Serum, da das Virus in den erythroiden Vorläuferzellen repliziert [187].

Wie bei allen viralen Infektionen ist auch das Zeitfenster der Diagnostik von Bedeutung. Zur Ausbildung des *rashes* kommt es etwa zwei Wochen nach der Infektion mit Parvovirus B19. Zu diesem Zeitpunkt ist die virämische Phase bereits abgeschlossen und die virale DNA lässt sich nicht mehr im Serum nachweisen [188]. Die dermatologischen Symptome beruhen auf der Formation und Deposition von Immunkomplexen in die Haut [185].

4.4. Spezifität der Illumina-Sequenzierung

Der Vorteil der Metagenomsequenzierung gegenüber klassischen Nukleinsäure-basierten Diagnostikmethoden wie der PCR ist der Hypothese-freie Blick in die Gesamtprobe, welcher die Detektion neuartiger und nicht erwarteter Erreger ermöglicht [104, 189]. Daher konnte ein hochdivergentes, zuvor nicht charakterisiertes Virus in der von einer Katze entnommenen Probe (Kruste) identifiziert werden, welche wegen pockenähnlicher Hautveränderungen tierärztlich behandelt wurde.

Neben MOCV Typ 1 in Probe 32 konnte zusätzlich in den Proben 25 und 26 MOCV Typ 2 identifiziert werden, welches durch die in der Routinediagnostik verwendete spezifische qPCR nicht abgedeckt ist und meist bei immunsupprimierten Patienten auftritt [190].

Der unspezifische Blick in die DNA einer Patientenprobe und die Generierung unzähliger Informationen sind jedoch auch kritisch zu betrachten. Neben den Erregern der Diagnostik und Differenzialdiagnostik werden bei der Sequenzierung von Patientendaten auch Informationen generiert, deren Analyse und Bewertung mit einer ethischen Problematik einhergehen. Dazu gehört vor allem die beiläufige Sequenzierung der humanen DNA des Patienten. Auch die in dieser Studie generierten Datensätze bestanden zu einem überwiegenden Anteil aus humanen Sequenzen. Der Umgang mit solchen „Nebenprodukten“ der Sequenzierung ist noch nicht eindeutig geklärt und ist nur ansatzweise durch die EU-Datenschutz-Grundverordnung (DSGVO) und das Bundesdatenschutzgesetz (BDSG) geregelt. Der Ansatz, die aus humaner DNA

generierten Sequenzen schon während der Sequenzierung zu löschen, ist vielversprechend [191]. Jedoch können hierbei auch relevante Daten und Informationen verloren gehen.

Obwohl die Diagnostik, beispielsweise bei einem pockenähnlichen Exanthem, durch eine Patienten-Einverständniserklärung geregelt ist, kann es zu Erkenntnissen kommen, die dem Datenschutz unterliegen. Dazu gehört die Detektion von Erregern, welche durch die Diagnostik und Differentialdiagnostik nicht abgedeckt sind, z.B. die Detektion des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder andere schwerwiegende Erkrankungen. Ein Beispiel dieser Studie war die Detektion von Merkelzell-Polyomavirus in den Proben von Abstrichen asymptomatischer Haut in der Metagenomanalyse. Es ist bereits bekannt, dass das Merkelzell-Polyomavirus die Haut eines großen Teils der Bevölkerung asymptomatisch infiziert, jedoch kann das Virus auch schwerwiegende Tumore verursachen [192]. Der Umgang mit solchen beiläufigen Ergebnissen ist nicht einheitlich geregelt und wird in vielen Fachbereichen diskutiert [193-195].

4.4.1. Detektion eines neuartigen Eichhörnchen-Pockenvirus

Eichhörnchen-Pockenviren sind in Großbritannien und Irland in Grauhörnchen (*Sciurus carolinensis*) als Reservoirwirt endemisch [196]. Die Infektionen sind meist asymptomatisch, die Übertragung auf Eurasische Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*) führt jedoch zu letalen Infektionen und zu einer fortschreitenden Dezimierung der Eurasischen Eichhörnchenpopulation [197, 198]. Auch in Kanada und Spanien konnten durch Eichhörnchen-Pockenviren verursachte Läsionen bei Eichhörnchen beobachtet werden [199, 200].

Am Robert Koch-Institut in Berlin konnte 2015 erstmalig ein Eichhörnchen-Pockenvirus mittels Metagenomsequenzierung identifiziert werden [201]. Das Eichhörnchen-Pockenvirus wurde zunächst phylogenetisch aufgrund seiner morphologischen Ähnlichkeit den Orthopockenviren, nach der Genomsequenzierung jedoch aufgrund der Genomunterschiede zu allen Familien der Pockenviren einer eigenen Klade innerhalb der Pockenviren zugeordnet [202, 203]. Genomgröße und Identität des Genoms zeigten die höchsten Übereinstimmungen mit den Parapockenviren oder dem Squirrelpoxvirus UK (Accession No. HE601899) [201].

In der Probe 43 konnten nur wenige *reads* des neuen Eichhörnchen-Pockenvirus detektiert werden und zu einem längsten *Contig* von nur 600 bp Länge assembliert werden. Die phylogenetische Einordnung ist daher nur vorläufig und weitere Sequenzierungen, Anzuchten und Analysen sind geplant.

Die kurze Sequenz hat die höchste Übereinstimmung zu Squirrelpoxvirus UK und den Parapockenviren, zeigt jedoch nur eine geringe Sequenzübereinstimmung und phylogenetische Nähe zu dem Eichhörnchen-Pockenvirus aus Berlin.

Interessanterweise wurden die viralen Sequenzen nicht aus der Probe eines Eichhörnchens, sondern einer Hauskatze detektiert. Da Hauskatzen mit CPXV infiziert werden können, wurde die Probe zur Orthopockenviren-Diagnostik eingesandt [23, 204, 205].

Es ist möglich, dass die Diversität der Pockenviren in Haus- und Wildtieren größer ist als bisher angenommen und dass viele Befunde der klassische PCR-Diagnostik entgehen. In den letzten Jahren wurden vermehrt neuartige Ortho- und Parapocken in Menschen und Tieren identifiziert [206-216]. Eine Übertragung solcher neuartiger Pocken auf den Menschen kann nicht ausgeschlossen werden. In den USA wurde die Übertragung eines Pseudokuhpocken-ähnlichen Virus von einem Hirsch auf zwei Jäger berichtet [217]. Auch die Übertragung eines Virus von Pferden auf zwei Personen mit anschließender Ausbildung von mehreren Läsionen im Gesicht konnte gezeigt werden [218]. Das Genom des identifizierten Virus zeigte die höchste Übereinstimmung zu Viren des Genus der Parapockenviren (88%) und Molluscipockenviren (78 %). Eine weitere Übertragung eines Pockenvirus von Rindern auf zwei Personen wurde in Georgien berichtet [209]. Das Genom des Virus zeigt die höchste Übereinstimmung zu CPXV und MPXV. Im Fall des Berliner Eichhörnchen-Pockenvirus konnte trotz intensivem Kontakt der Eichhörnchen zu Menschen keine Übertragung beobachtet werden [201].

Weitere Studien zu viralen Infektionen von Eichhörnchen in Deutschland wären notwendig, um zu bewerten, ob Eichhörnchen der Reservoirwirt des in Probe 43 detektierten Eichhörnchen-Pockenvirus sind und dieses bei direktem oder indirektem Kontakt auf eine Hauskatze übertragen wurde. Es muss sich dabei um keinen Einzelfall handeln, da im Jahr 2019 weitere Proben von Hauskatzen zur Orthopockenviren-Diagnostik eingesandt wurden. Nicht alle Fälle konnten als CPXV bestätigt werden und der Auslöser der orthopockenähnlichen Hautveränderungen blieb unklar.

Mit nur etwa 80 % Identität auf Nukleinsäureebene zu Squirrelpoxvirus UK konnte das neuartige Virus in der Probe 43 nicht mit den in der Diagnostik verwendeten Ortho-, Mollusci- oder Parapockenviren-PCRs detektiert werden, obwohl diese generisch mehrere Spezies der Pockengenera umfassen. Hier zeigt sich der Vorteil des ungerichteten Ansatzes der Metagenomsequenzierung.

4.5. Spezifität der VAmPSeq-Methode

Das neuartige Eichhörnchen-Pockenvirus konnten mittels Metagenomsequenzierung, jedoch nicht mit der VAmPSeq-Methode detektiert werden, welches spezifische virale Genomregionen amplifiziert. Im Gegensatz zu den Bakterien, deren Genome das konservierte 16S-rRNA-Gen ausweisen, gibt es bei den Viren keine Region, welche mit „Pan-virus“-Primern amplifiziert werden kann [219]. Jedoch könnten weitere generische Primer dem VAmPSeq-Panel hinzugefügt werden, welche auf konservierte Regionen zwischen den Orthopockenviren, Molluscipockenviren und Parapockenviren zielen [220].

Auch das Hinzufügen weiterer spezifischer Primer ist möglich, um möglichst viele Spezies und Genotypen der Pockenviren detektieren zu können. Die publizierte multiplex-Methode für die Detektion von Hämorrhagische Fieber-Viren ist eines der ersten entwickelten und validierten Assays [147]. Für das Assay wurden die Primer nicht wie für das Assay für pockenähnliche Hautveränderungen manuell, sondern mithilfe der AmpliSeq-Pipeline von Thermo Fisher entwickelt. AmpliSeq ist eine hoch-Multiplex-Methode zur Anreicherung von Genomen oder Genomfragmente vor der (PGM-)Sequenzierung, welche für die Detektion von Pathogenen adaptiert wurde [221, 222]. Der Anzahl an Primern für die AmpliSeq-Methode sind dabei nahezu keine Grenzen gesetzt; der Einsatz von bis zu 20.000 Primern in nur einem Reaktionsansatz soll möglich sein.

Eine weitere Möglichkeit für die Amplifikation neuartiger Viren wäre es, die Annealingtemperatur zu erniedrigen und die Konzentrationen der Reagenzien für die VAmplSeq-PCR anzupassen, um unspezifischere Primerbindungen zu ermöglichen.

Bei der Protokollentwicklung der VAmplSeq-PCRs hat sich jedoch gezeigt, dass Annealingtemperaturen, welche etwa 5°C über der Schmelztemperatur der Primer liegen, die beste Amplifikation ermöglichen. Die vergleichsweise hohe Annealingtemperatur der VAmplSeq-PCRs gewährleistet eine spezifische Primerbindung und reduziert ungewünschte Bindungen und Dimerbildungen, da bei erhöhter Temperatur weniger Energie aufgebracht werden muss, um „unperfekte“ Bindungen aufzubrechen. Für klassische PCR-Ansätze sollte im Vergleich die Annealingtemperatur 5 °C unter der Schmelztemperatur liegen [223].

Eine niedrigere Annealingtemperatur könnte die Amplifikation von divergenten Viren ermöglichen, wirkt sich jedoch auf die Sensitivität der Methode und das Verhältnis zwischen viraler DNA und Hintergrund-DNA aus.

Durch die hohe Spezifität der VAmplSeq-Methode wird die nicht gewünschte Sequenzierung von humaner Hintergrund-DNA oder die Detektion von Erregern außerhalb der Diagnostik und Differentialdiagnostik vermieden. Zudem müssen bei der VAmplSeq-Methode für die Detektion eines Virus im Vergleich zur Illumina-Sequenzierung aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität wesentlich weniger *reads* sequenziert werden. Obwohl die Detektionslimits für alle Viren in einem Bereich von 0,5–28,3 Genomequivalenten je Reaktion liegen, unterscheiden sich die Kinetiken bei der Sequenzierung erheblich. So werden bei CPXV und VACV innerhalb einer Stunde bis zu 2.000 virale Sequenzen und bei MOCV und VZV in einer Stunde bis zu 40.000 virale *reads* sequenziert. Dies ist vor allem abhängig von der verwendeten *flow cell*. So variiert die Anzahl der aktiven Poren je *flow cell* und kann sich auch während des Laufs nicht vorhersehbar verändern.

Es ist jedoch auch möglich, dass die Effektivität der spezifischen Primer entscheidend für die Kinetik der Sequenzierung ist. So hat die Sequenzierung von CPXV und VACV, welche durch das gleiche Primerpaar amplifiziert werden, eine ähnliche Kinetik mit bis zu 2.000 Sequenzen in einer Stunde.

Bei allen Viren wird jedoch durch die Kinetiken der Sequenzierung deutlich, dass schon innerhalb der ersten wenigen Minuten ausreichend virale Sequenzen generiert werden, um die Virusspezies zu identifizieren.

4.6. Bioinformatische Analyse von Illumina-Daten

Die bioinformatische Analyse der generierten Sequenzen ist von großer Bedeutung für die Metagenomsequenzierung. Dabei werden eine hohe Computerkapazität sowie bioinformatische und klinische Kenntnisse benötigt, um die hohen Datenmengen bioinformatisch auszuwerten und auch bewerten zu können.

Die Zeit für die Auswertung ist dabei ein wichtiger Faktor. Obwohl die Patientenproben in dieser Studie retrospektiv analysiert wurden, kommt es im Laboralltag häufig zu Probeneinsendungen, bei denen die Diagnostik von hoher Wichtigkeit und somit auch zeitabhängig ist. Eine tage- oder wochenlange Auswertung der Sequenzierdaten, wie es bei vielen Workflows und Pipelines üblich ist, ist daher von Nachteil [224]. Für die Analyse eines Datensatzes einer Probe wurden mit dem in dieser Arbeit verwendeten Workflow nur durchschnittlich 30 min benötigt. Ermöglicht wurde dies durch die Kombination der Programme und Referenzdatenbanken. So ist das verwendete Alignment Programm DIAMOND bis zu 20.000-mal schneller als das klassische NCBI BLAST [133]. Für die bioinformatische Datenanalyse in dieser Arbeit wurden zudem zwei unterschiedliche Methoden gewählt, die taxonomische Einordnung der Bakterien, Fungi und Viren durch ein Alignment auf Nukleotidebene sowie bei Viren durch ein Alignment auf Ebene der Aminosäure. Dabei konnte das Eichhörnchen-Pockenvirus und die Papillomaviren nur mit dem sensitiven Aminosäure-Alignment detektiert werden.

Mit dem Aminosäure-Alignment können virale Genome mit einem Sequenzunterschied von 70-80 % zur nächsten Referenz identifiziert werden, während mit einem Nukleotid-Alignment Unterschiede von mehr als 40 % und damit mutierte oder divergente Viren nicht mehr identifiziert werden können. Erst in den letzten Jahren konnte mittels Metagenomsequenzierung und Aminosäure-Alignments das Vorhandensein zahlreicher hochdivergenten Viren als „Virosphere“ zahlreicher Organismen gezeigt werden [189, 225, 226].

Auch in einem vom RKI organisierten Ringversuch mit 13 Teilnehmern konnten die Sequenzen eines hochdivergenten Bornavirus in einem simulierten Datensatz nur mittels Aminosäure-Alignment identifiziert werden [224]. Die Sequenzen eines leicht mutierten Masernvirus mit noch 80–90 % Identität auf Nukleotidebene zur nächsten Referenz konnten mittels Nukleotid-Alignment von vielen Teilnehmern nicht in kompletter Anzahl detektiert werden. Jedoch ist ein

Alignment auf Aminosäure-Ebene aufgrund der erhöhten Sensitivität auch anfälliger für falsch-positive Ergebnisse. Zudem werden grundsätzlich weniger *reads* identifiziert, da nicht-kodierende Sequenzen nicht in den Protein-Datenbanken enthalten sind.

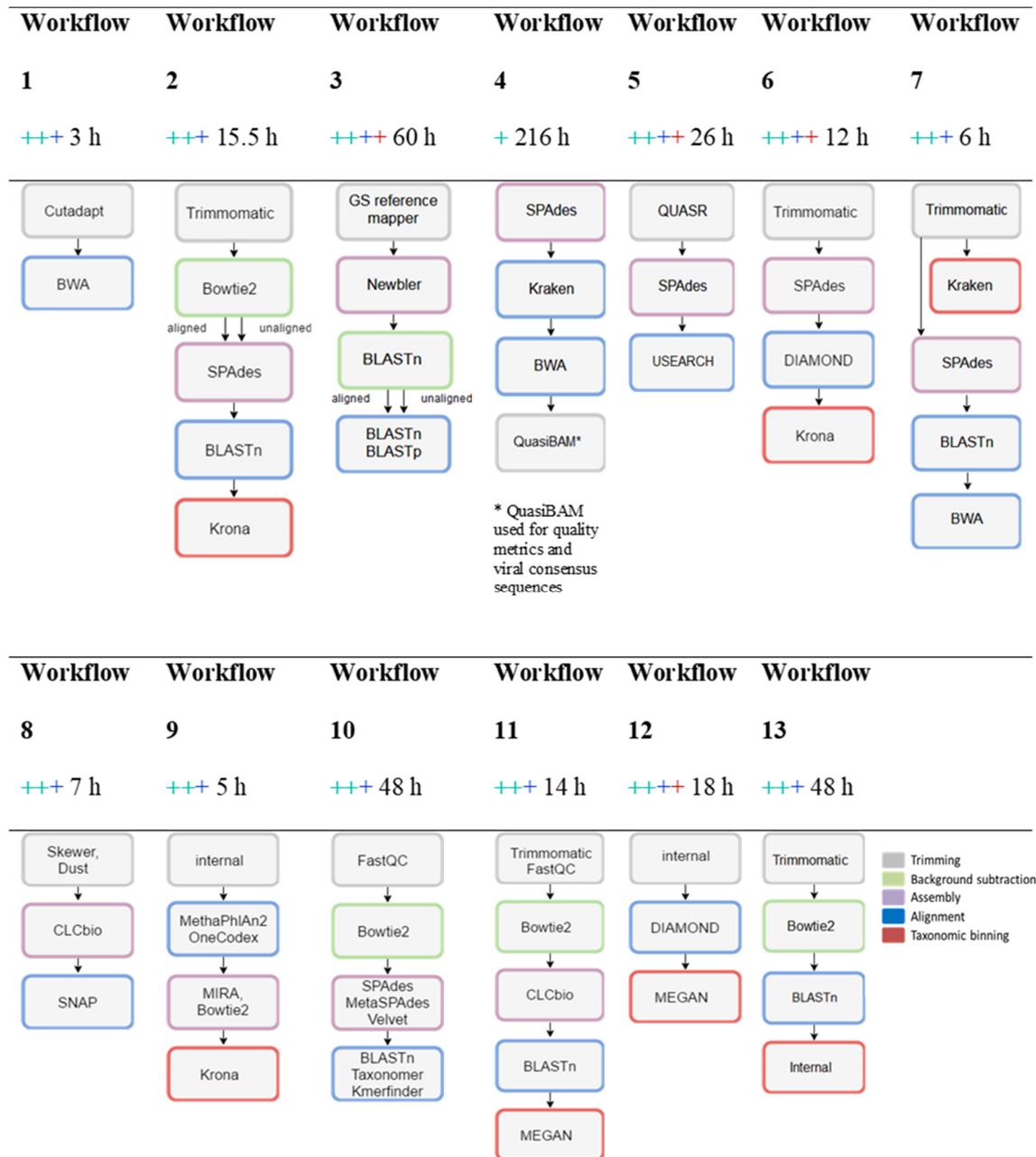


Abbildung 46 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Analyse-Workflows der Metagenomsequenzierung im Rahmen eines internationalen Ringversuches. Während HSV1, Torque Teno Virus (hellblaues Kreuz) und Masernvirus (dunkelblaues Kreuz) mit hoher Identität auf Nukleotidebene zur nächsten Referenz von fast allen Teilnehmern identifiziert werden konnten, wurde das hochdivergentes Bornavirus (rotes Kreuz) nur mit Aminosäure-Alignment (DIAMOND, BLASTx, BLASTp, USearch) detektiert [224].

Auch die Auswahl der Referenzdatenbanken ist von Bedeutung, um falsch-negative sowie falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Bislang gibt es nur wenige Referenzdatenbanken, deren Einträge regelmäßig nach bestimmten Kriterien überprüft werden. Dazu gehören z.B. EpiFlu für Influenzaviren, eine Datenbank für HIV oder ViPR für humanpathogene Viren [227-229]. NCBI

GenBank ist eine der größten Genom-Datenbanken, Einträge werden jedoch nicht fachlich auf Korrektheit kontrolliert. Daher wurden die in dieser Studie verwendeten Datenbanken manuell korrigiert und zusammengestellt. Bei Nutzung der eigentlich kurierten NCBI RefSeq Datenbank kam es bei der Analyse der Studienproben zur Detektion von zahlreichen *reads* eines Pockenvirus (Bean-Virus) in allen Proben, welche sich jedoch bei der weiteren Charakterisierung als falsch positiv (Identität zum humanen Genom) erweisen. Obwohl die manuelle Zusammenstellung und Bearbeitung der verwendeten Referenzdatenbanken die Detektion von falsch-positiven Ergebnissen verringert, ist die Aktualisierung solcher Datenbanken aufwendig und birgt die Gefahr von falsch-negativen Ergebnissen. Die Bereitstellung von fachmännisch kurierten und regelmäßig überarbeiteten Datenbanken wird daher bereits von vielen Wissenschaftlern gefordert [230, 231].

Neben der rein bioinformatischen Auswertung ist auch die klinische Betrachtung der Ergebnisse von großer Bedeutung [224, 232]. Anders als bei einer PCR werden bei der Metagenomsequenzierung unzählige Informationen generiert, deren Bewertung eine Herausforderung darstellen kann und nicht nur bioinformatisches, sondern auch klinisches Fachwissen erfordert. So bestätigt die Detektion der HSV1-, MOCV- und Orf-Virus-Sequenzen eine in der Studie zuvor formulierte Hypothese, denn all diese Viren können pockenähnliche Hautveränderungen verursachen. Die Bewertung von Informationen über die im Vorfeld formulierte Hypothese hinaus ist jedoch schwierig. So wurden in einigen der Proben Papillomaviren gefunden, deren Pathogenität nicht bekannt ist. Um zu vermeiden, dass bioinformatische Ergebnisse unter- oder überbewertet werden, sollten die Erkenntnisse daher immer unter verschiedenen, auch klinischen und biologischen, Blickwinkeln betrachtet und diskutiert werden. In einigen Instituten wurden daher „*precision medicine teams*“ gebildet, welche aus Experten der Mikrobiologie, Bioinformatik, Infektiologie und Medizinern bestehen und die Interpretation von HTS-Daten diskutieren [152].

4.7. Bioinformatische Datenanalyse mittels VAmPSeeker und PAmpliSeeker

Mit der Entwicklung des MinION wurde die „Vor-Ort“-Sequenzierung in Echtzeit, und damit die Untersuchungen von Ausbruchsgeschehen, Biosurveillance und einer „Point-Of-Care“-Erregerdiagnostik außerhalb der Labore ermöglicht [233]. Für die Analyse der generierten Daten wird jedoch eine Internet-Verbindung benötigt, welche unter Feld-Bedingungen und in entlegenen Regionen häufig nicht zur Verfügung steht, und die Anwendung erfordert bioinformatische Kenntnisse für die Nutzung von Kommandozeilen-Anwendungen [234-236].

Um eine Echtzeit-offline Analyse zu ermöglichen, die auch für Nutzer ohne bioinformatische Kenntnisse anwendbar ist, wurde in dieser Arbeit der VAmPSeeker entwickelt. Dabei handelt es sich um eine intuitiv bedienbare Oberflächenanwendung, welche auf der MinION Software Guppy beruht und Ergebnissen in Text- und Grafikformat generiert. Eine mit dem VAmPSeeker

vergleichbare offline-Oberflächenanwendung für die Erregerdiagnostik wurde erst 2019 veröffentlicht [237]. Das Programm (MINDS: MinION Detection Software) beruht dabei auf der Centrifuge Classification Software, einem Programm für die taxonomische Einordnung und Quantifizierung von HTS-*reads* [238]. Dabei hat MINDS im Vergleich zum VAmPSeeker den Nachteil, dass die generierten Sequenzen nicht in Echtzeit, sondern erst im Anschluss an die Sequenzierung ausgewertet werden oder die Auswertung wiederholt gestartet werden muss, um eine Echtzeit-Analyse zu ermöglichen. Der VAmPSeeker hingegen startet die Analyse mit der Generierung der ersten FastQ-Datei mit 4.000 Sequenzen und aktualisiert die Auswertung automatisch, sobald eine weitere FastQ-Datei generiert wird. Damit kann die Analyse während der Sequenzierung und nicht im Anschluss an sie erfolgen. Neben der spezifischen Nutzung des Programmes für die Detektion von Viren, welche pockenähnliche Hautveränderungen hervorrufen, ist der VAmPSeeker auch für weitere Analysen nutzbar. Neben der Visualisierung der *coverage* bei der Orthopocken-Vollgenom-Sequenzierung (PAmpliSeq) können spezifische Referenz-Datenbanken für die Detektion von weiteren Viren ausgewählt sowie eine ungerichtete Virensuche durch eine hinterlegte virale RefSeq-Datenbank durchgeführt werden. Auch die Analyse der 16S-Sequenzierung ist möglich.

4.8. Kontaminationen in der Illumina-Sequenzierung

In den Negativkontrollen der Mikrobiomanalysen dieser Studie lassen sich mehrere bakterielle Spezies finden. Zudem findet man in vielen Proben der Viromanalyse einige *reads* von HSV1, MOCV und Orf-Virus. Hierbei kann es sich um Kontaminationen innerhalb des Laufes oder aus vorherigen Läufen, aus Reagenzien oder während der Probenbearbeitung handeln [239].

In einer Studie von Laurence et. al. wurden 57 Sequenz-Datensätze des „1000 Genome Projektes“ auf Kontaminationen untersucht [240]. In allen Datensätzen wurden Sequenzen von Bakterien des Genus *Bradyrhizobium* identifiziert, eine vermutliche Kontamination aus ultrapurem Wasser. Weitere Kontaminationen wurden als Bakterien der Genera *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* und *Flavobacterium* identifiziert, welche sich sowohl in der in dieser Studie durchgeführten Illumina- als auch 16S-Sequenzierung fanden.

Sequenzen von Parvoviren wurden unabhängig in zwei Studien in Silica-basierten Säulen für die Extraktion von DNA identifiziert [241, 242].

Eine weitere Studie von Asplund et. al. zeigt die Kontamination in insgesamt 700 Datensätzen von Sequenzierungen mit zahlreichen Reagenzien, unter anderem für die Extraktion, cDNA-Synthese und PCR. Dazu gehören verschiedene Circoviren, Megaviren, Phagen, das Chikungunyavirus und Semliki-Forest-Virus [243]. Zudem konnten die Autoren bereits veröffentlichte Assoziationen viraler Erreger mit Krankheitsbildern widerlegen. So wurde in Patienten mit chronischer Müdigkeit das Murine Leukämievirus und das Xenotrophic murine

leukemia virus-related virus (XMRV) identifiziert [244, 245]. XMRV wurde in einer weiteren Studie mit der Entstehung von Tumoren assoziiert [246]. Weitere Studien zeigten den Zusammenhang zwischen einem Chlorovirus und Veränderungen von kognitiven Funktionen sowie zwischen einem Hybrid eines DNA-Virus und Hepatitis [247, 248]. Sequenzen der aufgezählten Viren ließen sich auch in den Datensätzen der vorliegenden Studie finden, wurden jedoch durch das Filtern und manuelle Zusammenstellen der verwendeten Referenzdatenbanken nicht detektiert bzw. angezeigt. Dies verdeutlicht erneut, wie wichtig die Verwendung von kurierten Referenzdatenbanken, jedoch auch die Verwendung von Negativkontrollen und die Interpretation der bioinformatischen Daten ist. Auch können Tools für die Detektion solcher Kontaminationen eingesetzt werden [249, 250].

Zusätzlich zu den genannten Kontaminationen aus Reagenzien kann es zudem zu einer Kreuz-Kontamination zwischen den einzelnen Proben durch die Probenvorbereitung oder durch falsch zugeordnete *barcodes* kommen.

Ist bei der *Library*-Präparation der DNA-Gehalt einer Probe, z.B. in den Negativkontrollen, gering, wird die mit Adaptoren ligierte DNA mit komplementärem Primern in mehreren PCR-Zyklen amplifiziert, um eine für die Sequenzierung ausreichende DNA-Menge zu generieren.

In der Virom-Analyse dieser Studie war besonders auffällig, dass die Kontamination in den während der *Library*-Präparation in Nähe der positiven Proben gelegenen Proben am höchsten war. Dies spricht gegen eine Kontamination innerhalb eines Laufes durch verunreinigte Reagenzien, *flow cells* oder einem fehlerhaften bioinformatischen *demultiplexing* der *barcodes*.

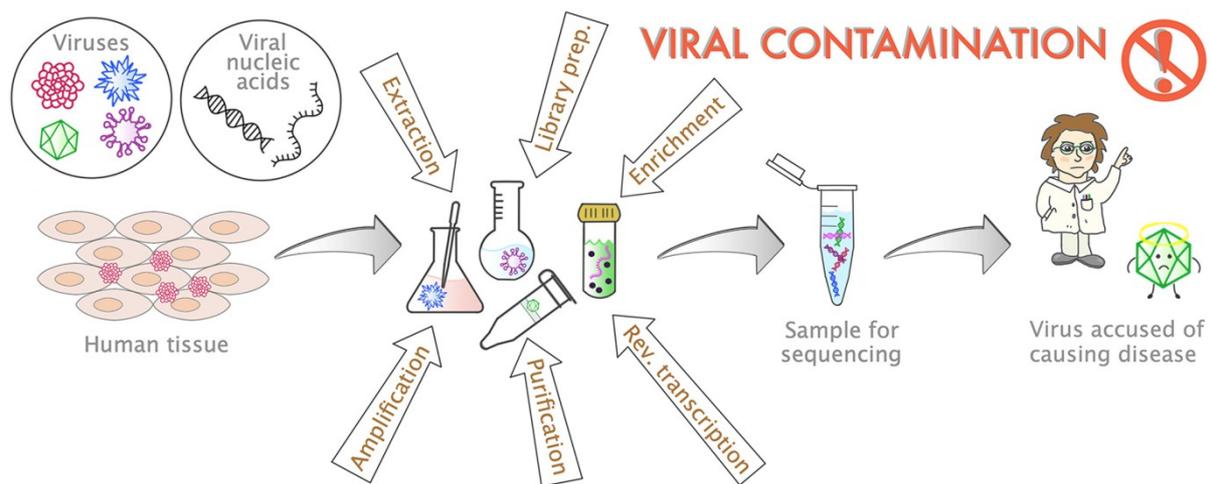


Abbildung 47: Virale und auch bakterielle Kontaminationen in Datensätzen einer Sequenzierung sind auf verschiedene Schritte der Probenvorbereitung zurückzuführen. Die Interpretation der bioinformatischen Ergebnisse ist daher von großer Bedeutung, Abbildung aus [243].

4.9. Kontaminationen bei der VAmPSeq-Methode

Wie bei der Illumina-Sequenzierung ist es auch bei MinION-Sequenzierungen möglich, die DNA der Proben mit *barcodes* zu markieren, sodass mehrere Proben in einem Lauf kombiniert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Sequenzierung von mehreren Proben auf einer *flow cell* zu Kreuz-Kontaminationen innerhalb der Proben kommen kann. Bei diesen kann es sich um Laborkontaminationen oder um bioinformatische Fehlzuordnung der *barcodes* handeln. Die Konzentration an Sequenzen einer Kontamination ist jedoch sehr gering und beträgt 0,0013 %–5,1 %. Dabei ist die Konzentration der Kontamination stark abhängig von der Konzentration der sequenzierten Probe, d.h. schwach konzentrierte Proben wie die Negativkontrolle sind mit Sequenzen einer hoch konzentrierten Probe kontaminiert. In einer Studie wurde ein Mittelwert an falsch zugeordneten *barcodes* bei einer MinION-Sequenzierung von 0,056 % ermittelt [251]. Für Illumina-Sequenzierungen beträgt die Kreuz-Kontamination hingegen 0,05 %–0,25 % [252, 253].

Es ist notwendig, für alle Sequenzierungen einen Schwellenwert (*threshold*) an Sequenzen zu setzen, unter dem die Diagnostik eines Virus ausgeschlossen wird. Dieser *threshold* würde aus den in der Literatur angegebenen Fehlraten für 100.000 sequenzierte *reads* bei 56 *reads* liegen. Ob sich die Konzentration einer Kontamination verringern lässt, ist fraglich, da es spätestens bei der *Library*-Präparation zu einer Arbeit mit zum Teil hoch konzentrierten Amplikons kommt.

4.10. Diagnostik pockenähnlicher Hautveränderungen – Studienproben

4.10.1. Viren

Mittels Metagenomsequenzierung konnten die viralen Erreger HSV1, MOCV und Orf-Virus in den Patientenproben identifiziert werden. Bei einigen Proben ist der Zusammenhang zwischen dem identifizierten Erreger, dem Erscheinungsbild der Hauteffloreszenzen sowie den übermittelten Informationen durch den behandelnden Arzt deutlich.

In Probe 35 konnte ein hoher Anteil von Sequenzen nachgewiesen werden, welche als Orf-Parapoxvirus identifiziert werden konnten. Diese Patientenprobe wurde auch für die Parapockendiagnostik (PPV) eingesandt und durch qPCR bestätigt. Aus dem Einsendeschein ging hervor, dass der Patient Kontakt zu Schafen hatte, was ebenfalls für eine durch Schafe und Ziegen übertragbare Infektion mit Orf-Virus sprach.

Den Proben 7, 29, 49, 50, 61 und 62 konnten Sequenzen von HSV1 zugeordnet und alle Ergebnisse konnten mit qPCR bestätigt werden. Probe 7 wurde für die Orthopocken- und Parapocken-Diagnostik eingesendet. Das Erscheinungsbild entsprach hingegen eher einer typischen Herpesinfektion und zeigte charakteristische flüssigkeitsgefüllte Vesikel im Gesicht des Kindes (Abbildung 12). Auch der niedrige CT-Wert von 22 sprach für eine Infektion mit HSV1.

Bei Probe 29 war das Erscheinungsbild der Herpesinfektion eher ungewöhnlich. Die Läsionen erschienen nicht als flüssigkeitsgefüllte Vesikel, sondern als Noduli (Abbildung 12). Es handelte sich vermutlich um einen *herpetic whitlow*, eine Infektion mit HSV1 oder HSV2, welche meist Daumen oder Indexfinger der Hand betrifft [254]. Der niedrige CT-Wert von 17,8 sprach für eine akute HSV1-Infektion. In der 16S-MinION-Sequenzierung konnten in derselben Probe zudem Sequenzen von *S. aureus* identifiziert werden. Die Probe wurde für die Diagnostik von Orthopockenviren, Parapockenviren sowie Herpesviren eingeschickt. Da bei dem Patienten Kontakt mit Kühen bekannt war, wurde vermutlich von einer Orthopockenvirus- oder Parapockenvirus-Infektion ausgegangen.

Auch bei dem Patienten, von dem die Proben 49 (CT 22) und 50 (CT 20) stammten, war ein Kontakt zu Rindern bekannt. Obwohl Kühe nicht mehr als typischer Wirt von Kuhpocken bekannt sind, wurden diese Proben zur Orthopockendiagnostik eingeschickt. Über das genaue Erscheinungsbild der Läsionen wurden keine Angaben gemacht.

Die Proben 61 und 62 stammten von einem Patienten, welcher Kontakt zu Katzen hatte. Die Läsionen wurden als „Ulzerationen an der Nase“ beschrieben und die Proben wurden ausschließlich zur Orthopockendiagnostik eingeschickt. Außerhalb der Schleimhäute im Gesicht auftretende Infektionen mit HSV1 treten häufig als wiederkehrende Ausbrüche einer latenten Infektion auf [255]. Vermutlich wurde auch hier aufgrund des Kontaktes mit einer Katze davon ausgegangen, dass es sich um eine Kuhpockeninfektion handelte, obwohl HSV der vermutliche Auslöser der pockenähnlichen Hautveränderung war. In der bakteriellen Mikrobiom-Sequenzierung konnten in beiden Proben zudem Sequenzen von *Stenotrophomonas maltophilia* identifiziert werden. Das Bakterium hat in den letzten Jahren in Bezug auf nosokomiale Infektionen an Bedeutung gewonnen und infiziert überwiegend den respiratorischen Trakt, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten [256].

4.10.2. Bakteriome

Der unspezifische Blick in das Metagenom ermöglicht neben der Detektion von Viren auch die simultane Analyse von Bakterien, Fungi und Parasiten.

Die Zusammensetzung der gesunden Hautflora ist höchst individuell und variiert sogar bei einzelnen Individuen je nach Körperregion, Zeitpunkt und äußeren Einflüssen [257, 258]. Obwohl überwiegend aus Propriobakterien, Corynebakterien und Staphylokokken bestehend, ist das gesunde Hautmikrobiom auch aus Bakterien zusammengesetzt, welche mit Hautinfektionen in Zusammenhang gebracht werden. Bei Hautinfektionen kommt es jedoch häufig zu einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung zugunsten der pathogenen Spezies [259]. Bei einer bakteriellen Infektion kommt es zu einer Invasion der Bakterien in die Haut und das unterliegende Gewebe (Skin and soft tissue infections, SSTI) [260].

Während *Staphylococcus epidermidis* (Probe 22 und Probe 34) ebenfalls ein Besiedler der gesunden Hautflora ist, stehen sowohl *S. aureus* (Probe 5, Probe 17) als auch *S. lugdenensis* (Probe 32) häufig in Zusammenhang mit chronischen Hautinfektionen und Abszessbildungen [261, 262]. Probe 32 wurde dabei bereits als MOCV-positiv identifiziert, eine bakterielle Ko-Infektion ist möglich. Auch *Pseudomonas aeruginosa* wird mit Hautinfektionen in Zusammenhang gebracht (Probe 13) [263]. Der Datensatz der Probe 28 besteht überwiegend aus Sequenzen der Spezies *Acinetobacter lwoffii* (23 %), die ebenfalls mit nosokomialen Infektionen in Zusammenhang steht [264].

Aus Probe 3 konnten Sequenzen von *Fingoldia magna* generiert werden, ein Erreger, welcher aus Patienten mit Gelenk- und Knocheninfektionen sowie aus nekrotisierenden Hautinfektionen isoliert wurde [265, 266]. Probe 37 konnte als *Escherichia coli* klassifiziert werden, welches häufig aus SSTIs isoliert wurde [267].

Die Behandlung mit Antibiotika ist für viele der Patienten in dieser Studie nicht dokumentiert. Es ist daher möglich, dass die Zusammensetzung des bakteriellen Mikrobioms eher eine Folge der Antibiotikabehandlung und kein die Hautläsionen verursachendes Ungleichgewicht der Hauterreger ist.

Als weiterer möglicher Bias der Mikrobiomanalyse ist die Nutzung eines Extraktionskits für RNA-Viren zu nennen. Obwohl dieses auch virale DNA sowie die DNA des Wirts und weiterer Organismen extrahiert, ist besonders bei Bakterien ein spezielles Extraktionsprotokoll von Vorteil. So besitzen viele Bakterien eine Zellwand, welche den meisten Extraktionsmethoden standhält [268, 269].

4.10.3. MinION-16S-Sequenzierung

Die klassische Detektion von bakteriellen Erregern beruht auf der Anzucht von Bakterien aus einer Patientenprobe und der anschließenden Sanger-Sequenzierung der 16S ribosomalen DNA [270]. Diese Region ist bei Bakterien konserviert, sodass die Primer auch Genomregionen unterschiedlicher Bakterienspezies abdecken; die Genomsequenz zwischen den Primern weist jedoch genügend Variationen auf, um die Bakterienspezies identifizieren zu können. Die vorherige Anzucht gewährleistet, dass nur replizierende Bakterien angezogen und identifiziert werden können.

Erst die Entwicklung der HTS hat es ermöglicht, mehrere Bakterienspezies einer Probe in einer 16S-PCR zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist wie bei der Shotgun-Metagenomsequenzierung kein durch eine Anzucht vereinzelt Bakterium, sondern stellt die gesamte bakterielle Zusammensetzung eines Bioms, wie z.B. des Mikrobioms der Haut, dar. Dabei wird nicht nur ein Erreger identifiziert, sondern auch die möglicherweise eine Krankheit hervorrufende Veränderung der gesamten Zusammensetzung des Mikrobioms.

Es konnte gezeigt werden, dass es zwischen der Illumina-Sequenzierung und der MinION-16S-Sequenzierung einige Übereinstimmungen gibt. Bei weiteren Proben unterschied sich die bakterielle Zusammensetzung des Ergebnisses der beiden Methoden jedoch signifikant. Es ist möglich, dass einige Proben aufgrund der bei einigen Patienten erfolgten Antibiotika-Behandlung für Bakterien negativ waren. Da es bei der 16S-PCR sowie bei der Metagenomsequenzierung zu einer Amplifikation der DNA in der Probe kommt, wird auch die kleinste Menge an DNA in einer Probe vermehrt. Daher kann es bei einer 16S-Sequenzierung leichter zu falsch-positiven Ergebnissen aus den Reagenzien der Extraktion und PCR, bei der Illumina-Sequenzierung zusätzlich aus Reagenzien der *Library*-Präparation kommen.

In einer Studie von Clooney et. al. wurde die *shotgun*- und 16S-Sequenzierung von Bakterien auf verschiedenen Sequenzierplattformen verglichen. Dabei konnten signifikante Unterschiede in den Ergebnissen gezeigt werden [271]. Besonders bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Primern der V1-V2-Region konnten Abweichungen der Spezies-Einordnung zu den weiteren Sequenzierungen gezeigt werden.

Zusammenfassend ließen sich weder durch die Metagenomsequenzierung noch durch die MinION-16S-Sequenzierung eindeutige Ergebnisse generieren. Man kann davon ausgehen, dass es mit beiden Methoden eingeschränkt möglich ist, ein in einer Probe vorhandenes Bakterium zu identifizieren, jedoch kommt es zu zahlreichen falsch-positiven sowie nicht relevanten Ergebnissen, sodass die Interpretation allgemein eine große Herausforderung darstellt.

4.10.4. Fungiome

Auffällig ist der hohe Anteil von Sequenzen der Fungi in den Proben asymptomatischer Haut der Metagenomanalyse dieser Studie. Fungi des Genus *Malassezia* sind kommensale Besiedler der Haut; die Populationsdichte ist in talgigen Körperregionen wie dem Gesicht besonders hoch und kann 10^4 Organismen je cm^2 betragen [272].

Zu dem Dermatophyten gehören vor allem die Genera *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton*, welche durch direkten oder indirekten Kontakt mit infizierten Menschen oder Tieren übertragen werden [273]. Sequenzen von *Trichophyton rubrum* konnten in der Patientenprobe 23 identifiziert werden (Abbildung 12). Die nach einer Schnittverletzung und Arbeiten in einer Metzgerei entstandene Hautveränderung ist dabei eher pockenuntypisch und entspricht den Abbildungen von *Trichophyton rubrum* verursachten Dermatophytosen aus der Literatur.

4.10.5. Nicht diagnostizierte Proben

Ein Großteil der Patientenproben konnte nicht diagnostiziert werden.

Es ist fraglich, ob diesen Läsionen eine Infektion zugrunde liegt oder andere Gründe wie Immun- oder Krebserkrankungen. Dafür spricht, dass die Erscheinungsbilder vieler der Hautläsionen eher pockenvirusuntypisch sind. Da die Progression einer Pockeneffloreszenz sehr unterschiedlich verlaufen und es auch zu ungewöhnlichen Ausprägungen kommen kann, wurden viele der Proben für die Diagnostik von Molluscipockenviren, Parapockenviren und Orthopockenviren von behandelnden Ärzten eingeschendet.

Möglich ist jedoch auch, dass den Hautläsionen eine Virus- oder Bakterieninfektion zugrunde liegt, diese jedoch nicht in der Metagenomsequenzierung identifiziert werden konnte. Dies kann an der geringen Sensitivität liegen, der Art der Probenentnahme, am Zeitpunkt der Probenentnahme sowie am Probenmaterial selbst.

Möglich ist auch, dass es sich bei den Infektionen um neuartige, noch nicht identifizierte Viren, Bakterien und Fungi handelt. Dafür spricht, dass ein großer Anteil des Metagenoms aus Sequenzen besteht, die nicht zugeordnet werden können (Abbildung 16). Da die Metagenomsequenzierung mittlerweile Routine in vielen Laboren ist, werden jedoch täglich neue virale und bakterielle Genomsequenzen den Datenbanken hinzugefügt, was die Wahrscheinlichkeit einer Detektion von neuartigen Erregern erhöht.

4.11. Vollgenomsequenzierung mittels PAmpliSeq

Die PAmpliSeq-Methode stellt eine Ergänzung zur VAmpliSeq-Methode dar und ermöglicht neben der Detektion auch die Vollgenomsequenzierung von Orthopockenviren. Ähnliche Ansätze einer Amplikon-basierten Sequenzierung mit dem MinION gibt es bereits für Influenza-, Ebola-, Lassa- und Zika-Virus, wobei es sich jedoch um vergleichsweise kleine Genome handelt, die mit nur wenigen Primerpaaren amplifiziert werden können [92, 94, 126, 162, 163].

Mittels der PAmpliSeq-Methode konnten die Genome der unterschiedlichen Orthopockenviren mit einer *coverage* von mindestens 97,9 % sequenziert werden. Die *in vitro coverage* stimmt dabei zu großen Teilen mit der errechneten *in silico coverage* überein. Jedoch sind Regionen, die *in silico* nicht abgedeckt sind, teilweise in niedriger *coverage* abgedeckt. Es ist daher wahrscheinlich, dass durch die Reaktionsbedingungen der PAmpliSeq-PCR teilweise mehr als zwei *mismatches* je Primer toleriert werden oder es zur Amplifizierung von längeren (> 800 bp) Amplikons kommt. Diese Regionen sind jedoch unterdurchschnittlich mit *reads* abgedeckt, was wiederum zu einer schlechteren Qualität der entsprechenden Region führt.

Im Vergleich zur PAmpliSeq-Methode ist die Illumina-Sequenzierung weniger sensitiv und ermöglicht keine Amplifikation mit hoher *coverage* von Genomen niedrig konzentrierter Viren. Bei der Sequenzierung von Viren in niedriger Konzentration wurde z.B. eine *coverage* von nur 23,7 % (Zika-Virus, CT 34, 0,003 % virale *reads*) oder 42,3 % (Enterovirus, CT 30) erreicht [126, 274].

Bei den Illumina-sequenzierten Proben dieser Studie konnte bei nur zwei Proben eine *coverage* der Genome von >90 % erreicht werden, bei drei weiteren Proben wurde eine *coverage* der Genome von 47,4 %, 16,6 % und nur 6,6 % erreicht. Auch die gering konzentrierte Probe (Cowpoxvirus Cepad 332) mit einem CT-Wert von 32 konnte hingegen mit PAmpliSeq mit hoher *coverage* sequenziert werden (vergleiche Illumina 16,6 %).

4.12. Zusammenfassung

Um eine Schnittstelle zwischen Metagenomsequenzierung, MinION-Sequenzierung und klassischer PCR zu bilden, wurde in dieser Arbeit die VAmplSeq (Virus Amplification based Sequencing)-Methode entwickelt. Ziel war es, die positiven Eigenschaften der Metagenomsequenzierung und der PCR zu kombinieren. Dazu zählen der Hypothese-freie Ansatz der Metagenomsequenzierung in die Probe und die Möglichkeit, auf mehrere Erreger gleichzeitig zu screenen, die Flexibilität und Geschwindigkeit der MinION Sequenzierung sowie die Sensitivität und Spezifität der PCR.

Zusammenfassend konnte durch die *in vitro*- sowie durch die *in silico*-Validierung des VAmplSeq-Assays gezeigt werden, dass sowohl die Amplifikation als auch die Sequenzierung verschiedener durch das Panel abgedeckter Viren erfolgreich ist. Dabei können auch Proben verschiedener Matrices eingesetzt werden. Die Detektionslimits der Methode sind vergleichbar mit denen konventioneller PCRs; nur wenige Minuten Sequenzierung reichen, um ausreichend Sequenzen für die Diagnostik eines Erregers zu generieren, und die Kreuz-Kontamination bei mehreren Proben ist gering. Somit ermöglicht die VAmplSeq-Methode ein sehr schnelles, sensitives Screening auf zahlreiche Erreger und parallel für mehrere Proben.

Im Vergleich zur Illumina-Sequenzierung ist die VAmplSeq-Methode daher sensitiver und schneller, weniger *reads* müssen generiert werden und die Sequenzierung von humaner DNA wird vermieden. Jedoch können auch nur virale Erreger detektiert werden, welche im Design des VAmplSeq-Assays berücksichtigt wurden. Die Detektion des neuartigen Squirrelpox-ähnlichen Virus war daher mit der VAmplSeq-Methode z.B. nicht möglich.

Um neben der Diagnostik und Differentialdiagnostik mittels VAmplSeq-Methode die MinION-Sequenzierung für weitere Anwendungen nutzen zu können, wurde die PAmplSeq-Methode entwickelt. Bei dieser Methode werden nicht nur kurze Regionen zur Identifizierung eines Erregers amplifiziert, sondern das gesamte Genom eines Orthopockenvirus. Dies ermöglicht die weitere Charakterisierung eines Virus, darunter die genaue Bestimmung des Stammes und die phylogenetische Einordnung.

5. Ausblick – VAmPSeq als Tool in der Routinediagnostik

HTS und die VAmPSeq-Methode haben das Potential, als Tool in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt zu werden.

Mittels HTS als hypothesefreie Methode wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Viren identifiziert, deren Detektion mit Standard-Diagnostikmethoden nicht gegeben war. Beispiele sind die Detektion von St.-Louis-Enzephalitis-Virus in CSF, Cache-Valley-Virus als Erreger einer Enzephalitis und Astrovirus bei einem Fall von Neuroleptospirose [275-277].

Dennoch ist die HTS als Methode noch immer ein Grenzfall zwischen Forschung und Diagnostik. Die Verlässlichkeit und Interpretation der Ergebnisse ist noch immer Gegenstand zahlreicher Diskussionen, und Richtlinien zur Standardisierung der Methode und Protokolle werden gefordert [278, 279].

Ob eine Methode wie HTS oder VAmPSeq Teil der Routinediagnostik wird, hängt von zahlreichen Voraussetzungen ab, von denen einige in dieser Studie bearbeitet und diskutiert wurden. Im Gegensatz zu HTS hat die VAmPSeq-Methode das Potential, alle der Voraussetzungen teilweise oder vollständig zu erfüllen.

- Die Spezifität und Sensitivität

Die Sensitivität der VAmPSeq-Methode ist mit der von spezifischen PCRs vergleichbar. Die Spezifität der Amplifikation von spezifischen viralen Genomregionen ist hoch. Obwohl die VAmPSeq-Methode damit keinen komplett „offenen“ Blick in die Probe bietet, ist der Einsatz der Primer skalierbar und bietet die Möglichkeit, nach zahlreichen Erregern in einer Probe screenen zu können. Theoretisch ist es dabei möglich, gesamte Virusfamilien mit nur einer PCR abzudecken oder ein Pan-Virus-VAmPSeq-Assay für alle bekannten Viren zu entwerfen. Neben dem VAmPSeq-Assay für pockenähnliche Hautveränderungen und dem PAmpliSeq-Assay wurden bereits weitere Assays entwickelt. Dazu gehören das Assay für hämorrhagische Fiebertypen, Enzephalitis auslösenden Viren, respiratorische Viren, gastrointestinale Erkrankungen, durch Mücken und Zecken übertragbare Viren sowie ein Assay für Erreger mit Bioterror-Relevanz.

Auch das Screening auf nicht-virale Erreger ist möglich. Die VAmPSeq-Assays für respiratorische und auch für Bioterror-relevante Erreger können bereits erfolgreich sowohl verschiedene Viren als auch Bakterien in nur einem Ansatz detektieren.

- Die Reproduzierbarkeit

Obwohl die Reproduzierbarkeit der Detektion eines Virus mit der VAmPSeq-Methode in Dreifachbestimmungen gezeigt werden konnte, gibt es Variationen der Ergebnisse. Dies betrifft

vor allem die Anzahl der generierten *reads* und die Geschwindigkeit der Sequenzierung, beides hauptsächlich abhängig von der Qualität der verwendeten *flow cell*. Hier ist es notwendig, das Ergebnis der Sequenzierung mit der Qualität und der Anzahl der aktiven Poren einer *flow cell* zu korrelieren, um Ergebnisse nicht über- oder unterzubewerten.

- Die Robustheit bei verschiedenen Probenarten

Es konnte gezeigt werden, dass die VAmPSeq-Methode bei verschiedenen Proben anwendbar ist, darunter Haut- und Rachenabstriche, Urin, Serum oder Gewebe. Das Verhältnis zwischen viraler und Hintergrund-DNA ist weniger relevant als bei der HTS, da virale Sequenzen spezifisch amplifiziert werden.

- Die Korrelation des Ergebnisses mit dem Erscheinungsbild der Erkrankung

Bei der HTS kann große Unsicherheit bei der Interpretation von Ergebnissen entstehen, da aus dem hypothesefreien Ansatz zahlreiche relevante und nicht relevante Ergebnisse generiert werden können. Die VAmPSeq-Methode umgeht diese Problematik, indem nur spezifische, mit einem bestimmten Krankheitsbild korrelierbare virale Erreger detektiert werden.

- Die Möglichkeit der Vereinheitlichung von Ergebnissen

Die Analyse mit dem VAmPSeeker und PAmpliSeeker vereinheitlicht die Ergebnisausgabe. So ist das Ergebnis für jede Diagnostik auch bei verschiedenen Nutzern einheitlich und bietet weniger Spielraum für möglicherweise falsche Interpretationen.

- Vergleichbarer Kosten- und Zeitaufwand mit etablierten Methoden

Die VAmPSeq-Methode inklusive Probenbearbeitung, PCR, Sequenzierung und Analyse ist für geübte Nutzer in etwa 4 Arbeitsstunden durchführbar. Für die Durchführung von spezifischen PCRs werden hingegen nur 1,5–2 Stunden benötigt. Die VAmPSeq-Methode hat jedoch den Vorteil, mehrere PCRs in einem Ansatz zu kombinieren, sodass der Zeitaufwand im Vergleich zu einer gesamten Diagnostik und Differentialdiagnostik wesentlich geringer ist.

Die Kosten für die MinION-Library-Präparation und Sequenzierung befinden sich für einen Sequenzierlauf im niedrigen dreistelligen Bereich.

- Anwendung von Qualitätsstandards

Qualitätsstandards während der Probenbearbeitung werden bei der VAmPSeq-Methode bislang nicht angewendet und müssen in Zukunft in die Methode integriert werden.

Dazu gehört vor allem die Anwendung von Extraktions- und Amplifikationskontrollen sowie Kontrollen bei der Sequenzierung. Auch die Mitführung von definierten Positiv- und Negativkontrollen muss etabliert werden.

Zusammenfassend ist VAmPSeq für pockenähnliche Hautveränderungen mittlerweile eine häufig angewandte ergänzende Methode zur Routinediagnostik im Konsiliarlabor für Pockenviren. Insbesondere bei negativ diagnostizierten Patientenproben kann die VAmPSeq-Methode die Differentialdiagnostik mit spezifischen PCRs und die Erregersuche mittels HTS ersetzen.

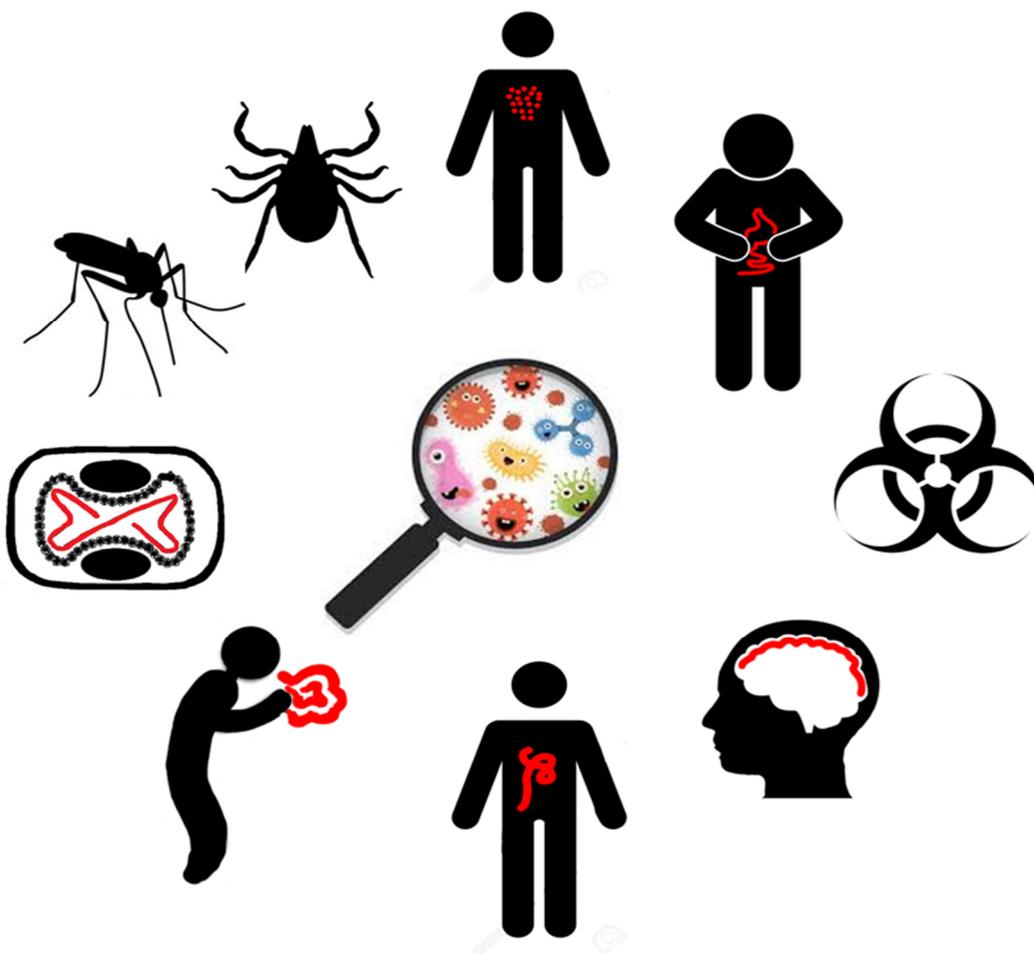


Abbildung 48: Für zahlreiche Fragestellungen wurden VAmPSeq-Diagnostik-Assays entwickelt; dazu gehören Assays für Enzephalitis, Gastroenteritis, Biowaffen, Hämorrhagische Fieber-Viren, respiratorische Erkrankungen sowie von Mücken und Zecken übertragbare Viren. Einige der Assays können nicht ausschließlich Viren, sondern zusätzlich spezifische Bakterien diagnostizieren.

Referenzen

1. Tulman, E.R., et al., *The genome of canarypox virus*. J Virol, 2004. **78**(1): p. 353-366.
2. Pauli, G., et al., *Orthopox Viruses: Infections in Humans*. Transfus Med Hemother, 2010. **37**(6): p. 351-364.
3. Modrow, S., et al., *Molecular Virology*. 2014. Berlin: Heidelberg: Springer.
4. World Health Organization. Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication & World Health Organization. *The global eradication of smallpox : final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, December 1979*. 1980, Geneva: World Health Organization.
5. Fenner, F., et al. *Smallpox and its eradication*. 1988. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39485>
6. Henderson, D.A. and I. Arita, *The smallpox threat: a time to reconsider global policy*. Biosecur Bioterror, 2014. **12**(3): p. 117-121.
7. Tegnell, A., B. Wahren, and F. Elgh, *Smallpox--eradicated, but a growing terror threat*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(8): p. 504-509.
8. Shchelkunov, S.N., *An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections*. PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003756.
9. Leggiadro, R.J., *Emergence of Monkeypox—West and Central Africa, 1970–2017* https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2018/07000/Emergence_of_Monkeypox_West_and_Central_Africa,21.aspx. Pediatr Infect Dis J, 2018. **37**(7): p. 721.
10. McCollum, A.M. and I.K. Damon, *Human monkeypox*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(2): p. 260-267.
11. Nitsche, A., L. Schrick, and L. Schaade, *Infektionen des Menschen mit Affenpocken*. Flugmedizin Tropenmedizin Reisemedizin - FTR, 2019. **26**(01): p. 18-24.
12. Doty, J.B., et al., *Assessing Monkeypox Virus Prevalence in Small Mammals at the Human-Animal Interface in the Democratic Republic of the Congo*. Viruses, 2017. **9**(10): pii: E283.
13. Ladnyj, I.D., P. Ziegler, and E. Kima, *A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo*. Bull World Health Organization, 1972. **46**(5): p. 593-597.
14. Eteng, W.-E., et al., *Notes from the Field: Responding to an Outbreak of Monkeypox Using the One Health Approach – Nigeria, 2017-2018*. MMWR 2018. **67**(37): p. 1040-1041.
15. Nigeria Centre For Disease Control: *An Update of Monkeypox Outbreak in Nigeria_310119_5.pdf*; Available from: <https://ncdc.gov.ng/diseases/sitreps/?cat=8&name=An%20Update%20of%20Monkeypox%20Outbreak%20in%20Nigeria>
16. Reed, K.D., et al., *The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere*. N Engl J Med, 2004. **350**(4): p. 342-350.
17. Vaughan, A., et al., *Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018*. Euro Surveill, 2018. **23**(38): p. 1800509.
18. Erez, N., et al., *Diagnosis of Imported Monkeypox, Israel, 2018*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(5): p. 980-983.
19. Jenner, E., E. Pearce, and W. Skelton, *An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox*. 1798, London: Printed, for the author, by Sampson Low, no. 7, Berwick Street, Soho : and sold by Law, Ave-Maria Lane ; and Murray and Highley, Fleet Street.
20. Chantrey, J., et al., *Cowpox: reservoir hosts and geographic range*. Epidemiol Infect, 1999. **122**(3): p. 455-460.
21. Hazel, S.M., et al., *A longitudinal study of an endemic disease in its wildlife reservoir: cowpox and wild rodents*. Epidemiol Infect, 2000. **124**(3): p. 551-562.
22. Campe, H., et al., *Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 777-780.
23. Switaj, K., et al., *Cowpox after a cat scratch - case report from Poland*. Ann Agric Environ Med, 2015. **22**(3): p. 456-458.

24. Ninove, L., et al., *Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 781-784.
25. Kurth, A., et al., *Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(4): p. 670-671.
26. Baxby, D., M. Bennett, and B. Getty, *Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases*. Br J Dermatol, 1994. **131**(5): p. 598-607.
27. Grönemeyer, L.-L., et al., *Generalised cowpox virus infection*. The Lancet, 2017. **390**(10104): p. 1769.
28. Gazzani, P., et al., *Fatal disseminated cowpox virus infection in an adolescent renal transplant recipient*. Pediatr Nephrol, 2016. **32**(3): p. 533-536.
29. Esparza, J., et al., *Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine*. Vaccine, 2017. **35**(52): p. 7222-7230.
30. Schrick, L., et al., *An Early American Smallpox Vaccine Based on Horsepox*. N Engl J Med, 2017. **377**(15): p. 1491-1492.
31. Esparza, J., A. Nitsche, and C.R. Damaso, *Beyond the myths: Novel findings for old paradigms in the history of the smallpox vaccine*. PLoS Pathog, 2018. **14**(7): p. e1007082.
32. Franco-Luiz, A.P.M., et al., *Spread of vaccinia virus to cattle herds, Argentina, 2011*. Emerg Infect Dis, 2014. **20**(9): p. 1576-1578.
33. Usme-Ciro, J.A., et al., *Detection and Molecular Characterization of Zoonotic Poxviruses Circulating in the Amazon Region of Colombia, 2014*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(4): p. 649-653.
34. Franco-Luiz, A.P., et al., *Detection of Vaccinia Virus in Dairy Cattle Serum Samples from 2009, Uruguay*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(12): p. 2174-2177.
35. Oliveira, J.S., et al., *Vaccinia Virus Natural Infections in Brazil: The Good, the Bad, and the Ugly*. Viruses, 2017. **9**(11): pii: E340.
36. Abrahao, J.S., et al., *Outbreak of severe zoonotic vaccinia virus infection, Southeastern Brazil*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(4): p. 695-698.
37. Trindade, G.S., et al., *Brazilian vaccinia viruses and their origins*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(7): p. 965-972.
38. Drumond, B.P., et al., *Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain*. Microbes Infect, 2008. **10**(2): p. 185-197.
39. Damaso, C.R., et al., *An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine*. Virology, 2000. **277**(2): p. 439-449.
40. Ramdass, P., S. Mullick, and H.F. Farber, *Viral Skin Diseases*. Prim Care, 2015. **42**(4): p. 517-567.
41. Wolff, K., Johnson, R. A., Suurmond, D., & Fitzpatrick, T. B., *Fitzpatrick's color atlas and synopsis of clinical dermatology*. Seventh Ed. 2005: New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division.
42. Buttner, M. and H.J. Rziha, *Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002. **49**(1): p. 7-16.
43. Urkin, J., *Skin reaction following immunization with smallpox vaccine: a personal perspective*. Cutis, 2003. **72**(1): p. 43-46.
44. Chen, X., A.V. Anstey, and J.J. Bugert, *Molluscum contagiosum virus infection*. The Lancet Infect Dis, 2013. **13**(10): p. 877-888.
45. Henderson, D.A., *Smallpox: clinical and epidemiologic features*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(4): p. 537-539.
46. Diven, D.G., *An overview of poxviruses*. J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(1): p. 1-16.
47. Hunnskaar, S., *Giant orf in a patient with chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Dermatol, 1986. **114**(5): p. 631-634.
48. Meza-Romero, R., C. Navarrete-Dechent, and C. Downey, *Molluscum contagiosum: an update and review of new perspectives in etiology, diagnosis, and treatment*. Clin Cosmet Invest Dermatol, 2019. **12**: p. 373-381.

49. Berger, E.M., et al., *Experience with molluscum contagiosum and associated inflammatory reactions in a pediatric dermatology practice: the bump that rashes*. Arch Dermatol, 2012. **148**(11): p. 1257-1264.
50. Basu, S. and A. Kumar, *Giant Molluscum contagiosum – A clue to the diagnosis of Human Immunodeficiency Virus infection*. J Epidemiol Global Health, 2013. **3**(4): p. 289-291.
51. Husak, R., C. Garbe, and C.E. Orfanos, *Mollusca contagiosa bei HIV-Infektion. Klinische Manifestation, Beziehung zum Immunstatus und prognostische Wertigkeit bei 39 Patienten*. Der Hautarzt, 1997. **48**(2): p. 103-109.
52. Keighley, C.L., et al., *Viral exanthems*. Curr Opin Infect Dis, 2015. **28**(2): p. 139-150.
53. Kadambari, S. and S. Segal, *Acute viral exanthems*. Medicine, 2017. **45**(12): p. 788-793.
54. Di Lernia, V. and Y. Mansouri, *Epstein-Barr virus and skin manifestations in childhood*. Int J Dermatol, 2013. **52**(10): p. 1177-1184.
55. Bernard, H.U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-79.
56. Cubie, H.A., *Diseases associated with human papillomavirus infection*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 21-34.
57. Kurth, A. and A. Nitsche, *Detection of human-pathogenic poxviruses*. Methods Mol Biol, 2011. **665**: p. 257-278.
58. McCarthy, K. and K.R. Dumbell, *Chorioallantoic inoculation of eggs: an improved method*. Virology, 1961. **14**: p. 488-489.
59. Boonham, N., et al., *Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing*. Virus Res, 2014. **186**: p. 20-31.
60. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
61. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
62. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1211-1213.
63. Baltimore, D., *Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses*. Nature, 1970. **226**(5252): p. 1209-1211.
64. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10**(4): p. 413-417.
65. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7276-7280.
66. Sanchez-Seco, M.P., et al., *Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification*. J Virol Methods, 2005. **126**(1-2): p. 101-109.
67. Sánchez-Seco, M.P., et al., *A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus*. J Virol Methods, 2001. **95**(1): p. 153-161.
68. Avellón, A., et al., *Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction*. J Virol Methods, 2001. **92**(2): p. 113-120.
69. Shi, X., et al., *Simultaneous detection of 13 viruses involved in meningoencephalitis using a newly developed multiplex PCR Mag-array system*. Int J Infect Dis, 2016. **49**: p. 80-86.
70. Das, S., et al., *A Multiplex PCR/LDR Assay for the Simultaneous Identification of Category A Infectious Pathogens: Agents of Viral Hemorrhagic Fever and Variola Virus*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138484.
71. Elnifro, E.M., et al., *Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(4): p. 559-570.
72. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
73. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>.

74. van Nimwegen, K.J., et al., *Is the \$1000 Genome as Near as We Think? A Cost Analysis of Next-Generation Sequencing*. Clin Chem, 2016. **62**(11): p. 1458-1464.
75. 1000 Genomes Project Consortium, et al., *A global reference for human genetic variation*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 68-74.
76. Gudbjartsson, D.F., et al., *Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 435-444.
77. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
78. Datta, S., et al., *Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses*. World J Virol, 2015. **4**(3): p. 265-276.
79. <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/novaseq/specifications.html>.
80. Goodwin, S., J.D. McPherson, and W.R. McCombie, *Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(6): p. 333-351.
81. Head, S.R., et al., *Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges*. Biotechniques, 2014. **56**(2): p. 61-4, 66, 68, passim.
82. Illumina, *Nextera XT Library Prep Kit reference guide*. Available from: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf.
83. Illumina, *Patterned Flow Cell Technology*. Available from: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/patterned-flow-cell-technology-technical-note-770-2015-010.pdf>.
84. Illumina, *Illumina Sequencing Technology*. Available from: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.
85. Payne, A., et al., *BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files*. Bioinformatics, 2019. **35**(13): p. 2193-2198.
86. Greninger, A.L., et al., *Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis*. Genome Med, 2015. **7**: p. 99.
87. Mikheyev, A.S. and M.M. Tin, *A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer*. Mol Ecol Resour, 2014. **14**(6): p. 1097-1102.
88. Lu, H., F. Giordano, and Z. Ning, *Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(5): p. 265-279.
89. Gardy, J., N.J. Loman, and A. Rambaut, *Real-time digital pathogen surveillance – the time is now*. Genome Biol, 2015. **16**(1): p. 155.
90. Oxford Nanopore; *Genomic DNA by Ligation (SQK-LSK109) Guide*. Available from: https://community.nanoporetech.com/protocols/gDNA-sqk-lsk109/v/GDE_9063_v109_revQ_14Aug2019.
91. Oxford Nanopore; *Rapid Sequencing (SQK-RAD004) Guide*. Available from: https://community.nanoporetech.com/protocols/rapid-sequencing-sqk-rad004/v/RSE_9046_v1_revM_14Aug2019.
92. Quick, J., et al., *Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance*. Nature, 2016. **530**(7589): p. 228-232.
93. Mbala-Kingebeni, P., et al., *Rapid Confirmation of the Zaire Ebola Virus in the Outbreak of the Equateur Province in the Democratic Republic of Congo: Implications for Public Health Interventions*. Clin Infect Dis, 2019. **68**(2): p. 330-333.
94. Kafetzopoulou, L.E., et al., *Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak*. Science, 2019. **363**(6422): p. 74.
95. Johnson, S.S., et al., *Real-Time DNA Sequencing in the Antarctic Dry Valleys Using the Oxford Nanopore Sequencer*. J Biomol Tech, 2017. **28**(1): p. 2-7.
96. Sutton, M.A., et al., *Radiation Tolerance of Nanopore Sequencing Technology for Life Detection on Mars and Europa*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 5370.

97. Ip, C.L.C., et al., *MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis*. F1000Res, 2015. **4**: p. 1075.
98. Jain, M., et al., *The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 239.
99. Kulski, J.K., *Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications*. 2016. Croatia: InTech.
100. Hugenholtz, P. and G.W. Tyson, *Metagenomics*. Nature, 2008. **455**(7212): p. 481-483.
101. Tully, B.J., E.D. Graham, and J.F. Heidelberg, *The reconstruction of 2,631 draft metagenome-assembled genomes from the global oceans*. Sci Data, 2018. **5**: p. 170203.
102. Hendriksen, R.S., et al., *Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1124.
103. Xiao, P., et al., *Metagenomic Sequencing From Mosquitoes in China Reveals a Variety of Insect and Human Viruses*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 364.
104. Delwart, E.L., *Viral metagenomics*. Rev Med Virol, 2007. **17**(2): p. 115-131.
105. Edridge, A.W.D., et al., *Viral Metagenomics on Cerebrospinal Fluid*. Genes (Basel), 2019. **10**(5).
106. Barzon, L., et al., *Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology*. J Clin Virol, 2013. **58**(2): p. 346-350.
107. Grard, G., et al., *A novel rhabdovirus associated with acute hemorrhagic fever in central Africa*. PLoS Pathog, 2012. **8**(9): p. e1002924.
108. Briese, T., et al., *Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000455.
109. Hoffmann, B., et al., *A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis*. N Engl J Med, 2015. **373**(2): p. 154-162.
110. Imai, K., et al., *Whole Genome Sequencing of Influenza A and B Viruses With the MinION Sequencer in the Clinical Setting: A Pilot Study*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2748.
111. Kafetzopoulou, L.E., et al., *Assessment of Metagenomic MinION and Illumina sequencing as an approach for the recovery of whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples*. bioRxiv, 2018: p. 355560.
112. Lewandowski, K., et al., *Metagenomic Nanopore sequencing of influenza virus direct from clinical respiratory samples*. J Clin Microbiol, 2019. **58**(1): pii: e00963-19.
113. Scharschmidt, T.C. and M.A. Fischbach, *What Lives On Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities Of the Skin Microbiome*. Drug Discov Today Dis Mech, 2013. **10**(3-4): pii: e83-e89.
114. Belkaid, Y. and J.A. Segre, *Dialogue between skin microbiota and immunity*. Science, 2014. **346**(6212): p. 954.
115. Byrd, A.L., Y. Belkaid, and J.A. Segre, *The human skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2018. **16**(3): p. 143-155.
116. Toland, A.E., et al., *Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing*. PLoS ONE, 2012. **7**(6): p. e38499.
117. Wylie, K.M., et al., *Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults*. BMC Biology, 2014. **12**(1): p. 71.
118. Bzhalava, D., et al., *Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5807.
119. Kohl, C., et al., *Protocol for metagenomic virus detection in clinical specimens*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(1): p. 48-57.
120. Hall, R.J., et al., *Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery*. J Virol Methods, 2014. **195**: p. 194-204.
121. Briese, T., et al., *Virome Capture Sequencing Enables Sensitive Viral Diagnosis and Comprehensive Virome Analysis*. mBio, 2015. **6**(5): p. e01491-15.
122. Wylie, T.N., et al., *Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture*. Genome Res, 2015. **25**(12): p. 1910-1920.
123. Karamitros, T. and G. Magiorkinis, *A novel method for the multiplexed target enrichment of MinION next generation sequencing libraries using PCR-generated baits*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(22): p. e152-e152.

124. Paskey, A.C., et al., *Enrichment post-library preparation enhances the sensitivity of high-throughput sequencing-based detection and characterization of viruses from complex samples*. BMC Genomics, 2019. **20**(1): p. 155.
125. Reyes, G.R. and J.P. Kim, *Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations*. Mol Cell Probes, 1991. **5**(6): p. 473-481.
126. Quick, J., et al., *Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples*. Nat Protoc, 2017. **12**(6): p. 1261-1276.
127. Andrews, S., *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. 2010. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
128. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-2120.
129. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-1760.
130. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. Nat Methods, 2012. **9**(4): p. 357-359.
131. Bankevich, A., et al., *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. J Comput Biol, 2012. **19**(5): p. 455-477.
132. Zerbino, D.R. and E. Birney, *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs*. Genome Res, 2008. **18**(5): p. 821-829.
133. Buchfink, B., C. Xie, and D.H. Huson, *Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND*. Nat Methods, 2015. **12**(1): p. 59-60.
134. Wood, D.E. and S.L. Salzberg, *Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments*. Genome Biology, 2014. **15**(3): p. R46.
135. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-410.
136. Edgar, R.C., *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST*. Bioinformatics, 2010. **26**(19): p. 2460-1.
137. Scheuch, M., D. Hoper, and M. Beer, *RIEMS: a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets*. BMC Bioinformatics, 2015. **16**: p. 69.
138. Vilsker, M., et al., *Genome Detective: An Automated System for Virus Identification from High-throughput sequencing data*. Bioinformatics, 2018. **35**(5): p. 871-873
139. Andrusch, A., et al., *PAIPline: pathogen identification in metagenomic and clinical next generation sequencing samples*. Bioinformatics, 2018. **34**(17): p. i715-i721.
140. Jain, M., et al., *Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer*. Nat Methods, 2015. **12**(4): p. 351-356.
141. Oxford Nanopore Technologies, *EPI2ME platform Protocol; Available from https://community.nanoporetech.com/protocols/epi2me/v/MTE_1014_v1_revAW_11Apr2016*. 2019.
142. Oxford Nanopore Technologies, *Guppy Protocol; Available from: https://community.nanoporetech.com/protocols/Guppy-protocol/v/GPB_2003_v1_revN_14Dec2018*. 2018.
143. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. Nature Methods, 2012. **9**(4): p. 357-359.
144. Huson, D.H., et al., *MEGAN analysis of metagenomic data*. Genome Res, 2007. **17**(3): p. 377-386.
145. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
146. Wu, Y. and A. Wu, *Taguchi methods for robust design*. 2000. New York: ASME Press.
147. Brinkmann, A., et al., *Development and preliminary evaluation of a multiplexed amplification and next generation sequencing method for viral hemorrhagic fever diagnostics*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(11): p. e0006075.
148. Kohl, C., A. Nitsche, and A. Kurth, *Metagenomics-driven Virome: Current Procedures and New Additions*. Br J Virol, 2016. **2**(6): p. 96-101..

149. Allen, U.D., et al., *The genetic diversity of Epstein-Barr virus in the setting of transplantation relative to non-transplant settings: A feasibility study*. *Pediatr Transplant*, 2016. **20**(1): p. 124-129.
150. Matranga, C.B., et al., *Enhanced methods for unbiased deep sequencing of Lassa and Ebola RNA viruses from clinical and biological samples*. *Genome Biol*, 2014. **15**(11): p. 519.
151. Calvet, G., et al., *Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study*. *The Lancet Infect Dis*, 2016. **16**(6): p. 653-660.
152. Simner, P.J., S. Miller, and K.C. Carroll, *Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases*. *Clin Infect Dis*, 2017. **66**(5): p. 778-788.
153. Huang, B., et al., *Illumina sequencing of clinical samples for virus detection in a public health laboratory*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 5409.
154. Konet, D.S., et al., *Inhibitors of RT-PCR in serum*. *J Virol Methods*, 2000. **84**(1): p. 95-98.
155. Schrader, C., et al., *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal*. *J Appl Microbiol*, 2012. **113**(5): p. 1014-1026.
156. Depledge, D.P., et al., *Specific capture and whole-genome sequencing of viruses from clinical samples*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27805.
157. Parras-Molto, M., et al., *Evaluation of bias induced by viral enrichment and random amplification protocols in metagenomic surveys of saliva DNA viruses*. *Microbiome*, 2018. **6**(1): p. 119.
158. Prakoso, D., et al., *Viral Enrichment Methods Affect the Detection but Not Sequence Variation of West Nile Virus in Equine Brain Tissue*. *Front Vet Sci*, 2018. **5**: p. 318.
159. Gitman, M.R., D. Ferguson, and M.L. Landry, *Comparison of Simplex HSV 1 & 2 PCR with culture, immunofluorescence, and laboratory-developed TaqMan PCR for detection of herpes simplex virus in swab specimens*. *J Clin Microbiol*, 2013. **51**(11): p. 3765-3769.
160. Batovska, J., et al., *Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing*. *J Virol Methods*, 2017. **249**: p. 79-84.
161. Tan, S., C.M.T. Dvorak, and M.P. Murtaugh, *Rapid, Unbiased PRRSV Strain Detection Using MinION Direct RNA Sequencing and Bioinformatics Tools*. *Viruses*, 2019. **11**(12): pii: E1132.
162. Wang, J., et al., *MinION nanopore sequencing of an influenza genome*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 766.
163. Hoenen, T., et al., *Nanopore Sequencing as a Rapidly Deployable Ebola Outbreak Tool*. *Emerging Infectious Diseases*, 2016. **22**(2): p. 331-334.
164. Dieffenbach, C., T. Lowe, and G. Dveksler, *General concepts for PCR primer design*. *PCR Methods Appl*, 1993. **3**(3): p. S30-37.
165. Singh, V.K., et al., *The effect of hairpin structure on PCR amplification efficiency*. *Mol Biol Today*, 2000. **1**(3): p. 67-69.
166. Kwok, S., et al., *Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(4): p. 999-1005.
167. Drosten, C., et al., *Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR*. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(7): p. 2323-2330.
168. Vieth, S., et al., *RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007. **101**(12): p. 1253-1264.
169. Drake, J.W. and J.J. Holland, *Mutation rates among RNA viruses*. *Proc Nat Acad Sci*, 1999. **96**(24): p. 13910-13913.
170. Gubser, C., et al., *Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 1): p. 105-117.
171. Nitsche, A., et al., *Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA*. *Clin Chem*, 2006. **52**(2): p. 316-319.

172. Schroeder, K. and A. Nitsche, *Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses*. Mol Cell Probes, 2010. **24**(2): p. 110-113.
173. Klein, G., *Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus*. Cell, 1989. **58**(1): p. 5-8.
174. Anagnostopoulos, I., et al., *Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus*. Blood, 1995. **85**(3): p. 744-750.
175. Sanguenza-Acosta, M. and E. Sandoval-Romero, *Epstein-Barr virus and skin*. An Bras Dermatol, 2018. **93**(6): p. 786-799.
176. Gequelin, L.C., et al., *Epstein-Barr virus: general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2011. **33**(5): p. 383-388.
177. Morgan, M.K., et al., *A patient with Fever and rash*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(1): p. 95, 136-137.
178. Caputo, R., et al., *Gianotti-Crosti syndrome: a retrospective analysis of 308 cases*. J Am Acad Dermatol, 1992. **26**(2 Pt 1): p. 207-210.
179. Basson, V. and A.A. Sharp, *Monospot: a differential slide test for infectious mononucleosis*. J Clin Pathol, 1969. **22**(3): p. 324-325.
180. Kukhta, A.L. and J.F. Jones, *Systemic Epstein Barr Virus (EBV) Infection with Skin and Joint Involvement in an Immunocompromised Patient*. Pediatr Res, 1999. **45**(7): p. 166-166.
181. Patrizi, A., et al., *Papular and papulovesicular acrolocated eruptions and viral infections*. Pediatr Dermatol, 1990. **7**(1): p. 22-26.
182. Kimura, H., et al., *Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(1): p. 132-136.
183. Anderson, M.J., et al., *An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection*. J Hyg (Lond), 1984. **93**(1): p. 85-93.
184. Alfadley, A., et al., *Papular-purpuric "gloves and socks" syndrome in a mother and daughter*. J Am Acad Dermatol, 2003. **48**(6): p. 941-944.
185. Young, N.S. and K.E. Brown, *Parvovirus B19*. N Engl J Med, 2004. **350**(6): p. 586-597.
186. Woolf, A.D., et al., *Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults*. Arch Intern Med, 1989. **149**(5): p. 1153-1156.
187. Zerbini, M., et al., *Diagnostic procedures in B19 infection*. Pathologie Biologie, 2002. **50**(5): p. 332-338.
188. Anderson, M.J., et al., *Experimental Parvoviral Infection in Humans*. J Infect Dis, 1985. **152**(2): p. 257-265.
189. Zhang, Y.Z., M. Shi, and E.C. Holmes, *Using Metagenomics to Characterize an Expanding Virosphere*. Cell, 2018. **172**(6): p. 1168-1172.
190. Scholz, J., et al., *Epidemiology of molluscum contagiosum using genetic analysis of the viral DNA*. J Med Virol, 1989. **27**(2): p. 87-90.
191. Loka, T.P., et al., *PriLive: privacy-preserving real-time filtering for next-generation sequencing*. Bioinformatics, 2018. **34**(14): p. 2376-2383.
192. Schowalter, R.M., et al., *Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin*. Cell Host & Microbe, 2010. **7**(6): p. 509-515.
193. Hehir-Kwa, J.Y., et al., *Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing*. Eur J Hum Genet, 2015. **23**(12): p. 1601-1606.
194. Lantos, J.D., M. Artman, and S.F. Kingsmore, *Ethical considerations associated with clinical use of next-generation sequencing in children*. J Pediatr, 2011. **159**(6): p. 879-880 e1.
195. McCombie, W.R. and J.D. McPherson, *Future Promises and Concerns of Ubiquitous Next-Generation Sequencing*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019. **9**(9): pii: a025783.
196. Bruemmer, C.M., et al., *Epidemiology of squirrelpox virus in grey squirrels in the UK*. Epidemiol Infect, 2010. **138**(7): p. 941-950.
197. Sainsbury, A.W., et al., *Poxviral disease in red squirrels *Sciurus vulgaris* in the UK: spatial and temporal trends of an emerging threat*. Ecohealth, 2008. **5**(3): p. 305-316.

198. Chantrey, J., et al., *The drivers of squirrelpox virus dynamics in its grey squirrel reservoir host*. *Epidemics*, 2019. **28**: p. 100352.
199. Himsworth, C.G., et al., *Poxvirus infection in an American red squirrel (*Tamiasciurus hudsonicus*) from northwestern Canada*. *J Wildl Dis*, 2009. **45**(4): p. 1143-1149.
200. Obon, E., et al., *Poxvirus identified in a red squirrel (*Sciurus vulgaris*) from Spain*. *Vet Rec*, 2011. **168**(3): p. 86.
201. Wibbelt, G., et al., *Berlin Squirrelpox Virus, a New Poxvirus in Red Squirrels, Berlin, Germany*. *Emerg Infect Dis*, 2017. **23**(10): p. 1726-1729.
202. Sainsbury, T. and L. Ward, *Parapoxvirus infection in red squirrels*. *Vet Rec*, 1996. **138**(16): p. 400.
203. McInnes, C.J., et al., *Genomic characterization of a novel poxvirus contributing to the decline of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the UK*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 8): p. 2115-2125.
204. Haenssle, H.A., et al., *Orthopoxvirus infection transmitted by a domestic cat*. *J Am Acad Dermatol*, 2006. **54**(2 Suppl): p. S1-4.
205. Kaysser, P., et al., *Genetic diversity of feline cowpox virus, Germany 2000-2008*. *Vet Microbiol*, 2010. **141**(3-4): p. 282-288.
206. Goldsmith, C.S., et al., *Emergence of Previously Unknown Poxviruses*. *Microsc Microanal*, 2016. **22**(S3): p. 1184-1185.
207. Gigante, C.M., et al., *Genome of Alaskapox Virus, A Novel Orthopoxvirus Isolated from Alaska*. *Viruses*, 2019. **11**(8): pii: E708.
208. Gruber, C.E.M., et al., *Whole Genome Characterization of Orthopoxvirus (OPV) Abatino, a Zoonotic Virus Representing a Putative Novel Clade of Old World Orthopoxviruses*. *Viruses*, 2018. **10**(10): pii: E546.
209. Vora, N.M., et al., *Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(13): p. 1223-1230.
210. Hoffmann, D., et al., *Out of the Reservoir: Phenotypic and Genotypic Characterization of a Novel Cowpox Virus Isolated from a Common Vole*. *J Virol*, 2015. **89**(21): p. 10959-10969.
211. Lakis, N.S., et al., *Novel Poxvirus Infection in an Immune Suppressed Patient*. *Clin Infect Dis*, 2015. **61**(10): p. 1543-1548.
212. Hodo, C.L., et al., *Novel Poxvirus in Proliferative Lesions of Wild Rodents in East Central Texas, USA*. *Emerg Infect Dis*, 2018. **24**(6): p. 1069-1072.
213. O'Dea, M.A., et al., *Genomic characterization of a novel poxvirus from a flying fox: evidence for a new genus?* *J Gen Virol*, 2016. **97**(9): p. 2363-2375.
214. Roess, A.A., et al., *Novel deer-associated parapoxvirus infection in deer hunters*. *New England Journal of Medicine*, 2010. **363**(27): p. 2621-2627.
215. Airas, N., et al., *Infection with possible novel parapoxvirus in horse, Finland, 2013*. *Emerg Infect Dis*, 2016. **22**(7): p. 1242.
216. Osadebe, L.U., et al., *Novel Poxvirus Infection in 2 Patients From the United States*. *Clin Infect Dis*, 2014. **60**(2): p. 195-202.
217. Roess, A.A., et al., *Novel Deer-Associated Parapoxvirus Infection in Deer Hunters*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(27): p. 2621-2627.
218. Osadebe, L.U., et al., *Novel poxvirus infection in 2 patients from the United States*. *Clin Infect Dis*, 2015. **60**(2): p. 195-202.
219. Woese, C.R., *Bacterial evolution*. *Microbiol Rev*, 1987. **51**(2): p. 221-271.
220. Li, Y., et al., *GC content-based pan-pox universal PCR assays for poxvirus detection*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(1): p. 268-276.
221. Anis, E., et al., *Evaluation of Targeted Next-Generation Sequencing for Detection of Bovine Pathogens in Clinical Samples*. *J Clin Microbiol*, 2018. **56**(7): pii: e00399-18.
222. Gardner, S.N., et al., *Targeted amplification for enhanced detection of biothreat agents by next-generation sequencing*. *BMC Res Notes*, 2015. **8**: p. 682.
223. Kämpke, T., M. Kieninger, and M. Mecklenburg, *Efficient primer design algorithms*. *Bioinformatics*, 2001. **17**(3): p. 214-225.

224. Brinkmann, A., et al., *Proficiency Testing of Virus Diagnostics Based on Bioinformatics Analysis of Simulated In Silico High-Throughput Sequencing Data Sets*. J Clin Microbiol, 2019. **57**(8): pii: e00466-19.
225. Shi, M., et al., *Redefining the invertebrate RNA virosphere*. Nature, 2016. **540**(7634): p. 539-543.
226. Shi, M., et al., *Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses*. J Virol, 2016. **90**(2): p. 659-669.
227. Shu, Y. and J. McCauley, *GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality*. Eurosurveillance, 2017. **22**(13): p. 30494.
228. Druce, M., et al., *Improving HIV proteome annotation: new features of BioAfrica HIV Proteomics Resource*. Database, 2016. **2016**: pii: baw045.
229. Pickett, B.E., et al., *ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research*. Nucleic Acids Research, 2011. **40**(D1): p. D593-D598.
230. Ibrahim, B., et al., *A new era of virus bioinformatics*. Virus Research, 2018. **251**: p. 86-90.
231. Hufsky, F., et al., *Virologists—Heroes need weapons*. PLOS Pathog, 2018. **14**(2): p. e1006771.
232. Junier, T., et al., *Viral Metagenomics in the Clinical Realm: Lessons Learned from a Swiss-Wide Ring Trial*. Genes (Basel), 2019. **10**(9): pii: E655.
233. Vashist, S.K., *Point-of-Care Diagnostics: Recent Advances and Trends*. Biosensors (Basel), 2017. **7**(4): pii: E62.
234. Juul, S., et al., *What's in my pot? Real-time species identification on the MinION™*. bioRxiv, 2015: p. 030742.
235. Cao, M.D., et al., *Realtime analysis and visualization of MinION sequencing data with npReader*. Bioinformatics, 2015. **32**(5): p. 764-766.
236. Watson, M., et al., *poRe: an R package for the visualization and analysis of nanopore sequencing data*. Bioinformatics, 2014. **31**(1): p. 114-115.
237. Deshpande, et al., *Offline Next Generation Metagenomics Sequence Analysis Using MinION Detection Software (MINDS)*. Genes, 2019. **10**(8): p. 578.
238. Kim, D., et al., *Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences*. Genome Res, 2016. **26**(12): p. 1721-1729.
239. Holmes, E.C., *Reagent contamination in viromics: all that glitters is not gold*. Clin Microbiol Infect, 2019. **25**(10): p. 1167-1168.
240. Laurence, M., C. Hatzis, and D.E. Brash, *Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97876.
241. Naccache, S.N., et al., *The perils of pathogen discovery: Origin of a novel parvovirus-like hybrid genome traced to nucleic acid extraction spin columns*. J Virol, 2013. **87**(22): p. 11966-11977.
242. Smuts, H., et al., *Novel Hybrid Parvovirus-Like Virus, NIH-CQV/PHV, Contaminants in Silica Column-Based Nucleic Acid Extraction Kits*. J Virol, 2014. **88**(2): p. 1398-1398.
243. Asplund, M., et al., *Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: a linkage study of 700 sequencing libraries*. Clin Microbiol Infect, 2019. **25**(10): p. 1277-1285.
244. Lombardi, V.C., et al., *Detection of an Infectious Retrovirus, XMRV, in Blood Cells of Patients with Chronic Fatigue Syndrome*. Science, 2009. **326**(5952): p. 585-589.
245. Lo, S.-C., et al., *Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors*. Proc Nat Acad Sci, 2010. **107**(36): p. 15874-15879.
246. Schlaberg, R., et al., *XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors*. Proc Nat Acad Sci, 2009. **106**(38): p. 16351-16356.
247. Yolken, R.H., et al., *Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice*. Proc Nat Acad Sci, 2014. **111**(45): p. 16106-16111.

248. Xu, B., et al., *Hybrid DNA virus in Chinese patients with seronegative hepatitis discovered by deep sequencing*. Proc Nat Acad Sci, 2013. **110**(25): p. 10264-10269.
249. Fievet, A., et al., *ART-DeCo: easy tool for detection and characterization of cross-contamination of DNA samples in diagnostic next-generation sequencing analysis*. Eur J Hum Genet, 2019. **27**(5): p. 792-800.
250. Sangiovanni, M., et al., *From trash to treasure: detecting unexpected contamination in unmapped NGS data*. BMC Bioinformatics, 2019. **20**(Suppl 4): p. 168.
251. Xu, Y., et al., *Detection of Viral Pathogens With Multiplex Nanopore MinION Sequencing: Be Careful With Cross-Talk*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2225.
252. Wright, E.S. and K.H. Vetsigian, *Quality filtering of Illumina index reads mitigates sample cross-talk*. BMC Genomics, 2016. **17**(1): p. 876.
253. Nelson, M.C., et al., *Analysis, Optimization and Verification of Illumina-Generated 16S rRNA Gene Amplicon Surveys*. PLOS ONE, 2014. **9**(4): p. e94249.
254. Rubright, J.H. and A.B. Shafritz, *The Herpetic Whitlow*. J Hand Surgery, 2011. **36**(2): p. 340-342.
255. Esmann, J., *The many challenges of facial herpes simplex virus infection*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(suppl_1): p. 17-27.
256. Brooke, J.S., *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(1): p. 2-41.
257. Dorrestein, P.C., R.L. Gallo, and R. Knight, *Microbial Skin Inhabitants: Friends Forever*. Cell, 2016. **165**(4): p. 771-772.
258. Grice, E.A., et al., *A diversity profile of the human skin microbiota*. Genome Res, 2008. **18**(7): p. 1043-1050.
259. Schommer, N.N. and R.L. Gallo, *Structure and function of the human skin microbiome*. Trends Microbiol, 2013. **21**(12): p. 660-668.
260. Ki, V. and C. Rotstein, *Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care*. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2008. **19**(2): p. 173-184.
261. Tong, S.Y.C., et al., *Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management*. Clin Microbiol Rev, 2015. **28**(3): p. 603-661.
262. Argemi, X., et al., *Is Staphylococcus lugdunensis Significant in Clinical Samples?* J Clin Microbiol, 2017. **55**(11): p. 3167-3174.
263. Wu, D.C., et al., *Pseudomonas skin infection*. Am J Clin Dermatol, 2011. **12**(3): p. 157-169.
264. Visca, P., H. Seifert, and K.J. Towner, *Acinetobacter infection—an emerging threat to human health*. IUBMB life, 2011. **63**(12): p. 1048-1054.
265. Lee, S., et al., *A case of necrotizing fasciitis due to Streptococcus agalactiae, Arcanobacterium haemolyticum, and Finegoldia magna in a dog-bitten patient with diabetes*. Korean J Lab Med, 2008. **28**(3): p. 191-195.
266. Misra, R., et al., *Necrotizing fasciitis due to Finegoldia magna (Peptostreptococcus magnus) as the sole isolate-rare report from India*. Int J Med Clin Res, 2012. **3**(8): p. 232.
267. Petkovsek, Z., et al., *Virulence potential of Escherichia coli isolates from skin and soft tissue infections*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(6): p. 1811-1817.
268. Fliegerova, K., et al., *Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population*. Anaerobe, 2014. **29**: p. 80-84.
269. de Liphay, J.R., et al., *Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis*. Soil Biol Biochem, 2004. **36**(10): p. 1607-1614.
270. Janda, J.M. and S.L. Abbott, *16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(9): p. 2761-2764.
271. Clooney, A.G., et al., *Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis*. PLOS ONE, 2016. **11**(2): p. e0148028.
272. Ashbee, H.R. and E.G.V. Evans, *Fungi and skin*. Microbiology Today, 2000. **27**: p. 132-135.
273. White, T.C., et al., *Fungi on the skin: dermatophytes and Malassezia*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(8): pii: a019802.

274. Wylie, K.M., et al., *Sequence Analysis of the Human Virome in Febrile and Afebrile Children*. PLOS ONE, 2012. **7**(6): p. e27735.
275. Chiu, C.Y., et al., *Diagnosis of Fatal Human Case of St. Louis Encephalitis Virus Infection by Metagenomic Sequencing, California, 2016*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(10): p. 1964-1968.
276. Wilson, M.R., et al., *A novel cause of chronic viral meningoencephalitis: Cache Valley virus*. Ann Neurol, 2017. **82**(1): p. 105-114.
277. Wilson, M.R., et al., *Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing*. N Engl J Med, 2014. **370**(25): p. 2408-2417.
278. Gargis, A.S., L. Kalman, and I.M. Lubin, *Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories*. J Clin Microbiol, 2016. **54**(12): p. 2857-2865.
279. Schlaberg, R., et al., *Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection*. Arch Pathol Lab Med, 2017. **141**(6): p. 776-786.

Supplements

Tabelle 26: Übersicht Readanzahl NGS

Lauf	Sample	Trimmed reads	Mapped human	Mapped bacteria	Mapped virus	Mapped fungi	Other
Lauf 1	01_P16_003_00_01	7,80*10 ⁶	7,68*10 ⁶	24.134	817	112	91.401
	02_P16_003_001_02	5,57*10 ⁶	5,57*10 ⁶	451	6	256	5.562
	03_P16_023_001_01	5,39*10 ⁶	5,38*10 ⁶	590	5	8	6.235
	04_P16_039_001_01	4,78*10 ⁶	4,30*10 ⁶	117.545	2.283	113	356.583
	05_P15_056_001_02_A	7,69*10 ⁶	7,10*10 ⁶	304.918	1.549	51	278.428
	06_P15_056_001_03	5,92*10 ⁶	5,91*10 ⁶	431	3	25	4.917
	07_P_15_093_001_01	1,41*10 ⁷	1,41*10 ⁷	980	3.685	4	13.061
	08_P15_050_001_02_A	8,14*10 ⁶	7,95*10 ⁶	42.377	1.073	129	145.231
	09_P15_050_001_03_B	3,84*10 ⁶	3,83*10 ⁶	466	1	4	5.176
	10_P14_25_001_01	1,15*10 ⁶	1,00*10 ⁶	30.101	884	458	118.839
	12_P11_40_001_01	5,81*10 ⁶	5,80*10 ⁶	442	4	4	7.695
	13_P13_29_001_01	1,45*10 ⁶	1,42*10 ⁶	7.818	70	37	21.947
	14_P12_46_C	3,64*10 ⁶	3,64*10 ⁶	223	0	41	3.259
	15_P_14_072_00_06	6,81*10 ⁶	6,80*10 ⁶	638	4	14	8.065
	16_P14_072_001_07	4,03*10 ⁶	4,03*10 ⁶	1.080	21	4	6.641
	17_P17_67_001_01	1,09*10 ⁷	1,09*10 ⁷	4.795	7	1.316	13.294
	Lauf 2	19_P18_008_001_01	2,27*10 ⁶	1,59*10 ⁶	237.342	22	9
20_P18_016_001_01		1,62*10 ⁵	3,37*10 ⁴	1.612	14	22	126.942
22_P18_023_001_03		3,92*10 ⁶	3,81*10 ⁶	15.179	595	0	91.470
23_P18_024_001_01		3,92*10 ⁶	3,85*10 ⁶	454	1	1.632	66.684
24_P18_025_001_01		3,53*10 ⁶	3,47*10 ⁶	492	0	0	65.055
25_P18_029_001_01		1,58*10 ⁵	1,13*10 ⁵	1.873	5.616	1	37.728
26_P18_029_001_02		2,57*10 ⁵	1,00*10 ⁵	1.740	2.568	11	152.704
27_P18_030_001_02		5,40*10 ⁵	4,10*10 ⁵	919	17	7	129.034
28_P18_031_001_01		4,80*10 ⁵	5,75*10 ⁴	113.571	15	18	309.059
29_P18_033_001_02		3,47*10 ⁶	3,38*10 ⁶	615	7.245	0	73.488
30_P18_048_001_01		3,09*10 ⁶	2,87*10 ⁶	3.938	13	44	214.285
32_P18_076_001_01		5,52*10 ⁵	1,04*10 ⁵	4.358	167.298	161	275.887
33_P18_086_001_01		2,10*10 ⁶	1,87*10 ⁶	3.113	39	59	228.618
34_P18_087_001_01		3,14*10 ⁶	2,95*10 ⁶	2.778	27	0	190.884
Lauf 3	35_P18_002_001_01	2,55*10 ⁶	2,42*10 ⁶	1.424	53.340	6	75.736
	36_P18_007_001_01	6,23*10 ⁵	1,59*10 ⁵	707	0	0	463.703
	37_P18_037_001_01	1,55*10 ⁶	3,98*10 ⁵	14.354	42	0	1.138.209
	43_P15_103_001_01	1,04*10 ⁶	2,42*10 ⁵	1.480	15	0	793.980
	44_P15_82_001_01	8,43*10 ⁵	1,07*10 ⁵	1.089	11	0	734.169
	45_P15_21_001_01	1,34*10 ⁶	3,37*10 ⁵	1.564	91	0	1.004.181
	46_P16_019_001_01	1,83*10 ⁶	4,53*10 ⁵	4.575	179	0	1.367.352
	47_P18_92_001_01	2,28*10 ⁶	2,17*10 ⁶	10.816	7	373	101.437
	48_P18_92_002_01	2,82*10 ⁶	2,77*10 ⁶	582	0	2	51.610

	49_P18_98_001_01	9,37*10 ⁵	9,26*10 ⁵	75	469	0	10.363
	50_P18_98_002_01	9,52*10 ⁵	9,42*10 ⁵	76	874	0	9.723
	51_P19_003_01	3,13*10 ⁶	3,08*10 ⁶	392	3	0	45.604
	52_P19_003_02	1,25*10 ⁶	1,24*10 ⁶	111	0	0	13.532
	58_P17_61_005	3,13*10 ⁶	3,08*10 ⁶	533	0	0	47.489
	59_P17_61_006	8,19*10 ⁵	8,11*10 ⁵	80	5	0	8.289
	60_P17_04_001	2,68*10 ⁶	2,62*10 ⁶	2.920	0	86	52.460
	61_P17_97_01	9,37*10 ⁵	9,25*10 ⁵	102	132	0	11.583
	62_P17_97_02	1,01*10 ⁶	9,96*10 ⁵	533	240	27	15.534
	63_P17_85	1,44*10 ⁶	1,43*10 ⁶	291	167	0	15.041
	64_P18_35	2,26*10 ⁶	2,19*10 ⁶	3.098	1	17	64.306
Lauf 1	NK_Arm_A	3,20*10 ⁶	1,12*10 ⁶	257.251	1.462	9.672	1.812.690
	NK_Arm_B	1,07*10 ⁶	3,05*10 ⁵	98.748	77	5.794	656.167
	NK_Leg_A	2,37*10 ⁶	1,13*10 ⁶	150.204	339	5.765	1.084.712
	NK_Leg_B	4,01*10 ⁶	2,20*10 ⁵	390.099	53	18.381	3.385.794
	NK_Head_A	5,85*10 ⁶	4,12*10 ⁶	109.526	142	210.694	1.405.160
	NK_Head_B	5,15*10 ⁶	4,15*10 ⁵	191.320	7	1.268.690	3.272.455
	NK_Arm_Pool	1,05*10 ⁷	5,75*10 ⁶	447.135	865	52.859	4.253.263

Abbildungen

Abbildung 1: Hauteffloreszenzen bei Infektionen mit Pockenviren.....	3
Abbildung 2: Charakteristische Entwicklungsstadien einer Pockenvirus-Infektion.....	4
Abbildung 3: Pockenähnliche Hauteffloreszenzen	5
Abbildung 4: Die Polymerase Kettenreaktion.....	7
Abbildung 5: Darstellung der <i>Cyclic Reversible Termination</i> Methode	8
Abbildung 6: Ablauf der Cluster-Generierung durch <i>bridge amplification</i>	9
Abbildung 7: Der MinION von Oxford Nanopore Technologies.....	10
Abbildung 8: Sequenzierung von doppelstrang-DNA (2D Sequenzierung) durch die Nanopore .	11
Abbildung 9: Das Mikrobiom der humanen Haut.....	12
Abbildung 10: Workflow der Dissertation	17
Abbildung 11: Virus Amplification based Sequencing – VAmSeq.....	17
Abbildung 12: Bilder der Patientenproben.....	20
Abbildung 13: Bilder Patientenproben Tiere.....	21
Abbildung 14: Workflow der Illumina Daten Auswertung.....	28
Abbildung 15: Grafische Darstellung der MinION Library Präparation.....	32
Abbildung 16: Sequenzanzahlen der Illumina-Sequenzierung.....	34
Abbildung 17: Sequenz-Alignment zeigt von MOCV.....	36
Abbildung 18: Virom Analyse der Patientenproben Nukleotid.....	37
Abbildung 19: Virom Analyse der Patientenproben basierend Aminosäures.....	39
Abbildung 20: Neighbor-Joining Tree der Squirrel poxvirus-ähnlichen Sequenz	40
Abbildung 21: Zytopathische Effekte bei Inkubation mit dem Patientenmaterial der Probe 43 ..	41
Abbildung 22: Analyse des fungalen Metagenoms.....	42
Abbildung 23: Mikrobiom Analyse Illumina.....	44
Abbildung 24: Mikrobiom Analyse MinION-16s Sequenzierung	46
Abbildung 25: Vergleich der Mikrobiom Analyse Illumina und 16S.....	48
Abbildung 26: VAmSeq Workflow.....	49
Abbildung 27: <i>In silico</i> Bindung der VAmSeq Primer.....	50
Abbildung 28: Schmelztemperatur (TM) der VAmSeq Primer.	51
Abbildung 29: ΔG Werte für die Ausbildung von Homodimeren und Hairpin Strukturen.	51
Abbildung 30: ΔG Werte für die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren.....	52
Abbildung 31: Zusammensetzung der PCR Reagenzien	53
Abbildung 32: Kinetiken der VAmSeq Sequenzierungen	57
Abbildung 33: Ergebnisse des VAmSeq Screenings der 49 Patientenproben.....	59
Abbildung 34: Alignment aller Genome der Orthopockenviren.....	62
Abbildung 35: <i>In silico coverage</i> , Abdeckung über das gesamte Genom.....	66

Abbildung 36: Abdeckung über das gesamte Genom.....	68			
Abbildung 37: Die <i>fold coverage</i> von CPXV, VACV, MPXV und Camelpoxvirus.....	69			
Abbildung 38: VAmplSeeker oder PAmplSeeker.....	70			
Abbildung 39: Oberfläche des VAmplSeekers und Ergebnis der gemessenen Proben.....	71			
Abbildung 40: Ergebnisausgabe bei einer VAmplSeq Sequenzierung von CPXV durch den VAmplSeeker.....	72			
Abbildung 41: Ergebnis des PAmplSeekers.....	73			
Abbildung 42: Viren, welche hämorrhagisches Fieber auslösen durch das VAmplSeq Assays detektiert werden können.....	74			
Abbildung 43: Sensitivität der VAmplSeq Methode für hämorrhagische Fiebviren.....	75			
Abbildung 44: Detektionslimits der VAmplSeq Methode.....	76			
Abbildung 45: Virale normalisierte <i>reads</i> (<i>reads/Mio reads</i>) nach der Sequenzierung.....	79			
Abbildung 46: Einfluss unterschiedlicher Analyse Workflows der Metagenomsequenzierung im Rahmen eines internationalen Ringversuches.....	87			
Abbildung 47: NGS Kontaminationen.....	90			
Abbildung	48:	Weitere	VAmplSe	Assay

Tabellen

Tabelle 1: Übersicht der Patientenproben	18
Tabelle 2: Primer für das VAmPSeq-Assay für Hauteffloreszenzen.....	21
Tabelle 3: Primer und Sonden für spezifische konventionelle PCRs und real-time PCRs	23
Tabelle 4: Reaktionsansatz eines Standardprotokolls für die qPCR.....	23
Tabelle 5: Temperaturprofil einer Standard-qPCR.....	24
Tabelle 6: Reaktionsansatz für die 16S-PCR.....	24
Tabelle 7: Temperaturprofil der 16S-PCR.....	24
Tabelle 8: Reagenzien, Kits und Geräte für die Probenvorbereitung und PCRs	24
Tabelle 9: Reagenzien und Kits für die Illumina Library-Präparation und Sequenzierung.....	25
Tabelle 10: Reagenzien, Kits für die MinION Library-Präparation und Sequenzierung	25
Tabelle 11: Software, Tools und Libraries.....	26
Tabelle 12: Pipettiermatrix für die Optimierung der VAmPSeq-multiplex-PCR	29
Tabelle 13: Reagens-Mastermix für die VAmPSeq multiplex-PCR	29
Tabelle 14: Temperaturprofil für die VAmPSeq multiplex-PCR.....	30
Tabelle 15: Mastermix für die PAmpliSeq PCR.....	30
Tabelle 16: Temperaturprofil für die PAmpliSeq PCR.....	31
Tabelle 17: HSV1-positive Proben der Illumina-Sequenzierung.....	35
Tabelle 18: Detektionslimit verschiedener Viren mit der VAmPSeq-Methode.....	54
Tabelle 19: Weitere durch VAmPSeq amplifizierte/sequenzierte Viren aus Patientenproben	55
Tabelle 20: Sequenzierung mehrerer Proben mit <i>barcodes</i> in einem Lauf; Lauf 1.....	58
Tabelle 21: Sequenzierung mehrerer Proben mit <i>barcodes</i> in einem Lauf; Lauf 2.....	58
Tabelle 22: Vergleich verschiedener Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten für die Entwicklung eines Protokolls für VAmPSeq-Methode	63
Tabelle 23: Genomabdeckung der mit PAmpliSeq MinION sequenzierten Viren	65
Tabelle 24: Coverage und Identity der PAmpliSeq-sequenzierten Proben im Vergleich zur Illumina-Sequenzierung.....	67
Tabelle 25: Ergebnisse des VAmPSeekers im Vergleich zu einer Geneious-Auswertung	72
Tabelle 26: Übersicht Readanzahl NGS.....	112

Liste Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwischen 2016 und 2019 zahlreiche Publikationen zu den Themen NGS, Virus-Discovery und Erreger-Diagnostik veröffentlicht:

1. **Brinkmann, A.**, A. Nitsche, and C. Kohl, Viral Metagenomics on Blood-Feeding Arthropods as a Tool for Human Disease Surveillance. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(10): pii: E1743.
2. Ergunay, K., N. Litzba, **A. Brinkmann**, F. Gunay, S. Kar, K. Oter, S. Orsten, Y Sarikaya, B. Alten, A. Nitsche, Y.M. Linton, Isolation and genomic characterization of *Culex theileri* flaviviruses in field-collected mosquitoes from Turkey. *Infect Genet Evol*, 2016. 46: p. 138-147.
3. **Brinkmann, A.**, K. Ergunay, A. Radonic, Z. Kocak Tufan, C. Domingo, and A. Nitsche, Development and preliminary evaluation of a multiplexed amplification and next generation sequencing method for viral hemorrhagic fever diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017. 11(11): p. e0006075.
4. Dincer, E., **A. Brinkmann**, O. Hekimoglu, S. Hacıoglu, K. Foldes, Z. Karapinar, P.F. Polat, B. Oguz, O. Orunc Kilinc, P. Hagedorn, N. Ozer, A. Ozkul, A. Nitsche, K. Ergunay, Generic amplification and next generation sequencing reveal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus AP92-like strain and distinct tick phleboviruses in Anatolia, Turkey. *Parasit Vectors*, 2017. 10(1): p. 335.
5. Ergunay, K., **A. Brinkmann**, N. Litzba, F. Gunay, S. Kar, K. Oter, S. Orsten, Y. Sarikaya, B. Alten, A. Nitsche, Y.M. Linton, A novel rhabdovirus, related to Merida virus, in field-collected mosquitoes from Anatolia and Thrace. *Arch Virol*, 2017. 162(7): p. 1903-1911.
6. Ergunay, K., N. Litzba, **A. Brinkmann**, F. Gunay, Y. Sarikaya, S. Kar, S. Orsten, K. Oter, C. Domingo, O. Erisoz Kasap, A. Ozkul, L. Mitchell, A. Nitsche, B. Alten, Y.M. Linton, Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey. *Parasit Vectors*, 2017. 10(1): p. 149.
7. **Brinkmann, A.**, E. Dincer, C. Polat, O. Hekimoglu, S. Hacıoglu, K. Foldes, A. Ozkul, I.M.A. Oktem, A. Nitsche, K. Ergunay, A metagenomic survey identifies Tamdy orthonairovirus as well as divergent phlebo-, rhabdo-, chu- and flavi-like viruses in Anatolia, Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2018. 9(5): p. 1173-1183.
8. Oncu, C., **A. Brinkmann**, F. Gunay, S. Kar, K. Oter, Y. Sarikaya, A. Nitsche, Y.M. Linton, B. Alten, K. Ergunay, West Nile virus, *Anopheles flavivirus*, a novel flavivirus as well as Merida-like

rhabdovirus Turkey in field-collected mosquitoes from Thrace and Anatolia. *Infect Genet Evol*, 2018. 57: p. 36-45.

9. Akiner, M.M., M. Ozturk, A.B. Baser, F. Gunay, S. Hacıoglu, **A. Brinkmann**, N. Emanet, B. Alten, A. Ozkul, A. Nitsche, Y.M. Linton, K. Ergunay, Arboviral screening of invasive *Aedes* species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019. 13(5): p. e0007334.

10. Bellikci-Koyu, E., B.P. Sarer-Yurekli, Y. Akyon, F. Aydin-Kose, C. Karagozlu, A.G. Ozgen, **A. Brinkmann**, A. Nitsche, K. Ergunay, E. Yilmaz, Z. Buyuktuncer, Effects of Regular Kefir Consumption on Gut Microbiota in Patients with Metabolic Syndrome: A Parallel-Group, Randomized, Controlled Study. *Nutrients*, 2019. 11(9): pii: E2089.

11. **Brinkmann, A.**, A. Andrusch, A. Belka, C. Wylezich, D. Hoper, A. Pohlmann, T. Nordahl Petersen, P. Lucas, Y. Blanchard, A. Papa, A. Melidou, B.B. Oude Munnink, J. Matthijnsens, W. Deboutte, R.J. Ellis, F. Hansmann, W. Baumgärtner, E. van der Vries, A. Osterhaus, C. Camma, I. Mangone, A. Lorusso, M. Marcacci, A. Nunes, M. Pinto, V. Borges, A. Kroneman, D. Schmitz, V.M. Corman, C. Drosten, T.C. Jones, R.S. Hendriksen, F.M. Aarestrup, M. Koopmans, M. Beer, A. Nitsche, Proficiency Testing of Virus Diagnostics Based on Bioinformatics Analysis of Simulated In Silico High-Throughput Sequencing Data Sets. *J Clin Microbiol*, 2019. 57(8): pii: e00466-19.

12. **Brinkmann, A.**, O. Hekimoglu, E. Dincer, P. Hagedorn, A. Nitsche, and K. Ergunay, A cross-sectional screening by next-generation sequencing reveals *Rickettsia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia*, *Babesia*, *Theileria* and *Hemolivia* species in ticks from Anatolia. *Parasit Vectors*, 2019. 12(1): p. 26.

13. Dincer, E., S. Hacıoglu, S. Kar, N. Emanet, **A. Brinkmann**, A. Nitsche, A. Ozkul, Y.M. Linton, K. Ergunay, Survey and Characterization of Jingmen Tick Virus Variants. *Viruses*, 2019. 11(11): pii: E1071.

14. Emanet, N., S. Kar, E. Dincer, **A. Brinkmann**, S. Hacıoglu, T.A. Farzani, Z. Kocak Tufan, P.F. Polat, A. Sahan, A. Ozkul, A. Nitsche, Y.M. Linton, K. Ergunay, Novel Tick Phlebovirus Genotypes Lacking Evidence for Vertebrate Infections in Anatolia and Thrace, Turkey. *Viruses*, 2019. 11(8): pii: E703.

15. Hendriksen, R.S., P. Munk, P. Njage, et al.; **Global Sewage** Surveillance project consortium (A. Nitsche, **A. Brinkmann**), Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 1124.

16. Polat, C., K. Ergunay, S. Irmak, M. Erdin, **A. Brinkmann**, O. Cetintas, M. Cogal, M. Sozen, F. Matur, A. Nitsche, I.M.A. Oktem, A novel genetic lineage of Tula orthohantavirus in Altai voles (*Microtus obscurus*) from Turkey. *Infect Genet Evol*, 2019. 67: p. 150-158.