

Aus dem Zentrum für Biologische Gefahren und
Spezielle Pathogene 1 (ZBS 1)
des Robert Koch-Instituts Berlin

DISSERTATION

**Die Entwicklung sequenzbasierter Schnelldiagnostikverfahren
zur Diagnostik von hochpathogenen Erregern**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Imke Hartwigsen

aus Braunschweig

Datum der Promotion: 30.05.2015

*„Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt,
sondern durch Arbeit und eigene Leistung.“*

Albert Einstein

Zusammenfassung

Einige hämorrhagische Fiebertviren, wie beispielsweise das Lassa Virus, CCHFV oder das Ebola und Marburg Virus sind hochkontagiös und gehen mit einer hohen Letalitätsrate einher, weshalb sie von besonderer Bedeutung für das klinische Management und den Bevölkerungsschutz sind. In Deutschland haben diese, vornehmlich in den Tropen und Subtropen verbreiteten, Infektionen vor allem aufgrund des zunehmenden Tourismus an Bedeutung gewonnen, durch den es in den letzten Jahren vereinzelt zum Import nach Deutschland kam.

Durch ihre relativ unspezifische Anfangssymptomatik ist eine Abgrenzung zu anderen Infektionskrankheiten, wie beispielsweise Malaria oder einer Infektion mit einem nicht isolierbedürftigen hämorrhagischen Fiebertvirus anhand des klinischen Bildes häufig schwierig. Um daher im Verdachtsfall angemessen reagieren zu können, werden große Ansprüche an die laborgestützte Diagnostik gestellt. So muss zum einen innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl wichtiger Differentialdiagnosen abgeklärt werden. Zum anderen muss eine zuverlässige virologische Diagnostik unter Hochsicherheitsbedingungen erfolgen, auf deren Basis eine begründete Verdachtsdiagnose gestellt bzw. eine Infektion ausgeschlossen werden kann.

Dem entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Screeningverfahren für hämorrhagische Fiebertviren entwickelt, welches die konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion mit der Pyrosequenzierung kombiniert, um die Nukleinsäuren der einzelnen Erreger schnell, sensitiv und spezifisch zu detektieren und diese in der anschließenden Sequenzierung zu typisieren. Da es sich um ein nukleinsäurebasiertes Nachweisverfahren handelt, eignet es sich vor allem in der frühen Phase einer Infektion als Diagnostikmethode. Es ist universell auf eine Vielzahl differentialdiagnostisch wichtiger Erreger sowohl viraler als auch bakterieller und parasitärer Genese anwendbar, die durch die Vereinheitlichung der Temperaturprofile sowie der Kombination einzelner PCR- bzw. PSQ-Assays parallel getestet werden können. Über die Etablierung interner Kontrollen sowie die Konstruktion spezieller Kontrollplasmide wurde bekannten Problemen in der PCR-Diagnostik begegnet und die Zuverlässigkeit des entwickelten Verfahrens weiter erhöht.

Insgesamt bietet somit das entwickelte Screeningverfahren den Ansatz einer sensitiven, spezifischen und auch zuverlässigen labordiagnostischen Abklärung verschiedener hämorrhagischer Fiebertviren sowie wichtiger Differentialdiagnosen mit nur einem Verfahren, wodurch vor allem Zeit, Kosten, Reagenzien und auch Probenmaterial gespart werden können.

Summary

Certain hemorrhagic fever viruses, as for example the Lassa virus, Crimean-Congo-HF-virus and Ebola and Marburg virus, are highly contagious and are associated with a very high rate of mortality; thus these viral infections have a great impact on both the clinical management of patients, as well as the protection of public health.

Originating largely from tropical or subtropical regions, these viral fevers have grown in importance in Germany due to the increase in tourism abroad, and have in several cases been imported into the country.

Because the infections share relatively unspecific initial symptoms, it is quite difficult to differentiate them from other infectious diseases according to their clinical symptoms, such as malaria or infections caused by non-transmissible between humans hemorrhagic fever viruses.

Hence, to be able to react appropriately in case of a suspicious case, great demands are put into the laboratory diagnosis: On one hand, a large number of differential diagnoses have to be ruled out in a short space of time; on the other, a reliable virological diagnosis has to be performed under conditions of high biosafety level, on the basis of which a reasonable final diagnosis can be established.

Accordingly, this study has come up with a method of screening for hemorrhagic fever viruses, which combines the conventional technique of polymerase chain reaction with pyrosequencing, with the aim of being able to quickly, sensitively and specifically detect the nucleic acids of individual viral agents, and to subsequently typify them during the following DNA-sequencing. Since this procedure of verification is based on viral nucleic acids, it is particularly useful as a diagnostic tool in the early stages of infection.

The procedure is universally applicable for a multitude of diagnostically significant infectious agents both of viral and bacterial, as well as parasitic origin, which can be tested at the same time through the standardisation of temperature profiles, as well as the combination of different PCR- and PSQ assays. Through the establishment of internal controls and the construction of special control plasmids, known problems of PCR-based diagnosis were counteracted and the reliability of the developed technique further increased.

Overall, the newly developed screening-method offers a sensitive, specific and reliable approach to the clarification of various hemorrhagic fever viruses in the laboratory, as well as differential diagnoses in only one procedure, thus conserving time, reagents, funds and testing materials.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Summary	4
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	8
1.1 Infektionskrankheiten und deren Bedeutung.....	8
1.2 Ursachen und Gründe für die zunehmende Bedeutung von Tropeninfektionen für den Infektionsschutz der Bundesrepublik	9
1.3 Virale Infektionserreger der Tropen und Subtropen.....	10
1.4 Durch Bakterien und Parasiten verursachte Infektionen der Tropen und Subtropen	14
1.5 Besondere Anforderungen an den Bevölkerungsschutz am Beispiel der VHF.....	16
1.6 Die Diagnosestellung eines viral bedingten hämorrhagischen Fiebers	18
1.7 Molekularbiologische Diagnostikverfahren zum Nachweis hämorrhagischer Fieberviren	222
1.8 Die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	24
1.9 Die Pyrosequenzierung (PSQ).....	27
1.10 Zielsetzung der Arbeit	29
2 Material	31
2.1 Nukleinsäuren und Plasmide	31
2.2 Oligonukleotide	32
2.3 Geräte	36
2.4 Software	36
2.5 Kits	36
2.6 Chemikalien.....	36
2.7 Verbrauchsmaterialien.....	37
3 Methoden	38
3.1 Etablierung und Validierung erregerspezifischer PCR- und PSQ-Assays	38
3.1.1 OneStep RT-PCR zur Amplifizierung von RNA	38
3.1.2 Konventionelle PCR zur Amplifizierung von DNA.....	39
3.1.3 Quantitative Gelelektrophorese	39
3.1.4 Pyrosequenzierung	39

3.1.5	Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der PCR- und PSQ-Assays	40
3.2	Etablierung eines TwoStep Screeningverfahrens für Humanserumproben auf alle ausgewählten Tropeninfectionserreger dieser Arbeit.....	41
3.3	Unbekannte RNA-Proben aus Humanserum.....	42
3.3.1	Testung der RNA-Proben mit den PCR-und PSQ-Assays der viralen Erreger	42
3.3.2	<i>real-time</i> PCR-Verfahren zur Evaluierung der Ergebnisse der RNA-Proben	43
3.3.2.1	Nachweis einer erfolgreichen Nukleinsäureextraktion mittels <i>c-myc real-time</i> PCR....	43
3.3.2.2	DvAll <i>real-time</i> PCR zur Quantifizierung der Nukleinsäuremengen.....	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Schnelle und spezifische Detektion verschiedener Tropeninfectionserreger durch Kombination der Pyrosequenzierung mit der konventionellen PCR.....	45
4.1.1	Bedingungen zur Auswahl der erregerspezifischen PCRs	45
4.1.2	Design der PSQ-Assays.....	46
4.1.3	Etablierung der erregerspezifischen PSQ-Assays	47
4.1.4	Testung der PSQ-Assays mit Erreger-Nukleinsäuren	48
4.2	Parallele Pyrosequenzierung als Screeningmethode für Tropeninfectionserreger	52
4.2.1	Synthetische Plasmide als Positivkontrollen	52
4.2.2	Etablierung interner Kontrollen.....	53
4.2.3	Validierung und Optimierung der PCR- und PSQ-Assays.....	54
4.2.4	Amplifikation der DNA-Erreger mit dem OneStep RT-PCR Temperaturprofil zur Vereinheitlichung der Temperaturprofile der DNA- und RNA-Erreger	58
4.2.5	Optimierung der Screeningmethode durch die Etablierung von Virus-Assay-Kombinationen sowie einem Pan-Flavi-Assay.....	59
4.2.5.1	Die Etablierung der Virus-Assay-Kombinationen	60
4.2.5.2	Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen der Virus-Assay-Kombinationen	63
4.2.5.3	Die Etablierung sowie Validierung eines Pan-Flavi-PSQ-Assays	63
4.2.5.4	Vergleich der Sensitivität der Detektion verschiedener Flaviviren RNAs mit der Pan-Flavi-PSQ und den virusspezifischen PSQs.....	64
4.3	Ablaufschema für die TwoStep Screeningmethode zur Detektion hämorrhagischer Fiebertypen sowie differentialdiagnostisch relevanter DNA- und RNA-Erreger	65
4.4	Extrahierte RNA-Proben aus Humanseren des BNIs zur Evaluierung der TwoStep Screeningmethode	69
4.4.1	Evaluierung der Ergebnisse aus dem TwoStep Screeningverfahren für die Dengue Virus positiv getestete Proben.....	70
4.4.2	Auswertung der auf Dengue Virus negativ getestete Proben	72

5	Diskussion	73
5.1	Das TwoStep Screeningverfahren als neuer Ansatz in der Diagnostik importierter Infektionskrankheiten	73
5.1.1	Vor- und Nachteile der PCR als molekularbiologisches Verfahren in der Diagnostik von Infektionskrankheiten	73
5.1.2	Die Verwendung von konventionellen PCRs im entwickelten Screeningverfahren	75
5.1.3	Die Verwendung der PSQ zur Sequenzierung der PCR-Produkte im entwickelten Screeningverfahren.....	76
5.1.4	Das detektierte Erregerspektrum der TwoStep Screeningmethode	76
5.2	Probleme in der PCR-Diagnostik hämorrhagischer Fiebertypen und ihre Lösungsansätze zur Etablierung einer zuverlässigen Screeningmethode	77
5.2.1	Das Primerdesign bei hämorrhagischen Fiebertypen.....	77
5.2.2	Tag-Sequenz zur Detektion von Kontamination durch das Kontrollplasmid zur Vermeidung daraus resultierender falsch-positiver Ergebnisse	79
5.2.3	Verminderung der Häufigkeit falsch-negativer Ergebnisse in der PCR-Diagnostik hämorrhagischer Fiebertypen.....	79
5.3	Die Validierung und Optimierung des TwoStep Screeningverfahrens	81
5.3.1	Die ermittelten Nachweisgrenzen zur Validierung der etablierten PCR- bzw. PSQ-Assays.....	81
5.3.2	Die etablierten Virus-Assay-Kombinationen als Multiplex-PCRs zur Optimierung der Screeningmethode	83
5.3.3	Die etablierte Pan-Flavi-PCR bzw. PSQ zur Optimierung der Detektion verschiedener Spezies des Genus Flavivirus	84
5.4	Dengue Proben zur Validierung des entwickelten TwoStep Screeningverfahrens	85
5.5	Die von deutschen Hochsicherheitslaboren am häufigsten angewandten molekularbiologischen Diagnostikverfahren zur Detektion von VHF im Detail.....	86
5.6	Fazit und Einordnung des entwickelten Screeningverfahrens in die Diagnostik hämorrhagischer Fiebertypen.....	89
	Abkürzungsverzeichnis.....	91
	Abbildungsverzeichnis	93
	Tabellenverzeichnis	94
	Literaturverzeichnis.....	95
	Eidesstattliche Versicherung.....	99
	Lebenslauf.....	100
	Danksagung.....	101

1 Einleitung

1.1 Infektionskrankheiten und deren Bedeutung

Unter Infektionskrankheiten versteht man Erkrankungen, die durch Bakterien und Viren, aber auch durch einzellige Lebewesen, Pilze oder Würmer verursacht werden. Heute sterben jährlich weltweit noch immer 15 Millionen Menschen an den Folgen einer Infektionskrankheit. Ein zentrales Anliegen des öffentlichen Gesundheitsdienstes ist es daher, die Bevölkerung hiervor zu schützen (1, 2).

Das Auftreten verschiedenster Infektionskrankheiten und die hiermit verbundene Bedeutung sowie die zu ergreifenden Maßnahmen im Rahmen des Gesundheitsschutzes der Bevölkerung, sind weltweit sehr unterschiedlich. Beim Gesundheitsschutz in Deutschland stehen vor allem Infektionskrankheiten wie Mumps, Masern, Röteln, Diphtherie oder Tetanus im Vordergrund, deren Ausbruch durch eine einfache Schutzimpfung verhindert werden kann. Teilweise treten aber immer wieder neue Infektionserreger in den Vordergrund, wie beispielsweise das SARS-Coronavirus oder die, durch Prionen verursachte, Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) (2).

Darüber hinaus wird in Deutschland in den letzten Jahren ein immer häufigeres Auftreten von Infektionskrankheiten der Tropen und Subtropen beobachtet. Im Jahr 2012 wurden beispielsweise 547 Malaria-Erkrankungen und 615 Dengue-Fieber Fälle gemeldet. Sie stellt die bisher höchste Fallzahl bekannter Dengue Virus Infektionen seit Einführung des Infektionsschutzgesetzes dar. 2006 kam es zudem zu einem Import des Lassa-Fiebers (aus Sierra Leone) und 2009 zur Einreise von zwei Infizierten mit dem Krim-Kongo-hämorrhagischen Fieber-Virus (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV) (3). Der Import von Infektionen mit einem von-Mensch-zu-Mensch übertragbaren hämorrhagischen Fieber verursachenden Virus, wie dem Lassa Virus oder CCHFV, geschieht bisher zwar nur sehr selten, ist jedoch möglich. Da diese Virusinfektionen lebensbedrohlich sind und ein großes Risiko für nosokomiale Infektionen mit sich bringen, sind sie von besonderer Bedeutung für das klinische Management und den Bevölkerungsschutz. Dies stellt gleichzeitig auch besondere Anforderungen an die Diagnostik, die bei solch einer Infektion vor allem laborgestützt und unter besonderen Sicherheitsbestimmungen erfolgt, worauf in dieser Arbeit schwerpunktmäßig eingegangen werden soll.

1.2 Ursachen und Gründe für die zunehmende Bedeutung von Tropeninfektionen für den Infektionsschutz der Bundesrepublik

Durch die zunehmenden Fallzahlen importierter Infektionskrankheiten der Tropen und Subtropen steigt deren praktische Relevanz und Bedeutung für die Bundesrepublik stetig. Einer der wichtigsten Gründe hierfür scheint der Import dieser Erreger zu sein, vor allem verursacht durch den zunehmenden Tourismus und dem damit einhergehenden Flugverkehr. Die so entstandene Vernetzung der Welt mit verkürzten Reisezeiten auf der einen sowie die Inkubationszeit einer Infektionskrankheit auf der anderen Seite, bei der der Patient zunächst asymptomatisch ist, führen dazu, dass diese Infektionen häufig unbemerkt importiert werden. Auch die immer ausgefalleneren Reiseziele, die besucht werden, fördern den Import. Gleichzeitig scheint die Bereitschaft der Reisenden, eine professionelle reisemedizinische Beratung durch die Tropeninstitute oder niedergelassenen Reisemediziner in Anspruch zu nehmen, eher gering zu sein. Verstärkt wird dies außerdem durch die zunehmenden Zahlen an Last-Minute-Angeboten, bei denen oft aus Zeitmangel keine reisemedizinische Vorbereitung erfolgen kann (4).

Neben dem Import durch den Tourismus lassen sich viele weitere Faktoren, wie beispielweise die Globalisierung wirtschaftlicher Aktivitäten, der Klimawandel, oder auch die Zuwanderung von Menschen aus tropischen, meist medizinisch unterversorgten Regionen, finden, die zu einer Verbreitung dieser Erreger oder zur Verbreitung verschiedener Lebewesen führen, die als Reservoir oder Vektor für diese Erreger fungieren (4, 5, 6).

Beispielsweise kam es zwischen 1999 und 2006 durch den Vogelzug zu einer weiten Verbreitung des West Nil Virus (West Nile Fever Virus, WNV) über den nord- und südamerikanischen Kontinent, das bis dahin in diesen Regionen vollkommen unbekannt war (6). Ähnliche Entwicklungen zeigen sich auch in Europa. Im Jahr 2010 wurden erstmals autochthone Dengue Virus Infektionen aus Südfrankreich und Kroatien gemeldet. Überträger dieser Infektionen sind vor allem die Gelbfiebermücke (*Aedes aegypti*), aber auch die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*). Diese, zunächst nur in tropischen Regionen der Welt heimischen Mückenarten, gelangten über die Seewege in mit Wasser gefüllten Autoreifen, Konservendosen oder auch an Schnittblumen, die die Larven und Eier enthielten, nach Europa und konnten sich dort durch die steigenden Temperaturen weiter verbreiten (7, 8). Auch das CCHFV hat sich in den letzten Jahren weiter nordwestlich ausgebreitet, dass Teile Europas inzwischen endemisch für diesen Erreger sind. Weiterhin wurden ebenfalls Infektionen mit Hantaviren und dem WNV aus Europa gemeldet (5, 6).

Die Erreger der Tropen und Subtropen gewinnen auch an Relevanz, weil von ihnen, ebenso wie von anderen Infektionserregern, die Gefahr eines Seuchenausbruchs ausgeht. Begünstigt wird dies heutzutage vor allem durch das enge Zusammenleben vieler Menschen in Ballungsgebieten. Speziell in den Entwicklungsländern ist dieses Zusammenleben oft zusätzlich mit einer engen Verbindung zu Tieren, fehlendem öffentlichen Gesundheitsdienst, Armut, Unterernährung, niedrigem Bildungsstand und vielen anderen begünstigenden Faktoren verbunden. Hierdurch werden ideale Voraussetzungen für das Auftreten und die Ausbreitung, zum Teil auch neuer oder veränderter Mikroorganismen geschaffen, die die Artengrenzen überwinden und so dem Menschen gefährlich werden könnten (6).

Im Jahr 2007 erkrankten beispielsweise mehrere Millionen Menschen in Afrika, Indien und vielen weiteren Ländern Asiens an einer neuen Variante des Chikungunya Virus. Dieses Virus infizierte darüber hinaus 200 Menschen in der norditalienischen Region Emilia Romagna. Dieses Beispiel zeigt, dass Seuchenausbrüche in den Tropen und Subtropen ebenfalls von Bedeutung für Europa sind (6).

Seit März 2014 herrscht in Guinea mit bisher 528 gemeldeten Fällen sowie 337 Todesfällen der bisher größte dokumentierte Ebola Virus Ausbruch seit Entdeckung des Virus (Stand Juni 2014). Er ist gleichzeitig auch der erste in Westafrika. Fallzahlen belegen eine bereits stattgefunden Ausweitung auf die angrenzenden Länder Liberia und Sierra Leone, Infektionen außerhalb dieser Länder wurden bisher allerdings noch nicht gemeldet. Weiterhin besonders ist, dass es im Rahmen dieses Ausbruches zum ersten Mal zu einer Virusübertragung innerhalb einer Hauptstadt, Conakry, kam (9).

Des Weiteren gewinnen die hämorrhagischen Fieberviren in der Bundesrepublik an Bedeutung, da sie als biowaffenfähige Erreger aufbereitet werden könnten. Sie können in Aerosolform verbreitet werden, weisen eine relativ hohe Stabilität auf und besitzen darüber hinaus eine hohe Morbidität und Letalität für den Menschen. Da sie weiterhin klinisch mit Infektionen durch ähnlichen Agenzien, die waffenfähig aufbereitet werden könnten, wie beispielsweise dem durch *Bacillus anthracis* verursachten Anthrax, verwechselt werden können, werden die hämorrhagischen Fieberviren als mögliche B-Erreger (Biowaffen-Erreger) eingestuft (10).

1.3 Virale Infektionserreger der Tropen und Subtropen

Hämorrhagisches Fieber auslösende Viren. Unter viralen hämorrhagischen Fiebern (VHF) versteht man eine Gruppe infektiöser Fiebererkrankungen, die hauptsächlich in den Tropen und Subtropen vorkommen. Das gemeinsame Kennzeichen dieser Erkrankungen, dem sie auch ihren

Namen verdanken, ist die Kombination von Fieber mit einer erhöhten Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese), die bis zu einem hypovolämischen Schock führen kann. Verursacht wird sie durch die viral bedingte Zerstörung der Gefäßendothelien und einer gleichzeitigen Komplementaktivierung, die zur Bildung von Immunkomplexen führt. Dieser Symptomkomplex stellt lediglich eine schwere Komplikation dieser Erkrankungen dar, die meist erst nach einer länger zurückliegenden Infektion auftritt, dann allerdings mit einer erhöhten Letalität verbunden ist, wodurch diese Erreger unter anderem ihre große Bedeutung erlangen (11, 12).

Die einzelnen Viren der VHF gehören fünf verschiedenen Virusfamilien (*Arena-*, *Bunya-*, *Filo-*, *Flavi-* und *Togaviridae*) an. Allen gemeinsam ist, dass es Viren mit einem RNA-Genom sowie einer Lipidhülle sind. Diese Viren zählen zu den zoonotischen Erregern, d.h. das Reservoir sind Vertebraten, wodurch sie sich zumeist im Tierreich verbreiten. Durch Infektionsketten kann es letztendlich zur Übertragung auf den Menschen kommen, der häufig kein natürliches Reservoir für diese Erreger darstellt und in dem Fall das Endglied dieser Kette bildet. Neben Reservoiren existieren unter den Säugetieren für einige Erreger auch sogenannte Amplifizierwirte, d.h. Lebewesen, die zu einer Verstärkung der Viruszirkulation führen, wie beispielsweise Affen beim Gelbfieber Virus (Yellow fever Virus, YFV) oder Hauswiederkäuer beim Rifttal Fiebertivirus (Rift Valley fever Virus, RVFV) (11).

Hinsichtlich ihrer Übertragungsmodi unterschieden sich die Viren deutlich voneinander. Die Übertragung erfolgt entweder direkt über den Kontakt mit den Ausscheidungen von Nagetieren, wie beim Lassa oder Hanta Virus oder über das Blut von infizierten Tieren, wie bei CCHFV oder RVFV. Viele Viren werden auch indirekt über Vektoren, Arthropoden, wie Stechmücken, bei z.B. Dengue oder Chikungunya Virus oder Zecken, wie beim CCHFV übertragen. Besonders ist, dass die Zecken beim CCHFV auch gleichzeitig das Reservoir dieses Erregers darstellen. Bei den Filoviren ist das Reservoir und somit der genaue Übertragungsweg noch unbekannt, es werden allerdings Fledermäuse vermutet (13). Eine besondere Bedeutung, gerade im Hinblick auf die Übertragung, kommt dem Ebola und Marburg Virus, dem Lassa und dem CCHFV zu, bei denen ein Krankheitsausbruch durch Mensch-zu-Mensch Übertragung beobachtet werden konnte (11).

Diese komplexen Zusammenhänge der Übertragungswege mit Einbindung in die einzelnen Ökosysteme liefern letztendlich eine Erklärung für die begrenzte Verbreitung dieser Erreger. Hinsichtlich der Art und Intensität des örtlichen Auftretens (ländlich bzw. städtisch, endemisches bzw. epidemisches Vorkommen) bestehen unter den Viren deutliche Unterschiede. Ähnlich wie bei den Übertragungsmodi und Reservoiren gibt es beim Auftreten der Erreger ebenfalls einige offene Fragen, die noch nicht ausreichend geklärt wurden, warum beispielsweise Gelbfieber

nicht in Asien oder hämorrhagisches Dengue Fieber überwiegend in Ostasien, der Karibik und dem pazifischen Raum vorkommt (11).

Die Symptomatik eines VHF kann vielgestaltig sein, verdächtig sind Pharyngitis, Erbrechen, Durchfall und Bauchschmerzen sowie besondere Blutungen. Wegen der Gefährlichkeit einer solchen Erkrankung muss von vornherein konsequent vorgegangen werden. Eine früh einsetzende symptomatische Behandlung bietet häufig den einzigen Weg, die Letalität deutlich zu reduzieren. Hier stehen Schock- und Azidosebehandlung im Vordergrund. Erfahrungen haben gezeigt, dass der Einsatz von Hydrokortison, Aldosteron-Antagonisten und Thrombozytenkonzentraten hilfreich sein kann. Ergebnisse aus kontrollierten Therapiestudien fehlen jedoch (11). Kausale Therapien sind bisher nur für Lassa Virus mit Ribavirin, das möglicherweise auch bei CCHFV Wirkung zeigt oder eine spezifische Immunglobulintherapie für Junin-Fieber bekannt (5).

Das Hendra und Nipah Virus. Neben einigen Vertretern aus der Gruppe der hämorrhagischen Fieberviren wurden zusätzlich das Hendra und das Nipah Virus in dieser Arbeit berücksichtigt, da sie den hämorrhagischen Fieberviren in einigen Aspekten sehr ähnlich sind. Das Hendra und das Nipah Virus sind eng miteinander verwandte RNA-Viren, die zur Familie der *Paramyxoviridae* gezählt werden. Auch bei diesen Viren handelt es sich um zoonotische Erreger. Das Reservoir für Hendra und Nipah Virus stellen vor allem Fledermäuse dar. In den 90er Jahren waren in Australien auch vermehrt Pferde vom Hendra Virus befallen, die über engen Kontakt und deren Körperflüssigkeiten das Virus auf den Menschen übertrugen. Beim Nipah Virus kam es in Malaysia und Singapur über infizierte Schweine zu einer Übertragung auf den Menschen. Sowohl das Hendra als auch das Nipah Virus können schwere enzephalitische und respiratorische Infekte beim Menschen verursachen, die mit einer hohen Letalität einhergehen. Neben schweren Krankheitsverläufen verfügen beide Viren über ein hohes Potential für eine weitere Ausdehnung der Verbreitungsgebiete, wodurch sie trotz bisher weniger Krankheitsausbrüche eine große Bedeutung für den Gesundheitsschutz erlangten. Beim Nipah Virus besteht darüber hinaus die Gefahr für nosokomiale Infektionen, da ein signifikanter Krankheitsausbruch durch Mensch-zu-Mensch-Übertragung beobachtet werden konnte.

Der Beginn einer Infektion gleicht dem eines viral bedingten hämorrhagischen Fiebers mit uncharakteristischen, grippeähnlichen Symptomen, zu denen später neurologische Symptome hinzutreten. Auch bei diesen Viren besteht bisher nur die Möglichkeit einer symptomatischen Therapie (14, 15, 16).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über alle in dieser Arbeit berücksichtigten Viren und deren Eigenschaften.

Tabelle 1: Übersicht über die, in dieser Arbeit berücksichtigten, Viren und deren Eigenschaften

Virus	Reservoir	Übertragung	Mensch zu Mensch Übertragung	BSL ¹	Verbreitung
<i>Arenaviridae</i>²					
Lassa Virus	Nagetiere	Nagerexkreme	gelegentlich	4	Westafrika
<i>Bunyaviridae</i>					
CCHFV	Tier/ Mensch	Zecken/ Nagerexkreme	gelegentlich	4	Asien, Afrika, Osteuropa
Hanta Virus	Nagetiere	Nagerexkreme	gelegentlich	3	Asien (China, Korea, Russland) und Europa (v.a. Finnland und Balkanstaaten), auch in Afrika und Nord- und Südamerika
RVFV	Tier/ Mensch	Mosquitos	nicht bekannt	3	Ost-, Zentral- und südliches Afrika, Madagaskar; seit 2000 auch im Yemen und Saudi Arabien
<i>Filoviridae</i>					
Ebola Virus	unbekannt	unbekannt	häufig	4	Zentral- und Westafrika, Asien
Marburg Virus	unbekannt	unbekannt	häufig	4	(Philippinen)
<i>Flaviviridae</i>³					
Alkhurma Virus	Tier/ Mensch	Zecken/Kontakt	nicht bekannt	4	Saudi Arabien
Dengue Virus 1-4	Mensch/ Affe	Mosquitos	nicht bekannt	3	tropische und subtropische Regionen weltweit
Gelbfieber Virus	Mensch/ Affe	Mosquitos	nicht bekannt	3	Afrika, Mittel- und Südamerika
Omsk Virus	Mensch/ Affe	Zecken	gelegentlich	4	Westsibirien
West Nil Virus	Vögel/ Mensch	Mosquitos	nicht bekannt	3	Afrika, Osteuropa, Nord-, Mittel und Südamerika, West- und Zentralasien
<i>Togaviridae</i>					
Chikungunya Virus	Tier/Mensch	Mosquitos	nicht bekannt	3	Afrika, Arabien, Indien, Südostasien
<i>Paramyxoviridae</i>⁴					
Hendra Virus	Fledermäuse/ Pferde	Ausscheidungen/ Blut/ Kontakt	nicht bekannt	4	Australien
Nipah Virus	Fledermäuse/ Schweine	Ausscheidungen/ Blut/ Kontakt	bekannt	4	Bangladesch, Indien, Malaysia, Singapur

¹ BSL = Biologischer Sicherheitslevel (Biosafety Level)

² weitere hämorrhagische Fiebertypen aus der Familie der *Arenaviridae*, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden: Junin Virus, Machupo Virus, Sabia Virus, Guanarito Virus

³ weitere hämorrhagische Fiebertypen aus der Familie der *Flaviviridae*, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden: Kayasanur Wald Virus (Kayasanur Forest Virus, KF Virus)

⁴ nicht zur Gruppe der hämorrhagischen Fiebertypen gehörend

(5, 11, 14, 15, 16)

1.4 Durch Bakterien und Parasiten verursachte Infektionen der Tropen und Subtropen

Bei unklarem Fieber nach Aufenthalt in den Tropen und Subtropen kommen neben einer Virusinfektion, auch viele, durch Bakterien oder Parasiten verursachte importierte Infektionskrankheiten als Differentialdiagnosen in Frage. Auf einige dieser Infektionen, deren Erreger bei dem entwickelten Diagnostikverfahren berücksichtigt wurden, soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

Malaria. Die am wichtigsten auszuschließende Differentialdiagnose einer importierten Virusinfektion der Tropen und Subtropen ist Malaria. Mit jährlich rund 600 importierten Erkrankungen nach Deutschland in den letzten sieben Jahren, stellt sie die am häufigsten importierte Infektionskrankheit dar (7). Verursacht wird Malaria durch die vier humanpathogenen Plasmodiumarten *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *ovale* und *malariae*, unter denen *Plasmodium falciparum* als Erreger der Malaria tropica die mit Abstand größte klinische Bedeutung besitzt. Auf den Menschen übertragen werden die Plasmodien durch Mücken. Hinsichtlich ihrer klinischen Manifestation sowie epidemiologisch, weisen die vier Plasmodiumarten untereinander wesentliche Unterschiede auf. Charakteristisch für eine Malariainfektion ist jedoch Fieber (11). Den Goldstandard in der Diagnostik stellt der mikroskopische Erregernachweis im Blutaussstrich („dicker Tropfen“) dar. Aus Zeitgründen und aufgrund der einfachen Handhabung finden heutzutage ebenfalls vermehrt Malaria-Schnelltests Anwendung, auch der Nukleinsäurenachweis mittels PCR ist möglich (17).

Typhus abdominalis. Neben Malaria muss differentialdiagnostisch bei monosymptomatischem Fieber auch immer an Typhus abdominalis gedacht werden. Die Infektion erfolgt fäkal-oral, zumeist über verunreinigtes Wasser, mit den Serovaren *Salmonella typhi* und *Salmonella paratyphi*. Typhus abdominalis ist eine systemische Erkrankung, die unter anderem mit Fieber, Kopfschmerzen und Benommenheit einhergehen kann und im Prodromalstadium keinen charakteristischen Verlauf zeigt. Die Diagnostik erfolgt über den Erregernachweis aus Blut, Knochenmark, Harn, Stuhl oder Duodenalsekret. Daneben existieren verschiedene serologische Nachweisverfahren. Weiterhin wurden zur Diagnostik verschiedene DNA-Tests entwickelt, die allerdings noch nicht ausreichend validiert wurden und daher bisher nicht als kommerzielle Testkits erhältlich sind (11, 18).

Viscerale Leishmaniose. Ebenfalls in den Kreis der Differentialdiagnosen gehört die viscerale Leishmaniose, auch „Kala-Azar“ genannt, die durch die Leishmanien-Spezies *Leishmania (L.) infantum* und *L. donovani* verursacht wird. Auch sie stellt eine systemische Erkrankung dar, die häufig mit Lymphknotenvergrößerungen, Hepato- oder Splenomegalie und entsprechenden Blutbildveränderungen einhergeht, verursacht durch eine Parasiteninvasion. Die einzigen

bekanntesten Vektoren der Leishmaniose sind die, in den Tropen und Subtropen weit verbreiteten, Phlebotomen (Schmetterlingsmücken). In der Diagnostik kommen neben dem direkten mikroskopischen Erregernachweis aus Biopaten von befallenen Organen verschiedene serologische Nachweisverfahren zum Einsatz (19).

Schlafkrankheit. Bei Fieber, Splenomegalie und Rückkehr aus Afrika sollte differentialdiagnostisch auch an die, durch *Trypanosoma brucei gambiense* und *rhodesiense* verursachte, Schlafkrankheit gedacht werden. Sie ist eine systemische Infektion, bei der es in der Anfangsphase, dem sogenannten hämolymphatischen Stadium, zum Befall des Blutes und der Lymphorgane kommt. Das zweite Krankheitsstadium ist durch meningoencephalische Symptome geprägt. Übertragen werden die Trypanosomen von der Tsetsefliege. In der Diagnostik stehen verschiedene indirekte Nachweismethoden zum Antigen- und Antikörpernachweis zur Verfügung. Die Diagnose sollte jedoch immer durch den direkten mikroskopischen Trypanosomennachweis gesichert werden. Weiterhin wurden PCR-Assays zum Nachweis der Erregernukleinsäure entwickelt, die bereits in den Laboren Anwendung finden, zum Teil jedoch noch einer weiteren Validierung bedürfen (11, 20).

Tuberkulose. Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die häufig die Lunge befällt. Auch weitere Organsysteme, wie beispielsweise der Gastrointestinaltrakt oder die Haut, können betroffen sein. Vor allem bei langanhaltendem Fieber sollte sie als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden. Die im Einzelfall präsentierte Symptomatik ist hierbei abhängig von den befallenen Organen. Verursacht wird sie durch die Mycobakterienarten des Mycobacterium-tuberculosis-Komplexes, *Mycobacterium (M.) tuberculosis* und *africanum* (natürlicher Wirt Mensch), *M. bovis* (natürlicher Wirt Rind) und *M. microti* (natürlicher Wirt Wühlmäuse). Aus geographischer und klimatischer Sicht stellt die Tuberkulose keine typische Tropenkrankheit dar. Da sie sich jedoch vor allem in Ländern mit ökonomischen und strukturellen Mängeln, wie hoher Armut, Wohnungsnot, erzwungenen Bevölkerungsbewegungen, Mangelernährung, Alkoholismus und Drogensucht ausbreitet, erlangt die Tuberkulose vor allem in den tropischen und subtropischen Regionen eine hohe Morbidität und Letalität. Darüber hinaus besteht eine Interferenz von Tuberkulose und HIV- (Humane Immundefizienz-Virus) Infektionen. Das wichtigste in der Tuberkulosedagnostik eingesetzte Verfahren ist der mikroskopische Erregernachweis aus gefärbtem Sputum oder anderen Materialien. Zusätzlich sollte immer ein kultureller Nachweis zur Spezieszuordnung und Resistenzbestimmung erfolgen (11, 21).

Chagas Krankheit. Die Chagas Krankheit ist eine durch *Trypanosoma cruzi* verursachte Zoonose, die durch Raubwanzen auf den Menschen übertragen wird. Sie gehört nicht zwingend zum Formenkreis der Differentialdiagnosen einer importierten Virusinfektion, kommt aber

endemisch in Süd- und Mittelamerika vor und besitzt dort eine hohe epidemiologische Bedeutung, weshalb sie ebenfalls in dieser Arbeit berücksichtigt wird. Bei der Infektion wird eine akute, intermediäre und chronische Phase unterschieden. Die akute Form findet sich häufig bei Kleinkindern und Säuglingen und zeigt ein eher uncharakteristisches Bild. Im weiteren Krankheitsverlauf befallen die Parasiten vor allem die glatte Muskulatur. Dies kann schließlich in der chronischen Phase zu einer Kardiomyopathie oder Megaorganen, wie Megaösophagus, Megagaster oder Megakolon führen, was mit einer hohen Morbidität und Letalität einhergeht. Probleme für die betroffenen Länder ergeben sich vor allem in der intermediären Phase der Infektion, in der die Infizierten meist asymptomatisch sind. Hier kommt es über Bluttransfusionen unbemerkt zur Mensch-zu-Mensch-Übertragung, da verschiedene serologische Screeningverfahren, die hiervor schützen würden, in einigen dieser Länder noch nicht etabliert wurden (11, 22).

In der Diagnostik einer *Trypanosoma cruzi*-Infektion bietet sich vor allem in der akuten Phase der direkte Parasitennachweis an. In der chronischen und intermediären Phase sollte aufgrund der geringen Parasitämie vor allem auf serologische Verfahren und die PCR als Nachweismethoden zurückgegriffen werden. Die mit Abstand sicherste Methode zum Parasitennachweis in der chronischen Phase stellt die Xenodiagnose dar (11).

1.5 Besondere Anforderungen an den Bevölkerungsschutz am Beispiel der VHF

Die hämorrhagischen Fiebertypen werden zu den Erregern der Sicherheitsstufe 3 bzw. 4 gezählt. Die Diagnostik dieser Erreger mittels Zellkultur, mikrobiologischer oder serologischer Diagnostikverfahren erfolgt daher in Hochsicherheitslaboren, die hierfür die Anforderungen an Räumlichkeiten, Ausrüstung und Arbeitsabläufen im Umgang mit diesen Erregern erfüllen. Zurzeit erfolgt die Diagnostik in Deutschland zentral über das Bernhardt-Nocht-Institut (BNI) in Hamburg und wird bestätigt durch das Konsiliarlabor zur Diagnostik hämorrhagischer Fieber der Universität Marburg. Ein weiteres S4-Labor befindet sich im Bau in Berlin am Robert Koch-Institut (RKI). Die parallele Testung dient der Absicherung der Diagnose. Neben einem breiten Spektrum virologischer Tests besitzt das Bernhardt-Nocht-Institut auch eine Vielzahl bakterieller und parasitärer Tests zum Ausschluss einer großen Anzahl an Differentialdiagnosen, was seine zentrale Rolle in der Diagnostik begründet. Lediglich für Hanta Viren, Phleboviren, wie das RVFV und die Flaviviren ist der biologische Sicherheitslevel (BSL) 3 ausreichend. Labore hierfür befinden sich unter anderem in München und in Berlin am RKI (6, 10, 23).

Besonders gefürchtet sind vor allem Infektionen mit einem von-Mensch-zu-Mensch übertragbaren VHF, wie Ebola oder Marburg Virus, Lassa Virus oder CCHFV, bei denen sowohl von dem Patienten selbst, als auch von den Patientenproben, ein erhöhtes Risiko für nosokomiale Infektionen ausgeht. Hier müssen, über die in Hochsicherheitslaboren durchgeführte Diagnostik hinaus, besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Für das Verschicken der Patientenproben stehen spezielle Sicherheitsbehältnisse zur Verfügung. Auch der Transport des Patienten in spezialisierte Behandlungszentren, in denen eine kompetente, intensivmedizinische Behandlung unter Isolation des Patienten stattfinden kann, erfolgt in speziellen Fahrzeugen auf dem Landweg (5).

Deutschland verfügt über neun dieser Behandlungszentren in Hamburg, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Frankfurt/M., Saarbrücken, Stuttgart, Würzburg und München, die alle die vorgegebenen Sicherheitsbestimmungen aus baulicher Sicht erfüllen, sowie die benötigte materielle Ausrüstung, die fachliche Kompetenz und geschultes und regelmäßig auf den Ernstfall trainiertes Personal besitzen. Durch diese Verteilung der Behandlungszentren über ganz Deutschland kann darüber hinaus gewährleistet werden, dass kein Patiententransport über mehr als 250 km erfolgt bzw. länger als 4 Stunden dauert (7, 23).

Durch die speziell zu ergreifenden Maßnahmen im Rahmen des Bevölkerungsschutzes belaufen sich die Behandlungskosten für einen Erkrankten auf ungefähr 10.000 €/Tag, weshalb die genannten Virusinfektionen, auch von der finanziellen Seite betrachtet, einen hohen Stellenwert einnehmen (24).

Da die Patienten bei den ersten Symptomen einer Infektion meist jedoch Krankenhäuser in ihrer Umgebung aufsuchen und nicht direkt vom Flughafen in ein Behandlungszentrum transportiert werden, stellen diese Häuser das Anfangsglied der Kette aus Sicherheitsvorkehrungen dar. Um bereits hier einen effektiven Schutz vor nosokomialen Infektionen schaffen zu können, sollte bereits beim Verdacht auf einen hochkontagiösen Erreger notfallmäßig, solange keine genaue Diagnose bekannt bzw. der Patient noch nicht in ein Fachzentrum transportiert wurde, das „Barrier nursing“ durchgeführt werden. Hierunter versteht man die Verwendung von Einwegschutzbekleidung und Gesichtsmasken sowie die sofortige einfache Isolierung des Patienten, was erfahrungsgemäß bereits einen hohen Schutz vor einer möglichen Ansteckung weiterer Personen bietet (5, 23).

Weiterhin wurden in Deutschland Kompetenzzentren errichtet. Sie sollen den betroffenen erstversorgenden Krankenhäusern und örtlichen Amtsärzten unterstützend und beratend zur Seite stehen sowie weitere Aufgaben, wie z.B. die Presse- und Öffentlichkeitsarbeit, übernehmen. Durch die hohe Bedeutung dieser Infektionen und die Besonderheiten in der Diagnostik,

Behandlung und dem klinischem Management, bei dem Fehler fatale Folgen haben können, wird geraten, sich bereits bei dem Verdacht auf solch eine Infektion an ein Kompetenzzentrum zu richten (23).

Virus bedingte hämorrhagische Fieber zählen gemäß §6 des Infektionsschutzgesetzes zu den namentlich meldepflichtigen Erkrankungen. Die Meldung bei Verdacht, Erkrankung oder Tod eines Patienten an einem VHF muss hiernach binnen 24 Stunden nach Erhalt der Erkenntnis an das zuständige Gesundheitsamt erfolgen (25).

Ein letzter wichtiger Punkt ist die Verständigung von Kontaktpersonen des Erkrankten. Die Ermittlung dieser Personen und deren weiteres Monitoring sollten durch die oberste Landesgesundheitsbehörde des Bundeslandes durchgeführt werden, in dem der Patient erstmalig gemeldet wird. Da häufig eine große Anzahl an Betroffenen überwacht werden muss, wurde eine Kategorisierung der Kontaktpersonen entsprechend ihres persönlichen Infektionsrisikos entwickelt, anhand derer die erforderlichen Maßnahmen zur Postexpositionsprophylaxe ergriffen werden (23).

1.6 Die Diagnosestellung eines viral bedingten hämorrhagischen Fiebers

Die Diagnose eines VHF ist nicht einfach zu stellen und hat weitreichende Folgen. Alleine der Verdacht reicht bereits aus, um eine Kette von Konsequenzen auszulösen, die, wie bereits beschrieben, Meldepflicht, Isolierung des Patienten, Patiententransport in ein Behandlungszentrum und vieles mehr, beinhaltet, weshalb ein unbegründeter Verdacht nicht ausgesprochen werden sollte.

Durch die sehr unspezifische Symptomatik, die die Anfangsphase einer Infektion mit einem hämorrhagischen Fiebervirus prägt sowie durch eine zusätzlich positive Reiseanamnese, kommt eine Vielzahl an Differentialdiagnosen in Frage (siehe 1.3 und 1.4). Am Anfang der Diagnosefindung ist daher eine ausführliche Anamnese mit sorgfältiger Reiseanamnese unerlässlich, um eine Eingrenzung der Symptome und infrage kommender Erreger zu ermöglichen (7, 12).

Besonderes Augenmerk sollte auf die Begleitsymptomatik des Fiebers gelegt werden. Zum Teil existieren für die einzelnen Viren charakteristische Symptome, die von einem Erkrankten präsentiert werden können und anhand derer letztendlich eine Eingrenzung in Frage kommender Erreger möglich ist (Abbildung 1). Gleiches gilt für bakteriell oder parasitär verursachte Infektionen. Einige diese spezifischen Symptome treten häufig allerdings erst im späteren Krankheitsverlauf auf, weshalb in diesen Fällen die Auswahl der in Frage kommenden Erreger

vorrangig anhand des Abgleiches von Verbreitungsgebieten einzelner Erreger mit dem bereisten Land erfolgen muss. Die Kontaktmöglichkeit mit Kranken oder deren Geweben/Sekreten muss darüber hinaus ebenfalls ausgeschlossen werden. Bei einer Exposition, die länger als drei Wochen zurückliegt, scheidet ein VHF als Diagnose aus (5, 7, 23).

Zur Orientierungshilfe und um eine gewisse Vollständigkeit zu garantieren, wurden spezielle Fragebögen entwickelt, die die betroffenen und häufig auch unerfahrenen Ärzte bei der Befragung unterstützen sollen (5).

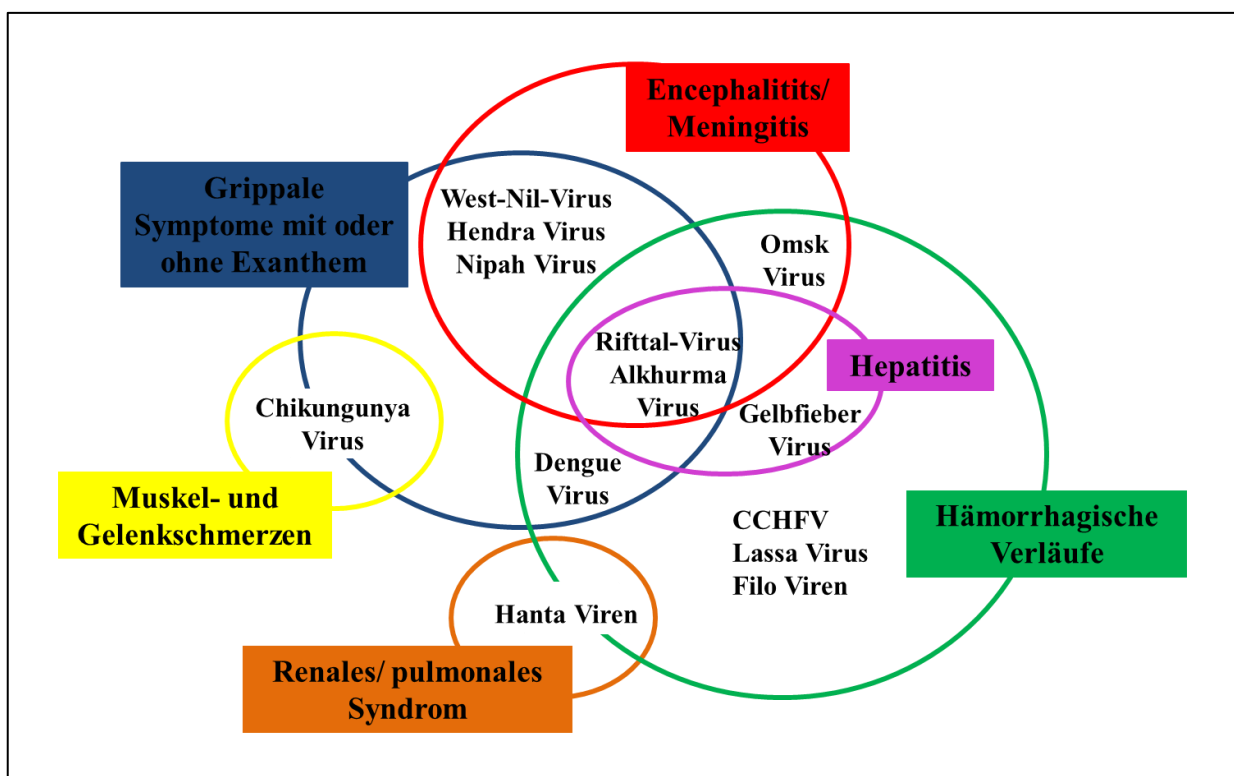


Abbildung 1: Charakteristische Symptome viraler Infektionen. Dargestellt sind die Hauptsymptome, die durch die, in dieser Arbeit berücksichtigten, Viren von einem infizierten Patienten im Verlauf der Infektion präsentiert werden können und charakteristisch für die einzelnen Erreger sind (abgewandelt nach 26).

Neben der Anamnese nimmt die laborgestützte Diagnostik eine zentrale Rolle ein. Bei der Routine-Labordiagnostik sollte vor allem auf die Lactat-Dehydrogenase (LDH) und die Transaminasen geschaut werden, von denen zumindest einer dieser Werte, als Zeichen einer Leber oder Muskelbeteiligung, leicht erhöht sein sollte. Zeichen einer Gerinnungsstörung sind im frühen Stadium einer Infektion meist noch nicht zu erkennen (25). Weiterhin sollte schnellstmöglich eine molekularbiologische Diagnostik erfolgen. Wie bereits erwähnt, ist die am wichtigsten auszuschließende Differentialdiagnose bei hohem Fieber nach Tropenaufenthalt erfahrungsgemäß Malaria. Sie stellt bei über 95% der Patienten, bei denen der Verdacht auf ein

viral bedingtes hämorrhagisches Fieber vorlag, die Enddiagnose dar, weshalb der Ausschluss umgehend über ein mikroskopischen Erregernachweis oder Schnelltest erfolgen sollte, bevor weitere Diagnostikschritte eingeleitet werden (5).

Im Anschluss steht eine spezifische virologische Diagnostik. Abhängig von der Krankheitsdauer bzw. dem gewählten Diagnostikverfahren eignen sich verschiedene Untersuchungsmaterialien, wie Blut, Liquor, Urin, Punktate oder auch Biopate als geeignetes Probenmaterial (11).

Eine Virusinfektion verläuft häufig mit biphasischen Fieberverlauf. Der erste Fieberanstieg am Anfang einer Infektion, mit unspezifischen Symptomen, zeigt die sogenannte virämische Phase an. Hierunter versteht man das massive Vorhandensein von Viruspartikeln im Blut. Nach einem Abfall der Körpertemperatur innerhalb eines bis hin zu mehreren Tagen kommt es schließlich zum erneuten Fieberanstieg. Dieser kennzeichnet den Organbefall mit organspezifischen Symptomen. Abbildung 2 zeigt den Verlauf der Fieberkurve und den serologischen Parametern am Beispiel einer Dengue Virus Erstinfektion (7, 11).

Um einen sicheren Nachweis des Virus bzw. seiner Nukleinsäure aus dem Blut zu ermöglichen, sollte daher die entnommene Probe aus der virämischen Phase stammen. Bei organspezifischen Symptomen, im fortgeschrittenen Stadium einer Infektion, eignet sich z.B. Liquor bei Befall des Gehirns mit neurologischen Symptomen, oder auch ein Biopat eines befallenen Organs als geeignetes Probenmaterial. Probleme mit den Probenmaterialien können sich vor allem dann ergeben, wenn eine Probenentnahme nicht zur rechten Zeit erfolgt. Außerdem muss ein fachgerechter und schneller Transport in ein geeignetes Labor gewährleistet sein, um ein sicheres Diagnostikergebnis garantieren zu können (11).

Weiterhin muss, neben dem Probenmaterial, ebenfalls ein geeignetes Diagnostikverfahren gewählt werden. Serologische Tests eignen sich vor allem bei Viren mit langer Inkubationszeit, da in der frühen Phase einer Infektion häufig noch keine spezifischen Immunglobulin M Antikörper (IgM Antikörper) vorhanden sind. Im späteren Krankheitsverlauf können sie jedoch, aufgrund der geringen Anzahl an Erregern im Blut, anderen Nachweisverfahren, wie dem direkten Erreger- oder Nukleinsäurenachweis aus dem Blut, überlegen sein (siehe hierzu ebenfalls Abbildung 2) (11).

Erfahrungen haben gezeigt, dass häufig vom Verdacht bis zum Eintreffen des Untersuchungsmaterials Stunden bis Tage vergehen können. Zusätzlich kann die Diagnosestellung ebenfalls einige Tage in Anspruch nehmen. Gerade bei einem vermeintlich hochinfektösen Erreger ist jedoch eine zuverlässige, d.h. relativ spezifische und sensitive, und auch schnelle Diagnostik unabdingbar. Neben womöglich vermeidbaren Sicherheitsmaßnahmen, die ergriffen werden und damit verbundenen hohen Kosten, die hierdurch gespart werden

können, ist ein möglichst schnelles und zuverlässiges Diagnostikergebnis auch für den Patienten mit einem frühen Einsetzen therapeutischer Maßnahmen verbunden, was erhebliche Auswirkungen auf die Überlebenschance hat (25). Um hierfür gute Voraussetzungen zu schaffen, sind Projekte entstanden, wie beispielsweise 1998 mit Experten aus 14 europäischen Ländern das „European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases (ENVID)“. Dieses dient der gegenseitigen Unterstützung beim Austausch von Materialien, Methoden und Informationen zur Verbesserung und Ausbau der Diagnostik dieser seltenen und importierten Virusinfektionen (11).

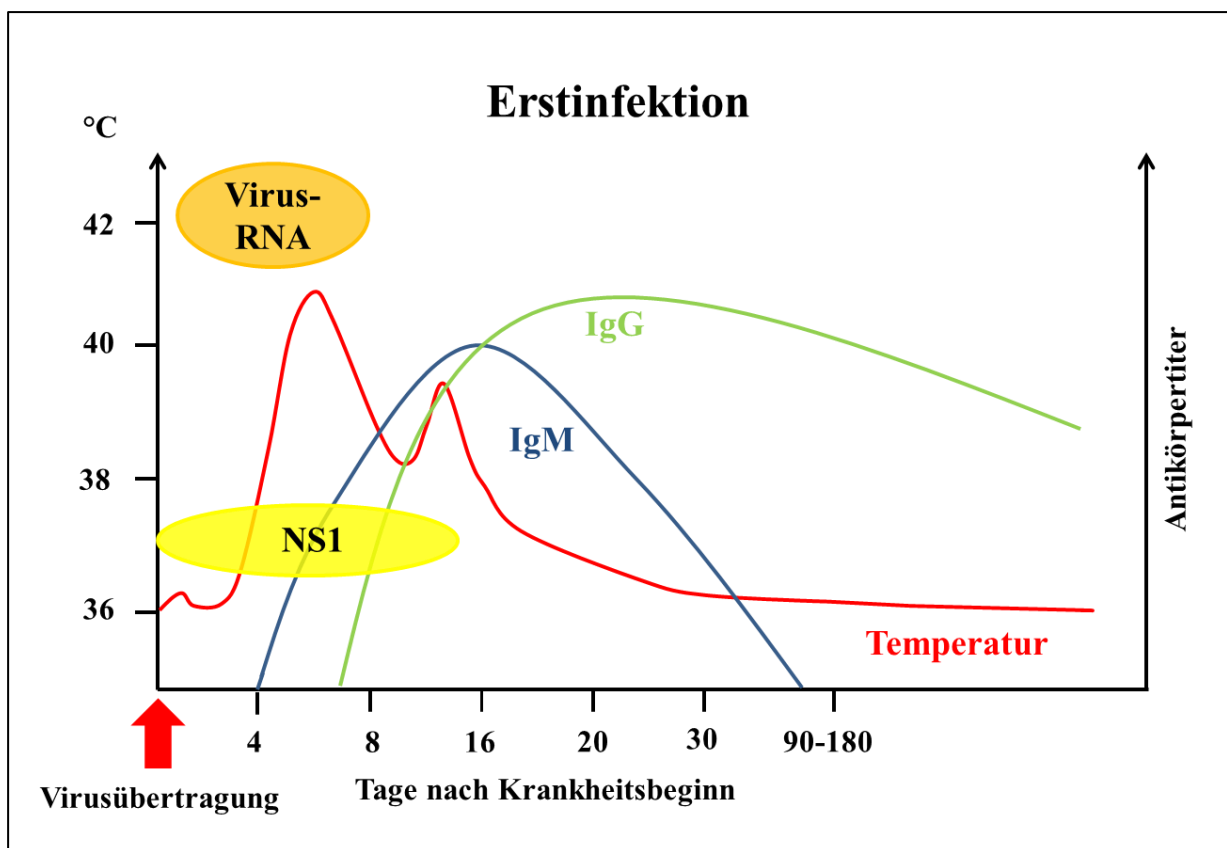


Abbildung 2: Verlauf von Fieber und serologischen Parametern bei einer Dengue Virus (DENV) Erstinfektion. Die Diagnose einer Infektion kann entweder durch den Nachweis von DENV-RNA, DENV-NS-1-Antigen oder DENV spezifischen-IgM oder -IgG erfolgen. Der erste Fieberanstieg kennzeichnet die virämische Phase mit einer hohen Viruslast im Blut des Erkrankten. In dieser Phase eignen sich besonders der Nukleinsäurenachweis oder auch der NS1-Antigentest als Diagnostikmethode. Spezifische Antikörper lassen sich erst im Verlauf der Erkrankung nachweisen. In der serologischen Diagnostik bietet es sich daher an, verschiedenen Diagnostikverfahren parallel zu testen, um eine möglichst hohe klinische Sensitivität und Spezifität zu erreichen (nach 7).

1.7 Molekularbiologische Diagnostikverfahren zum Nachweis hämorrhagischer Fiebertypen

In der Praxis stehen zur Diagnostik viral bedingter hämorrhagischer Fieber zahlreiche Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Neben der Isolierung des Virus aus Zellkulturen oder Labortieren oder der Elektronenmikroskopie finden auch zahlreiche zuverlässige serologische Untersuchungsmethoden oder die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) Anwendung. Frühere Probleme, wie das Warten auf einen signifikanten Antikörperanstieg in mehreren Verlaufspuren und die hierdurch verstrichenen Zeit bis zum Vorliegen eines endgültigen Ergebnisses, konnten durch die neueren Verfahren in der Diagnostik VHF, vor allem durch die Reversen Transkriptase (RT-) PCR oder IgM-Tests, deutlich verkürzt werden (11, 12). Die Serologie stellt ein breites Feld in der Diagnostik von VHF dar. Zu den klassisch angewandten Verfahren werden beispielsweise der Hämagglutinationshemmtest (HAH), der zum Nachweis von Antikörpern gegen Alpha-, Flavi- und Bunyaviren genutzt werden kann, der Virusneutralisationstest (VNT), die Komplementbindungsreaktion (KBR), die indirekte Fluoreszenz Antikörpertechnik (Immunfluoreszenz Assay, IFA) und der Agar-Gel-Präzipitationstest gezählt. Zu den neueren und heutzutage zunehmend angewandten Verfahren gehören Enzym-linked-immunosorbent assay (ELISA-) Tests und Radioimmunassays. Auch wenn sie den Nachteil besitzen bei antigenverwandten Virusarten häufig gruppenspezifisch zu reagieren, können sie durch eine Vielzahl an Vorteilen überzeugen. Sie sind spezifisch gegenüber den relevanten Immunglobulintypen. Darüber hinaus liefern sie ein frühes und schnelles Diagnostikergebnis, auf dessen Basis eine begründete Verdachtsdiagnose ausgesprochen werden kann und für das zudem eine einzige Probe ausreichend ist. Weiterhin kann durch die Verwendung von ELISA-Tests mit gentechnisch hergestellten hochgereinigten Virusteilantigenen anstelle von kompletten Viruspartikeln das Infektionsrisiko für das Laborpersonal gesenkt werden (11).

Häufig angewandt wird auch die Anzucht von Viren auf Zellkulturen, meist VERO-Zellen. Hierunter wird eine etablierte Zelllinie verstanden, die aus Nierenzellen der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen wurde und von einer Vielzahl verschiedenster Viren infiziert werden kann (27). Die Zellkultur stellt ein sehr zuverlässiges Verfahren dar, ist jedoch zeitaufwändig. Zudem stellt der zytopathische Effekt ein eher unspezifisches Zeichen für Viruswachstum dar, weshalb eine zusätzliche Differenzierung beispielsweise mittels Immunfluoreszenz unabdingbar ist (11).

Bei einer hohen Viruslast von mehr als 10^7 Viruspartikeln/ml Serum und einer für das Virus spezifischen Morphologie, wie beispielsweise bei den Filoviren, ist die Detektion mittels

Elektronenmikroskopie (EM) eine weitere, häufiger angewandte Methode (12). In einer Studie von Biel *et al.* konnte 2004 gezeigt werden, dass bei einer Viruskonzentration von 10^6 Viruspartikeln/ml die Nachweiswahrscheinlichkeit des Virus mittels EM 50% beträgt (28).

Ähnlich wie in vielen anderen Diagnostikbereichen findet heutzutage auch in der Diagnostik VHF der Erregernukleinsäurenachweis mittels PCR zunehmend Anwendung. Durch die bereits in anderen Bereichen gesammelten Erfahrungswerte mit dieser Methode und ihre vielfältige Einsatzmöglichkeit, besitzt sie viele Vorteile. Sie stellt ein vergleichsweise schnelles, sehr sensitives und spezifisches Verfahren dar. Sofern die Proben in den ersten Krankheitstagen gewonnen wurden, können sie auch für einige Tage gekühlt zwischengelagert werden, ohne dass dies Einfluss auf das Diagnostikergebnis hat. Der Virusnachweis kann außerdem aus verschiedensten gewonnenen Probenmaterialien, wie z.B. Blut oder Liquor erfolgen, das mittels „GIT“-Puffer-Behandlung inaktiviert wird. GIT-Puffer bezeichnet Guanidinium-Isothiocyanat, das zur Zelllyse und gleichzeitigem Schutz vor endogenen RNAsen dient (11, 12, 29).

Von den genannten Verfahren werden in der Diagnostik deutscher Hochsicherheitslabore vor allem die IFA, ELISA, EM, PCR, Virusisolation (VI), der VNT sowie die Nukleinsäure-Sequenzierung und der Western Blot (WB) angewandt (laut einer Liste der ENIVD für geeignete Laboratorien zur Durchführung der einzelnen Verfahren, Tabelle 2).

Letztendlich ist für die Zeit, die benötigt wird, bis eine begründete Verdachtsdiagnose ausgesprochen werden kann, die gewählte Untersuchungsmethode entscheidend. So könnte sie mittels Elektronenmikroskopie binnen 90 min oder mit fixierten Proben schon nach 20 min gestellt werden, bei der PCR beträgt die in Anspruch genommene Zeit weniger als 12 h. Die VI benötigt zum Teil sogar mehrere Tage oder Wochen bis zum Vorliegen eines Ergebnisses (10).

Abbildung 3 zeigt die schematische Darstellung der Diagnostik eines VHF nach den Vorgaben des Bundesamts für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe. Hiernach gilt eine Probe als bestätigt positiv, wenn eine positive Kultur, ein positiver Nukleinsäure-Nachweis und ein nachgewiesener Antikörperanstieg vorliegt (10).

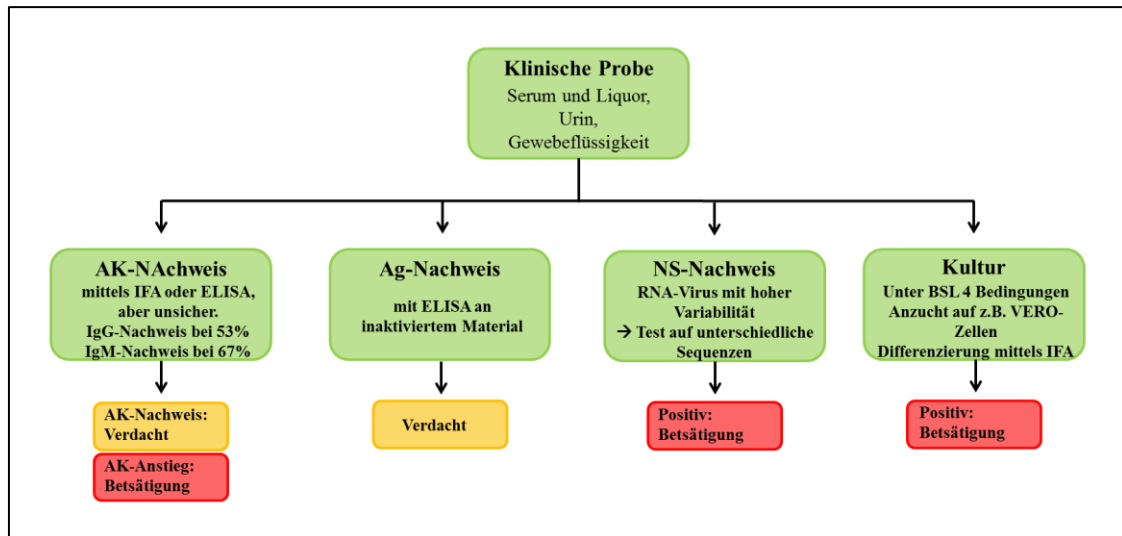


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Diagnostik VHF. In der Diagnostik VHF können verschiedene Diagnostikverfahren eingesetzt werden. Als diagnostisch bestätigt gilt, nach den Empfehlungen des Bundesamtes für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, eine klinische Probe bei positiver Kultur, positivem Nukleinsäurenachweis und einem nachgewiesenen Antikörperanstieg. Aufgrund der Variabilität der RNA-Viren wird empfohlen die Diagnostik von zwei Laboren parallel durchführen zu lassen sowie verschiedene Diagnostikverfahren parallel anzuwenden (10).

Tabelle 2: Angewandte Verfahren deutscher Labore in der Diagnostik viral bedingter hämorrhagischer Fieber nach Auflistungen der ENIVD

Diagnostikverfahren	IFA	EIA	NT	PCR	SEQ	WB	EM	VI
Virus								
Alkhurma Virus	keine Diagnostikverfahren vorhanden							
Chikungunya Virus	+	-	+	+	+	-	+	+
CCHFV	+	+	-	+	+	-	+	+
Dengue Virus	+	+	-	+	+	-	+	+
Filo Viren	+	+	-	+	+	-	+	+
Hanta Virus	+	+	-	+	+	+	-	+
Hendra Virus	keine Diagnostikverfahren vorhanden							
Lassa Virus	+	-	-	+	+	-	-	+
Nipah Virus	+	-	-	+	+	+	+	+
RVFV	+	+	+	+	+	+	-	+
WNV	+	+	+	+	+	-	+	+
YFV	+	+	+	+	+	-	+	+

IFA = Immunfluoreszenz Assay; EIA= Enzym Immuno Assay; NT = Neutralisationstest; SEQ = Sequenzierung; WB = Western Blot; EM = Elektronenmikroskopie; VI = Virusisolation

1.8 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation kleinster Mengen Nukleinsäure *in vitro*. Sie wird heutzutage in einer Vielzahl von Bereichen der Biowissenschaften verwendet (30).

Ausgangspunkt für eine PCR bildet ein DNA-Template, das amplifiziert werden soll. Für eine PCR-Reaktion werden zwei sogenannte Primer benötigt. Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge von ungefähr 15-30 Basenpaaren (bp), die komplementär zum 3' Ende der Stränge des DNA-Templates sind und die zu amplifizierende Sequenz einschließen. Außerdem müssen die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die von der Polymerase, zur Synthese der neuen DNA-Fragmente benötigt werden, zur Reaktion hinzugegeben werden (30, 31).

Das Prinzip der PCR beruht auf drei verschiedenen Temperaturschritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Diese laufen in sich wiederholenden Zyklen ab. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 4 dargestellt (30, 31).

Die Schlüsselrolle der PCR nimmt das Enzym Taq-Polymerase ein. Es stammt ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* und besitzt ein Temperaturoptimum bei ca. 72°C. Es ermöglicht durch seine Hitzestabilität die Synthese des komplementären DNA-Stranges, während der Elongation auf einem hohen Temperaturniveau, wodurch eine erneute Hybridisierung der zuvor aufgetrennten DNA-Fragmente verhindert werden kann (30).

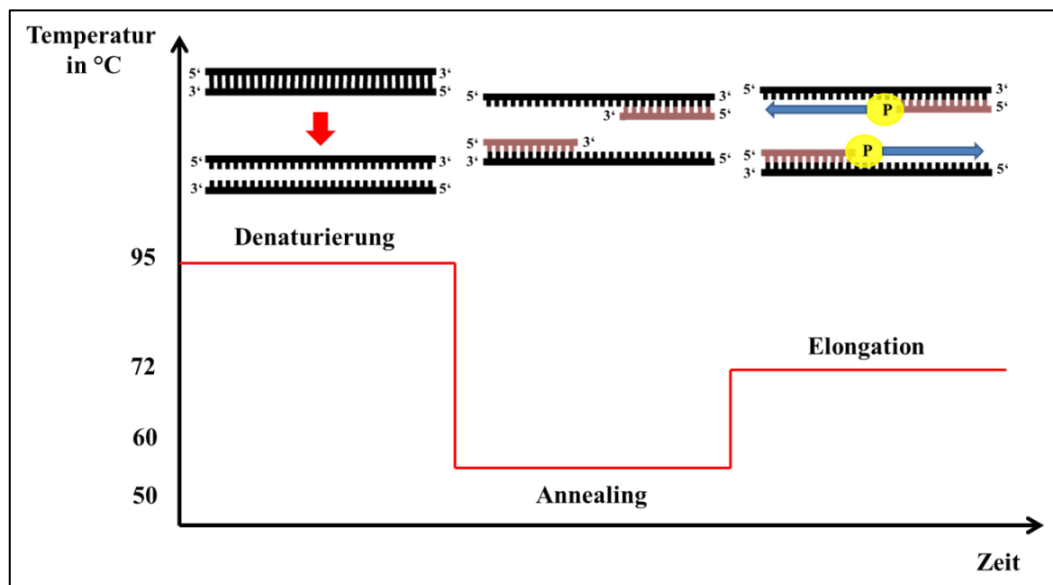


Abbildung 4: Funktionsprinzip der PCR. Die PCR besteht aus drei Temperaturschritten, die aufeinanderfolgend, in sich wiederholenden Zyklen, ablaufen. Im ersten Schritt, der Denaturierung erfolgt die Auftrennung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge, bei Temperaturen $> 90^{\circ}\text{C}$. Im darauffolgenden Schritt, dem Annealing, hybridisieren die jeweiligen komplementären Primer mit dem einzelsträngigen DNA-Template. Die Temperatur ist hierbei abhängig von den gewählten Primern und liegt meist etwas unter der Schmelztemperatur der Primer ($50\text{-}75^{\circ}\text{C}$). Im letzten Schritt eines Zyklus, der Elongation wird bei $72\text{-}78^{\circ}\text{C}$ mittels Taq-Polymerase der komplementäre DNA-Strang von den Primern ausgehend in $5'$ zu $3'$ Richtung synthetisiert, so dass am Ende wieder zwei doppelsträngige DNA-Fragmente vorliegen, bevor ein neuer Zyklus startet. Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich somit theoretisch pro Zyklus (2^n , n = Anzahl der Zyklen) (31).

In dieser Arbeit fanden verschiedene PCR-Systeme in Abhängigkeit von der Ziel-Nukleinsäure (DNA oder RNA) Anwendung. Zur Amplifikation von viraler RNA kam das Prinzip der one-step RT-PCR zum Einsatz, bei der zunächst in einem vorgeschalteten Schritt die RNA in cDNA umgeschrieben wird und anschließend im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert wird. Weiterhin fand neben den konventionellen PCR-Verfahren die *real-time* PCR als quantitatives PCR-Verfahren Anwendung. Hier wird mittels einer sequenzspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonde, die Menge des amplifizierten PCR-Produktes direkt während der Amplifikation (in Echtzeit, also *real-time*) sichtbar gemacht. Weiterhin kann anhand des generierten Fluoreszenzsignals zusätzlich eine quantitative Aussage über die Nukleinsäuremenge in einer Probe gemacht werden.

Der Ct-Wert bietet die Möglichkeit einer Quantifizierung. Er beschreibt den Schwellenwert, der während der *real-time* PCR generierten Amplifikationskurve, bei dem sich das Fluoreszenzsignal signifikant von den Hintergrundsignalen abhebt. Durch das Mitführen eines Plasmid-Standards und das Erstellen einer Standardkurve ist die Umrechnung des erreichten Ct-Wertes der Probe in die vorhandene DNA-Konzentration möglich (31).

In dieser Arbeit kamen ausschließlich sogenannte Taqman Sonden zum Einsatz. Diese Sonde besitzt an ihrem 5' Ende einen Reporterfarbstoff und am 3' Ende einen sogenannten Quencher. Bei intakter Sonde wird die anregende Energie des Reporterfarbstoffes auf den nahe gelegenen Quencher übertragen (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Hierdurch wird die Fluoreszenz so abgeschwächt, dass sie in einem niedrigen, nicht detektierten Energieniveau liegt. Während der Elongation zerschneidet die Taq-Polymerase mittels ihrer 5'-3' Exonukleaseaktivität die Sonde. Hierdurch kommt es zur räumlichen Trennung des Quenchers vom Reporterfarbstoff, wodurch ein messbares Fluoreszenzsignal generiert wird, das proportional zur gebildeten Menge des PCR-Produktes ist (Abbildung 5) (32).

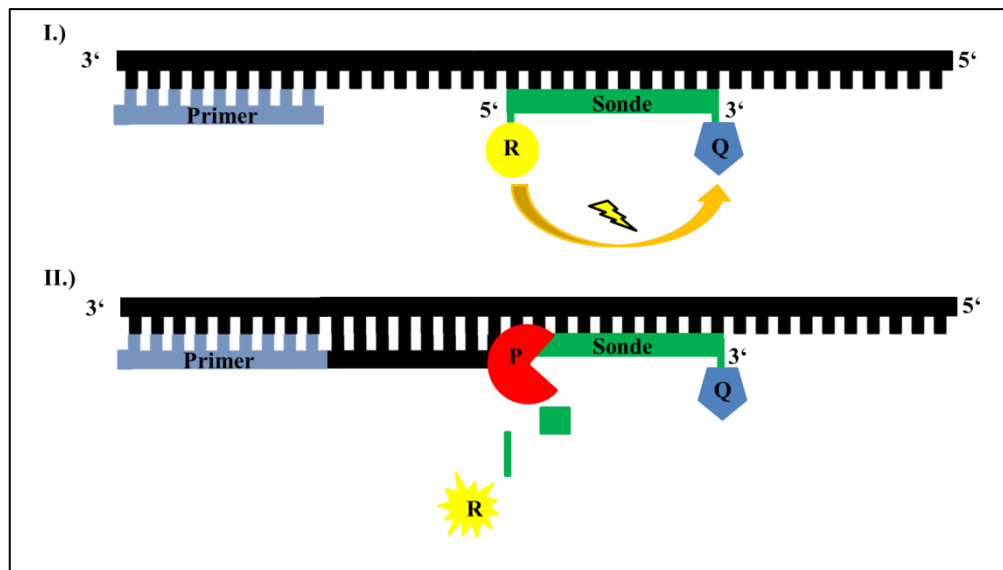


Abbildung 5: Funktionsprinzip der Taqman Sonde im 5' Nuklease Format. In der Annealingphase kommt es zur Anlagerung des Primers und der sequenzspezifischen Sonde an das komplementäre DNA-Template. Die Sonde ist zu diesem Zeitpunkt noch intakt, so dass die anregende Energie des Reporterfarbstoffes (R) auf den Quencher (Q) übertragen wird (I.). In der Elongationsphase zerschneidet die Taq-Polymerase (P) mittels ihrer 5'-3' Exonukleaseaktivität die Sonde, woraus eine räumliche Trennung des Reporterfarbstoffes von dem Quencher resultiert und ein Fluoreszenzsignal generiert wird (II.) (nach 32).

1.9 Die Pyrosequenzierung (PSQ)

Anschließend an die PCR kann eine DNA-Sequenzierung des PCR-Produktes erfolgen. Dieses Vorgehen bietet verschiedenste Vorteile. Zum einen kann ein positives PCR-Ergebnis bestätigt werden, zum anderen ermöglicht die Sequenzierung die genaue Typisierung des in der PCR detektierten Erregers. Dies kann für die Therapieentscheidung in der Klinik wichtig sein, da über die Sequenz Informationen über den Ursprung, die Übertragung und eventuelle genetische Veränderungen des Erregers zu erhalten sind (33).

Häufig wird die DNA-Sequenzierung nach Sanger mittels der Kettenabbruchmethode angewandt. Sie bietet ein gut etabliertes und zuverlässiges Verfahren, das jedoch aufgrund der zum Teil langen gelesenen Sequenzen von bis zu 1000 Basen und seinem zweistufigen Ablauf, mit vorgeschalteter Sequenzierungsreaktion und anschließender Auftrennung der Einzelstrangfragmente, vergleichsweise viel Zeit benötigt (34). Eine Alternative hierzu bietet die PSQ. Sie besitzt ebenfalls eine hohe Genauigkeit, ermöglicht die parallele Sequenzierung vieler Proben und kann darüber hinaus leicht automatisiert werden. Durch ihre kurzen gelesenen Sequenzen von 30-50 Basen ist sie deutlich schneller als die Kettenabbruchmethode und durch eine gezielte Wahl der verwendeten Primer reicht die Anzahl der gelesenen Basen meist zur genaueren Typisierung des Erregers aus (35, 36).

Den Ausgangsstoff für die PSQ-Reaktion bildet ein einzelsträngiges DNA-Fragment. Die in die PSQ eingesetzte DNA wird in der vorgeschalteten PCR gewonnen und dort mit Biotin modifiziert. Hierzu trägt einer der beiden PCR-Primer an seinem 5' Ende ein Biotinmolekül, wodurch der mit diesem Primer synthetisierte DNA-Strang mit Biotin markiert wird. Da Biotin eine starke Verbindung mit Streptavidin eingeht, kann in einem vorgeschalteten Waschschritt mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten Sepharosekügelchen eine Aufreinigung des biotinylierten DNA-Stranges erfolgen. Die eigentliche Sequenzierung erfolgt dann während der Synthese des komplementären DNA-Stranges zum biotinylierten Matrizenstrang im Pyromark Q96 ID Gerät. Das genaue Funktionsprinzip der PSQ-Reaktion ist in Abbildung 6 dargestellt. Das Gerät generiert schließlich aus den erhaltenen Lichtsignalen der PSQ-Reaktion ein sogenanntes Pyrogramm. Aus dem Pyrogramm lässt sich die Sequenz ablesen, die komplementär zu dem, aus der PCR, eingesetzten DNA-Strang ist (35, 36).

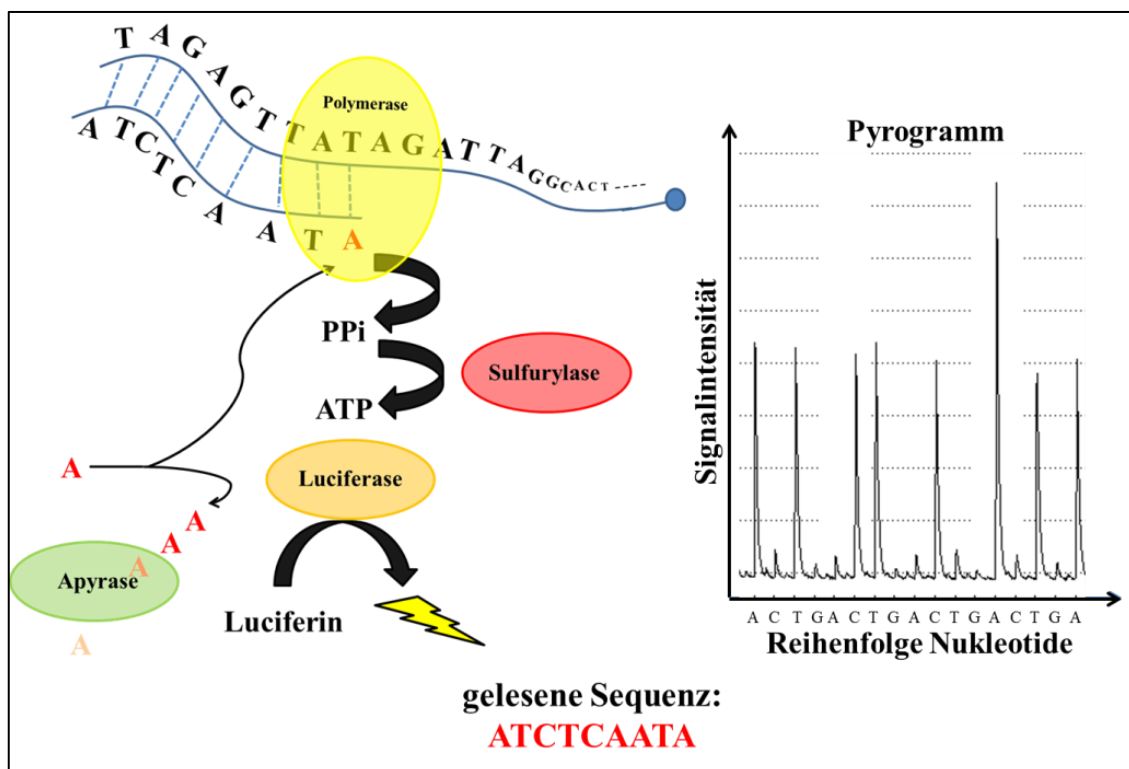


Abbildung 6: Funktionsprinzip der PSQ. Der, zuvor in der konventionellen PCR-Reaktion mit Biotin markierte, DNA-Einzelstrang wird mit Streptavidin-Sepharose aufgereinigt und zusammen mit dem PSQ-Primer zur PSQ-Reaktion hinzugegeben. Neben einem Enzym- und Substratmix werden über das Gerät, in zyklischer Gabe die vier Nucleotide nacheinander zur Reaktion hinzugegeben. Von der DNA-Polymerase werden die komplementären Nucleotide zum Matrizenstrang eingebaut. Beim Einbau wird über eine Enzymkaskade ein Lichtsignal generiert, dessen Intensität proportional zur Anzahl der eingebauten Nucleotide ist. Nicht eingebaute Nucleotide oder überschüssige Nucleotide werden durch die Apyrase abgebaut, bevor ein neuer Zyklus mit einem neuen Nucleotid beginnt (nach 35,36).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

In der Diagnostik der, in Deutschland für die Detektion hämorrhagischer Fieberviren qualifizierten, Labore kommt eine Vielzahl verschiedener Diagnostikverfahren zur Anwendung. Diese unterscheiden sich stark in ihrer Spezifität und Sensitivität und darüber hinaus in der Zeit bis zum Vorliegen eines endgültigen Ergebnisses. Gerade in der Diagnostik hochpathogener Erreger besitzt ein zuverlässiges und zugleich schnelles Diagnostikverfahren einen hohen Stellenwert. Mit diesen Anforderungen wurde in dieser Arbeit ein neues molekularbiologisches Diagnostikverfahren entwickelt und etabliert. Dazu wurden im Einzelnen folgende Ziele definiert:

- **Spezifischer Nachweis hämorrhagischer Fieberviren mittels PSQ.** Anhand der Kombination aus konventioneller PCR und PSQ soll ein sensitiver und spezifischer Nachweis mit Klassifizierung der einzelnen hämorrhagischen Fieberviren erfolgen. Durch die Etablierung einer internen RNA-Kontrolle als Extraktions- und Amplifikationskontrolle soll die Zuverlässigkeit dieses Nachweises zusätzlich erhöht werden.
- **Spezifischer Nachweis differentialdiagnostisch relevanter RNA- und DNA-Erreger der Tropen und Subtropen mittels PSQ.** Da bei unklarem Fieber nach Aufenthalt in den Tropen und Subtropen neben einem viral bedingten hämorrhagischen Fieber eine Vielzahl weiterer Infektionskrankheiten, sowohl viraler als auch bakterieller und parasitärer Genese, in Frage kommt, soll der sensitive und spezifische Nachweis mittels konventioneller PCR und PSQ auf eine Reihe weiterer differentialdiagnostisch relevanter Erreger erweitert werden. Zusätzlich soll für die DNA-Erreger ebenfalls eine interne Kontrolle für die PCR und PSQ etabliert werden.
- **Vereinheitlichung der Reaktionsbedingungen der einzelnen PCRs und Etablierung von Virus-Assay-Kombinationen sowie einer Pan-Flavi-PSQ.** Hierdurch soll die Testung einer Serumprobe auf eine große Anzahl differentialdiagnostisch relevanter Erreger in kürzester Zeit (wenige Stunden), parallel und mit wenig Material ermöglicht werden, so dass die einzelnen erregerspezifischen Nachweise, aus konventioneller PCR und PSQ, zu einer Two Step Screeningmethode zusammengefügt werden können.

- **Erarbeitung eines Ablaufschemas für den Einsatz der entwickelten TwoStep Screeningmethode in der Diagnostik.** Dieses soll als Leitfaden dienen, eine Serumprobe mit dem entwickelten Screeningverfahren, von der Nukleinsäureextraktion über die Auswertung bis zum endgültig vorliegenden Screeningergebnis, auf ein breites Erregerspektrum testen zu können.
- **Testung der etablierten PCR- und PSQ-Assays anhand von Nukleinsäuren und Durchführung eines Screenings unbekannter RNA-Proben auf alle viralen Erreger dieser Arbeit.** Die Etablierung der einzelnen PCR- und PSQ-Assays erfolgt anhand synthetisch hergestellter Kontrollplasmide. Zur Funktionstestung dieser Assays und Validierung der so ermittelten Ergebnisse soll eine Testung mit bekannten Nukleinsäuren zu den einzelnen Erregern erfolgen. Zusätzlich soll zur Validierung des entwickelten Two Step Screeningverfahrens ein Screening unbekannter RNA-Proben auf alle ausgewählten Viren dieser Arbeit durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Nukleinsäuren und Plasmide

Zur Etablierung von PSQ Assays wurde die gesamte RNA von folgenden Viren: CCHFV, Lassa Virus, RVFV, von Allen Grolla, Public Health Agency of Canada, Winnipeg, Kanada bereitgestellt. Die DNA für folgende Bakterien: *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica subsp. enterica*, wurde freundlicherweise von Ricarda Andrich und Astrid Lewin, RKI, Berlin, Deutschland bereitgestellt. Zur Validierung der PSQ-Assays der hämorrhagischen Fiebertypen wurden 222 bereits extrahierte RNA-Proben aus Humansenen freundlicherweise von Jonas Schmidt-Chanaitz, BNI, Hamburg, Deutschland zur Verfügung gestellt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über alle in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäuren.

Kontrollplasmid (PCR) pKoMa Bio & Sell, Nürnberg, D
 Kontrollplasmide (PSQ) für alle Life Technologies, Carlsbad, USA
 ausgewählten Erreger

Tabelle 3: Überblick über alle verwendeten Nukleinsäuren

Erreger	Stamm/ Accession Nummer	Bezeichnung der Erreger-nukleinsäure	Art der Nukleinsäure	Herkunft
<i>Flaviviridae</i>				
Dengue Virus 1	ATCC VR-344	Den1	RNA	ZBS1, RKI
Dengue Virus 2	ATCC VR-345	Den2	RNA	ZBS1, RKI
Dengue Virus 3	ATCC VR-1256	Den3	RNA	ZBS1, RKI
Dengue Virus 4	ATCC VR-1257	Den4	RNA	ZBS1, RKI
Frühsommer- Meningoenzephalitis (FSME) Virus	AF091010	FSME K603	RNA	ZBS1, RKI
	RKI Referenzstamm	FSME Louping ill		
japanische Enzephalitis Virus	ATCC SA14- 14-2	JEV	RNA	ZBS1, RKI
Usutu Virus	AY453411	Usutu	RNA	ZBS1, RKI
West-Nil-Virus	H. Bin, SMC, Israel lineage 2 AY532665, lineage 1	WNV Israel	RNA	ZBS1, RKI
		WNV Uganda		
YFV	X03700	YFV 17D	RNA	ZBS1, RKI
	RKI Referenzstamm	YFV ASIBI		
	RKI Referenzstamm	YFV Brazil		
	RKI Referenzstamm	YFV Ivory Coast		

fortgesetzt

Erreger	Stamm/ Accession Nummer	Bezeichnung der Erregernukleinsäure	Art der Nukleinsäure	Herkunft
<i>Bunyaviridae</i>				
CCHFV		CCHF RNA1 CCHF RNA2	RNA	A. Grolla, Winnipeg
RVFV		RVF RNA1 RVF RNA2	RNA	A. Grolla, Winnipeg
Hanta Viurs		RNA G	RNA	ZBS1, RKI
<i>Togaviridae</i>				
Chikungunya Virus	ST05.African isolate LR 2006	Chik. african isolate Chik. LR2006	RNA	ZBS1, RKI
Sinbis Virus	RKI Referenzstamm	Sinbis	RNA	ZBS1, RKI
<i>Arenaviridae</i>				
Lassa Virus		Lassa	RNA	A. Grolla, Winnipeg
<i>Old World Arenaviridae</i>				
Lymphozytäre Choriomeningitis Virus		LCMV	RNA	ZBS1, RKI
Mobala Virus		Mobala	RNA	ZBS1, RKI
Mopeia Virus		Mopeia	RNA	ZBS1, RKI
<i>Filoviridae</i>				
Ebola Virus		Ebola Ebola Zaire	RNA	ZBS1, RKI
Marburg Virus		Marburg	RNA	ZBS1, RKI
Bakterien /Parasiten				
<i>Mycobacterium bovis</i>		M. bovis	DNA	A. Lewin, FG16, RKI
<i>Plasmodium falciparum</i>		P. falciparum	DNA	ZBS1, RKI
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	S. typhi	DNA	R. Andrich, ZBS2, RKI

2.2 Oligonukleotide

In den folgenden Tabellen 4 und 5 sind die verwendeten Oligonukleotide für die einzelnen PCR- bzw. PSQ-Ansätze aufgeführt. Vorwärts-Primer sind mit „F“ und Rückwärts-Primer mit „R“ bezeichnet. PSQ-Primer sind mit „PS“ benannt, biotinylierte Primer sind mit „biotin“ gekennzeichnet. Sonden sind mit „TM“ (TaqMan) benannt. In den Sequenzen wird die Base „G“ klein geschrieben, um Verwechslungen mit „C“ vorzubeugen. Folgende Abkürzungen werden verwendet: FAM = FAM Markierung (Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein), BBQ =

Black Berry Quencher, NFQ = *Non-fluorescent quencher*. Folgende Buchstaben stehen für degenerierte Basen: R = (A/G), W = (A/T), K = (T/G), Y = (C/T), N = (A/G/T/C).

^a Accession Nummer der ncbi (National Center for Biotechnology Information) Gen-Datenbank mit entsprechender Lokalisation der Oligonukleotide

Tabelle 4: Primer und Sonden für die PCRs und Pyrosequenzierungen der RNA-Viren

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR-Produktes und Sequenz (5'--> 3')	Eintrag in Gendatenbank ^a	Referenz
Alkhurma Viurs (167 bp)		AY727575	
Alk F	AgTggTCAAAGTggCTCgC	54-72	n.p.
Alk R bio	Biotin-AgTCTgATggCCCgATCAC	229-211	
Alk PS	AgACCAACgTggTTCAG	117-133	
Chikungunya Virus (83 bp)		AF490259	
ChikS bio	Biotin-TgATCCCgACTCAACCATCCT	241-261	(37)
ChikAs	ggCAAACgCAgTggTACTTCCCT	323-303	
ChikAs PS	AACgCAgTggTACTTCC	319-303	
Crim-Congean Fever Virus (181 bp)		AY297691	
RWC F bio	Biotin-CAAggggTACCAAgAAAAgAAgAAggC	1068-1095	(38)
RWC R	gCCACAgggATTgTTCCAAAgCAgAC	1248-1223	
RWC R PS	ggATTgTTCCAAAgCAgAC	1241-1223	
Dengue Virus (511 bp)		HQ012538	
Den F bio	Biotin-TCAATATgCTAAAACgCgCgAgAAACCg	134-161	(39)
Den R	TTgCACCAACAgTCAATgTCTTCAggTTC	616-647	
Den R PS	AACAgTCAATgTCTTCAggTT	617-640	
Filoviren (221 bp)		EU224440	
FiloA2.4	AAgCATTTCCTAgCAATATgATggT	13340-13364	(40)
FiloA2.2	AAgCCTTTCCTAgCAACATgATggT	13340-13364	
FiloA2.3	AAgCATTCCCTAgCAACATgATggT	13340-13364	
Filo PS	ATTYCCTAgCAAYATgATggT	13344-13364	
Filo B bio	Biotin-ATgTggTgggTTATAATAATCACTgACATg	13589-13560	
Filo B-Ra bio	Biotin-gTgAggAgggCTATAAAAgTCACTgACATg	13589-13560	
Hanta Virus (452 bp)		AJ005637	
HAN-L-F1 bio	Biotin-ATgTAYgTBAGTgCWgATgC	2935-2954	(41)
HAN-L-R1/ PS	AACCADTCWgTYCCRTCATC	3386-3367	
Hendra (109 bp)		AF017149	
Hendra F	CATCAAgATTTACACTTCggACg	3089-3111	n.p.
Hendra R bio	Biotin-ATTgTCCTCAGgAgTAgTgTCAATg	3197-3173	
Hendra F PS	TCAAgATTTACACTTCggAC	3091-3110	
Lassa Virus (392 bp)		AY628202	
LVL3359D ⁺	AGAATYAGTGAAAGGGARAGCAATTC	3921-3895	(42)
LVL3359G ⁺	AGAATTAGTGAAAGGGAGAGTAACTC	3921-3895	
LVL3754A ⁺ bio	Biotin-CACATCATTTGGTCCCCATTTACTATGATC	3527-3555	
LVL3754D ⁻ bio	Biotin-CACATCATTTGGTCCCCATTTACTGTGATC	3527-3555	

fortgesetzt

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR-Produktes und Sequenz (5'--> 3')	Eintrag in Gendatenbank ^a	Referenz
LVL3359D ⁺ PS	ATTAgTgAAAaggAgAgCAATTC	3918-3895	
LVL3359G ⁺ PS	ATTAGTGAAAGGGAGAGTAACTC	3918-3895	
Nipah Virus (113 bp)		EU603758	
Nipah F	AAATCAAGTTGCAGAACTCGCT	74-95	
Nipah R bio	Biotin-CTCCRATGAGCACACCTCCTG	186-166	n.p.
Nipah F PS	CAAgTTgCAGAACTCgC	78-95	
Omsk Virus (89 bp)		AY438626	
Omsk F	gAggCYACAgACTCACACAACCC	9559-9581	
Omsk R bio	Biotin-AYCAGCATTCTTCCAaggCg	9647-9628	n.p.
Omsk F PS	gCYACAgACTCACACAACC	9562-9580	
Rift Valley Fever Virus (RVFV) (123 bp)		EU312138	
RVFV N up	gTCCgAgAgTTTgCTTATCAagg	1580-1558	
RVFV N up PS	CCgAgAgTTTgCTTATCAAg	1578-1557	(33)
RVFV N do1 bio	Biotin-gCCACgAgTYAgAgCCAgAAC	1458-1478	
West Nile Fever Virus (WNV) (144 bp)		DQ116961	
WNV F	CCTgTgTgAgCTgACAACTTAgT	10-33	
WNV R bio	Biotin-gCgTTTTAgCATATTgACAgCC	153-132	(43)
WNV F PS	gTgTgAgCTgACAACTTAgT	13-33	
Yellow Fever Virus (YFV) (66 bp)		X03700	
YFV 10664F bio	Biotin-gAgCCTCCgCTRCCACC	10664-10680	n.p.
YFV 10711R/PS	AgggTCTCCTCTAACCTCT	10729-10711	
Pan-Flavi (YFV Strain 268 bp)		NC_002031	
Flavi all F bio	Biotin-TACAACATgATggggAARAgAgARAA	8993-9019	
Den4 F bio	Biotin-TACAACATgATgggRAAACgTgAGAA	8996-9019	
Flavi all R	gTgCCCAgCCNgCKgTgTCATCWgC	9232-9260	
Flavi all R PS	AgCCNgCKgTgTCATCWg	9238-9259	n.p.
Sonde 3	FAM-Tg+gTWYATgT+ggYTNg+gRgC-BBQ	9062-9082	
	FAM-CCgTgCCATATggTATATgTggCTgggAgC-BBQ	9052-9081	
	FAM-TTCTggAATTTgAAgCCCTgggTTT-BBQ	9086-9012	
Interne RNA Kontrolle^b (88 bp)			
FCV F54 bio	Biotin-CgTTACCgCCACACCCAT		
FCV R141	gAgTTCACgAAAgATTTCAgACCAT		(33)
FCV R PS	CACgAAAgATTTCAgACCAT		
FCV TM	Tex-ACCCATCATCTAACACTCCCgCCAAT-BBQ		
c-myc^c (81 bp)		K01906	
c-myc F	gCCAgAggAggAACgAgCT	427-445	
c-myc R	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA	507-487	(44)
c-myc TM	Cy5-ATgCCCTgCgTgACCAgATCC NFQ	480-461	

^b RNA-Extraktions- und Amplifikationskontrolle (FCV), kein Eintrag in der Gen-Datenbank vorhanden

^c Extraktionskontrolle zur Detektion zellulärer Nukleinsäure

n.p. = nicht publiziert, PCR-Assay in Arbeitsgruppe vorhanden

Tabelle 5: Primer und Sonden für die PCRs und Pyrosequenzierungen der DNA-Erreger

Name	Assaybezeichnung, Länge des PCR-Produktes und Sequenz (5'--> 3')	Eintrag in Gendatenbank ^a	Referenz
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (164 bp)		CP001658	
MtubF	CTAggTCgggACggTgAggCCAgg	528706 - 528729	
MtubR bio	Bio-CATTgCgAAgTgATTCTCCggAT	528869 - 528846	(45)
MtubF PS	ACggTgAggCCAgg	528716 - 528729	
<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi</i> (132 bp)		AE014613	
ST F	CgCgAAgTCAgAgTCgACATAg	210867 - 210888	
ST R bio	Bio-AAgACCTCAACgCCgATCAC	210998 - 210979	(46)
ST F PS	CgAAgTCAgAgTCgACATAg	210869 - 210888	
<i>Leishmania sp.</i> (263 bp)		FN677358	
Leish F bio	Biotin-AgCTgGATCATTTTCCgATg	87-106	
Leish R	ATCgCgACACgTTATgTgAg	349-330	(47)
Leish R PS	gCgACACgTTATgTgAg	346-330	
<i>Plasmodium sp.</i> (209 bp)		GU816248	
P.sp. 683F bio	Biotin-TTgCAGTTAAAACgYTCgTAgTTg	69-92	
P.sp. 952R1	CTgTTTgCTTTgAACACTCTAATTTACTCA	277-248	
P.sp. 952R2	CCgTCTgTTATgAACACTTAATTTACTCA	277-248	
P.sp. PS1	gCTTTgAACACTCTAATTTACTC	270-249	n.p.
P.sp. PS2	CTgTTATgAACACTTAATTTACTC	272-249	
<i>Trypanosoma brucei</i> (148 bp)		AJ009142	
TryB F	TAgTTgAACTgTgggCCACg	681-700	
TryB F PS	TTgAACTgTgggCCAC	684-699	(48)
TryB R Bio	ATgCATgACATgCgTgAAAgt	828-802	
<i>Trypanosoma cruzi</i> (94 bp)		HQ335288	
TrpC F bio	CgAAAACgATCMgCCgACT	95-113	
TrpC R	CACTggACACCAAACAACYCTg	188-167	(49)
TrpC R PS	TggACACCAAACAACYCTg	185-167	
Interne Amplifikationskontrolle^d (139 bp)			
KoMa F	ggTgATgCCgCATTATTACTAgg	198-220	
KoMa R bio	Biotin-ggTATTAgCAGTCgCAggCTT	336-316	(33,50)
KoMa F PS	TgATgCCgCATTATTACTAg	196-219	
KoMa TM	TEX-TTCTTgCTTgAggATCTgTCgTggATCg q	224-251	

^d Synthetisches Plasmid als Interne Amplifikationskontrolle (PCR) bzw. Interne DNA Kontrolle (PSQ)

n.p. = nicht publiziert, PCR-Assay in Arbeitsgruppe vorhanden

2.3 Geräte

Die aufgeführten Geräte wurden verwendet. Geräte, die zur üblichen Laborausstattung gehören, sind nicht gesondert aufgelistet.

ABI 7500	Life Technologies, Carlsbad, USA
ABI StepOnePlus™	Life Technologies, Carlsbad, USA
PyroMark Q96 ID	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Q96 Vacuum Prep	Qiagen, Hilden, D
Sandbad	Techne / Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, D

2.4 Software

E.A.S.Y RH-3 (Gel-Dokumentation)	Herolab, Wiesloch, D
PyroMark Q96 ID Software v2.5.8	Qiagen, Hilden, D
StepOne™ Software v2.2.1	Life Technologies, Carlsbad, USA
7500 System SDS v2.0.5	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.5 Kits

PyroMark Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden, D
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum®Taq	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.6 Chemikalien

Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, D
Ethanol; technisch	Roth, Karlsruhe, D
Ladepuffer (6-fach)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Low DNA Mass Ladder	Life Technologies, Carlsbad, USA
MgCl ₂	Life Technologies, Carlsbad, USA
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
PCR-Puffer (10x)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Platinum® Taq DNA-Polymerase	Life Technologies, Carlsbad, USA
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, D

PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Wash Buffer	Qiagen, Hilden, D
Streptavidin Sepharose	GE Healthcare, Freiburg, D

2.7 Verbrauchsmaterialien

96-Well Mikrotiterplatte; Optical Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
Optical Adhesive Covers	Life Technologies, Carlsbad, USA
PyroMark Q96 Plate Low	Qiagen, Hilden, D
PyroMark Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden, D

3 Methoden

3.1 Etablierung und Validierung erregerspezifischer PCR- und PSQ-Assays

Für folgende Viren wurden PCR- bzw. PSQ-Assays entwickelt bzw. etabliert: Alkhurma Virus, Chikungunya Virus, CCHFV, Dengue Virus, Filoviren, Hanta Virus, Hendra Virus, Lassa Virus, Nipah Virus, Omsk Virus, RVFV, WNV, YFV sowie ein Pan-Flavi-Assay.

Weiterhin wurden PCR- und PSQ-Assays für folgende Bakterien und Parasiten entwickelt bzw. etabliert: *Mykobakterium tuberculosis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*, *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei sp. und cruzi*.

Zusätzlich wurden eine interne RNA-Kontrolle FCV (Felines Calcivirus) und eine interne DNA-Kontrolle KoMa als Amplifikations- und Extraktionskontrollen etabliert.

3.1.1 OneStep RT-PCR zur Amplifizierung von RNA

Zur Amplifizierung von viraler RNA sowie der internen RNA-Kontrolle FCV wurde das RT-PCR-Verfahren angewendet. Hierbei ist der eigentlichen PCR-Reaktion eine Reverse Transkription (RT) vorgeschaltet, bei der die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben wird. Verwendet wurde hierfür das kommerziell erhältliche OneStep RT-PCR-Kit von Qiagen, das alle benötigten Reagenzien in optimierter Konzentration enthält. Für den Reaktionsansatz wurden die Herstellerangaben eingehalten. Die verwendeten Primerkonzentrationen für die einzelnen Assays sind aus Tabelle 6 zu entnehmen. Das gewählte Temperaturprofil entspricht Tabelle 7, wobei die Herstellerangaben zur RT-Phase ebenfalls eingehalten wurden. Die PCR erfolgte am Eppendorf Thermocycler.

Tabelle 6: Reaktionsansatz für RT-PCR

Reagenz	25 µl Ansatz
5x RT-PCR Buffer	5 µl
dNTPs	0,4 µM
Primer F ^a	0,5 µM
Primer R ^a	0,5 µM
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 µl
Wasser	ad 24 µl
RNA	1 µl

^a Für Lassa Virus jeweils 2 F und R Primer mit je 0,4 µM eingesetzt; für die Pan-Flavi-PCR 2 F und ein R Primer mit je 0,4 µM eingesetzt; für Filovirus 3 F Primer äquimolar mit zusammen 0,5 µM und 2 R Primer äquimolar mit zusammen 0,5 µM eingesetzt.

Tabelle 7: Programm für RT-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
50°C	30 min	1
95°C	15 min	1
95°C	15 sec	
55°C ^a	30 sec	45
72°C	30 sec	
72°C ^b	5 min	1

^a Die Annealingtemperatur für die Pan-Flavi PCR beträgt 60°C.

^b zusätzlich eingefügter Elongationsschritt (siehe Abschnitt 4.2.3)

3.1.2 Konventionelle PCR zur Amplifizierung von DNA

Zur Amplifizierung der DNA der bakteriellen und parasitären Erreger sowie der internen DNA-Kontrolle KoMa, wurde die Platinum® Taq-Polymerase mit 10x Puffer verwendet. Die Konzentrationen für Primer, MgCl₂, und Nukleotide wurden für die einzelnen Assays, wie in Tabelle 8 aufgeführt, gewählt. Das Temperaturprofil entspricht Tabelle 9. Die PCR erfolgte am Eppendorf Thermocycler.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für konventionelle PCR

Reagenz	25 µl Ansatz
10 x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 µM
Primer F	0,5 µM
Primer R ^a	0,5 µM
Platinum Taq	1 U
Wasser	ad 24 µl
DNA	1 µl

^a für Plasmodium 2 R Primer äquimolar mit zusammen 0,5 µM eingesetzt.

Tabelle 9: Programm für konventionelle PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1
95°C	15 sec	
55°C ^a	30 sec	40
72°C	30 sec	

^a Annealingtemperatur für parasitäre Erreger-PCR-Assays 60°C.

3.1.3 Quantitative Gelelektrophorese

Durch Anwendung von konventionellen PCR-Verfahren für die erregerspezifischen Assays wurde zur Evaluierung und Quantifizierung der PCR-Produkte das Verfahren der quantitativen Gelelektrophorese gewählt. Hierzu werden 2 µl PCR-Produkt mit 1 µl 6-fach Ladepuffer gemischt und auf ein 2% iges Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthält, aufgetragen. Parallel dazu werden 2 µl eines Massenstandards (Low DNA Mass Ladder), ebenfalls gemischt mit 1 µl 6-fach Ladepuffer, aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 90 V in 1 x TAE Puffer für 30 min erfolgt die Auftrennung der einzelnen PCR-Produkte abhängig von ihrer Größe und Ladung. Die hieraus resultierenden Banden können mit Hilfe von UV-Strahlung sichtbar gemacht und mit der E.A.S.Y.RH-3 Software quantifiziert werden.

3.1.4 Pyrosequenzierung

Zur Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte wurde das Verfahren der PSQ angewendet. Die hierfür verwendeten Primer wurden auf der Basis vorhandener PCR-Assays konstruiert und sind aus Tabelle 4 und 5 zu entnehmen. Im Reaktionsansatz für die PSQ sollten 100-200 ng PCR-Produkt eingesetzt werden. Das daraus resultierende, einzusetzende Volumen wurde

anhand der Konzentration aus der quantitativen Gelelektrophorese für die einzelnen PCR-Produkte berechnet.

Die Aufreinigung des biotinylierten DNA-Einzelstranges erfolgte an der PyroMark Q96 Vacuum Workstation. Hierzu werden bis zu 25 µl PCR-Produkt mit 40 µl PyroMark Binding Buffer und 1,5 µl Streptavidin-Sepharose in eine Vertiefung der PCR-Platte gegeben und mit Wasser auf 80 µl aufgefüllt. Es folgt eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und weitere 5 min unter Schütteln (1400 rpm). Zur Denaturierung wird das PCR-Produkt aufeinanderfolgend für jeweils 5 Sekunden mit 70 % Ethanol, NaOH (0,2 M) und Waschpuffer (1-fach) inkubiert. Die hierbei entstandenen Einzelstränge werden anschließend in die PSQ-Platte gegeben, die 40 µl PyroMark Annealing Buffer und den PSQ-Primer (375 nM) enthält. (Ausnahme: Der Lassa Virus sowie *Plasmodium* PSQ-Assay besitzen jeweils 2 PSQ-Primer, so dass beide Primer in angegebener Konzentration in die PSQ-Platte gegeben werden.) Durch eine weitere Inkubation für 2 min im Sandbad bei 80°C, bindet der PSQ-Primer an den biotinylierten DNA-Einzelstrang. Die Sequenzierung erfolgte im PyroMark Q96 ID Gerät mit zyklischer Zugabe von Nukleotiden in der Reihenfolge CTGA (15-mal CTGA).

3.1.5 Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der PCR- und PSQ-Assays

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen der PCR bzw. PSQ-Reaktionen wurde für jeden Erreger das Kontrollplasmid zunächst von 10^4 Kopien in 1:10 Verdünnungsschritten auf 10^2 Kopien verdünnt, in die PCR eingesetzt und anschließend mittels PSQ sequenziert. Die letzte Verdünnung, bei der eine lesbare erwartete Sequenz generiert wurde, diente daraufhin als Ausgangsverdünnung für weitere kleinere Verdünnungsschritte. War eine Sequenz nur bis 10^4 Kopien lesbar, wurde auf 8000, 6000, 4000, 2000, 1000 und 500 Kopien herunterverdünnt, bei 10^3 auf 800, 600, 400, 200, 100 und 50 Kopien und bei 10^2 auf 80, 60, 40, 20, 10, 5 Kopien sowie eine Verdünnung von 200 Kopien erstellt. Parallel wurde in der Gelelektrophorese geprüft, bis zu welchem Verdünnungsschritt eine quantifizierbare Bande auf dem Gel nachweisbar ist, um die unteren Nachweisgrenzen der PCR zu ermitteln. Die PCR erfolgte am Eppendorf Thermocycler, der Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil für die RNA-Viren entsprechen Tabelle 6 und 7, der Reaktionsansatz und das Temperaturprofil der DNA-Erreger entsprechen Tabelle 8 und 9.

3.2 Etablierung eines TwoStep Screeningverfahrens für Humanserumproben auf alle ausgewählten Tropeninfektionserreger dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer TwoStep Screeningmethode, bestehend aus PCR mit anschließender PSQ, mit der Humanserumproben innerhalb kürzester Zeit auf das Vorhandensein verschiedener Erreger (bzw. deren Nukleinsäuren) getestet werden können. Hierzu wurden neben den genannten erregerspezifischen PCR- und PSQ-Assays unter 3.1. zusätzlich Virus-Assay-Kombinationen etabliert. Um die verschiedenen PCRs gleichzeitig durchführen zu können, wurden die Annealingtemperaturen der PCR-Primer so angepasst, dass die RNA-Erreger-Assays (Filo-, Hanta-, Lassa-, Nipah-, Pan-Flavi sowie die Virus-Assay-Kombinationen Alkhurma und RVFV, Chikungunya und CCHFV, Omsk und Hendra Virus) auf einer PCR-Platte mit der internen RNA-Amplifikations- und Extraktionskontrolle FCV amplifiziert werden können. Auf einer weiteren PCR-Platte sollten die DNA-Erreger-Assays von *Mykobakterium tuberculosis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*, *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei* und *cruzi* sowie die interne DNA-Kontrolle pKoMA getestet werden. Als Positivkontrolle wurde zu jedem Assay das Kontrollplasmid in einer Konzentration von 10^4 Kopien/ μl und eine Negativkontrolle mitgeführt. Der Reaktionsansatz für die RNA-Erreger entspricht Tabelle 10, das Temperaturprofil Tabelle 7, wobei die Messung des Fluoreszenzsignals beim Annealingschritt erfolgte. Der Reaktionsansatz für die DNA-Erreger entspricht Tabelle 11, das Temperaturprofil Tabelle 9, wobei das Fluoreszenzsignal ebenfalls beim Annealingschritt gemessen wurde. Die PCRs wurden am ABI StepOnePlus™ durchgeführt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für Screeningmethode auf RNA-Erreger

Reagenz	25 μl Ansatz
5x RT-PCR Buffer	5 μl
dNTPs	0,4 μM
Primer F ^a	0,5 μM
Primer R ^a	0,5 μM
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 μl
Sonde ^b	0,2 μM
Wasser	ad 24 μl
RNA-Probe	1 μl

^a Für Lassa Virus jeweils 2 F und R Primer mit je 0,4 μM eingesetzt; für die Pan-Flavi-PCR 2 F und ein R Primer mit je 0,4 μM eingesetzt; für Filovirus 3 F Primer äquimolar mit zusammen 0,5 μM und 2 R Primer äquimolar mit zusammen 0,5 μM eingesetzt, bei den Kombinationen Alkhurma und RVFV, Chikungunya und CCHFV, Omsk und Hendra Virus für jeden Erreger jeweils den F und R Primer in angegebener Konzentration eingesetzt.

^b Sonde nur bei FCV hinzugegeben.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für Screeningmethode auf DNA-Erreger

Reagenz	25 μl Ansatz
10 x Puffer	2,5 μl
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 μM
Primer F	0,5 μM
Primer R ^a	0,5 μM
Platinum Taq	1 U
Sonde ^b	0,1 μM
Wasser	ad 24 μl
DNA	1 μl

^a Für Plasmodium 2 R Primer äquimolar mit zusammen 0,5 μM eingesetzt.

^b Sonde nur bei pKoMa hinzugegeben.

Die anschließende PSQ erfolgte wie unter 3.1.4 beschrieben. Es wurde jeweils 20 µl PCR-Produkt auf die vorbereitete PSQ-Platte gegeben, die in derselben Plattenbelegung wie die PCR-Platte vorbereitet wurde.

3.3 Unbekannte RNA-Proben aus Humanserum

Zur Funktionstestung und Validierung der entwickelten TwoStep Screeningmethode erfolgte, in Kooperation mit dem BNI in Hamburg, ein Screening von 222 unbekanntem RNA-Proben auf alle ausgewählten Viren dieser Arbeit. Die bereitgestellten Proben wurden bereits extern aus Humanseren extrahiert. Ihre Identität wurde erst nach den Versuchen im RKI bekannt gegeben. Bei den Proben handelt es sich um 34 vom BNI auf Dengue Virus positiv getestete Proben und 188 negativ auf Dengue Virus getestete Proben. Der Transport der RNA-Proben zum RKI erfolgte unter permanenter Kühlung und die Aufbewahrung der Proben bis zur Bearbeitung bei -80°C.

3.3.1 Testung der RNA-Proben mit den PCR- und PSQ-Assays der viralen Erreger

Alle Proben wurden blind, d.h. ohne Kenntnis der Ergebnisse des BNI nach demselben Verfahren bearbeitet. Hierzu wurde jede Probe mit den folgenden PCR- und PSQ-Assays getestet: Dengue-, Filo-, Hanta-, Lassa-, Nipah-, Pan-Flavi-, WNV-, YFV-Assay sowie den Virus-Assay-Kombinationen Alkhurma und RVFV, Chikungunya und CCHFV, Omsk und Hendra Virus. Die Reaktionsansätze für die PCR-Reaktionen entsprechen Tabelle 6, wobei für die genannten Virus-Assay-Kombinationen für jeden Erreger jeweils der F und R Primer in angegebener Konzentration eingesetzt wurde. Das Temperaturprofil entspricht Tabelle 7. Die PCR erfolgte am Eppendorf Thermocycler.

Nach bereits erfolgreicher Etablierung der verwendeten PSQ-Assays, wurden bei jeder Probe 20 µl PCR-Produkt direkt, ohne vorherige quantitative Gelelektrophorese, in die PSQ eingesetzt. Die PSQ wurde wie unter 3.1.4 beschrieben durchgeführt. Bei den Virus-Assay-Kombinationen wurde für jeden der beiden Erreger der jeweilige PSQ-Primer, in der angegebenen Konzentration von 375 nM, in die Vertiefung der PSQ-Platte gegeben.

Die generierten Sequenzen aus der PSQ wurden nach manueller Auswertung mit Hilfe des Nukleotid Blast (BLAST) der *ncbi* Datenbank ausgewertet und die Ergebnisse mit denen des BNIs abgeglichen.

3.3.2 *real-time* PCR-Verfahren zur Evaluierung der Ergebnisse der RNA-Proben

Zur Evaluierung der Ergebnisse aus 3.3.1 wurde zum Nachweis einer erfolgreich durchgeführten Extraktion am BNI mit allen Proben eine *c-myc real-time* PCR durchgeführt. Weiterhin wurde zur Quantifizierung der enthaltenen Nukleinsäuremengen mit den 34, im BNI auf Dengue Virus positiv getesteten, Proben eine DvAll *real-time* PCR durchgeführt.

3.3.2.1 Nachweis einer erfolgreichen Nukleinsäureextraktion mittels *c-myc real-time* PCR

Bei *c-myc* handelt es sich um ein Gen, das in humanen Zellen, wie den Blutzellen, kodiert ist. Eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion aus den humanen Seren kann über die Detektion des *c-myc* Gens nachgewiesen werden, da sich diese zelluläre Nukleinsäure neben der erregerspezifischen RNA in der Probe befindet. Die dazu verwendeten Primer und Sonden sind aus Tabelle 4 zu entnehmen. Der Reaktionsansatz entspricht Tabelle 12. Die PCR wurde am ABI 7500 mit dem Temperaturprofil in Tabelle 13 durchgeführt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für *c-myc real-time* PCR

Reagenz	25 µl Ansatz
10 x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	4 mM
dNTPs	0,1 µM
Primer F	0,3 µM
Primer R	0,3 µM
Platinum Taq	1 U
Sonde ^a	0,1 µM
Wasser	ad 24 µl
DNA	1 µl

^a FAM-Markierung

Tabelle 13: Programm für *c-myc real-time* PCR

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

Farblich markiert: Messung des Fluoreszenzsignals

3.3.2.2 DvAll *real-time* PCR zur Quantifizierung der Nukleinsäuremengen

Zur Quantifizierung der enthaltenen Nukleinsäuremengen wurde mit den 34, im BNI auf Dengue Virus positiv getesteten, Proben eine Dengue Virus *real-time* PCR durchgeführt. Hierzu wurde ein, am RKI bereits bestehender, generischer Dengue Virus PCR-Assay „Dvall“ mit dem OneStep RT-PCR-Kit von Qiagen verwendet. Die PCR wurde mit dem Reaktionsansatz in Tabelle 14 und dem Temperaturprofil in Tabelle 15 am ABI 7500 durchgeführt.

Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde ein Plasmid-Standard, der die Zielsequenz des Dengue Virus PCR-Assays enthält, von 10⁶ Kopien je Ansatz in 1:10

Verdünnungsschritten auf 10 Kopien verdünnt und eine weitere Verdünnung von 5 Viruskopien hergestellt. Diese Verdünnungen wurden parallel zu den Proben und in Doppelbestimmung in der PCR mitgeführt. Anschließend wurde aus den gemessenen Ct-Werten mit Hilfe der 7500 System SDS v2.0.5 Software eine Standardkurve generiert. Diese ermöglicht die Umrechnung von Ct-Werten in Kopien je Ansatz.

4 Ergebnisse

4.1 Schnelle und spezifische Detektion verschiedener Tropeninfektionserreger durch Kombination der Pyrosequenzierung mit der konventionellen PCR

4.1.1 Bedingungen zur Auswahl der erregerspezifischen PCRs

Über die Pyrosequenzierung kann eine spezifische Detektion verschiedener Infektionserreger erfolgen. Sie benötigt ein biotinyliertes PCR-Produkt der Zielsequenz, von welchem der biotinylierte Strang als Matrize für die PSQ Reaktion dient. Somit ist eine vorgeschaltete PCR-Reaktion notwendig. Durch die Kombination der konventionellen PCR mit anschließender Pyrosequenzierung soll in dieser Arbeit ein spezifischer und zugleich sensitiver Nachweis hämorrhagischer Fiebertypen sowie weiterer differenzialdiagnostisch relevanter Tropeninfektionserreger ermöglicht werden. Um das PCR-Produkt aus der vorgeschalteten PCR in die PSQ einsetzen zu können, sollten folgenden Bedingungen erfüllt sein:

- Das Amplikon sollte eine ungefähre Länge von 100-200 Basenpaaren aufweisen.
- Zur Erfassung möglichst vieler Varianten und Typen sollten die Primerbindungsstellen in, für die Erregergruppe, gut konservierten Bereichen liegen. Gleichzeitig sollte die Sequenz dazwischen auch ausreichend Unterschiede aufweisen, um anhand der kurzen gelesenen Sequenz von 30-50 Basen in der PSQ, einzelne Erreger Spezies oder Stämme differenzieren zu können.
- Die Sequenz *downstream* der PSQ-Primerbindungsstelle sollte wenig Homopolymere aufweisen, um eine gute Lesbarkeit der Sequenz in der PSQ zu garantieren.
- Zusätzlich sollte mit dem entwickelten Screeningverfahren eine parallele Testung eines breiten Erregerspektrums ermöglicht werden. Hierzu wurde bereits bei der Auswahl der PCRs auf ähnliche Annealingtemperaturen der Primer geachtet, um die verschiedenen Assays einfacher an dieselben Reaktionsbedingungen anpassen zu können.

Unter Beachtung der genannten Kriterien erfolgte eine Recherche in elektronischen Datenbanken zu bestehenden PCRs zu folgenden Erregern: Alkhurma Virus, Chikungunya Virus, CCHFV, Dengue Virus, Filoviren, Hanta Virus, Hendra Virus, Lassa Virus, Nipah Virus, Omsk Virus, RVFV, WNV, YFV, *Mykobakterium tuberculosis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*, *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei sp.* und *cruzi*. Eine Übersicht über die ausgewählten PCRs bieten Tabelle 4 und 5. Teilweise fanden bei einigen Erregern auch bestehende PCR-Assays aus dem RKI Anwendung.

4.1.2 Design der PSQ-Assays

Ausgehend von einem erregerspezifischen PCR-Assay wurde der dazugehörige PSQ-Assay designt. Dieser besteht aus einem PSQ-Primer und einem biotinylierten PCR-Primer. Theoretisch kann in der PSQ das PCR-Produkt von beiden Seiten sequenziert werden. Zur Konstruktion des PSQ-Primers bietet es sich daher an, entweder den Vorwärts- oder den Rückwärtsprimer des PCR-Assays als Basis für den PSQ-Primer zu verwenden, da dieser in jedem Fall an das PCR-Produkt binden sollte. Sofern bei einem dieser Primer eine geeignete Sequenz für die PSQ *downstream* der Bindungsstelle lag (siehe Abbildung 7), wurde dieser als PSQ-Primer gewählt und am 5' bzw. 3' Ende verkürzt, so dass er eine Schmelztemperatur von ca. 50°C besaß, wie es vom Hersteller der PSQ-Reagenzien empfohlen wird. Erst wenn sich keiner der beiden PCR-Primer als geeignet herausgestellt hat, wurde ein zusätzliches Oligonukleotid innerhalb des Amplikons als PSQ-Primer designt.

Zur Vervollständigung des PSQ-Assays wurde der andere PCR-Primer mit Biotin markiert, so dass PSQ-Primer und biotinylierter PCR-Primer auf komplementären DNA-Strängen liegen. Hierdurch wird es möglich, den mit diesem Primer synthetisierten Einzelstrang des PCR-Produktes mit Hilfe von Streptavidin-Sepharose auszuwaschen und als Template für den PSQ-Primer in der PSQ einzusetzen.

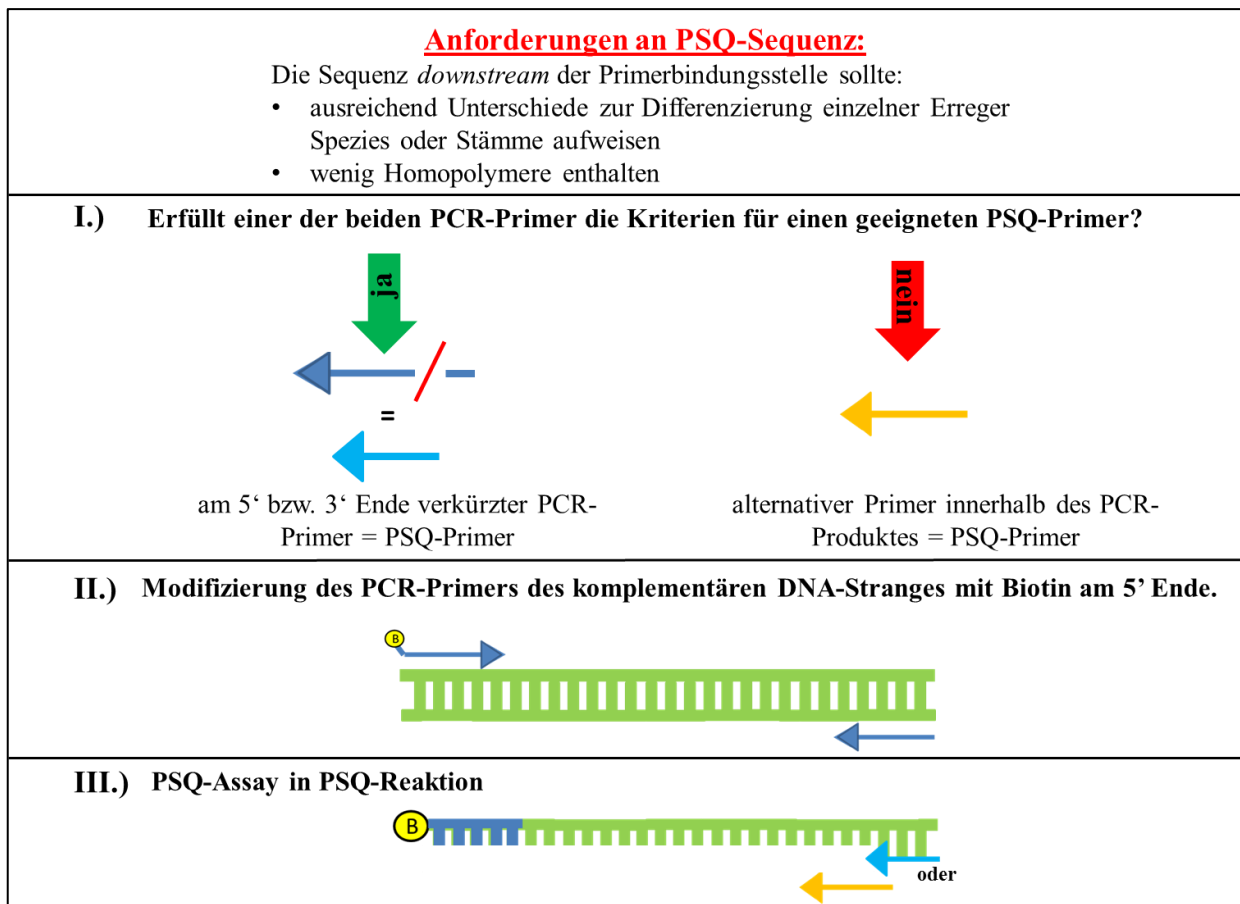


Abbildung 7: Design eines PSQ-Assays. Ausgehend von einem bestehenden PCR-Assay wird ein PSQ-Assay designt. Er besteht aus einem PSQ-Primer und einem mit Biotin markierten PCR-Primer, die auf komplementären Strängen des PCR-Produktes liegen. Kann einer der beiden PCR-Primer die Kriterien für einen geeigneten PSQ-Primer erfüllen, wird er am 5' bzw. 3' Ende verkürzt, bis er eine Schmelztemperatur von ungefähr 50°C aufweist und als PSQ-Primer eingesetzt. Diese Temperatur entspricht Herstellerangaben der PSQ-Reagenzien. Andernfalls erfolgt das Design eines weiteren Primers, der an das Amplikon bindet und die Kriterien erfüllt (I.). Der PCR-Primer des komplementären Stranges wird mit Biotin markiert (II.). Unter (III.) ist der fertige PSQ-Assay in der PSQ-Reaktion dargestellt.

4.1.3 Etablierung der erregerspezifischen PSQ-Assays

Die Etablierung und Optimierung der PSQ-Assays erfolgte anhand von synthetischen Plasmiden. Hierzu wurden verschiedene Kontrollen mit den einzelnen PSQ-Assays durchgeführt, die sicherstellen, dass Fehlerquellen ausgeschlossen werden können (Abbildung 8).

Bei allen getesteten PSQ-Assays waren die Kontrollen negativ. Lediglich beim richtigen PCR-Produkt in Kombination mit dem entsprechenden PSQ-Primer wurde ein auswertbares Pyrogramm mit der erwarteten Sequenz erzeugt. Alle weiteren Kontrollen waren negativ, das heißt, erzeugten keine lesbare Sequenz. Die Ergebnisse sprechen somit für die Funktionsfähigkeit der Assays, so dass sie für reale Proben eingesetzt werden können.




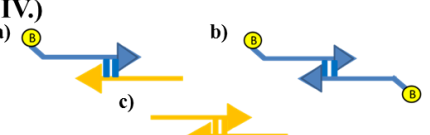

Fehlerquelle	Ansatz mit	Funktionsfähiger PSQ-Assay
I.)  Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb des biotinylierten Einzelstranges	PCR-Produkt ohne PSQ Primer	Kein Pyrogramm
II.)  Bio-Primer bindet am Amplikon	PCR-Produkt mit Bio-Primer	Kein Pyrogramm
III.)  PSQ-Primer bindet falsches Amplikon	PCR-Negativkontrolle mit PSQ-Primer	Kein Pyrogramm
IV.)  Ausbildung von Primerdimeren	Primerkombinationen ohne PCR-Produkt a) Bio-Primer + PSQ-Primer b) nur Bio-Primer c) nur PSQ-Primer	Kein Pyrogramm
V.)  PSQ-Primer bindet mehrfach am Amplikon	PCR-Produkt mit PSQ-Primer	Pyrogramm mit erwarteter Sequenz ohne Sequenzüberlagerungen

Abbildung 8: Kontrollen zur Detektion von Fehlerquellen bei der Etablierung eines PSQ-Assays. Gezeigt sind die einzelnen Kontrollansätze und die hiermit detektierbaren Fehlerquellen, sowie die Ergebnisse in der PSQ, die insgesamt die Funktionsfähigkeit eines PSQ-Assays belegen. Keiner der biotinylierten DNA-Einzelstränge der PSQ-Assays bildete Sekundärstrukturen aus, so dass kein Pyrogramm in der PSQ mit dem PCR-Produkt alleine erzeugt wurde (I.). Auch die Bio-Primer (biotinylierte PCR-Primer) der einzelnen Erreger haben nicht unspezifisch an das einzelsträngige PCR-Produkt gebunden, die PSQ war negativ (II.). Die PSQ-Primer aller Assays waren zudem spezifisch, da sie nicht unspezifisch an falsche PCR-Produkte gebunden haben. Die PCR Negativkontrollen waren auch in der PSQ negativ (III.) Darüber hinaus wurden bei den Ansätzen mit verschiedenen Primerkombinationen ohne PCR-Produkt keine Pyrogramme erzeugt, womit die Ausbildung von Primerdimeren ebenfalls ausgeschlossen werden kann (IV.). Beim Ansatz mit dem PCR-Produkt und dem jeweiligen PSQ-Primer wurde bei allen Erregern ein Pyrogramm mit der erwarteten Sequenz generiert, so dass gezeigt werden konnte, dass der PSQ-Primer spezifisch an der erwarteten Sequenz bindet (V.) (nach 33).

4.1.4 Testung der PSQ-Assays mit Erreger-Nukleinsäuren

Nach erfolgreicher Etablierung der PSQ-Assays mit den synthetisch hergestellten Kontrollplasmiden, erfolgte eine Testung dieser Assays mit Nukleinsäuren der einzelnen Erreger. Hierzu wurden RNAs bzw. DNAs verwendet, die bereits aus Humansenen extrahiert wurden (siehe Tabelle 3). Anhand der gelesenen Sequenz in der PSQ sollte eine eindeutige

Identifizierung des Erregers möglich sein, die über einen Abgleich der generierten Sequenz mit dem BLAST der *ncbi* Datenbank erfolgte.

Die PSQ Assays von CCHFV, Chikungunya Virus, Filoviren, Hanta Virus und RVFV wurden mit den verfügbaren erregerspezifischen RNAs getestet. Der Abgleich der generierten Sequenzen mit dem Nukleotid Blast der *ncbi* Datenbank ergab eindeutige Treffer für die einzelnen Viren, was zusätzlich die Funktionsfähigkeit dieser PSQs belegt.

Beim Lassa Virus Assay wurden, neben der Lassa Virus RNA, zusätzlich RNAs verschiedener Old World Arenaviren, dem Mobala, Mopeia und lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) mitgetestet. Hier zeigte sich, dass auch diese Sequenzen eindeutig in der PSQ gelesen werden können und somit eine zusätzliche Detektion dieser Viren mit dem etablierten Lassa Virus Assay möglich ist. Tabelle 16 bietet einen Überblick über die Ergebnisse.

Tabelle 16: Generierte Sequenzen der Erregernukleinsäuren in der PSQ

Virus RNA	generierte Sequenz in der PSQ				Ergebnis Nukleotid Blast
<i>Arenaviridae</i>					
Lassa	AGAGGCACTT	AGTAAAGCTC	TGTCACCTGAC	AACTGA	Lassa Virus
<i>Old World Arenaviridae</i>					
LCMV	TGAGTCCCTT	AGTAAAGCTC	TGTCGTTGAC	AAATGTA	Lymphozytäre Choriomeningitis Virus
Mobala	AGAAGCATTG	AGCAAAGCAC	TAAGTCTAAC	TAACTGA	Mobala Virus strain Acar 3080
Mopeia	AGAGGCACTA	GGGAAAGCAT	TATCGCTCAC	CAACTG	Mopeia Virus strain Mozambique
<i>Bunyaviridae</i>					
RVF RNA1	GGTTTGATGC	CCGTAGAGTT	ATCGAACTCT	TAAGCAG	RVFV
RVF RNA2	GGTTTGATGC	CCGTAGAGTT	ATCGAACTCT	TAAAGCAG	RVFV
CCHF RNA1	TCCCATTTCA	CTGATTCTAC	CAGCTGTAAG	CACGGCA	CCHFV
CCHF RNA2	ACCCATTTCA	CTGATTCTGC	CAGCTGTCAG	CACA	CCHFV
Hanta RNA G	AATCGGTTTCG	AGGTAACCAT	ATATGAACAG	TGCA	Dobrava-Belgrad Virus strain GRW/Aa
<i>Filoviridae</i>					
Ebola	AGTTACGGAA	CGTGAGCAAA	AAGAGATATA	TCTA	Zaire-Ebolavirus
Marburg	TGTCACCTGAG	AGGGAACAGA	AAGAAGCATT	ATTACAT	Marburg Virus
Ebola Zaire	AGTCACAGAG	CGTGAGCAAA	AAGAAAGACT	TATTG	Zaire-Ebolavirus
<i>Togaviridae</i>					
Chikungunya LR2006	TGTCCGACAT	CATCCTCCTT	GCTGGCGCAC	TGCCGATA	Chikungunya Virus
Chikungunya african isolate	TGTCCGACAT	CATCCTCCTT	GCTGGCGCAC	TACCAATA	Chikungunya Virus

mit **rot** markiert = Basen aus der in der Pyrosequenzierung generierten Sequenz, die laut Nukleotid Blast nicht zur Erregersequenz gehören

Da eine enge Verwandtschaft zwischen den einzelnen Flaviviren besteht, erfolgte zum Nachweis von Kreuzreaktionen bei allen Flaviviren PSQs eine Testung mit RNAs verschiedener Flaviviren. Neben verschiedenen Dengue Virus, YFV und WNV RNAs wurden hierzu zusätzlich RNAs des FSME Virus, dem Japanischen Enzephalitis Virus, dem Usutu Virus und dem, eng mit den Flaviviren verwandten, Sinbis-Virus in die PSQs eingesetzt.

Es zeigte sich, dass sowohl mit der Dengue Virus als auch mit der WNV PSQ ausschließlich RNAs der jeweiligen Virusspezies gelesen werden können, wohingegen der YFV Assay zusätzlich WNV RNA sowie das, eng mit dem WNV verwandte, Usutu Virus erkennt. Außerdem konnten mit der Omsk Virus PSQ die RNAs des FSME Virus detektiert werden. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Tabelle 18 bietet eine Übersicht über die generierten Sequenzen der Flaviviren RNAs aus den PSQ Reaktionen mit den einzelnen Flaviviren-PSQ-Assays.

Tabelle 17: Überblick über die Flaviviren-PSQ-Assays mit den getesteten Erreger-RNAs

	<i>Erreger-Assay</i>				
	Alkhurma Virus	Dengue Virus	YFV	Omsk Virus	WNV
<i>Flaviviridae</i>					
Den 1	-	+	-	-	-
Den 2	-	+	-	-	-
Den 3	-	+	-	-	-
Den 4	-	+	-	-	-
YFV 17D	-	-	+	-	-
YFV Asibi	-	-	+	-	-
YFV Brazil	-	-	+	-	-
YFV Ivory Coast	-	-	+	-	-
WNV					
Uganda	-	-	+	-	+
WNV Isreal	-	-	+	-	+
FSME K603	-	-	-	+	-
FSME Louping ill	-	-	-	+	-
JEV	-	-	-	-	-
Usutu Virus	-	-	+	-	-
<i>Togaviridae</i>					
Sinbis Virus	-	-	-	-	-

+ = RNA eindeutig durch den Erreger-PSQ-Assay identifiziert

- = RNA nicht durch Erreger-PSQ-Assay detektiert

Tabelle 18: Generierte Sequenzen der Flaviviren RNAs in der PSQ mit den Erreger-PSQ-Assays

Virus RNA	generierte Sequenz in der PSQ				Ergebnis Nukleotid Blast	
<i>Flaviviridae</i>						
Den 1	CCGCCTCAGT	GATCCTGGGG	CATTGTAGGT	TCATTGTG	Dengue Virus 1	
Den 2	CATCTGCCTG	AGAAGGGGAC	ACTTGTACGT	GATTGTGTCT	TTG	Dengue Virus 2
Den 3	CCACTTCGGC	AATGAGGGGG	CATTTGTAAG	TGACCGTGTC	A	Dengue Virus 3
Den 4	CGGTATTGAC	CAGTAGGGGG	GCATTTATAC	GTGACAGTTG	G	Dengue Virus 4
YFV 17D	AGACCCCGTC	TTTCTACCAC	CACGTGGGAGG	TGGCAGCGGA	YFV	
YFV Asibi	AGACCCCGTC	TTTCTACCAC	CACGTGGGAGG	TGGCAGCGGA	YFV	
YFV Brazil	AGACCCCTCT	TTTCTACCACC	ACGTGGGGTGGT	GGCGGAGG	YFV	
YFV Ivory Coast	AGACCCCTCT	TTTCTACCACC	ACGTGGGGGT	GGCGCGGA	YFV	
WNV Uganda	AGTGTGGTG	AGGATTAACA	ACAATTAACA	CAGTGCGA	WNV	
WNV Isreal	AGTGTGGTG	AGGATTAACA	ACAATTAACA	CAGTGCGA	WNV	

mit **rot** markiert = Basen aus der in der Pyrosequenzierung generierten Sequenz, die laut Nukleotid Blast nicht zur Erregersequenz gehören

mit **orange** markiert = Basen, die laut Nukleotid Blast in der generierten Sequenz aus der Pyrosequenzierung in der Erregersequenz fehlen

Sofern DNA-Proben zur Testung der PSQs der DNA-Erreger zur Verfügung standen, erfolgte auch hier eine Funktionsprüfung anhand der Erreger-Nukleinsäuren. Auch hier konnten bei den getesteten PSQs von *Plasmodium* und *Salmonella typhi* die Erreger eindeutig anhand der generierten Sequenzen identifiziert werden. Die DNA des *Mycobacterium bovis*, dem Erreger der Tuberkulose bei Rindern, konnte mit der *Mycobacterium tuberculosis* PSQ detektiert werden. Zum Überblick über die Ergebnisse siehe Tabelle 19.

Tabelle 19: Generierte Sequenzen der Erreger-DNAs in der Pyrosequenzierung

DNA	generierte Sequenz in der PSQ				Ergebnis Nukleotid Blast
M. bovis	CCCGTCGTCG	CAGCGAGTGG	CAGCGAGGAC	AA	Mycobacterium bovis
P. falciparum	AAAGTAACAA	AATCCCCAAA	ACGACAAAGA	CAAAAAGGGA	Plasmodium falciparum
S. typhi	ACGCCAACGT	GATCGGCGTT	GAGGTC		Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium

mit **rot** markiert = Basen aus der in der Pyrosequenzierung generierten Sequenz, die laut Nukleotid Blast nicht zur Erregersequenz gehören

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion, sowie dem Nachweis einer erfolgreichen Sequenzierung wurde bei allen Reaktionen zu jedem Assay das synthetische Kontrollplasmid in einer

Konzentration von 10^4 Kopien/ μl als Positivkontrolle (PK) und eine Negativkontrolle (NK) mitgeführt.

4.2 Parallele Pyrosequenzierung als Screeningmethode für Tropeninfektionserreger

Nach der erfolgreichen Etablierung einzelner PCR PSQ Kombinationen soll über die parallele Durchführung der Assays eine Screeningmethode für viral bedingte hämorrhagische Fieber sowie einige differentialdiagnostisch relevante bakteriell und parasitär bedingte Infektionserkrankungen entwickelt werden.

4.2.1 Synthetische Plasmide als Positivkontrollen

Zu jedem erregerspezifischen Assay wurde ein synthetisches Plasmid hergestellt. Es dient sowohl in der PCR als auch in der PSQ als Positivkontrolle.

Die Besonderheit eines jeden Plasmids liegt in der eingefügten „*tag*-Sequenz“. Hierunter versteht man vier aufeinander folgende Basen, zumeist in der Reihenfolge CTGA, die zusätzlich zur Erregersequenz, direkt hinter die PSQ-Primerbindungsstelle, eingefügt wurden und nicht zur Erregersequenz gehören. Durch diese gewählte Position wird die *tag*-Sequenz immer vor der eigentlichen Erregersequenz des Plasmids gelesen, wodurch eine deutliche Differenzierung zwischen Sequenzen der Kontrollplasmide und Sequenzen echter Erregernukleinsäuren möglich ist (Abbildung 9). Dies ermöglicht die Detektion falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von Kontaminationen durch die Kontrollplasmide. Zusätzlich können die Peakhöhen der einzelnen Basen als Referenzhöhe bei der manuellen Auswertung der PSQ genutzt werden.

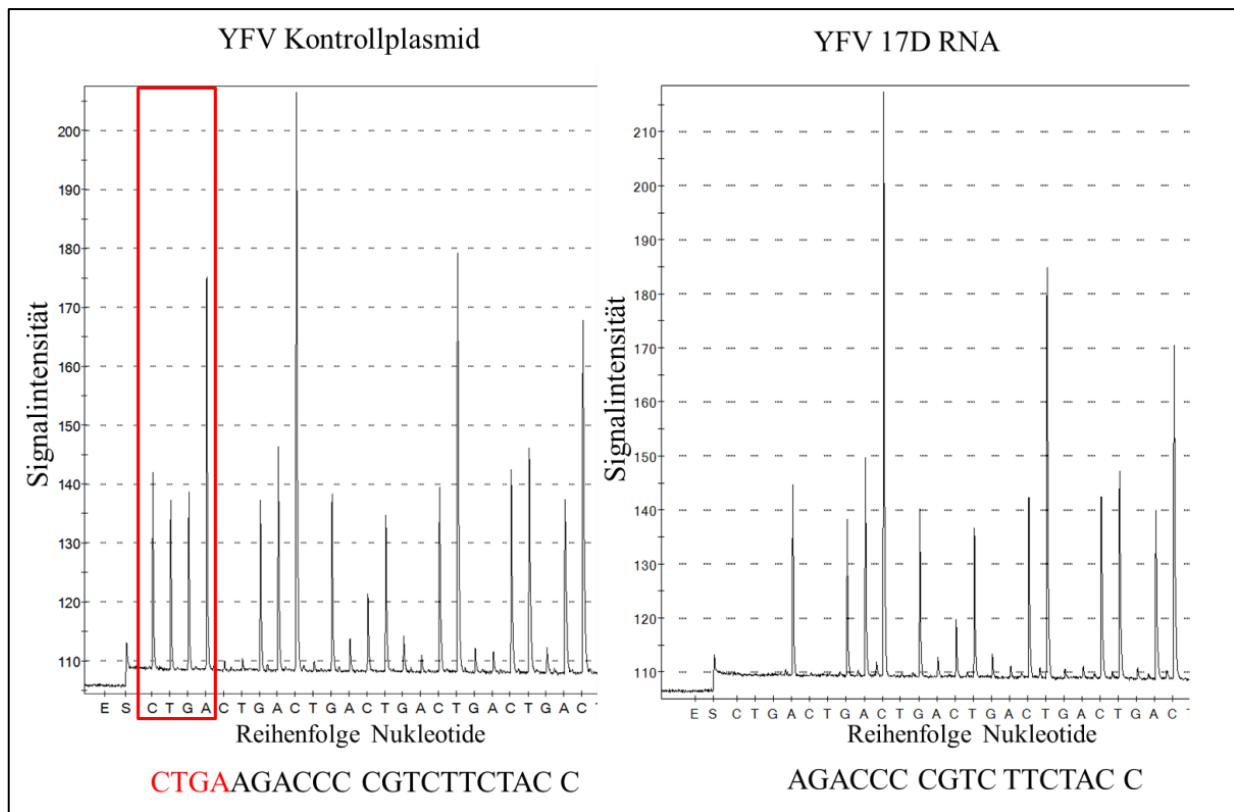


Abbildung 9: Beispiel Pyrogramme für ein Kontrollplasmid und die erregerspezifische RNA von YFV. Die hier gezeigte Sequenz des Kontrollplasmids für YFV enthält, wie alle Kontrollplasmide, eine „tag-Sequenz“. Hierunter versteht man zusätzlich zur eigentlichen Erregersequenz eingefügte Nukleotide, zumeist in der Reihenfolge CTGA (in dieser Abbildung mit rot markiert.) Diese Sequenz bietet zum einen den Vorteil, eine Kontamination durch das Kontrollplasmid und ein hieraus resultierendes falsch-positives Ergebnis eindeutig identifizieren zu können, da es sich durch die Nukleotide deutlich von der Sequenz der RNA (rechts im Bild dargestellt) unterscheiden lässt. Zum anderen können die Peakhöhen der einzelnen Basen als Referenz für die manuelle Auswertung eines Pyrogramms verwendet werden. In dem gezeigten Beispiel beginnt die eigentliche Erregersequenz der YFV RNA mit einem A, weshalb der Peak in der „tag-Sequenz“ doppelt so hoch ist.

4.2.2 Etablierung interner Kontrollen

Sowohl für die RNA- als auch für die DNA-Erreger wurde jeweils eine interne Kontrolle etabliert, die als Extraktions- und Amplifikationskontrolle dient (siehe Abbildung 10). Für die RNA-Viren wurde hierfür das RNA-Virus Felines Calicivirus (FCV) gewählt, das nicht pathogen beim Menschen ist. Für die DNA-Erreger wurde das synthetische Kontrollplasmid KoMA (pKoMa) etabliert. Die Kontrollen werden vor der Nukleinsäure-Extraktion in die zu untersuchende Probe gegeben, wodurch sie bei einer erfolgreichen Extraktion von DNA und RNA ebenfalls mit extrahiert werden. Beide interne Kontrollen werden anschließend mit jeweils spezifischen PCRs parallel zu den erregerspezifischen PCRs nachgewiesen und in der PSQ sequenziert. Zusätzlich zum Nachweis einer erfolgreichen Nukleinsäure-Extraktion werden somit die PCR- bzw. PSQ-Bedingungen kontrolliert.

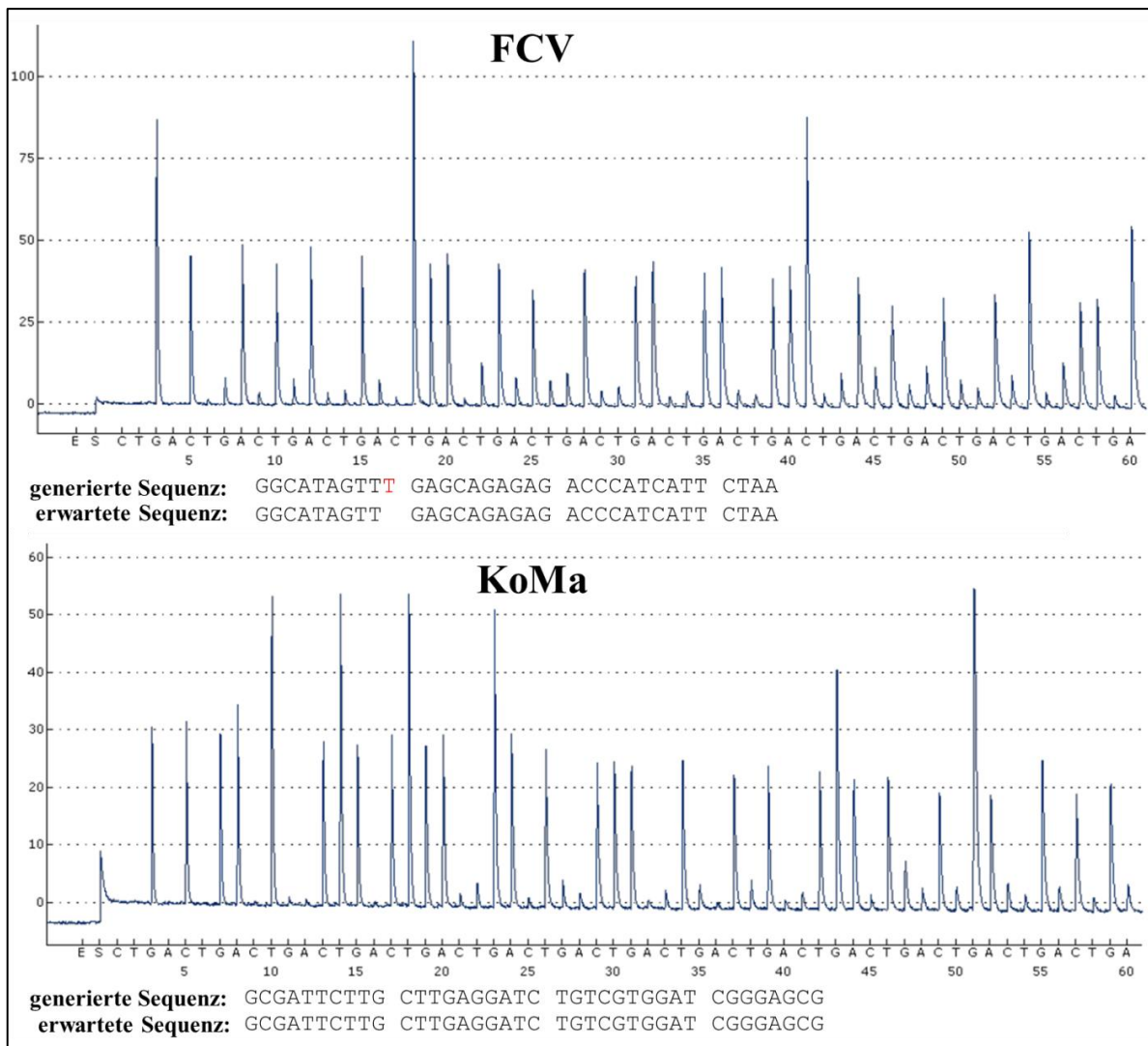


Abbildung 10: Beispielpyrogramme der internen Kontrollen FCV und KoMa. Die internen Kontrollen werden vor der Nukleinsäure-Extraktion in die zu untersuchende Probe gegeben und lassen sich nach einer erfolgreichen Extraktion von DNA und RNA mit der jeweils spezifischen PCR bzw. PSQ nachweisen. Die FCV RNA dient somit als Extraktions- und Amplifikationskontrolle für die RNA Viren, das synthetische Plasmid pKoMA als Extraktions- und Amplifikationskontrolle für die DNA-Erreger. (In rot markiert, fehlerhafte Base in der generierten Sequenz von FCV, die nicht zur erwarteten Sequenz gehört.)

4.2.3 Validierung und Optimierung der PCR- und PSQ-Assays

Die Etablierung der einzelnen PCRs erfolgte aus Gründen der Praktikabilität anhand der Kontrollplasmide (nicht für jeden Erreger stand eine entsprechende Nukleinsäure zur Verfügung). Hierfür wurde für die RNA-Viren das Verfahren der RT-PCR angewendet (siehe Abschnitt 3.1) und für die DNA-Erreger die konventionelle PCR mit der Platinum® Taq-Polymerase (siehe Abschnitt 3.2). Zur Evaluierung und Quantifizierung der PCR-Produkte wurde das Verfahren der Gelelektrophorese, wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben, gewählt. Um eine Serumprobe auf möglichst viele Erreger parallel testen zu können, wurden die einzelnen PCRs an dieselben PCR-Bedingungen angepasst und optimiert. Hierzu wurde für die RNA-

Erreger und die interne RNA-Kontrolle FCV, sowie die PCRs der bakteriellen Erreger, eine Annealingtemperatur von 55°C und für die parasitären Erreger sowie die Pan-Flavi-PCR und die interne DNA-Kontrolle KoMa eine Annealingtemperatur von 60°C gewählt (siehe Tabelle 20). Weiterhin wurde ein Elongationsschritt in die PCR-Reaktion der RNA-Viren eingefügt, um bei PCRs mit großen Amplikonlängen für Diagnostikzwecke, wie beispielsweise dem Dengue Virus Assay mit 511 bp, eine vollständige Amplifikation des gesamten Amplikons gewährleisten zu können und mehr PCR-Produkt für die anschließende PSQ zu erhalten (siehe Tabelle 7).

Anschließend erfolgte die Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen (NWG) für die PCR und PSQ, wie unter 3.1.5 beschrieben, für die einzelnen Assays (siehe Tabelle 20). Abbildung 11 zeigt Beispielpyrogramme aus den Verdünnungsreihen des RVFV-Kontrollplasmids sowie die Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Bestimmung der unteren NWG der PCR und PSQ.

Tabelle 20: Überblick über die Erregerassays mit den Annealingtemperaturen, der Anzahl der Primer, den unteren NWG in PCR und PSQ sowie der Länge der erwarteten Sequenz des Kontrollplasmids in der PSQ

Erregerassay	Amplikon- größe [bp]	Anzahl PCR- und (PSQ-)Primer	Annealing- temperatur	NWG PCR [Kopien/µl]	NWG PSQ [Kopien/µl]	Länge der erwartete Sequenz in PSQ [Basen]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	164	2 (1)	55°C	100	100	33
<i>Salmonella typhi</i>	132	2 (1)	55°C	100	100	40
Alkhurma Virus	167	2 (1)	55°C	10	10	41
Chikungunya Virus	83	2 (1)	55°C	80	100	39
CCHFV	181	2 (1)	55°C	200	200	39
Dengue Virus	511	2 (1)	55°C	200	400	47
Filoviren	221	5 (1)	55°C	1000	6000	29
Hanta Virus	452	2 (1)	55°C	2000	6000	38
Hendra Virus	109	2 (1)	55°C	5	10	37
Lassa Virus	392	4 (2)	55°C	100	400	40
Nipah Virus	113	2 (1)	55°C	100	100	34
Omsk Virus	89	2 (1)	55°C	200	400	40
RVFV	123	2 (1)	55°C	200	200	39
WNV	144	2 (1)	55°C	5	40	42
YFV	66	2 (1)	55°C	60	60	46
Pan-Flavi	268	3 (1)	60°C	200	1000	33
<i>Plasmodium sp.</i>	263	3 (2)	60°C	100	8000	39
<i>Leishmania sp.</i>	209	2 (1)	60°C	20	20	49
<i>Trypanosoma cruzi</i>	148	2 (1)	60°C	5	5	48
<i>Trypanosoma brucei sp.</i>	94	2 (1)	60°C	50	50	39
FCV	88	2 (1)	55°C	100	100	33
KoMA	139	2 (1)	60°C	20	20	38

Es zeigte sich, dass die meisten Erreger eine untere Nachweisgrenze für die PCR und PSQ im zwei- bis dreistelligen Kopien-Bereich aufweisen. Einige Assays, wie der Alkhurma Virus, Hendra Virus und *Trypanosoma cruzi* Assay, sind sensitiver und weisen Nachweisgrenzen von 5-10 Kopien/Ansatz auf. Auffallend hohe Nachweisgrenzen lassen sich für die Plasmodium PSQ, sowie für die Filoviren und Hanta Virus PCR und PSQ im vierstelligen Bereich finden. Besonderheiten, die diese Assays von den anderen unterscheiden und womöglich die Ursache für die relativ hohe Nachweisgrenze darstellen können, sind beim Hanta Virus Assay die Größe des Amplikons, das mit 452 bp das zweitgrößte aller verwendeten Amplikons darstellt und beim Filoviren Assay die hohe Anzahl an PCR-Primern, die verwendet wird. Bei der Plasmodium PSQ enthält die Kontrollsequenz viele Homopolymere (siehe Tabelle 21), was eine erhöhte Fehlerquelle für die generierte Sequenz in der PSQ in sich birgt.

Tabelle 21: Generierte Sequenzen in der PSQ des Plasmodium Kontrollplasmids

Konzentration Kontrollplasmid	generierte Sequenz in der PSQ
erwartete Sequenz	ACTGAAGTAA CAAAATCCCC AAAAA G CAAAAG CAAAG TGG GAT
10 ⁴ Kopien/Ansatz	ACTGAAGTAA CAAAATCCCC AAAA CGACAAA GACAA GA GG GGAT
8000 Kopien/ Ansatz	ACTGAAGTAA CAAAATCCCC AAAA CGACAAA GACAA GA GG GGAT
6000 Kopien/ Ansatz	ACTGAAGTAA CAAAA CCC AAA CCAACAACG AACGAACGAA AGGAATT

In grün markiert die Basen der „tag-Sequenz“ des Kontrollplasmids

In rot markiert Basen, die nicht zu der erwarteten Sequenz des Kontrollplasmids gehören

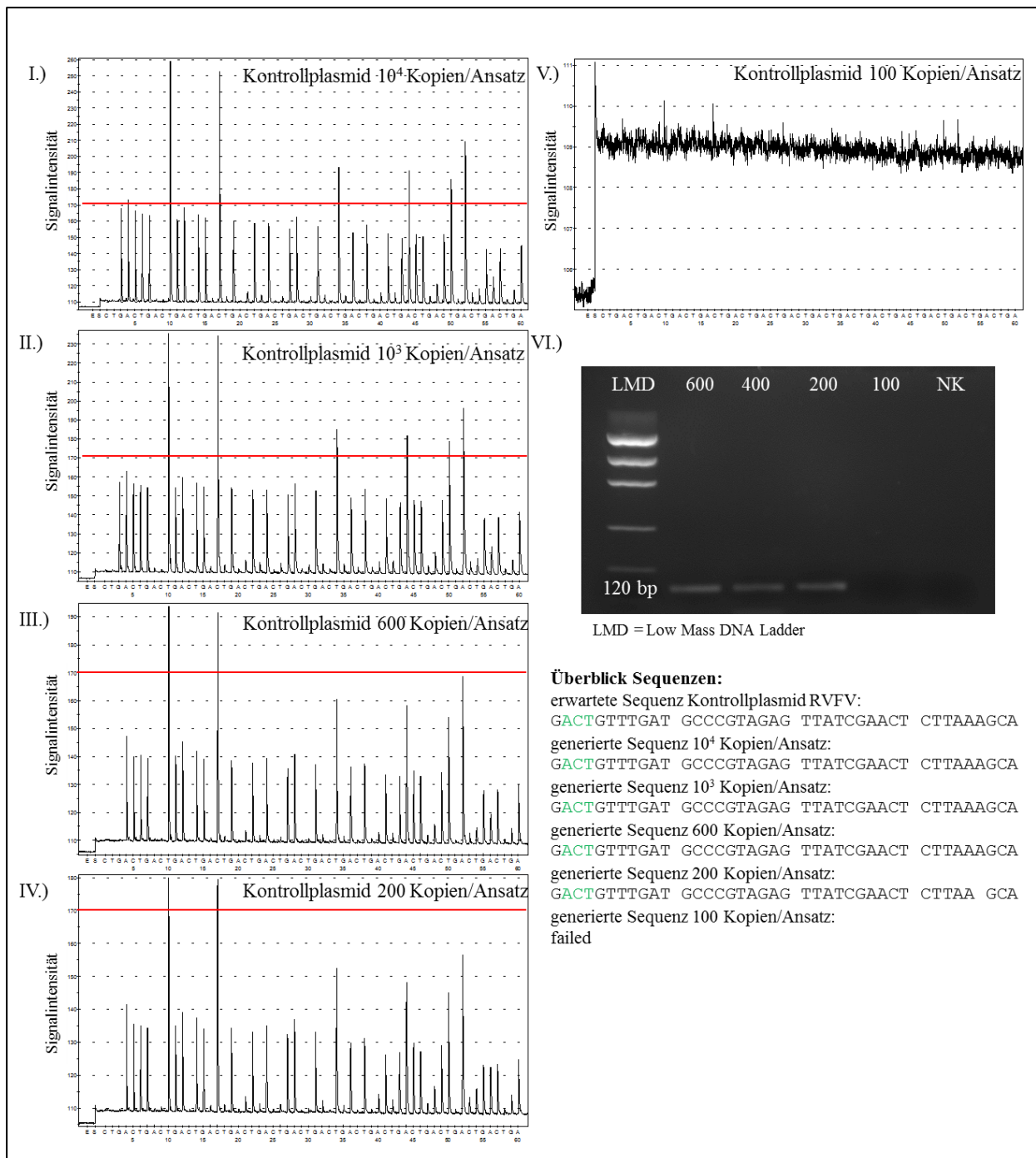


Abbildung 11: Beispielpyrogramme sowie das Ergebnis der Gelelektrophorese aus der Verdünnungsreihe des RVFV Kontrollplasmids zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für PCR und PSQ. Bei der Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der PCR und PSQ wurde wie unter 3.1.5 beschrieben vorgegangen. In den Beispielpyrogrammen (I.-IV.) zeigt sich eine Abnahme der Signalintensität mit Verringerung der Kopienzahl/Ansatz. (Die rote Linie zeigt die Signalintensität von 170 an.) Ab einer Konzentration von 200 Kopien/Ansatz kann die erwartete Sequenz nicht mehr fehlerfrei detektiert werden (fehlendes „A“). Ab 100 Kopien/Ansatz ist in der Gelelektrophorese kein PCR-Produkt mehr nachweisbar (V.) auch die Detektion mittels PSQ ist nicht mehr möglich (VI.). Somit liegt die untere Nachweisgrenze für den den RVFV PCR und PSQ Assay bei 200 Kopien/Ansatz. (Mit grün markiert sind die Basen der „tag-Sequenz“ des Kontrollplasmids.)

4.2.1 Amplifikation der DNA-Erreger mit dem OneStep RT-PCR Temperaturprofil zur Vereinheitlichung der Temperaturprofile der DNA- und RNA-Erreger

Im Unterschied zur Amplifikation von DNA mittels PCR ist bei der Amplifikation von RNA eine vorgeschaltete RT-Phase notwendig, in der die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben wird. Da bei Fieber nach Aufenthalt in den Tropen und Subtropen sowohl RNA- als auch DNA-Infektionserreger differentialdiagnostisch relevant sind, kann eine parallel durchgeführte Labordiagnostik Zeit und Kosten sparen. Um sowohl RNA als auch DNA der verschiedenen Infektionserreger auf einer PCR-Platte parallel amplifizieren zu können, wurde überprüft, ob es zu einer Beeinflussung der DNA-Amplifikation durch die Verwendung des OneStep RT-PCR-Temperaturprofils mit vorgeschalteter RT-Phase kommt. Hierzu wurden die Kontrollplasmide der DNA-Erreger auf 10^4 Kopien/ μ l herunterverdünnt und jeweils einmal mit dem Temperaturprofil der Taq-Polymerase (Tabelle 9) und einmal mit dem Temperaturprofil der OneStep RT-PCR der RNA-Erreger (Tabelle 7) in einem Eppendorfcycler amplifiziert. Die gewählte Annealingtemperatur betrug hierbei für die Parasiten 60°C und für die Bakterien 55°C , der Reaktionsansatz entsprach bei beiden Temperaturprofilen dem Ansatz der konventionellen PCR mit Platinum® Taq-Polymerase, wie in Tabelle 8 angegeben. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels quantitativer Gelelektrophorese quantifiziert.

Der Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass die DNA-Amplifikation durch die vorgeschaltete RT-Phase, nicht beeinträchtigt wird, da die bestimmten Mengen an PCR-Produkt aus der PCR mit dem Temperaturprofil der Platinum® Taq-Polymerase nahezu identisch mit den Mengen an PCR-Produkt aus der PCR mit dem OneStep RT-PCR Temperaturprofil sind (siehe Abbildung 12). Somit scheint die parallele Amplifizierung von DNA- und RNA-Erregern auf einer PCR-Platte mit dem einheitlichen Temperaturprofil der OneStep RT-PCR möglich zu sein.

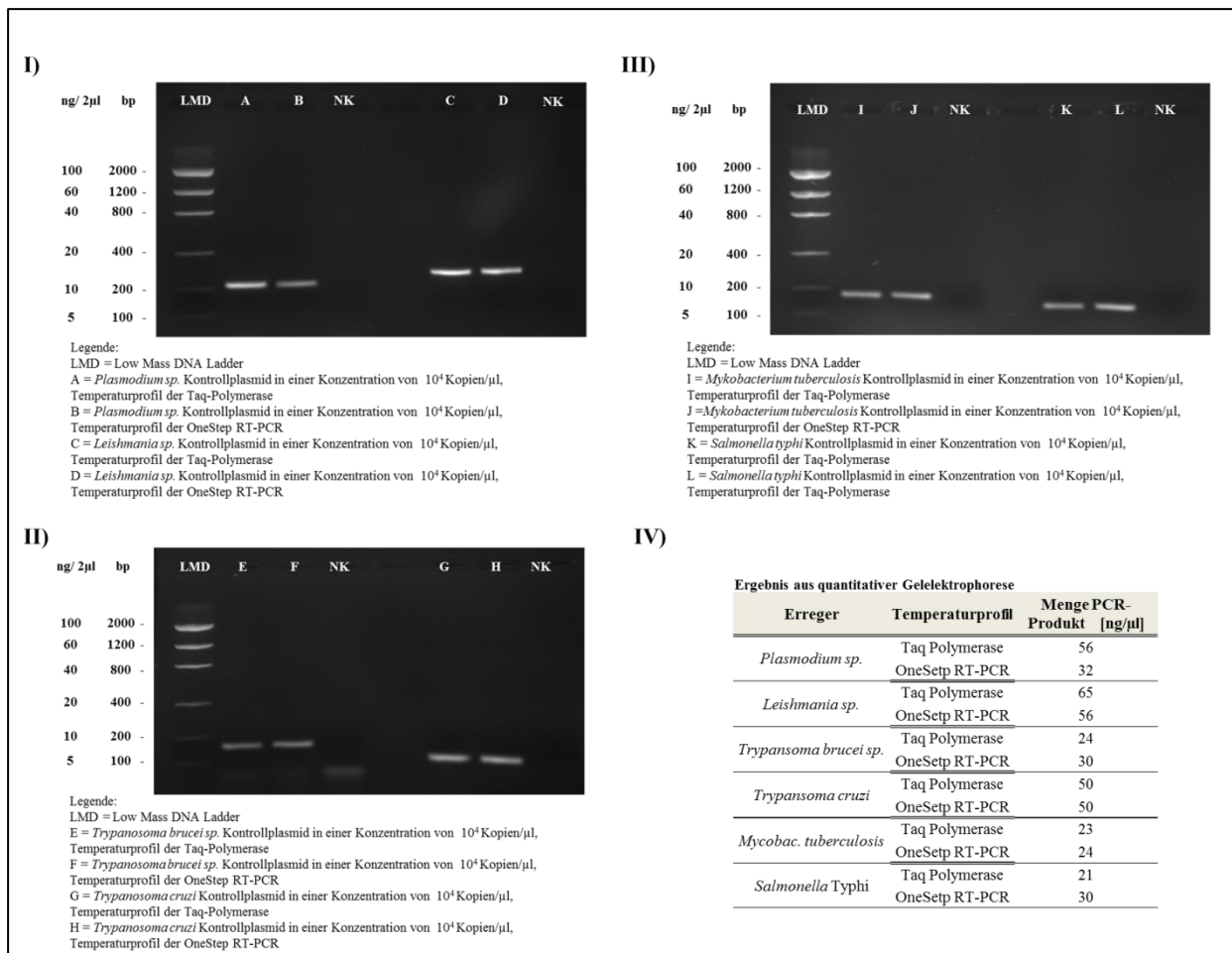


Abbildung 12: Ergebnisse der Gelelektrophorese bei der Vereinheitlichung der Temperaturprofile der DNA- und RNA-Erreger. Gezeigt sind die detektierten Banden der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese vom *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.* (I.) sowie vom *Trypanosoma brucei sp.* und *Trypanosoma cruzi* Assay (II.) und vom *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella typhi* Assay (III.) nach Amplifikation der Kontrollplasmide in der PCR mit dem Temperaturprofil der Platinum® Taq-Polymerase sowie dem Temperaturprofil der OneStep RT-PCR mit jeweils dem Reaktionsansatz der Platinum® Taq-Polymerase. Die Ergebnisse der Quantifizierung aus der Gelelektrophorese (IV.) zeigen nahezu identische Mengen an PCR-Produkt für beide Temperaturprofile. Eine Amplifikation von DNA scheint somit ohne Beeinflussung durch die vorgeschaltete RT-Phase mit dem Temperaturprofil der OneStep RT-PCR möglich zu sein. Dies bietet die Möglichkeit einer Amplifikation von RNA und DNA auf einer PCR-Platte mit dem einheitlichen Temperaturprofil der OneStep RT-PCR, unter Einhaltung der verschiedenen Annealingtemperaturen der einzelnen PCR-Assays.

4.2.2 Optimierung der Screeningmethode durch die Etablierung von Virus-Assay-Kombinationen sowie einem Pan-Flavi-Assay

Zur Ermöglichung der parallelen Testung einer Patientenprobe mit der TwoStep Screeningmethode auf möglichst viele Erreger, wurden bereits die Annealingtemperaturen der einzelnen Erreger-PCRs vereinheitlicht (Abschnitt 4.2.3). Zur weiteren Optimierung des Screeningverfahrens wurden verschiedene PCR- bzw. PSQ-Assays der RNA-Viren kombiniert. Hierdurch soll zum einen erreicht werden, dass eine geringere Menge Nukleinsäure-Extrakt auf

die gleiche Anzahl der Erreger getestet werden kann. Gleichzeitig soll die Anzahl der Erreger erhöht werden, die parallel auf einer PCR- bzw. PSQ-Platte getestet werden können.

Zusätzlich wurde ein Pan-Flavi-PSQ-Assay etabliert. Hierunter versteht man einen generischen PCR- bzw. PSQ-Assay mit dem verschiedenste Viren aus der Familie der *Flaviviridae* detektiert werden können.

4.2.2.1 Die Etablierung der Virus-Assay-Kombinationen

Bei der Etablierung von Assay-Kombinationen der RNA-Viren wurden zunächst elektronische Datenbanken auf bekannte Viruskoinfektionen durchsucht. Das Vorliegen einer Koinfektion von Erregern kombinierter PSQ-Assays würde zu einer parallelen Sequenzierung beider Erreger in einem Ansatz führen. Hierdurch käme es zu einer Überlagerung der Pyrogramme, anhand derer keine Identifizierung der einzelnen Erreger in der PSQ mehr möglich wäre. Lediglich für Dengue und Chikungunya Virus wurden bekannte Koinfektionen in der Literatur beschrieben, womit diese Erregerkombination als mögliche Assay-Kombination ausschied.

Weiterhin wurden Assays eng verwandter Viren, wie die Assays der einzelnen Flaviviren, nicht miteinander kombiniert, da hier ein erhöhtes Risiko für Kreuzreaktionen zwischen Primern und Nukleinsäuren verschiedener Viren im Reaktionsansatz besteht.

Nach erfolgter Literaturrecherche wurden zunächst die PCR- bzw. PSQ-Assays zweier Viren kombiniert. Hierzu wurden die Primer beider Erreger zum Reaktionsansatz hinzugegeben und je Erreger das Kontrollplasmid als PK und eine NK mitgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Testung der Virus-Assay-Kombinationen mit den vorhandenen RNAs der kombinierten Viren.

Voraussetzungen für eine erfolgreich etablierte Virus-Assay-Kombination waren:

- Eindeutig lesbare Sequenzen für die beiden PKs sowie die getesteten erregerspezifischen RNAs in der PSQ
- Identifizierung beider Erreger anhand der generierten Sequenzen in der PSQ mittels BLAST der *ncbi* Datenbank
- Mitgeführte NK „negativ“, also keine oder non-sense Sequenz in der PSQ
- Eindeutige Banden für die PKs und RNAs sowie wenig Primerdimere in der parallel durchgeführten Gelelektrophorese (Abbildung 13)

Lediglich die Virus-Assay-Kombinationen von Alkhurma Virus und RVFV, CCHFV und Chikungunya Virus sowie Hendra Virus und Omsk Virus erfüllten alle genannten Kriterien.

Eine mögliche Virus-Assay-Kombination mit drei Erregern konnte nicht gefunden werden. Tabelle 22 gibt einen Überblick über die gesamten ausgetesteten Virus-Assay-Kombinationen und ihre Funktionsfähigkeit.

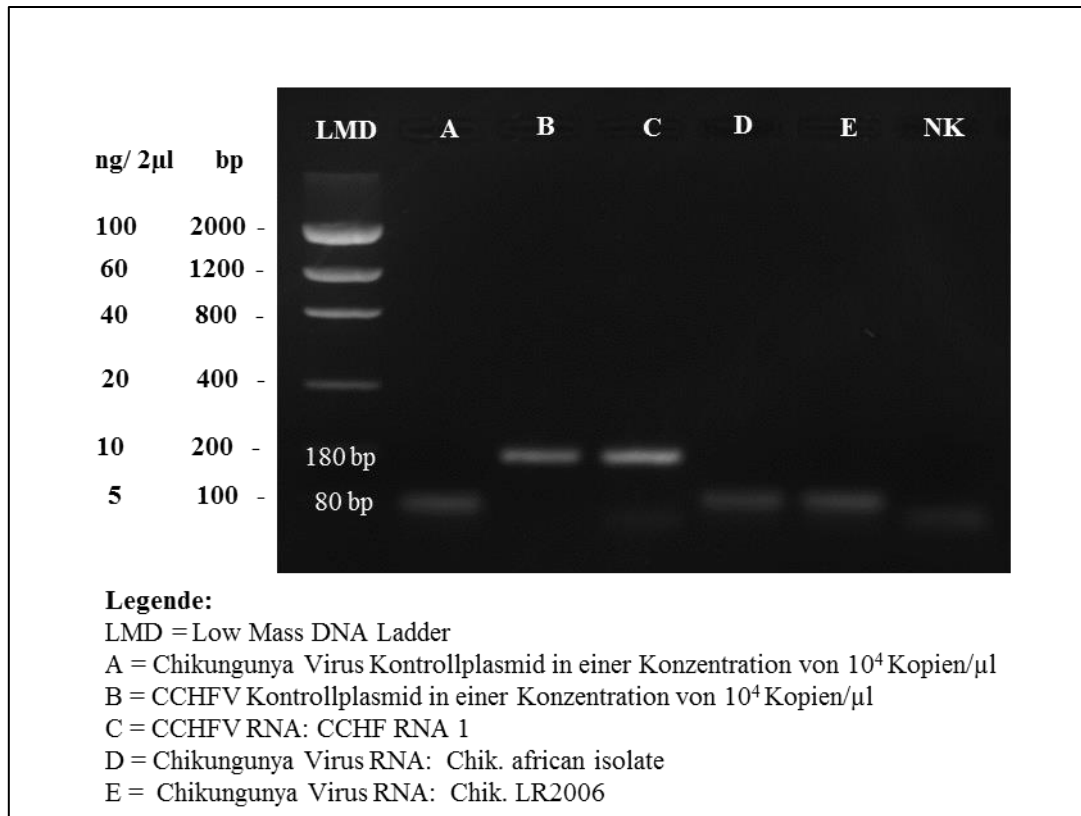


Abbildung 13: Quantitative Gelelektrophorese der Virus-Assay-Kombination von CCHFV und Chikungunya Virus. In der Gelelektrophorese konnten sowohl für die Plasmide von CCHFV und Chikungunya Virus, in einer Konzentration von 10^4 Viruskopien/ μ l, als auch für die erregerspezifischen RNAs quantifizierbare Banden und wenig Primerdimere (Bande NK) als Zeichen einer erfolgreichen Etablierung dieser Virus-Assay-Kombination detektiert werden.

Tabelle 22: Überblick über getestete Virus-Assay-Kombinationen

Assay 1	Assay 2	Assay 3	getestete RNAs	Kombination möglich?	Begründung
Alkhurma Virus	Hanta Virus	-	RNA G	nein	Hanta Virus PK falsch negativ
Alkhurma Virus	RVFV ¹	-	RVF RNA 1 RVF RNA 2	ja	alle Sequenzen wie erwartet
Alkhurma Virus	Hanta Virus	RVFV ¹	RNA G RVF RNA1 RVF RNA2	nein	Hanta Virus PK und RNA falsch negativ
Alkhurma Virus	Hendra Virus	RVFV ¹	RVF RNA1 RVF RNA2	nein	Alkhurma Virus PK falsch negativ
CCHFV	Chikungunya Virus ¹	-	CCHF RNA1 Chik. African isolate Chik. LR2006	ja	alle Sequenzen wie erwartet
CCHFV	Chikungunya Virus	Lassa Virus ¹	CCHF RNA1 Chik. African isolate Chik. LR2006 Lassa	nein	alle PKs und RNAs falsch negativ
CCHFV	Chikungunya Virus	Nipah Virus ¹	CCHF RNA1 Chik. African isolate	nein	Chikungunya Virus- und CCHFV-PK falsch negativ
Chikungunya Virus	Lassa Virus ¹	-	Chik. African isolate Chik. LR2006 Lassa	nein	Lassa Virus PK falsch negativ
Chikungunya Virus	Dengue Virus	-	-	nein	Coinfektionen bekannt
Filo Viren	Nipah Virus	-	-	nein	Filo Viren PK falsch negativ
Hanta Virus	Hendra Virus	-	-	nein	Hanta Virus PK falsch negativ
Omsk Virus	Hendra Virus	-	-	ja	alle Sequenzen wie erwartet
Omsk Virus	Lassa Virus	-	-	nein	Lassa Virus PK falsch negativ
Omsk Virus	RVFV	-	RVF RNA1 RVF RNA2	nein	RVF RNA falsch negativ

¹ Überschneidung der Verbreitungsgebiete der Erreger, jedoch keine Koinfektion in Literatur bekannt

4.2.2.2 Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen der Virus-Assay-Kombinationen

Nach erfolgreicher Etablierung der Virus-Assay-Kombinationen wurden anhand der Kontrollplasmide die unteren Nachweisgrenzen für die PCR und PSQ beider Viren in ihrer Assay-Kombination bestimmt. Hierzu wurden die Kontrollplasmide beider Erreger, wie unter 4.1.6 beschrieben, herunterverdünnt und in die PCR bzw. PSQ eingesetzt, wobei die Reaktionsansätze jeweils die Primer beider Erreger enthielten. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese.

Es zeigte sich, dass die Sensitivitäten der einzelnen PCR- bzw. PSQ-Assays durch die Kombination nicht negativ beeinträchtigt werden. Die bestimmten NWG entsprechen ungefähr den NWG der nicht kombinierten Assays. Tabelle 23 bietet einen Überblick über die Ergebnisse.

Tabelle 23: Vergleich der Nachweisgrenzen von PCR bzw. PSQ der Viren in den Virus-Assay-Kombination und den einzelnen Virusassays

Erreger	NWG PCR einzeln [Kopien/μl]	NWG PSQ einzeln [Kopien/μl]	NWG PCR in Kombination [Kopien/μl]	NWG PSQ in Kombination [Kopien/μl]
Alkhurma Virus	10	10	20	20
RVFV	200	200	200	200
CCHFV	200	200	200	200
Chikungunya Virus	80	100	80	100
Hendra Virus	5	10	50	50
Omsk Virus	200	400	200	400

4.2.2.3 Die Etablierung sowie Validierung eines Pan-Flavi-PSQ-Assays

Basierend auf einer bestehenden Pan-Flavi-PCR wurde ein Pan-Flavi-PSQ-Assay designt und etabliert. Mittels eines Standards wurden auch hier, wie unter 4.1.7 beschrieben, die NWG für die PCR bzw. PSQ bestimmt. Es zeigte sich, dass die NWG der PCR mit 200 Viruskopien/Ansatz deutlich unter der NWG der PSQ mit 1000 Viruskopien/ Ansatz liegt (Tabelle 20).

Zur Evaluierung des Pan-Flavi-Assays wurde dieser, wie die erregerspezifischen PSQs, mit allen vorhandenen Flavivirus RNAs sowie der RNA des eng verwandten Sinbis Virus getestet und die generierten Sequenzen mit dem BLAST der *ncbi* Datenbank abgeglichen. Anhand der generierten Sequenzen in der PSQ war für alle erregerspezifischen RNAs, bis auf das WNV Israel Isolat, eine eindeutige Identifizierung des Erregers möglich (Tabelle 24).

Tabelle 24: Generierte Sequenzen der Erregernukleinsäuren in der PSQ mit dem Pan-Flavi-Assay

RNA	generierte Sequenz in der PSQ					Ergebnis Nukleotid Blast
Flaviviridae						
Den 1	CATACATATT	TCCCCCGGA	ATCTTTGATA	TGTCTCTGAG	TA	Dengue Virus 1
Den 2	CATACATGGC	TCCTCCCTCT	TTCTTGCTCA	CGTCTCTTA		Dengue Virus 2
Den 3	CATACATAGC	TCCCTCCACG	GTATCTTGGA	AATATCTTA		Dengue Virus 3
Den 4	CATACATTAG	GTCTCCATCC	TTCTTGTCTA	TCT		Dengue Virus 4
YFV 17D	CGTAGAATCC	ACCACCATCC	ATTGCAGCCA	GGT		YFV
YFV Asibi	CGTAGAATCC	ACCACCATCC	ATTGCAGCCA	GGT		YFV
YFV Brazil	CATAGAATCC	ACCACCCTCT	AGTGCAGCCA	GGCT		YFV
YFV Ivory Coast	CATAGAATCC	ACCACCCTCT	AGTGCAGCCA	GGCT		YFV
WNV Uganda	CGTAAACCTT	TCCTCCAGGC	TTTGTTCCAA	CTTCCTTCAG	ATGTA	WNV
WNV Israel	nicht detektiert					
FSME K603	CATAGAAGAG	TCCTCCATTC	AGGGTTGACA	ACTTCTTGA		FSME Virus
FSME Louping ill	CTGTAGAAGA	TGGCCCCTCC	ACCTCAAGGT	TGATAGCCTC	TTGA	Louping ill Virus
JEV	CGTACATTTT	CCTCCTTGCT	TTCCTGCTAT	GTCACGGAGG	ATG	JEV
Usutu Virus	CGTACATTTT	TCCACCTGAA	TGGTGGCTCA	TCTCACGCA		Usutu Virus
Togaviridae						
Sinbis Virus	nicht detektiert					

4.2.2.4 Vergleich der Sensitivität der Detektion verschiedener Flaviviren RNAs mit der Pan-Flavi-PSQ und den virusspezifischen PSQs

Zum Vergleich der Sensitivität der Detektion verschiedener Flavivirenspezies mittels Pan-Flavi-PSQ und den erregerspezifischen Flaviviren PSQs, wurden Verdünnungsreihen in 1:10 Verdünnungsschritten (log-Stufen) von 1:10 bis 1:10⁶ der folgenden RNAs hergestellt: YF17D, Den1-4 und WNV Uganda. Diese Verdünnungen wurden parallel mit dem jeweiligen erregerspezifischen Assays von Dengue Virus, YFV bzw. WNV und dem Pan-Flavi-Assay in der PCR amplifiziert und anschließend in der PSQ sequenziert. Hier wurde sowohl für den erregerspezifischen als auch den Pan-Flavi-Assay überprüft bis zu welchem Verdünnungsschritt noch eine lesbare Sequenz, anhand derer eine genaue Identifizierung des jeweiligen Erregers mittels BLAST der *ncbi* Datenbank möglich ist, generiert wird.

Es zeigte sich, dass die Detektion der verschiedenen RNAs mittels erregerspezifischer PSQ-Assays mindestens eine log-Stufe sensitiver ist, als die Detektion mittels Pan-Flavi-Assay (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Vergleich der Sensitivität der Detektion von Flaviviren RNAs mittels virusspezifischer PSQ-Assay und der Pan-Flavi PSQ

RNA	Verglichene PSQ-Assays	NWG Virus PSQ	NWG Pan-Flavi
Den 1	Dengue Virus/ Pan-Flavi	1:10 ²	1:10
Den 2	Dengue Virus/ Pan-Flavi	1:10 ²	1:10
Den 3	Dengue Virus/ Pan-Flavi	1:10 ³	1:10
Den 4	Dengue Virus/ Pan-Flavi	1:10 ⁴	1:10 ³
YF 17D	YFV/ Pan-Flavi	1:10 ²	1:10 ²
WNV Uganda	WNV/ Pan-Flavi	1:10 ³	1:10

4.3 Ablaufschema für die TwoStep Screeningmethode zur Detektion hämorrhagischer Fiebertypen sowie differentialdiagnostisch relevanter DNA- und RNA-Erreger

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Screeningmethode, welche es ermöglicht innerhalb kürzester Zeit die Verdachtsdiagnose eines viral bedingten hämorrhagischen Fiebers sowie wichtige Differentialdiagnosen labortechnisch parallel abklären zu können. Nach Zusammenschau aller Ergebnisse wurde das im Folgenden beschriebene Ablaufschema entwickelt. Es soll als Orientierungshilfe dienen eine verdächtige Humanserumprobe auf alle ausgewählten Erreger dieser Arbeit von der Nukleinsäureextraktion bis zum Vorliegen eines endgültigen Ergebnisses testen zu können.

Extraktion der Nukleinsäuren. Zur Vorbereitung auf das entwickelte TwoStep Diagnostikverfahren, aus konventioneller PCR mit anschließender PSQ, muss bei Erhalt einer Humanserumprobe zunächst eine Extraktion der Nukleinsäuren erfolgen. Hierzu eignen sich kommerziell erhältliche Extraktionskits, die sowohl RNA, als auch DNA extrahieren können. Vor einer Extraktion sollten die internen Kontrollen FCV (IC 1), zum Nachweis einer erfolgreichen RNA-Extraktion, und das synthetische Plasmid pKoMA (IC 2) für den DNA-Nachweis in einer Konzentration von jeweils 10⁴ Kopien/μl zur Serumprobe hinzugegeben werden.

PCR zur Amplifikation der Nukleinsäuren. Zur Amplifikation der extrahierten Nukleinsäuren und Vorbereitung der Proben auf die nachfolgende PSQ wird zunächst die PCR durchgeführt. Die Plattenbelegung der beiden PCR-Platten sollte wie in Abbildung 14 erfolgen. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturprofile der DNA- und RNA-Erreger in der PCR bietet es sich an, bei einem Screening auf alle ausgewählten Erreger dieser Arbeit, getrennte Platten für die Amplifikation von DNA bzw. RNA zu verwenden. Da das Temperaturprofil für die

Amplifikation von RNA durch die vorgeschaltete RT-Phase um 45 Minuten verlängert ist, sollte mit der Vorbereitung der PCR-Platte der Viren (RNA-Erreger) begonnen werden.

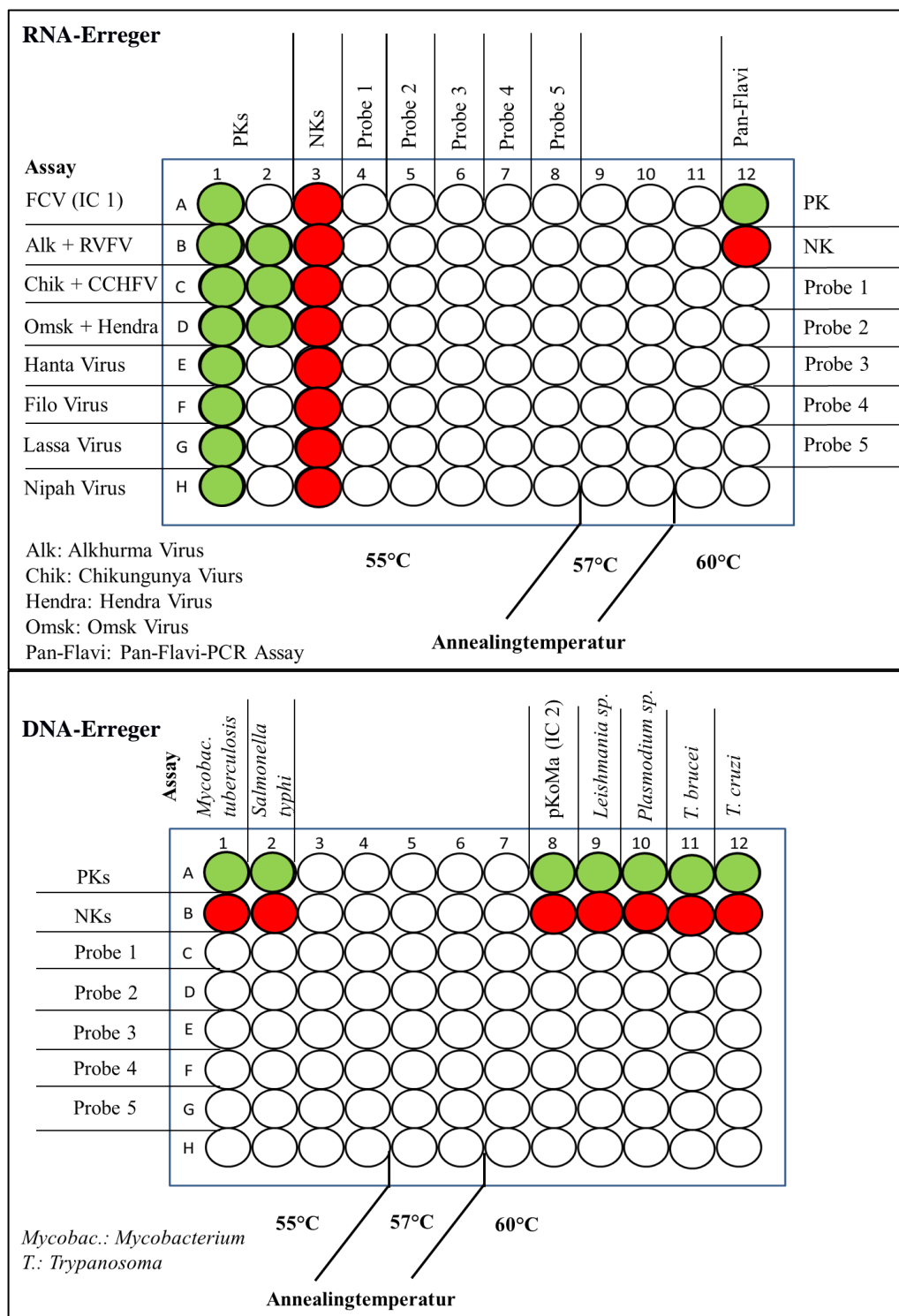


Abbildung 14: Einteilung der PCR- und PSQ-Platten für die RNA- und DNA-Erreger zum Screening von max. 5 Proben. In jeder Spalte bzw. Reihe wird ein anderer erreger- bzw. IC-spezifischer PCR- bzw. PSQ-Assay gemessen. Die entsprechenden Temperaturzonen für die verschiedenen Annealingtemperaturen der Primer werden am PCR-Gerät eingestellt. Hierbei dürfen sich die benachbarten Zonen nicht um mehr als 4°C in ihrer Temperatur unterscheiden. Zu jedem Assay wird eine spezifische Positivkontrolle (PK) und Negativkontrolle (NK) mitgeführt. Die PCR-Produkte werden nach ihrer Amplifikation in gleicher Plattenbelegung auf die vorbereitete PSQ-Platte, die den erregerspezifischen PSQ-Primer in der jeweiligen Spalte enthält, pipettiert.

Sofern eine Eingrenzung in Frage kommender Erreger beispielsweise aufgrund spezifischer Symptome oder der Reiseanamnese möglich ist, kann die Plattenbelegung individualisiert werden. Auch die parallele Amplifikation von DNA und RNA auf einer PCR-Platte ist möglich (siehe Abschnitt 4.2.1). Durch die unterschiedlichen Annealingtemperaturen der Primer, eignet sich der ABI StepOnePlus™ (Life Technologies) als PCR-Gerät. Mit diesem Gradientenzykler ist es möglich, innerhalb eines Programmschrittes unterschiedliche Temperaturzonen einzustellen. Dabei sollten nebeneinanderliegende Temperaturzonen maximal 4°C Temperaturunterschied aufweisen. Gleichzeitig ist eine *real-time* Detektion möglich. Zur Amplifikationskontrolle in der PCR kann daher das Verfahren der *real-time* PCR gewählt werden, sofern eine Sonde für den Assay vorhanden ist, wie bei den internen Kontrollen FCV und KoMa.

Zu jedem Erreger-Assay sollte darüber hinaus, wie in der Abbildung 14 dargestellt, das Kontrollplasmid des Assays als PK und eine NK mitgeführt werden. Die PKs werden jeweils mit einer Konzentration von 10^4 Kopien/ μ l eingesetzt, um deutlich über der Nachweisgrenze des Assays zu liegen und ein positives Ergebnis zu garantieren.

Durchführung und Auswertung der PSQ. Im Anschluss an die PCR wird die PSQ durchgeführt. Dabei werden die erhaltenen PCR-Produkte in gleicher Belegung wie die PCR-Platte, auf die vorbereitete PSQ-Platte pipettiert.

Bei der Auswertung der PSQ werden die erhaltenen Sequenzen zunächst durch die Herstellersoftware drei Qualitäts-Gruppen zugeordnet. Diese Einteilung erfolgt anhand der Peakhöhen der einzelnen Basen und deren Variabilität untereinander. Gut auswertbare und eindeutige Pyrogramme, d.h. Pyrogramme deren Peakhöhen untereinander nicht zu sehr variieren und dadurch eindeutige Rückschlüsse auf die Anzahl der eingebauten Basen zulassen, werden durch die Software mit „passed“ bewertet. Weniger gute Pyrogramme mit „check“ und nicht oder nur schlecht lesbare Pyrogramme werden mit „failed“ bewertet (33).

Erfahrungen haben jedoch gezeigt, dass aufgrund der Bewertung der Software keine genauen Rückschlüsse auf die Sequenz gezogen werden können. So wurden z.B. die Sequenzen vom Kontrollplasmid des Filoviren oder auch vom Lassa Virus Assay häufig mit „failed“ und damit falsch-negativ bewertet. Die erhaltenen Sequenzen entsprachen in diesen Fällen, zum Teil sogar ohne Fehler, der erwarteten Sequenz. Zum Teil wurden auch falsch-positive Ergebnisse von der Software detektiert. Dies trat vor allem bei einigen Dengue Virus negativen Proben des BNIs auf (siehe Abschnitt 4.4), bei denen vermutlich kein PCR-Produkt in die PSQ hinzugegeben wurde. Bei diesen Proben wurde statt dessen die Sequenz des biotinylierten Primers gelesen und von der Software mit „passed“ bewertet.

Daher werden die Sequenzen in einem 2. Schritt manuell und unabhängig von dem Ergebnis der Herstellersoftware nach folgendem Schema ausgewertet (Abbildung 15):

Jede Probe wird einzeln betrachtet.

(i) Zunächst wird überprüft, ob die NK „negativ“ (d.h. keine oder eine nonsense-Sequenz generiert wurde) und die PK „positiv“ (d.h. die erwartete Sequenz des Kontrollplasmids generiert wurde) ist. Ist eines dieser Kriterien nicht erfüllt, wird die PCR und PSQ für diese Probe wiederholt.

(ii) Danach betrachtet man die Sequenz der Probe. Zunächst erfolgte der Abgleich der generierten Sequenz mit der *ncbi* Datenbank. Ergab der Abgleich eine nonsense-Sequenz, wurde die Probe als negativ bewertet. Ergab der Abgleich mit der Gendatenbank jedoch Treffer mit niedrigem *e-values*, wurde die Sequenz unter Vorbehalt als positiv bewertet. (Der *e-values* gibt Aufschluss über die Signifikanz des Alignments, die umso höher ist, je niedriger der angegebene Wert.)

(iii) Um eine Kontamination durch das Kontrollplasmid oder ein falsch-positives Ergebnis durch die generierte Sequenz des biotinyliertem Primers ausschließen zu können, schließt sich darauf ein Abgleich der generierten Sequenz mit den jeweiligen Sequenzen des biotinylierten Primers und des Kontrollplasmids an. War einer der beiden Abgleiche positiv, wurde die Sequenz als falsch-positiv bewertet, waren beide negativ, wurde die Probe als positiv gewertet. Eine Klassifizierung des Erregers konnte erfolgen, wenn der Abgleich mit der Gendatenbank einen eindeutigen Treffer ergab.

(iv) Wurde keine Sequenz für die Probe generiert, wurde zum Ausschluss eines Extraktionsfehlers die interne Kontrolle betrachtet. Ist diese positiv, wurde die getestete Probe als negativ bewertet, ist die IC jedoch negativ, muss die Extraktion der Probe wiederholt werden. Bei einem positiven Ergebnis für die Probe in der PSQ, ist die IC hingegen vernachlässigbar.

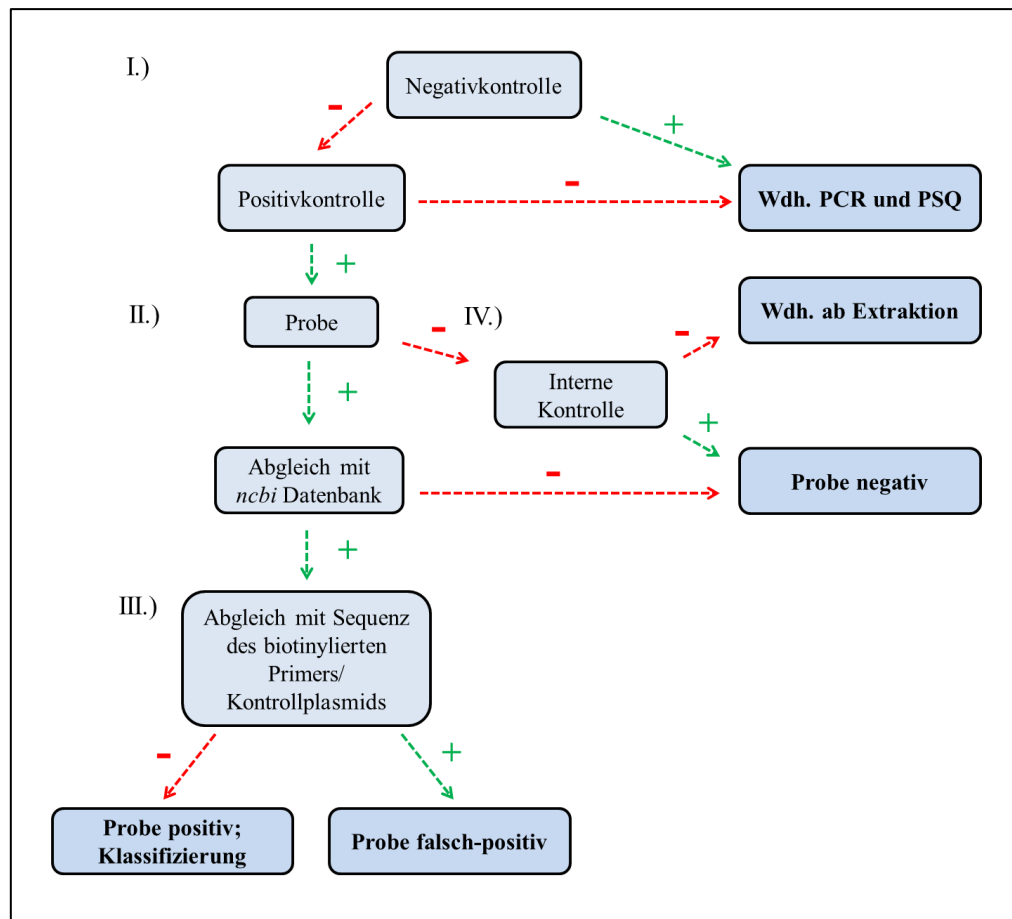


Abbildung 15: Schema zur Auswertung der PSQ einer unbekannt Probe. Jeder Assay wird hierbei einzeln betrachtet. Die NK muss negativ und die PK positiv sein, ansonsten muss die PCR und PSQ wiederholt werden (I.). Wurde keine Sequenz für die Probe generiert, erfolgt die Betrachtung der IC. Ist die IC positiv, handelt es sich um eine negative Probe. Ist die IC jedoch ebenfalls negativ, muss die Extraktion wiederholt werden (IV.). Bei einer generierten Sequenz für die Probe ist die IC vernachlässigbar. Die generierte Sequenz der Probe wird zunächst mit der *ncbi* Datenbank abgeglichen. Bei einer non-sense Sequenz wird die Probe als negativ bewertet. Bei Treffern mit niedrigem *e-values* wird die Probe unter Vorbehalt als positiv bewertet (II.). Zum Ausschluss eines falsch positiven Ergebnisses schließt sich darauf folgend der Abgleich mit der Sequenz des Kontrollplasmids und des biotinylierten Primers an. Sind diese Abgleiche negativ, wird die Probe als positiv gewertet. Eine Klassifizierung des Erregers kann nur bei einem eindeutigen Treffer der Gendatenbank erfolgen (III.).

4.4 Extrahierte RNA-Proben aus Humanseren des BNIs zur Evaluierung der TwoStep Screeningmethode

Zur Evaluierung der entwickelten Screeningmethode wurden 222, bereits aus Humanseren extrahierte, RNA-Proben vom BNI zur Verfügung gestellt. Der Inhalt der Proben wurde erst nach dem Vorliegen aller Ergebnisse aus der Screeningmethode zum Abgleich bekannt gegeben. Alle 222 Proben wurden nach demselben Schema bearbeitet. Zum Ausschluss eines falsch-negativen Ergebnisses aufgrund einer fehlerhaften Extraktion wurde zunächst mit allen Proben, wie unter 3.3.2.1 beschrieben, eine *c-myc real-time* PCR durchgeführt. C-myc beschreibt ein

Referenzgen, dessen Nukleinsäure bei einer erfolgreichen Extraktion aus Humanseren mit extrahiert wird und daher ebenfalls in der Probe mittels *real-time* PCR nachweisbar ist (42). Bei dem verwendeten PCR-Assay handelt es sich um eine bereits erfolgreich in der Diagnostik des RKIs als Extraktionskontrolle eingesetzte PCR.

Lediglich für 22 der insgesamt 222 Proben (10%) konnte sowohl in der ersten PCR, als auch in einer Wiederholung der PCR kein positiver Nachweis für c-myc erfolgen, weshalb eine Beschädigung der Proben beim Transport bzw. eine fehlerhafte Extraktion für diese Proben nicht ausgeschlossen werden kann.

Danach erfolgte ein Screening aller Proben mit den angegebenen Assays der viralen Erreger, wie unter 3.3.1 beschrieben. Im Anschluss erfolgte der Abgleich der Ergebnisse mit denen des BNIs. Von den breitgestellten 222, wurden 34 Proben im BNI auf Dengue Virus positiv sowie 188 auf Dengue Virus negativ getestet.

4.4.1 Evaluierung der Ergebnisse aus dem TwoStep Screeningverfahren für die Dengue Virus positiv getestete Proben

Der Abgleich der Ergebnisse aus dem TwoStep Screeningverfahren zeigte, dass mit der entwickelten Dengue-Virus PSQ 28 der insgesamt 34 Dengue Virus positiv getesteten Proben detektiert werden konnten (82%), mit der Pan-Flavi-PSQ 23 Proben (68%). Ein falsch-negatives Ergebnis aufgrund einer PCR-Inhibition konnte anhand der mitgeführten PK und eine fehlerhafte Extraktion über die vorherige positive c-myc *real-time* PCR ausgeschlossen werden.

Zur Evaluierung der Ergebnisse aus dem TwoStep Screeningverfahren und Quantifizierung der enthaltenen Nukleinsäuremengen wurden die 34 Proben daraufhin in eine *real-time* PCR eingesetzt, die bereits am RKI etabliert ist. Hierzu wurde, wie unter 3.3.2.2 beschrieben, eine generische Dengue Virus *real-time* PCR („Dvall“) verwendet, mit der alle vier Serotypen des Dengue Virus detektiert werden können.

Die gemessenen Ct-Werte aus der Dvall PCR wurden mit den Ergebnissen aus der PSQ verglichen. So zeigte sich, dass der Pan-Flavi-PSQ-Assay alle Proben bis zu einem Ct-Wert von 36 detektieren kann. Alle Proben mit einem höheren Ct-Wert in der Dvall werden nicht mehr erkannt. Der Dengue Virus-Assay hingegen kann Proben bis zu einem Ct-Wert von 43 detektieren und scheint somit sensitiver. Über einen mitgeführten Plasmid-Standard wurde eine Standardkurve generiert, bei der ein Ct-Wert von 38 etwa fünf Viruskopien/Ansatz entspricht. Beide entwickelten PSQs weisen demzufolge eine hohe Sensitivität auf. Für fünf der 34 Proben (15%) konnte das Dengue Virus positive Ergebnis des BNIs mit der Dvall *real-time* PCR nicht bestätigt werden. Abbildung 16 und Tabelle 26 geben einen Überblick über die Ergebnisse.

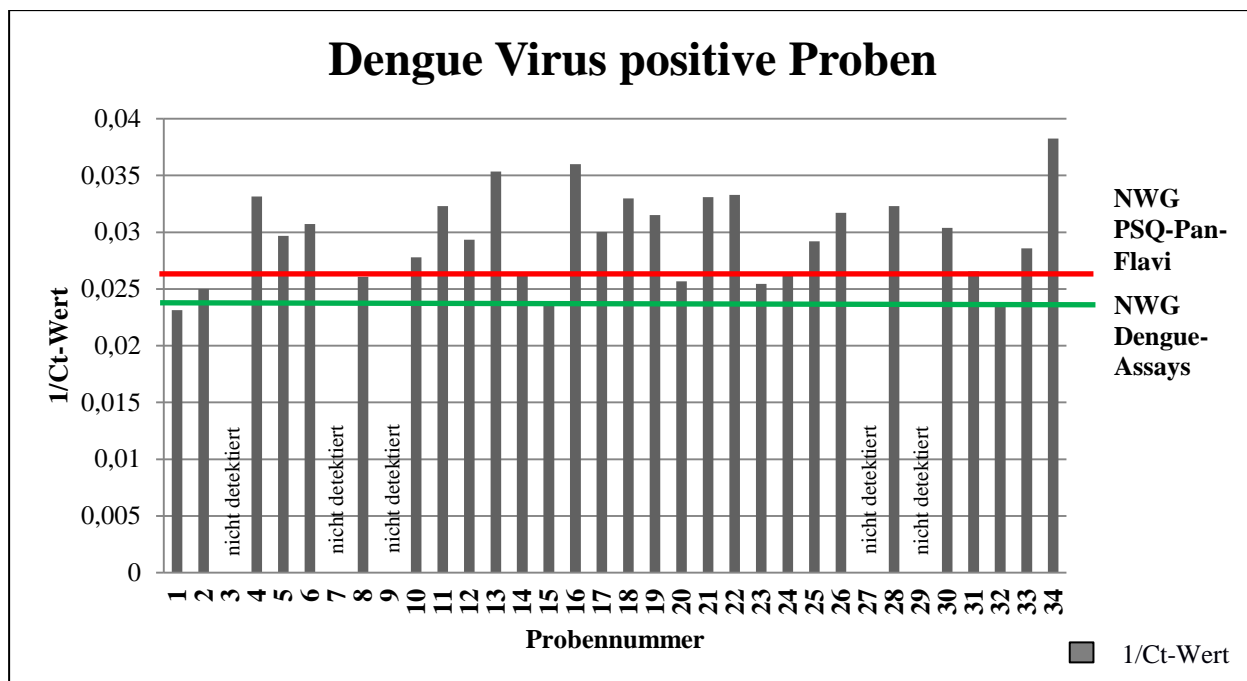


Abbildung 16: Ermittelte Nachweisgrenzen des Dengue Virus und Pan-Flavi-PSQ-Assays anhand der Ct-Werte der Dvall *real-time* PCR. Dargestellt ist der reziproke Ct-Wert aus der Dvall *real-time* PCR für die 34 Dengue Virus positiven Proben des BNI. Die grüne Linie markiert die NWG der spezifischen Dengue Virus PSQ und entspricht einem Ct-Wert von 43, die rote Linie entspricht der NWG der Pan-Flavi-PSQ mit einem Ct-Wert von 36. Alle Proben, deren Balken unterhalb der jeweiligen NWG liegen und damit einen höheren Ct-Wert aufweisen, werden von dem entsprechenden Assay nicht mehr erkannt. Die spezifische Dengue Virus PSQ ist somit sensitiver als der Pan-Flavi-PSQ-Assay.

Tabelle 26: Übersicht über die Ergebnisse der Dengue Virus positiven Proben des BNI

Probe	Serotyp	Dengue PSQ	Pan-Flavi-PSQ	Dvall Ct-Wert	<i>cmv</i> Ct-Wert	Probe	Serotyp	Dengue PSQ	Pan-Flavi-PSQ	Dvall Ct-Wert	<i>cmv</i> Ct-Wert
1	-	-	-	43,21	32,6	18	2	+	+	30,31	33,18
2	2	+	-	40,01	29,9	19	1	+	+	31,73	32,17
3	-	-	-	-	27,49	20	3	+	-	38,96	31,99
4	3	+	+	30,16	32,3	21	2	+	+	30,22	33,81
5	3	+	+	33,69	32,53	22	1	+	+	30,05	29,91
6	1	+	+	32,56	33,16	23	1	+	-	39,3	29,31
7	-	-	-	-	32,03	24	2	+	-	37,8	26,5
8	4	+	+	38,35	32,97	25	3	+	+	34,26	29,8
9	-	-	-	-	36,07	26	1	+	+	31,55	32,64
10	4	+	+	36	25,48	27	-	-	-	-	27,98
11	2	+	+	30,96	33,77	28	2	+	+	30,96	25,06
12	1	+	+	34,1	29,75	29	-	-	-	-	28,55
13	2	+	+	28,28	31,11	30	1	+	+	32,92	33,16
14	2	+	+	37,92	33,24	31	2	+	+	37,66	30,11
15	3	+	-	42,03	32,11	32	2	+	-	42,6	30,63
16	2	+	+	27,77	33,91	33	3	+	+	34,99	29,8
17	3	+	+	33,31	32,73	34	2	+	+	26,14	29,18

— NWG Dengue Virus PSQ = Ct-Wert von 43 in Dvall *real-time* PCR

— NWG Pan-Flavi-PSQ = Ct-Wert von 36 in Dvall *real-time* PCR

4.4.2 Auswertung der auf Dengue Virus negativ getestete Proben

Bei den 188 negativ auf Dengue Virus getesteten Proben handelt es sich um Nukleinsäureextrakte von Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Dengue Virus Infektion vorlag und durch das BNI ausgeschlossen werden konnte. Eine Testung auf weitere Infektionskrankheiten, wie beispielsweise Malaria oder Typhus abdominalis, die wichtige Differentialdiagnosen einer Dengue Virus Infektion darstellen, wurde nicht vorgenommen. Die Enddiagnose dieser Patienten ist daher unbekannt.

22 der insgesamt 188 Proben (12%) waren in der *cmv* *real-time* PCR negativ, weshalb die Ergebnisse aus der PSQ aufgrund des fehlenden Nachweises einer erfolgreichen Extraktion nicht bewertet werden können.

In einer der verbleibenden 166 Proben wurde eine eindeutige Sequenz für das Chikungunya Virus generiert. Eine Kontamination durch das Kontrollplasmid und ein hieraus resultierendes falsch-positives Ergebnis konnte über den Abgleich der Sequenzen sicher ausgeschlossen werden. Der Abgleich mit der Sequenz des biotinylierten PCR-Primers war ebenfalls negativ. Es liegt daher ein begründeter Verdacht für das Vorliegen einer Chikungunya Virus Infektion vor. Da jedoch kein Befund zu dieser Probe vorliegt, bleibt das Ergebnis unbestätigt. Alle weiteren 165 Proben waren negativ für alle getesteten Viren (Alkhurma Virus, CCHFV, Chikungunya Dengue Virus, Filoviren, Hantaviren, Hendra Virus, Lassa Virus, Nipah Virus Omsk Virus, RVFV, WNV und YFV).

5 Diskussion

5.1 Das TwoStep Screeningverfahren als neuer Ansatz in der Diagnostik importierter Infektionskrankheiten

Als neuer Ansatz in der Diagnostik importierter Infektionskrankheiten wurde in dieser Arbeit ein Screeningverfahren aus konventioneller PCR mit anschließender PSQ für folgende Erreger erfolgreich etabliert: Alkhurma Virus, Chikungunya Virus, CCHFV, Dengue Virus, Filoviren, Hanta Virus, Hendra Virus, Lassa Virus, Nipah Virus, Omsk Virus, RVFV, WNV, YFV, *Mykobakterium tuberculosis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi*, *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Trypanosoma brucei sp. cruzi* sowie ein Pan-Flavi-Assay. Die PCRs der IC1 (FCV) und IC2 (KoMA) wurden im *real-time* Format durchgeführt und ebenfalls mit der PSQ kombiniert. Hierdurch sollte ein sensitiver, spezifischer und zugleich zuverlässiger Nachweis verschiedener hämorrhagischer Fieberviren sowie wichtiger Differentialdiagnosen innerhalb weniger Stunden ermöglicht werden.

Die Basis dieses neuen Screeningverfahrens bildet die PCR auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll. Im Anschluss erfolgt eine Darstellung der Vorteile und Möglichkeiten, die sich durch die Kombination mit anschließender PSQ ergeben.

5.1.1 Vor- und Nachteile der PCR als molekularbiologisches Verfahren in der Diagnostik von Infektionskrankheiten

In der molekularen Diagnostik hat der Gebrauch der PCR in den letzten Jahren stark zugenommen, so dass ihre Bedeutung auch in der Detektion von Infektionskrankheiten stetig steigt. Auch in dieser Arbeit bildet sie die Basis des entwickelten Screeningverfahrens und stellt mit der konventionellen PCR zur Amplifikation von DNA, der RT-PCR zur Amplifikation von viraler RNA sowie verschiedenen *real-time* PCRs ein sehr häufig und vielfältig eingesetztes Verfahren dar (30).

Auf Grund des hohen Erfahrungsstands ist die PCR in vielen Bereichen ein gut etabliertes, sehr schnelles, spezifisches und sensitives Verfahren. Zusätzlich besitzt die PCR viele Einsatzmöglichkeiten. In der Diagnostik von Infektionskrankheiten wird dieses Verfahren zum Nachweis bzw. zur Amplifikation der Erregernukleinsäure aus verschiedenen klinischen Probenmaterialien, wie Blut, Liquor, Sputum oder Gewebeproben eingesetzt (51). Besonders beim Nachweis hochkontagiöser Erreger, wie beispielsweise einigen hämorrhagischen Fieberviren, bietet sie darüber hinaus die Möglichkeit eines Erregernachweises aus inaktiviertem Material (11).

Im Vergleich zu Antikörper-Nachweisverfahren, bei denen eine Infektion indirekt über die im Blut des Patienten gebildeten Antikörper nachgewiesen wird, erfolgt mit der PCR der Erregernachweis direkt über die Detektion der Erregernukleinsäure. Somit ermöglicht die PCR schon vor dem Anstieg von Antikörpern im Blut den Nachweis der Infektion.

Über quantitative PCR-Verfahren, wie die *real-time* PCR, kann eine Quantifizierung der Nukleinsäure erfolgen, so dass auch Rückschlüsse auf die Viruslast eines Patienten gezogen werden können. Weiterhin bietet die *real-time* PCR die Möglichkeit einer Amplifikationskontrolle und Identifizierung des Erregers bereits während der PCR-Reaktion. Zusätzlich erlangt sie durch die Verwendung spezifischer Sonden eine noch höhere Spezifität im Vergleich zur konventionellen PCR (12). In der Diagnostik der VHF stellt die *real-time* PCR ein eher neueres Verfahren dar, das allerdings zunehmend Anwendung findet, so dass in Zukunft auch hier die Quantifizierung viraler RNA als Prognosefaktor für den Verlauf einer Infektion und zum Therapiemonitoring eingesetzt werden kann. Zusätzlich soll die Gefahr für nosokomiale Infektionen, die von einem infizierten Patienten ausgeht, anhand der Menge an Erregernukleinsäure bestimmt werden.

Probleme ergeben sich in der Diagnostik mittels PCR zum einen dadurch, dass die zur Amplifikation extrahierte Erregernukleinsäure, in Fall der VHF RNA, sehr empfindlich ist und durch RNasen oder DNasen verdaut werden kann, was zu falsch-negativen Ergebnissen führt (52). Zusätzlich kann die PCR-Reaktion durch verschiedene im Reaktionsansatz enthaltene Substanzen, wie Häm, Leukozyten DNA oder Heparin aus Serumproben inhibiert werden, die bei schlechter Probenbearbeitung in der Extraktion weiterhin im Reaktionsansatz enthalten sein können (12).

Die hohe Sensitivität der PCR birgt ein erhöhtes Risiko für Kontaminationen, für die bereits eine geringe Menge an Nukleinsäure, die fälschlicherweise in die zu untersuchende Probe gelangt ist und amplifiziert wird, ausreicht. Beispielsweise kann dies aufgrund einer unsterilen Aufbereitung oder durch parallele Aufbewahrung oder Bearbeitung von Proben geschehen, so dass falsch-positive Ergebnisse resultieren.

Auch die hohe Spezifität der PCR kann unter Umständen, wie in der Diagnostik der VHF, ein Problem darstellen, wenn die detektierten Erreger eine zu große genetische Variabilität aufweisen und durch die spezifischen Primer und Soden nicht erfasst werden können.

5.1.2 Die Verwendung von konventionellen PCRs im entwickelten Screeningverfahren

Auch wenn die *real-time* PCR, wie unter Abschnitt 5.1.1 beschrieben, eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber der konventionellen PCR aufweist und bereits einige *real-time* PCR-Assays zur Detektion verschiedenster hämorrhagischer Fiebertypen publiziert wurden, fanden in dieser Arbeit ausschließlich konventionelle PCRs zum Erregernachweis Anwendung.

Zum einen liegt dies darin begründet, dass zum Nachweis einiger Erreger, wie beispielsweise dem Lassa Virus, zum Zeitpunkt der Arbeit keine gut funktionierende *real-time* PCR verfügbar war (33). Zum anderen sollten die PCRs vorrangig die, für diese Arbeit relevanten, Auswahlkriterien erfüllen (Abschnitt 4.1.1), so dass lediglich für die Detektion des Chikungunya Virus, WNV, CCHFV und die Filoviren geeignete *real-time* PCRs gefunden werden konnten.

Das nachträgliche Design einer spezifischen Sonde wäre darüber hinaus für die ausgewählten konventionellen PCRs, aufgrund der hohen genetischen Variabilität der einzelnen Viren, sehr schwierig gewesen. Für einige Erreger, wie beispielsweise beim CCHFV, bei dem der PCR-Assay im *real-time* Format drei Sonden benötigt, hätten sogar mehrere individuelle Sonden zum Reaktionsansatz hinzugegeben werden müssen, um überhaupt eine *real-time* Detektion verschiedener Virusspezies zu ermöglichen.

Beispielsweise sind für die primerbindende Region der ausgewählten RVFV-PCR (Segment S) 298 verschiedene Nukleotid-Sequenzen in der *ncbi* Nukleotid-Datenbank registriert, für das Dengue Virus Polyprotein Gen, insgesamt sogar 4528 Nukleotid-Sequenzen.

Durch die Verwendung der konventionellen PCR können letztendlich die Anzahl der benötigten Reagenzien pro Ansatz und die hierdurch entstehenden Kosten gesenkt werden. Zusätzlich verringert sich das Risiko von Wechselwirkungen unter den hinzugegebenen Oligonukleotiden hierdurch deutlich.

Sofern eine erfolgreiche Amplifikation in der konventionellen PCR nachzuweisen ist, kann dies mittels Gelelektrophorese anhand der optischen Beurteilung der Bandengrößen erfolgen. Da dieses Verfahren jedoch relativ ungenau ist, gleichzeitig das gesamte Diagnostikverfahren verlangsamen würde und als zusätzlicher Arbeitsschritt das Risiko von Kontaminationen erhöht, wurde nach erfolgreicher Etablierung der PSQ darauf verzichtet und die PCR-Produkte direkt in die PSQ eingesetzt.

Schließlich erfolgt in dieser Arbeit mit der sich anschließenden PSQ für die ausgewählten Erreger, trotz verwendeter konventioneller PCR, eine sehr spezifische Detektion und Analyse des PCR-Produktes, weshalb in diesem Fall ebenfalls auf die *real-time* Detektion verzichtet werden kann.

5.1.3 Die Verwendung der PSQ zur Sequenzierung der PCR-Produkte im entwickelten Screeningverfahren

Üblicherweise erfolgt die Auswertung des Ergebnisses aus der konventionellen PCR mittels Gelelektrophorese. In der laborgestützten Diagnostik hämorrhagischer Fieberviren ist die optische Beurteilung der PCR-Produkte allerdings nicht ausreichend genau. Besser geeignet ist die Kombination von PCR und Sequenzierung. Neben einer Bestätigung des Ergebnisses aus der konventionellen PCR bietet die Sequenzierung zusätzlich die Möglichkeit einer genauen Typisierung des Erregers, wodurch wichtige Informationen, z.B. über die Pathogenität des Erregers und die hieraus abgeleitete Wahrscheinlichkeit für schwere Krankheitsverläufe gewonnen werden können. Dies kann zur Planung der weiteren Therapie und Überwachung des Patienten genutzt werden (12). Für Dengue Virus konnte beispielweise in einer Studie von Cologna *et al.* 2005 gezeigt werden, dass die südostasiatischen Dengue Virus Stämme gegenüber anderen Virusstämmen des Serotypen 2, ein höheres Potential für schwere Krankheitsverläufe besitzen (53).

Aber auch in Bezug auf die Entwicklung von Impfstoffen oder für die Sammlung epidemiologischer Daten kann eine Sequenzierung der Erregernukleinsäure von Bedeutung sein (12).

Die Sequenzierung der PCR-Produkte bietet somit viele Vorteile. Da das Primerdesign der PSQ-Primer auf bestehenden PCR-Assays basiert, lassen sich die konventionelle PCR und PSQ einfach miteinander kombinieren. Die Hinzugabe des PCR-Produktes zur PSQ-Reaktion ist direkt ohne aufwändige Vorbereitung der Proben möglich. Weiterhin ist die PSQ durch die kurzen gelesenen Sequenzen von 30-50 Basen deutlich schneller sowie kostengünstiger als die klassische Sanger-Sequenzierung und besitzt zudem eine ebenso hohe Genauigkeit. Durch ihre Flexibilität kann sie zur Detektion einer Vielzahl von Erregern eingesetzt werden, weshalb sie sich ebenfalls gut für das entwickelte Screeningverfahren eignet (35, 36).

5.1.4 Das detektierte Erregerspektrum der TwoStep Screeningmethode

Insgesamt ist die Liste an wichtigen Differentialdiagnosen bei Verdacht auf ein viral bedingtes hämorrhagisches Fieber lang. Der Schwerpunkt dieser Arbeit wurde zunächst auf die spezielle Detektion verschiedenster hämorrhagischer Fieberviren gelegt und nur wenige bakteriell und parasitär bedingte und differentialdiagnostisch wichtige Infektionen bei der Etablierung des entwickelten Screeningverfahrens mit eingeschlossen. Auch wurden zu einzelnen Viren aus der Familie der *Arenaviridae* (das Junin Virus, Machupo Virus, Sabia Virus und Guanarito Virus),

die ebenfalls zur Gruppe der hämorrhagischen Fiebertviren gezählt werden, noch keine PCR- bzw. PSQ-Assays etabliert, was in Zukunft nachgeholt werden sollte.

Bei der Auswahl der bakteriellen und parasitären Erreger wurden lediglich importierte Infektionserreger der Tropen und Subtropen in das Screeningverfahren aufgenommen. In Deutschland vorkommende Infektionskrankheiten, die als Differentialdiagnosen eines VHF nicht außer Acht gelassen und über die Routinediagnostik mit abgeklärt werden sollten, wie Meningokokken-Infektionen, Lues, Virushepatitiden, Epstein-Barr-Virusinfektionen, Zytomegalie-Infektionen oder HIV-Infektionen fanden daher keine Berücksichtigung.

Auch sollten die ausgewählten DNA-Erreger dieser Arbeit mittels PCR aus dem Blut des Patienten nachzuweisen sein, um sie neben den Viren aus derselben Probe detektieren zu können. Generell ermöglicht die vorgeschaltete PCR-Reaktion allerdings auch einen Erregernachweis aus Liquor, Urin oder Stuhlproben, was allerdings eine zusätzliche Bearbeitung dieser Patientenproben voraussetzt.

Weitere wichtige Differentialdiagnosen für die aktuell noch keine Assays konstruiert und etabliert wurden und um die das Screeningverfahren erweitert werden könnte, sind beispielsweise die Rickettsiose, Leptospirose oder tropische Borreliosen (7).

5.2 Probleme in der PCR-Diagnostik hämorrhagischer Fiebertviren und ihre Lösungsansätze zur Etablierung einer zuverlässigen Screeningmethode

Durch die zum Teil hohe Kontagiosität und den fulminanten Krankheitsverlauf einiger Infektionen mit hämorrhagischen Fiebertviren, verlangt die laborgestützte Diagnostik gerade bei diesen Erregern ein zuverlässiges Ergebnis. Wie in dieser Arbeit daher bekannten Problemen in der Diagnostik VHF mittels PCR begegnet wurde, um dieses Verfahren als zuverlässige Methode in dem neu entwickelten Screeningverfahren einsetzen zu können, wird im Folgenden genauer erläutert.

5.2.1 Das Primerdesign bei hämorrhagischen Fiebertviren

Bei der Konstruktion eines neuen PCR-Assays erfolgt das Design der Primer auf der Basis bekannter Nukleinsäuresequenzen zu den einzelnen Erregern. Die beiden Primer sind jeweils komplementär zum 3' Ende des DNA-Stranges, so dass der zu amplifizierende Genomabschnitt von ihnen eingeschlossen wird und durch sie vorgegeben ist. Durch die Kombination der PCR mit der PSQ findet eine gezielte Sequenzierung des gewonnenen PCR-Produktes direkt im Anschluss an die PCR-Reaktion statt. Der hierfür benötigte PSQ-Primer wurde auf der Basis

bestehender PCRs konstruiert, wodurch das mit der entwickelten Screeningmethode detektierbare Erregerspektrum von den ausgewählten PCRs vorgegeben wird.

Wie bereits unter Abschnitt 5.1.1 beschrieben, handelt es sich bei den hämorrhagischen Fiebviren um RNA-Viren, die eine hohe Mutationsrate aufweisen, so dass eine große genetische Variabilität entsteht. Innerhalb eines Genus bzw. einer Spezies findet man daher gerade bei diesen Erregern sehr diverse Viren (Quasispezies) (33), was Schwierigkeiten bei der Konstruktion von Primern verursacht und die Diagnostik mittels PCR erschwert.

Zum einen können mit sehr spezifisch konstruierten Primern gegebenenfalls nur wenige Virusspezies erkannt werden, was letztendlich das detektierbare Erregerspektrum dieser Screeningmethode relativ beschränkt. Zum anderen besteht ein erhöhtes Risiko für *mismatches* (Fehlpaarungen) zwischen Primer und Template, welche sich erheblich auf die Effizienz der RT-PCR auswirken können, wie von Christopherson *et al.* 1997 gezeigt wurde. In dieser Studie wurde anhand des HIV-1 Modells festgestellt, dass fünf oder mehr *mismatches* oder sogar nur ein *mismatch* an der 3' Position bereits ausreichen, die Effizienz der RT-PCR deutlich einzuschränken (54).

Um in dieser Arbeit den genannten Problemen zu begegnen, wurden ausschließlich PCRs verwendet, deren Primer-Design auf der Basis einer großen Anzahl von bekannten Erregersequenzen erfolgt ist. Beispielsweise verwendet die CCHFV PCR als Zielsequenz das S Segment, welches von den insgesamt 3 Genomsegmenten das bisher am besten Charakterisierte für die einzelnen Virusstämme darstellt (12).

Zusätzlich besitzen die ausgewählten PCRs Zielsequenzen, die in gut konservierten Genomabschnitten der jeweiligen Erreger liegen. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit für *mismatches* deutlich reduziert. Gleichzeitig weisen diese Abschnitte allerdings ausreichend Unterschiede auf, anhand derer eine genaue Typisierung des Erregers und eine Differenzierung vieler verschiedener Spezies eines Virus Genus bzw. Familie erfolgen kann. Beispielsweise verwendet die ausgewählte Chikungunya Virus PCR als Zielsequenz das NSP1-Protein (Nichtstrukturprotein 1) oder die Filoviren PCR das Polymerase Gen, die innerhalb dieser Virusspezies bzw. -familie hoch konservierten Genomabschnitt darstellen (12, 55).

Weiterhin eignen sich zur Detektion einer großen Anzahl verschiedener Spezies einer Virusfamilie generische Primer, wie beispielsweise bei der ausgewählten Lassa Virus PCR. Dieser Assay verwendet zwei generische Primerpaare, die als Zielsequenz das L-RNA-Segment besitzen, einen gut konservierten Genomabschnitt der Arenaviren. Mit Hilfe dieser PCR kann, neben einem spezifischen Lassa Virus Nachweis, zusätzlich ein breites Spektrum weiterer Old World Arenaviren detektiert werden, ohne eine Vielzahl individueller PCRs parallel einsetzen zu

müssen, wodurch zusätzlich Reagenzien und Probenmaterial gespart werden können. Auch bei der Detektion neuer, bisher noch unbekannter Spezies kann dies vorteilhaft sein (42).

Darüber hinaus können zur Verringerung des Risikos von *mismatches* im Bereich der Target-Region Primer mit degenerierten Basen verwendet werden, wie beispielsweise bei der in dieser Arbeit ausgewählte Hanta Virus PCR. In diesem Zusammenhang muss allerdings beachtet werden, dass sich hierdurch die Anzahl der verschiedenen Nukleotide im Reaktionsansatz sowie das Risiko von Primer Dimeren erhöht, was sich negativ auf die PCR-Effizienz auswirken kann. Abschließend sei angemerkt, dass neben der Auswahl geeigneter Zielsequenzen und Primer fortlaufend ein Abgleich der verwendeten Assays mit Sequenzen neu entdeckter Spezies erfolgen sollte, um gegebenenfalls eine Aktualisierung vornehmen und so auch in Zukunft die Zuverlässigkeit des entwickelten Screeningverfahren wahren zu können.

5.2.2 Tag-Sequenz zur Detektion von Kontamination durch das Kontrollplasmid zur Vermeidung daraus resultierender falsch-positiver Ergebnisse

Wie bereits unter 5.1.1 beschrieben, besteht bei der PCR aufgrund ihrer hohen Sensitivität ein erhöhtes Risiko für Kontaminationen durch fälschlicherweise in die Probe gelangte Nukleinsäuren, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Das parallele Mitführen der Kontrollplasmide als Positivkontrollen zu jedem Assay birgt ein besonders hohes Risiko für Kontaminationen durch diese Plasmide. Um daher bei der entwickelten Methode eine daraus resultierendes falsch-positives Ergebnis sicher ausschließen zu können, wurden wie unter 4.2.1 beschrieben, in die Sequenzen der Kontrollplasmide eine *tag*-Sequenz eingefügt. Anhand dieser Sequenz ist die Differenzierung zwischen Kontrollplasmid und Erregernukleinsäure und folglich die Detektion einer Kontamination durch das Plasmid möglich.

Weiterhin bieten die zusätzlich eingefügten Nukleotide den Vorteil einer manuellen Überprüfung und Auswertung der Pyrogramme und geben Aufschluss über eine erfolgreich abgelaufene Sequenzierung, was die Zuverlässigkeit des entwickelten Screeningverfahrens weiter erhöht.

5.2.3 Verminderung der Häufigkeit falsch-negativer Ergebnisse in der PCR-Diagnostik hämorrhagischer Fieberviren

Neben falsch-positiven Ergebnissen stellen falsch-negative Ergebnisse ebenfalls ein Problem in der PCR-Diagnostik viraler hämorrhagischer Fieber dar. Falsch-negative Ergebnisse werden, wie von Drosten *et al.* 2002 beobachtet werden konnte, vor allem in der akuten Phase einer schwer verlaufenden Infektion detektiert. Ursache ist hier zumeist die Inhibition der PCR durch verschiedene Substanzen, die sich neben der Nukleinsäure in der Probe befinden. Ein potenter

Inhibitor, der v.a. auch im Zusammenhang mit VHF eine zentrale Rolle einnimmt, ist das Häm. Dieses gelangt über massive Hämolyse, die ein charakteristisches Symptom dieser Virusinfektionen darstellt, vermehrt in die zu untersuchenden Blutproben. Bei schweren Krankheitsverläufen, die ohne Hämolyse einhergehen, ist die Konzentration des inhibierend wirkenden Häm sehr gering. Jedoch können eine Vielzahl anderer PCR-Inhibitoren durch den enormen Gewebeerfall, bedingt durch eine massive Organbeteiligung, in die zu untersuchende Probe gelangen (56).

Blutentnahme mit EDTA-Röhrchen und Nukleinsäureaufreinigung. In der PCR-Diagnostik anderen Infektionskrankheiten konnte die Häufigkeit falsch-negativer Ergebnisse aufgrund einer PCR-Inhibition durch den Einsatz verschiedener Methoden deutlich reduziert werden. Zum einen werden zur Blutentnahme EDTA-Röhrchen verwendet, für die in verschiedenen Studien die größte PCR-Effizienz im Vergleich zu Serum-, Citrat- und Heparinröhrchen gezeigt werden konnte (57, 58). Zum anderen kann eine Nukleinsäureaufreinigung vorgenommen werden, um die Anzahl inhibitorisch wirksamer Substanzen in der Probe deutlich zu reduzieren. In der Diagnostik der VHF wird hierfür vor allem aufgrund ihrer Schnelligkeit die Kieselsäuremembran-Chromatographie empfohlen. Sie ist ein gut reproduzierbares Verfahren, das eine große Anzahl inhibitorischer Substanzen entfernt und eine zellfreie Flüssigkeit liefert (12).

Etablierung interner Kontrollen. Allerdings wurde in der Studie von Drosten *et al.* 2002 gezeigt, dass diese beiden Verfahren, Blutentnahme mit EDTA-Röhrchen und eine Nukleinsäureaufreinigung, in der Diagnostik der VHF alleine keine ausreichende Zuverlässigkeit bieten (56). Der Autor empfiehlt eine zusätzliche Etablierung interner Kontrollen. Als Amplifikationskontrolle ermöglichen sie die Detektion eines falsch-negativen Ergebnisses aufgrund einer PCR-Inhibition. Zusätzlich können sie den Nachweis einer erfolgreich durchgeführten Extraktion erbringen, aus der durch fehlerhaftes Vorgehen ebenfalls häufig falsch-negative Ergebnisse resultieren. Um Aufschluss über eine erfolgreich abgelaufene, spezifische PCR zu erhalten, sollten ebenfalls zu jedem PCR-Assay eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden.

Je nach Art der zu untersuchenden Probe und dem geforderten Nukleinsäurenachweis können verschiedene ICs verwendet werden. Bei der Untersuchung einer Humanserumprobe können beispielsweise zelluläre Gene als geeignete ICs genutzt werden. Die zelluläre, humane Nukleinsäure befindet sich nach einer erfolgreich durchgeführten Extraktion ebenfalls neben der nachzuweisenden Erregernukleinsäure in der zu testenden Probe. In dieser Arbeit erfolgte beispielsweise bei den bereitgestellten Dengue-Proben des BNIs der Nachweis einer

erfolgreichen Extraktion aus Humanseren mittels einer spezifischen *c-myc real-time* PCR für einen Abschnitt des *c-myc* ORFs (open reading frame).

Für eine erfolgreiche DNA-Aufbereitung aus einer Probe können, wie in dieser Arbeit, synthetisch hergestellte Plasmide, wie das Kontrollplasmid KoMa, als eine gute und stabile Alternative eingesetzt werden. Diese werden vor einer Extraktion in einer geringen, aber mittels PCR sicher nachweisbaren Menge zur Probe hinzugegeben und bei der Extraktion ebenfalls mit extrahiert. So können sie nach erfolgreich durchgeführter DNA-Extraktion und sorgfältiger Nukleinsäureaufreinigung mittels spezifischer PCR bzw. PSQ nachgewiesen werden.

Zum Nachweis einer erfolgreichen RNA-Extraktion und -Amplifikation können ganze Viruspartikel, wie das in dieser Arbeit verwendete nicht humanpathogene FCV, eingesetzt werden. Sie stellen eine gute Alternative zu frei vorliegender RNA dar, die in diesem Zustand sehr instabil ist. Auch die Viruspartikel werden in einer definierten Menge vor einer Extraktion zur Probe hinzugegeben (33).

Herstellung von Verdünnungen. Eine weitere Ursache für falsch-negative Ergebnisse können neben PCR-Inhibitoren und fehlerhafter Extraktion zu hohe Konzentrationen an viraler RNA sein, die sich aus den zum Teil sehr hohen Viruslasten bei Infektionen mit einigen hämorrhagischen Fiebertviren ergeben. Im Vergleich zu unverdünnten Nukleinsäureproben konnte Drosten *et al.* 2002 die Häufigkeit dieser so bedingten falsch-negativen Ergebnisse durch die Erstellung von Verdünnungsreihen deutlich reduzieren (56).

Fazit. Um somit den häufigsten Ursachen falsch-negativer Ergebnisse in der PCR-Diagnostik der VHF begegnen zu können und hierdurch die Zuverlässigkeit des entwickelten Screeningverfahrens deutlich zu verbessern, sollten neben ICs und einer spezifisch mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle für jeden Assay, fünf verschiedene Verdünnungen der zu testenden Probe hergestellt und parallel, anstelle von fünf individuellen Proben, die maximal nach der Plattenbelegung wie in Abbildung 15 gezeigt auf eine PCR- bzw. PSQ-Platte passen, getestet werden.

5.3 Die Validierung und Optimierung des TwoStep Screeningverfahrens

5.3.1 Die ermittelten Nachweisgrenzen zur Validierung der etablierten PCR- bzw. PSQ-Assays

Um einen PCR-Assay zuverlässig in der Routinediagnostik etablieren zu können, sollten zum einen Intra- und Interassayvarianzen bestimmt, sowie eine Probitanalyse zur Bestimmung der unteren NWG durchgeführt werden (33). Da es sich bei den verwendeten PCRs dieser Arbeit

allerdings um bereits etablierte Assays in der Diagnostik handelt, wurden sowohl die NWG für die PCR als auch PSQ, wie unter 3.1.5 beschrieben, bestimmt.

Hierbei zeigten sich für die NWG der Filoviren und Hanta Virus PCR und PSQ sowie die Plasmodium PSQ, verglichen mit den anderen Erregern, deutlich höhere Kopienzahlen im vierstelligen Bereich.

Die bereits höheren NWG des Hanta Virus und Filoviren PCR-Assays lassen vermuten, dass schon in der vorgeschalteten PCR-Reaktion weniger PCR-Produkt gebildet wird. Bei der Filoviren PCR könnte hierfür einerseits die höhere Anzahl an PCR-Primern ursächlich sein, da diese PCR im Unterschied zur Mehrzahl der anderen Erreger-PCRs fünf statt zwei PCR-Primer benötigt. Eine höhere Anzahl an Primern in einem Reaktionsgefäß erhöht das Risiko für Wechselwirkungen unter den Oligonukleotiden, was letztendlich die PCR-Reaktion behindern kann. Zum anderen könnten sich *mismatches* auf die Effizienz der PCR auswirken, die sich aus der Diversität der einzelnen Virusspezies, die mit diesem Assay detektiert werden können, ergeben. Dies scheint vor allem bei der Hanta Virus PCR die Ursache für die höhere NWG darzustellen. Zur Detektion der verschiedenen Hantavirus-Spezies wurden bei diesem PCR-Assay degenerierte Primer eingesetzt (siehe hierzu ebenfalls Abschnitt 5.2.1). Auch kann die Vereinheitlichung der Annealingtemperaturen Einfluss auf die Effizienz dieser Assays genommen haben, da hierdurch nicht für alle erregerspezifischen Primerpaare die optimalen Reaktionsbedingungen eingehalten werden konnten.

Die nochmals höheren Nachweisgrenzen dieser Assays in der PSQ zeigen, dass auch die PSQ-Reaktionen durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Beim Hanta Virus Assay könnte dies zum einen durch die Amplikonlänge bedingt sein. Das Amplikon stellt mit 452 bp das zweitgrößte Amplikon dieser Arbeit dar und liegt deutlich über der empfohlenen Länge von 100-200 bp für eine optimale Detektion in der PSQ. Hierdurch kann es durch Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb des PCR-Produktes zur Beeinträchtigung der PSQ-Reaktion kommen. Aber auch weitere Faktoren, wie *mismatches*, zwischen PSQ Primer und PCR Produkt können sich auf die Effizienz der PSQ-Reaktionen auswirken. Bei dem Plasmodium Assay enthält die erwartete Sequenz darüber hinaus eine große Anzahl an Homopolymeren.

Ein Abgleich der bestimmten NWG mit Nukleinsäurekonzentrationen aus Humansenen bzw. Virustitern Infizierter ist eher schwierig. Dies liegt vor allem darin begründet, dass aufgrund der Seltenheit einzelner Infektionen mit einigen hämorrhagischen Fiebertoren die Verfügbarkeit zuverlässiger Studien mit großem Stichprobenumfang begrenzt ist. Drosten *et al.* zeigte 2002 in einer Studie, dass die Virustiter aus Humansenen von sowohl an Lassa Virus, als auch an CCHFV oder an Ebola Virus Erkrankten, die mittels *real-time* PCR bestimmt wurden, in

Bereichen zwischen $7,7 \times 10^5$ geq/ml und 4×10^9 geq/ml lagen (59). Hiernach kann somit zumindest beim Filoviren Assay, trotz der deutlich höher liegenden NWG, von einer ausreichenden Sensitivität ausgegangen werden.

5.3.2 Die etablierten Virus-Assay-Kombinationen als Multiplex-PCRs zur Optimierung der Screeningmethode

Mittels Multiplex PCRs erfolgt die Amplifikation der Erregernukleinsäure nicht anhand verschiedener PCRs, die parallel in verschiedenen Reaktionsansätzen getestet werden, sondern zusammen in einem PCR-Reaktionsansatz. Gerade wenn eine Abklärung verschiedener in Frage kommender Erreger in kurzer Zeit erfolgen soll, wie beispielsweise bei den VHF, besitzt dieses Verfahren viele Vorteile. Mittels Multiplex-PCR können zum einen Reagenzien und die Menge des Probenvolumens vermindert werden, zum anderen kann die Bearbeitungszeit der Proben hierdurch verkürzt werden (59).

Die Etablierung einer gut funktionierenden Multiplex-PCR ist allerdings nicht trivial. Schwierigkeiten entstehen vor allem durch die hohe Anzahl an verschiedenen Primern - (und Sonden), die sich im Reaktionsansatz befinden und für die optimale Reaktionsbedingungen geschaffen werden müssen, um die Funktionalität bzw. Sensitivität der kombinierten PCRs nicht zu stark zu beeinflussen (59).

Trotz der genannten Schwierigkeiten ist es in dieser Arbeit gelungen, drei mögliche Multiplex-PCRs mit je zwei Erregern zu etablieren (Alkhumra Virus und RVFV, CCHFV und Chikungunya Virus, Omsk und Hendra Virus). Bei den anderen ausgetesteten Kombinationen ist aufgrund der Ergebnisse von einer zu starken Beeinträchtigung der einzelnen Assays, vermutlich durch Interaktionen zwischen den Oligonukleotiden im Reaktionsansatz, auszugehen. Auch durch Variation der Primerkonzentrationen konnte diesen Problemen nicht begegnet werden.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass bei dem entwickelten Screeningverfahren bereits durch die Anpassung der verschiedenen PCR-Assays an dieselben PCR-Bedingungen und die hierdurch mögliche parallele Testung der verschiedenen Viren, Bakterien und Parasiten auf einer PCR- bzw. PSQ-Platte eine relativ schnelle und einfache Diagnostik ermöglicht wird. Darüber hinaus stellt, anders als bei der *real-time* Multiplex-PCR, bei der ein spezifischer Erregernachweis mittels spezifischer Sonden erfolgt, eine vorliegende Koinfektion ein großes Problem für den Erregernachweis mittels PSQ dar. Wie bereits unter 4.2.2.1 beschrieben, käme es bei einer Koinfektion zu einer parallelen Sequenzierung beider PCR-Produkte in einem Reaktionsansatz und hierdurch zur Überlagerung der Pyrogramme, anhand derer ein Erregernachweis nicht mehr möglich wäre. Auch wenn Koinfektionen mit VHF relativ selten

beschrieben sind, scheint somit die parallele Testung der einzelnen Erreger zumindest bei der Kombination der PSQ mit der konventionellen PCR das zuverlässigere Verfahren darzustellen. Zusätzlich erhält man so die Möglichkeit, relativ flexibel eine Auswahl der zu testenden Erreger treffen zu können.

5.3.3 Die etablierte Pan-Flavi-PCR bzw. PSQ zur Optimierung der Detektion verschiedener Spezies des Genus Flavivirus

Bei eng verwandten Viren, wie den Flaviviren, ist das Design einer Multiplex-PCR aufgrund des hierdurch erhöhten Risikos für Kreuzreaktionen unter den einzelnen Oligonukleotiden nochmals schwieriger. Alternativ können zur Detektion verschiedener Spezies einer Virusfamilie bzw. Genus mit nur einer PCR-Reaktion generische PCR-Primer, wie bei der ausgewählten Lassa Virus PCR, verwendet werden.

Zur Detektion verschiedener Spezies des Genus Flavivirus wurde in dieser Arbeit ein Pan-Flavi-PSQ-Assay designt und etabliert. Dieser Assay verwendet als Zielsequenz die gut konservierte NS5 (Nichtstrukturprotein 5) Region der Flaviviren.

Anhand der Testung dieses Assays mit bekannten Nukleinsäuren zu den einzelnen Flaviviren konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass mittels Pan-Flavi-PSQ, ebenso wie mit den erregerspezifischen PSQs, eine genaue Differenzierung der einzelnen Virusspezies des Genus Flavivirus möglich ist.

Der Vergleich des detektierten Erregerspektrum der Pan-Flavi-PSQ mit den erregerspezifischen PSQs (Dengue Virus, WNV, YFV) zeigt, dass mittels Pan-Flavi-Assay weitere Spezies des Genus Flavivirus detektiert werden können (FSME Virus, Japanische Enzephalitis Virus und das Usutu Virus), für die in dieser Arbeit keine erregerspezifischen PSQs etabliert wurden, wodurch das Spektrum des entwickelten Screeningverfahrens zusätzlich erweitert wird.

Die Detektion des WNV Israel Isolat konnte nur mittels spezifischer WNV PSQ erfolgen, was zeigt, dass zumindest im Vergleich zum spezifischen WNV-Assay das detektierte Spektrum an WNV-Stämmen beim Pan-Flavi-Assay eingeschränkter zu sein, was vermutlich auf eine zu große Diversität unter den einzelnen Stämme zurückzuführen ist.

Auch der Vergleich der Sensitivitäten zeigt, dass die NWG der entwickelten Pan-Flavi-PSQ zumeist mindestens eine log Stufe höher lag, als die NWG der erregerspezifischen Flaviviren PSQs.

Dieser Sensitivitätsverlust des Pan-Flavi-Assays ist vermutlich auf den PSQ-Primer zurückzuführen, der abweichend von den Herstellerangaben der PSQ-Reagenzien (Primer-Schmelztemperatur von ungefähr 50°C) eine höhere Schmelztemperatur von 55°C besitzt. Eine

weitere Verkürzung dieses Primers wäre allerdings nicht ohne Verlust seiner Spezifität möglich gewesen. Durch die höhere Schmelztemperatur können sich unspezifische Bindungen zwischen Primer und Template ergeben, die Einfluss auf die Effizienz haben können. Aber auch *mismatches* können hierfür ursächlich sein.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass durch die Verwendung des Pan-Flavi-Assays ein breites Spektrum an verschiedenen Flavivirenspezies, das Dengue Virus, FSME Virus, Japanische Enzephalitis Virus, Usutu Virus, WNV und YFV spezifisch detektiert werden kann. Verglichen mit den erregerspezifischen Assays geht dies allerdings mit einer Einschränkung der erkannten Virenstämme der einzelnen Spezies sowie einer verminderten Sensitivität einher. Zur genaueren Einordnung der klinischen Relevanz dieser Einschränkungen sollte daher eine weitere Testung mit klinischen Proben erfolgen.

5.4 Dengue Proben zur Validierung des entwickelten TwoStep Screeningverfahrens

Bei der Etablierung eines neuen Diagnostikverfahrens sollte immer auch eine Validierung des Verfahrens mit realen Proben erfolgen und die Reproduzierbarkeit der, anhand von synthetisch hergestellten Kontrollplasmiden, gewonnenen Ergebnisse überprüft werden. Gerade bei den hämorrhagischen Fiebertoren ist die Verfügbarkeit solcher Proben aufgrund der Seltenheit einzelner Infektionen, sowie den besonderen Anforderungen an die Labordiagnostik eher begrenzt. Auch in dieser Arbeit stand nur eine geringe Anzahl an bekannten Nukleinsäuren zu den einzelnen Erregern (siehe Tabelle 3) zur Testung der entwickelten Assays zur Verfügung. Allerdings konnte zumindest für diese Nukleinsäuren die Funktionsfähigkeit des entwickelten Verfahrens gezeigt werden, so dass im nächsten Schritt ein Screening unbekannter Nukleinsäurenproben des BNIs auf alle viralen Erreger dieser Arbeit erfolgte. Da diese Proben bereits extern extrahiert wurden, konnte die interne RNA-Kontrolle FCV nicht als Extraktionskontrolle verwendet werden, weshalb bei diesen Proben zum Nachweis einer erfolgreichen Extraktion eine *c-myc real-time* PCR durchgeführt wurde. Über den Nachweis der humanen *c-myc* DNA kann jedoch keine Aussage zur Qualität der enthaltenen, deutlich instabileren RNA dieser Proben gemacht werden.

Über eine generische *Dv* *real-time* PCR sowie das Mitführen eines Standards, mit dem eine Standardkurve generiert wurde, erfolgte die Quantifizierung der enthaltenen Dengue Virus RNA in den einzelnen Proben. Anhand der so bestimmten RNA-Mengen zeigte sich für beide Assays (Dengue Virus PSQ und Pan-Flavi PSQ) eine hohe Sensitivität, wobei die erregerspezifische PSQ gegenüber der Pan-Flavi-PSQ eine noch höhere Sensitivität aufweist. Einen Rückschluss

auf die klinische Relevanz der eingeschränkten Sensitivität der Pan-Flavi-PSQ kann allerdings anhand der Ergebnisse nicht gezogen werden, da vollkommen unklar bleibt, wie viel Dengue Virus RNA durch den Transport beschädigt wurde. Somit sind die bestimmten RNA-Mengen nicht mit den ursprünglichen Virustitern eines Patienten korrelierbar. Eine Bestimmung des Serotypen war mit beiden Assays möglich.

Bei den fünf laut BNI Dengue Virus positiven Nukleinsäureproben, bei denen alle Dengue Virus Assays negativ waren, ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die enthaltene RNA beim Transport beschädigt wurde. Weiterhin könnte es sich bei diesen Proben um Dengue Virusstämme handeln, die aufgrund genetischer Diversität mit der entwickelten Screeningmethode nicht detektiert werden können. Da allerdings alle drei verwendeten Assays unterschiedliche Genomabschnitte als Zielsequenz besitzen, scheint dies als Ursache für ein falsch-negatives Ergebnis eher unwahrscheinlich.

Eine Aussage zur Funktionsfähigkeit der anderen erregerspezifischen PSQs ist aufgrund der Ergebnisse leider nicht möglich, da es sich bei den bereitgestellten Proben lediglich um auf Dengue Virus getestete Proben handelt. Es sollten daher in Zukunft weitere Testungen mit weiteren Erregerproben durchgeführt werden.

Bei einigen Dengue Virus negativen Proben wurden allerdings die Sequenzen der biotinylierten PCR-Primer verschiedener Assay gelesen. Die hieraus resultierenden falsch-positive Ergebnisse unterstreichen somit nochmals die Notwendigkeit eines Abgleiches der generierten Sequenz in der PSQ mit der Sequenz des biotinylierten PCR-Primers. Nur so kann ein ausreichend zuverlässiges Ergebnis in der PSQ gewährleistet werden, auch wenn die Etablierung der PSQ-Assays erfolgreich war.

5.5 Die von deutschen Hochsicherheitslaboren am häufigsten angewandten molekularbiologischen Diagnostikverfahren zur Detektion von VHF im Detail

Wie bereits unter 1.7 beschrieben werden in der molekularbiologischen Diagnostik von den in Deutschland qualifizierten Diagnostikzentren für VHF neben der PCR und Sequenzierung, vor allem die VI, IFA, ELISA, EM sowie der VNT und WB angewandt, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

Die Virusisolierung. Eine klassische Methode in der Diagnostik VHF zur Isolierung und anschließenden Detektion der Viren stellt die Virusanzucht auf Zellkulturen oder in Labortieren dar. Aufgrund des hohen Erfahrungsstands stellt die VI ein sehr zuverlässiges und darüber hinaus sehr sensitives Verfahren dar. Da bei der VI vor der eigentlichen Virusanalyse eine Virusvermehrung stattfindet, wird lediglich ein infektiöses Partikel pro Assay benötigt. Die

Detektion des Virus kann entweder direkt über den zytopathischen Effekt als Nachweis für Viruswachstum oder da dies häufig sehr unspezifisch ist, über eine anschließend durchgeführte Methode zum Nachweis des Erregers oder dessen Nukleinsäure erfolgen. Verfahren, die sich hierfür anbieten, sind unter anderem die PCR, die Antigendetektion mittels Immunfluoreszenz oder auch die Elektronenmikroskopie. Da bei der VI bis zum Vorliegen eines endgültigen Diagnostikergebnisses Tage bis Wochen vergehen können, ist häufig eine parallele Testung einer verdächtigen Probe mit einem schnelleren Diagnostikverfahren notwendig. Anwendung findet die VI vor allem zur Bestätigung eines Diagnostikergebnisses oder wenn eine genaue virologische Analyse des Virus erfolgen soll (12, 62).

Die Elektronenmikroskopie. Die EM stellt, mit 15 Minuten bis zu vier Stunden bis zum Vorliegen eines Ergebnisses, eine relativ schnelle Diagnostikmethode dar. Sie bietet die Möglichkeit, eine verdächtige Probe mit einem offenen Blick auf Erreger untersuchen zu können, ohne eine vorherige Selektion der zu testenden Viren vornehmen zu müssen. Dies erfordert auf der einen Seite vom Untersuchenden viel Erfahrung und eine spezifische Morphologie der einzelnen Viren zur Identifizierung auf der anderen Seite. Der Nachweis kann aus verschiedenen Materialien erfolgen. Dieser gelingt allerdings nur zuverlässig bei hohen Viruskonzentrationen im Untersuchungsmaterial. Im Serum werden beispielsweise $> 10^7$ Viruskopien/ ml benötigt. Weiterhin kann mittels EM lediglich ein Nachweis der Virusfamilie erfolgen, einzelne Subtypen bzw. Stämme können mit ihr nicht differenziert werden (12, 62).

Immunfluoreszenz Assay. Bei der IFA handelt es sich um ein lange in der Diagnostik VHF etabliertes, serologisches Diagnostikverfahren. Mit ihr werden im Serum enthaltene Virusantikörper detektiert, die an eine fixierte Schicht aus mit dem Virus infizierten Zellen binden, so dass alle Proteine eines Virus als Antigen fungieren können. Die Bindung der Serumantikörper wiederum wird über fluoreszenzmarkierte Antikörper in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Für jedes Virus existiert ein charakteristisches Fluoreszenzmuster, was diesem Verfahren eine gewisse Spezifität im Vergleich z.B. zum ELISA (siehe unten) verleiht. Das Erkennen dieser Muster bedarf allerdings Erfahrung mit der Methode. In der Regel werden bis zum Vorliegen eines Diagnostikergebnisses 2-3 Stunden benötigt. Durch, für einige Erreger kommerziell erhältliche Testkits wird der Einsatz dieses Verfahrens in Routinelaboren erleichtert (63). Problematisch bei der IFA ist, dass es zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern verwandter Viren kommen kann, die beispielsweise aus vorangegangenen Infektionen, Impfungen oder Koinfektionen resultieren. Sofern für ein Virus kein virusspezifischer Test vorhanden ist, kann dies allerdings ebenfalls ein Vorteil sein (64).

Enzym-linked-immunosorbent assay. Beim ELISA handelt es sich ebenfalls um ein serologisches Verfahren zum Nachweis von Virusantigenen oder spezifischen IgM und IgG Antikörpern, die an fixierte Antigene bzw. Antikörper binden. Der Nachweis der Antigen- bzw. Antikörper-Bindung erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion. Zum Teil wurden bereits ELISA-Tests mit rekombinanten Antigenen und infizierten Zellen entwickelt. Die Relevanz für spezifische Antikörpertests ist vom Virus und von der Krankheitsdauer abhängig. Durch den zum Teil fulminanten Verlauf einer VHF-Infektion kann bei einer, an solch einer Infektion verstorbenen Person eine Serokonversion vollkommen fehlen (64). Bei Hanta Virus und auch Dengue Virus Infektionen stellen IgM Antikörper allerdings häufig den einzig nachweisbaren Parameter einer Infektion dar, da oft kurz nach Krankheitsbeginn keine Viren mehr im Blut nachweisbar sind. Der Nachweis von IgG Antikörpern ist gerade bei einer Dengue Virus Infektion von prognostischer Wichtigkeit, da eine vorherige Dengue Virus Infektion mit einem anderen Serotyp das Risiko für ein schwer verlaufendes hämorrhagisches Dengue Fieber erhöht. Auch aus epidemiologischer Sicht kann die Prävalenz von spezifischen IgG Antikörpern in Endemiegebieten interessant sein (12).

ELISA-Tests bieten den Vorteil, dass sie ein relativ einfaches Protokoll besitzen und leicht automatisiert werden können. Zum Teil sind auch kommerziell erhältliche Kits vorhanden, weshalb diese Methode mittlerweile eine der häufigsten angewandten Methode in der Labordiagnostik darstellt (65). Auch ELISA-Tests besitzen den Nachteil, dass es zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern verwandter Viren kommen kann. Die Zeit bis zum Vorliegen eines endgültigen Diagnostikergebnisses beträgt 2-3 Stunden.

Western Blot. Beim WB werden die Virusproteine, die als Antigene für gesuchte Antikörper dienen, zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose Membran aufgetragen, bevor sie mit dem Patienten-Serum inkubiert werden (66). So kann ein Nachweis verschiedener Antikörper parallel erfolgen. Zudem bietet diese räumliche Auftrennung der Antikörper den Vorteil eines übersichtlicheren Ergebnisses, was dieser Methode im Vergleich zu anderen serologischen Verfahren eine höhere Spezifität verleiht. Testkits für WBs sind kommerziell erhältlich, so dass ihr Einsatz in der Routinediagnostik erleichtert wird.

Virusneutralisationstest. Der Virusneutralisationstest stellt den Goldstandard zur Quantifizierung von Antikörperreaktionen auf eine Infektion oder Impfung dar und gibt Aufschluss über den Immunstatus eines Patienten. Er dient dem Nachweis neutralisierender Antikörper gegen bestimmte Viren im Serum, die diesen Namen tragen, da sie eine Aufnahme des Virus in die Zelle verhindern und so der zytopathische Effekt ausbleibt. Zur Bestimmung des Antikörpertiters werden verschiedene Verdünnungen (1:2, 1:4 usw.) des Patientenserum zum

Virus und der Zellkultur gegeben. Die letzte Verdünnung bei der 50% des Zellrasens erhalten bleibt bezeichnet man als Titer (67). Insgesamt stellt der Virusneutralisationstest ein sehr aufwändiges und langwieriges Verfahren dar, das allerdings durch den Nachweis der neutralisierenden Antikörper hoch spezifisch ist. Kreuzreagierende Antikörper stellen hier kein Problem dar, weshalb das Verfahren in diesem Punkt anderen serologischen Verfahren wie ELISA-Tests oder der IFA überlegen ist und daher vor allem zur Qualitätskontrolle in der Labordiagnostik Anwendung findet. Eingesetzt wird dieses Verfahren zudem zur Sammlung epidemiologischer Informationen (64).

5.6 Fazit und Einordnung des entwickelten Screeningverfahrens in die Diagnostik hämorrhagischer Fieberviren.

Die Sicherung der Verdachtsdiagnose eines viral bedingten hämorrhagischen Fiebers bedarf aufgrund der Besonderheiten im klinischen Management und der Gefahr für nosokomiale Infektionen einer spezifischen und zuverlässigen Labordiagnostik. Zum Nachweis dieser Infektionen werden daher verschiedene molekularbiologische Verfahren angewandt, die eine Infektion entweder direkt über den Erreger oder dessen Nukleinsäure oder indirekt über Antikörper nachweisen. Die Ergebnisse aus den verschiedenen Verfahren, die zeitlich auseinandergehen können, müssen sich gegenseitig bestätigen, woraus zusammengenommen ein ausführliches und zuverlässiges Diagnostikergebnis resultiert. Gleichzeitig muss eine große Anzahl an Differentialdiagnosen abgeklärt werden, was die Diagnostik von hämorrhagischen Fieberviren zusätzlich aufwändig und zeitintensiv macht.

Mit dem Einsatz des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens als Screeningmethode könnte die Labordiagnostik VHF sinnvoll ergänzt und der gesamte Prozess vereinfacht werden. Das innerhalb weniger Stunden erhaltene Screeningergebnis könnte dazu genutzt werden, erste Behandlungsmaßnahmen einzuleiten und sich über die Notwendigkeit spezieller Sicherheitsvorkehrungen klar zu werden. Weiterhin könnte basierend auf dem Ergebnis eine gezielte und notwendige Bestätigungsdiagnostik durchgeführt werden.

Das entwickelte Verfahren vereint die konventionelle PCR mit anschließender PSQ. Mit der Verwendung speziell konstruierter Kontrollplasmide und der Etablierung interner Kontrollen wurde bekannten Problemen in der PCR-Diagnostik VHF begegnet und die Zuverlässigkeit des Verfahrens erhöht. Der Nachweis des Erregers erfolgt direkt über seine Nukleinsäure, wodurch eine frische Infektion bereits vor einem Antikörperanstieg und somit zu einem sehr frühen Zeitpunkt detektiert werden kann. Hierdurch kann es besonders in der Anfangsphase einer Infektion serologischen Nachweisverfahren überlegen sein. Durch die zunächst durchgeführte

PCR wird die enthaltene Erregernukleinsäure der Probe vor dem Einsatz in die PSQ amplifiziert, was dem Verfahren eine hohe Sensitivität verleiht. Die PSQ ermöglicht im Anschluss einen hoch spezifischen Erregernachweis und stellt zudem gerade bei hämorrhagischen Fiebertviren, bei denen eine *real-time* Detektion aufgrund der hohen genetischen Variabilität häufig Schwierigkeiten bereitet, eine geeignete Alternative dar, trotz der verwendeten konventionellen PCR eine genaue Typisierung des Erregers vornehmen zu können. Besonders geeignet als Screeningmethode erscheint das Verfahren vor allem dadurch, da es universell auf eine große Anzahl verschiedener Infektionserreger, sowohl viraler, bakterieller als auch parasitärer Genese, anwendbar ist und so eine parallele Abklärung verschiedenster Differentialdiagnosen in kürzester Zeit mit nur einem molekularbiologischen Verfahren ermöglicht. Zusätzlich ist das Verfahren mit dem entwickelten Ablaufschema leicht zu erlernen. Bis zum zuverlässigen Einsatz der entwickelten Methode in der Routinediagnostik VHF, sollten allerdings folgende Aspekte in zukünftigen Projekten bearbeitet werden:

- Aufgrund der geringen Anzahl sowie dem begrenzten Erregerspektrum der bereitgestellten Nukleinsäureproben sollte zur Bestätigung der, anhand von Kontrollplasmiden, gewonnenen Ergebnisse das entwickelte Verfahren mit weiteren Proben getestet werden.
- Auch sollte eine Testung des Verfahrens mit Serumproben erfolgen, um die, in dieser Arbeit etablierten, internen Kontrollen FCV und KoMa als Extraktions- und Amplifikationskontrollen einsetzen und ihre Funktionsfähigkeit überprüfen zu können.
- Um ein noch breiteres Spektrum differentialdiagnostisch wichtiger Infektionserreger, wie beispielsweise weitere Viren aus der Familie der *Arenaviridae*, parallel abklären zu können, sollten weitere PSQ-Assays für die Screeningmethode konstruiert und etabliert werden. Zusätzlich sollte fortlaufend eine Optimierung der vorhandenen Assays vorgenommen werden, um ebenfalls eine Detektion neu auftretender Spezies der einzelnen Erreger ermöglichen zu können.
- Die einzelnen Arbeitsschritte sollten, sofern möglich, weiter optimiert werden. So könnte durch die Verwendung von Trockenreagenzien oder vorgefertigten Materialien für PCR und PSQ versucht werden, den Gesamtprozess der Screeningmethode weiter zu beschleunigen.

Abkürzungsverzeichnis

BBQ	<i>Black Berry Quencher</i>	HIV	<i>human immunodeficiency virus,</i>
B-Erreger	Biowaffen-Erreger		Humane Immundefizienz-Virus
BNI	Bernhardt-Nocht-Institut	IC	<i>Internal control,</i>
bp	Basenpaare		Interne Kontrolle
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie	IgM	Immunglobulin M
		IgG	Immunglobulin G
BSL	<i>Biosafety Level,</i> Biologischer Sicherheitslevel	JEV	Japanische Enzephalitis Virus
		KBR	Komplementbindungsreaktion
CCHFV	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever</i> <i>virus,</i> Krim-Kongo-hämorrhagisches- Fieber-Virus	KF Virus	<i>Kayasanur Forest Virus,</i> Kayasanur Wald Virus
		<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
Ct	<i>threshold cycle,</i> Schwellenwert-Zyklus	LCMV	lymphozytäre Choriomeningitis Virus
		LDH	Lactat-Dehydrogenase
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	NaOH	Natriumhydroxid
ELISA	<i>Enzym-linked-immunosorbent</i> <i>assay</i>	<i>ncbi</i>	<i>National Center for</i> <i>Biotechnology Information</i>
EM	Elektronenmikroskopie	NK	Negativkontrolle
ENIVD	<i>European Network for Diagnostics</i> <i>of Imported Viral Diseases</i>	NFQ	<i>Non-fluorescent quencher</i>
		NWG	Nachweisgrenze
FAM	Carboxyfluorescein	ORF	<i>open reading frame,</i> offener Leserahmen
FCV	Felines Calicivirus		
FRET	<i>fluorescence resonance energy</i> <i>transfer</i>	PCR	<i>Polymerase Chain reaction,</i> Polymerase-Kettenreaktion
FSME- Viurs	Frühsommermeningitis Virus	PK	Positivkontrolle
		pKoMa	Kontrollplasmid KoMa
GIT	Guanidinium-Isothiocyanat Puffer	PSQ	Pyrosequenzierung
Puffer		RKI	Robert Koch-Institut
HAH	Hämagglutinationshemmtest	RNA	Ribonukleinsäure

RT-PCR	Reversen Transkriptase PCR
RVFV	<i>Rift Valley fever Virus</i> , Rifttal-Fieber-Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
VHF	virale hämorrhagische Fieber
VI	Virusisolation
VNT	Virusneutralisationstest
WB	Western Blot
WNV	<i>West Nile Virus</i> , West Nil Virus
YFV	<i>Yellow fever Virus</i> , Gelbfieber Virus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristische Symptome viraler Infektionen.....	19
Abbildung 2: Verlauf von Fieber und serologischen Parametern bei einer Dengue Virus (DENV) Erstinfektion	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Diagnostik VHF	24
Abbildung 4: Funktionsprinzip der PCR.....	25
Abbildung 5: Funktionsprinzip der Taqman Sonde im 5' Nuklease Format	27
Abbildung 6: Funktionsprinzip der PSQ	28
Abbildung 7: Design eines PSQ-Assays	47
Abbildung 8: Kontrollen zur Detektion von Fehlerquellen bei der Etablierung eines PSQ- Assays.....	48
Abbildung 9: Beispiel Pyrogramme für ein Kontrollplasmid und die erregerspezifische RNA von YFV.....	53
Abbildung 10: Beispielpyrogramme der internen Kontrollen FCV und KoMa.....	54
Abbildung 11: Beispielpyrogramme sowie das Ergebnis der Gelelektrophorese aus der Verdünnungsreihe des RVFV Kontrollplasmids zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für PCR und PSQ.....	57
Abbildung 12: Ergebnisse der Gelelektrophorese bei der Vereinheitlichung der Temperaturprofile der DNA- und RNA-Erreger.....	59
Abbildung 13: Quantitative Gelelektrophorese der Virus-Assay-Kombination von CCHFV und Chikungunya Virus	61
Abbildung 14: Einteilung der PCR- und PSQ-Platten für die RNA- und DNA-Erreger zum Screening von max. 5 Proben.....	66
Abbildung 15: Schema zur Auswertung der PSQ einer unbekannt Probe	69
Abbildung 16: Ermittelte Nachweisgrenzen des Dengue Virus und Pan-Flavi-PSQ-Assays anhand der Ct-Werte der Dvall <i>real-time</i> PCR	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die, in dieser Arbeit berücksichtigten, Viren und deren Eigenschaften	13
Tabelle 2: Angewandte Verfahren deutscher Labore in der Diagnostik viral bedingter hämorrhagischer Fieber nach Auflistungen der ENIVD	24
Tabelle 3: Überblick über alle verwendeten Nukleinsäuren	31
Tabelle 4: Primer und Sonden für die PCRs und Pyrosequenzierungen der RNA-Viren.....	33
Tabelle 5: Primer und Sonden für die PCRs und Pyrosequenzierungen der DNA-Erreger...	35
Tabelle 6: Reaktionsansatz für RT-PCR	38
Tabelle 7: Programm für RT-PCR	38
Tabelle 8: Reaktionsansatz für konventionelle PCR.....	39
Tabelle 9: Programm für konventionelle PCR.....	39
Tabelle 10: Reaktionsansatz für Screeningmethode auf RNA-Erreger	41
Tabelle 11: Reaktionsansatz für Screeningmethode auf DNA-Erreger	41
Tabelle 12: Reaktionsansatz für c-myc real-time PCR	43
Tabelle 13: Programm für c-myc real-time PCR	43
Tabelle 14: Reaktionsansatz DvAll <i>real-time</i> PCR.....	43
Tabelle 15: Programm für DvAll <i>real-time</i> PCR.....	43
Tabelle 16: Generierte Sequenzen der Erregernukleinsäuren in der PSQ	49
Tabelle 17: Überblick über die Flaviviren-PSQ-Assays mit den getesteten Erreger-RNAs....	50
Tabelle 18: Generierte Sequenzen der Flaviviren RNAs in der PSQ mit den Erreger-PSQ-Assays.....	51
Tabelle 19: Generierte Sequenzen der Erreger-DNAs in der Pyrosequenzierung	51
Tabelle 20: Überblick über die Erregerassays mit den Annealingtemperaturen, der Anzahl der Primer, den unteren NWG in PCR und PSQ sowie der Länge der erwarteten Sequenz des Kontrollplasmids in der PSQ.....	55
Tabelle 21: Generierte Sequenzen in der PSQ des Plasmodium Kontrollplasmids.....	56
Tabelle 22: Überblick über getestete Virus-Assay-Kombinationen	62
Tabelle 23: Vergleich der Nachweisgrenzen von PCR bzw. PSQ der Viren in den Virus-Assay-Kombination und den einzelnen Virusassays	63
Tabelle 24: Generierte Sequenzen der Erregernukleinsäuren in der PSQ mit dem Pan-Flavi-Assay	64
Tabelle 25: Vergleich der Sensitivität der Detektion von Flaviviren RNAs mittels virusspezifischer PSQ-Assay und der Pan-Flavi PSQ	65
Tabelle 26: Übersicht über die Ergebnisse der Dengue Virus positiven Proben des BNI.....	71

Literaturverzeichnis

1. Kaufmann SHE, Sütterlin S. Infektionskrankheiten. Vol.: Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2009
2. Anonymous. Robert Koch-Institut. Auftreten tödlicher tropischer Krankheiten in Deutschland selten, Vorsorge muss aber getroffen werden. (Pressemitteilung vom 26.11.1999). (Accessed November 15, 2012, at http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/1999/22B_99.html.)
3. Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2012. Berlin 2013
4. Diesfeld H J, Krasuse G, Teichmann D. Praktische Tropen- und Reisemedizin. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2003
5. Scientific Advisory Committee of European Network for Imported Viral Diseases (ENIVD). Management and Control of Viral Haemorrhagic Fevers, 2011. (Accessed November 15, 2012, at <http://www.enivd.de/netz.pdf>)
6. Gottschalk R, Dreesman J, Leitmeyer K et al. Kummunen, Länder, Bund und Europäische Gemeinschaft. Zuständigkeiten und Aufgaben bei Seuchennotfällen im Kontext der neuen internationalen Vorschriften. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2009;52:183-192
7. Schmidt-Chansit J, Schmiedel S, Fleischer B et al. Viruses acquired abroad-what does the primary care physician need to know?. Dtsch Arztebl Int 2012;109(41):681-692
8. Medlock J M, Hansford K M, Schaffner F et al. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012;12(6):435–447
9. Dixon M G, Schafer I J. Ebola Viral Disease Outbreak — West Africa, 2014. MMWR Morb Mortal Wkly Rep June 27, 2014;63(25):548-551
10. Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe: Biologische Gefahren II. Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage. 1. Auflage 2007
11. Lang W, Löscher T. Tropenmedizin in Klinik und Praxis. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2000
12. Drosten C, Kümmerer B, Schmitz H, et al. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. Antiviral Research 2003;57:61-87
13. Laminger F, Prinz A. Bats and other reservoir hosts of Filoviridae. Danger of epidemic on the African continent? – A deductive literature analysis. Wien Klin Wochenschr 2010;122:19-30
14. Hsu V. Nipah and Hendra Viruses. In: Tabor E eds. Emerging Viruses in Human Populations. Oxford: Elsevier 2007:179-199
15. Anonymous. World Health Organization (WHO). Hendra Virus, Fact sheet N°329. (Accessed November 20, 2012, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs329/en/index.html>.)
16. Anonymous. World Health Organization (WHO). Nipah Virus, Fact sheet N°262. (Accessed November 20, 2012, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs262/en/>.)
17. Wilson M L. Laboratory Diagnosis of Malaria: Conventional and Rapid Diagnostic Methods. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2013;137(6):805-811
18. Uneke C J. Concurrent malaria and typhoid fever in the tropics: the diagnostic challenges and public health implications. J Vector Borne Dis 2008;45:133-142
19. Agrawal S. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. J Postgrad Med 2005;51(5):53-57

20. Mitashi P, Hasker E, Lejon V, et al. Human African Trypanosomiasis Diagnosis in First-Line Health Services of Endemic Countries, a Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(11):e1919
21. Anonymous. Robert Koch-Institut. Tuberkulose RKI-Ratgeber für Ärzte. (Accessed May 18, 2013, at http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html#doc2374486bodyText2.)
22. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:113-122
23. Fock R, Koch U, Finke E et al. Schutz vor lebensbedrohenden importierten Infektionskrankheiten. Strukturelle Erfordernisse bei der Behandlung von Patienten und anti-epidemischen Maßnahmen. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 2000;43:891-899
24. Gottschalk R, Grünewald T, Biederbick W. Aufgaben und Funktion der ständigen Arbeitsgemeinschaft der Kompetenz- und Behandlungszentren für hochkontagiöse, lebensbedrohliche Erkrankungen. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 2009;52:214-218
25. Schmitz H. Vorgehen bei Verdacht auf virale hämorrhagische Fieber. *Dt Ärztebl* 2001;98(41):2659-2661
26. Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2006
27. Rhim JS, Schell K, Creasy B et al. Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med* 1969;132(2):670-678
28. Biel SS, Nitsche A, Kurth A et al. Detection of human polyomaviruses in urine from bone marrow transplant patients: comparison of electron microscopy with PCR. *Clin Chem* 2004;50(2):306-12
29. Bedei I. Untersuchung zur MUC-18-Expression des metastasierenden malignen Melanoms mittels der RT-PCR-Methode. 2002. (Accessed June 5, 2013, at http://vts.uni-ulm.de/docs/2002/1101/vts_1101.pdf.)
30. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 2002;30(6):1292-1305
31. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95-125
32. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;109(4):365-79
33. Schröder K. Etablierung ultrasensitiver generischer Nukleinsäuretestverfahren zum Nachweis hochpathogener Mikroorganismen. 2012. (Accessed October 15, 2012, at <http://opus4.kobv.de/opus4-tuberlin/frontdoor/index/index/docId/3378>.)
34. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74:5436-5467
35. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* 2006;363:83-94
36. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001;11(1):3-11
37. Panning M, Grywna K, van Esbroeck M et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008;14(3):416-422

38. Wölfel R, Paweska JT, Petersen N et al. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. *Emerg Infect Dis* 2007;13(7):1097-1100
39. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(3):545-551
40. Panning M, Laue T, Olschlager S et al. Diagnostic reverse-transcription polymerase chain reaction kit for filoviruses based on the strain collections of all European biosafety level 4 laboratories. *J Infect Dis* 2007;196(2):199-204
41. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis* 2006;12(5):838-840
42. Vieth S, Drosten C, Lenz O et al. RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101(12):1253-1264
43. Linke S, Niedrig M, Kaiser A et al. Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(2):358-364
44. Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. *Mol Cell Probes* 2010;24(2):110-113
45. Marone P, Carretto E, Telecco S et al. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Mycobacterium* spp. in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Int Conf AIDS* 1993;9(1):331
46. Nga TV, Karkey A, Dongol S et al. The sensitivity of real-time PCR amplification targeting invasive *Salmonella* serovars in biological specimens. *BMC Infect Dis* 2010;10:125
47. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(1):e581
48. Stijn D, Veerle L, Rosine AE et al. Diagnostic Accuracy of PCR in gambiense Sleeping Sickness Diagnosis, Staging and Post-Treatment Follow-Up: A 2-year Longitudinal Study. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(2):e972
49. Zago MP, Barrio AB, Cardozo RM et al. Impairment of Infectivity and Immunoprotective Effect of a LYT1 Null Mutant of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2008;76(1):443-451
50. Kirchner S, Krämer KM, Schulze M et al. Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(13):4387-4395
51. De Paula SO, Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis* 2004;8(6):390-398
52. Lynch JR, Brown JN. The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. *J Med Genet* 1990;27(1):2-7
53. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005;79(2):853-9
54. Christopherson C, Sninsky J, Kwok S. The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. *Nucleic Acids Res* 1997;25(3):654-8
55. Modrow S, Flake D, Truyen U et al. *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2010
56. Drosten C, Panning M, Guenther S et al. False-negative results of PCR assay with plasma of patients with severe viral hemorrhagic fever. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4394-5
57. Holodniy M, Kim S, Katzenstein D et al. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991;29(4):676-9

58. Dickover RE, Herman SA, Saddiq K et al. Optimization of specimen-handling procedures for accurate quantitation of levels of human immunodeficiency virus RNA in plasma by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):1070-3
59. Drosten C, Götting S, Schilling S 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):2323-30
60. Vasilakis N, Holmes EC, Fokam EB et al. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. *J Virol* 2007;81(17):9591-5
61. Cardoso J, Ooi MH, Tio PH et al. Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(4):e423
62. Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol* 1999;13(1-2):105-19
63. Anonymous. European Network for Imported Viral Diseases (ENVID). Commercial Diagnostic Tests Available. (Accessed November 25, 2012, at http://www.enivd.de/test_commercial.htm.)
64. Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T et al. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses* 2012;4(10):2097-114
65. Wright WF, Pritt BS. Update: The diagnosis and management of dengue virus infection in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;73(3):215-20
66. Ksiazek TG, West CP, Rollin PE et al. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J Infect Dis* 1999;179(1):192-8
67. Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2005

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Imke Hartwigsen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Entwicklung sequenzbasierter Schnelldiagnostikverfahren zur Diagnostik von hochpathogenen Erregern, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

-

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Andreas Nitsche für seine Betreuung und seine Mühen und für seine Geduld, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses Projekt neben meinem Studium durchführen zu können und eigene Impulse in die Gestaltung der Arbeit einfließen zu lassen. Dr. Dr. Jonas Schmidt-Chanasit und seiner Arbeitsgruppe möchte ich recht herzlich für die gute Kooperation und Bereitstellung der Dengue Proben danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Kati Bourquain bedanken, für ihre umfangreiche Unterstützung, Betreuung und tolle Zusammenarbeit, die immer ein offenes Ohr für alle meine Fragen und Probleme hatte.

Pranav Patel möchte ich für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe bei der Etablierung der Pan-Flavi-PSQ sowie Bereitstellung von Virus-RNAs danken.

Außerdem möchte ich mich bei folgenden Kollegen von ZBS1 besonders bedanken: Silvia Muschter für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung vor allem bei der Pyrosequenzierung und Bestellung von Labormaterialien sowie Fragen rund ums Labor. In diesem Zusammenhang sei auch Jule Tesch und Jule Hinzmann gedankt. Daniel Bourquain danke ich für die umfangreiche Unterstützung und Hilfe bei der Plasmid-Bestellung. Weiterhin sei allen Doktoranden und Studenten gedankt, die mich ebenfalls tatkräftig bei der Arbeit unterstützt haben: Wojtek Dabrowski, Marica Burger, Anna Löwa, Kathrin Bankov, Jörg Döllinger, Bettina Wedekind und vielen anderen lieben und netten Kollegen für die schöne Laborzeit am RKI.

Meiner Familie vor allem, meinen Eltern Katja und Frank Hartwigsen sowie meine Brüdern Nils und Sören möchte ich für die umfassende Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Ich konnte immer auf euch zählen.