Aus der Abteilung Virologie
(Prof. Dr. med. F. Hufert)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Entwicklung von Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Verfahren zum schnellen Nachweis von hochpathogenen Erregern

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Anna Milena Euler
aus
Kassel

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Hufert

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. P. Burfeind

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2015

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen zum Thema der Dissertation

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Zoonosen 1

1.2 Biologische Agenzien 2

1.2.1 CDC-Kategorien 2

1.2.2 Exkurs: Historie von B-Agenzien 3

1.3 Hochpathogene Zoonose-Erreger 5

1.3.1 Ebola Virus 5

1.3.2 Marburg-Virus 6

1.3.3 Rift-Valley-Fieber-Virus 7

1.3.4 Variola-Virus 7

1.3.5 Francisella tularensis 8

1.3.6 Yersinia pestis 9

1.3.7 Bacillus anthracis 10

1.4 Bestehende Nachweisverfahren 11

1.5 PCR, Echtzeit-PCR und isothermale Nachweisverfahren 12

1.6 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation 13

1.7 Zielsetzung 16

2 Material und Methoden 17

2.1 Material 17

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte 17

2.1.2 Chemikalien 18

2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer 19

2.1.4 Reagenzienansätze 19

2.1.5 Enzyme 20

2.1.6 Bakterienstämme 20

2.1.7 Ausgangs-DNA 21

2.1.8 DNA-Plasmide 21

2.1.9 Oligonukleotide 21

2.1.10 Computerprogramme 22

2.2 Methoden 22

2.2.1 Bakteriologische Methoden 22

2.2.1.1 Nährmedien 22

2.2.1.2 Anzucht von *E.coli*-Kulturen 22
2.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien 22
2.2.1.4 Transformation von *E. coli*- Zellen 23
2.2.2 Molekularbiologische Methoden 23
2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA 23
2.2.2.2 Midipräparation von Plasmid-DNA 24
2.2.2.3 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung 25
2.2.2.4 Reinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren 25
2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA mittels Fluoreszenzmessung 25
2.2.2.6 Gelelektrophorese 26
2.2.2.7 DNA-Extraktion aus präparativen Agarosegelen 26
2.2.2.8 Aufbereitung von genomischer DNA und DNA von infiziertem Hasengewebe von *Francisella*-Stämmen 27
2.2.2.9 Enzymkatalysierte Reaktionen an RNA 27
2.2.2.9.1 Reverse Transkription 27
2.2.2.10 Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA 28
2.2.2.10.1 Restriktionsverdau 28
2.2.2.10.2 TA-Klonierung 28
2.2.2.10.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 30
2.2.2.10.4 *In-vitro*-Transkription 31
2.2.2.10.5 Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion 32
2.2.2.10.6 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation 35
2.2.2.10.7 Sequenzierung 40
2.2.2.10.8 Probit-Analyse 40

3 Ergebnisse 42

3.1 Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Verfahren zum Nachweis viraler RNA 42
3.1.1 Entwurf der RT-RPA-Amplikons 42
3.1.2 Herstellung molekularer Standards 44
3.1.3 Vergleich von TwistAmp™-fpg- und TwistAmp™-exo-Kit 44
3.1.4 RT-RPA von *Francisella tularensis* und *Yersinia pestis* 46
3.1.5 Analytische Sensitivität 48

3.2 Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Verfahren zum Nachweis bakterieller und viraler DNA 53
3.2.1 Entwurf der DNA-RPA-Amplikons 53
3.2.2 Herstellung molekularer Standards 55
3.2.3 Analytische Sensitivität 57

3.3 Analytische Spezifitätstestungen 62
3.3.1 Kreuztestungen 62
3.3.2 Spezifitätstest des Variola-Virus-Ansatzes mit anderen Orthopocken 63

3.4 Extraktionstestungen 64

4 Diskussion 65

4.1 RNA-RT-RPA 68

4.1.1 Vom Zwei-Schritt- zum Ein-Schritt-Verfahren 68

4.1.2 RT-RPA-Nachweise für die tmRNA von *Yersinia-pestis* und *Francisella-tularensis* 70

4.1.3 Vergleich von TwistAmp™-exo-Kit und TwistAmp™-fpg-Kit 72

4.1.4 Sensitivität und Spezifität der RT-RPA-Nachweise 73

4.2 DNA-RPA 76

4.2.1 Sensitivität und Spezifität der DNA-RPA-Ansätze 76

4.3 Optimierung und Ausblick der RPA 80

5 Zusammenfassung 82

6 Anhang 83

6.1 Sequenzanalysen 83

6.2 RPA-Amplikons 84

6.2.1 RNA-Amplikons 84

6.2.2 DNA-Amplikons 86

6.3 RPA-Ergebnisse 88

6.3.1 Ergebnisse der RNA-RPA-Nachweise 88

6.3.2 Ergebnisse der DNA-RPA-Nachweise 89

7 Literaturverzeichnis 91

Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen zum Thema der Dissertation

Euler M, Wang Y, Otto P, Tomaso H, Escudero R, Anda P, Hufert FT, Weidmann M (2012): Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Francisella tularensis. J Clin Microbiol 50(7), 2234-2248

Euler M, Wang Y, Nentwich O, Piepenburg O, Hufert FT, Weidmann M (2012): Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Rift Valley Fever Virus. J Clin Virol 54(4), 308-312

Euler M, Wang Y, Heidenreich D, Patel P, Strohmeier O, Hakenberg A, Niedrig M, Hufert FT, Weidmann M (2013): Development of a Panel of Recombinase Polymerase Amplification Assays for the Detection of Biothreat Agents. J Clin Microbiol 51(4),1110-7

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
BA	*Bacillus anthracis*
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
cDNA	komplementäre DNA
Cp	Schwellenwert (engl.: Crossing point)
ddH2O	doppelt-destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EBOV	Zaire-Ebola-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
Ftu	*Francisella tularensis*
gp32	Glykoprotein 32
HDA	Helicase-dependant-Amplification
IUB-Code	International-Union-of-Biochemisty-Code
kb	Kilobasen
LAMP	Engl.: Loop-mediated-isothermal-amplification
LB	Luria Bertani
M	molar
MARV	Marburg-Virus
NASBA	Engl.: Nucleic-Acid-Sequence-based-Amplification
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RCA	Rolling-Circle-Amplification
RNA	Ribonukleinsäure
rNTPs	Ribonukleosidtriphosphate
RPA	Rekombinase-Polymerase-Amplifikation
RT	Reverse Transkriptase

RVFV	Rift-Valley-Fieber-Virus
SDA	Engl.: Strand-Displacement-Amplification
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMART	Engl.: Signal-mediated-Amplification-of-RNA-Technology
ssrA	Engl.: Small stable RNA A
SUDV	Sudan-Ebola-Virus
TA	Thymin-Adenin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	*Thermus aquaticus*
TE	Tris-EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofuran
Tm	Schmelztemperatur (engl.: Melting temperature)
TMA	Engl.: Transcription-mediated-amplification
tmRNA	transfer-messenger-RNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UNO	Vereinte Nationen (engl.: United-Nations-Organization)
UpM	Umdrehungen pro Minute
VAV	Vaccinia-Virus
VARV	Variola-Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: World-Health-Organization)
Ype	*Yersinia pestis*

1 Einleitung

1.1 Zoonosen

Zoonosen sind Infektionskrankheiten, die auf natürlichem Weg wechselseitig zwischen Menschen und Wirbeltieren übertragen werden. Infektionserreger können Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze sein. Es sind weltweit über 200 Infektionserreger bekannt, die Zoonosen auslösen. Ungefähr 60% aller humanpathogenen Erreger sind Zoonose-Erreger.

Die meisten Zoonose-Erreger überleben in Tierreservoirs. Eine Übertragung auf den Menschen kommt nur gelegentlich und eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung kommt nicht oder nur selten vor (z.B. Tollwut, Salmonellen). Bei anderen Zoonose-Erregern ist eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung häufig, was zu lokalen Ausbrüchen (z.B. Ebola-Fieber) oder einer weltweiten Verbreitung führen kann (z.B. pandemische Influenza). Der Übertragungsweg ist direkt oder indirekt möglich. Eine direkte Übertragung erfolgt oral, über Haut-, Schleimhautkontakt oder Inhalation. Indirekt kann eine Übertragung über Nahrungsmittel oder über Vektoren wie Zecken, Flöhe oder Mücken erfolgen.

Es gibt Zoonosen, die seit Jahrhunderten bekannt sind, wie die Pest und die Tollwut. Neuere emergente Zoonosen sind unter anderem die Lyme-Borreliose, das Ebola-Fieber, die Hanta-Virus-Infektion und die Creutzfeld-Jakob-Krankheit. Kürzlich aufgetretene Zoonosen sind das SARS-Coronavirus und das aviäre Influenzavirus H5N1. Das SARS-Coronavirus löste 2003 eine weltweite Pandemie einer atypischen Pneumonie aus, bei der ungefähr 8000 Menschen infiziert wurden, die Letalität der Erkrankung lag bei ca. 10%.

Die verstärkte Verbreitung und Übertragung von Zoonosen wird durch verschiedene Faktoren begünstigt. Zunehmender Tourismus mit einer internationalen Vernetzung über den Schiffs- und Flugverkehr, die Globalisierung von Nahrungsmittelproduktion und -verteilung, das steigende Bevölkerungswachstum und die Ansammlung von Menschen in großen Städten sind hier bedeutende Einflussfaktoren. Zusätzlich werden durch die globale Erwärmung bessere Lebensbedingungen und eine Ausweitung der Lebensräume für Zecken und Mücken ermöglicht. Eine zunehmende Entwaldung und ein damit verbundener Anstieg von Nagerpopulationen führen zu einer vermehrten Ausbreitung zoonotischer Infektionen. Die steigende Anzahl immunsupprimierter Patienten und ein exzessiver Antibiotikaverbrauch mit Ausbildung von Mutations-, Selektions-,

Adaptierungsprozessen und Resistenzen der Erreger führen zudem zu einer höheren Ausbreitungstendenz.

Die Ausbreitung von Zoonose-Erregern ist, je nach Erregereigenschaften, multifaktoriell bedingt und für die globale Gesundheit relevant, da sie Epidemien und Pandemien auslösen können. Hochpathogene und lebensbedrohende Zoonose-Erreger können auch als biologische Agenzien eingesetzt werden (Bioterrorismus) und für einige Vertreter ist so ein potentieller Missbrauch dokumentiert. Zu dieser Kategorie gehören das Ebola-, das Marburg- und das Rift-Valley-Fieber-Virus, die ein hämorrhagisches Fieber auslösen. Als bakterielle Erreger sind *Francisella tularensis, Yersinia pestis* und *Bacillus anthracis*, die Erreger der Tularämie, der Pest und des Milzbrands zu nennen (Faulde et al. 2002; Alpers et al. 2004; Hong et al. 2012; Karesh et al. 2012; Rabozzi et al. 2012).

1.2 Biologische Agenzien

Laut der Definition der Vereinten Nationen von 1969 sind biologische Agenzien (B-Agenzien) „...lebende Organismen jeglicher Art oder aus diesen gewonnene infektiöse Stoffe, die Krankheiten oder Tod bei Mensch, Tier oder Pflanze verursachen sollen und deren Wirkung auf ihrer Fähigkeit beruht, sich in den angegriffenen Personen, Tieren oder Pflanzen zu vermehren.“ (UNO 1970, S. 5). Bei den Organismen handelt es sich um Bakterien, Viren und Gifte biologischen Ursprungs (Toxine), die sich aufgrund gewisser Eigenschaften, wie z.B. einer hohen Übertragungsrate und einer hohen Mortalität bei Infektion, als potentielle Waffe eignen.

Die B-Agenzien, können in unterschiedlicher Weise als Waffe verwendet werden, z.B. in Form von Explosivkörpern, Sprühgeräten oder durch die Verseuchung von Nahrungsmitteln bzw. Trinkwasser.

Hinzu kommt die Befürchtung, dass bekannte B-Agenzien genetisch manipuliert werden und dadurch an Gefahr bezüglich Infektiösität und Resistenz gegenüber bestehenden wirksamen Medikamenten zunehmen (Friesecke et al. 2007).

1.2.1 CDC-Kategorien

Die amerikanischen Centers of Disease Control and Prevention (CDC) teilen die B-Agenzien in die drei Kategorien A, B und C ein (s. Tabelle 1.1).

Die Agenzien mit der höchsten Gefahrenstufe zählen zu Kategorie A. Sie können leicht von Person zu Person übertragen werden, sind leicht zu verbreiten und die durch die Erreger ausgelösten Erkrankungen haben hohe Mortalitätsraten. Sie können eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellen, soziale Unruhe und Panik auslösen. Sie würden,

falls sie als Waffe eingesetzt würden, von den Gesundheitsbehörden besondere Vorbereitungen erfordern.

Zu Kategorie B werden Erreger gezählt, die relativ leicht zu verbreiten sind und die Erkrankungen mit hoher Morbidität aber geringer Letalität auslösen können.

Die Erreger der Kategorie C haben bislang noch ein geringes Gefährdungspotential, könnten durch genetische Veränderung zu gefährlichen B-Agenzien umgewandelt werden (CDC 2009, URL: http://www.emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp, Stand: 01.12.2014).

Tabelle 1.1 CDC- Einteilung der B-Agenzien in Kategorie A, B und C, nach Gefahrenstufen (Kategorie A höchste Gefahrenstufe, Kategorie C niedrigste Gefahrenstufe)

Kategorie	Krankheit (Erreger)
A	Anthrax (*Bacillus anthracis*) Botulismus (Clostridium botulinum toxin) Pest (*Yersinia pestis*) Pocken (Variola-Virus) Tularämie (*Francisella tularensis*) Virale hämorrhagische Fieber (z.B. Arenaviren [z.B. Lassa-Virus], Filoviren [z.B. Ebola-, Marburgvirus], Rift-Valley-Fieber-Virus, Dengue-Virus)
B	Brucellose (*Brucella*-Spezies) Epsilon-Toxin Nahrungsmittelkeime (z.B. *Salmonella* Spezies*, Escherichia coli O157:H7, Shigella* Spezies) Maliasmus (Burkholderiae mallei) Melioidose (Burkholderia pseudomallei) Psittakose (*Chlamydia psittaci*) Q-Fieber (*Coxiella brunetii*) Ricin (Ricinus communis) Staphylokokken-Enterotoxin B Epidemisches Fleckfieber (*Rickettsia prowazekii*) Virale Encephalitis (Alphaviren) Trinkwasserkeime (Vibrio cholerae, Cryptosporidium parvum)
C	z.B. Niphavirus, Hantavirus

(CDC, URL: http://www.emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp, Stand: 01.12.2014).

1.2.2 Exkurs: Historie von B-Agenzien

Die Verwendung von B-Agenzien ist seit Jahrhunderten bekannt. Im Folgenden wird die Entwicklung ab dem 20. Jahrhundert beschrieben.

Im Ersten Weltkrieg verwendete Deutschland den Milzbranderreger *Bacillus anthracis,* um in verschiedenen Ländern wie Rumänien, Russland, Mesopotamien und den USA Tiere zu infizieren, die militärisch eingesetzt wurden.

Nach dem Ersten Weltkrieg wurde im Jahre 1925 das Genfer Protokoll über das Verbot des Einsatzes chemischer und biologischer Kampfstoffe von 108 Nationen unterzeichnet. In diesem Protokoll wurde aber nicht die Forschung, die Produktion oder der Besitz verboten.

Die USA unterzeichneten dieses Protokoll nicht. Belgien, Frankreich, Großbritannien, Italien, Kanada, die Niederlande, Polen und die Sowietunion begannen trotz Unterzeichnung des Protokolls Forschungsprogramme zwischen dem Ersten und dem Zweiten Weltkrieg (Martin et al. 2008).

Im Zweiten Weltkrieg wurde in Japan eine geheime Einrichtung der japanischen Armee mit dem Namen „Einheit 731“ gebildet, die Versuche mit biologischen Agenzien durchführten. Chinesische Gefangene wurden unter anderem den Erregern des Milzbrands, der Cholera und der Pest ausgesetzt. Im Rahmen von Feldversuchen wurden 11 chinesische Städte mit B-Agenzien angegriffen. Allerdings erkrankten bei einem Feldversuch in Changde 1941 nicht nur Chinesen, sondern auch 10000 japanische Soldaten an Cholera.

Auch Großbritannien forschte während des Zweiten Weltkrieges an biologischen Agenzien und testete Anthrax-Bomben in den Jahren 1942 und 1943 auf der unbewohnten Gruinard Insel an der Nordwestküste von Schottland (Martin et al. 2008).

Die Vereinigten Staaten begannen 1942 B-Waffenprogramme mit Botulinumtoxin, *Bacillus anthracis* und *Brucellen*. In den 50er und 60er Jahren fuhren sie mit der Forschung fort.

Es gab mehrere Feldversuche in den USA, zum Beispiel wurde 1966 als nicht-infektiöser Testkampfstoff *Bacillus globigii* in dem New Yorker U-Bahn System freigesetzt, um eine Ausbreitung des Milzbranderregers *Bacillus anthracis* zu simulieren (Frischknecht 2003).

Die Vereinten Nationen entwickelten 1972 die Biowaffenkonvention, ein Übereinkommen über den Verbot der Entwicklung, Herstellung und Lagerung bakteriologischer Waffen und Toxinwaffen, sowie über die Vernichtung solcher Waffen. Diese trat 1975 in Kraft und wurde von über 100 Staaten ratifiziert. Jedoch fehlt es der Biowaffenkonvention an Kontrolle. Es gibt keine Verifizierungsmaßnahmen und somit werden Verstöße gegen den Vertrag nicht aufgedeckt (Christopher et al. 1997).

Die Sowjetunion begann zwischen dem Ersten und dem Zweiten Weltkrieg mit Programmen für biologische Agenzien. Ein Hauptprogramm hieß Biopreparat, das auch nach der Unterzeichnung der Biowaffenkonvention weiter bestand. Während des Kalten Krieges erkrankten 1979 durch einen Unfall in einem Forschungslabor in Swerdlowsk 66 Menschen im Umkreis des Labors an Milzbrand. 1992 wurde dieser Unfall von der russischen Regierung unter Boris Jelzin bestätigt. Russland unterzeichnete eine

Vereinbarung mit den Vereinten Nationen und Großbritannien, das Waffenprogramm zu beenden (Martin et al. 2008).

Seit den 80er Jahren ist der Bioterrorismus in den Vordergrund getreten. Anhänger des indischen Guru Rajneesh versetzten im Jahre 1984 Nahrungsmittel von 10 Restaurants in in Oregon mit *Salmonella thyphimurium*. Ungefähr 750 Menschen erkrankten durch diesen Vorfall an Enteritis (Török et al. 1997).

Im Jahr 1995 wurde von der japanischen religiösen Organisation Ōmu Shinrikyō das Nervengas Sarin in der Tokioter U-Bahn ausgesetzt, woraufhin 12 Menschen starben und etwa 6200 Menschen in Krankenhäuser behandelt werden mussten. Dieser Anschlag zählt zwar zu den bioterroristischen Anschlägen mit chemischen und nicht biologischen Waffen, ist aber aufgrund der Häufung bioterroristischer Anschläge erwähnenswert.

Im Oktober 2001, drei Wochen nach dem Anschlag auf das World Trade Center, wurden Briefe mit *Bacillus anthracis* in New York und Washington DC verschickt (Frischknecht 2003; Martin et al. 2008).

Die Historie der B-Agenzien verdeutlicht, dass der Einsatz von biologischen Waffen eine mögliche Gefahr darstellen kann, unter anderem weil die Biowaffenkonvention nicht sichert, dass Länder, die den Vertrag unterschrieben haben, nicht an B-Agenzien forschen oder diese entwickeln.

1.3 Hochpathogene Zoonose-Erreger

1.3.1 Ebola Virus

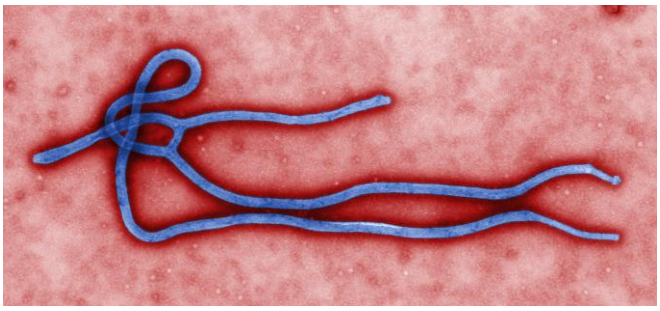


Abbildung 1.1 Koloriertes elektronenmikroskopisches Bild eines Ebola-Virions (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp, ID#.10816, Stand: 01.12.2014).

Das Ebola-Virus gehört zu den Filoviren. Die Virionen bestehen aus langen, verzweigten Filamenten, die für die Filoviren charakteristisch sind (s. Abbildung 1.1 und Abbildung 1.2). Das Ebola-Virus hat ein einzelsträngiges Negativ-Strang-RNA-Genom (Kayser et al. 2010). Es löst das Ebola-Fieber aus, ein hämorrhagisches (mit Blutungen einhergehendes) Fieber.

Das Ebola-Virus ist seit 1976 bekannt. Es wird in fünf Subspezies eingeteilt: Zaire-Ebola-Virus, Sudan-Ebola-Virus, Tai-Forest-Ebola-Virus, Bundibugyo-Ebola-Virus und Reston-Ebola-Virus. Die erstgenannten vier sind humanpathogene Subspezies. Die häufigsten Infektionen wurden bisher von Zaire-Ebola-Virus und Sudan-Ebola-Virus ausgelöst.

Ausbrüche sind seit 1976 zum Großteil in Afrika (z.B. Kongo, Südsudan, Uganda) aufgetreten, es gab aber unter anderem auch Ausbrüche in den USA und Russland. Ein erneuter Ausbruch des Zaire-Ebola-Virus breitet sich seit März 2014 in Guinea, Liberien und Sierra Leone aus (CDC 2014, URL: http://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html, Stand: 01.11.2014).

Der Übertragungsweg des Ebola-Virus ist meist die Schmierinfektion, das natürliche Reservoir des Virus ist noch nicht vollständig geklärt. Hinweise deuten jedoch auf eine Übertragung auf Primaten und Menschen durch Fledertiere, wie *Rousettus aegyptiacus,* hin (Pourrut et al. 2009). Häufig sind Infektionen des Menschen durch Ansteckung nach Primatenkontakt (z.B. Bushmeat) beschrieben. Die Inkubationszeit beträgt 2-21 Tage.

Ein akuter Beginn mit grippeähnlichen Symptomen ist charakteristisch. Es kann zu Muskelschmerzen, Pharyngitis, Erbrechen, Durchfall sowie zu Schleimhautulzerationen mit Exanthem kommen. Da die Viren sich in Makrophagen, dendritischen Zellen und in Endothelzellen vermehren, kommt es zu nekrotischen Schäden in vielen Organen. Nach 5-7 Tagen folgt das hämorrhagische Fieber mit inneren Blutungen, aber auch Blutungen ins Gewebe. Die Letalität der meisten Stämme liegt bei 50-90%. Die Therapie ist symptomatisch, durch intravenöse Flüssigkeitszufuhr wird die Prognose verbessert (Reuter 2004; Niedrig et al. 2006; Kayser et al. 2010).

Experimentelle Therapieansätze sind in Erprobung, z.B. die Verwendung von kleinen RNA-Molekülen, der Influenzavirus-Polymeraseblocker Favipiravir (T507) und Gemische aus monoklonalen Antikörpern (Pourrut et al. 2009; Mitka 2010; Olinger et al. 2012; Qiu et al. 2012).

1.3.2 Marburg-Virus

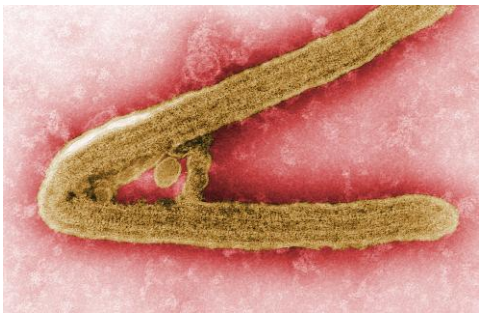


Abbildung 1.2 Koloriertes elektronenmikroskopisches Bild eines Marburg-Virions (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp, ID#.10816, Stand: 01.12.2014).

Das Marburg-Virus gehört wie das Ebola-Virus zu den Filoviren. Es ist ein einzelsträngiges Negativ-Strang-RNA-Virus. Die ersten Fälle des Marburg-Fiebers ereigneten sich 1967 in Marburg, Frankfurt und Belgrad. Die Infektionen traten bei Labormitarbeitern, die an aus Uganda importierten Affen forschten, auf. Meist treten Ausbrüche des Marburg-Fiebers in Afrika auf (Uganda, Süd-Afrika, Kenia, Angola, Kongo) (Brauburger et al. 2012). Die Inkubationszeit beträgt 2-14 Tage. Die

Symptome sind kaum von denen des Ebola-Fiebers zu unterscheiden. Die Therapie ist ebenso symptomatisch. Die Letalität beträgt 25-70% (Borio et al. 2002).

1.3.3 Rift-Valley-Fieber-Virus

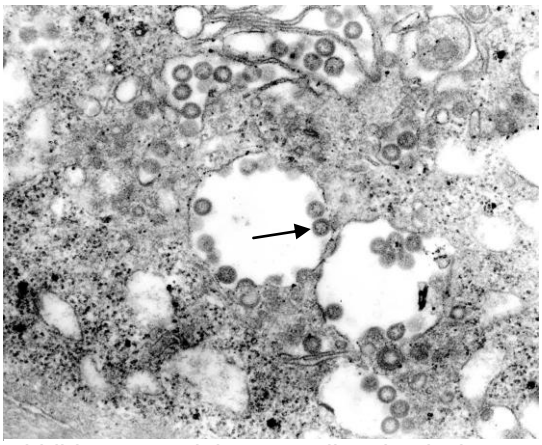


Abbildung 1.3 Elektronenmikroskopisches Bild eines mit Rift-Valley-Fieber-Virus (Pfeil) infizierten Gewebes (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp, ID#.8237, Stand: 01.12.2014).

Das Rift-Valley-Fieber-Virus gehört zu den Phleboviren der Familie der Bunyaviridae. Es besitzt ein Negativ-Strang-RNA-Genom und ist der Erreger des Rift-Valley-Fiebers (auch Rifttalfieber), ein hämorrhagisches Fieber, das endemisch in Subsahara-Afrika ist. Ausbrüche kamen unter anderem in Kenia, Somalia, Tansania, Madagaskar, Süd-Afrika, Sudan, Ägypten und Senegal vor. Seit 2000 kam es erstmals zu Ausbrüchen außerhalb Afrikas in Saudi-Arabien und im Jemen (Balkhy und Memish 2003; Ikegami und Makino 2011).

Das Rift-Valley-Fieber-Virus wird über verschiedene Mückenarten übertragen. Für Nutztiere, wie Schafe und Rinder, ist das Virus hochpathogen. Der Mensch infiziert sich meist bei den Tieren durch Schmierinfektion oder durch Vektorstiche. Die Inkubationszeit beträgt 2-6 Tage.

Meist verläuft das Rift-Valley-Fieber ähnlich einer Grippesymptomatik. Ein hämorrhagisches Fieber mit schweren intestinalen Blutungen kann sich entwickeln. Ein bis zwei Wochen nach dem Fieber kann es zu einer lebensgefährlichen Enzephalitis kommen. Die Therapie ist symptomatisch (Niedrig et al. 2006; Kayser et al. 2010).

1.3.4 Variola-Virus

Das Variola-Virus gehört zu den Orthopocken der Familie der Poxviridae und hat ein Doppelstrang-DNA-Genom. Zu den Orthopocken gehört neben dem Variola-Virus auch das Vaccinia-Virus, das Kuhpockenvirus, das Kamelpockenvirus und das Affenpockenvirus.

Das Variola-Virus wird auch Menschenpockenvirus genannt. Es ist der Erreger der Pocken, die bis Mitte des 20. Jahrhunderts große Epidemien auslösten. Die Impfungen gegen Pocken führten zur Ausrottung. Der letzte Pockenfall in Deutschland trat 1972 in Hannover auf (Buchwald 1973). Die letzte natürliche Infektion weltweit wurde 1977 in Somalia aufgezeichnet, 1978 kam es in England zu Laborinfektionen. Im Jahre 1980

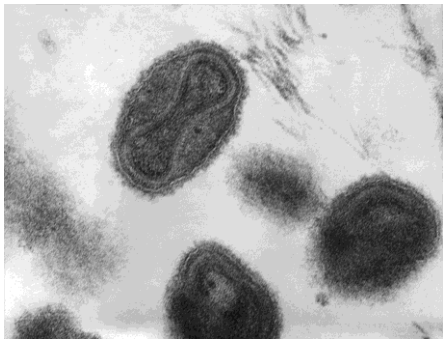


Abbildung 1.4 Elektronenmikroskopisches Bild einiger Variola-Viren (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp, ID#.1849, Stand: 01.12.2014).

wurden die Pocken von der WHO als eradiziert erklärt, weshalb auch nicht mehr dagegen geimpft wird (Fenner 1988).

Die Übertragung des Variola-Virus kann über Schmierinfektion oder Tröpfcheninfektion erfolgen. Die Inkubationszeit beträgt 1-2 Wochen. Der Beginn ist durch Fieber, Kopfschmerzen und einer Infektion des oberen Gastrointestinaltrakts gekennzeichnet. Nach 4-8 Tagen kommt es zur generalisierten Infektion mit typischem Pockenexanthem. Die Hauterscheinungen der Pocken haben einen bestimmten Ablauf: Papeln (Knötchen) entwickeln sich zu Vesikeln (Bläschen), diese zu einer Pustel (Eiterbläschen) mit anschließender Krustenbildung. Im Gegensatz zu den Windpocken haben die Pocken alle das gleiche Entwicklungsstadium. Die Therapie ist antiviral und symptomatisch. Die Letalität der unbehandelten Infektion liegt zwischen 20 und 50% (Niedrig et al. 2006; Kayser et al. 2010).

Das erneute Auftreten von Infektionen durch das Variola Virus würde einen weltweiten Gesundheitsnotstand bedeuten, da nur noch ein geringer Teil der Weltbevölkerung einen Immunschutz besitzt.

1.3.5 Francisella tularensis

Francisella tularensis ist der Erreger der Tularämie. Da das Krankheitsbild der Pest ähnlich ist und Hasen und Kaninchen ein bedeutendes Erregerreservoir darstellen, wird die Tularämie auch Hasenpest genannt.

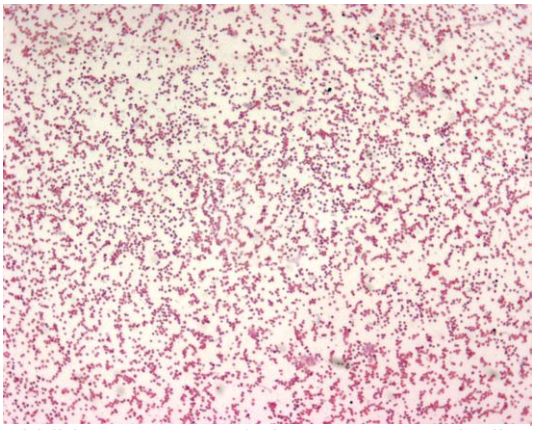


Abbildung 1.5 Gramfärbung von Francisella tularensis (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp , ID#.1903, Stand: 01.12.2014).

F. tularensis ist ein fakultativ intrazelluläres, unbewegliches, sporenloses, gram-negatives, aerobes Bakterium. *F. tularensis* wird in verschiedene Unterformen eingeteilt, klinisch relevant sind die Subspezies *F. tularensis* subsp. *holarctica* und *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Petersen et al. 2009).

F. tularensis subsp. *tularensis* hat eine hohe Virulenz. Infektionen kommen weltweit in der Nordhemisphere vor. In Europa treten Tularämie-Fälle mit einem Nord-Süd-Gefälle

auf. In Finnland und Schweden gibt es häufiger Infektionen, als in Deutschland, Frankreich, Tschechien, Österreich, Ungarn und Spanien (Karagoz et al. 2013). In Deutschland werden jährlich durchschnittlich drei Fälle von Tularämie gemeldet (Robert Koch Institut 2007). *F.tularensis* subsp. *holarctica* ist weniger virulent und kommt hauptsächlich in Europa und Asien vor (Thomas et al. 2003).

Die Übertragung auf den Menschen kann über Vektoren (blutsaugende Insekten), durch den direkten Kontakt mit infizierten Nagetieren (Haut- und Schleimhautkontakt, Verzehr von rohem Fleisch), oder bei der Inhalation von infektiösen Aerosolen erfolgen. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist nicht bekannt. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 3-5 Tage. Die klinische Ausprägung der Tularämie kann sehr vielfältig sein. Man unterscheidet „äußere Formen“ und „innere Formen“. Bei der häufigsten äußeren, der ulzeroglandulären Form, kommt es an der Eintrittspforte zum Geschwür und zur Beteiligung zugehöriger Lymphknoten. Als innere Form ist die typhöse Form zu erwähnen, die durch Erbrechen, Durchfall, Darmblutungen, sekundäre Pneumonie, Fieber und Sepsis charakterisiert ist. Des Weiteren gibt es die pulmonale Form mit Befall der Lunge und die intestinale Form, mit Durchfall und Erbrechen. Die inneren Formen sind durch Granulome und eitrige Abszesse charakterisiert. Als Therapie wird bevorzugt Streptomycin, Doxycylin oder Gentamicin verwendet. Unbehandelt hat die Tularämie eine hohe Letalität (Niedrig et al. 2006; Kayser et al. 2010).

1.3.6 Yersinia pestis

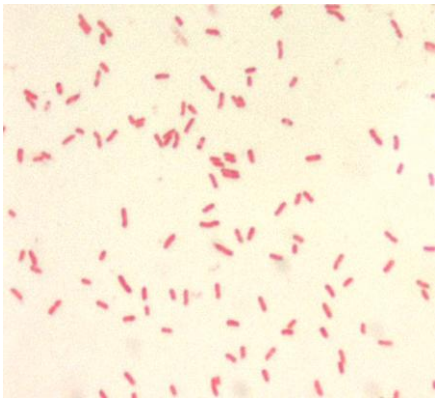


Abbildung 1.6 Gramfärbung von Yersinia pestis (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp, ID#.1916, Stand: 01.12.2014).

Yersinia pestis ist ein gramnegatives, bekapseltes, nicht-porenbildendes Stäbchen und ist der Erreger der Pest.

Bereits drei große Pandemien wurden von *Yersinia pestis* ausgelöst (die Justinianische Pest, „Der Schwarze Tod“ und die dritte Pest-Pandemie) (Perry und Fetherston 1997). Heutzutage kommen Infektionen endemisch in Afrika, Asien, Südamerika und Nordamerika vor. In Afrika treten die meisten Infektionen auf (z.B. Madagaskar, Uganda und Kongo) (World Health Organisation 2010).

Das Wildtierreservoir von *Yersinia pestis* sind Nagetiere, wie zum Beispiel Ratten.

Die Übertragung auf den Menschen kann durch direkten Kontakt mit infizierten Nagern, oder den Stich eines Rattenflohs erfolgen. Die Inkubationszeit beträgt 1-7 Tage.

Man unterscheidet die Beulenpest von der Lungenpest. Bei Auftreten der Beulenpest entsteht etwa 2 Tage nach der Infektion eine hämorrhagische Schwellung der Lymphknoten, die in der Nähe der Eintrittspforte (z.B. Stich) liegen. Bei Fortschreiten der Erkrankung können weitere Lymphknoten und viele Organe befallen werden und somit kann die Erkankung in die sekundäre Lungenpest übergehen. Durch Kontakt mit infizierten Personen kann es über Tröpfcheninfektion zur primären Lungenpest kommen. Lymphknotenschwellungen gehen dieser Lungeninfektion nicht voraus. Hohes Fieber, Abgeschlagenheit, Husten, blutig-seröser Auswurf sowie Atemnot sind typische Symptome.

Bei der Beulenpest ist ohne Behandung eine Letalität von 50% zu erwarten, die Lungenpest und die Pestsepsis verlaufen unbehandelt fast immer tödlich. Die Therapie besteht aus der Gabe von Streptomycin, Tetracyclin oder Doxycyclin (Niedrig et al. 2006; Kayser et al. 2010)

1.3.7 Bacillus anthracis

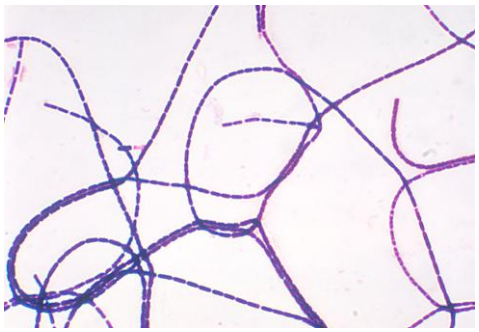


Abbildung 1.7 Gramfärbung von Bacillus anthracis (Quelle: Public Health Image Library (PHIL), http://phil.cdc.gov/phil/home.asp, ID#.2105, Stand: 11.12.2012).

Bacillus anthracis ist ein grampositives, bekapseltes, sporenbildendes Stäbchenbakterium. Es ist der Erreger des Milzbrandes. *Bacillus anthracis* kommt im Erdboden vor. Endemisch tritt die Milzbrand-Infektion gehäuft in Mittel- und Südamerika, in Afrika, im Iran, in Indien und Thailand auf. In den Industriestaaten tritt Milzbrand sehr selten auf. In Deutschland kam es 2009/2010 und 2012 zu wiederholten Milzbrand-Infektionen bei Heroinkonsumenten (Hanczaruk et al. 2014).

Die Erkrankung tritt primär bei Pflanzenfressern auf, der Mensch und fleischfressende Tiere sind Fehlwirte. Der Kontakt mit infizierten Materialien und die Tröpfcheninfektion sind mögliche Infektionswege. Eine Mensch-zu-Mensch-Infektion ist unüblich. Die Inkubationszeit beträgt ein bis sieben, gelegentlich auch bis zu sechzig Tage.

Es werden drei Formen unterschieden. Beim Hautmilzbrand tritt, z.B. an einer kleinen Hautverletzung, nach Kontakt mit infizertem Material eine Papel auf, die von einer Rötung und Schwellung umgeben ist. Es entsteht ein Geschwür, ähnlich einem Karbunkel, das bei gutartigem Verlauf ausheilen kann. Bei schwereren Verläufen kann es zu Fieber,

Benommenheit und Sepsis kommen. Der Lungenmilzbrand äußert sich in einer Grippe-Symptomatik mit sich anschließendem schweren Krankheitsverlauf. Hohes Fieber, blutiger Auswurf, Atemnot bis hin zu Sepsis und Herz-Kreislaufversagen sind möglich. Bei der dritten Form des Milzbrands, dem Darmmilzbrand, treten blutige Durchfälle und Erbrechen auf.

Die Therapie besteht aus Ciprofloxacin oder Penicillin. Der Hautmilzbrand ist therapeutisch gut zu behandeln. Der Lungen- und Darmmilzbrand haben selbst unter antibiotischer Behandlung eine schlechte Prognose mit einer hohen Mortalität (Niedrig et al. 2006).

1.4 Bestehende Nachweisverfahren

Je nach Art der Erreger, können diese über verschiedene Nachweisverfahren bestimmt werden. Die Erregeranzucht, die Mikroskopie, die Serologie (Nachweis mit Hilfe von spezifischen Antikörpern oder Antigenen z.B. über den Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay [ELISA] oder den Immunfluoreszenztest [IFT]) und die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sind die Hauptbestandteile der Diagnostik von hochkontagiösen Erreger (Lim et al. 2005).

Tabelle 1.2 ist zu entnehmen, was für Probenmaterial für die Diagnostik genutzt wird und mit welchen Methoden die oben genannten Erreger jeweils diagnostisch nachgewiesen werden können.

Tabelle 1.2 Methoden zur Diagnostik von Ebola-Virus, Marburg-Virus, Rift-Valley-Fieber-Virus, Variola-Virus, Francisella tularensis, Yersinia pestis und Bacillus anthracis in unterschiedlichen Probenmaterialien (Nulens und Voss 2002; Mims 2006; Kayser et al. 2010).

Erkrankung	**Erreger**	**Probenmaterial**	**Labor-Diagnostik**
Hämorrhagisches Fieber	Ebola -/ Marburgvirus	Blut	Virusanzucht, Serologie, Elektronenmikroskopie, PCR
	Rift-Valley-Fieber-Virus	Blut	Virusanzucht, Serologie, PCR
Pocken	Variola-Virus	Exsudat, Bläschenflüssig-keit, Pustelinhalt, Krusten	Virusanzucht, Serologie, Elektronenmikroskopie, PCR
Tularämie	*Francisella tularensis*	Blut, Sputum, Biopsie, Bronchiallavage	Kultur, Serologie, PCR, Tierversuche
Pest	*Yersinia pestis*	Blut, Sputum, Abstrich, Lymphknotenas-pirat, Bronchiallavage	Kultur, Fluoreszenzmikroskopi, PCR
Milzbrand	*Bacillus anthracis*	Abstrich, Blut, Sputum, Liquor, Stuhl	Kultur, Serologie, PCR, Tierversuche

1.5 PCR, Echtzeit-PCR und isothermale Nachweisverfahren

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist für die Diagnostik aller genannten Agenzien relevant. Bei diesem molekularen Nachweisverfahren werden spezifische Nukleinsäuren amplifiziert - also vervielfältigt - und anschließend quantifiziert.

Die PCR besteht aus den drei Abschnitten Denaturierung, Primer-Anlagerung und Verlängerung. In diesen Schritten erfolgt duch unterschiedliche Temperaturzyklen eine Auftrennung des DNA-Doppelstranges, eine Anlagerung der Primer an der Einzelstrang-Ziel-DNA und eine Verlängerung der Primer und Bildung eines komplementären Stranges. Durch Wiederholung dieses Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

Die Echtzeit-PCR (engl.: Realtime-PCR) ist eine Variation der PCR. Hier werden die Zielsequenzen zudem durch spezifische Sonden erkannt, die ein Fluoreszenzsignal abgeben. Somit kann parallel zur Amplifikation eine Spezifitätskontrolle erfolgen. Bei der PCR und Echtzeit-PCR werden unterschiedliche Temperaturzyklen benötigt, um Trennungs- und Anlagerungsprozesse der Nukleinsäuren zu ermöglichen (Wittwer et al. 2004).

Mittlerweile wurden mehrere isothermale Nachweisverfahren entwickelt, um DNA zu vervielfältigen. Da bei diesen neueren Verfahren thermozyklische Schritte häufig durch enzymatische Reaktionen ersetzt werden, kann die Reaktion bei einer konstanten Temperatur ablaufen (Gill und Ghaemi 2008).

Einige isothermale Transkriptionsverfahren verwenden die „T7-Transkription. Bei der Transcription-Mediated-Amplification (TMA) und der Nucleic-Acid-Sequence-based-Amplification (NASBA) wird mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase und einem Oligo-T7-Promoter-Primer von einer RNA-Vorlage ein DNA-RNA-Hybrid gebildet. Unter Verwendung eines weiteren Enzyms, der RNase H, wird die RNA von der komplementären DNA (cDNA) gelöst. Anhand der cDNA kann die RNA-Polymerase eine Kopie der ursprünglichen Vorlage-RNA herstellen.

Bei anderen Methoden wird das Strang-Verdrängungs-Verfahren angewandt. Die Strand-Displacement-Amplification (SDA) und die Loop-mediated-isothermal-amplification (LAMP) arbeiten nach diesem Prinzip. Bei diesen beiden, aber auch bei der Helicase-dependant-Amplification (HDA) und der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) werden unterschiedliche Enzyme verwendet, die an die Ziel-DNA binden und den Doppelstrang trennen. An diesen Stellen kann anschließend durch passende Primer der Strang verdrängt werden und durch Wiederholung dieses Vorgangs die DNA hochamplifiziert werden.

Des Weiteren gibt es Methoden, bei denen nicht die Ziel-DNA, sondern ein Nachweissignal amplifiziert wird, das mit spezifischen Oligonukleotiden die Ziel-DNA erkennt. So funktionieren beispielsweise die Signal-mediated-Amplification-of-RNA-Technology (SMART), die Circular-Helicase-dependant-Amplification (cHDA) und die Rolling-Circle-Amplification (RCA) (Gill und Ghaemi 2008).

1.6 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation

Die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) ist eine alternative Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA oder RNA. Die RPA ist ein isothermales molekulares Amplifikationsverfahren. Die Reaktionstemperatur liegt zwischen 24-45°C, ein thermischer Denaturierungsschritt ist nicht notwendig, da eine Auftrennung der DNA durch enzymatische Strangverdrängung erfolgt.

Ein entscheidendes Enzym der RPA ist die Rekombinase UvsX. UvsX bindet unter Anwesenheit von ATP an synthetisierte Oligonukleotid-Primer, der Kofaktor UvsY unterstützt die Reaktion. Der Rekombinase-Oligonukleotid-Komplex bindet sequenz-spezifisch per Stranginvasion an die homologen Stränge der Doppelstrang-DNA. Nun kann die *Staphylococcus-aureus(Sau)*-Polymerase oder alternativ die *Bacillus-subtilis(Bsu)*-Polymerase vom 3'-Ende der Primer ausgehend eine Kopie der Einzelstrang-DNA bilden. Das Einzelstrang-bindende Protein Glykoprotein 32 (gp32) stabilisiert die Reaktion, es bindet an den verdrängten DNA-Strang und verhindert, dass sich die Ausgangs-Doppelstrang-DNA wieder zusammenschließt. Dieser Ablauf findet von zwei gegenläufigen Seiten aufeinander zu statt. Durch Wiederholung dieses Vorgangs kann die Ziel-DNA bzw. RNA in kurzer Zeit (ca. 20 min) und mit einer hohen Sensitivität und Spezifität exponentiell amplifiziert werden (Piepenburg et al. 2006).

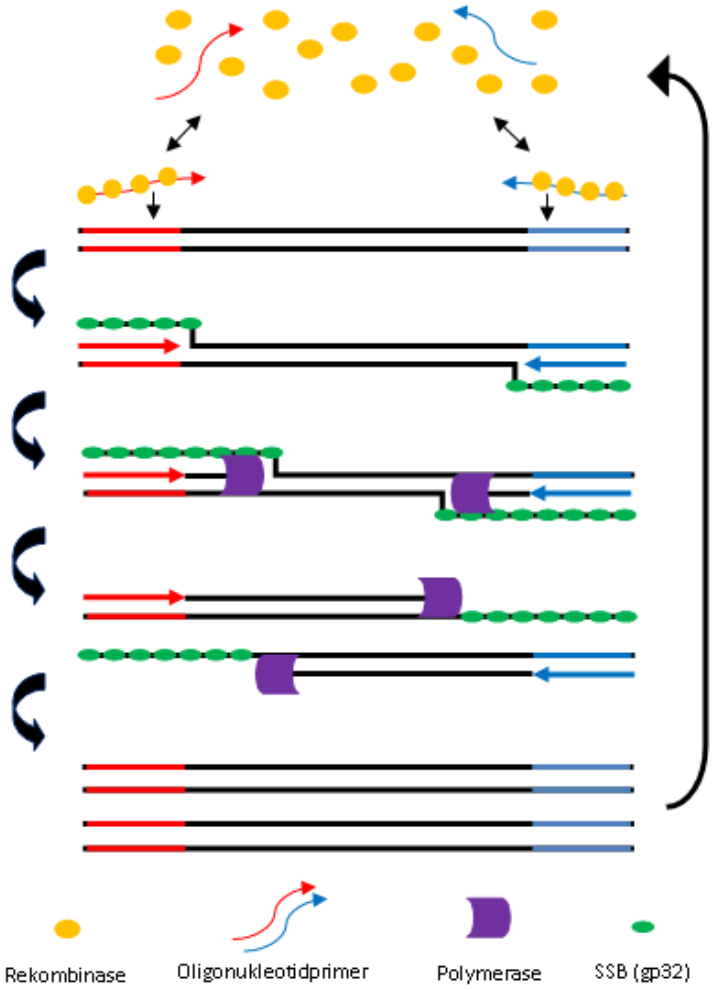


Abbildung 1.9 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation: Von oben nach unten: 1) Die Rekombinase UvsX (gelb) bildet (mit dem Kofaktor UvsY, nicht abgebildet) einen Komplex mit den Primern (blau und rot). 2) Stranginvasion des Rekombinase-Primer-Komplexes mit Bildung einer D-Schlaufe. 3) Stabilisierung durch das Einzelstrang-bindende Protein Glykoprotein 32 (SSB gp32, grün). 4) Strangsynthese durch Sau/Bsu-Polymerase (lila). 5) Zwei Strangkopien liegen vor. (modifiziert nach TwistDx und Piepenburg et al. (TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand: 01.12.2014; Piepenburg et al. 2006, S.1116)).

Der Spezifitätsnachweis kann, wie bei der Echtzeit-PCR, auch bei der RPA durch die Verwendung von fluoreszierenden Sonden erfolgen.

Für die RPA gibt es verschiedene Typen von Sondensystemen, die von TwistDX zur Verfügung gestellt werden. Für diese Arbeit ist die TwistAmp™-exo-Sonde und die TwistAmp™-fpg-Sonde relevant, die in Abbildung 1.10 und Abbildung 1.11 exemplarisch dargestellt sind.

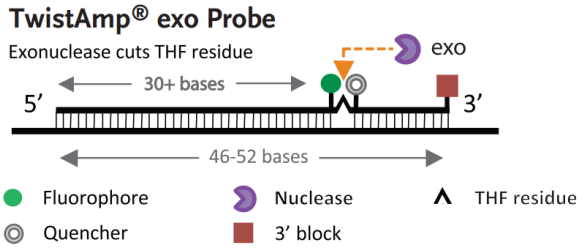


Abbildung 1.10 Hybridisierte TwistAmp ™-exo-Sonde, mit Tetrahydrofuran (ca. 30 Nukleotide vom 5´-Ende entfernt), eingerahmt von Fluoreszenzfarbstoff (grün) und Quencher (Doppelring). Exonuklease III (lila) (Quelle: TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand 01.12.2014).

Die TwistAmp™-exo-Sonde ist vom 5'-Ende ausgehend, nach 30 Nukleotiden mit einem Tetrahydrofuran (THF) versehen, das auf einer Seite mit einem Fluoreszenzfarbstoff und auf der anderen Seite mit einem Quencher flankiert ist. Sobald die Sonde am korrespondierenden Einzelstrang gebunden ist, wird sie am THF durch die im Kit enthaltene Exonuklease III geschnitten. Der kleine Teil der Sonde dissoziiert vom Einzelstrang und der Quencher wird vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt. Die fluoreszenzunterdrückende Funktion des Quenchers wird durch die Trennung aufgehoben und ein Fluoreszenzsignal entsteht. Da die Exonuklease die Sonde nur schneidet, wenn diese an die korresponierende Einzelstrang-DNA gebunden ist, bedeutet die Zunahme der Fluoreszenz gleichzeitig ein Nachweis für die Amplifikationszunahme.

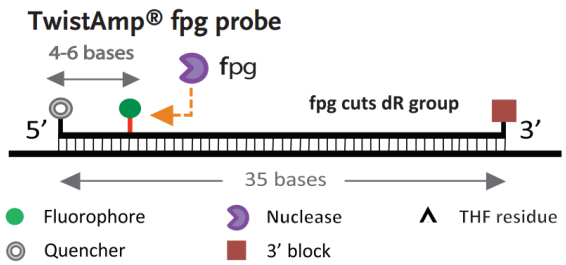


Abbildung 1.11 HybridisierteTwistAmp ™ -fpg-Sonde mit Quencher am 5´-Ende (Doppelring), dem Fluoreszenzfarbstoff (grün) 4-6 Nukleotide vom 5´-Ende entfernt. Schneideenzym FPG (lila) (Quelle: TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand 01.12.2014).

Die TwistAmp™-fpg-Sonde hat eine Länge von ca. 35 Nukleotiden. Am 5'-Ende liegt ein Quencher, 4-6 Nukleotide weiter ein Fluoreszenzfarbstoff. Im TwistAmp™-fpg-Kit befindet sich das FPG-Protein, ein Enzym mit DNA-Reparatur-Aktivität, das den Fluoreszenzfarbstoff abschneiden kann. Durch Trennung des Fluoreszenzfarbstoffes vom Quencher entsteht ein Fluoreszenzsignal.

Abbildung 1.12 Abbildung 1.13 ESEQuant Tubescanner
(Quelle: URL: http://www.qiagen.com/Products/ESEQuantTubeScanner.aspx?r=603, Stand: 01.12.2014)

Zur Durchführung der RPA können Reagenzienansätze von TwistDx und der ESEQuant-Tubescanner von Qiagen verwendet werden.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es molekulare Schnellnachweisverfahren auf Basis der hochpathogenen Erreger (Sudan- und Zaire-Ebola-Virus, Marburg-Virus, Rift-Valley-Fieber-Virus, Variola-Virus, *Francisella tularensis, Yersinia pestis* und *Bacillus anthracis)* zu entwickeln, die hinsichtlich der analytischen Sensitivität und Spezifität mit der Echtzeit-PCR vergleichbar sein sollten.

Damit die Tests intern validiert werden können, sollte ein RPA-Nachweisverfahren als Positivkontrolle für das Sigma-Virus, ein Insektenvirus der Familie Rhabdoviridae mit Negativ-Strang-RNA-Genom, entwickelt werden. In dieser Arbeit wurden folgende Arbeitsziele verfolgt:

I. Entwurf spezifischer RPA-Primer und RPA-Sonden für die Erreger.
II. Herstellung molekularer Standardreihen.
III. Analyse der Sensitivität und Spezifität der jeweiligen Erregernachweisverfahren anhand der molekularen Standards.
IV. Bestimmung der analytischen Sensitivität mittels Probit-Analyse.
V. Überprüfung der analytischen Sensitivität durch Untersuchung verschiedener Stämme und mit inaktivierten Erregern gespikter Blutproben.
VI. Ermittlung der analytischen Spezifität in Kreuztestungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Falkonröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekulturschalen (100x20mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe (Latex)	Mikroflex Corporation, Wien, Österreich
Handschuhe (Nitril)	GE Healthcare, München, Deutschland
Labortücher 20,5cmx20cm	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-RheinHafen, Deutschland
Light Cycler®Capillaries (20µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
MikroPlatte F-Boden/Kaminform (96-K) FLUOTRAC™ 600	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Biozym, Scientific GmbH, Oldendorf Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-10µl, 1,0-100µl, 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter (0,1-10µl, 1,0-100µl, 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Safe-Lock-Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vernichtungsbeutel (300mmx200mm)	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Deutschland

Tabelle 2.2 Verwendete Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Deutschland
Chemidoc XRS System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FLUOstar Optima MicroPlate Fluorometer	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
Elektrophoresekammern HORIZON 58 HORIZON 1114	Life Technologies Inc., Maryland, USA
Elektrophoresis Power Supply	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland

Gefrierschrank (-80°c)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank (5°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Light Cycler® 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Nano Drop® ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Pipetten (0,1-10µl, 1-20µl, 1,0-100µl, 101-1000µl)	Gilson International Deutschland, Limburg, Deutschland
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortexer	Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK Scientific Industries Inc, New York, USA
Tube Scanner	Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zenrifuge (LC-Carousel Centrifuge)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Zentrifuge	LMS Co. LTD, Tokyo, Japan

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2.3 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	**Bezugsquelle**
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Acetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
BSA (10mg/ml)	New England Biolabs Inc., Ipswich, England
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Dithiothreitol (DTT 0,1M)	GE Healthcare, München, Deutschland
Ethanol	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Human Genome DNA	Roche, Mannheim, Deutschland
IsoVitaleX™ Enrichment	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
L-Cysteine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Orange Loading Dye (6x)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
DNA LängenStandards O'Gene Ruler™100bp Ladder Plus O'Gene Ruler™1kb DNA Ladder O'Gene Ruler™1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland

Plus	
Ribonucleosidtriphosphate (rNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Tetramethylammoniumchlorid (5M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
X-Gal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

Tabelle 2.4 Verwendete Lösungen, Medien und Puffer

Name	Zusammensetzung
Agarosegel [1%ig]	100ml TAE [1x], 1g Agarose, 5µl Ehtidiumbromid- Lösung (Endkonzentration 0,5mg/ml)
Ethidiumbromid-Lösung	10mg/ml in H_2O
LB Amp-Agar	10g Bacto™-Tryptone, 5g Bacto™-Yeast Extract, 10g NaCl, 1ml Ampicilin[100µg/ml], 15 g Bacto™-Agar, ad 1l H_2O
LB-Amp-Medium	10g Bacto™-Tryptone, 5g Bacto™-Yeast Extract, 10g NaCl, 1ml Ampicilin[100µg/ml], ad 1l H_2O
TAE [1x]	40ml TAE [50x] ad 1960ml H_2O
TAE [50x]	242g Tris: 57,1ml Essigsäure, 100ml EDTA pH8,0 [0,5M]
TE-Puffer	10mM Tris (pH 8,0), 1mM EDTA

2.1.4 Reagenzienansätze

Tabelle 2.5 Verwendete Reagenzienansätze

Name	Bezugsquelle
Ambion Turbo DNA free™-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Dual Promotor TA Cloning® Kit (with pCRII®-Vektor) with one Shot® INVαF' Chemically Competent *E.coli*	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Light Cycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Light Cycler® Fast start DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Peq GOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
TwistAmp™-exo-Kit	TwistDx, Cambridge, UK
TwistAmp™-fpg-Kit	TwistDx, Cambridge, UK
QIAamp® DNA Blood Kit	Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, Deutschland
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Z-Competent™ *E.coli* Transformation Kit & Buffer	Zymo Research, Freibug, Deutschland
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freibug, Deutschland
Zymoresearch™ DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research, Freibug, Deutschland

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.6 Verwendete Enzyme

Name	Bezugsquelle
Taq-DNA-Polymerase	5-Prime GmbH, Hamburg, Deutschland
Fast Digest® *BglII*	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest® *EcoRV*	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest® *EcoRI*	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest® *NcoI*	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Fast Digest® *ScaI*	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Protector RNase Inhibitor (40U/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Restriction Endonuclease Pvu I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
SP6 RNA Polymerase from Escherichia coli BL 21/pSR3	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
T7 RNA Polymerase from Escherichia coli BL 21/pAR 1219	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Transcriptor Reverse Transcriptase (20U/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Bakterienstämme

Tabelle 2.7 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
INVαF´	*F´ endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80LacZΔM15* Δ(*LacZ*YA-argF)U169 λ-	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´proAB lacIqZdelta-M15 Tn10 (Tetr)]	Zymo Research, Freiburg, Deutschland

2.1.7 Ausgangs-DNA

Tabelle 2.8 Verwendete Ausgangs-DNA

Name	Bezugsquelle
BA Cap pc 2.1	Zur Verfügung gestellt vom Robert Koch Institut
Bacillus anthracis 3007	Zur Verfügung gestellt vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr
F.tu. ssp. tularensis DNA-2 EQA DuBa-1	
Y.pe. St. 03-1501 DNA 5 EQA DuBa-1	
pOPV	Zur Verfügung gestellt vom Robert Koch Institut
VARV_HAgene	GeneArt AG, Regensburg, Deutschland

2.1.8 DNA-Plasmide

Tabelle 2.9 Verwendete DNA-Plasmide

Name	Bezugsquelle
pCRII®-Ebola Zaire-N	Zur Verfügung gestellt von Andrea Koch, Institut für Virologie Göttingen
pCRII®-Ebola Sudan-N	Zur Verfügung gestellt von Doris Heidenreich, Institut für Virologie Göttingen
pCRII®-*Francisella tularensis-ssrA*	
pCRII®-Marburg-N	Zur Verfügung gestellt von Andrea Koch, Institut für Virologie Göttingen
pCRII®-Rift Valley Fieber-N	
pCRII®-Sigma-N	Zur Verfügung gestellt von Manfred Weidmann, Institut für Virologie Göttingen
pCRII®-*Yersinia pestis-ssrA*	

2.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 2.10 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
M-13 Forward Primer	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung von Inserts des pCR®II- Vektors
M-13 Reverse Primer	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von Inserts des pCR®II- Vektors

Die M-13-Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland bezogen.

Die verwendeten Oligonukleotide zur Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion, Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion, und Rekombinase-Polymerase-Amplifikation sind in dem zugehörigen Methodenteil aufgeführt (s.Kapitel 2.2.2.10.3, 2.2.2.10.5, 2.2.2.10.6).

2.1.10 Computerprogramme

Tabelle 2.11 Verwendete Computerprogramme

Name	Hersteller	Anwendung
Microsoft® Office mac 2008	Microsoft	Text- und Datenverarbeitung
EndNote X3	Thomson Reuters	Literaturverwaltung
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH	Fluoreszenzmessungen
Lasergene™	DNASTAR Inc	DNA-Sequenzanalyse, Primer- und Sondendesign, Plasmidkonstruktion
ND-1000 V3.3.0 one channel	PEQLAB Biotechnologies GmbH	Spektrophotometrische Messungen
Prism 4.0a	GraphPad Software, Inc.	Datenverarbeitung
Statistica 9	StatSoft GmbH	Datenverarbeitung
Twista™Studio	TwistDx	Aufzeichnung und Evaluation der Messungen des Tube Scanners

2.2 Methoden

2.2.1 Bakteriologische Methoden

2.2.1.1 Nährmedien

Als Nährmedium für *E. coli* wurde LB-Medium and LB-Agar verwendet. Zur Wachstumsselektion wurde das Antibiotikum Ampicillin hinzugegeben.

Durchführung: Dem Medium für die Agarplatten wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 1,5% hinzugefügt, beide Medien wurden bei 120°C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50°C wurde dem LB-Agar 100 mg/l Ampicillin hinzugefügt, die Platten gegossen und beide Nährmedien bei 4°C gelagert.

Dem LB-Medium wurden vor Gebrauch 100 mg/l Ampicillin zugesetzt.

2.2.1.2 Anzucht von *E.coli*-Kulturen

Flüssigkultur: 4 ml LB-Amp-Medium wurden in ein 15-ml-Falkonröhrchen gegeben und mit einem Teil einer bereits bestehenden Dauerkultur oder einer Einzelkolonie von einer Transformationsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden mit 120 Upm über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Agarplatten-Kultur: Ein Teil einer Dauerkultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Um fremde Plasmid-DNA in *E.coli* einzuschleusen, müssen die Bakterien vorbehandelt werden (Cohen et al. 1972).

Durchführung: Verwendet wurde das Z-Competent™ *E.coli* Transformation Kit. Es wurden 50 ml Zymobroth™-Medium mit *E.coli - XL1 blue* angeimpft und bei 29°C und 120 Upm bis zu einer optischen Dichte$_{600nm}$= 0,5 wachsen gelassen. Die Flüssigkultur wurde in ein 50-ml-Falkonröhrchen gegeben und 10 min bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 5 ml des im Kit enthaltenen Wasch-Puffers resuspendiert. Es wurde erneut für 10 min bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 5 ml Kompetent-Puffer gelöst. Zu je 50 µl wurden die nun kompetenten Bakterienzellen aliquotiert und bei -80°C für die spätere Transformation gelagert.

2.2.1.4 Transformation von *E. coli*- Zellen

Bei der Transformation von kompetenten *E.coli*- Zellen wird DNA (z.B. Plasmid-DNA) zu den Zellen gegeben und von dem Bakterium aufgenommen.

Durchführung: 50 µl der chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 10 ng der DNA zugegeben und vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze gemischt. Im Anschluss wurde der Ansatz auf LB-Amp-Platten aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformation nach TA-Klonierung ist in Kapitel 2.2.2.10.2 beschrieben.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation wird durchgeführt, um geringe Mengen Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-Zellen zu isolieren.

Durch die Zugabe von SDS und NaOH zu transformierten *E. coli*-Zellen werden diese alkalisch lysiert. Die chromosomale DNA von *E. coli* denaturiert, die Plasmid-DNA denaturiert durch die geknäulte Form in der sie vorliegt kaum. Die Plasmid-DNA renaturiert vollständig unter Zugabe von Kaliumacetat. Die genomische DNA, Proteine und Zellreste fallen aus und werden durch einen Zentrifugationsschritt von der Plasmid-DNA getrennt. Durch Zugabe von Ethanol wird die Plasmid-DNA von Salzen befreit und ausgefällt. Restliche RNAs werden durch die Zugabe von RNase A verdaut.

Durchführung: Verwendet wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I. Für die Minipräparation wurden 5 ml LB-Amp-Medium in einem 15-ml-Falkonröhrchen mit Einzelkolonien angeimpft, über Nacht bei 37°C und 120 Upm inkubiert. 2 ml der Flüssigkultur wurden in ein Eppendorf-Cup gegeben und 5 min bei 11000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 250 µl RNase A hinzugegeben und das

Pellet durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Lösung II und 350 µl Lösung III dazugegeben, jeweils nach dem Pipettierschritt wurde die Probe durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Für 10 min wurde bei 11000 Upm zentrifugiert und der Überstand auf eine Zentrifugensäule aufgetragen. Daraufhin folgte erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 11000 Upm. Im Anschluss wurden zwei Waschschritte mit 500 µl PW-Puffer bzw. mit 750 µl Waschpuffer durchgeführt und die Probe anschließend jeweils 1 min bei 11000 Upm zentrifugiert. Nach einer weiteren Minute Trockenzentrifugation bei 11000 Upm wurde die gereinigte Plasmid-DNA mit 100 µl Elutionspuffer bei 6000 Upm für 1 min in einem Eppendorf-Cup aufgefangen.

2.2.2.2 Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Midipräparation wird zur Isolation größerer Mengen von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien (z.B. aus *E.coli*-Zellen) durchgeführt. Sie funktioniert wie die Minipräparation (s. 2.2.2.1) aber mit größeren Volumina.

Durchführung: Verwendet wurde das Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit. Für die Midipräparation wurden 50 ml Bakterienkultur in LB-Amp-Medium über Nacht bei 120 Upm und 37°C inkubiert. Von der Flüssigkultur wurde anschließend ein Glycerin-Bestand angelegt: 850 µl der Kultur wurden mit 150 µl 87%igem Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

Bei Raumtemperatur wurde die Bakterienkultur in ein 50-ml-Falkonröhrchen gegeben und bei 5000 Upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 5 ml Resuspensionspuffer hinzugegeben und bis zur vollständigen Resuspension des Pellets gemischt. Anschließend wurden 5 ml Zell-Lyse-Puffer hinzugegeben, mehrmals invertiert, dann wurde 5 ml Neutralisationspuffer hinzugegeben und erneut mehrmals invertiert. Nach 25 min bei 6000 Upm Zentrifugation wurde der klare Überstand in ein neues 50-ml-Falkonröhrchen gegeben, 1 ml Quantum-Prep-Matrix hinzupipettiert und 30 s vorsichtig geschüttelt. Im Anschluss wurde 4 min bei 6000 Upm zentifugiert, der Überstand entfernt, 10 ml Wasch-Puffer hinzugegeben und vorsichtig geschüttelt bis das Pellet vollständig gelöst war. Für 4 min wurde die Probe bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Daraufhin wurde das Pellet mit 500 µl Waschpuffer resuspendiert und auf die Zentrifugensäule gegeben. Bei 13000 Upm wurde für 30 s zentrifugiert, der Durchlauf verworfen. Eine Wiederholung des Wasch-Durchgangs wurde durchgeführt und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde bei 14000 Upm für 2 min trockenzentrifugiert. 500 µl ddH_2O wurden auf die Säule aufgetragen und für 2 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Das aufgereinigte Plasmid wurde in einem Eppendorf-Cup aufgefangen.

2.2.2.3 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Mit dem Spektralphotometer Nano Drop® ND-100 kann die Konzentration von DNA und RNA in wässriger Lösung bestimmt werden. Da Nukleotide bei der Wellenlänge 260 nm ein Absorptionsmaximum besitzen, kann bei dieser Wellenlänge die Gehaltsbestimmung erfolgen. Zudem kann die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Da bei aromatischen Aminosäuren und Phenolen die UV-Licht-Absorption bei 280 nm liegt, erlaubt die Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280}) eine Abschätzung der Reinheit. Liegt der Quotient OD_{260}/OD_{280} bei 1,8-2,0, spricht dies für eine relativ proteinfreie DNA oder RNA-Lösung (Sambrook et al. 1989).

Durchführung: Es wurden 1,5 µl Volumen in den Nano Drop® ND-100 eingesetzt, zuerst mit der Basis-Lösung, z.B. Elutionspuffer nach Minipräparation, um das Gerät zu eichen, anschließend die DNA- bzw. RNA-Lösung gemessen.

2.2.2.4 Reinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren

Zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA wurde das Zymoresearch™ DNA Clean & Concentrator™-5 Kit verwendet.

Durchführung: In einem 1,5-ml-Eppendorf-Cup wurde der im Kit mitgelieferte DNA-Binding-Puffer mit DNA (z.B. ein PCR-Produkt) im Verhältnis von 5:1 bis 2:1; je nach Vorliegen der Nukleinsäure (z.B. Plasmid, genomische DNA, PCR-Produkt), zusammengemischt und auf eine Zymo-Spin™- Säule gegeben. Bei 11000 Upm wurde die Probe für 30 s zentrifugiert, der Durchlauf wurde verworfen. 200 µl Waschpuffer wurden hinzugegeben, erneut bei 11000 Upm für 30 s zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde wiederholt und im Anschluss 30 s trockenzentrifugiert. Es wurden ≥ 6 µl ddH_2O auf die Säule gegeben, für 30 s bei 11000 Upm zentrifugiert und in einem neuen 1,5-ml-Eppendorf-Cup aufgefangen.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA mittels Fluoreszenzmessung

Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung (siehe oben) misst nur im µg/ml-Bereich verlässlich. Zur exakteren Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA benötigt man eine genauere Konzentrationsbestimmung. Mit Ribo-Green® und Pico-Green® (Fluoreszenzfarbstoffe, die spezifisch an RNA bzw. DNA binden), kann man anhand eines Fluorometers die Menge der RNA bzw. DNA an der Fluoreszenzintensität hochsensitiv im ng/ml Bereich messen.

Durchführung: Es wurde das Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit und das Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit verwendet. Für eine Standardkurve wurde mit dem

mitgelieferten DNA/RNA-Standard eine Verdünnung von 1, 50, 250, 500, 750 ng/ml und 1 µg/ml mit 1xTE-Puffer und 200x Ribo- bzw. Pico-Green® (Endkonzentration 1x) hergestellt. Die zu messenden RNA/DNA-Proben wurden 1:100 und 1:1000 mit 1x TE-Puffer und 200x Ribo- bzw. Pico-Green® verdünnt. Die Ansätze wurden in eine Microtiterplatte (F-Boden/ Kaminform FLUOTRAC™ 600, schwarz) pipettiert, bei Raumtemperatur für 5 min im Fluorometer Fluostar Optima bei Dunkelheit inkubiert und anschließend gemessen. Anhand der Standardreihe wurde eine Regressionsgerade berechnet und somit die RNA/DNA-Konzentration der Probe ermittelt.

2.2.2.6 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren durch elektrische Ladung. Im elektrischen Feld wandert die RNA oder DNA durch die negative Ladung der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren zur positiv geladenen Anode. Ist die Nukleinsäure kurz, wandert sie schnell durch die Netzstruktur des Agarosegels, ist sie größer, wandert sie langsamer. Durch den Vergleich mit Längenstandards, kann die Größe der Fragmente abgeschätzt werden. Die Menge der DNA/RNA kann durch die Intensität der Färbung mit Ethidiumbromid grob bestimmt werden.

Durchführung: Es wurden 1%ig und 1,5%ige Agarosegele gegossen (s.Tabelle 2.4), vom Längenstandard wurden stets 2 µl benutzt. Die Auftrennung erfolgte bei 80-120 V in horizontalen Elektrophoresekammern, die fotografische Aufnahme wurde mit dem Chemidoc XRS System durchgeführt.

2.2.2.7 DNA-Extraktion aus präparativen Agarosegelen

Um aufgetrennte DNA aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit verwendet.

Durchführung: Die Nukleinsäure-Fragmente wurden unter UV-Licht am Chemidoc-XRS-System ausgeschnitten, in ein 2-ml-Eppendorf-Cup gegeben, gewogen und pro 100 mg Gel 300 µl ADB Buffer™ hinzugegeben. Bei 55°C wurde die Probe im Heizblock inkubiert bis das Gel vollständig aufgelöst war. Anschließend erfolgte die Auftragung auf eine Zymo-Spin I™-Säule, bei 10000 Upm wurde 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurde 200 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben für 30 s bei 10000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Waschschritt wurde wiederholt und die Säule daraufhin für 30 s bei 10000 Upm trockenzentrifugiert. Mit 10 µl ddH_2O wurde die DNA durch Zugabe auf die Säule und Zentrifugation bei 10000 Upm eluiert und in einem 1,5-ml-Eppendorf-Cup aufgefangen.

2.2.2.8 Aufbereitung von genomischer DNA und DNA von infiziertem Hasengewebe von *Francisella*-Stämmen

Zur Aufreinigung und Extraktion von genomischer DNA und DNA aus Gewebeproben wurde das QIAamp® DNA Mini Kit und das QIAamp® DNA Blood Kit verwendet.

Die *Francisella*-DNA-Stämme und das mit *Francisella* infizierte Hasengewebe wurden vom Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, zur Verfügung gestellt.

Die *Francisella*-Stämme *B 38: F. tularensis subs. tularensis, FX 1: F. novicida, LVS: F. tularensis subs holarctica, FX 2: F. novicida, FT 10: F. tularensis subs holarctica, U 112: F. novicida, FT 7: F. tularensis subs holarctica, FHSP: F. hispaniensis, CCUG4492: F. philomiragia* wurden auf Schokoladenagar, der mit IsoVitaleX und L-Cystein versetzt wurde, gegeben und für 48h bei 37°C in einer 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Die Kolonien wurden in 200 µl PBS resuspendiert und die genomische DNA wurde mit dem QIAamp DNA Minikit extrahiert und aufgereinigt.

Die DNA aus infiziertem Hasengewebe wurde im S3-Labor aufgearbeitet: Kleine Teile des Hasengewebes wurden homogenisiert und bei 56°C über Nacht in 180 µl ALT-Puffer und 20 µl Protease inkubiert (QIAamp® DNA Mini-Kit). Die DNA wurde mit dem QIAamp® DNA Blood Reagenzienansatz extrahiert.

2.2.2.9 Enzymkatalysierte Reaktionen an RNA

2.2.2.9.1 Reverse Transkription

RNA kann durch die reverse Transkription in komplementäre (engl. complementary) DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Das Enzym, das die reverse Transkription durchführt, heißt Reverse Transkriptase. Es hat RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, mit der anhand der RNA der cDNA-Strang gebildet wird. Die Reverse Transkriptase hat zudem RNase-H-Aktivität, wodurch die RNA abgebaut werden kann.

<u>Durchführung:</u> Es wurden 10 µl H_2O, mit 2 µl RNA und 1 µl M13 Primer (s. Tabelle 2.10) zusammen in eine 0,5-ml-Eppendorf-Cup pipettiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 4 µl Transcriptor RT Reaction Buffer (5x), 5 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl) hinzugefügt, gevortext und herunterzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 55°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Transcriptor Reverse Transcriptase wurde bei 85° C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.2.10 Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA

2.2.2.10.1 Restriktionsverdau

DNA kann durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden, um z.B. Plasmide anhand ihrer Schnittstellen zu charakterisieren oder sie zu linearisieren.
Es wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die spezifische 6-Basenpaarsequenzen der DNA erkennen und schneiden. Je nach Enzym entstehen glatte Schnittstellen („blunt-ends“) oder Enden mit überhängenden Basen am 5’- bzw. 3’-Ende („sticky-ends“) (Sambrook et al. 1989). Je nach Hersteller werden entsprechende Puffer verwendet, welche die Reaktion unterstützen.
Durchführung: Für den Kontrollverdau wurde ein 15 µl Ansatz mit 1 µl Restriktionsenzym (s.Tabelle 2.6), 1,5 µl mitgelieferter Puffer, DNA (ca. 200-500 ng/µl) und ddH_2O in 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert.
Die Proben mit Fast Digest®-Enzymen wurden für 10 min bei 37°C inkubiert, bei Verwendung von *PvuI* wurde für 1 h bei 31°C inkubiert und anschließend 5 µl des Ansatzes auf das Agarosegel aufgetragen.

Für die Linearisierung wurde ein 100 µl Ansatz mit 10 µl Restriktionsenzym (s.Tabelle 2.6), 10 µl Puffer, DNA (ca.10 ng/µl) und ddH_2O in 1,5-ml-Eppendorf-Cups pipettiert:
Handelte es sich bei den Restriktionsenzymen um Fast Digest®-Enzyme, wurde für 20 min bei 37°C inkubiert, mit *PvuI* wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Wenn laut Anleitung eine Hitzeinaktivierung möglich war, wurde sie durchgeführt (Dauer und Temperatur der Inaktivierung sind enzymabhängig). Zur Kontrolle wurden anschließend 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.2.10.2 TA-Klonierung

Um Nukleinsäuresequenzen vermehren zu können, müssen diese erst in ein Plasmid eingefügt werden, damit dieses von Bakterien aufgenommen und vervielfältigt werden kann. Das Plasmid, in das die Nukleinsäuresequenz eingefügt wird, nennt sich Vektor, die Nukleinsäuresequenz Insert.
Bei der Thymin(T)-Adenin(A)-Klonierung wird als Insert ein PCR-Produkt verwendet, das durch Verwendung einer thermostabilen Polymerase an den Enden einen 3’-Adenin-Überhang aufweist. Dies erlaubt die Verknüpfung des Inserts mit einem Vektor, der an den Enden einen einfachen 5’-Thymin-Überhang hat. Nach der Ligation wird das Plasmid in INVαF’*E.coli*-Zellen eingeschleust.

Um zu überprüfen welche Bakterien das Plasmid mit Insert enthalten, nutzt man die Blau-Weiß-Differenzierung. Im pCRII®-Vektor, der in dieser Methode verwendet wurde, ist an der Stelle, wo das Insert eingefügt werden kann, an der sogenannten multiplen Klonierungsstelle, ein *LacZ*-Gen eingebracht. Dieses codiert für den aminoterminalen Teil der Proteinsequenz der β-Galaktosidase (dieses Enzym kann Laktose spalten). Die INVαF'*E.coli*-Zellen enthalten eine Sequenz, die für die Proteinsequenz des carboxyterminalen Abschnittes der β-Galaktosidase kodiert und so wird bei der Zusammenführung der INVαF'*E.coli*-Zellen mit dem pCRII®-Vektor die β-Galaktosidase gebildet. Dieses Enzym spaltet X-Gal, ein lactoseähnliches Substrat, welches vor dem Auftragen der Zellen auf die LB-Amp-Platten aufgetragen wird. Bei der Spaltung von X-Gal wird eine Blaufärbung hervorgerufen.

Bei der Ligation von Insert und Plasmid, wird das Insert in die multiple Klonierungsstelle eingefügt und das Leseraster für das *LacZ*-Gen wird durchbrochen. Die β-Galaktosidase wird bei den Bakterien, die das Insert enthalten daher nicht gebildet und die enstandenen Klone bleiben weiß.

Durchführung: Es wurde das Kit Dual Promotor TA Cloning® (with pCRII®-Vektor) with one Shot® INVαF' Chemically Competent *E.coli* verwendet.

Laut Angaben des Herstellers muss, um die Menge des einzusetztenden PCR-Produktes zu bestimmen, die Menge der Basenpaare des PCR-Produktes mit der Menge des pCRII®-Vektors (50 ng) multipliziert werden und durch die Menge der Basenpaare des pCRII®-Vektors (ca. 3900) dividiert werden.

Für einen Reaktionsansatz von 10 µl wurde das PCR-Produkt, 1 µl Ligation Buffer 10x, 2 µl pCRII®-Vektor (25 ng/µl), 1 µl T4-Ligase (4 U/µl) und steriles H_2O in ein 1,5-ml-Eppendorf-Cup pipettiert.

Der Ansatz wurde zwischen 4 und 16 h bei 14°C inkubiert.

Anschließend wurden 2 µl der Probe für die Transformation in 50 µl mitgelieferte INVαF'-Zellen überführt, 30 min auf Eis gestellt, für 30 s bei 42°C inkubiert und auf Eis 250 µl S.O.C.-Medium hinzugegeben. Für 1 h wurde die Probe bei 300 Upm und 37°C inkubiert. Währenddessen wurden 2 LB-Amp-Platten mit je 40 µl X-Gal (40 mg/ml) bestrichen. 100 µl des Ansatzes wurden auf eine Platte gegeben, der Rest auf die zweite Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden von den weißen Klonen eine Flüssigkultur angelegt (s.2.2.1.2).

2.2.2.10.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine *In-vitro*-Methode um spezifische DNA-Sequenzen in großen Mengen zu amplifizieren. Für die PCR benötigt man die DNA, die vervielfältigt werden soll, eine hitzestabile Polymerase (Taq-Polymerase, DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*), und Desoxyribonukleotisidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine für die Polymerase. Durch Hinzugabe von Magnesium wird die Enzymfunktion unterstützt und ein Puffer sichert die chemische Umgebung für das Enzym. Außerdem benötigt man zwei spezifische Primer. Diese Oligonukleotide sollen ca. 20-30 Nukleotide lang sein, einen Guanin-Cytosin-Gehalt von ca. 40-60% haben und zu einem Strang des aufeinanderliegenden Doppelstrangs komplementär sein.

Die PCR gliedert sich in drei Abschnitte: Denaturierung, Renaturierung bzw. Primer-Anlagerung und Verlängerung (engl. Melting, Primer Annealing, Elongation). Diese werden in einem Thermocycler durchgeführt, der verschiedene Temperaturen einstellen kann, die für die verschiedene Abschnitte der PCR benötigt werden.

Die Denaturierung läuft bei 94-96°C ab, der Doppelstrang trennt sich, da bei dieser Temperatur Wasserstoffbrückenbindungen getrennt werden.

Für die Primer-Anlagerung muss der Thermocycler auf eine Temperatur herabkühlen, unter der sich die spezifischen Primer an die DNA-Stränge anlagern können. Dieser Wert soll zwischen 5-10°C unter dem berechneten Schmelzpunkt T_m (in dieser Arbeit wurde der berechnete T_m von TIB MOLBIOL verwendet) der Primersequenzen liegen. Je höher die Anlagerungstemperatur, desto spezifischer erfolgt die Hybridisierung der Primer mit der Ausgangs-DNA.

Bei der Verlängerung wird der Thermocycler auf 68°C geheizt, bei dieser Temperatur kann die Taq-Polymerase optimal arbeiten. Die Oligonukleotidprimer besitzen freie OH'-Gruppen am 3'-Ende und sind der Startpunkt für die DNA-Polymerase. Das Enzym verknüpft die OH-Gruppe durch eine Phosphodiesterbindung in Gegenwart der dNTPs mit dem passenden Nukleotid komplementär zu der einzelsträngigen denaturierten Ausgangs-DNA.

Diese drei Schritte werden in 30-45 Zyklen wiederholt, bei Beginn eines neuen Zyklus dienen die entstandenen Amplifikationsprodukte zusätzlich als Vorlage und somit steigt die Konzentration der vervielfältigten DNA exponentiell an (Mullis und Faloona 1987).

Durchführung: Die PCR wurde in dünnwandigen 0,5-ml-Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler durchgeführt. Anschließend folgte eine Analyse mit der Agarose-Gelelektrophorese (s.Kap. 2.2.2.6).

Der PCR-Ansatz von 50 µl enthielt Original DNA (5-30 ng), 200 nM Vorwärtsprimer, 200 nM Rückwärtsprimer, 200 µM dNTPs, 1U Taq-Polymerase (s.Tabelle 2.6), 1x Taq-Puffer und ddH_2O.

Programmbeispiel für den Thermocycler:

Tabelle 2.12 Verwendetes PCR-Programm

Schritt	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
Aktivierung	1	95	3:00
Denaturierung	30	95	1:00
Anlagerung		60	1:00
Verlängerung		68	1:00
Kühlung	1	8	0:30

Tabelle 2.13 Verwendete PCR-Primer

Name	**Zielgen**
Bacillus anthracis	*pagA*
Vorwärtsprimer	5'-AGAGGTGATTCAGGCAGAAGTTAAACAGG-3'
Rückwärtsprimer	5'-GTTGCGTTTAATTCCGCTAACTGATTCTTG-3'
Francisella tularensis	*tul4*
Vorwärtsprimer	5'-TTATCTTTATCAATCGCAGGTTTAGC-3'
Rückwärtsprimer	5'-GGTTGGTGCACATGGCTAAGT-3'
Yersinia pestis	*pla*
Vorwärtsprimer	5'-ACGTTTCAGTTGGACAGCTACAGGT-3'
Rückwärtsprimer	5'-AACACCAACCTCCTTTCCACAGA-3'

Die in Tabelle 2.13 verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland, bezogen.

2.2.2.10.4 *In-vitro*-Transkription

Die Transkription beschreibt die Synthese von RNA anhand einer DNA-Vorlage.

Für diese Arbeit wurden als DNA-Vorlage nur Nukleinsäuren transkribiert, die als Inserts in pCR®II-Vektoren ligiert waren. Mit dem Plasmid wurde eine PCR mit Primern für den Insert-Bereich durchgeführt (M-13 Primer s. Tabelle 2.10) und das PCR-Produkt wurde mit der SP6- oder T7-Polymerase in 5'-3'-Richtung transkribiert. Der PCR-II®-Vektor

enthält Startpunkte für die SP6- und T7-Polymerasen (sogenannte Promotoren) links vom Insert der SP6-Promotor, rechts der T7-Promoter. Je nachdem in welcher Richtung man den RNA-Strang von der DNA-Vorlage gebildet haben möchte, setzt man die SP6- oder die T7-Polymerase ein.

Durchführung: Der Transkriptionsansatz mit einem Volumen von 100 µl wurde mit 30 µl PCR-Produkt (max. 2 µg DNA), 10 µl Transkriptionspuffer (10x), 5 µl DTT (0,1M), 5 µl BSA (1 mg/ml), 16 µl rNTPs (2,5 µM), 27 µl ddH_2O, 5 µl RNAse Inhibitor (40 U/µl) und 2 µl Promoter (SP6/T7) in 1,5 ml-Eppendorf-Cups hergestellt.

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert.

Zur Entfernung der DNA wurde aus dem Ambion Turbo DNA-free™-Kit 11 µl Turbo DNase Puffer (10x) und 1 µl Turbo DNase hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 11 µl DNase Inactivation Reagent hinzugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zwischendurch 2-3 Mal gemischt. Anschließend wurde 1,5 min bei 110000 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Cup gegeben. Je nach Bedarf wurde die Behandlung mit Ambion Turbo DNA-free™ wiederholt und anschließend wurde die Probe bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.10.5 Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (Echtzeit-PCR, engl: Realtime-PCR) ist eine Variation der PCR. Zum Reaktionsansatz wird eine spezifische Oligonukleotid-Sonde hinzugefügt, die ein Fluoreszenzsignal abgeben kann, somit kann parallel zur Amplifikation der DNA eine Spezifitätskontrolle erfolgen.

In dieser Arbeit wurden TaqMan-Sonden benutzt. Diese Sonden sind einzelsträngige Oligonukleotide an denen am 3’-Ende ein Quencher (engl. quenching: Fluoreszenzlöschung) sitzt und die in einem Abstand von 3-30 Nukleotiden zum 5’-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM) versehen sind. Wenn die Sonde mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm angeregt wird, emittiert der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff ein Fluoreszenzemissionselektron, dieses wird durch den Quencher absorbiert. Diese Reaktion heißt Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer (FRET).

Wenn die Sonde mit der Zielsequenz hybridisiert, kann die Polymerase, die 5’-3’-Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde vom 5’-Ende aus verdrängen, der Reporterfarbstoff wird vom Quencher getrennt und es entsteht eine Zunahme der Fluoreszenz. Diese ist proportional zu den Amplifikations-Produkten (Meuer et al. 2001).

Die PCR und die Echtzeit-PCR können auch mit RNA durchgeführt werden. Dafür muss die reverse Transkription durchgeführt werden, das heißt RNA wird in cDNA umgeschrieben. Dies wird unter Verwendung der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, möglich. Für den Light Cycler ist ein Reagenzienansatz für RNA als Kit erhältlich.

Durchführung: Verwendet wurde das Light Cycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes Kit und das Light Cycler® Fast start DNA Master HybProbe Kit.

Je nach genutztem Reagenzienansatz wurden die mitgelieferten Reagenzien nach Anleitung als Mastermix mit Primern und Sonde in 0,5-ml-Eppendorf-Cups pipettiert, in Light Cycler®Capillaries überführt und im letzten Schritt die RNA oder DNA hinzugegeben. In der LC-Carousel-Zentrifuge runterzentrifugiert und mit Hilfe des Light Cycler® 2.0 gemessen.

Für den RNA Nachweis wurden insgesamt 20 µl, bestehend aus 1x LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes Buffer, 3,25 mM Activator, 500 nM Vorwärts-Primer, 500 nM Rückwärts-Primer, 200 nM TaqMan-Sonde, RNA und H_2O in Light Cycler®Kapillaren pipettiert.

Tabelle 2.14 Verwendetes Echtzeit-PCR-RNA-Programm

Schritt	**Zyklen**	**Temperatur (°C)**	**Zeit**
Reverse Transkription	1	63	5:00
Aktivierung	1	95	5:00
Denaturierung	45	95	0:15
Anlagerung/Verlängerung		60	1:00
Kühlung	1	40	0:30

Tabelle 2.15 Verwendete Echtzeit-PCR-Oligonukleotide zum RNA-Nachweis

Name	**Zielgen**
Sudan-Ebola-Virus	Nukleoprotein
Vorwärtsprimer	5'-TTGACCCGTATGATGATGAGAGTA-3'
Rückwärtsprimer	5'-CAAATTGAAGAGATCAAGATCTCCT-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-CCTGACTACGAGGATTCGGCTGAAGG-TMR-3'
Zaire-Ebola -Virus	Nukleoprotein
Vorwärtsprimer	5'-TGATCCYGATGATGGAAGCTAC-3'
Rückwärtsprimer	5'-GTCTAGATCGAATAGGACCAAGTCATCT-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-CCAGAGTTACTCGGAAAACGGCATG-TMR-3'
Marburg-Virus	Nukleoprotein
Vorwärtsprimer	5'-CTGARATYACACACAGTCAGACA-3'
Rückwärtsprimer	5'-TRTTGTTTTCAATTTCTGCAGC-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-CCGTCCTCAGCCAGAAACGAGA-TMR-3'
Rift-Valley-Fieber-Virus	Nukleokapsid
Vorwärtsprimer	5'-TGCCACGAGTYAGAGCCA-3'
Rückwärtsprimer	5'-TTGAACAGTGGGTCCGAGA-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-TCCTTCTCCCAGTCAGCCCCAC-TMR-3'
Sigma-Virus	Glykoprotein
Vorwärtsprimer	5'-GTGACATTCCAAGTAACTGATT-3'
Rückwärtsprimer	5'-CAACGGCAGTTTGGATA-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-CCCTCCGTGTCCTCCCGGTACC-TMR-3'

Die gesamten, in Tabelle 2.15 verwendeten Oligonukleotide, wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland, bezogen.

Für den DNA-Nachweis wurden 20 µl, bestehend aus 500 nM Vorwärtsprimer, 500 nM Rückwärtsprimer, 200 nM TaqMan-Sonde, 1x LightCycler® Fast-Start DNA Master HybProbes, 5 mM $MgCl_2$, DNA und H_2O in Light Cycler®Kapillaren pipettiert.

Tabelle 2.16 Verwendetes DNA-Echtzeit-PCR-Programm

Schritt	**Zyklen**	**Temperatur (°C)**	**Zeit**
Aktivierung	1	95	5:00
Denaturierung	45	95	0:05
Anlagerung/Verlängerung		60	1:00
Kühlung	1	40	0:30

Tabelle 2.17 Verwendete Echtzeit-PCR-Oligonukleotide zum DNA-Nachweis

Name	**Zielgen**
Bacillus anthracis	*capC*
Vorwärtsprimer	5'-ACGTATGGTGTTTCAAGATTCATG-3'
Rückwärtsprimer	5'-ATTTTCGTCTCATTCTACCTCACC-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-CCACGGAATTCAAAAATCTCAAATGGCAT-TMR-3'
Bacillus anthracis	*pagA*
Vorwärtsprimer	5'-CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA-3'
Rückwärtsprimer	5'-CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-CTCGAACTGGAGTGAAGTGTTACCGCAAAT-TMR-3'
Francisella tularensis	*tul4*
Vorwärtsprimer	5'-ATTACAATGGCAGGCTCCAGA
Rückwärtsprimer	5'-GCCCAAGTTTTATCGTTCTTCTCA
TaqMan-Sonde	5'-FAM-TTCTAAGTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTACTAA GTA-TAMRA-3'
Variola-Virus	ha
Vorwärtsprimer	5'-TCTGTGACTGTATGATCTTCTTTATTAG-3'
Rückwärtsprimer	5'-TCATTAATACAGTAAGTACATCATCTGGAGAATC-3'
TaqMan-Sonde	5'-FAM-ACAACAGACAAGACGTCGGGACCAAT-TMR-3'

Die Primer und Sonden für die *Bacillus-anthracis*- und *Francisella-tularensis*-Ansätze wurden am Beispiel von Publikationen (Ellerbrok et al. 2002; Emanuel et al. 2003) entworfen.

Alle in Tabelle 2.17 verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland, bezogen.

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit der LightCycler® 2.0 Software.

2.2.2.10.6 Rekombinase-Polymerase-Amplifikation

Mit der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) kann, ähnlich wie bei der Echzeit-PCR, DNA oder RNA hochamplifiziert werden. Bei der RPA geschieht dieser Vorgang bei einer konstanten Temperatur von 37-42°C innerhalb weniger Minuten. In Kapitel 1.6 ist der genaue Ablauf der RPA beschrieben.

Für den RPA-Primerentwurf gibt es einige Empfehlungen von TwistDx, um Primer für die RPA zu entwerfen. Die Oligonukleotide sollen ca. 35 Nukleotide lang sein, aufeinanderfolgende Guanine am 5'-Ende sollen vermieden werden, Cytidine am 5'-Ende

und Guanine und Cytidine am 3'-Ende scheinen für die Reaktion vorteilhaft zu sein. Zudem sollte der Guanin-Cytidin-Gehalt der Primer zwischen 30% und 70% liegen.
Je nach Länge der Sonde sollte das zu amplifizierende Produkt zwischen 100 und 200 Basenpaaren lang sein.

Wie bei der Echtzeit-PCR kann auch bei der RPA durch den Einsatz von fluoreszierenden Sonden eine Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäuren erfolgen.
Es gibt verschiedene Typen von Sonden für die RPA, für diese Arbeit wurden TwistAmp™-exo-Sonden und TwistAmp™-fpg-Sonden verwendet.

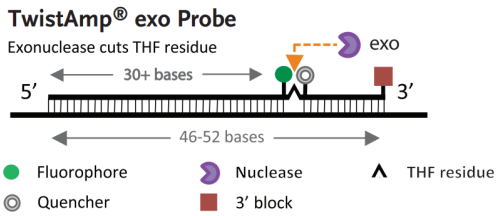


Abbildung 2.1 TwistAmp™-exo-Sonde (Quelle: TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand 01.12.2014)

Die Sonde für das TwistAmp™-exo-Kit hat eine Länge von ca. 46-52 Nukleotiden. Vom 5'-Ende ausgehend wird nach 30 Nukleotiden ein Tetrahydrofuran (THF) eingefügt, das auf einer Seite mit einem dT-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. dT-FAM) und auf der anderen Seite mit einem dT-Quencher (z.B. dT-BHQ) flankiert ist (Beispiel: [FAM-dT][THF][BHQ1-dT]). Am 3'-Ende hängt ein Blocker (z.B. ein Phosphat, ein C3-Spacker oder ein Biotin-TEG), um die Verlängerung durch die Polymerase zu hemmen. Das THF stellt ein Substrat für die Exonuklease III dar, die im TwistAmp™-exo-Kit enthalten ist. Schneidet die Exonuklease am THF, dissoziiert der kleine Teil der Sonde und der Quencher, der daran hängt, wird vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt. Die fluoreszenzunterdrückende Funktion des Quenchers wird durch die Trennung aufgehoben und ein Fluoreszenzsignal entsteht. Das Enzym schneidet nur, wenn die Sonde an die Einzelstrang-DNA gebunden hat, somit bedeutet die Zunahme der Fluoreszenz gleichzeitig ein Nachweis für die Amplifikationszunahme.

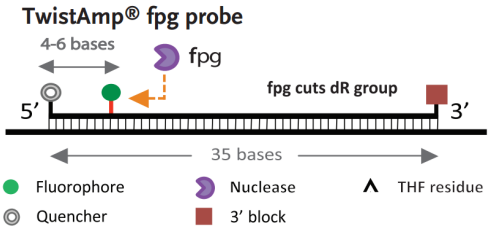


Abbildung 2.2 TwistAmp™-fpg-Sonde (Quelle: TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand 01.12.2014)

Die Sonde für das TwistAmp™-fpg-Kit hat eine Gesamtlänge von etwa 35 Nukleotiden. Am 5'-Ende hängt ein Quencher, 4-6 Nukleotide weiter ein Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende befindet sich wie bei der TwistAmp™-exo-Sonde ein Blocker (z.B. ein Phosphat, ein C3-Spacker oder ein Biotin-TEG). Im TwistAmp™-fpg-Kit befindet sich das FPG-Protein, ein Enzym mit DNA-Reparatur-Aktivität, das den Fluoreszenzfarbstoff abschneiden kann, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht.

Für die Auswertung der Ergebnisse mit der Tube Scanner Software ist die Definition des Schwellenwerts (engl.: threshold) und die der Steigung (engl.: slope) von Bedeutung. Der Schwellenwert gilt als positiv, wenn ein Zeitpunkt erreicht ist, an dem die Ergebnisse der gesamten Fluoreszenzmessung, den von den Ergebnissen der ersten Minute (die Zeit ist benutzerabhängig) ermittelten Mittelwert plus ein dreifaches der Standardabweichung übersteigen. Die Steigung wird in einem zeitlich festgelegen Fenster betrachtet (z.B. 4-12 min). Der Wert der Fluoreszenzintensitat (in mV) pro Zeit muss als Schwellenwert (z.B. 30 mV) für die Steigung festgelegt werden, was in einem Ableitungsgraphen durchgeführt werden kann. Für das genannte Beispiel würden die Ergebnisse als „positiv“ bewertet, wenn das abgeleitete Signal der Sonde 30mV innerhalb der 4-12 Minuten übersteigt.
In Anlehnung an die Echtzeit-PCR wird der Zeitwert an dem die Probe als positiv ausgewertet wird als „Crossing Point“ bzw. „Crossing Threshold“ und daher Cp- bzw. Ct-Wert bezeichnet.

Durchführung: Verwendet wurde das TwistAmp™-exo-Kit und das TwistAmp™-fpg-Kit. Es wurden je nach Ansatz alle Reagenzien außer der RNA/DNA und Magnesiumacetat in die mitgelieferten Tubes pipettiert, gemischt und herunterzentrifugiert. Damit das Magnesiumacetat gleichzeitig in die Reaktionsgefäße gegeben wird, wurde es in die Deckel der Tubes pipettiert. Die RNA/DNA wurde hinzupipettiert und vorsichtig der Deckel geschlossen. Es wurde zentrifugert, für 10 s gevortext und erneut herunterzentrifugiert. Die Proben wurden in den Tube Scanner positioniert, nach 4 min herausgenommen, für 5 s gevortext, herunterzentrifugiert und zurück in den Tube Scanner gesteckt.

Für den **RNA-Ansatz** von 50 µl wurden 420 nm Vorwärtsprimer, 420 nm Rückwärtsprimer, 120 nm RPA-Sonde, 1x Rehydration Buffer, 2 mM DTT, 10 U Reverse Transkriptase (20 ul/µl), 20 U RNase Inhibitor, 22,4 mM Magnesiumacetat; RNA und ddH_2O in die mitgelieferten TwistAmp™-Tubes pipettiert.

Im Tube Scanner wurde bei 42°C für 20 min gemessen.

Tabelle 2.18 Verwendete RPA-Oligonukleotide zum RNA-Nachweis

Name	**Zielgen**
Sudan-Ebola-Virus	Nukleoprotein
Vorwärtsprimer	5'-CAACTATYCCAGGTGGTGTTGTTGACCCGT-3'
Rückwärtsprimer	5'-GGCTGTCRTCATCGTCGTCGTCCAAATTGAAGA-3'
exo-Sonde	5'-CTCCTGTGGTGCCTTCAGCCGAATCCTCG (FAM-dT)A(THF)(BHQ1-dT)CAGGATAATTATTACT (Phosphat)-3'
Zaire-Ebola-Virus	Nukleoprotein
Vorwärtsprimer	5'-GACGACAATCCTGGCCATCAAGATGATGATCC-3'
Rückwärtsprimer	5'-CGTCCTCGTCTAGATCGAATAGGACCAAGTC-3'
exo-Sonde	5'-GATGATGGAAGCTACGGCGAATACCAGAG (FAM-dT)T(THF)C(BHQ1-dT)CGGAAAACGGCATG (Phosphat)-3'
fpg-Sonde	5'-(dR-FAM)GGCG(BHQ1)ATACCAGAGTTACTCGGAAAACG GCATGAA(Phosphat)-3'
Marburg-Virus	Nukleoprotein
Vorwärtsprimer	5'-CATGAACATCAGGAAATTCAAGCTATTGCMGARG-3'
Rückwärtsprimer	5'-CTAATTTTTCTCGTTTCTGGCTGAGGACGGC-3'
	5'-TGTGTGTGATTTCAGTTTTYTGAAGGTGGAAY(FAM-dT) (THF)(BHQ1-dT)TCTAATATCTTCC(Phosphat)-3'
Vorwärtsprimer 2	5'-CGACATGAACACCAGGAAATTCAGGCCATCGCC-3'
Rückwärtsprimer 2	5'-CGAGCTAGTTTCTCTCGTTTCTGGCTGAGGAC-3'
exo-Sonde 2	5'-AATCTCAGTCTTCTGGAGATGGAACTGTTCTAA(FAM-dT) (THF)(BHQ1-dT)TTTTCTCTCTTCGTC(Phosphat)-3'
fpg-Sonde	5'-(dR-FAM)GCCGT(BHQ-1)CTCAGCCAGAAACGAGARAAA YTAGC(C3-Spacer)-3'
Rift-Valley-Fieber-Virus	Nukleokapsid
Vorwärtsprimer	CATTTTCATCATCATCCTCCKGGGCTTRTTG
Rückwärtsprimer	GARCTCYTAAAGCAGTATGGTGGGGCTGACT
exo-Sonde	GGGAGAAGGATGCCAAGAAAATGATTGT (BHQ1-dT) (THF) (FAM-dT) GGCTCTRACTCGTG (Phosphat)
Sigma-Virus	Glykoprotein
Vorwärtsprimer	5'-TGACCATCCTAACTCTGTGACATTCCAAGT-3'
Rückwärtsprimer	5'-ACCCAGAGATTCAAGAGCTCACTGTCAA-3'
exo-Sonde	5'-ACTGATTTCCCTCCGTGTCCTCCCGGTACCAC(FAM-dT) (THF)(BHQ1-dT)CCAAACTGCCGTTGTG(Phosphat)-3'
fpg-Sonde	5'-(dR-FAM)TGTC(BHQ-1)TCCCGGTACCACTATCCAAACTG CCGTTGT(Phosphat)-3'
Francisella tularensis	*ssrA*
Vorwärtsprimer	5'-CCGCGTAGCGGCTAACGACAGCAACTTTGCTGC-3'
Rückwärtsprimer	5'-CCCAGACAAAAAGCAAAGACCGTCTTATGCGGA-3'
exo-Sonde	5'-GTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTACTAAG(FAM-dT)

	(THF)(BHQ1-dT)GCTGAGAAGAACGATA(Phosphat)-3’
Yersinia pestis	*ssrA*
Vorwärtsprimer	5’-CCAGTATCGCATTAATGATTTTGAGTTAAATGC-3’
Rückwärtsprimer	5’-TTGAACCCCCGTCCGAAATTACTACACC-3’
exo-Sonde	5’-TCGTGTGGAAACCTTGCCTGGGGTGGAAGCAT(FAM-dT)(THF)(BHQ1-dT)AACTAATCAGGATAGTT(Phosphat)-3’

Der **DNA-Ansatz** von 50-µl-Gesamtvolumen wurde mit 420 nM Vorwärtsprimer, 420 nM Rückwärtsprimer, 120 nM RPA-Sonde, 1x Rehydration Buffer ddH_2O, 14 mM Magensiumacetat, DNA und ddH_2O hergestellt.

Im Tube Scanner wurde bei 42°C für 20 min gemessen.

Tabelle 2.19 Verwendete RPA-Oligonukleotide zum DNA-Nachweis

Name	**Zielgen**
Bacillus anthracis	*capC*
Vorwärtsprimer	5’-CTGGAACAATAACTCCAATACCACGGAATTCA-3’
Rückwärtsprimer	5’-GGTGTTTCAAGATTCATGATTTTATATGGCCG-3’
exo-Sonde	5’-TGGCATAACAGGATAACAATAATCAAATAAAAGT(FAM-dT)(THF)(BHQ1-dT)AAACAAATACCTGTAATTAGC(Phosphat)-3’
Bacillus anthracis	*pagA*
Vorwärtsprimer	5’-TACAGGGGATTTATCTATTCCTAGTTCTGAG-3’
Rückwärtsprimer	5’-GTAGCAAATGTATATTCATCACTCTTCTTAAC-3’
exo-Sonde	5’-GAAAATATTCCATCGGAAAACCAATATTTTCAA(FAM-dT)(THF)(BHQ1-dT)GCTATTTGGTCAGGAT(Phosphat) -3’
Francisella tularensis	*tul4*
Vorwärtsprimer	5’-CACAAGGAAGTGTAAGATTACAATGGCAGGCTCC-3’
Rückwärtsprimer	5’-CGCTACAGAAGTTATTACCTTGCTTAACTGTTA-3’
exo-Sonde	5’-GTGCCATGATACAAGCTTCCCAATTACTAAG(FAM-dT)(THF)(BHQ1-dT)GCTGAGAAGAACGATA(Phosphat)-3’
Yersinia pestis	*pla*
Vorwärtsprimer	5’-CCAGTATCGCATTAATGATTTTGAGTTAAATGC-3’
Rückwärtsprimer	5’-TCCAGCGTTAATTACGGTACCATAATAACGTGAG-3’
exo-Sonde	5’-CGACTGGGTTCGGGCACATGATAATGATGAGCACTA(FAM-dT)(THF)(BHQ1-dT)GAGAGATCTTACTT(Phosphat)-3’
Vaccinia-Virus	ha
Vorwärtsprimer	5’-ACATACACTAGTGATAGCATTAATACAGTAAG-3’
Rückwärtsprimer	5’-AGATGATGTACTTACTGTAGTGTATGAGACAGT-3’
exo-Sonde	5’-TCTTCTTATCAGTAATTGGTTCCGGAGTCTCG(FAM-dT)C

	(THF)G(BHQ1-dT)TGTGGATTCTCCA-3’
Variola-Virus	ha
Vorwärtsprimer	5’-GAGAATCCACAACMGACAAGACKTCSGGAC-3’
Rückwärtsprimer	5’-TTGGCGGTTGATTTAGTAGTGACAATTTCA-3’
exo-Sonde	5’-TGTATGAGACAGTGTCTGTGACTGTATGA(FAM-dT)(THF)(BHQ1-dT)TCTTTATTAGTAATTGGTCC(Phosphat) -3’

Die Primer aus Tabelle 2.18 und Tabelle 2.19 wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland, bezogen. Die exo-Sonden wurden von der Firma Eurogenetec und der Firma TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland, bezogen

2.2.2.10.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH per Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden durchgeführt (Sanger et al. 1977).

Durchführung: Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde durch die Minipräparation aufgereinigt und anschließend ca. 600 ng DNA mit 2 µl M-13-Primern (forward oder reverse s. Tabelle 2.10) und ddH_2O in einem Gesamtvolumen von 8 µl an SeqLab geschickt.

2.2.2.10.8 Probit-Analyse

Das Probit-Modell (McCulloch et al. 2001) wurde angewendet, um zu ermitteln wieviele Moleküle die spezifisch angefertigten Tests der RPA in 95% der Fälle detektieren werden. Der mit dieser statistischen Auswertung berechnete Wert basiert auf den gemessenen Ergebnissen in einer bestimmten Anzahl von Testläufen. Da die Ergebnisse der RPA Messungen binär sind (basierend auf der Fragestellung: Ist das Ergebnis positiv oder negativ?), ist eine statistische Auswertung über eine lineare Regression nicht möglich.

Im Probit-Modell wird eine S-förmige Kurve, über die Verteilungsfunktion einer Gauß’schen Normalverteilung durch den Zusammenhang zwischen dem Anteil der positiven Tests und der Anzahl der eingesetzten Moleküle, erstellt. Die Kurve der Funktion $Y=\phi(a+b*x)$ wird so modelliert, dass die quadrierte Differenz der vorhergesagten Werte zu den gemessenen Werten möglichst klein ist. Y ist der Wahrscheinlichkeitswert, für ein positives Testergebnis, a gibt die Steigung der Kurve an und b verschiebt die Kurve auf der Abszissenachse. Auf Grundlage der modellierten Kurve wird in einem zweiten Schritt der Wert berechnet, bei dem 95% der Testläufe positiv sind. Dieser Wert steht in dieser

Arbeit für die theoretische Molekülzahl, die ein Test auf Grundlage der durchgeführten Messungen in 95% der Testläufe nachweist.

Durchgeführt wurde die Probit-Analyse mit Statistica und Microsoft Excel.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Verfahren zum Nachweis viraler RNA

3.1.1 Entwurf der RT-RPA-Amplikons

Für das Sudan-Ebola-Virus (SUDV), das Zaire-Ebola-Virus (EBOV), das Marburg-Virus (MARV), das Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) und das Sigma-Virus (SIGV) wurden Reverse-Transkriptase(RT)-RPA-Ansätze entworfen. Der SIGV-Nachweis wurde entwickelt als Positivkontrolle, um die Tests intern validieren zu können.

Es wurden Zielsequenzen ausgewählt, für die bereits Echtzeit-PCR-Nachweise existierten, die zuvor im Labor für Virologie an der Universitätsmedizin Göttingen entwickelt wurden. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der beiden molekularen Nachweisverfahren.

Diese Zielsequenzen lagen bereits als synthetische Standards ligiert in pCR®II-Vektoren vor. Auch für die tmRNA (*ssrA*-Gen) von *Yersinia pestis (Ype)* und *Francisella tularensis (Ftu)* lagen ligierte pCR®II-Plasmide vor. Aufgrund bestimmter Eigenschaften erwies sich die tmRNA als attraktives Amplifikationsziel, weshalb auch für die tmRNA von *Ype* und *Ftu* RT-RPA-Ansätze entworfen wurden (s. Kapitel 3.1.4).

Diese Zielsequenzen wurden anhand des Sequenzbearbeitungsprogrammes DNASTAR Lasergene™ MegAlign mit den gesamten, aktuell verfügbaren Vergleichssequenzen der Erreger der Onlinedatenbank GeneBank verglichen und im Bereich oder in der Nähe des Echtzeit-PCR-Entwurfs ein Abschnitt ausgesucht und dort die RPA-Primer und RPA-Sonde platziert.

Für die RPA gibt es für den Entwurf der Primer bisher noch keine genauen Anleitungen, sondern nur eingrenzende, auf Erfahrungswerten beruhenden Vorgaben, da die Methode noch nicht in allen Details verstanden wird. Die empfohlene Länge der Primer liegt bei 30-35 Nukleotiden, aufeinanderfolgende Guanine am 5'-Ende sollten vermieden werden. Cytidine am 5'-Ende und Guanine oder Cytidine am 3'-Ende scheinen die Leistung zu verbessern. Der Guanin-Cytidin-Gehalt der Primer sollte zwischen 30% und 70% liegen und die Länge des Amplikons 100-200 Basenpaare lang sein.

Nach diesen Vorgaben wurden für die RNA-Ansätze 3-8 Primerpaare entworfen und diese in verschiedenen Kombinationen getestet. Die Primerpaare mit den sensitivsten Ergebnissen wurden dann für die weiteren Versuche verwendet.

Der Entwurf der RPA-Sonden erfolgte nach Anleitung für das TwistAmp™-exo-Kit.
Für das Marburg-Virus wurden zwei Primer- und Sondenkombinationen entworfen, da die Virus-Isolat-Sequenzen von den Ausbrüchen in Angola 2005 und in Uganda im Jahre 2007 untereinander große Varianzen aufweisen und so alle Sequenzvarianten detektiert werden sollen.

In der folgenden Tabelle sind die RNA-Erreger mit der Referenzsequenz des Gens, in der das Amplikon platziert wurde, der Position und der Nukleotidlänge des Amplikons aufgelistet.

Tabelle 3.1 RPA-Amplikon-Entwürfe für RNA-Erreger (SUDV, EBOV, MARV, RVFV, SIGV) und für tmRNA (Ype, Ftu).

Erreger	**Referenz-sequenz der Genbank**	**Gen**	**Amplikon-position**	**Nukleotide**	**Vergleichs-sequenzen**
SUDV	AF173836.1	Nukleoprotein	1783-1868	130	AF173836, AY729654, NC_006432, EU338380
EBOV	AY142960.1	Nukleoprotein	1779-1943	164	Jo44337, L11365, AF086833, AY142960, AF499101, AF272001, EU22440, AY354458, Y09358, AY054908, AY058895, EU051640-50
MARV1	FJ750959.1	Nukleoprotein	1121-1256	135	Z12132, Z29337, NC_0016081, DQ217792, AY430365-66
MARV2	FJ750953.1	Nukleoprotein	1121-1260	139	X68495, M72714, DQ447649-61, AY358025, FJ750953-59
RVFV	EU574087.1	Nukleokapsid	1429-1536	107	AF134530-41, AF134543, AF134545-51, NC_002045, Y53771, D0380152-81, EU574057-87
SIGV	X06171.1	G-Protein	841-960	119	X00171

Ftu	CP000915	*ssrA*	4490-4743	254	CP000915, CP000803, CP000608, CP000439, CP000437, CP001633, AJ749949, BK006741, AM286280, AM233362
Ype	CP000308	*ssrA*	662342-662506	165	CP002956, CP001608, CP001593, CP001589, CP001585, CP000901, CP000668, CP000308, CP000305, AL590842, AE017042, AE009952

3.1.2 Herstellung molekularer Standards

Um die Sensitivitäten der RPA-Verfahren bestimmen zu können, wurden molekulare RNA-Standardreihen hergestellt. Zur Herstellung wurden die ligierten Inserts der vorliegenden pCR®-II-Plasmide mit M-13-Primern, die strangaufwärts und strangabwärts des ligierten Inserts der vorliegenden pCR®-II-Vektoren binden, per PCR amplifiziert. Zur Kontrolle der richtigen Länge wurde eine Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte durchgeführt und anschließend mit der T7- oder- SP6-Polymerase (je nach Orientierung der gewünschten RNA) transkribiert (s. Kaptiel 2.2.2.10.4). Anschließend wurde die RNA von Rest-DNA befreit, quantifiziert (s. Kapitel 2.2.2.5) und die Molekülzahl pro Mikroliter berechnet. Ausgehend von 10^8-Molekülen/µl wurden Verdünnungsreihen in 1:10-Verdünnungsschritten von 10^7-10^1 Molekülen/µl hergestellt.

3.1.3 Vergleich von TwistAmp™-fpg- und TwistAmp™-exo-Kit

In dieser Arbeit wurde das TwistAmp™-fpg-Kit mit dem TwistAmp™-exo-Kit verglichen, um zu evaluieren, mit welchem Reagenzienansatz sensitivere Ergebnisse erzielt werden können.

Die Reagenzienansätze enthalten unterschiedliche Nukleasen und die vorgesehenen Sonden weichen in der Länge und im Format voneinander ab.

Die Sonde für das TwistAmp™-exo-Kit ist ca. 46-52 Nukleotiden lang. Nach 30 Nukleotiden vom 5‘-Ende ausgehend ist ein Tetrahydrofuran (THF) platziert, das von einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher umrahmt ist. Schneidet die im Kit enthaltene Exonuklease III die hybridisierte Sonde am THF, dissoziiert der kleine Teil der Sonde vom Komplementärstrang, der Quencher wird vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt und ein Fluoreszenzsignal entsteht.

Die Sonde für das TwistAmp™-fpg-Kit ist etwa 35 Nukleotide lang. Am 5’-Ende hängt ein Quencher, 4-6 Nukleotide weiter ein Fluoreszenzfarbstoff. Bei dieser Sonde entsteht das Fluoreszenzsignal, wenn das im TwistAmp™-fpg-Kit enthaltene FPG-Protein den Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde abschneidet.

Da Erregerstämme eine hohe genomische Variabilität untereinander aufweisen können, kann es schwierig sein geeignete Bereiche zum Platzieren der Sonde zu finden. Da die fpg-Sonde 10-15 Nukleotide kürzer ist als die exo-Sonde, ist es leichter für diese Sonde einen konservierten Bereich im Zielgen zu finden.

Für das Zaire-Ebola-Virus, das Marburg- und das Sigma-Virus wurden fpg- und exo-Sonden für die gewählten Zielsequenzen entworfen (s. Tabelle 3.1) und mit den molekularen Standards in dem TwistAmp™-fpg-Kit und dem TwistAmp™-exo-Kit getestet. Die mittleren Sensitivitäten der gemessenen RNA-Moleküle wurden ermittelt (s. Tabelle 3.2) und die Ergebnisse in Graphen dargestellt (Abbildung 3.1).

Tabelle 3.2 Vergleich der fpg- und exo-Sonde. Sensitivitäten von RT-RPA-Nachweisen unter Verwendung des TwistAmp™-fpg- und TwistAmp-exo-Kits.

	fpg-Ansatz	**exo-Ansatz**
Erreger	**Sensitivität (RNA-Moleküle/µl)**	**Sensitivität (RNA-Moleküle/µl)**
EBOV	10^4	$10^1/10^2$
MARV	10^7	$10^1/10^2$
SIGV	10^4	$10^1/10^2$

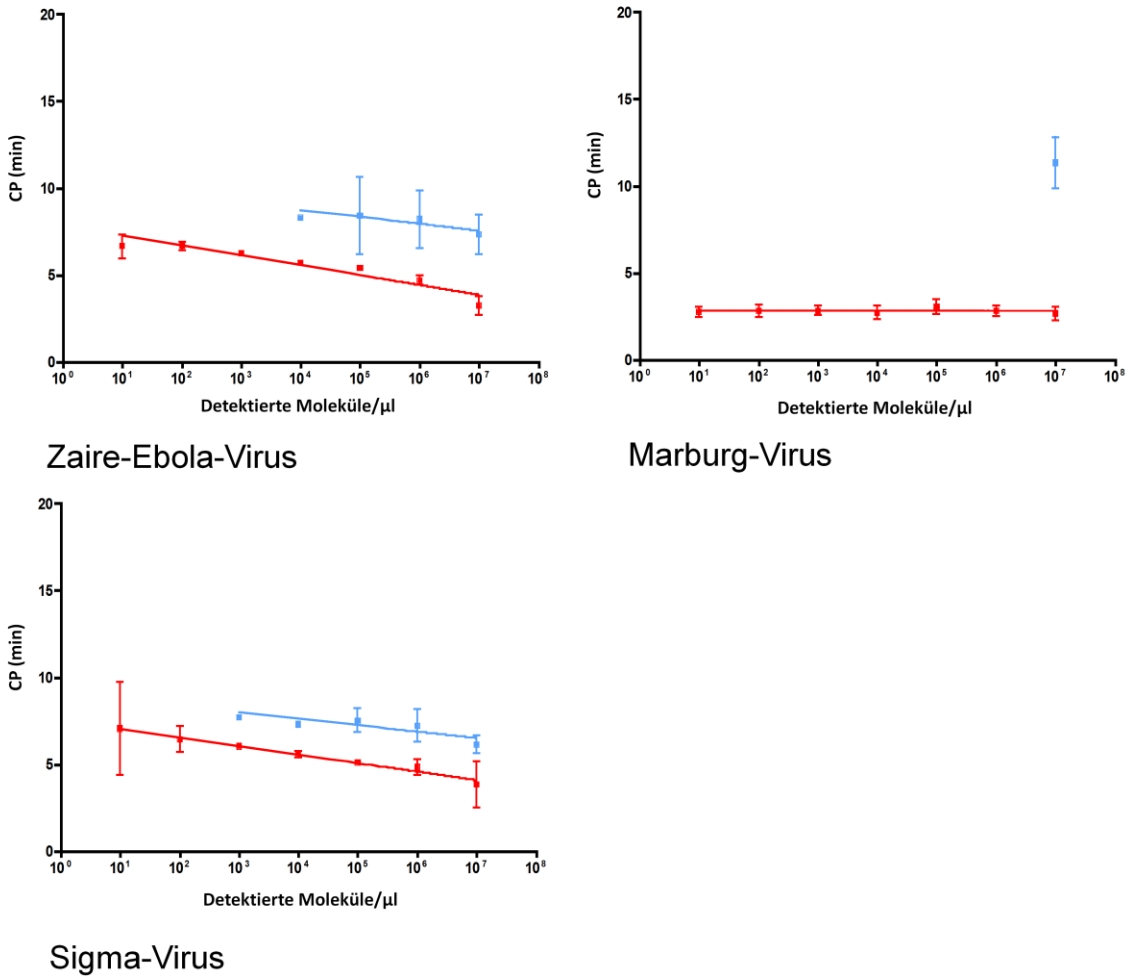


Abbildung 3.1 Vergleich der analytischen Sensitivitäten der RT-RPA-Ansätze (EBOV, MARV und SIGV) unter Verwendung von fpg (blau)- und exo (rot)-Sonden, getestet im jeweiligen Reagenzienansatz (TwistAmp™-fpg-Kit und TwistAmp™-exo-Kit).

Anhand der exo-RT-RPA-Entwürfe (EBOV, MARV und SIGV) konnten die Erreger mit einer analytischen Sensitivität von 10^1 Molekülen/µl nachgewiesen werden, die fpg-RT-RPA-Nachweise wiesen 10^4-10^7 Molekülen/µl nach. Die Ergebnisse bei Verwendung des exo-Kits lagen zudem schneller vor. Aufgrund der deutlich höheren analytischen Sensitivität und Geschwindigkeit wurden alle weiteren Entwürfe mit dem exo-Kit durchgeführt.

3.1.4 RT-RPA von *Francisella tularensis* und *Yersinia pestis*

Die tmRNA ist eine bakterielle RNA, die vom *ssrA*-Gen kodiert wird. Die tmRNA ist eine kombinierte tRNA und mRNA und beendet an den Ribosomen die Translation eines unvollständigen Proteins. Dies führt zum Abbau des Proteins und einer Reaktivierung des vorher blockierten Ribosomen. Die tmRNA liegt mit einer hohen Kopienzahl in der

Bakterienzelle vor (z.B. bei *E. coli* mit etwa 1000 Kopien) und ist sehr stabil. Die Sequenz des *ssrA* (engl: small stable RNA A)-Gens ist zudem stark konserviert, weshalb sich die tmRNA gut als Amplifikations-Zielsequenz eignet (Schönhuber et al. 2001).

Für *Francisella tularensis (Ftu)* und *Yersinia pestis (Ype)* lagen im Labor für Virologie Standardplasmide mit dem jeweiligen ligierten *ssrA*-Gen (in pCR®II-Vektoren) vor.

Im Labor war ein „Zwei-Schritt-Verfahren“ etabliert worden. Bei diesem wurde in einem ersten Schritt mit der Reversen Transkriptase aus RNA cDNA hergestellt (s. Kapitel 2.2.2.9.1) und im zweiten Schritt die cDNA in die RPA eingesetzt. In diesem Verfahren konnte die tmRNA erfolgreich nachgewiesen werden, allerdings deutete sich am Ende der Reaktion des *Ype*-Ansatzes ein leichter Anstieg der Negativ-Kontrolle an (s. Abbildung 3.2 dunkelgrün).

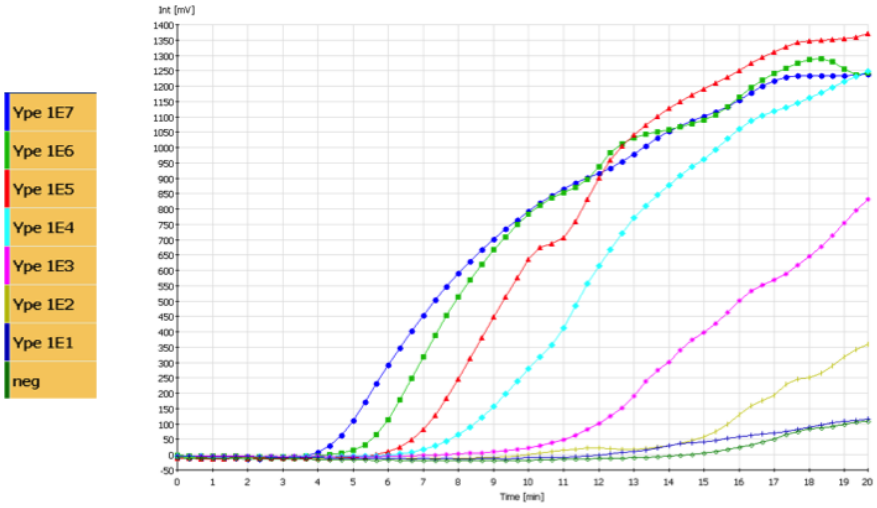


Abbildung 3.2 „Zwei-Schritt-RPA“ des Ype-tmRNA-Nachweises. Durchführung mit 10^7-10^1 RNA-Molekülen/µl und Negativkontrolle (Zuordnung s. Legende links). X-Achse: Zeit (min), Y-Achse: Fluoreszenz (mV).

Im Ein-Schritt-Verfahren wird die Reverse Transkriptase direkt in den Ansatz gegeben, weshalb sie auch als Reverse-Transkriptase-(RT)-RPA bezeichnet wird. Bei bereits im Labor durchgeführten Versuchen mit der „Ein-Schritt-RPA“ stellte sich die Transkriptor Reverse Transkriptase von Roche als beste Transkriptase für diese Reaktion heraus.

Bei Testung der tmRNA von *Ype* per RT-RPA waren die Ergebnisse der Negativ-Kontrolle bei allen Messungen positiv und zwar noch früher als bei der „Zwei-Schritt-RPA“ (s. Abbildung 3.3).

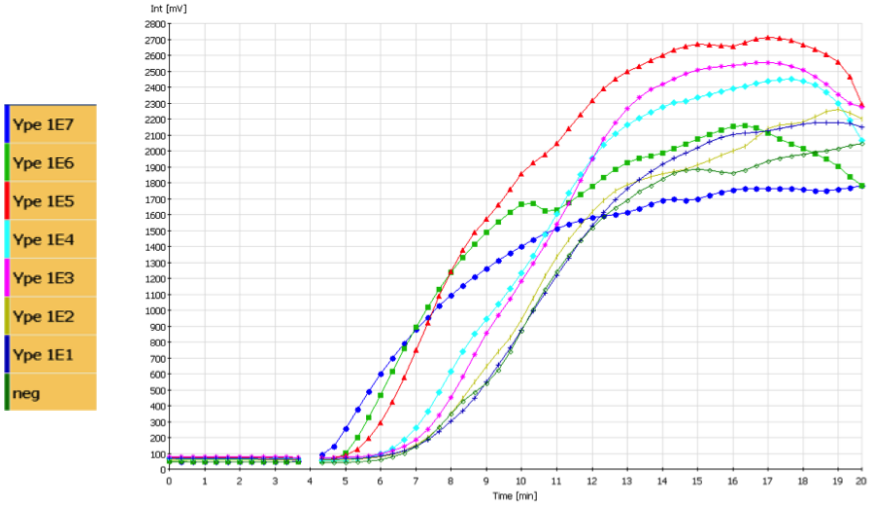


Abbildung 3.3 „Ein-Schritt-RPA“ des Ype-tmRNA-Nachweises. Durchführung mit 10^7-10^1 RNA-Molekülen/µl und Negativkontrolle (Zuordnung s. Legende links). X-Achse: Zeit (min), Y-Achse: Fluoreszenz (mV).

Für den RT-RPA-Nachweis von der tmRNA von *Ftu* gelang es nach dem Entwurf von vielfachen Primer-Kombinationen nicht, eine höhere Sensitivität als 10^3 Moleküle zu erreichen.

Da ein sensitiver Nachweis der tmRNA von *Ftu* und *Ype* mit der RT-RPA nicht möglich war, wurden DNA-RPA-Ansätze zum Nachweis der genomischen DNA entwickelt.

3.1.5 Analytische Sensitivität

Um zu überprüfen, wie sensitiv die RT-RPA-Nachweise sind, wurden jeweils acht Durchgänge mit den RNA-Standard-Verdünnungsreihen von 10^7-10^1 RNA-Molekülen/µl mit den RT-RPA-Ansätzen von SUDV, EBOV, MARV, RVFV und SIGV getestet. Bei diesen Versuchen wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten mittleren Sensitivitäten erreicht.

Zum Vergleich lagen 3-fach-Ergebnisse für Echtzeit-PCR-Nachweise der genannten RNA-Viren, die mit den RNA-Standardreihen erzielt wurden, vor. Die Echtzeit-PCR wurde zum Vergleich herangezogen, da sie das derzeit sensitivste Amplifikationsverfahren von Nukleinsäuren darstellt (s.Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Analytische Sensitivitäten der RT-RPA-Nachweise, im Vergleich RPA und Echtzeit-PCR.

Erreger	**Sensitivität RPA**	**Sensitivität Echtzeit-PCR**
SUDV (NP)	10^1-10^2	10^2
EBOV (NP)	10^1-10^2	10^1
MARV (NP)	10^1-10^2	10^1
RVFV (N)	10^1-10^2	10^1
SIGV (G)	10^1-10^2	10^1

Mit den RT-RPA-Entwürfen konnten die Erreger mit einer Sensitivität von 10^1-10^2 Molekülen/µl nachgewiesen werden, mittels Echtzeit-PCR lagen die Sensitiviäten bei allen Nachweisen bei 10^1Molekülen/µl, somit ist die RPA ähnlich sensitiv wie die Echtzeit-PCR.

Die Schwellenwerte bzw. Crossing-point(Cp)–Werte der nachgewiesenen RNA-Moleküle sind in den Graphen der Abbildung 3.4 und im Anhang tabellarisch aufgeführt.

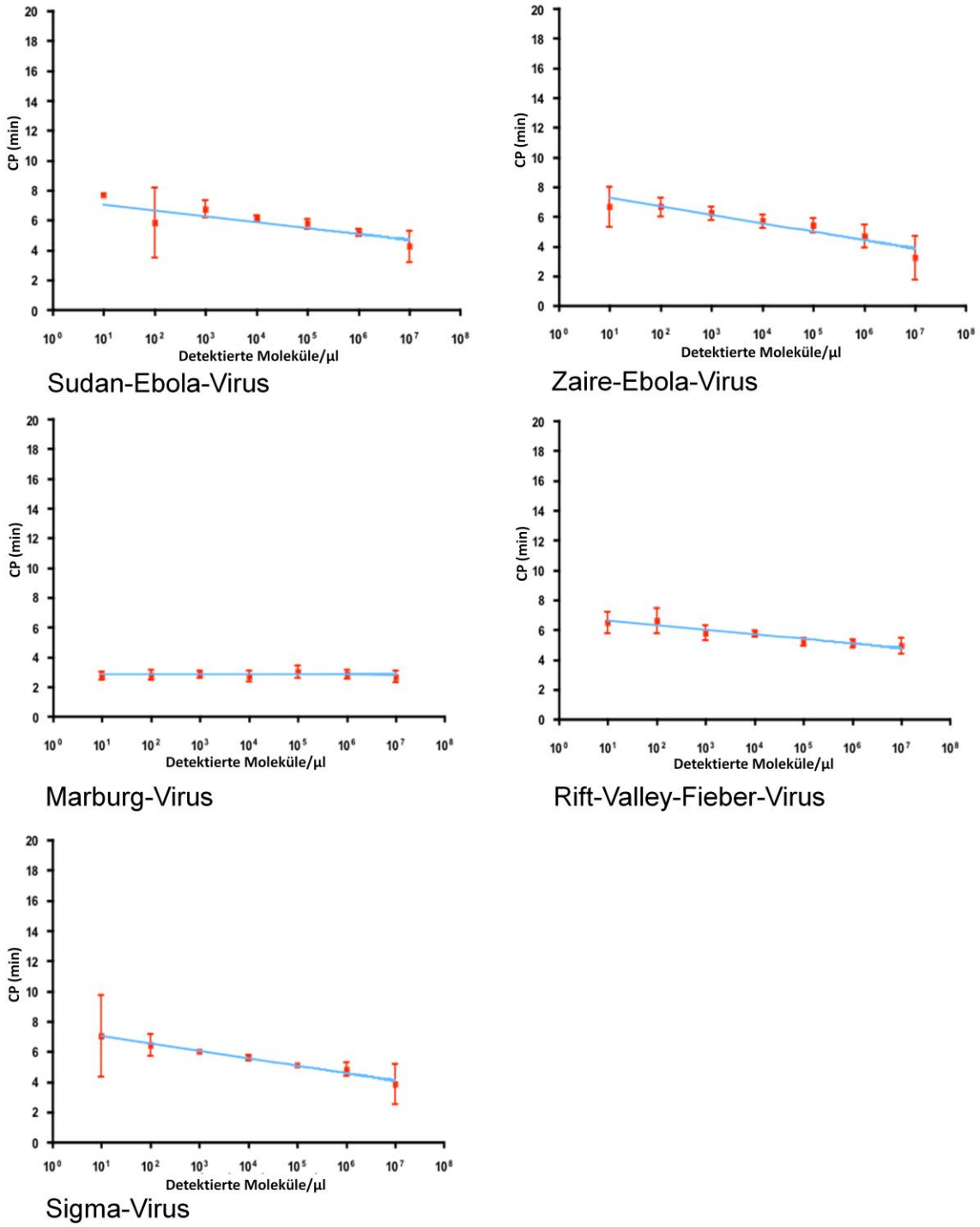


Abbildung 3.4 Sensitivität der RT-RPA-Verfahren SUDV, EBOV, MARV, RVFV und SIGV. Von je 8 Durchläufen ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Schwellenwerte (rot) und die Durchschnittsgerade (blau) dargestellt. X-Achse: Detektierte Moleküle/µl, Y-Achse: CP-Wert: Crossing-point (min).

Die Daten wurden per Probit-Analyse mit dem Programm Statistica ausgewertet. Es wurde ermittelt, dass die RT-RPA-Nachweise theoretisch in 95% der Testläufe 15-21 Moleküle nachweisen können (vgl. Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Auswertung der RT-RPA-Ergebnisse per Probit-Analyse.

Erreger	**Probit-Sensitivität (RNA-Moleküle)**
SUDV (NP)	21,07
EBOV (NP)	17,13
MARV (NP)	15,64
RVFV (N)	20,9
SIGV (G)	15,63

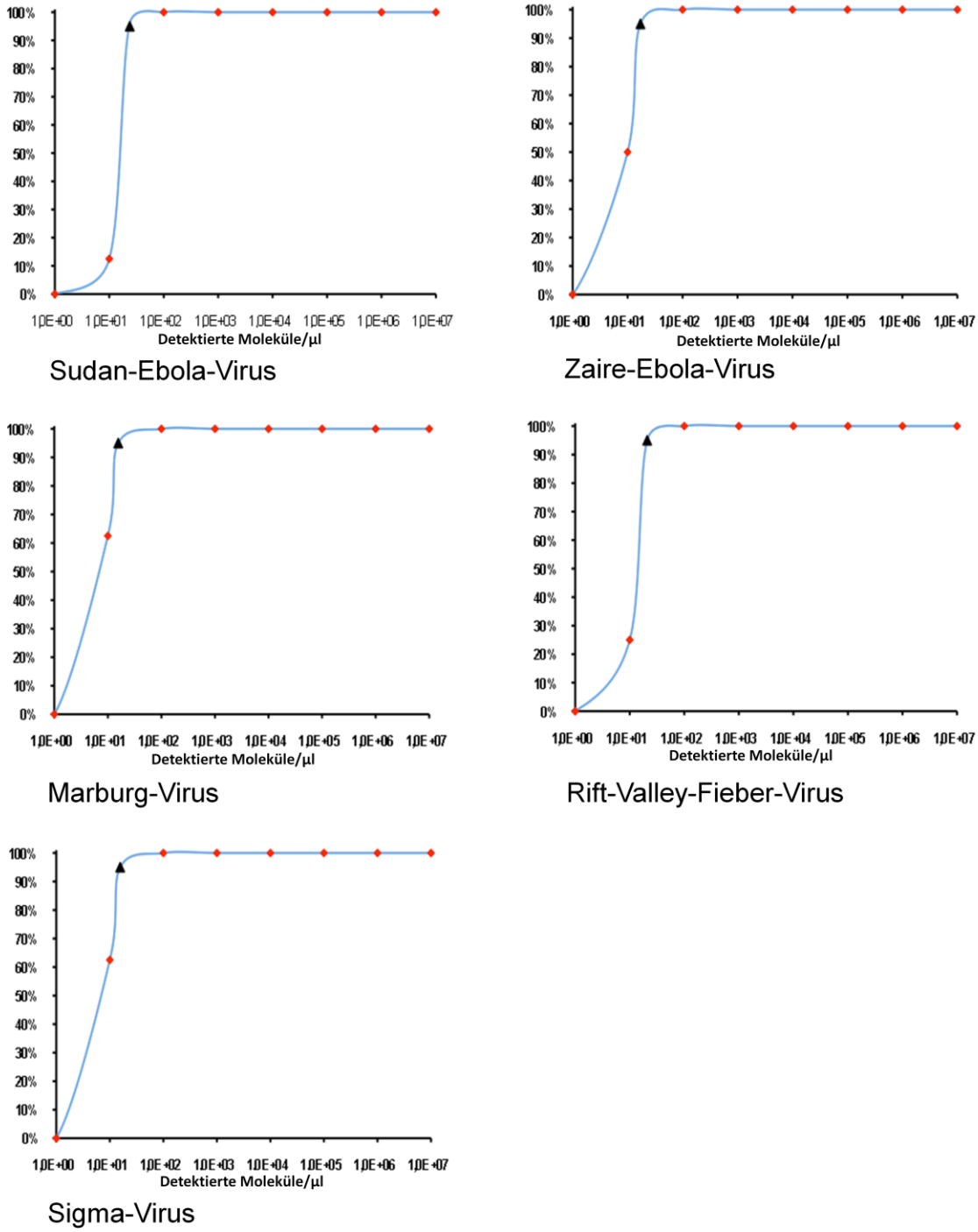


Abbildung 3.5 Probit-Analyse der Sensitivitäten der RT-RPA-Verfahren. Anhand der Ergebnisse der acht Test-Durchläufe (rot) wird die Molekülzahl berechnet, die der jeweilige RT-RPA-Ansatz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachweisen kann (Dreieck schwarz). X-Achse: Detektierte Moleküle/µl, Y-Achse: Nachweiswahrscheinlichkeit in Prozent.

Zur weiteren Sensitivitätsbestimmung der RT-RPA-RVFV-Nachweises, konnten Stammtestungen mit 18 RVFV-Stämmen durchgeführt werden. Die gesamten Stämme konnten mit der RT-RPA nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Stammtestungen mit Rift-Valley-Fieber-Virus-Stämmen in der RPA. Die genomische RNA wurde vom Institut Pasteur de Dakar zur Verfügung gestellt.

Rift-Valley-Fieber-Virus-Stamm	Ergebnis	Quelle	Land
73 HB 1230	+	Mensch	Zentralafrikanische Republik
Ar B 1986	+	Mosquito	Zentralafrikanische Republik
Ar Mg 811	+	Mosquito	Madagaskar
Ar Mg 992	+	Mosquito	Madagaskar
An Mg 990	+	Rind	Madagaskar
An K 6087	+	Fledermaus	Guinea
H D 48169	+	Mensch	Mauritius
H D 48188	+	Mensch	Mauritius
H D 47380	+	Mensch	Mauritius
H D 48263	+	Mensch	Mauritius
An D 133723	+	Tier	Mauritius
Ar D 141896	+	Mosquito	Mauritius
SH M 169867	+	Mensch	Mauritius
SH M 169868	+	Mensch	Mauritius
SH M 169885	+	Mensch	Mauritius
SH M 169898	+	Mensch	Mauritius
SH M 172776	+	Mensch	Mauritius
SH M 182805	+	Mensch	Mauritius

3.2 Rekombinase-Polymerase-Amplifikations-Verfahren zum Nachweis bakterieller und viraler DNA

3.2.1 Entwurf der DNA-RPA-Amplikons

Für *Bacillus anthracis (BA), Francisella tularensis* (*Ftu*)*, Yersinia pestis* (*Ype*), das Variola-Virus (VARV) und das Vaccinia-Virus (VAV) wurden DNA-RPA-Ansätze entwickelt. Der Vaccinia-Virus-Ansatz wurde zusätzlich entwickelt, da das Vaccinia-Virus, wie das Variola Virus zu den Orthopocken gehört und als vertretender RPA-Ansatz für Sensitivitäts- und Spezifitätstestungen dienen sollte, da für das Variola-Virus keine Stammtestungen durchgeführt werden können.

Anhand bereits veröffentlichter Echtzeit-PCR-Verfahren zum Nachweis von *BA* (Ellerbrok et al. 2002), *Ftu* (Emanuel et al. 2003), *Ype* (Matero et al. 2010) und VARV (Ibrahimy et al. 2003; Putkuri et al. 2009) wurden die Zielsequenzen für die DNA-RPA-Ansätze ausgewählt.

In der Nähe oder im direkten Sequenzabschnitt von diesen Echtzeit-PCR-Entwürfen wurden Zielbereiche ausgesucht, diese wurden mit dem Alignement-Programm

DNASTAR Lasergene™ MegAlign mit allen aktuell verfügbaren DNA-Sequenzen der Onlinedatenbank auf den Konservierungsgrad und ihre Eignung als RPA-Amplikon verglichen. In die ausgewählten Zielbereiche wurden die RPA-Primer und RPA-Sonden nach denselben Vorgaben wie in Kapitel 3.1.1 platziert.

Für *BA* wurden zwei RPA-Amplikons für die Virulenzplasmide (pX01 und pX02, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren) erstellt, da ein *Bacillus-anthracis*-Stamm erst als virulent gilt, wenn er beide Plasmide trägt (Kaspar und Robertson 1987).

Tabelle 3.6 RPA-Amplikon-Entwürfe für DNA-Erreger.

Erreger	**Referenz-sequenz der Genbank**	**Gen**	**Amplikon-position**	**Nukleotide**	**Vergleichssequenzen**
BA	CP001216.1	*pagA* (pX01)	144299-144424	125	AF306778-83, AE011190, NC_003980, AE017336, CP001216, NC_012579, CP001599, NC_012656
BA	AF188935.1	*capC* (pX02)	55735-55885	150	AF188935, AE01191, NC_003981, AE017335, NC_007323, CP001214, NC0125771, CP001597, NC_012655
Ftu	M32059.1	*tul4*	792-936	144	M32059, EF208970-77, EF208979
Ype	AF053945.1	*pla*	7267-7420	153	AF528089, AF053945, AL1009969, NC_003132, NC_004837, AE017046, NC_005816, CP001592, CP001596, NC_014027
VARV	X69168	ha	151606-151732	126	X69168, Y16780, DQ441416, DQ441418-48, DQ437500, DQ437581-91
VAV	DQ121394.1	ha	165441-165584	143	M35027, U94848, AY243312, AY313847-48, AY603355, NC_006998, DQ121394

Um das Variola-Virus von anderen Orthopocken differenzieren zu können, wurden als Vergleichssequenzen neben den VARV-Sequenzen die Sequenzen von Vaccinia-Virus, Kamelpocken, Kuhpocken und Affenpocken hinzugezogen. Der Entwurf wurde an einer Position platziert, an der sich die VARV-Sequenzen spezifisch von den anderen Orthopocken-Viren unterscheiden. Zusätzlich wurden die Primer so entworfen, dass sich Nukleotidvarianzen in den Sequenzen der Vergleichs-Orthopocken an der drittletzten Position vom 3'-Ende der spezifischen VARV-Primer befanden. Nach dem „amplification refractory mutation system“ (ARMS) -Prinzip ist die Hybridisierung an dieser Stelle

entscheidend für die Anbindung des 3'-Endes und somit für die Spezifität eines Primers (Newton et al. 1989). Dieses Prinzip wurde in der Echtzeit-PCR verwendet (Weidmann et al. 2003) und daher auch hier für die RPA eingesetzt.

```
Cowpox       .............A.G....TC...A.........G.........AGAAGAAGAAGAAGA.............A.............................---...G.....................A..G.
Camelpox     .............A.G....TC...A......C...G.........AGA-----------.............................................G.....................A..G.
Monkeypox    .............A.G....TC...A.........G.........AGA-----------.........A.......................................G.....................A..G.
Vaccinia     .............A.G....TC...A.........G.........AGA-----------.............................................G.....................A..G
Variola      GAGAATCCACAACAGTCAAGACGTCGGGACCAATTACTAATAAAGAAGA--------------TCATACAGTCACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGAAATTGTCACTACTAAATCAACCGCCAA
VARV RPA FP  GAGAATCCACAACMGACAAGACKTCSGGAC
VARV RPA P                                GGACCAATTACTAATAAAGAAAA              TCATACAGTCACAGACACTGTCTCATACA
VARV RPA RP                                                                                                                                TGAAATTGTCACTACTAAATCAACCGCCAA
```

Abbildung 3.6 RPA-VARV-Amplikon. Die Nukleotide, die der VARV-Sequenz entsprechen, sind als Punkte dargestellt. Primer-Sequenzen sind vollständig aufgeführt. Lücken sind als Bindestriche dargestellt. Der Vorwärtsprimer VARV RPA FP ist in seiner Originalsequenz angegeben, die Sonde VARV RPA P und der Rückwärtsprimer VARV RPA RP sind komplementäre Rückwärtssequenzen. Graue Felder: VARV RPA FP- Gemischte Basen (nach IUB-Code), VARV RPA P- TTT-Triplet, wo Tetrahydrofuran, Fluoreszenzfarbstoff und Quencher eingesetzt wurden, VARV RPA RP- Nukleotide an Position 3 des 3'-Endes unterscheiden sich von den anderen Orthopocken-Viren nach dem ARMS-Prinzip. Sequenzen: Kuhpocken (Cowpox) AY902252, Kamelpocken (Camelpox) AF438165, Affenpocken (Monkeypox) AF380138, Vaccinia-Virus M35027, Variola-Virus X69168.

Da für die Extraktionsversuche vollständige Organismen verwendet werden sollten und der Variola-Virus für diese nicht verwendet werden kann, wurde für das Vaccinia-Virus im ha-Gen ein Entwurf erstellt, um mit diesem, als Ersatz für den Variola-Virus, Sensitivitäts- und Spezifitätsversuche durchführen zu können.

3.2.2 Herstellung molekularer Standards

Für die Herstellung molekularer Standards wurden Bereiche der genomischen DNA von *Francisella tularensis (tul4)*, *Yersinia pestis (pla)* und *Bacillus anthracis (pagA)* mittels PCR (Primerliste s. Kapitel 2.2.2.10.3) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf ein Kontroll-Agarosegel aufgetragen und anschließend per TA-Klonierung in das pCR®II-Plasmid ligiert.

Die ligierten Plasmide wurden in *E.coli* transformiert, Flüssigkulturen angelegt und daraufhin eine Mini-Präpapation durchgeführt. Die Plasmide wurden per Kontrollverdau verifiziert und eine Auswahl sequenziert. Mit dem Sequenzprogramm DNASTAR Lasergene™ SeqMan wurde mit Hilfe der Vergleichssequenz die sequenzierte DNA analysiert (Beispiel Abbildung 3.7). Die übrigen Sequenzkontrollen sind im Anhang aufgeführt.

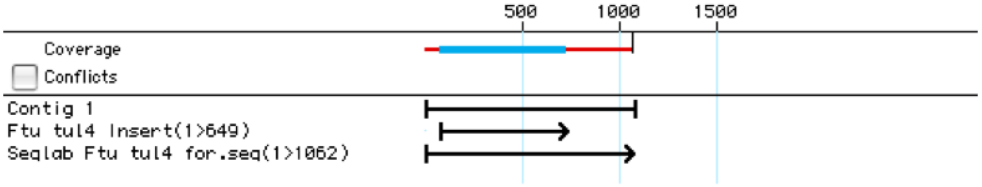


Abbildung 3.7 Graphische Darstellung einer Sequenzkontrolle mit Lasergene™ SeqMan nach Sequenzierung eines Klons von Francisella tularensis bei Seqlab

Ein Klon mit korrekter Sequenz wurde mit der Midi-Präparation aufgereinigt, spektrophotometrisch gemessen, erneut kontrollverdaut und anschließend linearisiert.

Für *Bacillus anthracis* (*capC)* wurde von Hermann Meyer vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr ein Plasmid zur Verfügung gestellt, das ein 262 Basenpaare langes Insert mit dem Bereich für das entworfene RPA-Amplikon enthielt (s. Tabelle 2.8**)**

Das ha-Gen (Sequenz der Genbank DQ437590.1, Position 151688-152629) des Variola-Virus wurde von Geneart synthetisiert und in einem pMA-RQ-Plasmid ligiert geliefert. Es wurde nach Transformation und Anlegen einer Flüssigkultur durch Midipräparation aufgereinigt, spektophotometrisch gemessen, kontrollverdaut und linearisiert.

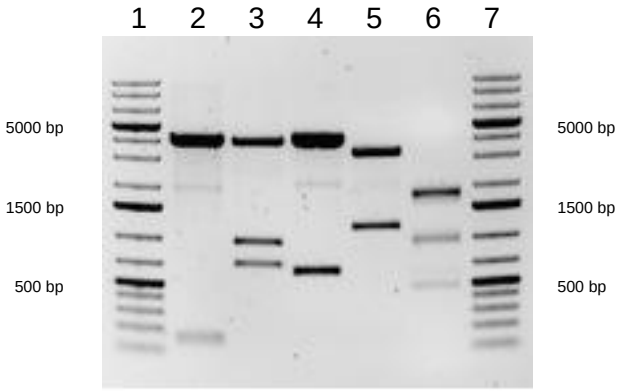


Abbildung 3.8 Kontrollgel von links nach rechts aufgetragen: Spur 1,7: O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus. Spur 2: Bacillus anthracis capC, kontrollverdaut mit EcoRI, erwartete Banden bei 3913 bp, 171 bp, 138 bp. Spur 3: Bacillus anthracis pagA, kontrollverdaut mit EcoRI, erwartete Banden bei 3913 bp, 1007 bp, 740 bp. Spur 4: Francisella tularensis tul4, kontrollverdaut mit EcoRI, erwartete Banden bei 3955bp, 655bp. Spur 5: Yersinia pestis pla, kontrollverdaut mit BglII, erwartete Banden bei 3207 bp und 1305 bp. Spur 6: Variola Virus ha, kontrollverdaut mit EcoRV und PvuI, erwartete Banden bei 1800 bp, 991 bp, 505bp.

Im Kontrollverdau wurden die Plasmide, je nach Vektoren, an spezifischen Erkennungssequenzen durch unterschiedliche Nukleasen geschnitten und anschließend mit dem Zymoresearch™ DNA Clean & Concentrator-5-Kit aufgereinigt und auf ein

präparatives Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde die entsprechende Bande mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit aus dem Gel gelöst.

Das linearisierte Plasmid wurde dann mit dem Quant-iT™ PicoGreen® RNA Assay Kit quantifiziert und nach Molekülzahlberechnung mit TE-Puffer auf 10^8 Moleküle/µl verdünnt. Es wurden aliquotierte 10^8 -Standards bei -80°C eingefroren und vor Gebrauch Verdünnungsreihen mit 1:10-Verdünnungen von 10^7-10^1 hergestellt.

3.2.3 Analytische Sensitivität

Die DNA-RPA-Nachweise für *Ftu*, *Ype*, *BA* (c*apC* und p*agA*) und VARV wurden jeweils mit Standard-Verdünnungen von 10^7-10^1 DNA-Molekülen/µl in der RPA getestet. Um zu zeigen, wie sensitiv die RPA-Nachweise sind, wurden acht Durchgänge der RPA mit drei Durchgängen der Echtzeit-PCR verglichen.

Die Echtzeit-PCR-Testungen für *BA* und VARV wurden in drei Durchgängen ermittelt. Für *Ftu* und *Ype* wurden die Echtzeit-PCR-Ergebnisse Publikationen entnommen (Emanuel et al. 2003; Matero et al. 2010).

Tabelle 3.7 Analytische Sensitivität der DNA-Nachweise mit Echtzeit-PCR und RPA. Die Umrechnung von Genomäquivalent (fg) in Moleküle/µl erfolgte nach der Rechnung GE (fg)= Basenpaare pro Genom × 618 g mol-1 × 10^{15}/6.023 ×1023 mol-1 (Avogadrokonstante)(Tomaso et al. 2010)).

Erreger	Sensitivität Echtzeit-PCR	Sensitivität RPA
BA (capC)	10^2-10^3	10^1-10^3
BA (pagA)	$10^{1-}10^2$	10^1-10^2
Ftu (tul4)	10^2 (200fg)*[1]	10^1-10^2
Ype (pla)	2 (10fg)*[2]	10^1-10^2
VARV (ha)	10^1-10^2	$10^{1-}10^2$

[1](Emanuel et al. 2003)[2](Matero et al. 2010).*

Es zeigte sich, dass die Sensitivitäten der RPA mit denen der Echtzeit-PCR vergleichbar sind. In folgender Abbildung sind die Werte in Graphen dargestellt.

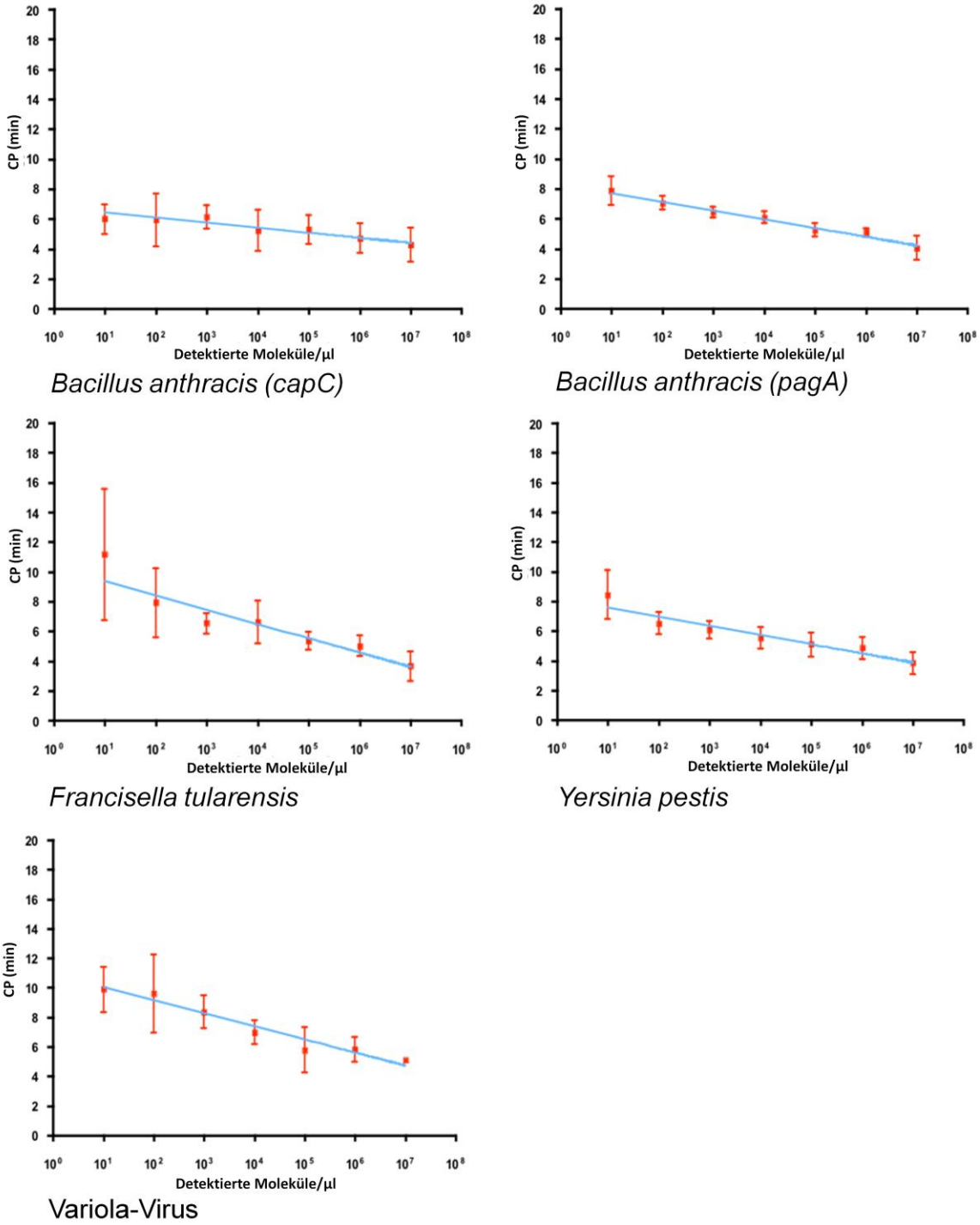
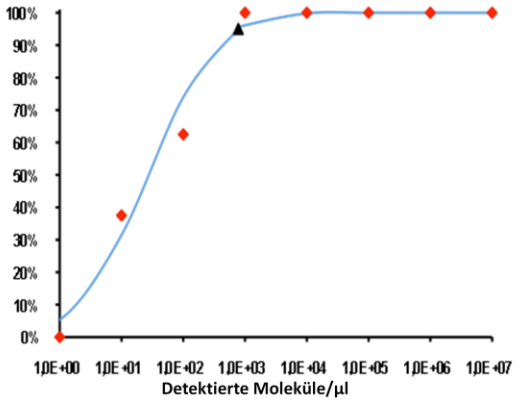


Abbildung 3.9 Sensitivität der DNA-RPA-Verfahren BA, Ftu, Ype und VARV. Von je 8 Durchläufen ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Schwellenwerte (rot) und die Durchschnittsgerade (blau) dargestellt. X-Achse: Detektierte Moleküle/µl, Y-Achse: CP-Wert: Crossing-point (min).

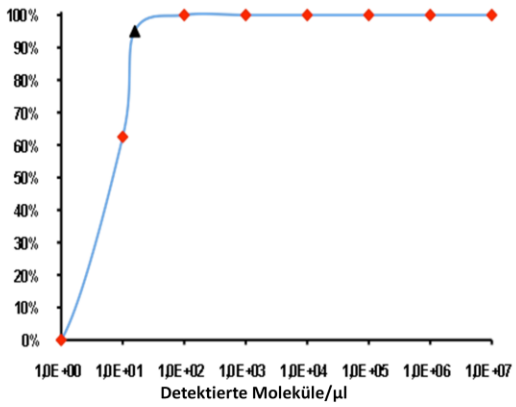
Die Ergebnisse wurden per Probit-Analyse mit Statistica ausgewertet. Es zeigte sich dass der DNA-RPA-Nachweis für BA (capC) in 95% der Testläufe theoretisch 778 Moleküle nachweist und die anderen DNA-RPA-Nachweise 15-19 DNA-Moleküle detektieren.

Tabelle 3.8 Auswertung der DNA-RPA-Ergebnisse per Probit-Analyse.

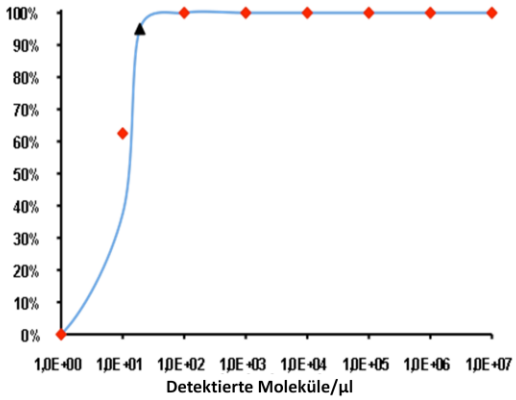
Erreger	**Probit-Sensitivität (DNA-Moleküle)**
BA (capC)	778,2
BA (pagA)	15,74
Ftu (tul4)	19,01
Ype (pla)	15,72
VARV (ha)	15,64



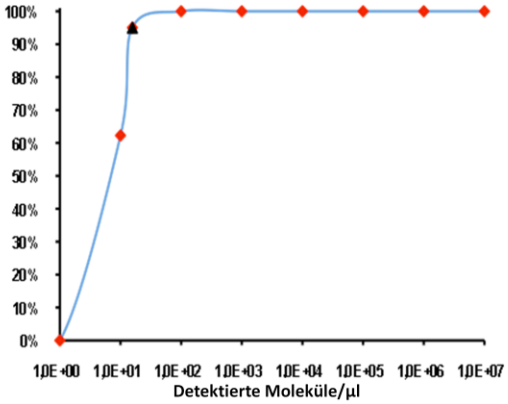
Bacillus anthracis (capC)



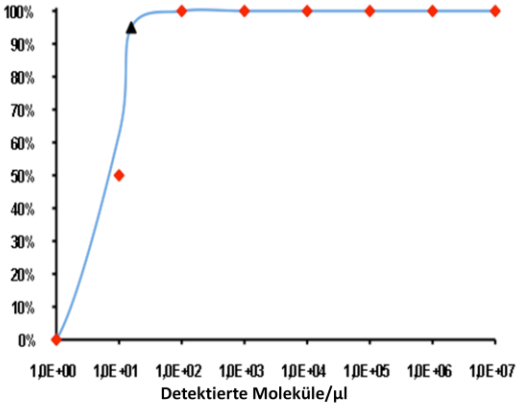
Bacillus anthracis (pagA)



Francisella tularensis



Yersinia pestis



Variola-Virus

Abbildung 3.10 Probit-Analyse der Sensitivitäten der DNA-RPA-Verfahren. Anhand der Ergebnisse der acht Test-Durchläufe (rot) wird die Molekülzahl berechnet, die der jeweilige RPA-Ansatz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachweisen kann (Dreieck schwarz). X-Achse: Detektierte Moleküle/µl, Y-Achse: Nachweiswahrscheinlichkeit in Prozent.

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des *Ftu*-RPA-Nachweises von wurden 9 *Francisella*-Stämme mit der RPA getestet. 8 Stämme konnten nachgewiesen werden, *Francisella philomiragia*, wurde nicht detektiert (s. Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 Stammtestung mit Francisella-tularensis-Stämmen. Die Stämme wurden zur Verfügung gestellt vom Friedrich-Loeffler-Institut, Jena.

***Francisella-tularensis*-Stamm**	**Ergebnis**
B 38: *F. tularensis subs. tularensis*	+
LVS: *F. tularensis subs holarctica*	+
FT 10: *F. tularensis subs holarctica:*	+
FT 7: *F. tularensis subs holarctica*	+
FX 1:*F. novicida*	+
FX 2: *F. novicida*	+
U 112:*F. novicida*	+
FHSP:*F. hispaniensis*	+
CCUG4492: *F. philomiragia*	-

Es wurden 9 mit *Ftu* infizierte und zwei nicht infizierte Hasengewebeproben in die RPA und zum Vergleich in die Echtzeit-PCR eingesetzt. Mittels Echtzeit-PCR-Ansatz wurden 6 der *Ftu*-Proben detektiert, der DNA-RPA-Ansatz konnte 4 dieser 6 Proben nachweisen. Es wurde zusätzlich eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt, die zeigte, dass die DNA-Konzentrationen in den Proben in Bereichen von 2,32-6.77 ng/l lagen.

Tabelle 3.10 Mit Francisella tularensis infiziertes Hasengewebe. Zur Verfügung gestellt vom Friedrich-Loeffler-Institut, Jena. Getestet mit der Echtzeit-PCR und der RPA. PCR-Ergebnisse sind Ct-Werte (min), RPA-Ergebnisse sind Schwellenwerte (min). Negativ (neg), nicht infiziert (NI).

Probennummer	**Gewebe**	**Echtzeit-PCR *tul4***	**RPA *tul4***
10TO174 B2	Knochenmark	29.07	7,7
10TO183 B10	Zunge	29.70	9,3
10TO179 B7	Milz	32.66	10,0
10TO173 B1	Leber	34.77	11,7
10TO176 B4	Lymphknoten	37.25	neg
10TO180 B8	Niere	40.31	neg
10TO178 B6	Muskel	neg	neg
10TO175 B3	Lunge	neg	neg
10TO182 A2	Gehirn	neg	neg
11T0351 (NI)	Milz	neg	neg
11T0350 (NI)	Leber	neg	neg

3.3 Analytische Spezifitätstestungen

3.3.1 Kreuztestungen

Um die analytische Spezifität der RPA-Nachweisverfahren zu bestimmen, wurden Kreuztestungen durchgeführt.

Die RNA oder DNA der beschriebenen Standardreihen aus dieser Arbeit wurden mit einer Konzentration von 10^7 Molekülen in den allen Ansätzen getestet. In die RT-RPA-Ansätze wurde jeweils die synthetisierte Standard-RNA und -DNA der übrigen Erreger gegeben. In die DNA-RPA-Ansätze wurden die DNA-Standardreihen und die pCR®II-Plasmide der RNA-Zielsequenzen gegeben. Die pCR®II-Plasmide wurden verwendet, da sie als Doppelstrang vorliegen und der Nachweis der RNA-Standardreihen im DNA-RPA-Ansatz nicht möglich wäre.

Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden (s. Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 Durchgeführte Kreuztestungen der RNA/DNA-Nachweise mit den gesamten Standardreihen dieser Arbeit. In die DNA-Ansätze wurde zur Kreuztestung der RNA-Erreger aufgrund der Vorlage als Doppelstrang anstatt der RNA-Standards die pCR®II-Plasmide gegeben.

	SUDV	**EBOV**	**MARV**	**SIGV**	**RVFV**
BA (capC)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
BA (pagA)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ftu	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ype	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
VARV	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Zusätzlich wurden die RPA-Verfahren mit humangenomischer DNA getestet, es kam zu keiner Kreuzreaktion mit humangenomischer DNA.

Um eine mögliche Inhibition der RPA durch humangenomische Hintergrund-DNA zu testen, wurde in einen RT-RPA-Ansatz (EBOV) und in einen DNA-RPA-Ansatz (BA *pagA)* neben der Standard-RNA/-DNA humangenomische DNA hinzugegeben.

Für diesen Test wurde zunächst die DNA-Konzentration in Nukleinsäureextrakten von 10 Negativ-Seren spektroskopisch bestimmt. Es waren im Mittelwert ca. 70 ng/µl Hintergrund-DNA enthalten, woraufhin jeweils 70 ng humangenomische DNA in die RPA zur Kreuzreaktion eingesetzt wurden.

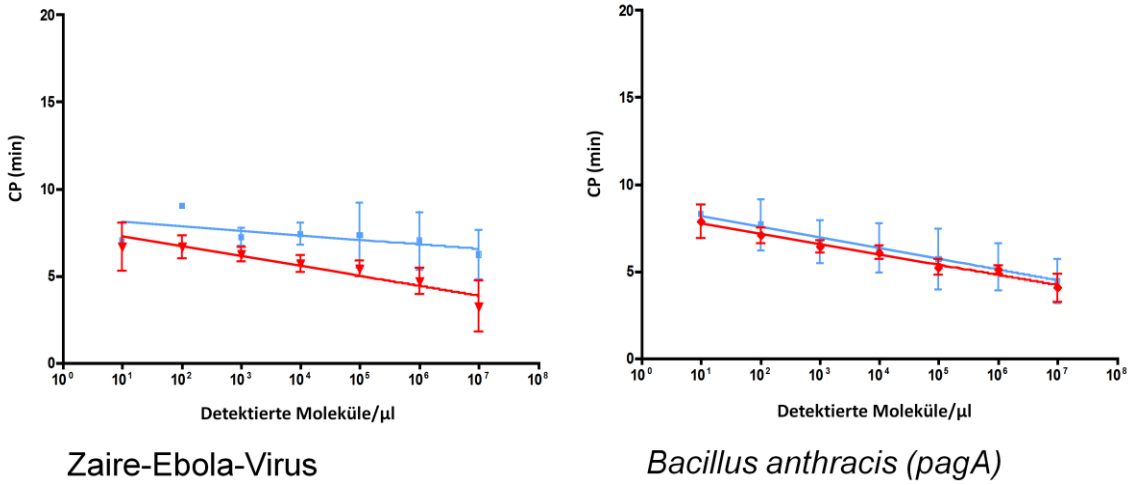


Abbildung 3.11 Einfluss von humangenomischer DNA der RPA-Nachweise von EBOV und BA (pagA). In rot sind je 8 Durchgänge der Standard-Verdünnungsreihe 10^7-10^1 RNA-/DNA-Moleküle/µl, in blau sind je 3 Durchgänge mit zusätzlich 70 ng/µl humangenomischer DNA aufgeführt. X-Achse: Detektierte Moleküle/µl, Y-Achse CP-Wert: Crossing-point (min).

Die analytische Sensitivität der RPA-Nachweisverfahren wurde von der humangenomischen Hintergrund-DNA kaum beeinflusst.

3.3.2 Spezifitätstest des Variola-Virus-Ansatzes mit anderen Orthopocken

Um zu überprüfen wie spezifisch der VARV-RPA-Entwurf ist, wurde die DNA von einigen Orthopockenstämmen in diesem getestet (zur Verfügung gestellt von Hermann Meyer, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr).

Tabelle 3.12 Spezifitätstestung des RPA-Ansatzes für Variola-Virus.

Erreger	Variola-Virus-RPA-Ansatz
Variola-Virus (mol. Standard)	+
Vaccinia-Virus (Elstree 5)	-
Kamelpocken (CP19)	-
Affenpocken (MP4)	-
Orthopocken (OPV 90/3)	-

Mit dem VARV-RPA-Nachweis wurde nur der Variola-Virus-Standard spezifisch detektiert, die DNA der anderen Orthopocken-Stämme wurde nicht nachgewiesen.

3.4 Extraktionstestungen

Es wurde getestet, wie sensitiv die RNA oder DNA aus Blutplasma, das mit vollständigen, durch Gammastrahlung inaktivierten Erregern titriert wurde, mit der RPA nachgewiesen werden kann.

RVFV und SIGV wurden als Vertreter der Negativ-Strang-RNA-Viren, *BA* als Vertreter der gram-positiven Bakterien, *Ype* für die gram-negativen Bakterien und VAV als Vertreter für VARV für diese Versuche ausgewählt.

Das mit den genannten Erregern (10^7-10 Erreger/ml) titrierte Blutplasma wurde mit dem innuPREP MP Basic Kit (Analytik Jena AG) von der Arbeitsgruppe Prof. M. Niedrig des Robert Koch Instituts aufgereinigt, gegebenenfalls mit PBS (engl: Phosphate buffered saline, dt: Phosphat-gepufferte Salzlösung) verdünnt und dort mit der Echtzeit-PCR in je zwei Durchgängen gemessen. Bei diesen Versuchen wurden 4 µl der aufgereinigten RNA/DNA eingesetzt. In der Messung wurde berechnet, wieviele Moleküle/µl sich in der Probe befinden.

Die aufgereinigten Proben wurden mit je drei Durchgängen, zum direkten Vergleich ebenfalls mit 4 µl, in der RPA getestet. Die Mittelwerte der detektierten Konzentrationen von der extrahierten RNA und DNA der Echtzeit-PCR und der RPA sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tabelle 3.13 Extraktionstestungen Echtzeit-PCR im Vergleich zur RPA

Erreger	**Sensitivität Echtzeit-PCR (Moleküle/µl)**	**Sensitivität RPA (Moleküle/µl)**
(RNA-Extraktionen)		
RVFV (Negativ-Strang-RNA-Virus)*	100	100
SIGV (Negativ-Strang-RNA-Virus)	1	10
(DNA-Extraktionen)		
BA (pagA) (gram-positiv)*	10	10
Ype (gram-negativ)*	10	10
VAV (DNA-Virus)	10	10

** Proben wurden mit PBS verdünnt.*

Die RPA-Ansätze waren genauso sensitiv, wie die der Echtzeit-PCR, nur die Versuche der Positivkontrolle (Sigma-Virus) waren mit der RPA etwas weniger sensitiv.

4 Diskussion

Verschiedene Faktoren haben in den letzten Jahrzehnten weltweit die Ausbreitungsmöglichkeiten für Infektionserreger maßgeblich verändert. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem die Globalisierung, die zunehmende Vernetzung von Ländern über den Flug- und Schiffsverkehr und die damit verbundene hohe Mobilität von Menschen, Tieren und Gütern. Auch Migrationsbewegungen, politische Krisen und das Bevölkerungswachstum (Weltbevölkerung: aktuell ca. 7 Milliarden Menschen, mit einem derzeitigen Wachstum von ca. 80 Millionen pro Jahr) sind zentrale Faktoren für die Ausbreitung von emergenten Infektionserkrankungen. Die Entwicklung von Megastädten (Megastadt: mind. 10 Mio. Einwohner, Anstieg von 2 auf 21 Megastädte von 1950 bis 2011) (Dickmann et al. 2007; United Nations 2011) ist ebenso ein begünstigender Faktor, wie der Klimawandel und die aktuellen ökologischen Veränderungen auf der Erde. Alle diese Faktoren schaffen veränderte Lebensbedingungen für Vektoren (z.B. Zecken, Mücken und Nager) und bereiten so den Boden für die Zunahme von Infektionserkrankungen bei Mensch und Tier. Neben den vektorübertragenen Infektionskrankheiten führt auch die exzessive Verwendung von Antibiotika zur Ausbildung von (Multi-)Resistenzen durch Mutations-, Selektions- und Adaptierungsprozesse der Erreger, die somit auch Auswirkungen auf die globale Gesundheit haben.

Das häufigere Auftreten von emergenten Infektionserkrankungen hat eine hohe Bedeutung für die globale Gesundheit, wie an der aktuellen Ebola-Epidemie mit einer Sterblichkeit von 50% in West-Afrika deutlich wird (ECDC, URL:http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispForm.aspx?List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&ID=1100, Stand: 01.12.2014). Auch andere Zoonose-Erreger, die endemisch in verschiedenen Ländern vorkommen, können zu Epidemien führen (z.B: das Marburg- und das Rift-Valley-Fieber-Virus, *Francisella tularensis, Yersinia pestis* und *Bacillus anthracis*). Aufgrund einer hohen Übertragungsrate und einer hohen Pathogenität können sich diese Zoonose-Erreger sogar zum Missbrauch als biologische Agenzien eignen. Die Centers of Disease and Control (CDC) teilen die biologischen Agenzien in drei Kategorien ein. Zu Kategorie A zählen Erreger, die durch ihre Ansteckungsgefahr, der Sterblichkeit der jeweiligen ausgelösten Erkrankung und der potentiell auslösbaren sozialen Unruhen mit dem höchsten Gefahrenpotential verbunden werden (CDC, URL: http://www.emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp, Stand:

01.12.2014). Darüber hinaus handelt es sich um Erreger, an denen bereits in staatlichen B-Waffenentwicklungsprogrammen geforscht wurde (Heden 1967; Christopher et al. 1997; Fraser und Dando 2001; Hawley und Eitzen 2001; Martin et al. 2008).

Aufgrund der zunehmenden Ausbreitungstendenzen für hochpathogene Erreger und der Befürchtung, dass einige als biologische Waffen eingesetzt werden könnten, wird es als wichtig erachtet die Diagnostik für diese Erreger zu verbessern. Besonders um in Notfallsituationen, beispielsweise einer Epidemie, rechtzeitig handeln zu können. Durch eine schnelle Erregerdiagnostik kann eine frühzeitige Therapie eingeleitet und durch Eindämmungsmaßnahmen, wie Isolierung, Ringimpfung und verstärkte Hygienemaßnahmen, eine Ausbreitung der Erkrankung vermindert werden (Greenwood et al. 2009).

Zur bisherigen Routinediagnostik von B-Agenzien zählt die Echtzeit-PCR, die Serologie, die Mikroskopie, die Kultur von Erregern und Tierversuche (Lim et al. 2005). Die Kulturanzucht ist eine sehr spezifische und sensitive Methode. Nachteile sind das erhöhte Risiko der Erregerverbreitung durch Inkubationsschritte, zudem dauert die Kulturanzucht länger als molekulare Nachweismethoden. Die molekulare Diagnostik nimmt unter den diagnostischen Maßnahmen, durch eine hohe analytische Sensitivität und Spezifität einen bedeutenden Stellenwert ein. Der Nachteil aller molekularen Nachweismethoden ist, dass genetische Veränderungen möglicherweise Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität dieser Methoden haben (Yang und Rothman 2004).

Als molekulare diagnostische Methoden bestehen bereits neben der weit etablierten Echtzeit-PCR mehrere isothermale Amplifikationsmethoden. Zu diesen zählen unter anderem die Transcription-mediated-amplification (TMA), die Nucleic-Acid-Sequence-based-Amplification (NASBA), die Strand-Displacement-Amplification (SDA), die Loop-mediated-isothermal-amplification (LAMP), die Signal-mediated-Amplification-of-RNA-Technology (SMART), die Circular-Helicase-dependant-Amplification (cHDA), die Rolling-Circle-Amplification (RCA), die Helicase-dependant-Amplification (HDA) und die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) (Gill und Ghaemi 2008). Da bei diesen Methoden keine Zyklen mit verschiedenen Temperaturen notwendig sind, wird der Aufbau der Detektionsgeräte unkomplizierter. Somit eignen sich diese Methoden eher für tragbare Detektionsgeräte als die Echtzeit-PCR (Asiello und Baeumner 2011).

Für die Diagnostik von hochpathogenen Erregern wurden bereits LAMP-Entwürfe für das Ebola-Virus, das Marburg-Virus, das Rift-Valley-Fieber-Virus und für *Bacillus anthracis* erstellt (Kurosaki et al. 2007; Peyrefitte et al. 2008; Kurosaki et al. 2009; Le Roux et al.

2009). Für *Bacillus anthracis* wurden zudem HDA-Entwürfe (Tong et al. 2008) und für *Yersinia pestis* RCA-Ansätze entwickelt (Schopf et al. 2008).

Unter den isothermalen Amplifikationsmethoden hat die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) einige vorteilhafte Eigenschaften. Zu diesen zählt beispielsweise (I) die Verwendung von spezifischen Primern und einer spezifischen fluoreszierenden Sonde, deren Signal nur bei Bildung eines Doppelstranges freigegeben und somit die spezifische Amplifikation durch das fluoreszierende Signal bestätigt wird. (II) Im Gegensatz zu anderen der genannten isothermalen Amplifikationsmethoden werden nur drei konservierte Regionen in einem Zielsequenzabschnitt zum Entwurf der Oligonukleotide benötigt. Im Vergleich müssen bei der LAMP 4 verschieden Primer entworfen werden die an 6 Stellen hybridisieren (Mori und Notomi 2009). (III) Die Reaktionsansätze für die RPA sind als getrocknetes Pellet verfügbar (TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand: 01.12.2014), wodurch die Lagerung und die Möglichkeit der Reagenzvorlagerung in Schnelltestplattformen erleichtert wird.
(IV) Der als RPA-Detektionsgerät zur Verfügung stehende ESEQuant Tubescanner von Qiagen ist mit einer Größe von 7,4cm x 17,8cm x 18,8cm sehr klein und wiegt mit Laptop ca. 1kg. Er ist mit einem Kostenaufwand für die Anschaffung von 4000 Euro im Gegensatz zu anderen Detektionsgeräten günstig (Qiagen, URL: http://www.qiagen.com/Products/ESEQuantTubeScanner.aspx?r=603, Stand: 01.12.2014). Im Vergleich zu mobilen Detektionsgeräten, wie dem R.A.P.I.D.® BioDetection System für die Echtzeit-PCR (Maße 26,6cm x 36,3 cm x 49,2cm, Gewicht: 23kg) und dem LAMP-Detektionsgerät SAS™Loopamp® Realtime Turbidimeter (24,5cm x 28,2 cm x 18.8cm und 6,5kg) ist der Tubescanner kleiner, leichter und kostengünstiger und daher mobil einsetzbar (Biofire Diagnostics, URL: http://www.biofiredx.com/RAPID/index.html, Stand: 01.12.2014; SA Scientific™, URL: http://www.uib.no/med/avd/ii/nyhetsbrev/2010/15/Turbidimeter.pdf, Stand: 01.12.2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RPA aufgrund der o.g. Eigenschaften als isothermale molekulare Amplifikationsmethode für die Entwicklung von Nachweisverfahren für Sudan-Ebola-Virus (SUDV), Zaire-Ebola-Virus (EBOV), Marburg-Virus (MARV), Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV), Variola-Virus (VARV), *Francisella tularensis (Ftu), Yersinia pestis (Ype) und Bacillus anthracis (BA)* ausgewählt.

4.1 RNA-RT-RPA

4.1.1 Vom Zwei-Schritt- zum Ein-Schritt-Verfahren

Da die Rekombinase-Primer-Komplexe und die *Bac*/*Sau*-Polymerase, die in der RPA verwendet werden, nur an DNA binden, kann RNA nicht direkt mit der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation amplifiziert werden. Daher muss RNA mit der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Dies ist in zwei Schritten möglich, im ersten Schritt wird die cDNA transkribiert und diese im zweiten Schritt in die RPA-Reaktion gegeben. Die Reverse Transkriptase kann auch in einem „Ein-Schritt-Verfahren“ direkt zur RPA-Reaktion hinzugegeben werden.

Bei der Durchführung der Versuche mit RNA stand noch kein Reagenzienansatz von TwistDx zur Verfügung, der die Reverse Transkriptase enthielt. Mittlerweile ist der TwistAmp™-exo-RT-Reagenzienansatz erhältlich.

Die RPA für die Erreger mit RNA-Genom wurde zunächst im „Zwei-Schritt-Verfahren“ durchgeführt. In diesem wurde die RNA in einem separaten Schritt, wie in Kapitel 2.2.2.9.1 beschrieben, in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde dann in die RPA eingesetzt.

Bei der Umstellung von der „Zwei-Schritt-RPA“ zur „Ein-Schritt-RPA“ wurde zum ursprünglichen RPA-Ansatz zusätzlich Reverse Transkriptase und RNase Inhibitor hinzugefügt Die „Ein-Schritt-RPA“ oder auch RT(Reverse Transkriptase)-RPA zeigte zunächst eine geringere analytische Sensitivität im Vergleich zur „Zwei-Schritt-RPA“, deshalb musste das Ein-Schritt-Verfahren optimiert werden.

Da die additive Zugabe von Dithiothreitol (DTT) aufgrund einer stabilisierenden Wirkung positive Auswirkungen auf teilhabende Enzyme in der PCR-Reaktion zeigte (Nagai et al. 1998), wurden 2mM DTT zur RPA-Reaktion hinzugegeben. Dies führte nachweislich zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung der Ergebnisse, was darauf hinweist, dass DTT auch für die Enzyme der RPA eine stabilisierende Wirkung hat.

Die optimale Temperatureinstellung bei Verwendung der TwistAmp™-Reagenzienansätze zur Durchführung der RPA liegt nach Angaben des Herstellers bei 37-42°C. Die Versuche der DNA-RPA wurden bei 39°C durchgeführt. Bei Erhöhen der Temperatur auf 42°C bei den RT-RPA-Versuchen konnten die sensitivsten Ergebnisse erzielt werden. Dies könnte daran liegen, dass die optimale Temperatur für die enzymatische Reaktion der Transcriptor Reverse Transcriptase laut Anleitung zwischen 42°C und 65°C liegt (s. Gebrauchsanweisung).

Da bei Zugabe von Magnesiumacetat zum Gesamtansatz der RPA die Amplifikation beginnt (Shen et al. 2011), wurde die Magnesiumacetat-Menge in der RPA-Reaktion

angepasst. Die Ergebnisse der RT-RPA konnten durch Änderung der Magnesiumacetatmenge von 14 mM auf 22,4 mM optimiert werden.

Die aktivierende Funktion des Magnesiumacetates in der RPA-Reaktion ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Magnesium für die enzymatische Reaktion der Rekombinase benötigt wird (Yonesaki und Minagawa 1985). Magnesium hat zudem eine stabilisierende Wirkung auf DNA (Hartwig 2001) und ist Cofaktor vieler Polymerasen (Cowan 2002), weshalb die Magnesiumkonzentration auch in PCR-Entwürfen zur Optimierung der Sensitivität angepasst wird (Eckert und Kunkel 1990; Cobb und Clarkson 1994). Eine optimale Anpassung der Magnesiumacetat-Menge ist daher in der RPA-Reaktion für die Sensitivität der Ergebnisse bedeutend.

Weiterhin wurden zur Optimierung der RT-RPA-Sensitivität verschiedene Primerkombinationen getestet, da laut TwistDx unterschiedliche Oligonukleotide in der RPA-Reaktion nicht immer gleichwertig funktionieren. Für die RT-RPA wurden für die jeweiligen Erreger verschiedene Primerpaare (zwischen 3-8) entworfen und diese in unterschiedlichen Kombinationen getestet. Mit Änderung der Primerkombinationen wurden verschiedene Sensitivitäten erreicht. Insgesamt hatte die Primerauswahl den größten Einfluss auf die Optimierung der Sensitivität der RT-RPA im Vergleich zu oben genannten Vorgehensweisen.

Bisher beruhen die Anhaltspunkte zum Entwurf der Primer für die RPA, laut Angaben von TwistDx, auf empirischen Beobachtungen. Ein zu hoher (>70%) oder zu niedriger (<30%) GC-Gehalt und lange Guanin-Sequenzen am 5‘-Ende sollen vermieden werden. Hingegen wirken sich Cytidine am 5‘-Ende und Guanine und Cytidine am 3‘-Ende positiv auf die Ergebnisse aus (TwistDx Ltd., URL: http://www.twistdx.co.uk/, Stand: 01.12.2014).

Dass die Auswahl der Primer die Sensitivität von molekularen Nachweismethoden bedeutend beeinflusst, ist nicht ungewöhnlich, dies zeigte sich bereits für Testungen mit der PCR (He et al. 1994; Rychlik 1995).

Warum abweichende Primersequenzen in der RPA-Reaktion unterschiedlich sensitive Ergebnisse erbringen kann verschiedene Gründe haben. Die Primersequenz könnte z.B. Auswirkungen auf den Komplex mit der Rekombinase UvsX oder auf die Bindung des Primers an der dsDNA bei der Stranginvasion haben.

Die ATPase der UvsX, die für die Bindung der UvsX an Oligonukleotiden ATP verbraucht, zeigte bei Testungen mit ringförmiger und linearer ssDNA gleiche Aktivität. Dies bedeutet, dass die Sequenz an den Enden des Primers (5‘- und 3‘-Ende) auf die ATPase-Aktivität von UvsX keine Auswirkungen hat (Yonesaki und Minagawa 1985). Auch die Stabilität der Bildung des ssDNA-UvsX/UvsY-Komplexes zeigte sich beim Vergleich von zwei ssDNAs

(Länge: 24 Nukleotide) mit völlig unterschiedlicher Sequenz als nicht-sequenzabhängig (Hashimoto und Yonesaki 1991).

In Untersuchungen der Rekombinasen Rad51 und RecA, die der bei der RPA verwendeten Rekombinase UvsX ähneln (Cox und Lehman 1987), zeigte sich, dass der GC- und AT-Gehalt der ssDNA für die Stranginvasion von Bedeutung ist. Bei Untersuchungen der homologen Rekombination von Rad51 erwiesen sich A:T-Bindungen zwischen der ssDNA und der dsDNA bei der Stranginvasion im Gegensatz zu G:C-Bindungen als vorteilhaft. Möglicherweise weil die A:T-Bindungen öfter aus der Doppelhelix herausdrehen und somit für den ssDNA-Rekombinase-Komplex besser erreichbar sind (Gupta et al. 1999).

Für RecA konnte gezeigt werden, dass ssDNA mit einem höheren GC-Gehalt von 62-72% weniger stark an die dsDNA bindet, als ssDNA mit geringerem GC-Gehalt von 28-36% (Gruss et al. 1991). Dies könnte erklären, dass ein niedriger GC-Gehalt (ca. 30%) und ein hoher AT-Gehalt auch günstige Auswirkungen auf die Sensitivität der Ergebnisse der RPA-Reaktion haben.

Um weitere Empfehlungen zum Primerentwurf geben zu können, wäre es notwendig die Beeinflussung der Stranginvasion der UvsX durch verschiedene ssDNA- bzw. Primersequenzen zu untersuchen.

Unter Anwendung der oben genannten Optimierungsmaßnahmen, zeigte die RT-RPA im Vergleich zur „Zwei-Schritt-RPA“ vergleichbare Ergebnisse. Daher konnten die Reaktionen auf einen Schritt vereinfacht werden. Die Anpassung von Magnesiumacetat, Temperatur und Primerkombinationen können zukünftig gleichermaßen auf den TwistAmp™-exo-RT-Reagenzienansatz angewendet werden.

4.1.2 RT-RPA-Nachweise für die tmRNA von *Yersinia-pestis* und *Francisella-tularensis*

Für *Yersinia pestis* (*Ype)* und *Francisella tularensis (Ftu)* sollten RPA-Verfahren entwickelt werden, bei denen das Zielgen auf der tmRNA liegt. Die tmRNA ist eine bakterielle RNA, die vom *ssrA*-Gen kodiert wird. Die tmRNA ist eine kombinierte tRNA und mRNA, die an den Ribosomen die Translation eines unvollständigen Proteins (zum Beispiel aufgrund eines fehlenden Stoppcodons der mRNA) beendet. An den Ribosomen wird das unvollständige Protein durch die tmRNA markiert, was zu dessen Abbau und einer Reaktivierung des vorher blockierten Ribosomen führt. In lebenden Zellen ist die Anzahl der tmRNA mit ca. 1000 Kopien pro Bakterium relativ hoch (Wower et al. 2008; Kaplinski

et al. 2010). Daher ist die tmRNA von Bakterien ein attraktives Amplifikationsziel molekularer Methoden und wurde bereits als vielversprechendes Detektionsziel beschrieben (Schönhuber et al. 2001; Scheler et al. 2009).

Die RPA-Nachweise von *Ype* und *Ftu* mit der tmRNA als Zielgen konnten mittels „Zwei-Schritt-RPA“ sensitive Ergebnisse erreichen. Bis zu 10 RNA-Moleküle/µl wurden detektiert. Jedoch war ein geringer Anstieg der Kurve in der Negativkontrolle der Ergebnisse des *Ype-tmRNA*-Nachweises nach 17 Minuten in der Fluoreszenzmessung festzustellen (s. Abbildung 3.2), der bei der Auswertung allerdings unbedeutend blieb. Bei Umstellung auf die „Ein-Schritt-RPA“ zeigte die Negativkontrolle bereits nach 5-6 Minuten deutliche positive Ergebnisse.

Die falsch-positive Negativkontrolle des *Ype-ssrA*-RPA-Ansatzes konnte weder durch neue Primerkombinationen noch durch die Verlegung des Amplikons auf dem *ssrA*-Gen verändert werden. Eine Ursache könnten Primer-Dimer-Strukturen sein, die durch die besondere Sekundärstruktur der tmRNA entstehen. Die Sekundärstruktur der tmRNA ist stark gefaltet (Williams und Bartel 1996; Karzai et al. 2000). Somit wäre es denkbar, dass die Primer durch die Verdrehung der tmRNA an Stellen binden können, an die sie normalerweise nicht binden würden, wenn die tmRNA in der Primärstruktur vorliegen würde.

Durch die komplizierte Sekundärstruktur der tmRNA zeigte diese sich bereits in Microarray-Versuchen als komplexes Zielgen. Anhand spezifischer Oligonukleotide, die die tmRNA Sekundärstruktur aufbrechen, konnte sie zugänglicher für die Sonden im Microarray gemacht werden (Kaplinski et al. 2010).

Ein weiterer Nachteil des *ssrA*-Gens von *Ype* ist, dass die *ssrA*-Sequenz homolog zur *ssrA*-Sequenz von *Yersinia pseudotuberculosis* ist (Okan et al. 2006). Somit ist eine Spezies-spezifische RT-RPA mit dem *ssrA*-Gen als Zielgen für *Ype* nicht möglich.

Bei Umstellung des *Ftu*-tmRNA-Ansatzes von der „Zwei-Schritt-RPA“ auf die RT-RPA konnte trotz zahlreicher Optimierungsversuche nur eine Sensitivität von 10^3 RNA-Molekülen/µl erreicht werden. Die geringe Sensitivität könnte, wie bei den tmRNA-Versuchen für *Ype*, durch die komplexe Sekundärstuktur der tmRNA verursacht werden, da diese die Reverse Transkriptase bei der Bildung der cDNA behindern und unterbrechen kann (Malboeuf et al. 2001). Da die RPA eine isothermale Methode ist, fällt ein Denaturierungsschritt von 95°C weg, der eine störende Sekundärstruktur aufbrechen könnte. Um die Sekundärstruktur in der RPA aufzubrechen, wäre ein Hinzufügen von Helfer-Oligonukleotiden wie bei Kaplinski et al. möglich. Diese könnten hingegen für die RPA-Reaktion hinderlich sein.

Die schwierige Anpassung der RT-RPA-Nachweise mit der tmRNA als Zielgen zeigte, dass zur Entwicklung dieser Verfahren weitere Optimierungsschritte notwendig sind. Aus diesen Gründen wurde die Entwicklung der „Ein-Schritt-RPA“ zum Nachweis der bakteriellen tmRNA nicht weiter verfolgt und für *Ype* und *Ftu* DNA-RPA-Nachweise entwickelt.

4.1.3 Vergleich von TwistAmp™-exo-Kit und TwistAmp™-fpg-Kit

TwistDx stellt verschiedene Reagenzienansätze für die RPA zur Verfügung, die unterschiedliche Enzyme enthalten, die mit entsprechenden Sondenformaten reagieren. In dieser Arbeit wurde der Einsatz der fpg-Sonde im TwistAmp™-fpg-Kit mit dem Einsatz der exo-Sonde im TwistAmp™-exo-Kit verglichen. Im TwistAmp™-fpg-Kit ist das FPG-Protein enthalten, im TwistAmp™-exo-Kit die Exonuklease. Der genaue Aufbau und die Reaktion der Enzyme an den Sonden ist in Kapitel 2.2.2.10.6 detailliert beschrieben. Bei der TwistAmp™-fpg-Reaktion besteht der Vorteil, dass man im Anschluss an die Amplifikations-Reaktion eine Gelanalyse durchführen kann, was mit dem TwistAmp™-exo-Kit nicht möglich ist, da die Exonuklease III einen reduzierenden Einfluss auf das finale Amplifikationsprodukt hat. Zudem ist die fpg-Sonde mit einer Länge von 35 Basenpaaren ca. 10 Nukleotide kürzer als die exo-Sonde. Dies kann das Platzieren der Sonde in der Zielsequenz erleichtern. Wenn die bekannten Stämme eines Erregers z.B. eine hohe genomische Variabilität untereinander aufweisen, kann es schwierig sein einen konservierten Bereich zu finden in dem man die Sonden platzieren kann. In diesem Fall ist eine kurze Sonde von Vorteil.

Im RT-RPA-Verfahren wurde da Ebola-Zaire-Virus (EBOV), das Marburg-Virus (MARV) und das Sigma-Virus (SIGV) mit dem TwistAmp™-fpg-Kit und dem TwistAmp™-exo-Kit nachgewiesen (s. Kapitel 3.1.3). Es wurden je drei Durchläufe mit den beiden Reagenzienansätzen durchgeführt.

Im Vergleich zeigten die RT-RPA-Verfahren bei Verwendung des TwistAmp™-fpg-Kits eine eindeutig geringere analytische Sensitivität als bei Verwendung des TwistAmp™-exo-Kits. Die untere Nachweisgrenze der RNA-Moleküle/µl mit dem TwistAmp™-fpg-Kit lag bei EBOV und SIGV bei 1000 Molekülen/µl, bei MARV sogar bei 10^7 Molekülen/µl. Unter Verwendung des TwistAmp™ exo-Kit wurden pro Erreger 10 Moleküle/µl der RNA identifiziert.

Der Grund für die weniger sensitiven Ergebnisse des fpg-Kits ist nicht eindeutig zu erklären. Es ist möglich, dass das FPG-Enzym eine geringere enzymatische Effizienz hat, als die Exonuklease III. Zum Vergleich der Effizienz kann der enzymspezifische Km-Wert

herangezogen werden. Der Km-Wert steht für die Michaelis-Menten-Konstante. Sie beschreibt die Substratkonzentration, bei der ein Enzym die Hälfte seiner maximalen Enzymreaktivität erreicht hat (Michaelis et al. 2011). Der Km-Wert der Exonuklease III beträgt 6,3x 10^{-9}M (Schnitte/min) (Kow und Wallace 1985), der vom FPG-Protein liegt im Bereich von 7x10^{-9} M (Schnitte/min) (Boiteux et al. 1990). Der direkte Vergleich der Effizienz ist so nicht möglich, da die Enzyme unterschiedliche Reaktionen katalysieren. Da der Km-Wert aber in der gleichen Größenordnung liegt, gibt dies einen Hinweis darauf, dass die beiden Enzyme eine ähnliche Enzymaktivität besitzen.

Trotz des ähnlichen Km-Werts, wurde bei Verwendung des TwistAmp™-exo-Kits deutlich sensitivere Werte erzielt, was darauf schließen lässt, dass die Reaktion der Exonuklease im Gegensatz zur enzymatischen Reaktion des FPG-Enzyms in der RPA-Reaktion besser funktioniert. Daher wurden die folgenden RPA-Versuche mit diesem Kit durchgeführt.

4.1.4 Sensitivität und Spezifität der RT-RPA-Nachweise

Um die analytische Sensitivität der RT-RPA-Verfahren zum Nachweis von Sudan-Ebola-Virus (SUDV), Zaire-Ebola-Virus (EBOV), Marburg-Virus (MARV), Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) und der Positivkontrolle Sigma-Virus (SIGV) zu ermitteln, wurden RNA-Standards in jeweils 8 Durchläufen mit der RPA gemessen.

Da die Echtzeit-PCR eine weit verbreitete, hochsensitive und spezifische Methode ist und ähnlich wie bei der RPA Nukleinsäuren amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert werden, wurde diese Methode zum Vergleich herangezogen.

Zum Vergleich der RPA mit bestehenden isothermalen PCR-Methoden gibt es Veröffentlichungen, in denen der Nachweis der RNA von EBOV, MARV und RVFV in der LAMP-Reaktion beschrieben wurde. Die statistische Auswertung der RPA-Ergebnisse wurde mit der Probit-Analyse durchgeführt, um die prädiktive Anzahl der Moleküle, die von den jeweiligen Ansätzen in 95% der Fälle detektiert werden definieren zu können (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Vergleich der Sensitivitäten (Moleküle/µl) der RT-RPA-Ansätze mit Ergebnissen der Echtzeit-PCR und Ergebnissen der LAMP (u.g. Publikationen entnommen) (links). Probit-Analyse der RT-RPA und RPA-Schwellenwert der Sensitivitätsgrenze (rechts).

Erreger und Zielgen	RPA	Echtzeit-PCR	LAMP	Probit-Analyse	RPA-Schwellenwert der Sensitivitätsgrenze(min)
SUDV (NP)	10^1-10^2	10^1	-	21,07	8
EBOV (NP)	10^1-10^2	10^2	10^1 (1)	17,13	7
MARV (NP)	10^1-10^2	10^1	10^2 (2)	15,64	4
RVFV (N)	10^1-10^2	10^2	10 (3) 10 (4)	20,9	7
SIGV (G)	10^1-10^2	10^1	-	15,63	8

Quellen: (1)(Kurosaki et al. 2007) (2) (Kurosaki et al. 2010), (3) (Le Roux et al. 2009) (4) (Peyrefitte et al. 2008).

Mit der RT-RPA konnte die Standard-RNA von SUDV, EBOV, MARV, RVFV und SIGV mit jeweils 10^1-10^2 Molekülen/µl nachgewiesen werden.

Die Auswertung der Ergebnisse der RT-RPA per Probit-Analyse zeigte, dass die RT-RPA-Ansätze mit 95%iger Wahrscheinlichkeit zwischen 15 und 21 Moleküle detektieren.

Im Vergleich zur Echtzeit-PCR und der LAMP zeigte sich bei Verwendung der RT-RPA für alle getesteten Erreger ähnliche analytische Sensitivitäten. Dies unterstreicht, dass die RT-RPA eine sehr sensitive Methode ist. Bemerkenswert ist der zeitliche Unterschied der RPA zu der Echtzeit-PCR und der LAMP-Reaktion. Die Echtzeit-PCR- und die LAMP-Testungen dauern im Mittel zwischen 40 und 60 Minuten, gelegentlich (Kurosaki et al. 2007) auch weniger als 30 Minuten. Die RPA wurde durchgängig in 20-minütigen Tests durchgeführt. Der mittlere Schwellenwert, bei dem die Ergebnisse mit der höchsten Sensitivität vorlagen, lag zwischen 4 und 8 Minuten.

Zur genaueren Beurteilung der analytischen Sensitivität sollten verschiedene Stämme der Erreger getestet und klinischen Proben verwendet werden. In LAMP-Ansätzen konnten bereits verschiedene Stämme der jeweiligen Viren getestet werden (Kurosaki et al. 2007; Peyrefitte et al. 2008; Le Roux et al. 2009; Kurosaki et al. 2010). Le Roux et al. und Peyrefitte et al. beschrieben darüber hinaus Testungen mit klinischen Proben. Diese zeigten gute Sensitivitäten für die LAMP-Ansätze.

Mit der RPA konnten Stammtestungen mit RVFV-Stämmen durchgeführt werden: 18 RVFV-Stämme wurden mit der RT-RPA getestet, alle Stämme wurden detektiert. Dies spricht für eine gute analytische Sensitivität des RPA-Verfahrens. Für die übrigen Erreger sind weitere Stammtestungen und Testungen mit klinischen Proben notwendig, um die

analytische Sensitivität ferner beurteilen zu können. Diese Testungen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Um zu evaluieren, wie sensitiv die RNA von vollständigen Erregern aus extrahiertem Vollblut in der RPA nachgewiesen werden kann, wurden RVFV und SIGV als Vertreter der Negativ-Strang-RNA-Viren ausgewählt. Blutplasma wurde mit aus Virus-Zellkulturüberstand gewonnenen und durch Gammastrahlung inaktivierten Viren versetzt. Diese Proben wurden mit der zugehörigen Echtzeit-PCR in jeweils zwei Durchgängen gemessen und quantifiziert. Die Proben wurden in drei Durchgängen in der RPA getestet.

Mit der Echtzeit-RT-PCR und mit der RT-RPA war der Nachweis der RNA der RVFV-Proben, die 100 Moleküle/µl enthielten, möglich. Von den SIGV-RNA-Proben konnten mit der Echtzeit-RT-PCR 1 Molekül/µl und mit der RT-RPA 10 Moleküle/µl nachgewiesen werden.

Die analytische Sensitivität der beiden Methoden war ähnlich, womit gezeigt werden konnte, dass die RPA vergleichend zur Echtzeit-PCR nicht nur aufgearbeitete Standard-RNA sondern auch vollständige Erreger hochsensitiv nachweisen kann. Die RPA-Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den Echtzeit-PCR-Ergebnissen bei Testungen der Sigma-Virus-RNA-Proben weniger sensitive Werte. Da es sich hierbei um den Nachweis der Positivkontrolle handelt, die in einer feststehenden Konzentration zur Probe gegeben werden soll, ist dieses minimal schlechtere Ergebnis nicht entscheidend.

Es sollte ermittelt werden ob die in Blutproben vorhandene humangenomische DNA die Sensitivität der RT-RPA beeinträchtigt. Zunächst wurde die humangenomische DNA-Konzentration in Nukleinsäureextrakten von 10 Negativ-Seren spektroskopisch bestimmt. Der Mittelwert lag bei ca. 70 ng/µl. Der EBOV-RT-RPA-Ansatz wurde als Vertreter für die RNA-Ansätze ausgewählt und in diesen wurde 70 ng/µl humangenomische DNA als „Hintergrund-DNA“ in drei Durchläufen hinzugegeben. Es konnte eine minimale Zeitverzögerung der RT-RPA-Reaktion beobachtet werden, die Sensitivität der RT-RPA wurde aber nicht beeinträchtigt (s. Abbildung 3.11) . Dies spricht dafür, dass die Ergebnisse der RT-RPA durch die humangenomische DNA in klinischen Proben nicht beeinflusst werden.

Zur Evaluation der Spezifität wurden in die jeweiligen RT-RPA-Ansätze, die in dieser Arbeit verwendeten molekularen RNA/DNA-Standards und humangenomische DNA gegeben. Es konnten keine Kreuzreaktionen festgestellt werden. Dies spricht insgesamt für eine sehr gute analytische Spezifität der RT-RPA-Verfahren.

4.2 DNA-RPA

4.2.1 Sensitivität und Spezifität der DNA-RPA-Ansätze

Für den Nachweis der DNA von *Bacillus anthracis (BA), Francisella tularensis (Ftu), Yersinia pestis (Ype) und* Variola-Virus (VARV) wurden im Rahmen dieser Arbeit RPA-Verfahren entwickelt und in 8 Durchläufen in die RPA eingesetzt. In Tabelle 4.2 ist die analytische Sensitivität der RPA-Verfahren, sowie vergleichende Ergebnisse aus Publikationen über Echtzeit-PCR- und LAMP-Nachweise für diese Erreger aufgeführt. Ferner sind der Tabelle die Ergebnisse der statistischen Auswertung der RPA-Ergebnisse per Probit-Analyse zu entnehmen.

Tabelle 4.2 Vergleich der Sensitivitäten (Moleküle/µl) der DNA-RPA-Nachweise mit Ergebnissen aus Publikationen über Echtzeit-PCR- und LAMP-Nachweise (links). (Die Umrechnung von Genomäquivalent (fg) in Moleküle/µl erfolgte nach der Rechnung GE (fg)= Basenpaare pro Genom × 618 g mol-1 × 10^{15}/6.023 ×1023 mol-1 (Avogadrokonstante)(Tomaso et al. 2010).)
Probit-Analyse der RPA und RPA-Schwellenwert der Sensitivitätsgrenze (rechts).

Erreger	RPA	Echtzeit-PCR	LAMP	Probit-Analyse	RPA-Schwellenwertder Sensitivitätsgrenze(min)
BA capC	10^2-10^3	10^1 (1)	10^3 (8)	778,2	8
BA pagA	10^1-10^2	10^1 (1)	10^3 (8)	15,74	7
Ype	10^1-10^2	10^1(2) 2(10fg) (3)	-	19,01	10
Ftu	10^1-10^2	10^2(200fg) (4)	-	15,72	8
VARV	10^1-10^2	10^1-10^2 (5) 25 (6) 25 (7)	10^2 (Affen-pocken) (9) 30 (Kamel-pocken) (10)	15,64	10

Quellen: (1) (Ellerbrok et al. 2002) (2) (Tomaso et al. 2003) (3)(Matero et al. 2010) (4) (Emanuel et al. 2003; Matero et al. 2010)(5)(Putkuri et al. 2009)(6) (Ibrahimy et al. 2003) (7) (Scaramozzino et al. 2007) (8) (Kurosaki et al. 2009)(9) (Iizuka et al. 2009)(10)(Venkatesan et al. 2012).

Die DNA-RPA-Verfahren zeigten eine gute analytische Sensitivität. Der *BA-capC*-Nachweis wies eine analytische Sensitivität von 10^2-10^3 Molekülen/µl auf, die anderen DNA-Verfahren zeigten eine analytische Sensitivität von 10^1-10^2 Molekülen/µl. Die statistische Auswertung per Probit-Analyse ergab, dass die DNA-Ansätze mit 95%iger Wahrscheinlichkeit zwischen 15 und 19 Moleküle detektieren. Nur bei dem *BA-capC*-

RPA-Nachweis lag dieser Wert bei 778,2 Molekülen. Der Schwellenwert, bei dem die Sensitivitätsgrenze erreicht wurde, lag bei den DNA-Nachweisen im Mittel bei 7-10 Minuten.

Die Sensitivitäten der DNA-RPA-Verfahren sind mit Echtzeit-PCR-Ergebnissen aus Publikationen (s. Tabelle 4.2) vergleichbar. Nur die Ergebnisse des *BA-capC*-RPA-Nachweises fiel etwas schlechter aus und dementsprechend die statistische Auswertung der Probit-Analyse. Die Echtzeit-PCR zum Nachweis von *BA capC* nach Ellerbrok et al. wurde vergleichend durchgeführt. Die Sensitivitäten lagen wie die der RPA bei 10^2-10^3 Molekülen/µl. Daher ist es möglich, dass die weniger sensitiven Werte nicht aufgrund des RPA-Ansatzes sondern aufgrund der Zielsequenz zu erklären sind. Um dies zu überprüfen, wären weitere Versuche mit anderen c*apC*-Standards notwendig. Für den molekularen Nachweis von *BA* ist es wichtig, dass die beiden Ansätze p*agA* und *capC* gleiche Sensitivitäten aufweisen, da p*agA* auf dem Plasmid px01 und *capC* auf dem Plasmid px02 liegt und *BA* erst als virulent gilt, wenn beide Plasmide vorhanden sind (Kaspar und Robertson 1987).

Die Ergebnisse der DNA-RPA-Nachweise lagen im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-RPA-Ansätzen (4-8 Minuten) nach 7-10 Minuten vor. Dies könnte daran liegen, dass bei der RT-RPA-Reaktion durch die anhaltende Produktion der cDNA durch die Reverse Transkriptase mehr Vorlagen vorhanden sind an die Primer und Sonden binden können, woraufhin die Fluoreszenz schneller ansteigt, ähnlich wie bei der NASBA-Reaktion (Fakruddin et al. 2012).

Mit einer Gesamtversuchzeit von 20 Minuten ist die RPA der Echtzeit-PCR und der LAMP überlegen, die im Mittel zwischen 40 und 60 Minuten (Emanuel et al. 2003; Ibrahimy et al. 2003; Scaramozzino et al. 2007; Kurosaki et al. 2009; Matero et al. 2010) und nur gelegentlich ca. 25 Minuten. (Ellerbrok et al. 2002) dauern.

Um die analytische Sensitivität der DNA-RPA-Nachweise zu bewerten, müssen Stammtestungen durchgeführt werden. Dies konnte für den *Ftu*-RPA-Nachweis erfolgen. Es wurden 9 Stämme getestet: Ein Stamm von *F. tularensis subs. tularensis,* drei Stämme von *F. tularensis subs. holarctica,* ein Stamm von *F. hispaniensis,* drei Stämme von *F. novicida* und ein Stamm von *F. philomiragia.* Alle Stämme, bis auf *F. philomiragia,* wurden mit dem *Francisella-tularensis*-RPA-Ansatz detektiert. Bei *F. philomiragia* handelt es sich um einen fischpathogenen *Francisella*-Stamm. Infektionen beim Menschen werden nur selten beobachtet. Hollis et al. untersuchten 14 *Francisella philomiragia* Stämme, die von infizierten Menschen isoliert wurden. Fünf der Patienten hatten Ertrinkungsunfälle

überlebt, weitere 5 Patienten hatten chronisch granulomatöse Erkrankungen (Hollis et al. 1989). Dies verdeutlicht, dass die Infektion beim Menschen zwar auftreten kann, aber eher in Extremfällen, z.B. bei immunsupprimierten Menschen. Somit ist ein Nachweis dieses Erregers aufgrund geringer Humanpathogenität nicht zwingend erforderlich.

Im November 2011 wurden zwei Fälle von Tularämie in Tasmanien beobachtet. Die Infektionen wurden durch *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* biovar *japonica* ausgelöst (Promedmail 2011, URL: http://www.promedmail.org/direct.php?id=20111122.3425, Stand: 01.12.2014). In Australien wurde bereits 2003 ein Fall von Tularämie einer *novicida*-ähnlichen *Francisella*-Spezies berichtet (Whipp et al. 2003). Das Auftreten der Tularämie in der südlichen Hemisphere ist eher selten. Bei genetischen Abweichungen, die bei solchen untypischen Vorkommen von *Francisella*-Spezies nicht unwahrscheinlich sind, wäre es möglich, dass der hier entwickelte RPA-Nachweis diese Stämme nicht detektiert. Dies könnte nur durch die Testung und Kontrollsequenzierung der Zielsequenzen der betreffenden Stämme abgesichert werden.

Erstrebenswert wäre die Entwicklung eines RPA-Ansatzes, gegebenenfalls auch als Multiplex-Reaktion, der die humanpathogenen *Francisella*-Stämme voneinander differenzieren kann, da sich diese in ihrer Virulenz stark unterscheiden und somit unterschiedliche prognostische Aussagen gemacht werden könnten.

Neben den Stammtestungen wurden zur Bewertung der analytischen Sensitivität des *Francisella-tularensis*-Entwurfes Testungen mit *Franicsella-tularensis*-DNA von natürlich infizierten Hasenproben durchgeführt. Neun Proben mit extrahierter DNA aus diesen Geweben wurden vergleichend in den *tul-4*-Echtzeit-PCR-Ansatz und in den *tul4*-RPA-Ansatz eingesetzt. Im Echtzeit-PCR-Ansatz wurden 6 von 9 Proben, im RPA-Ansatz 4 von 9 Proben positiv detektiert (s.Tabelle 3.10). Der RPA-Ansatz zeigte somit eine etwas schlechtere Sensitivität als der Echtzeit-PCR-Ansatz. Allerdings lagen bei den zwei Echtzeit-PCR-positiven- und RPA-negativen-Proben die Crossing-point(Ct)-Werte der Echtzeit-PCR über Ct 35. In der Routinediagnostik werden Echtzeit-PCR-Ct-Werte über 35 als fraglich positiv gewertet und deswegen zur Bestätigung wiederholt. Werte über 40 gelten als negativ. Ohne Bestätigung der zwei Werte, die in der Echtzeit-PCR mit einem Ct-Wert über 35 positiv detektiert wurden, bleibt dieser Wert fraglich positiv und lässt darauf schließen, dass die RPA vergleichend sensitive Ergebnisse liefert wie die Echtzeit-PCR.

Um zu testen, wie sensitiv die DNA von vollständigen Erregern aus extrahiertem Vollblut von der RPA nachgewiesen werden kann, wurde für die DNA-Erreger *BA* (als Vertreter

der gram-positiven Bakterien), *Ype* (für die gram-negativen Bakterien) und Vaccinia Virus (VAV) (als DNA-Virus und als Vertreter für VARV) ausgewählt. Es wurde Blutplasma mit den aus Bakterienkultur oder Virus-Zellkulturüberstand gewonnenen, durch Gammastrahlung inaktivierten Erregern versetzt und mit der zugehörigen Echtzeit-PCR in jeweils zwei Durchgängen gemessen und quantifiziert. Mit der RPA wurden jeweils drei Durchläufe mit den Proben durchgeführt. Mit der Echtzeit-PCR und mit der RPA konnten 10 Moleküle/µl der DNA von *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* und Vaccinia-Virus nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die analytischen Sensitivitäten der RPA und Echtzeit-PCR bei Testung mit aufgereinigter DNA aus vollständigen Erregern vergleichbar ist. Mit der LAMP-Reaktion konnten bereits Proben von *Bacillus anthracis* ohne Nukleinsäureaufreinigung effektiv nachgewiesen werden (Dugan et al. 2012) . Um zu zeigen, dass die RPA die DNA der Erreger auch ohne Aufreinigung nachweisen kann, sind weitere Testungen notwendig.

Wie bei den RT-RPA-Verfahren wurde für die DNA-RPA-Verfahren ein Erreger-Nachweis ausgewählt (*BA*-p*agA*), in den humangenomische DNA gegeben wurde, um eine Beeinflussung der analytischen Sensitivität ausschließen zu können. Die Zugabe der humangenomischen DNA ergab keine Veränderung der Sensitivität. Dies weist darauf hin, dass bei Testungen mit infizierten Gewebeproben, die darin enthaltene humangenomische DNA kein Störfaktor darstellt.

Überdies wurden zur Evaluierung der Spezifität Kreuztestungen durchgeführt. In die DNA-RPA-Nachweise wurden aufgrund der Doppelstrangkonfiguartion die pCR®II-Plasmidstandards der entwickelten RT-RPA-Verfahren (SUDV, EBOV, MARV, RVFV und SIGV) eingesetzt. Zudem wurden die DNA-Standardreihen (*BA capC, BA pagA, Ype, Ftu*, VARV) und humangenomische DNA mit den DNA-Nachweise getestet. Die DNA-RPA-Nachweise stellten sich als sehr spezifisch heraus, da sie weder die RNA/DNA-Standards, noch die humangenomische DNA detektierten.

Das Variola-Virus unterscheidet sich von den anderen Orthopocken-Stämmen in einer höheren Virulenz und bei einer Variola-Infektion wird eine höhere Letalität beschrieben (Fenner 1988). Zur Abgrenzung der RPA zum Nachweis des Variola-Virus von weiteren Orthopocken-Stämmen (z.B. Vaccinia-Virus, Kamelpocken, Affenpocken) wurde das VARV-RPA-Amplikon in einen Bereich gelegt, in dem sich die Sequenz der DNA des Variola-Virus spezifisch von der Sequenz der DNA der anderen Orthopocken-Viren unterscheidet. Ferner wurden die Primer nach dem „amplification refractory mutation system“ (ARMS)-Prinzip entworfen. Dieses besagt, dass für die Hybridisation des Primers

die drittletzte Position am 3'-Ende entscheidend ist (Newton et al. 1989). Zur Differenzierung eng verwandter Zielsequenzen in der Amplifikation werden deswegen einzelne Nukleotide die sich in den Sequenzen unterscheiden an diese drittletzte Position des 3'-Endes der Primer platziert. Da dieses Prinzip in der Echtzeit-PCR erfolgreich angewendet wurde (Weidmann et al. 2003), wurden die Variola-Virus-Primer an der drittletzten Position des 3'-Endes spezifisch für die Variola-Virus-Sequenz und abweichend zu den anderen Orthopockensequenzen entworfen.

Die DNA der folgenden Orthopocken-Stämme wurden mit dem VARV-RPA-Verfahren getestet: Vaccinia-Virus (Elstree 5), Kamelpocken (CP19), Affenpocken (MP4), Orthopocken (OPV 90/3). Keine dieser Stämme wurde mit dem VARV-RPA-Verfahren detektiert. Dies unterstreicht die Spezifität des Variola-Virus Nachweises auch innerhalb der Orthopockenstämme und macht es möglich, die Variola-Virus Infektion eindeutig von einer Infektion mit anderen Orthopocken-Stämmen zu differenzieren.

4.3 Optimierung und Ausblick der RPA

Die Ergebnisse der RPA-Nachweise dieser Arbeit sind bezüglich Sensitivität, Spezifität und Geschwindigkeit vielversprechend. Jedoch sind Optimierungs- und Änderungsschritte für diese Methode notwendig, um sie in einem weiten Spektrum in der molekularen Diagnostik einsetzen zu können.

Da die exo-Sonde für das TwistAmp™ exo-Kit mit einer Länge von 45 Basenpaaren recht lang ist, wäre eine Kürzung der Sonde wünschenswert, da nicht immer konservierte Bereiche in dieser Länge in den nachzuweisenden Zielsequenzen zu finden sind. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, könnte der Einbau von modifizierten dNTPs in die Sonde sein. Die dNTPs können beispielsweise durch Basenmodifikation an C5-Position des Pyrimidins mit einem hydrophoben Methylrest, oder an C2-Position des Purins mit einem Aminorest versehen werden, was die Affinität zur Anlagerung an die Komplementärsequenz verstärkt. Derartig modifizierte dNTPs erwiesen sich als effektiv beim Einsatz von Oligonukleotiden in der PCR (Lebedev et al. 1996) und auch für Sonden und Primer der Echtzeit-PCR (Kutyavin 2008). Daher ist es denkbar, dass sie bei der RPA ebenso gut funktionieren.

Dass die RPA auch in Multiplex-Ansätzen funktioniert, wurde bereits gezeigt (Piepenburg et al. 2006). Multiplex bedeutet, dass mehrere Primer-Sonden-Paare in einen Ansatz gegeben werden, in dem gleichzeitig mehrere Erreger detektiert werden können. Wichtig ist, dass die Primer und Sonden, die zu dem Ansatz hinzu gegeben werden nicht

miteinander interagieren oder kompetitieren und somit die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Nachweise beeinflussen.

Für eine Multiplex-RPA mit mehr als zwei Erregern wäre es notwendig den ESEQuant Tubescanner insofern zu optimieren, dass er mehrere verschiedenen Farbstoffe voneinander differenzieren kann. Bisher ist es nur möglich zwei Farbstoffe voneinander zu differenzieren (im Standard-Tubescanner ist dies FAM™ und TAMRA™/ bzw FAM™ und ROX™).

In dieser Arbeit wurden die RPA-Ergebnisse qualitativ ausgewertet: Nach Ablauf des Versuchs konnte festgestellt werden, ob die RNA/DNA bis zu einer gewissen Menge in der Probe vorhanden ist oder nicht. Bei der Echtzeit-PCR kann per absoluter Quantifizierung (durch den Vergleich zu einer Standardkurve) oder die relative Quantifizierung (durch Vergleich des Zielgens zu einem Referenzgen) die Menge der RNA/DNA berechnet werden (Ferre 1992). Die Quantifizierung von RNA und DNA mit der RPA ist mit der RPA-Enzymmischung, die derzeit von TwistDx zur Verfügung gestellt wird nicht möglich, weil die Enzymmischung auf Leistung und damit einem explosiven Reaktionsgeschehen eingestellt ist. Dies gewährleistet eine robuste und hochsensitive Leistungsfähigkeit der RPA-Reaktion. Eine regelmäßige, lineare Reaktonskinetik, wie sie für eine quantitative Bestimmung notwendig ist, ist zwar grundsätzlich möglich (Piepenburg et al. 2006), aber zur Zeit nicht verfügbar.

Insgesamt zeigte sich die RPA mit schnellen, hochsensitiven und hochspezifischen Reaktionen als vielversprechende isothermale Amplifikationsmethode und könnte gut für die Integration in ein mobiles Detektionsgerät für die Notfalldiagnostik von emergenten Infektionserregern dienen.

Die Integration der RPA in eine „Lab-Disc“ ist bereits beschrieben. Diese „Lab-Disc“ besteht aus mehreren Reaktionskammern, die in einer CD-förmigen Scheibe angebracht sind. Durch Zentrifugation wird die Reaktionsflüssigkeit in randständig liegende Kammern transportiert, um parallel bis zu 30 verschiedene RPA-Reaktionen zu ermöglichen (Lutz et al. 2010).

Die in dieser Arbeit beschreibenen RPA-Verfahren könnten in einen Schnelltest integriert werden, der ähnlich der oben beschriebenen „Lab-Disc“ aufgebaut ist, um den zeitnahen gleichzeitigen Nachweis der Erreger in Patientenmaterial zu erlauben. Eine Herausforderung dürfte dabei die klinische Evaluierung der integrierten Plattform darstellen, da Patientenmaterialien für diese Erkankungen nicht ausreichend zur Verfügung stehen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Rekombinase-Polymerase-Amplifikations(RPA)-Verfahren zum Nachweis der hochpathogenen Erreger Sudan-Ebola-Virus (SUDV), Zaire-Ebola-Virus (EBOV), Marburg-Virus (MARV), Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV), Variola-Virus (VARV), *Francisella tularensis (Ftu), Yersinia pestis (Ype)* und *Bacillus anthracis (BA)*. Zusätzlich sollte eine interne Positivkontrolle auf der Basis des Sigma-Virus (SIGV, Minus-Strang-RNA-Virus, Rhabdoviridae) integriert werden.

Für alle Viren mit einem RNA-Genom (SUDV, EBOV, MARV, RVFV, SIGV) wurden Reverse-Transkriptase(RT)-RPA-Nachweisverfahren etabliert. Der Nachweis bakterieller Erreger (*Ftu, Ype, BA*) und des Variola Virus (VARV), erfolgte auf der Basis des DNA-Genoms. Drei bis acht Primerpaare wurden jeweils für die verschiedenen Erreger anhand der Zielsequenzen selektiert und RPA-Sonden entworfen. Zusätzlich wurden molekulare Standards (10^7-10^1 Moleküle/µl) der Zielsequenzen hergestellt und die sensitivsten Primer/Sonden-Kombinationen der einzelnen Verfahren ermittelt. Aufgrund der Stammvariabilität von *Francisella tularensis* wurden hier zusätzlich verschiedene Stämme analysiert. Die Spezifität der RPA-Verfahren wurde durch Kreuztestungen untereinander und mit humangenomischer DNA untersucht. Die Testverfahren wurden auch mit gespikten Blutplasmaproben (RVFV, SIGV, *BA* und *Ype*) analysiert.

Für alle Erreger konnten RPA-Nachweise entwickelt werden. Die analytische Sensitivität lag zwischen 10^1-10^3 Molekülen/µl. Die Probit Analyse zeigte, wie viele Moleküle theoretisch in 95% der Testläufe nachgewiesen werden können. Dieser Wert lag für fast alle RPA-Ansätze zwischen 16-21 Molekülen, für den *BA(CapC)*-RPA-Nachweis lag der ermittelte Wert bei 778 Molekülen. Der Ausschluss von Kreuzamplifikationen zeigte die hohe Spezifität der RPA-Verfahren auf. Beim Vergleich von RPA und Echtzeit-PCR waren beim Einsatz von gespiktem Blutplasma mit vollständigen, inaktivierten Erregern (RVFV, SIGV, *BA* und *Ype*) keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden nachweisbar. Die Vorzüge der RPA liegen jedoch in der Geschwindigkeit des Nachweisverfahrens, da ein Ergebnis schon in weniger als 10 Minuten erzielt werden kann. Die hohe Geschwindigkeit des Verfahrens, der einfache Versuchsaufbau und der erfolgreiche Einsatz an gespikten Blutplasmaproben eröffnen die Perspektive für einen zukünftigen breiten molekulargenetischen Point-of-Care-Einsatz dieses Verfahrens.

6 Anhang

6.1 Sequenzanalysen

Die Sequenzanalysen wurden mit DNASTAR Lasergene™ SeqMan durchgeführt. Als Vergleichssequenz dienten die in Kapitel 3.1.1 und 3.2.1 beschriebenen Sequenzen.

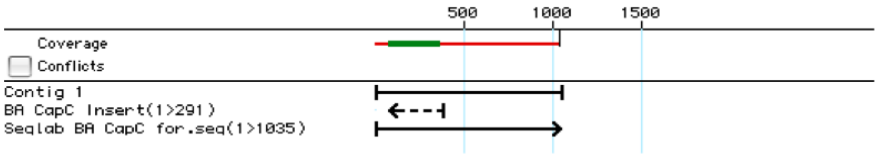


Abbildung 6.1 Sequenzanalyse Bacillus anthracis capC

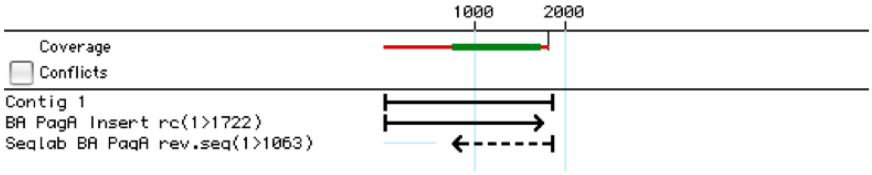


Abbildung 6.2 Sequenzanalyse Bacillus anthracis pagA

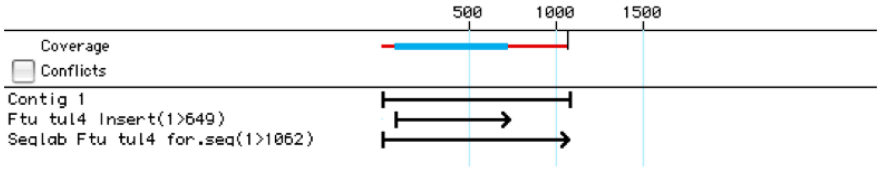


Abbildung 6.3 Sequenzanalyse Francisella tularensis tul4

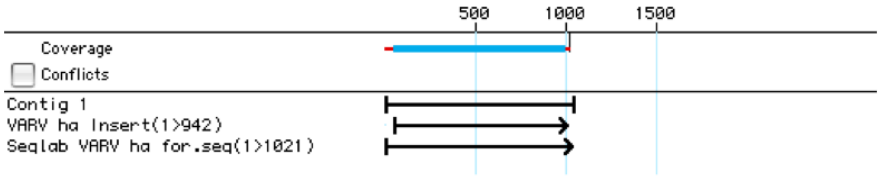


Abbildung 6.4 Sequenzanalyse Variola-Virus ha

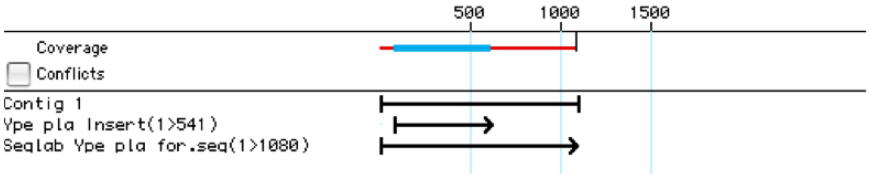


Abbildung 6.5 Sequenzanalyse Yersinia pestis pla

6.2 RPA-Amplikons

Die RNA- und DNA-RPA-Amplikons wurden anhand der aktuell verfügbaren RNA- und DNA-Sequenzen der Onlinedatenbank mit DNASTAR Lasergene™ MegAlign entworfen.
(Die in den Abbildungen dargestellte Oligonukleotidsequenz kann an den 5‘-Enden von den verwendeten Primer/Sonden-Sequenzen (s. Material- und Methoden) abweichen, da zum Teil endständige Nukleotide beim Alignment nicht richtig positioniert wurden).

6.2.1 RNA-Amplikons

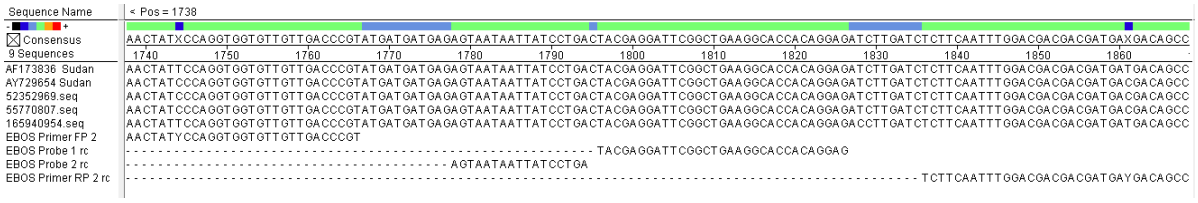


Abbildung 6.6 Sudan-Ebola-Virus

Abbildung 6.7 Zaire-Ebola-Virus

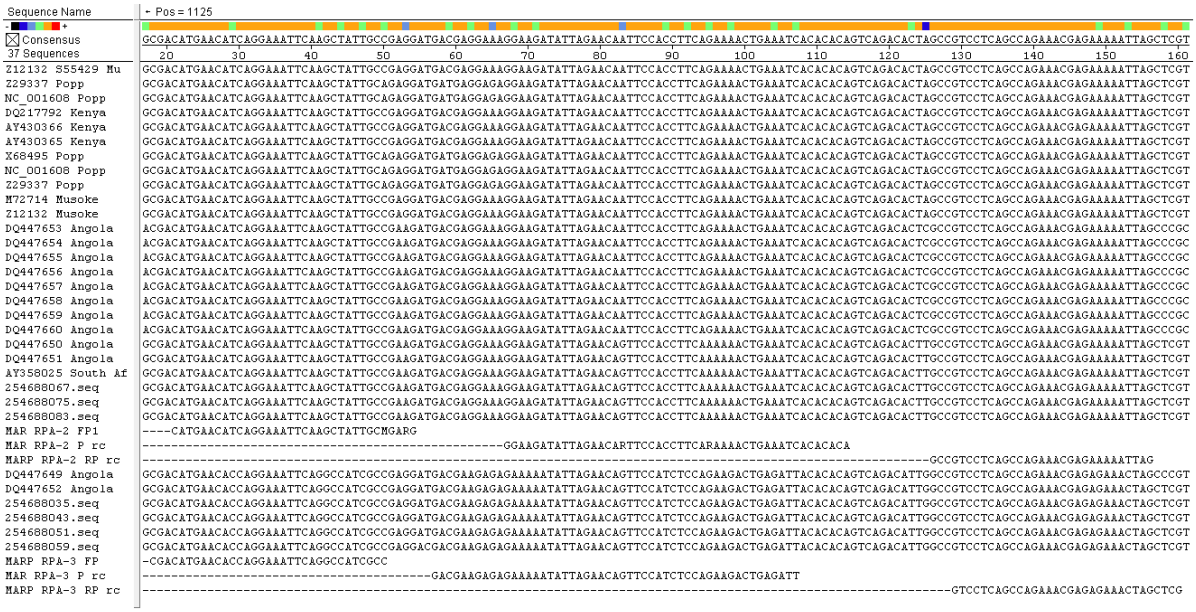


Abbildung 6.8 Marburg-Virus

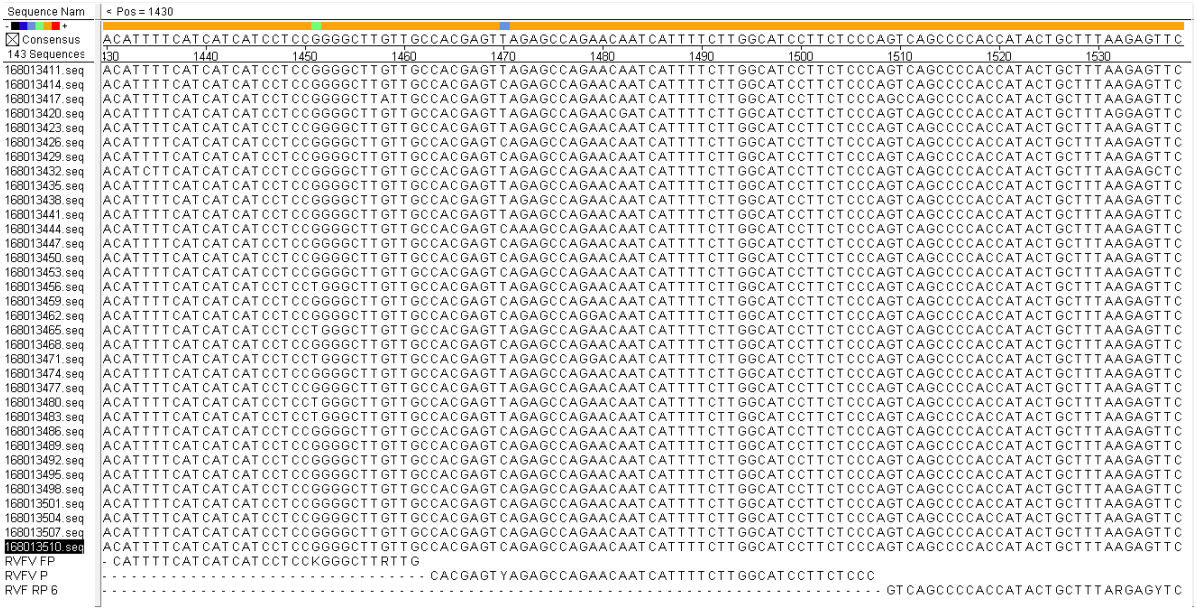


Abbildung 6.9 Rift-Valley-Fieber-Virus

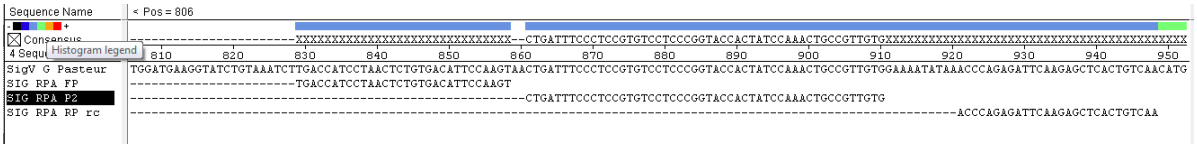


Abbildung 6.10 Sigma-Virus

6.2.2 DNA-Amplikons

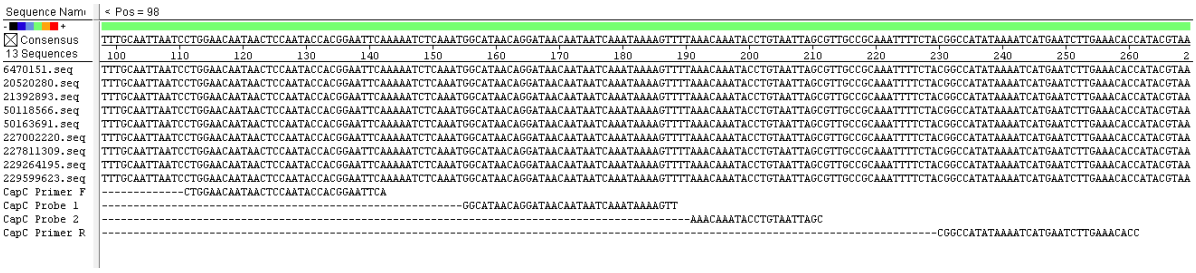


Abbildung 6.11 Bacillus anthracis capC

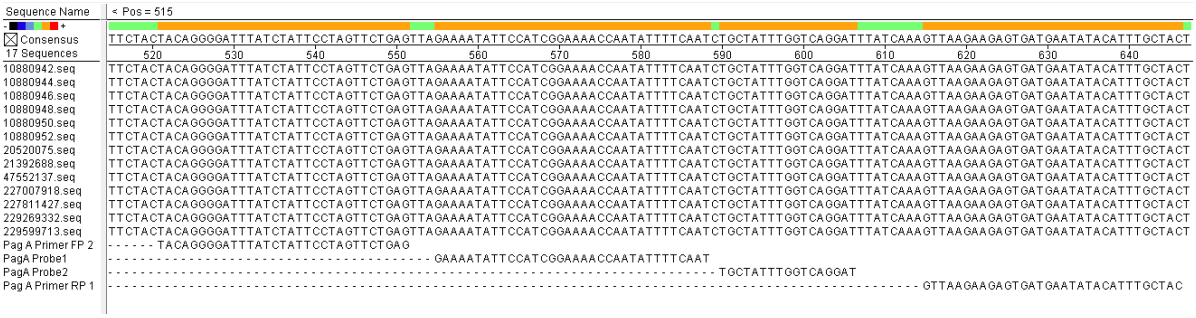


Abbildung 6.12 Bacillus anthracis pagA

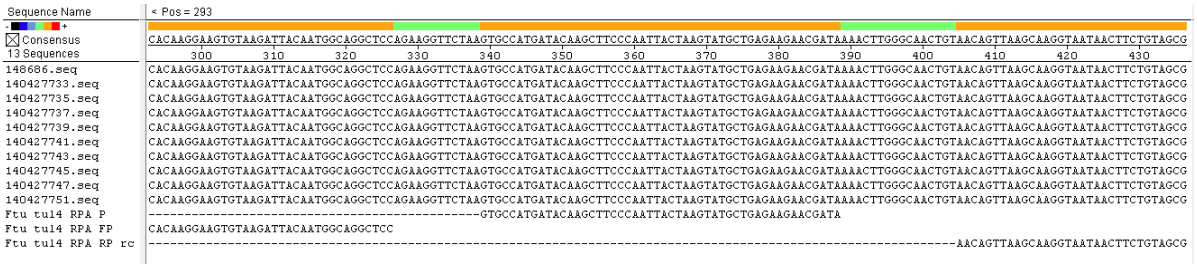


Abbildung 6.13 Francisella tularensis

Abbildung 6.14 Vaccinia-Virus

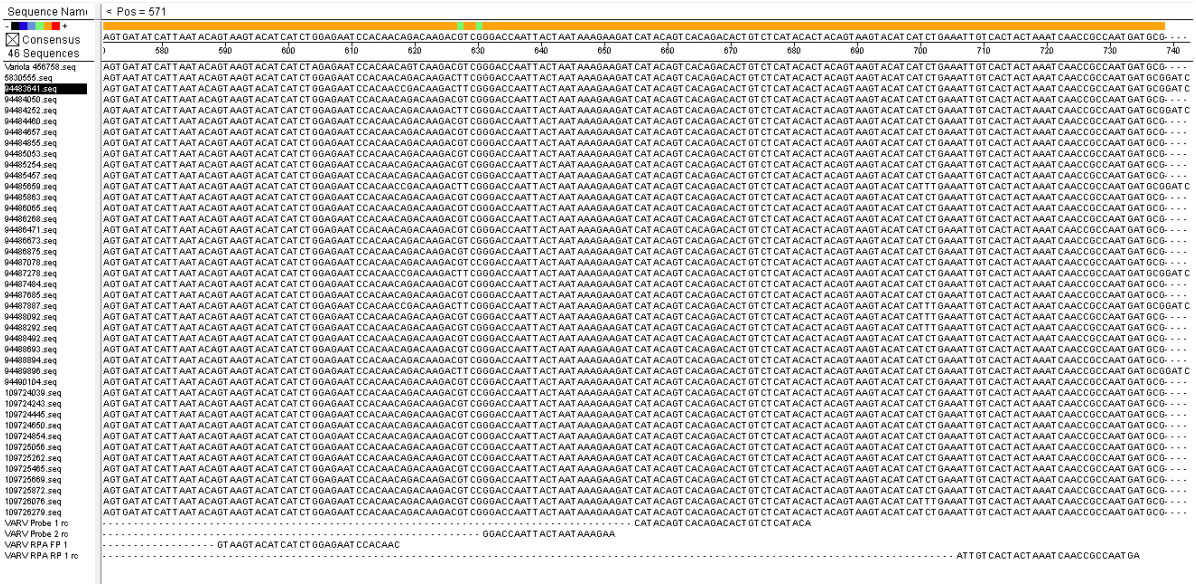


Abbildung 6.15 Variola-Virus

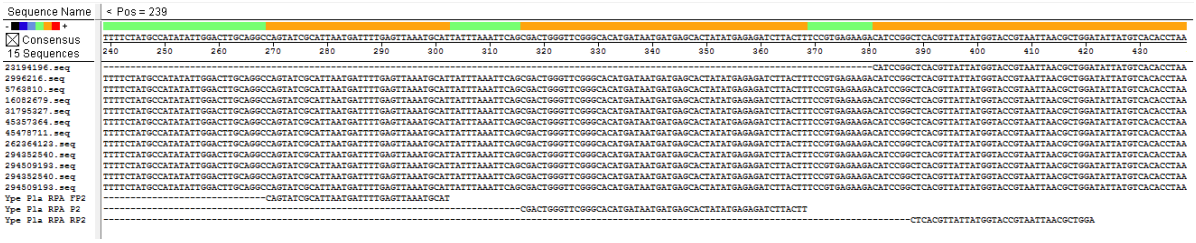


Abbildung 6.16 Yersinia pestis

6.3 RPA-Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der RNA- und DNA-RPA-Nachweise von jeweils 8 Durchläufen aufgeführt. Dargestellt ist der zeitliche Schwellenwert (Cp-Wert in Minuten), an dem die RNA/DNA-Standards als positiv nachgewiesen wurden.

6.3.1 Ergebnisse der RNA-RPA-Nachweise

Tabelle 6.1 Sudan-Ebola-Virus-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
RNA-Moleküle/µl	**10**	-	-	-	7,7	-	-	-	-
	100	7	5	6	3,7	6,7	7	7,7	7
	1000	7	6	6,7	6,3	7,7	6,7	6,3	7,3
	10000	6,3	5,7	6	6,3	6,3	6,3	6	6
	100000	6	5	6	5,7	6	6	5,7	5,7
	1000000	5	5	5	5	5,3	5,7	5	5,3
	10000000	3	5	5	2,7	5	5	5	3,3

Tabelle 6.2 Zaire-Ebola-Virus-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
RNA-Moleküle/µl	**10**	-	7	8,3	6,7	-	5	-	-
	100	6,7	6,7	7,7	6,7	6,7	5,3	6,7	6,7
	1000	6,3	6,3	6,3	6,3	6	5,3	6,7	6,7
	10000	6	5,7	6	6	5,3	5,3	6,3	5
	100000	5,3	5	5,3	5,7	5	5	6,3	5,7
	1000000	4,3	4,7	5,3	5	3	5	5	5,3
	10000000	3,3	2,7	3,6	5	0,3	3	3	5

Tabelle 6.3 Marburg-Virus-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
RNA-Moleküle/µl	**10**	2,7	3	2,7	-	-	2,3	-	3
	100	2,7	3	3	2	3	3	3	2,7
	1000	3	3	3	2,3	2,7	3	3	2,7
	10000	2,7	2,7	2,7	2	2,7	2,7	3	3,3
	100000	3	3	3,3	3,7	2,7	2,3	3,3	3
	1000000	2,7	3	2,7	3,3	3	2,3	3	2,7
	10000000	2,7	2,7	2,7	3	2,7	2,3	3,3	2

Tabelle 6.4 Rift-Valley-Fieber-Virus-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
RNA-Moleküle/µl	**10**	-	-	7	-	-	-	6	-
	100	7	7,7	7	7,3	6	6,3	5	6,7
	1000	6,3	6	6,3	6	5,7	6	5	5
	10000	6	5,7	6	5,7	5,7	5,7	5,3	5,7
	100000	5,3	5,3	5,7	5	5	5,3	5	5
	1000000	5	5	5,7	5	5	5	5	5
	10000000	5	5	5,7	5	5	5	5	3,7

Tabelle 6.5 Sigma-Virus-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
RNA-Moleküle/µl	**10**	9	-	8	-	8	2,3	-	8
	100	6	8	6,3	6	6,3	6,3	5,7	7
	1000	6	6	6	6	6,3	6	6	6
	10000	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,3	5,3	5,7
	100000	5	5,3	5	5,3	5,3	5	5	5
	1000000	5	5	5	5	5	3,7	5	5
	10000000	3,7	2,7	5	5	5	2,3	5	2

6.3.2 Ergebnisse der DNA-RPA-Nachweise

Tabelle 6.6 Bacillus-anthracis-capC-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
DNA-Moleküle/µl	**10**	5,0	6,0	7	-	-	-	-	-
	100	6,7	3,3	7,7	-	5	7	-	-
	1000	7	7	6,3	6	6	6,7	5	5
	10000	6	3	3,3	6,3	6,3	6,3	5,7	5
	100000	5	3,3	6,7	5,7	5,3	5,7	5,7	5
	1000000	3,3	3	5,7	5,3	5,0	5,3	5	5
	10000000	3,3	5,3	2,7	5	2,7	5	5	5

Tabelle 6.7 Bacillus-anthracis-pagA-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
DNA-Moleküle/µl	**10**	7	7	-	9,3	-	8,3	-	7,7
	100	6,7	7,3	6,7	6,7	6,7	7,7	7	7,7
	1000	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3	7,3
	10000	6	5,7	6	6	6	6	6	7
	100000	5	5,3	5	5	5	5,3	5	6,3
	1000000	5	5	5	5	5	5	5	5,7
	10000000	3	3,3	3,7	3,7	5	3,7	5	5

Tabelle 6.8 Francisella-tularensis-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
DNA-Moleküle/µl	**10**	14,7	11	14	-	-	5	-	-
	100	5	10,3	10,7	7	5	8	10,3	7
	1000	5,7	8	6,3	6	6,7	6,7	6,3	6,7
	10000	7	6,7	10	5,7	6	6	6	5,7
	100000	6,3	5,3	6,3	5	5	5	5	5
	1000000	5	6,3	5	3,7	5	5	5	5
	10000000	5,3	2,3	3,3	3	5	3,3	3,7	3,3

Tabelle 6.9 Variola-Virus-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
DNA-Moleküle/µl	**10**	9,7	8,7	8,3	12	-	10,7	-	-
	100	7,7	9	8,3	5	11,7	11,3	13,3	10,7
	1000	6,7	8	7,3	8,7	8,7	8	10,3	9,3
	10000	6,3	7	6,3	6,3	7,7	6,3	8	8
	100000	6	6,3	5	5	7	2,7	7,3	7
	1000000	5	5,7	5	5	6	7,3	6	6,7
	10000000	5	5	5	5	5	5,3	5	5,3

Tabelle 6.10 Yersinia-pestis-Nachweis

		Cp-Wert (min) von 8 Durchläufen							
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
DNA-Moleküle/µl	**10**	9,3	7,3	7,3	7,3	-	-	11	-
	100	7,7	7	6	6,3	5,3	6	6,7	7
	1000	6,3	6,7	7	6	6	5,7	6	5
	10000	5	7	6,3	5,3	5,3	5,3	5	5
	100000	5	5,3	6,7	3,7	5	5	5	5
	1000000	5	5	5,7	5,7	5	3,7	3,7	5
	10000000	3,3	5	5	3,3	3,3	3,3	3,7	3,7

7 Literaturverzeichnis

Alpers K, Stark K, Hellenbrand W, Ammon A (2004): Zoonotic infections in humans. Review of the epidemiological situation in Germany. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 47 (7) 622-632

Asiello PJ, Baeumner AJ (2011): Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. Lab Chip 11 (8) 1420-1430

Balkhy HH, Memish ZA (2003): Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. Int J Antimicrob Agents 21 (2) 153-157

Biofire Diagnostics, Inc.: "R.A.P.I.D.® BioDetection System." URL: http://www.biofiredx.com/RAPID/index.html. Stand: 01.12.2014

Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, Gouyette A, Laval J (1990): Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. J Biol Chem 265 (7) 3916-3922

Borio L, Inglesby T, Peters CJ, Schmaljohn AL, Hughes JM, Jahrling PB, Ksiazek T, Johnson KM, Meyerhoff A, O'Toole Tet al. (2002): Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. JAMA 287 (18) 2391-2405

Brauburger K, Hume AJ, Muhlberger E, Olejnik J (2012): Forty-five years of Marburg virus research. Viruses 4 (10) 1878-1927

Buchwald G (1973): Smallpox in Yugoslavia and Hannover in 1972. Med Klin 68 (39) 1271-1274

CDC (2009): "Emergency Preparedness and Response, Bioterrorism Agents/Diseases." URL: http://www.emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp. Stand: 01.12.2014

CDC (2014): "Ebola Hemorrhagic Fever." URL: http://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html. Stand: 01.12.2014

Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM, Jr. (1997): Biological warfare. A historical perspective. JAMA 278 (5) 412-417

Cobb BD, Clarkson JM (1994): A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. Nucleic Acids Res 22 (18) 3801-3805

Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 69 (8) 2110-2114

Cowan JA (2002): Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. Biometals 15 (3) 225-235

Cox MM, Lehman IR (1987): Enzymes of general recombination. Annu Rev Biochem 56 229-262

Dickmann P, Brockmann S, Ebert B, Wildner M: Die Angst der Gesellschaft vor Infektionen, in: Biologische Gefahren I, Handbuch zum Bevölkerungsschutz, Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, Robert Koch Institut. Bonn, Berlin 2007, 342-352

Dugan L, Bearinger J, Hinckley A, Strout C, Souza B (2012): Detection of Bacillus anthracis from spores and cells by loop-mediated isothermal amplification without sample preparation. J Microbiol Methods 90 (3) 280-284

ECDC (2005-2014): "Epidemiological update: outbreak of Ebola virus disease in West Africa." URL: http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispForm.aspx?List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18ff4cb1b568&ID=1100. Stand: 01.12.2014

Eckert KA, Kunkel TA (1990): High fidelity DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase. Nucleic Acids Res 18 (13) 3739-3744

Ellerbrok H, Nattermann H, Ozel M, Beutin L, Appel B, Pauli G (2002): Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic Bacillus anthracis by real-time PCR. FEMS Microbiol Lett 214 (1) 51-59

Emanuel PA, Bell R, Dang JL, McClanahan R, David JC, Burgess RJ, Thompson J, Collins L, Hadfield T (2003): Detection of Francisella tularensis within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. J Clin Microbiol 41 (2) 689-693

Fakruddin M, Mazumdar RM, Chowdhury A, Mannan KSB (2012): Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)-Prospects and Applications. Int J Life Sci Pharma Res 2 (1) 106-121

Faulde M, Fock R, Hoffmann G, Pietsch M (2002): Vectors and Animal Reservoirs of Pathogens of Imported Life-Threatening Human Infectious Diseases. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 45 (2) 139-151

Fenner F: Smallpox and its eradication, History of international public health, World Health Organization. Geneva 1988, 1460

Ferre F (1992): Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. PCR Methods Appl 2 (1) 1-9

Fraser CM, Dando MR (2001): Genomics and future biological weapons: The need for preventive action by the biomedical community. Nat Genet 29 (3) 253-256

Friesecke DI, Biederbick DW, Boecken DG, Gottschalk PDDR, Koch DH-U, Peters PDG, Peters DS, Sassa DJ, Stich PDA: Biologische Gefahren II, Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage, Bundesamt für Bevölkerungsschutz, Robert Koch Institut. Bonn 2007

Frischknecht F (2003): The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century. EMBO Rep 4 47-52

Gill P, Ghaemi A (2008): Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 27 (3) 224-243

Greenwood DP, Jeys TH, Johnson B, Richardson JM, Shatz MP (2009): Optical Techniques for Detecting and Identifying Biological-Warfare Agents. IEEE 97 (6) 971-989

Gruss A, Moretto V, Ehrlich SD, Duwat P, Dabert P (1991): GC-rich DNA sequences block homologous recombination in vitro. J Biol Chem 266 (11) 6667-6669

Gupta RC, Folta-Stogniew E, O'Malley S, Takahashi M, Radding CM (1999): Rapid exchange of A:T base pairs is essential for recognition of DNA homology by human Rad51 recombination protein. Mol Cell 4 (5) 705-714

Hanczaruk M, Reischl U, Holzmann T, Frangoulidis D, Wagner DM, Keim PS, Antwerpen MH, Meyer H, Grass G (2014): Injectional anthrax in heroin users, europe, 2000-2012. Emerg Infect Dis 20 (2) 322-323

Hartwig A (2001): Role of magnesium in genomic stability. Mutat Res 475 (1-2) 113-121

Hashimoto K, Yonesaki T (1991): The characterization of a complex of three bacteriophage T4 recombination proteins, uvsX protein, uvsY protein, and gene 32 protein, on single-stranded DNA. J Biol Chem 266 (8) 4883-4888

Hawley RJ, Eitzen EM (2001): Biological weapons - A primer for microbiologists. Annu Rev Microbiol 55 235-253

He Q, Marjamaki M, Soini H, Mertsola J, Viljanen MK (1994): Primers are decisive for sensitivity of PCR. Biotechniques 17 (1) 82, 84, 86-87

Heden CG (1967): Defences against Biological Warfare. Annu Rev Microbiol 21 639-&

Hollis DG, Weaver RE, Steigerwalt AG, Wenger JD, Moss CW, Brenner DJ (1989): Francisella philomiragia comb. nov. (formerly Yersinia philomiragia) and Francisella tularensis biogroup novicida (formerly Francisella novicida) associated with human disease. J Clin Microbiol 27 (7) 1601-1608

Hong T, Gurian PL, Huang Y, Haas CN (2012): Prioritizing risks and uncertainties from intentional release of selected Category A pathogens. PLoS One 7 (3) e32732

Ibrahimy MI, Ahmed F, Mohd Ali MA, Zahedi E (2003): Real-time signal processing for fetal heart rate monitoring. IEEE Trans Biomed Eng 50 (2) 258-262

Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani Tet al. (2009): Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. J Med Virol 81 (6) 1102-1108

Ikegami T, Makino S (2011): The pathogenesis of Rift Valley fever. Viruses 3 (5) 493-519

Kaplinski L, Scheler O, Parkel S, Palta P, Toome K, Kurg A, Remm M (2010): Detection of tmRNA molecules on microarrays at low temperatures using helper oligonucleotides. BMC Biotechnol 10 34

Karagoz S, Kilic S, Berk E, Uzel A, Celebi B, Comoglu S, Karagoz A, Akyar I, Can S (2013): Francisella tularensis bacteremia: report of two cases and review of the literature. New Microbiol 36 (3) 315-323

Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, Aldrich S, Harrington T, Formenty P, Loh EHet al. (2012): Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. Lancet 380 (9857) 1936-1945

Karzai AW, Roche ED, Sauer RT (2000): The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. Nat Struct Biol 7 (6) 449-455

Kaspar RL, Robertson DL (1987): Purification and physical analysis of Bacillus anthracis plasmids pXO1 and pXO2. Biochem Biophys Res Commun 149 (2) 362-368

Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM: Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie.12. Auflage, Georg Thieme Verlag. Stuttgart 2010

Kow YW, Wallace SS (1985): Exonuclease III recognizes urea residues in oxidized DNA. Proc Natl Acad Sci 82 (24) 8354-8358

Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, Grolla A, Kamo N, Feldmann H, Kawaoka Y, Yasuda J (2007): Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods 141 (1) 78-83

Kurosaki Y, Sakuma T, Fukuma A, Fujinami Y, Kawamoto K, Kamo N, Makino SI, Yasuda J (2009): A simple and sensitive method for detection of Bacillus anthracis by loop-mediated isothermal amplification. J Appl Microbiol 107 (6) 1947-1956

Kurosaki Y, Grolla A, Fukuma A, Feldmann H, Yasuda J (2010): Development and evaluation of a simple assay for Marburg virus detection using a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol 48 (7) 2330-2336

Kutyavin IV (2008): Use of base-modified duplex-stabilizing deoxynucleoside 5'-triphosphates to enhance the hybridization properties of primers and probes in detection polymerase chain reaction. Biochemistry 47 (51) 13666-13673

Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, van Vuren PJ, Weyer J, Nel LH, Swanepoel R, Morita K, Paweska JT (2009): Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. J Clin Microbiol 47 (3) 645-651

Lebedev Y, Akopyants N, Azhikina T, Shevchenko Y, Potapov V, Stecenko D, Berg D, Sverdlov E (1996): Oligonucleotides containing 2-aminoadenine and 5-methylcytosine are more effective as primers for PCR amplification than their nonmodified counterparts. Genet Anal 13 (1) 15-21

Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF (2005): Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. Clin Microbiol Rev 18 (4) 583-607

Lutz S, Weber P, Focke M, Faltin B, Hoffmann J, Muller C, Mark D, Roth G, Munday P, Armes Net al. (2010): Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). Lab Chip 10 (7) 887-893

Malboeuf CM, Isaacs SJ, Tran NH, Kim B (2001): Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. Biotechniques 30 (5) 1074-1078

Martin JW, Christopher GW, Eitzen EM: History of Biological Weapons: From Poisoned Darts to Intentional Epidemics, in: Medical Aspects of Biological Warfare, Dembek ZF, Borden Institute (U.S. Army Walter Reed). 2008, 1-20

Matero P, Hemmila H, Tomaso H, Piiparinen H, Rantakokko-Jalava K, Nuotio L, Nikkari S (2010): Rapid Field Detection Assays for Bacillus anthracis, Brucella spp., Francisella tularensis and Yersinia pestis. Clin Microbiol Infect 17 (1) 34-43

McCulloch CE, Searle SR, Neuhaus JM: Generalized, Linear, and Mixed Models, John Wiley & Sons. New York 2001

Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K: Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications, Springer Verlag. Berlin; Heidelberg; New York 2001

Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS (2011): The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. Biochemistry 50 (39) 8264-8269

Mims C: Medizinische Mikrobiologie Infektiologie mit Virologie und Immunologie.2. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer. München, Jena 2006

Mitka M (2010): Experimental RNA therapy shows promise against Ebola virus in monkey studies. JAMA 304 (1) 31

Mori Y, Notomi T (2009): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother 15 (2) 62-69

Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155 335-350

Nagai M, Yoshida A, Sato N (1998): Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. Biochem Mol Biol Int 44 (1) 157-163

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res 17 (7) 2503-2516

Niedrig M, Reinhardt B, Burchard G-D, Schmitz H, Tannich E, Tintelnot K, Laude G, Alpers K, Stark K, Mehlhose J: Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten, Robert-Koch-Institut Berlin 2006

Nulens E, Voss A (2002): Laboratory diagnosis and biosafety issues of biological warfare agents. Clin Microbiol Infect 8 (8) 455-466

Okan NA, Bliska JB, Karzai AW (2006): A Role for the SmpB-SsrA system in Yersinia pseudotuberculosis pathogenesis. PLoS Pathog 2 (1) e6

Olinger GG, Jr., Pettitt J, Kim D, Working C, Bohorov O, Bratcher B, Hiatt E, Hume SD, Johnson AK, Morton Jet al. (2012): Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci U S A 109 (44) 18030-18035

Perry RD, Fetherston JD (1997): Yersinia pestis--etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev 10 (1) 35-66

Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME (2009): Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. Vet Res 40 (2) 7

Peyrefitte CN, Boubis L, Coudrier D, Bouloy M, Grandadam M, Tolou HJ, Plumet S (2008): Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of rift valley Fever virus. J Clin Microbiol 46 (11) 3653-3659

PHIL: "Public Health Image Library (PHIL) Photographs, Illustrations, Multimedia Files." URL: http://phil.cdc.gov/phil/home.asp Stand: 01.12.2014

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA (2006): DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol 4 (7) e204

Pourrut X, Souris M, Towner JS, Rollin PE, Nichol ST, Gonzalez JP, Leroy E (2009): Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in Rousettus aegyptiacus. BMC Infect Dis 9 159

Promedmail (2011): "Tularemia, human, possum - Australia." URL: http://www.promedmail.org/direct.php?id=20111122.3425. Stand: 01.12.2014

Putkuri N, Piiparinen H, Vaheri A, Vapalahti O (2009): Detection of human orthopoxvirus infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. J Med Virol 81 (1) 146-152

Qiagen: "ESEQuant Tube Scanner." URL: http://www.qiagen.com/Products/ESEQuantTubeScanner.aspx?r=603. Stand: 01.12.2014

Qiu X, Fernando L, Melito PL, Audet J, Feldmann H, Kobinger G, Alimonti JB, Jones SM (2012): Ebola GP-specific monoclonal antibodies protect mice and guinea pigs from lethal Ebola virus infection. PLoS Negl Trop Dis 6 (3) e1575

Rabozzi G, Bonizzi L, Crespi E, Somaruga C, Sokooti M, Tabibi R, Vellere F, Brambilla G, Colosio C (2012): Emerging zoonoses: the "one health approach". Saf Health Work 3 (1) 77-83

Reuter P: Springer Lexikon Medizin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Berlin 2004

Robert Koch Institut (2007): "Epidemiologisches Bulletin." URL: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/Ausgabenlinks/07_07.pdf?__blob=publicationFile. Stand: 01.12.2014

Rychlik W (1995): Priming efficiency in PCR. Biotechniques 18 (1) 84-86, 88-90

SA Scientific™: "SAS™ Loopamp® Realtime Turbidimeter, LA-320C, Designed specifically for the Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method ". URL: http://www.uib.no/med/avd/ii/nyhetsbrev/2010/15/Turbidimeter.pdf. Stand: 01.12.2014

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York 1989

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74 (12) 5463-5467

Scaramozzino N, Ferrier-Rembert A, Favier AL, Rothlisberger C, Richard S, Crance JM, Meyer H, Garin D (2007): Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses. Clin Chem 53 (4) 606-613

Scheler O, Glynn B, Parkel S, Palta P, Toome K, Kaplinski L, Remm M, Maher M, Kurg A (2009): Fluorescent labeling of NASBA amplified tmRNA molecules for microarray applications. BMC Biotechnol 9 45

Schönhuber W, Le Bourhis G, Tremblay J, Amann R, Kulakauskas S (2001): Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. BMC Microbiol 1 20

Schopf E, Fischer NO, Chen Y, Tok JB (2008): Sensitive and selective viral DNA detection assay via microbead-based rolling circle amplification. Bioorg Med Chem Lett 18 (22) 5871-5874

Shen F, Davydova EK, Du W, Kreutz JE, Piepenburg O, Ismagilov RF (2011): Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip. Anal Chem 83 (9) 3533-3540

Thomas R, Johansson A, Neeson B, Isherwood K, Sjostedt A, Ellis J, Titball RW (2003): Discrimination of human pathogenic subspecies of Francisella tularensis by using restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 41 (1) 50-57

Tomaso H, Reisinger EC, Al Dahouk S, Frangoulidis D, Rakin A, Landt O, Neubauer H (2003): Rapid detection of Yersinia pestis with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. FEMS Immunol Med Microbiol 38 (2) 117-126

Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, Wernery U, Al Dahouk S, Straube E, Neubauer H, Scholz HC (2010): Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC Infect Dis 10 100

Tong Y, Tang W, Kim HJ, Pan X, Ranalli T, Kong H (2008): Development of isothermal TaqMan assays for detection of biothreat organisms. Biotechniques 45 (5) 543-557

Török TJ, Tauxe RV, Wise RP, Livengood JR, Sokolow R, Mauvais S, Birkness KA, Skeels MR, Horan JM, Foster LR (1997): A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. JAMA 278 (5) 389-395

TwistDx Ltd.: " A Revolution in DNA Detection." URL: http://www.twistdx.co.uk/. Stand: 01.12.2014

United Nations (2011): "Population Distribution, Urbanization, Internal Migration and Development: An International Perspective." URL: www.un.org. Stand: 01.12.2014

UNO: Chemische und bakteriologische (biologische) Waffen und die Wirkungen ihrer möglichen Anwendung: der Bericht des Generalsekretärs der Vereinten Nationen vom 1. Juli 1969; mit einem Vorwort des Bundesministers des Auswärtigen, im Auftrag der Bundesregierung in deutscher Übersetzung vorgelegt, Siegler. Bonn; Wien; Zürich 1970

Venkatesan G, Bhanuprakash V, Balamurugan V, Singh RK, Pandey AB (2012): Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of camelpox virus in clinical samples. J Virol Methods 183 (1) 34-39

Weidmann M, Rudaz V, Nunes MR, Vasconcelos PF, Hufert FT (2003): Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. J Clin Microbiol 41 (7) 3299-3305

Whipp MJ, Davis JM, Lum G, de Boer J, Zhou Y, Bearden SW, Petersen JM, Chu MC, Hogg G (2003): Characterization of a novicida-like subspecies of Francisella tularensis isolated in Australia. J Med Microbiol 52 (Pt 9) 839-842

Williams KP, Bartel DP (1996): Phylogenetic analysis of tmRNA secondary structure. RNA 2 (12) 1306-1310

Wittwer C, Hahn M, Kaul K: Rapid Cycle Real Time Pcr-Methods and Applications: Quantification, Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York 2004

World Health Organisation (2010): "Weekly epidemiological record." 5 February 2010, Vol. 85, 6 (pp 37–48) URL: http://www.who.int/wer/. Stand: 30.04.2014

Wower J, Wower IK, Zwieb C (2008): Making the jump: new insights into the mechanism of trans-translation. J Biol 7 (5) 17

Yang S, Rothman RE (2004): PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis 4 (6) 337-348

Yonesaki T, Minagawa T (1985): T4 phage gene uvsX product catalyzes homologous DNA pairing. EMBO J 4 (12) 3321-3327

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Frank Hufert für die freundliche Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Herrn PD Dr. Manfred Weidmann. Nicht nur sein Ideenreichtum und seine zahlreichen Anregungen für die Versuchsgestaltung, sondern auch seine hilfreiche und geduldige Unterstützung zum Verfassen der Dissertation haben besonders zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Dankbar bin ich Dr. Meik Dilcher für seine grenzenlose Geduld und Hilfsbereitschaft. Ich danke Dr. Martin Spiegel für seine geduldige Hilfe bei jeglicher EDV-Problematik.

Susanne Böhlken-Fascher, Tanja Gall, Andrea Paluschkiwitz, Dora Finkeisen und Dr. Bastian Dörrbecker bin ich für die gute Zusammenarbeit dankbar. Insbesondere danke ich Doris Heidenreich und Andrea Koch, die mich in jeden Belangen unterstützt haben.

Ich danke Katha und Julian für die schöne Zeit im Labor und für jegliche emotionale und geistige Unterstützung.

Lebenslauf

Am 20.02.1986 wurde ich, Anna Milena Euler, als Tochter von Dr. med. Horst Kurt Euler und Jutta Margit Euler, in Kassel geboren.

Von 1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule in Fürstenhagen und ab 1996 die Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe „Freiherr-vom-Stein-Schule“ in Hessisch Lichtenau. Die allgemeine Hochschulreife erreichte ich 2005.

Nach einer Au-Pair-Tätigkeit für drei Monate in Brisbane (Australien), begann ich zum Sommersemester 2006 das Studium der Humanmedizin an der Georg August Universität zu Göttingen.

Von Februar bis September 2010 arbeitete ich während eines Freisemesters in der Abteilung Virologie des Universitätsklinikums Göttingen, um meine experimentellen Arbeiten dieser Dissertation durchzuführen.

Ende November 2012 absolvierte ich die Ärztliche Prüfung. Seit April 2013 arbeite ich als Assistenzärztin in der Abteilung für Neurologie im Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin.