

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig- Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.,  
angefertigt am  
Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München  
(Dr. med. Dimitrios Frangoulidis)

**Der Einfluss von WGA-Techniken auf das  
*Coxiella*-Genom  
und  
genotypische Dynamik von *Coxiella burnetii* in  
einer isolierten Herde kleiner Wiederkäuer**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Silvia Maria Reis  
aus Neuwied am Rhein

München, 2014

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meiner Familie

**Die Q ist, allgemein betrachtet,  
derart beliebt und auch geachtet,  
dass einst ein hoch gelehrter Mann  
für unsre Q das "Q" ersann.  
So bleibt sie nun, ewig beredt,  
als Buchstabe im Alphabet. -  
Mich wundert's nur, dass manche Kreise  
abhold sind dieser Schreibweise.**

"Heinz Erhardt"

## I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Coxiella burnetii</i> .....	1
1.1.1	Allgemeines zum Erreger .....	1
1.1.2	Krankheitsbilder bei Tier und Mensch.....	3
1.1.3	Diagnose .....	4
1.1.4	Therapie und Schutzmaßnahmen bei Mensch und Tier.....	5
1.1.5	<i>Coxiella burnetii</i> als bioterroristisches Agens.....	6
1.1.6	Epidemiologie.....	6
1.2	Molekularbiologische Grundlagen.....	9
1.2.1	Das <i>Coxiella-burnetii</i> -Genom.....	9
1.2.2	Typisierung.....	10
1.2.3	Gesamtgenom-Amplifizierung .....	13
1.2.3.1	Geschichte und Nutzen .....	13
1.2.3.2	Multiple Displacement Amplification (MDA) .....	15
1.2.3.3	OmniPlex®-Methode .....	17
1.2.3.4	Gegenüberstellung / Vergleich der WGA-Methoden .....	19
1.2.3.5	Einflussfaktoren / Störfaktoren / Grenzen der WGA-Methoden.....	20
1.3	Ziele der Arbeit.....	21
2	Materialien und Methoden .....	22
2.1	Materialien.....	22
2.1.1	Proben .....	22
2.1.2	Oligonukleotide.....	28
2.2	Methoden .....	29
2.2.1	Vorangegangene Arbeiten.....	29

2.2.1.1	Anzucht von <i>Coxiella burnetii</i> .....	29
2.2.1.2	DNA-Extraktion.....	30
2.2.1.3	Aufbereitung der klinischen Proben .....	30
2.2.2	Gesamtgenom-Amplifizierung .....	30
2.2.2.1	REPLI-g® (Qiagen) .....	31
2.2.2.2	Genomi-Phi V2® (GE-Healthcare).....	31
2.2.2.3	GenomePlex® (Sigma-Aldrich).....	31
2.2.2.4	Reamplifikationskit (Sigma) .....	32
2.2.2.5	REPLI-g® Formalin fixated and Paraffin Embedded Tissue (FFPE)-Kit (Qiagen) .....	32
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion .....	34
2.2.3.1	Real-time-PCR .....	34
2.2.3.1.1	Quantifizierung mittels <i>com1</i> .....	36
2.2.3.1.2	Bestimmung des Plasmidtyps.....	37
2.2.3.1.3	Bestimmung des <i>adaA</i> -Typs.....	37
2.2.3.2	Konventionelle PCR .....	38
2.2.3.2.1	Konventionelle singleplex-PCR .....	38
2.2.3.2.2	Multiplex-PCR .....	40
2.2.3.2.3	Gelelektrophorese .....	41
2.2.4	Typisierungsmethoden .....	42
2.2.4.1	Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA).....	42
2.2.4.2	<i>IS1111</i> -Analyse .....	45
2.2.4.2.1	Primersynthese <i>IS1111</i> -Multiplex 7 - 10 .....	45
2.2.4.2.2	Primer und Protokolle Multiplex 1 - 10 .....	48
2.2.5	Sequenzierung .....	52
2.2.5.1	Aufreinigung der Amplifikate.....	52
2.2.5.2	Gelextraktion .....	52
2.2.5.3	Farbmarkierung .....	53
2.2.5.4	Aufreinigung der markierten Amplifikate .....	54
2.2.5.5	Sequenzierung der PCR-Produkte nach WGA .....	54

2.2.5.6	Auswertung der Sequenzen .....	54
2.2.6	Statistik .....	55
2.2.7	Bestimmung der Gesamt-DNA-Menge .....	56
3	Ergebnisse .....	57
3.1	Gesamtgenom-Amplifizierung .....	57
3.1.1	Quantitative Untersuchung .....	57
3.1.1.1	REPLI-g® .....	57
3.1.1.2	GenomiPhi® .....	58
3.1.1.3	GenomePlex® .....	60
3.1.1.4	REPLI-g® FFPE-Kit.....	61
3.1.1.5	Kompatibilität und doppelte Anwendung.....	62
3.1.2	Qualitative Untersuchungen .....	66
3.1.2.1	Die “housekeeping“-Gene .....	66
3.1.2.1.1	Sequenzierung der “housekeeping“-Gene .....	68
3.1.2.2	Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA).....	69
3.1.2.3	<i>IS1111</i> -Analyse .....	73
3.1.2.3.1	Sequenzierung der Zusatzbanden.....	75
3.1.2.3.2	Statistische Auswertung <i>IS1111</i> -Analyse .....	76
3.1.3	Zusammenfassung der qualitativen Ergebnisse .....	79
3.2	Herdenuntersuchung Oberer Lindenhof Mai 2009 .....	81
3.2.1	Die “housekeeping“-Gene Mai 2009 .....	81
3.2.2	Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) Mai 2009 ..	81
3.2.3	<i>IS1111</i> -Verteilung Mai 2009 .....	83
3.3	Herdenuntersuchung Oberer Lindenhof Juni – September 2009 .....	84
3.3.1	Die “housekeeping“-Gene Juni – September 2009 .....	84
3.3.2	Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) Juni – September 2009.....	84
3.3.3	<i>IS1111</i> -Verteilung Juni – September 2009 .....	87
3.4	Proben 2010 – 2011 .....	89

---

3.4.1	Die "housekeeping"-Gene 2010 – 2011 .....	89
3.4.2	Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) 2010 – 2011 .....	89
3.4.3	<i>IS1111</i> -Verteilung 2010 – 2011 .....	89
3.5	Zusammenhang mit dem Phänotyp .....	90
3.6	Phylogenie und Vergleich mit Stammsammlung .....	92
4	Diskussion .....	94
4.1	Evaluierung der WGA-Kits .....	94
4.1.1	Quantitative Untersuchung .....	94
4.1.2	Qualitative Untersuchung .....	100
4.2	Herdenuntersuchung Oberer Lindenhof .....	109
4.2.1	Typisierungsmethoden .....	109
4.2.2	Zusammenhang mit dem Phänotyp .....	112
4.2.3	Vergleich mit anderen Erregern und Epidemiologie .....	116
<b>II.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>120</b>
<b>III.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>122</b>
<b>IV.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>124</b>
<b>V.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>136</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (= französische Agentur für Lebensmittel- und Verbrauchersicherheit)
A	Ampere
ADP/ATP	Adenosin-Diphosphat / Adenosin-Triphosphat
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Restriktionsenzym Typ II
Bp	Basenpaar(e)
BGM	buffalo green monkey
BioStoffV	Biostoffverordnung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
<i>com1</i>	<i>Coxiella</i> outer membrane protein 1
C <sub>t</sub>	cycle threshold
DNA	deoxyribonucleic-acid
dt.	deutsch
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> -Stamm R Nuklease I
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
FFPE	formalinfixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe
fg	Femtogramm
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
Fn-Rate	Falschnegativen-Rate
Fp-Rate	Falschpositiven-Rate
GP	GenomePlex®
GPR	GenomePlex® + Reamplifikation
GPhi	GenomiPhi®
ID <sub>50</sub>	(minimale) Infektionsdosis, bei der 50 % der Infektionen zur Erkrankung führen
IgG/A/M	Immunglobulin G / Immunglobulin A / Immunglobulin M
IS	Insertionssequenz

kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LCV	large cell variant
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MDA	multiple displacement amplification
µg	Mikrogramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MLVA	multilocus variable number of tandem repeats analysis
MST	multispacer sequence typing assay
NCBI	National Centre of Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NM	Nine Mile
Not	<i>Nocardia otitidis-cavarium</i> Restriktionsenzym Typ II
OIE	Office International des Epizooties (= Weltorganisation für Tiergesundheit)
PCR	polymerase chain reaction
PFGE	Puls-Feld-Gel-Elektrophorese
QpH1/RS/DV	Q-Fieber-Plasmid H1/RS/DV
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen
Rg	REPLI-g®
SCV	small cell variant
SDS	strand displacement synthesis
Std.	Stunde
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Elektrophorese-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Units
V	Volt
VT	Vaginaltupfer
WGA	whole genome amplification

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gemeldete Neuausbrüche (Betriebe) .....	7
Tabelle 2: Übersicht über Kit-Charakteristika .....	19
Tabelle 3: Verwendete Proben .....	25
Tabelle 4: Übersicht Versuchsaufbau REPLI-g® FFPE Kit .....	34
Tabelle 5: Chemikalien für real-time-PCR .....	35
Tabelle 6: Primer für real-time-PCRs.....	36
Tabelle 7: Mastermix für die Singleplex 1 .....	39
Tabelle 8: Mastermix für die Singleplex 2 .....	39
Tabelle 9: Thermoprotokoll der Singleplex 1 .....	39
Tabelle 10: Thermoprotokoll der Singleplex 2 .....	40
Tabelle 11: Alternativprimer der QpH1-PCR.....	40
Tabelle 12: Chemikalien für die Gelelektrophorese .....	42
Tabelle 13: Primer MLVA-multiplex-PCRs.....	43
Tabelle 14: Mastermix für die MLVA.....	44
Tabelle 15: Primerpositionen IS1111 1 – 20 auf dem Nine Mile-Genom (RSA 493) .....	46
Tabelle 16: Neue Primer .....	48
Tabelle 17: Mastermix Multiplexe 1,4,7 - 10 .....	49
Tabelle 18: Mastermix Multiplexe 2,3 .....	49
Tabelle 19: Mastermix Multiplex 5 .....	49
Tabelle 20: Mastermix Multiplex 6 .....	50
Tabelle 21: IS1111-multiplex-PCR Primer für insgesamt 52-Elemente .....	50
Tabelle 22: Thermoprotokoll IS1111-multiplex-PCR.....	52
Tabelle 23: Nine Mile nach REPLI-g® .....	57
Tabelle 24: Nine Mile mit hoher Ausgangskonzentration nach REPLI-g® .....	58
Tabelle 25: Klinische Probe nach REPLI-g® .....	58
Tabelle 26: Nine Mile nach GenomiPhi® .....	59
Tabelle 27: Nine Mile hohe Ausgangskonzentration nach GenomiPhi® .....	59
Tabelle 28: Klinische Probe nach GenomiPhi® .....	60
Tabelle 29: Nine Mile und klinische Probe nach GenomePlex® .....	60
Tabelle 30: Nine Mile und klinische Probe nach GenomePlex® und Reamplifikation .....	61
Tabelle 31: Nine Mile nach REPLI-g® FFPE Kit .....	61

Tabelle 32: Nine Mile nach GenomiPhi®/ REPLI-g® mit Reamplifikation.....	63
Tabelle 33: Klinische Probe nach doppelter Anwendung von GenomiPhi® .....	63
Tabelle 34: Klinische Probe nach doppelter Anwendung von REPLI-g® .....	64
Tabelle 35: Klinische Probe nach doppelter Anwendung von GenomiPhi® mit Aufreinigung .....	64
Tabelle 36: Klinische Probe nach doppelter Anwendung von REPLI-g® mit Aufreinigung .....	65
Tabelle 37: Gemittelte Ct-Werte der "housekeeping"-Gene nach Amplifikation .....	67
Tabelle 38: Gemittelte Ct-Werte der "housekeeping"-Gene nach Amplifikation .....	67
Tabelle 39: MLVA-Ergebnisse Überblick .....	70
Tabelle 40: Korrigierte Fehlerangaben.....	71
Tabelle 41: Korrigierte Fehlerrate .....	71
Tabelle 42: MLVA-Ergebnisse nach doppelter Anwendung.....	72
Tabelle 43: Korrigierte Fehlerangaben.....	72
Tabelle 44: MLVA-Ergebnisse nach doppelter Anwendung.....	73
Tabelle 45: Korrigierte Fehlerangaben.....	73
Tabelle 46: Ergebnisse IS1111-Analyse Überblick .....	77
Tabelle 47: Statistik aus IS1111 Analysen .....	78
Tabelle 48: Korrigierte Fehlerangaben in Bezug auf Tabelle 46.....	79
Tabelle 49: Zusammenfassung MLVA-Fehlerraten der klinischen Probe .....	79
Tabelle 50: Zusammenfassung IS1111-Falschklassifikationsrate der klinischen Probe .....	80
Tabelle 51: MLVA-Ergebnisse Mai 2009 .....	82
Tabelle 52: Häufigkeitsverteilung der fünf Genotypen von Mai 2009.....	84
Tabelle 53: MLVA-Ergebnisse Oberer Lindenhof 20.07. - 13.09.2009 .....	86
Tabelle 54: Häufigkeitsverteilung der 3 Genotypen am Oberen Lindenhof vom 20.07.- 13.09.2009.....	88
Tabelle 55: Häufigkeitsverteilung der IS-Elemente in Prozent.....	90
Tabelle 56: Verteilung der Genotypen im Zusammenhang mit der Spezies .....	91
Tabelle 57: Verteilung der Genotypen im Zusammenhang mit dem Probenmaterial	91
Tabelle 58: Verteilung der Genotypen im Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Probennahme .....	92

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemeldete Q-Fieber-Infektionen beim Menschen 2001 - 2013 .....	7
Abbildung 2: Strangablösungssynthese .....	16
Abbildung 3: Flussdiagramm der Ereignisse am Oberen Lindenhof.....	24
Abbildung 4: Primerauswahl am Beispiel IS 5 .....	47
Abbildung 5: Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse für die klinische Probe .....	65
Abbildung 6: Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse für Nine Mile .....	66
Abbildung 7: Beispielhafter Teil des Alignments der Sequenzen der <i>IS1111</i> -real- time-PCR nach WGA (M= A/C ; S= G/C ).....	69
Abbildung 8: Vergleich der MLVA-Fehlerraten der jeweiligen doppelten Anwendung mit und ohne Zwischenaufreinigungsschritt.....	80
Abbildung 9: <i>IS1111</i> -Verteilung Oberer Lindenhof Mai 2009.....	83
Abbildung 10: MLVA-Verteilung Oberer Lindenhof Juni – September 2009.....	87
Abbildung 11: <i>IS1111</i> -Verteilung Oberer Lindenhof Juni – September 2009.....	88
Abbildung 12: Verwandtschaftsverhältnisse aller gefundenen Genotypen .....	92
Abbildung 13: Sekundärstruktur am Marker ms01 .....	103
Abbildung 14 : Möglicher Mechanismus der Chimärenbildung bei der OmniPlex®- Methode .....	105

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits teilweise veröffentlicht:

Reis, SM, Kahlhofer, C, Walter, MC, Frangoulidis, D. 2013. Whole Genome Amplification (WGA) in *Coxiella* diagnostics and typing. Medical Biodefense Conference 2013. Genomics, Metagenomics and Beyond. Poster: NP 12. 22. – 25. Oktober 2013, München, Deutschland.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Coxiella burnetii*

### 1.1.1 Allgemeines zum Erreger

Q-Fieber wurde erstmals 1935 in Queensland, Australien, bei einem Ausbruch ungeklärter fieberhafter Erkrankungen unter Schlachthofmitarbeitern als „query Fever“ (dt.: „fragliches Fieber“) beschrieben, da die auslösende Ursache zunächst unklar war (1). Im selben Jahr gelang Burnet und Freeman die Isolierung des verursachenden Erregers *Rickettsia burnetii* (heute *Coxiella burnetii*) (2).

Es handelt sich um ein obligat intrazelluläres, 0,2 - 0,4 µm x 0,4 - 1,0 µm großes, gramnegatives Bakterium, das weltweit vorkommt. Ausnahmen sind lediglich die Antarktis (3) und Neuseeland (4). Taxonomisch wurden die Coxiellen aufgrund ihrer äußerlichen Ähnlichkeit anfangs der Ordnung Rickettsiales zugeordnet. 1989 gelang es Weisburg et al. mittels 16S rRNA-Analysen die Coxiellen als der Ordnung der Legionellales zugehörig zu identifizieren. Hier bilden sie eine eigene Familie, die *Coxiellaceae* (5).

Neben der vegetativen, intrazellulären Form (großzellige Variante oder large cell variant: LCV) wird auch eine extrazelluläre, sporenähnliche Form (kleinzellige Variante oder small cell variant: SCV) beschrieben (6). Diese sporenähnliche, kleinzellige Variante verleiht dem Erreger eine sehr hohe Widerstandskraft gegen Umwelteinflüsse. Sie bleibt im Boden oder in Stäuben jahrelang, in Lebensmitteln, Wasser oder auf Oberflächen monatelang stabil (6, 7). Der Wirt infiziert sich mit der kleinzelligen Variante. Zielzellen sind sowohl Gewebsmakrophagen, die zum Beispiel in Lymphknoten, Milz, Lunge und Leber lokalisiert sind, als auch im Blut befindliche Monozyten (8, 9). Nach Aufnahme des Erregers, meist durch Inhalation, dockt dieser an eine Wirtszelle an und wird durch rezeptorvermittelte Phagozytose aufgenommen. Nach Verschmelzen des Phagosoms mit dem Lysosom befindet sich die Coxielle im sauren Milieu des Phagolysosoms. Die Coxiellen-typischen, intrazellulären Vakuolen entstehen durch Verschmelzen mehrerer Phagolysosomen. Der Erreger wandelt sich im sauren Milieu der Vakuole in die vegetative Form um und vermehrt sich (10). Die Mechanismen, die dahinter stehen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Des Weiteren besitzt *Coxiella burnetii* zwei Antigenphasen (11), die sich, wie bei der Familie der Enterobacteriaceae, durch unterschiedliche Ausbildung der oberflächlichen Lipopolysaccharide (LPS) unterscheiden (12). Phase I, die ein komplettes LPS auf der Oberfläche aufweist, ist die virulente Form (13) und wird sowohl bei natürlich erkrankten als auch bei im Labor infizierten Tieren gefunden (14). Phase II hingegen besitzt ein rudimentäres LPS auf der Oberfläche (15) und gilt als eine weniger virulente Form, die man nach mehrmaliger Zellkultur- oder Eipassage vorfindet (14, 16).

Die zwei Phasen spielen besonders bei der serologischen Diagnostik und der Impfstoffentwicklung eine Rolle. So findet man bei einer akuten Infektion hohe Titer mit IgG- und IgM-Antikörpern gegen Phase II und nur niedrige Titer gegen Phase I. Erst bei einer chronischen Infektion steigen die IgG- und IgA-anti-Phase-I-Antikörpertiter auf das Niveau der Phase-II-Immunantwort an und können diese sogar übertreffen (16).

Der Erreger hat ein sehr breites Wirtsspektrum, löst aber nur bei Menschen, Schafen, Ziegen und Rindern eine Erkrankung aus (17-19). Als Reservoir dienen ihm neben Säugern auch Vögel, Reptilien und Arthropoden, insbesondere Zecken (19-21). Die Ausscheidung von *Coxiella burnetii* erfolgt bei Rindern, Ziegen und Schafen über Milch, Kot, Urin, Speichel und im Besonderen über Vaginalsekrete und Geburtsprodukte, wie Plazenta und Amnionflüssigkeit (22-25). In eingetrocknetem Zustand ist auch eine Verbreitung durch den Wind bis über fünf Kilometer Entfernung beschrieben, was eine Identifizierung der Infektionsquelle erschwert (26-29).

Beim Menschen reicht unter experimentellen Bedingungen die Inhalation einer einzigen Coxielle aus, um eine Infektion zu verursachen (30). Am embryonierten Hühnerei, an Mäusen und Meerschweinchen wurde durch Ormsbee et al. 1978 eine ID<sub>50</sub> von 0,6 bis 2 Erregern bestimmt (31).

Die Möglichkeit einer oralen Infektion ist bis heute umstritten, da hier nach Expositionsversuchen wesentlich mehr Erreger benötigt werden als für die aerogene Infektion (32, 33). Solche Erregerkonzentrationen wurden in der Milch bisher jedoch noch nie nachgewiesen (34). Dennoch rät das Bundesinstitut für Risikobewertung vom Konsum roher Milch aus infizierten Beständen ab (35).



### 1.1.2 Krankheitsbilder bei Tier und Mensch

Q-Fieber ist eine Krankheit mit variabler Klinik. Bei adulten Wiederkäuern verläuft die Infektion meist symptomlos. Es kann aber zu Fruchtbarkeitsproblemen, Metritiden, Aborten und zur Geburt lebensschwacher Nachkommen kommen (36), wobei sich die Schwere der Erkrankung je nach Tierart unterscheidet. Bei infizierten Ziegen kann es in bis zu 90 % der Fälle zum Abort kommen (37), während Rinder selten abortieren. Aber auch hier kann eine Infektion in der Herde durch Unfruchtbarkeit, Metritiden und Mastitiden zu hohen finanziellen Verlusten führen (24). Bei Schafen verläuft die Infektion meist klinisch inapparent. Verlämungen und Frühgeburten sind die häufigsten klinischen Veränderungen (38). Differentialdiagnostisch sind alle anderen Abortursachen, wie zum Beispiel der Chlamydienabort der Schafe (*Chlamydia abortus*), eine Infektion mit *Campylobacter fetus*, *Listeria monocytogenes* oder die Brucellose zu bedenken. Auch virale Ursachen, wie die Bovine Virusdiarrhöe oder das Bovine Herpesvirus 1, kommen insbesondere bei Rindern infrage. Bei einer atypischen Pneumonie sind unter anderem Mykoplasmeninfektionen auszuschließen (38, 39).

Beim Menschen unterscheidet man eine akute und eine chronische Form (40).

Die akute Form, die bei etwa 98 % aller Infizierten auftritt, lässt sich wiederum in zwei Verläufe einteilen. Bei 50 % verläuft sie meist harmlos und ist durch grippeähnliche Symptome, die häufig mit einer atypischen Pneumonie oder / und einer granulomatösen Hepatitis einhergehen, gekennzeichnet. Die restlichen 50 % serokonvertieren asymptomatisch (7, 41).

Bei ca. 2 – 5 % der Infizierten kommt es zu einer chronischen Manifestation (42). Die Endokarditis ist hier der häufigste Befund (43, 44), wobei auch chronische Hepatitis, Osteomyelitis, septische Arthritis, interstitielle Pneumonie und Chronisches Erschöpfungssyndrom beschrieben werden (45, 46).

Differentialdiagnostisch kommen beim Mensch in unseren Breitengraden neben Influenza auch die Legionärskrankheit (hervorgerufen durch Bakterien der Gattung *Legionella*), Mykoplasmeninfektionen (z.B. *Mycoplasma pneumoniae* oder *Mycoplasma fermentans*) und die Tularämie infrage, während in tropischen Gegenden auch Dengue-Fieber und Malaria ausgeschlossen werden müssen (47).

Bei Schwangeren kann eine akute Infektion in 29 % der Fälle zum Abort oder zu Missbildungen des Fetus führen (48, 49). Allerdings wies das European Centre for

Disease Prevention and Control (ECDC) 2010 darauf hin, dass es aufgrund der mangelhaften Datenlage keinen absoluten Beweis für diese Aussagen gibt (50).

Die unterschiedlichen Ausprägungen und die meist milden Verläufe sind die Ursache, dass diese Zoonose selten diagnostiziert und entsprechend selten gemeldet wird. Es ist daher von einer hohen Dunkelziffer auszugehen (51).

In Deutschland ist bei Tieren der Nachweis von *Coxiella burnetii* nach Tierseuchengesetz (§78a Abs. 2 TierSG) immer meldepflichtig, bei Menschen nach Infektionsschutzgesetz (§7(1) IfSG) nur dann, wenn er auf eine akute Infektion hinweist (siehe auch 1.1.6).

### 1.1.3 Diagnose

Die Diagnose des Q-Fiebers beim Menschen oder subklinisch infizierten Herden über den Nachweis des Erregers ist schwierig, weil dieser in den gängigen Probenmaterialien, wie beispielsweise im Blut, Serum oder verschiedenen Tupferproben meist nur in sehr niedrigen Konzentrationen zu finden ist (52). Als Goldstandard sowohl bei tierischen als auch bei Humaninfektionen gilt die Serologie. Es werden mit Hilfe von ELISA oder indirekten Immunfluoreszenztests Antikörper gegen Phase I- und Phase II-Antigen im Serum nachgewiesen, wobei je nach Verteilung und Höhe der Titer eine Aussage über den Krankheitsverlauf gemacht werden kann (17).

Die Anzucht von *Coxiella burnetii* ist langwierig und darf nur in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 erfolgen, was diese Methode für viele Einrichtungen von vornherein ausschließt. Es werden zum einen embryonierte Hühnereier, zum anderen verschiedene Zellkulturlinien, wie zum Beispiel L929, Vero-Zellen oder, wie am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München, Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze (buffalo green monkey cells (BGM)), verwendet als Zelllinienvariante der Vero-Zellen (53, 54). Nach zirka zweiwöchiger Inkubation kann der Erreger als kurzes Stäbchen in Vakuolen infizierter Zellen mittels Licht- oder Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht oder gegebenenfalls im Anschluss mittels spezifischer PCR-Methoden identifiziert werden.

Die bei weitem sensitivste und schnellste Methode zum Nachweis in klinischem Material stellt die PCR dar (55). Hier wird entweder mit konventioneller gelbasierter Technik oder mit der real-time-Variante nach einem der sogenannten „housekeeping“-Gene der Coxiellen (z.B. IS1111, *com1* und *adaA*) gesucht (56-58). Es handelt sich hierbei um *Coxiella*-spezifische Gene.

#### 1.1.4 Therapie und Schutzmaßnahmen bei Mensch und Tier

Die Therapie einer akuten Infektion beim Menschen besteht aus der oralen Einnahme von 200 mg Doxycyclin pro Tag für 14 bis 21 Tage (59). Im chronischen Fall erstreckt sich die Behandlung über 18 bis 36 Monate, wobei selbst dann die Chancen auf eine komplette Heilung gering sind. Dabei wird 200 mg Doxycyclin mit 600 mg Hydroxychloroquin, was den pH-Wert im Phagolysosom anhebt, kombiniert (59). Bei Schwangeren kann mit Cotrimoxazol (160 mg Trimethoprim und 800 mg Sulfamethoxazol) alle 12 Std. oder mit Rifampicin alle 8 Std. bakteriostatisch bis zur Geburt und anschließend wie bei einer chronischen Infektion behandelt werden (59). Die Gabe von Muttermilch an das Neugeborene ist aufgrund der möglichen Übertragung des Erregers kontraindiziert (50). Eine Impfung auf der Basis von inaktivierten Coxiellen ist nur in Australien zugelassen (Q-Vax<sup>®</sup>, Commonwealth Serum Laboratories) (60, 61).

Die Therapie beim Tier ist immer mit dem Amtstierarzt abzusprechen. Handelt es sich bei den infizierten Tieren um Rinder, so ist eine Bestandssperre vorzunehmen, die Milch zu pasteurisieren und die ganze Herde mittels Blut- und Milchserologie zu untersuchen (39). Es obliegt dann dem Ermessen des Amtstierarztes, ob die Reagenten oder nur die Ausscheider ausgemerzt werden müssen. Eine Einzeltierbehandlung kann analog dem Menschen mit Tetrazyklinen erfolgen, während eine Herdenbehandlung im Falle latenter Ausscheidung aufgrund der ständigen Reinfektionen nicht sinnvoll erscheint (38, 39).

Seit November 2010 ist in Deutschland mit Coxevac<sup>®</sup> (bestehend aus Phase I-Antigen; CEVA Santé Animale) ein Impfstoff für Rinder und Ziegen zugelassen, der die Ausscheidung des Erregers und die klinischen Symptome reduzieren soll. 2013 konnten Eibach et al. die Wirksamkeit zur Reduktion der Ausscheidung bestätigen (62).

### 1.1.5 *Coxiella burnetii* als bioterroristisches Agens

Gemäß BioStoffV ist *Coxiella burnetii* der Risikogruppe 3 zugeordnet und nur unter entsprechenden Schutzmaßnahmen zu handhaben bzw. anzuzüchten. Der Erreger ist zwar nicht als tödliches Agens einzustufen (Gesamtleletalität assoziierter Infektionen < 2 %), jedoch kann es zu längerer Arbeitsunfähigkeit und damit zu hohen Ausfallraten in der Bevölkerung kommen (63).

Wegen der Möglichkeit durch aerogene Verbreitung schnell viele Menschen zu infizieren, wegen seiner ausgeprägten Umweltstabilität und aufgrund der vorher erwähnten geringen Infektionsdosis wird der Erreger als potentieller biologischer Kampfstoff angesehen (52). Laut CDC-Klassifikation (Centers for Disease Control and Prevention) ist er als bioterroristisches Agens der Gruppe B eingestuft (64). Das CDC richtet sich bei der Einteilung nach Letalitätsrate, Verfügbarkeit, Ansteckungsgefahr und Behandlungsmöglichkeit des Erregers und der assoziierten Erkrankung. In Gruppe B befinden sich relativ leicht zu verbreitende Erreger mit einer mittleren Letalitätsrate, die aber leicht einzudämmen und zu überwachen sind. Neben den Coxiellen gehören unter anderem auch die Brucellen und der Erreger des Rotzes *Burkholderia mallei* zur Gruppe B.

In den früheren Biowaffenprogrammen der USA und der ehemaligen Sowjetunion wurde *Coxiella burnetii* als Biowaffe entwickelt und getestet (65, 66).

### 1.1.6 Epidemiologie

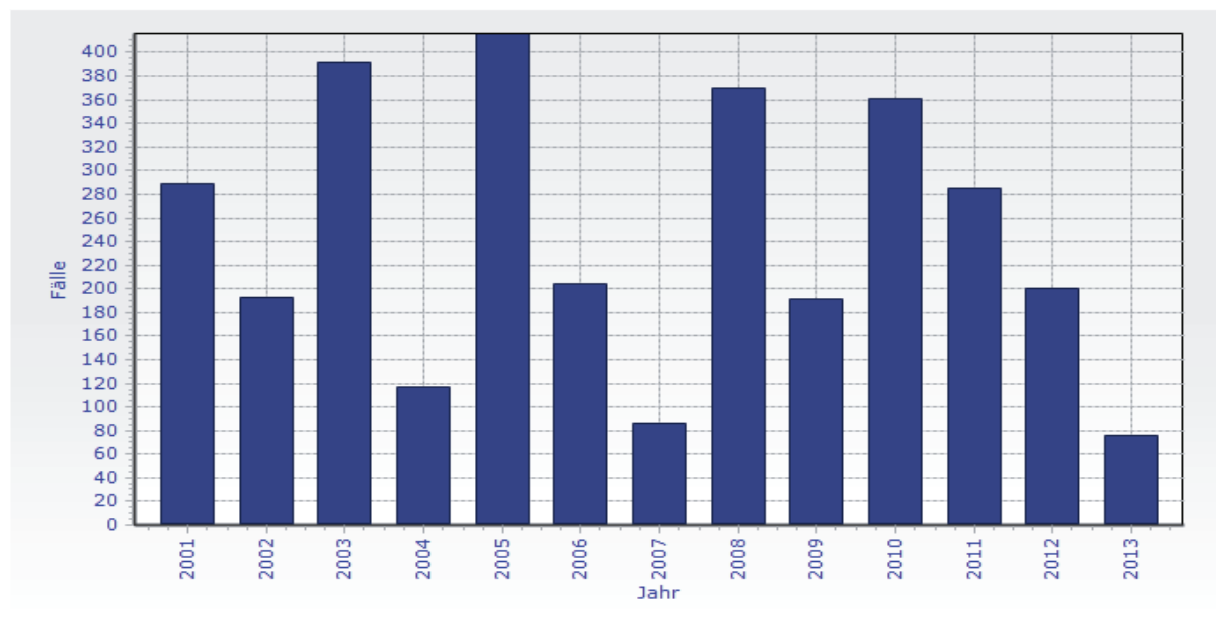
Für die Tiermedizin insbesondere in der Nutztierhaltung ist *Coxiella burnetii* ein nicht zu vernachlässigender Erreger. In den letzten Jahren sind insbesondere die Zahlen der neuinfizierten gemeldeten Rinderbetriebe weiter angestiegen. Inwieweit die seit November 2011 durchgeführten Impfungen eine Besserung bringen, lässt sich noch nicht absehen.

**Tabelle 1:** Gemeldete Neuausbrüche (Betriebe)

Quelle: Friedrich Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tiergesundheitsjahresbericht 2003 – 2011; Datenstand 09.10.2013

	Rind	Schaf	Ziege	Sonstige	Gesamt
2005	106	3	1	1	111
2006	87	6	1	2	96
2007	96	9	0	4	109
2008	124	22	5	0	162
2009	126	8	4	1	139
2010	123	12	3	3	141
2011	156	18	3	0	177

In Deutschland wurde das Q-Fieber beim Menschen zum ersten Mal 1947/48 diagnostiziert (67). Seitdem gilt es in Deutschland als endemisch. Die meisten dieser Fälle konnten auf Kontakt zu Schafen zurückgeführt werden (68).

**Abbildung 1:** Gemeldete Q-Fieber-Infektionen beim Menschen 2001 - 2013

Quelle: Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand 07.10.13

So erkrankten zum Beispiel im Sommer 2001 einige Mitglieder einer Tatort-Filmcrew nach Dreharbeiten auf einem bewirtschafteten Schafhof in der Nähe von München. Sie gaben an, mit Wind- und Nebelmaschinen in einem der Ställe gedreht zu haben, wobei es zu erheblicher Staubaufwirbelung kam. Siebzehn weitere Personen, die

unabhängig von dem Dreh in direktem oder indirektem Kontakt zu der Schafherde gestanden hatten, erkrankten ebenfalls (69).

Ebenso erkrankten 2003 rund dreihundert Menschen nach dem Besuch eines Bauernmarktes in Soest (Nordrhein-Westfalen), auf dem ein infiziertes Schaf Zwillingslämmer zur Welt gebracht hatte (70). 2005 erkrankten sogar mehr als 320 Personen im Raum Jena an Q-Fieber. Hier hatte eine Schafherde, bei der im Nachhinein anhand von Abortmaterial Q-Fieber diagnostiziert wurde, in der Nähe eines Wohngebiets geweidet (71).

Der weltweit größte dokumentierte Q-Fieberausbruch ereignete sich von 2007 bis 2011 in den Niederlanden, wo sich mehr als 3.500 Menschen infizierten (29). In diesem Fall war nicht das Schaf, sondern die Ziege als Infektionsquelle identifiziert worden. Die Frage, warum sich die Krankheit in den Niederlanden so rasant verbreiten konnte, wurde intensiv untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass die besondere Infrastruktur und dichte Besiedlung des Landes in direkter räumlicher Nähe zu den verursachenden Ziegenfarmen, sowie die hiesigen Wetterverhältnisse (Wind) eine entscheidende Rolle spielten. Auf einem Quadratkilometer lebten zur Zeit des Ausbruchs 492 Menschen und 23 Milchziegen. Speziell in der südlichen Provinz Noord-Brabant war 2007 die Dichte an Milchziegenfarmen extrem hoch (<http://statline.cbs.nl/statweb/>; (72)), wobei 26 % der 306 in dieser am schwersten betroffenen Region befindlichen Ziegenfarmen Q-Fieber-positiv waren (29). Die räumliche Nähe, die leichte Übertragung über den Luftweg und die geringe Infektionsdosis von *Coxiella burnetii* waren wohl ausschlaggebend für das Ausmaß dieses Ausbruchs.

Im Zuge der Bekämpfung des Ausbruchs in den Niederlanden wurden die Farmen umfassenden Impfprogrammen und Hygienemaßnahmen unterworfen. Da trotzdem die humanen Infektionen weiter zunahmen, wurde bis auf weiteres ein Ziegenzuchtverbot verhängt und die Keulung von insgesamt rund 62.500 tragenden Ziegen auf den positiv getesteten Farmen angeordnet (29). Dank dieser umfassenden Maßnahmen konnte das Infektionsgeschehen letztendlich zurückgedrängt werden.

## 1.2 Molekularbiologische Grundlagen

### 1.2.1 Das *Coxiella-burnetii*-Genom

Das Genom des Q-Fieber-Referenzstammes, der erstmalig in den USA im Gebiet „Nine Mile“ aus einer Zecke isoliert werden konnte, wurde 2003 komplett sequenziert (73). Seither sind sechs weitere gefolgt, die in der NCBI Datenbank zur Verfügung stehen: Dugway 5J108-111, Q321, RSA 331, Q154, Q177 und Q212 (NCBI Genome Refseq: NC\_002971, NC\_009727, NC\_010117, NZ\_AAYJ00000000, NC\_011528, NC\_011527).

*Coxiella burnetii* verfügt über ein zirkuläres Genom von 1,9 bis 2,4 Millionen Basenpaaren (Nine Mile 1,99 Millionen bp) mit 89,1 % kodierenden Sequenzen (73). Die Coxiellen sind in vielerlei Hinsicht einzigartig. Ihre isolierte Stellung als eigene Spezies konnte anhand der Erkenntnisse, die durch die Gesamtgenomsequenzierung gewonnen wurden, noch weiter gefestigt werden. So besitzen Coxiellen beispielsweise, für ihren intrazellulären Lebensstil untypisch, viele genetisch identische, mobile Elemente, die Insertionssequenz-Elemente (IS-Elemente) (73). Wie bei intrazellulären Bakterien üblich, fand auch bei *Coxiella burnetii* eine evolutionäre Entwicklung durch Reduktion des Genoms statt, jedoch in weit höherem Ausmaß. Das Genom des Nine Mile verfügt über 83 Pseudogene, die durch Rasterverschiebungen, Punktmutationen oder Abbrüche entstanden sind (73). In Bereichen des Genoms, die für Resistenzmechanismen verantwortlich sind, scheinen diese Pseudogene überrepräsentiert. Das könnte der Grund für die geringe Antibiotikaresistenz von *Coxiella burnetii* sein (74).

Auch in Bezug auf metabolische Kapazitäten und Möglichkeiten gehen die Coxiellen eigene Wege. Anders als Rickettsien oder Chlamydien besitzen Coxiellen keine ATP/ADP-Translokase, die ihnen den Gebrauch von wirtseigenem ATP erlauben würden (73). Im Gegensatz zu anderen obligat intrazellulären Organismen besitzt *Coxiella* viele biosynthetische Fähigkeiten, wie zum Beispiel Enzyme zur Glykolyse und andere für eukaryotische Zellen typische Gene (73).

Um im sauren Milieu des Phagolysosoms überleben zu können, besitzt *Coxiella burnetii* ein ausgeklügeltes Transportersystem aus vier Natriumionen-Austauschpumpen, drei mechanosensitive Ionenkanäle sowie drei weitere Transporter zum Schutz vor osmotischem Stress (73).



Statt der Gene, die für Pili oder ähnliche typische Adhäsionsstrukturen kodieren, finden sich im Coxiellengenom dreizehn Ankyrine zur Zellanhaftung (73).

### 1.2.2 Typisierung

Im Laufe der letzten Jahre hat die Genotypisierung als Mittel der bioforensischen Aufklärung an Bedeutung gewonnen. Während die Forensik sich mit der Identifikation, Analyse und Rekonstruktion von Vorgängen beschäftigt, spielt die Bioforensik insbesondere eine Rolle im Hinblick auf die Infektkettenaufklärung und die Verbreitung bestimmter Stämme, um eventuell Rückschlüsse auf die Virulenz eines spezifischen Stammes ziehen zu können. Dies hat besondere Relevanz bei Erregern, die, wie *Coxiella burnetii*, als potentiell bioterroristische Agens eingestuft wurden. Im Q-Fieber-Ausbruchsgeschehen kann mithilfe der Typisierung nach den im Folgenden beschriebenen Eigenschaften eine Rückverfolgung der auslösenden Ursache durchgeführt und damit geklärt werden, ob z.B. ein Laborstamm vorliegt.

In der vorliegenden Untersuchung wird die Genotypisierung insbesondere im Hinblick auf das Vorkommen, die Verbreitung unterschiedlicher Klone, deren Veränderung und Entwicklung über einen definierten Zeitraum, deren verwandtschaftliche Beziehungen untereinander und / oder mögliche Eintragungen von außen in eine Herde hinein angewendet. Außerdem ermöglicht die Genotypisierung einen Vergleich der gefundenen Klone mit bereits vorhandenen Isolaten und somit eine regionale Zuordnung. Die Differenzierungsfähigkeit der einzelnen Methoden hat im Laufe der Jahre stark zugenommen.

In den Anfängen der Typisierung befassten sich die Wissenschaftler mit dem 36 - 54 kb langen Plasmid, das die allermeisten Stämme zusätzlich zum zirkulären Genom aufweisen. Heute werden fünf verschiedene Plasmidtypen, QpH1, QpRS, QpDG, QpDV (75-77) und eine plasmidlose Form mit einer QpRS-homologen chromosomalen Sequenz unterschieden (78).

Hendrix et al. gelang es 1991 mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) innerhalb genomischer DNA unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI sechs genomische Gruppen zu bilden (79). Später konnten diese Gruppen durch Kopplung mit den bereits bestehenden Plasmidgruppen weiter unterteilt werden. Stämme der RFLP-Gruppen I - III enthielten das QpH1-Plasmid, die der Gruppe IV das QpRS-Plasmid. Die Stämme, die der RFLP-Gruppe V zuzuordnen waren, wiesen die QpRS-homologe chromosomale



Sequenz und somit kein Plasmid auf, während die der Gruppe VI die QpDG-Variante enthielten (76, 77). Einen Schritt weiter gingen dann Jager et al. 1998, die mittels NotI-Restriktion und Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE) weitere Isolate in die Gruppen I, IV, V und VI einteilen sowie sechzehn weitere Untergruppen unterscheiden konnten (80).

2003 wurde durch Seshadri et al. das Gesamtgenom des Nine-Mile Phase-I-Stammes (RSA 493) sequenziert. Dieser Meilenstein brachte nicht nur neue Erkenntnisse in Bezug auf die Physiologie und Pathologie des Erregers, sondern ebnete auch den Weg für neue Typisierungsmöglichkeiten.

Glazunova et al. haben 2005 einen multispacer sequence typing-Assay (MST) etabliert, mit dem 173 Isolate von *Coxiella burnetii* in 30 verschiedene Sequenztypen eingeteilt werden konnten (81). Die Proben stammten aus verschiedenen geografischen Regionen, von unterschiedlichen Spezies, wie Schaf, Ziege, Rind und von Humaninfektionen unterschiedlicher klinischer Manifestation.

Arricau-Bouvery et al. führten 2006 die multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) mit siebzehn Markern in verschiedenen Panels durch (82). Es gelang ihnen, die Gruppen von Hendrix zu bestätigen (79) und die Unterteilung noch weiter zu verfeinern. Aus 42 *Coxiella-burnetii*-Isolaten von Schafen, Rindern, Ziegen und Menschen aus verschiedenen Ländern, unter anderem Frankreich und Deutschland, konnten 36 Genotypen mittels MLVA differenziert werden. In Bezug auf den Q-Fieber-Ausbruch in den Niederlanden konnte mithilfe dieser Methode ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den infizierten Ziegenherden und den Humaninfektionen nachgewiesen werden: Klaassen et al. gelang es 2009, einen vorherrschenden *Coxiella-burnetii*-Klon zu identifizieren, aus dem sich innerhalb kurzer Zeit mehrere weitere, sich nur in einem MLVA-Marker differierende Klone entwickelt haben könnten (83). Seine Untersuchungen umfassten allerdings nur drei MLVA-Marker (ms27, ms28, ms34), was ein unvollständiges Bild lieferte. 2011 befassten sich Roest et al. ebenfalls mit der Typisierung des Erregers im Ausbruch und untersuchten die gefundenen Isolate mittels zehn verschiedener MLVA-Marker, die ein Teil der von Arricau-Bouvery et al. 2006 entwickelten Zusammenstellung waren (82). Sie fanden dreizehn verschiedene Genotypen, von denen einer, der vorherrschende Klon, auf 91 % der Ziegenfarmen mit Abortgeschehen zu finden war und auch mit einem humanen Isolat eines Farmers übereinstimmte (84).

Eine weitere Typisierungsmethode stellt die Analyse der Verteilung spezifischer IS1111-Elemente dar. Diese Insertionssequenzen sind das prokaryotische Äquivalent zu den eukaryotischen Transposons und kodieren eine Transposase, welche in der Lage ist, Genabschnitte an einer Stelle des Genoms auszuschneiden oder zu kopieren und an einer anderen wieder einzufügen (85). Sie werden auch als mobile Elemente bezeichnet. Die IS-Elemente erhielten ihren Namen wegen des äußeren Aufbaus der Sequenz. Das Transposon ist zum einen von gegenläufig-identischen, nicht kodierenden und sich wiederholenden Endsequenzen (engl.: inverted repeats) und zum anderen von gleichgerichteten äußeren Wiederholungen (engl.: direct repeats) umgeben. Die Bereiche, die die Transposase selbst kodieren, sind die inserierten Sequenzen, die IS-Sequenzen. In intrazellulären Bakterien kommen IS-Elemente wegen limitiertem Gentransfer normalerweise nicht vor. *Coxiella burnetii* bildet hier eine Ausnahme (86-89).

Im Genom des Nine Mile der Phase I kommt das IS1111-Element 20 mal vor. Denison et al. (2007) verglichen Isolate von Zecken, Rindern und Menschen aus verschiedenen Ländern mit den Daten des Nine-Mile Phase-I-Genoms (90). Sie verwendeten einen Rückwärtsprimer, der direkt in jedem einzelnen IS1111-Element bindet und einen Vorwärtsprimer, der individuell zirka 500 bp vor dem jeweiligen Element lokalisiert ist. Die amplifizierten Produkte wurden mit Gelelektrophorese analysiert. Mithilfe dieser Untersuchungen konnte ein Algorithmus zur Differenzierung von *Coxiella burnetii* etabliert werden. Die so entstandenen Gruppen bestätigten die von Hendrix et al. 1991 (79) durch RFLP-Analysen etablierten Gruppen ebenfalls.

Die Genotypisierung ist auch deshalb interessant, weil sie prinzipiell die Möglichkeit bietet, mittels geeigneter molekularer Marker eine Aussage über den Verlauf der Krankheit zu treffen (91). 2005 identifizierten Zhang et al. das Antigen der akuten Erkrankung, das sogenannte „acute disease antigen A“ (*adaA*) als einen geeigneten Marker (92). In ihrer Studie wurde *adaA* nur bei akut Erkrankten gefunden und konnte somit als Virulenzfaktor angesehen werden. Frangoulidis et al. gelang es jedoch 2013, das Gen in verlängerter Form mit einer Insertionssequenz von 226 bp auch bei chronischen Patienten nachzuweisen. Damit ist er nicht als absoluter / eindeutiger Marker der akuten Erkrankung anzusehen (93). Außerdem wurden von der gleichen Arbeitsgruppe Punktmutationen innerhalb dieses Gens gefunden, die nicht nur zur Diskriminierung von Stämmen aus verschiedenen endemischen

Gebieten genutzt werden können, sondern auch Zeugnis für mikroevolutionäre Vorgänge der Coxiellen ablegen.

Die Gesamtgenom-Sequenzierung ist die Zukunft der Typisierung. Diese steht bei den Coxiellen allerdings mit bisher sieben sequenzierten Genomen noch am Anfang. In den ermittelten Sequenzen werden IS-Elemente, Punktmutationen und *Repeat*-Strukturen mittels verschiedener Software-Algorithmen untersucht und identifiziert.

### 1.2.3 Gesamtgenom-Amplifizierung

#### 1.2.3.1 Geschichte und Nutzen

Im Untersuchungsmaterial von den verschiedenen Formen des Q-Fiebers bei Mensch und Tier kommt der Erreger in ganz unterschiedlichen Konzentrationen vor: Bei einem akuten Abortgeschehen der Wiederkäuer ist der Erreger massenhaft vorhanden ( $10^9$  Erreger/g Plazenta), während bei subklinischen Infektionen oder der Infektion beim Menschen nur eine sehr viel geringere Erregerzahl vorhanden ist.

Für die Diagnostik spielt der direkte Erregernachweis eher eine untergeordnete Rolle, da diese, wie beschrieben, hauptsächlich auf der Serologie basiert. Allenfalls als ergänzende Methode in der Akutdiagnostik und beim Nachweis des Erregers in Organmaterialien (z.B. infizierten Herzklappen) ist die Anwendung der PCR sinnvoll. Eine solche diagnostische PCR weist im Gegensatz zur Typisierungs-PCR meist nur eine einzelne, für den Erreger spezifische Sequenz nach, während bei der Typisierung verschiedene Genorte eines bereits bekannten Erregers auf ihre Eigenschaften untersucht werden.

Daher sind ausreichende DNA-Mengen in einer Probe für die Genotypisierung von besonderer Relevanz. Diese ist vor allem aus forensischer Sicht aus den bereits erläuterten Gründen interessant (s. 1.2.2 Typisierung).

Die gängigen Typisierungsmethoden wie MLVA, *IS1111*-Analyse, Plasmidtyp-Bestimmung, MST und gegebenenfalls auch die *adaA*-SNP-Bestimmung, benötigen alle eine Mindestmenge an eingesetzter DNA von adäquater Qualität. Bisher war der erste Schritt zur Herstellung adäquater DNA-Mengen aus einer klinischen Probe die erfolgreiche Anzucht und alle Arbeiten zur Typisierung von *Coxiella burnetii* basieren auf der Untersuchung von Stammsammlungen.

Wie bereits geschildert, darf *Coxiella burnetii* aufgrund seiner großen Umweltstabilität, der geringen Infektionsdosis und der leichten Übertragung nur in Labors der Sicherheitsstufe 3 angezüchtet werden. Die Anzucht ist zeitintensiv und kann bis zu zwei Wochen mit mehreren BSL3-Arbeitsgängen in Anspruch nehmen.

Im Zeitalter der zunehmenden Gesamtgenomanalysen kommt der Gewinnung von qualitativ und quantitativ ausreichend DNA eine große Bedeutung zu. Daher wurde bereits frühzeitig an Methoden geforscht, die es ermöglichen, das gesamte Genom gleichmäßig zu amplifizieren. Im Unterschied zur „normalen“ PCR, bei der durch spezifische Primer ein bestimmtes Amplifikat generiert wird, das im Schnitt nur 100 bis maximal 1000 bp lang ist, arbeiten diese Methoden mit universellen Primern und besonderen DNA-Polymerasen.

Diese universellen Primer wurden das erste Mal von Feinberg und Vogelstein 1983 beschrieben (94). Um einen Komplementärstrang zu einer unbekanntem Ausgangssequenz zu schaffen, nutzten sie das sogenannte „Random Priming“. Sie verwendeten Hexamere einzelsträngiger DNA, die aus allen möglichen Basenkombinationen ( $4^6 = 4096$  Möglichkeiten) bestanden und somit auch an jedem komplementären Bereich der DNA binden konnten. Allerdings bedingt die Kürze der Primer, wegen der geringeren Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen, auch nur eine weniger stabile Bindung an die Zielsequenz.

Williams et al. etablierten 1990 eine Methode zur Herstellung der sogenannten „randomly amplified polymorphic DNA“ (= RAPD; zufällig vervielfältigte polymorphe DNA) (95). Sie verwendeten kurze Primer von nur 8 – 12 Nukleotiden Länge, die zufällig erzeugt wurden und mit ihren unterschiedlichen Produkten für ein individuelles Bandenmuster im Gel sorgten. Auf diese Weise wurde die Unterscheidung von Genomen verschiedener Spezies ermöglicht. Die Methode diente zur Untersuchung phylogenetischer Verwandtschaften von Tier- und Pflanzenarten.

In den Jahren darauf folgten weitere PCR-basierte Methoden, wie die degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR; (96, 97)) oder primer extension PCR (PEP; (98)), die in Genomabdeckung und sehr geringer Produktgröße (< 3 kb) unzuverlässige, ungenaue und teilweise unbrauchbare Ergebnisse liefern (96, 97, 99).

Der Durchbruch war die Einführung der MDA-Systeme (MDA = Multiple Displacement Amplification) und der OmniPlex<sup>®</sup>-Variante (siehe unten). Diese Kits wurden bisher zum Beispiel zur Amplifikation von humaner DNA aus Vollblut und aus Wangenabstrichen genutzt. Zusätzlich wurden mit dieser Methode verschiedene Bakterienarten, wie zum Beispiel *Vibrio Cholerae*, *Chlamydia trachomatis* und *Prochlorococcus*, erfolgreich amplifiziert (100-102).

Als bislang letzte Methode wurde 2011 von Joneja et al. die „Linear nicking endonuclease-mediated strand displacement DNA amplification“ als eine Methode zur linearen, isothermen Gesamtgenom-Amplifizierung vorgestellt (103). Hierbei dient ein von der Endonuclease von der Proben-DNA abgeschnittenes DNA-Fragment als Primer für die Polymerase. Der synthetisierte Strang wird abgelöst, sodass er wieder als Einzelstrang vorliegt und erneut amplifiziert werden kann.

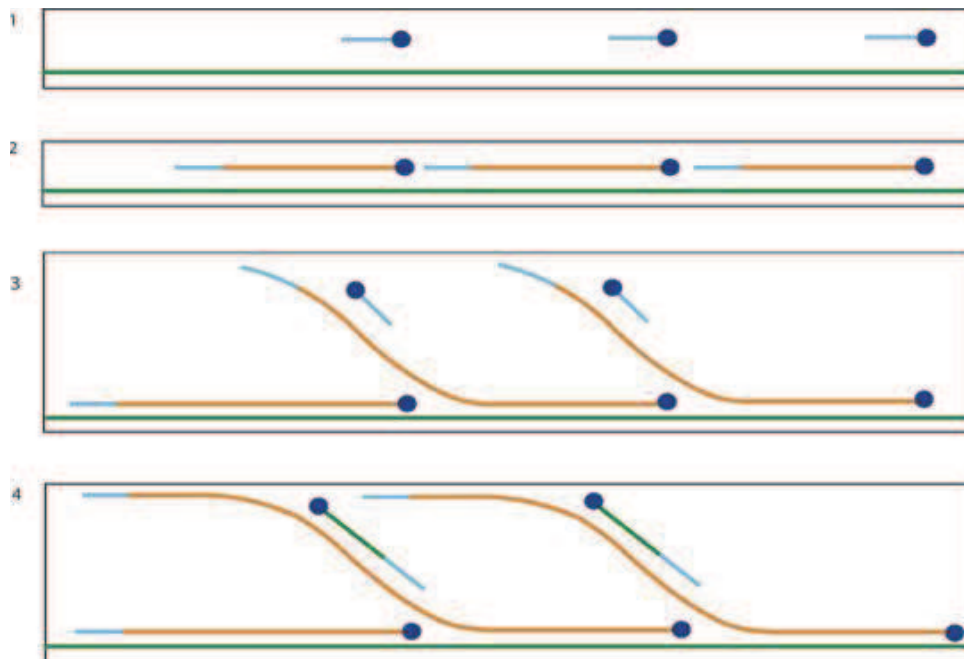
In Rahmen dieser Arbeit werden drei verschiedene Gesamtgenom-Amplifizierungs- (engl.: whole genome amplification = WGA-) Kits und ein Reamplifikationskit auf ihre Praktikabilität im Hinblick auf eine Nutzung bei der direkten Untersuchung von klinischen Proben bei Herden- und Einzeltieruntersuchungen durch unter anderem Milch- und Abstrichproben verglichen. Dazu werden die Proben unter Gebrauch des jeweiligen Kits amplifiziert und anschließend mit den im Institut etablierten Typisierungsmethoden (MLVA und IS1111-Analyse) untersucht. Dadurch soll überprüft werden, ob eine Genotypisierung direkt aus klinischem Probenmaterial mit nur geringer Kopienzahl an *Coxiella burnetii* möglich ist. Dies würde die zeitaufwändige Anzucht des Erregers überflüssig machen.

### 1.2.3.2 Multiple Displacement Amplification (MDA)

Die Gesamtgenom-Amplifizierungsmethode mittels MDA wird mithilfe von unspezifischen, exonukleaseresistenten Hexamerprimern und einer Phi29-DNA-Polymerase in einer isothermen Reaktion bei 30 °C durchgeführt (104). Das Enzym ist wesentlich weniger fehleranfällig als die meist eingesetzte *Taq*-Polymerase. Während bei letzterer ein Fehler auf ~200 bp vorkommt, entsteht durch die 3'-5'-Exonuklease-Korrekturlesefunktion der Phi29-DNA-Polymerase nur ein Fehler auf 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Basen (105).

Nach Denaturierung der Probe lagern sich an verschiedenen Stellen die unspezifischen Hexamerprimer an die denaturierte DNA an. Sie stellen die

Ausgangspunkte für das Andocken der Phi29-DNA-Polymerase dar. Die Phi29-DNA-Polymerase dissoziiert nicht vom Strang, wodurch sehr lange Produkte von durchschnittlich 10 kb bis zu 100 kb entstehen können. Diesen Vorgang nennt man Strangablösungssynthese (engl.: strand displacement synthesis; SDS) (106, 107).



**Abbildung 2:** Strangablösungssynthese; hellblau = universelle Primer; grün = Proben-DNA / in 4 oben auch synthetisierter Strang; blau = Polymerase; orange = synthetisierter Strang; 1-Primeranlagerung; 2-Amplifikation mit Phi29-Polymerase; 3-Phi29-„Entzweigung“ (engl.: debranching); 4-Primeranlagerung mit erneuter Amplifikation (Quelle: <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n4/images/nprot.2006.326-F1.jpg> (108))

Die SDS läuft wie folgt ab: Das Enzym beginnt an verschiedenen freien 3'-Enden den komplementären Strang zu bilden. Auf seinem Weg trifft es auf 5'-Enden angelagerte Primer und auf bereits gebildete Komplementärstränge. Die Reaktion ist aber keineswegs beendet. Die Phi29-Polymerase löst diesen Strang vom Ursprungsstrang ab und die Replikation läuft weiter.

An den abgelösten Strang lagern neue Hexamerprimere an und führen die Replikation fort. Dies führt zu einer fast exponentiell verlaufenden Amplifikationsreaktion.

Die Mindestlänge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente sollte bei beiden MDA-Methoden 2 kb nicht unterschreiten, um eine fehlerfreie Amplifikation zu gewährleisten. Zur Anwendung an in Formalin fixiertem und damit stark

fragmentiertem Material gibt es ein gesondertes Kit der Firma Qiagen, das dem Amplifikationskit vorgeschaltet wird (FFPE-Kit (formalinfixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe-Kit)). Dieses Kit isoliert die DNA aus dem fixierten Gewebe und verbindet die einzelnen Fragmente mithilfe einer Ligase in willkürlicher Reihenfolge, sodass sie amplifizierbare Längen erreichen.

Die MDA-Methode wurde ursprünglich zur Amplifizierung von zirkulären DNA-Proben, wie Plasmiden und bakterieller DNA, entwickelt (109). Sie wurde in verschiedenen Studien auf Ihre Anwendbarkeit bei Untersuchungen auf Punktmutationen (engl.: single nucleotide polymorphism; SNP) (110, 111) und auch bei Analysen von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) untersucht (104, 107). Ihre Nutzbarkeit in Hinblick auf die Gesamtgenomsequenzierung einiger ausgewählter Erreger wurde in verschiedenen Studien evaluiert und bestätigt (100-102). MDA kann auch direkt an klinischem humanem Material (z.B. Serum) angewendet werden, wodurch eine zeitaufwendige Aufreinigung nicht mehr notwendig ist (110). Über Untersuchungen an tierischen Materialien liegen bisher keine Daten vor.

In dieser Arbeit werden zwei Kits verwendet, deren Amplifikationsmethode die MDA ist. Es sind das REPLI-g® Mini Kit von Qiagen und das GenomiPhi® V2-Produkt von GE-Healthcare. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen nur durch die unterschiedliche Denaturierung: Während beim REPLI-g® Mini Kit eine alkalische Denaturierung angewandt wird, arbeitet GenomiPhi® mit Hitzedenaturierung.

In einer Studie von Schneider et al. wurden diese beiden Kits bereits unter Verwendung von humanen HepG2- und P118-Zellen miteinander verglichen, wobei die Gesamtmenge des amplifizierten Produkts bei REPLI-g® immer zirka doppelt so hoch war wie bei GenomiPhi® (112).

### **1.2.3.3 OmniPlex®-Methode**

Die Funktionsweise des GenomePlex®-Kits basiert auf der willkürlichen Fragmentierung der DNA mit anschließender Umwandlung der entstandenen Fragmente in eine sogenannte OmniPlex®-Library, eine Sammlung von PCR-amplifizierbaren Molekülen definierter Größe (~1,5 kb), die von universellen Adaptersequenzen flankiert werden. Diese OmniPlex®-Sammlung wird dann mit limitierter Zykluszahl mittels PCR amplifiziert.



Als DNA-Polymerase wird hier eine sogenannte *high-fidelity*-DNA-Polymerase eingesetzt, die, wie auch die Phi29-DNA-Polymerase, über eine 3'-5'-Exonuklease-Korrekturlesefunktion und damit über eine sehr hohe Genauigkeit verfügt (113).

Es sollten bei der OmniPlex<sup>®</sup>-Methode mindestens 10 ng aufgereinigte DNA eingesetzt werden, um eine einwandfreie Reaktion zu gewährleisten. Wird weniger DNA eingesetzt, ist die Produktmenge zwar nur etwas geringer, aber die Fehleranfälligkeit stark erhöht (Sigma). Dies trifft besonders auf den Einsatz komplexer DNA, wie zum Beispiel humaner DNA, zu. Bei bakterieller DNA kann auch eine geringe Menge von 1 ng zu einer erfolgreichen Amplifizierung führen. Soll DNA aus formalinfixiertem Gewebe amplifiziert werden, so muss hier mindestens 100 ng Ausgangs-DNA eingesetzt werden. Handelt es sich bei der Probe um DNA schlechterer Qualität, so sollten die DNA-Fragmentlängen größer als 200 bp sein.

Bei der Amplifizierung stellt sich eine Sättigung, ein sogenanntes DNA-Plateau, bei 200 µg (400 ng/µl) nach ca. 2000facher Amplifikation ein (114).

OmniPlex<sup>®</sup> ist in der Lage, sowohl aus intakter als auch aus degradiertem DNA solche Sammlungen herzustellen (114). Diese sind lagerfähig und können mithilfe eines eigenen Reamplifikationskits beliebig oft erneut amplifiziert werden, um die Ausbeute noch weiter zu steigern. In dieser Arbeit werden zwei WGA-Kits von Sigma eingesetzt, die die genannte Methode verwenden: GenomePlex<sup>®</sup> Whole Genome Amplification Kit 1 und das GenomePlex<sup>®</sup> Whole Genome Amplification Reamplification Kit 3.



### 1.2.3.4 Gegenüberstellung / Vergleich der WGA-Methoden

Zusammengefasst lassen sich die Kits wie folgt charakterisieren:

**Tabelle 2:** Übersicht über Kit-Charakteristika

	REPLI-g®	GenomiPhi®	GenomePlex®
Probe	2,5 – 5 µl (>10 ng)	max 1 µl (>1 ng)	10 µl (1 ng/µl)
Denaturierung	alkalisch	thermisch	chem. + thermisch
Polymerase	Phi29-Polymerase	Phi29-Polymerase	<i>high-fidelity</i> -Polymerase
Amplifikationszeit	16 h	16 – 18 h	ca. 3 h
Reaktionstemp.	isotherm 30 °C	isotherm 30 °C	Thermoprofil (95°C, 94°C, 65°C)
Fragmentlänge	> 2 kb	> 2 kb (opt. 10 kb)	> 200 bp
System	MDA	MDA	OmniPlex®-Library

Die beiden WGA-Methoden, OmniPlex®-Sammlung und MDA, wurden 2004 betreffend der Verlässlichkeit der Amplifizierung des Genoms anhand von 12.442 SNPs gegenübergestellt (115). Die Wissenschaftler kamen zu dem Ergebnis, dass die MDA nur 0,2 % Variabilität aufwies, wogegen die OmniPlex®-Variante zwischen 0,54 und 1,33 % Variabilität zeigte. In der gleichen Studie untersuchte die Gruppe die Nutzbarkeit verschiedener Materialien, unter anderem Wangenabstriche, die von ihrer Zusammensetzung mit den hier untersuchten Vaginaltupferproben vergleichbar sind. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Amplifikation von Vollblutproben die besten Ergebnisse erzielte und die von Wangenabstrichen weniger verlässlich und präzise war. Am schlechtesten und damit ungeeignet für diese Methode war die Amplifikation von getrockneten Blutproben. Hier ist die DNA sehr stark fragmentiert und durch Austrocknung beschädigt, was zu sehr hohen Fehlerraten und geringer Verlässlichkeit führte. Die Erfolgsrate für Fragmente von 20, 5 und 2 kb Länge sank von 98,5 % über 94,4 % auf schließlich 76,4 % bei den kleinsten Fragmenten, während die Fehler von 2,4 % über 8,2 % bis auf 28,9 % anstiegen!

Auch Barker et al. haben 2004 die beiden Kits bei der Genotypisierung des Humangenoms mittels eines 2.320-SNP-Linkage-Panels gegenübergestellt (114). Nur ein einziger SNP war bei OmniPlex® nicht auffindbar, während bei MDA alle vorhanden waren. Bei MDA unterschieden sich > 20 % der Genorte im Hinblick auf die Fehlerrate vom nicht amplifizierten Genom. Bei OmniPlex® waren es nur 13

Genorte. Sie kamen zu dem Schluss, dass bei einer Konkordanz von 99,9 % beide Kits außergewöhnlich gute Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede lieferten.

### **1.2.3.5 Einflussfaktoren / Störfaktoren / Grenzen der WGA-Methoden**

In der Vergangenheit wurde in der Literatur über Fehler bei den Kits berichtet, die die potentiellen Störfaktoren und die Grenzen der WGA aufzeigen. Es gab Probleme mit unspezifischer Amplifikation von Primer-Dimeren oder von Kontaminationen, mit der Bildung sogenannter DNA-Chimären und mit Fehlern in der Repräsentation einzelner Genorte (116).

Trotz der Tatsache, dass die WGA aus „fast nichts“ adäquate DNA-Mengen herstellen kann, ist die eingesetzte Menge DNA der limitierende Faktor und somit entscheidend für die Qualität der Amplifikate (117). Ebenso steigt die Anzahl der Amplifikationsfehler, je weniger Kopien eingesetzt werden (118, 119).

In der Literatur sind zahlreiche Verbesserungsvorschläge nachzulesen, die auch in die heute aktuellen Kits eingearbeitet wurden, wie zum Beispiel ein sensitivitätssteigernder, modifizierter Puffer von Wu et al. 2006 (119).

Das größte Problem bei der späteren Sequenzierung eines Amplifikationsproduktes stellen die Chimären, also Mischsequenzen und andere Amplifikationsfehler dar (120, 121).

Ein weiterer Störfaktor scheint die Fragmentierung und damit die Vorbehandlung der DNA zu sein. Die Hersteller geben Mindestfragmentlängen an. In der Literatur wurde dies als kritischer Faktor durch Nelson et al. 2002 bestätigt und gleichzeitig auf die Zirkularität der eingesetzten DNA als Voraussetzung hingewiesen (122). Prokaryotische DNA erfüllt dieses Kriterium, wird allerdings vor ihrem Einsatz in der WGA auf verschiedene Weisen bearbeitet.

Wie in Abbildung 4 ersichtlich, standen in der ersten Lammperiode 203 Proben, in der zweiten 269, im Jahr 2010 noch 47 und ein Jahr später 53 Proben zur Verfügung. Von diesen insgesamt 572 Proben waren 182 negativ und 243 zu niedrig konzentriert, um eine adäquate Typisierung zuzulassen, sodass nur 147 Proben genotypisiert wurden. Im Ausbruchsgeschehen im Mai 2009 waren somit erwartungsgemäß 97 % der Proben positiv, wobei 39 % davon zu niedrig konzentriert für eine differenzierende Typisierung waren. Das zweite Probennahmeintervall im Herbst 2009 erfolgte nach Durchführung der veterinärmedizinischen Maßnahmen,

deren Effekt durch den geringeren Umfang der positiven Proben sichtbar wurde. Achtundfünfzig % der Proben lieferten ein positives Ergebnis, während 84 % zu gering konzentriert für die Typisierung waren. Im Jahr 2010 lieferten noch 47 % ein positives Ergebnis, im Jahr 2011 noch 28 %.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das klonale Muster innerhalb eines nachweislich Q-Fieber-infizierten, regional stark eingegrenzten Bestands kleiner Wiederkäuer mittels molekularbiologischer Methoden über einen zeitlichen Verlauf zu identifizieren. Außerdem soll ein Abgleich mit bereits bekannten Stämmen erfolgen, um eine regionale Zuordnung zu ermöglichen. Insbesondere soll festgestellt werden, ob Schafe und Ziegen mit dem gleichen Genotyp infiziert sind und ob es über den Beobachtungszeitraum von zwei Jahren zu Änderungen im Genotyp gekommen ist. Dies soll dazu beitragen, die Genomvielfalt von *Coxiella burnetii* besser zu verstehen und eventuell Rückschlüsse auf Virulenzfaktoren bzw. pathogene Eigenschaften des Erregers zuzulassen. Dazu stehen 147 Proben zur Verfügung. Es werden verschiedene genotypische Methoden genutzt, die das Vorkommen entsprechender *Coxiella-burnetii*-spezifischer Attribute untersuchen ("housekeeping"-Gene (*IS1111*, *com1*, *adaA*, Plasmide), MLVA und *IS1111*-Analyse).

Zusätzlich wird der Einfluss verschiedener Gesamtgenom-Amplifizierungsverfahren (MDA und OmniPlex®-Library) auf das Typisierungsergebnis und damit die prinzipielle Eignung dieser Technik für die direkte Anwendung an klinischem, tierischem Untersuchungsmaterial für die Diagnostik untersucht.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Proben

Die klinischen Proben stammen aus dem Q-Fieber-Projekt der Klinik für kleine Klautiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (123). Sie wurden freundlicherweise zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Vaginaltupfer-, Milch-, Woll-, Kot- und Serumproben von Ziegen und Schafen vom Oberen Lindenhof auf der Schwäbischen Alb. Seit dem ersten Ausbruch 2009 wurde der Tierbestand im Rahmen des Projektes jährlich mehrmals während der Lammzeiten beprobt und überwacht.

Der Hof dient als Lehr- und Versuchsgut der Universität Hohenheim und befindet sich, an drei Seiten von Wald umgeben, abgeschottet auf einer Anhöhe (720 m). Die nächste Ortschaft liegt drei Kilometer entfernt. Der Hof beherbergte zum Zeitpunkt der ersten Probennahme 263 Merino-Landschafe, 165 Dahlem-Cashmere-Ziegen, einige Hofmitarbeiter und -bewohner.

Im April 2009 stieg die Abortrate und die Verluste aufgrund der Geburt lebensschwacher Lämmer und Kitze unter den Schafen (2 % Aborte, 16 % lebensschwach) und besonders unter den Ziegen (14 % Aborte, 11 % lebensschwach) an. Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt in Stuttgart untersuchte daraufhin drei Feten und eine Plazenta pathologisch und mikrobiologisch und konnte im gleichen Monat die Infektion mit *Coxiella burnetii* bestätigen. Von März bis Juni wurden vier Mitarbeiter und Bewohner des Betriebs als Q-Fieber-positiv diagnostiziert, nachdem sie unspezifische Grippe-symptome gezeigt hatten. Die anschließende Beprobung beider Herden im Mai 2009 bestätigte die Durchseuchung mit *Coxiella burnetii*.

Die meisten Ziegen wurden im Zuge der Bekämpfung des Erregers nach Abschluss des ersten Probenentnahmeintervalls getötet. Die verbleibenden Tiere wurden mit Coxevac<sup>®</sup> geimpft und mit Tetracyclinen behandelt. Die Schafe, die in engem Kontakt mit den Ziegen gelebt hatten, zeigten keine klinischen Veränderungen mehr, blieben aber zum Teil (s. Tabelle 3) in der PCR und Antikörper-ELISA, hier nicht zuletzt wegen der Impfung, positiv für *Coxiella burnetii*, während die Ausscheidung deutlich

zurückging (62). Die weiteren Proben stammen daher fast nur von Schafen und aus der Umgebung (Boden, Staub etc.). Wie in Abbildung 4 ersichtlich, standen in der ersten Lammperiode 203 Proben, in der zweiten 269, im Jahr 2010 noch 47 und ein Jahr später 53 Proben zur Verfügung. Von diesen insgesamt 572 Proben waren 182 negativ und 243 zu niedrig konzentriert, um eine adäquate Typisierung zuzulassen, sodass nur 147 Proben genotypisiert wurden. Im Ausbruchsgeschehen im Mai 2009 waren somit erwartungsgemäß 97 % der Proben positiv, wobei 39 % davon zu niedrig konzentriert für eine differenzierende Typisierung waren. Das zweite Probennahmeintervall im Herbst 2009 erfolgte nach Durchführung der veterinärmedizinischen Maßnahmen, deren Effekt durch den geringeren Umfang der positiven Proben sichtbar wurde. Achtundfünfzig % der Proben lieferten ein positives Ergebnis, während 84 % zu gering konzentriert für die Typisierung waren. Im Jahr 2010 lieferten noch 47 % ein positives Ergebnis und im Jahr 2011 noch 28 %, wobei hier nur bei je einer Probe die DNA-Menge ausreichte, um eine Typisierung durchzuführen.



**Abbildung 3:** Flussdiagramm der Ereignisse am Oberen Lindenhof

Alle typisierten Proben stammen vom Oberen Lindenhof und sind mit Identifikationsnummer, Art des Probenmaterials und Tierart in Tabelle 3 aufgeführt. Als Referenzmaterial wurde eine DNA des Stammes Nine Mile (RSA493) mit der Konzentration  $9,823 \times 10^5$  Genomkopien/ $\mu\text{l}$  (in *com1*-PCR) aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr verwendet.

**Tabelle 3:** Verwendete Proben

Probennummer	Entnahmedatum	Probenmaterial	Tierart
1	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
2	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
3	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
4	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
5	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
6	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
7	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
8	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
9	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
10	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
11	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
12	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
13	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
14	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
15	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
16	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
17	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
18	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
19	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
20	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Schaf
21	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
22	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
23	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
24	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
25	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
26	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
27	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
28	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
29	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
30	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
31	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
32	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
33	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
34	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Schaf
35	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
36	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
37	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
38	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
39	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege

40	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
41	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
42	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
43	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
44	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
45	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
46	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
47	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
48	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
49	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
50	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
51	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
52	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
53	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
54	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
55	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
56	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
57	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
58	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
59	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
60	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
61	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
62	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
63	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
64	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
65	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
66	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
67	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
68	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
69	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
70	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
71	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
72	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
73	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
74	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
75	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
76	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
77	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
78	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
79	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
80	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege



81	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
82	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
83	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
84	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
85	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
86	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
87	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
88	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
89	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
90	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
91	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
92	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
93	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
94	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
95	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
96	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
97	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
98	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
99	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
100	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
101	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
102	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
103	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
104	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
105	20.05.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
M 4	20.05.2009	Milch	Ziege
M 24	20.05.2009	Milch	Ziege
M 32	20.05.2009	Milch	Ziege
M 34	20.05.2009	Milch	Ziege
M 40	20.05.2009	Milch	Ziege
M 52	20.05.2009	Milch	Ziege
M 61	20.05.2009	Milch	Ziege
M 65	20.05.2009	Milch	Ziege
342	25.05.2009	Blut	Schaf
345	25.05.2009	Blut	Schaf
381	25.05.2009	Blut	Schaf
383	25.05.2009	Blut	Schaf
389	25.05.2009	Blut	Schaf
391	25.05.2009	Blut	Schaf
398	25.05.2009	Blut	Schaf

443	23.06.2009	Blut	Schaf
445	23.06.2009	Blut	Schaf
450	20.07.2009	Milch	Ziege
453	20.07.2009	Milch	Ziege
454	20.07.2009	Milch	Ziege
505	20.07.2009	Tupfer, Nasen	Ziege
506	20.07.2009	Tupfer, Nasen	Ziege
507	20.07.2009	Tupfer, Nasen	Ziege
508	20.07.2009	Tupfer, Nasen	Ziege
3228	20.07.2009	Wolle	Schaf
3229	20.07.2009	Wolle	Schaf
3191	20.07.2009	Kot	Schaf
793	31.07.2009	Blut	Schaf
796	31.07.2009	Blut	Schaf
2077	10.08.2009	Milch	Schaf
2072	10.08.2009	Milch	Schaf
2118	13.08.2009	Tupfer, Kot	Schaf (Lamm)
2191	28.08.2009	Tupfer, Vaginal	Schaf
2862	10.09.2009	Tupfer, Nasen	Ziege
2863	10.09.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
2864	10.09.2009	Tupfer, Haut	Ziege
2865	10.09.2009	Milch	Ziege
2866	10.09.2009	Urin	Ziege
2870	12.09.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
2871	13.09.2009	Tupfer, Vaginal	Ziege
16192	17.12.2010	Umgebungsproben	Schaf
20826	16.12.2011	Tupfer, Kot	Schaf

### 2.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MolBiol® in Berlin synthetisiert. Die Primersequenzen zu den IS1111-multiplex-PCRs 7 – 10 wurden zum Teil aus den bestehenden singleplex-Primern von Denison et al. (90) zusammengesetzt und die übrigen anhand der *in-silico*-Sequenz des Nine Mile RSA 493 (NCBI Genome Refseq: NC\_002971) bestimmt. Als Auswahlkriterien waren die Einzigartigkeit der Sequenz auf dem Genom, ihr GC-Gehalt und die Produktlänge entscheidend. Da es sich um multiplex-PCRs handelte, musste das entstandene PCR-Produkt in Kombination mit dem verwendeten Rückwärtsprimer (*IS1111* Rev) eine Produktlänge

ergeben, die sich mindestens um 30 bp von den anderen unterschied, sodass eine klare Differenzierung der auftretenden Banden im Gel möglich war.

Die Primer für die *IS1111*-multiplex-PCRs 1 – 6 wurden bereits im Institut von Bleichert et al. 2011 etabliert (124, 125). Die Sequenzen stammen aus Analysen der *in-silico*-Daten der Isolate Nine Mile RSA 493, RSA 331, Q154 und Q212 (NCBI Genome Refseq.: NC\_002971, NC\_010117, NC\_011528, NC\_011527).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vorgegangene Arbeiten

#### 2.2.1.1 Anzucht von *Coxiella burnetii*

Die kulturelle Anzucht des verwendeten Nine-Mile-Stammes fand auf Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze (*Chlorocebus spec.*), sogenannten Buffalo-Green-Monkey-Zellen (BGM; Stammnummer 90092601, Sigma-Aldrich), im Labor der Sicherheitsstufe drei statt. Die Zellen wurden in Minimalmedium ohne Antibiotika herangezogen, das mit 3 % fötalem Kälberserum und 1 % Vitaminzusatz (1:100 verdünnt mit Minimalmedium) versetzt war und anschließend unter STV / Trypsin EDTA-Zusatz durch Inkubation bei 37 °C abgelöst. Nach Resuspension der gelösten Zellen im Erhaltungsmedium und deren Sedimentation und Anwachsen an den Flaschenboden erfolgte die Infektion. Hierzu wurden 250 µl Coxiellen-Suspension in die Zellkulturflasche hinein pipettiert. Alle zwei bis drei Tage wurde nun das Medium gewechselt und die Zellen unter dem Mikroskop auf Veränderungen untersucht. Die für *Coxiella-burnetii*-Infektionen pathognomischen Vakuolen wurden innerhalb von ca. zwei Wochen sichtbar.

Die Erreger wurden mithilfe von thermischer Denaturierung (Gefriertauen) der Zellen freigesetzt. Hierzu wurden die Zellen bei -40 °C eingefroren und wieder aufgetaut, was sie zum Platzen brachte. Die Erregerzellsuspension wurde aliquotiert und entweder eingefroren oder zum Ausschleusen aus dem BSL3-Labor inaktiviert. Dies geschah thermisch bei 96 °C für 30 Min. Eine Inaktivierungskontrolle des hitzebehandelten Materials wurde auf BGM-Zellen aufgebracht, zwei Wochen lang bebrütet und mikroskopisch auf Wachstum kontrolliert.

### **2.2.1.2 DNA-Extraktion**

Die Aufreinigung der Zelllysate aus dem BSL3-Labor wurde semiautomatisiert am MagNA-Pure<sup>®</sup>-compact-Gerät der Firma Roche (Basel, Schweiz) mit dem Programm „Culture Cells“ durchgeführt. Hierzu wurden 200 µl des denaturierten Materials verwendet.

Die Probe wurde zunächst lysiert und die Gesamt-DNA dann mittels magnetischer Glaspartikel gebunden und separiert. Anschließend wurden alle übrigen Zellbestandteile verworfen und die DNA durch starke Temperaturerhöhung von den Glaspartikeln getrennt.

### **2.2.1.3 Aufbereitung der klinischen Proben**

Die Aufbereitung der klinischen Proben wurde bereits an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover durch die Arbeitsgruppe „Q-Fieber“ mithilfe des Mini-Kits zur DNA-Extraktion (Qiagen, Hilden, Deutschland) und des NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue- bzw. NucleoSpin<sup>®</sup> Virus-Kits (Mascherey-Nagel, Düren, Deutschland) bei Blutproben durchgeführt.

## **2.2.2 Gesamtgenom-Amplifizierung**

Drei in der Literatur häufig erfolgreich genutzte Kits wurden für vergleichende Untersuchungen ausgewählt, wobei eines aus einem Amplifikationskit und einem Folgekit zur Reamplifikation bestand. Außerdem wurde ein viertes Kit, das speziell für degradierte (FFPE-)DNA geeignet sein soll, verwendet.

Die verschiedenen Kits wurden sowohl an einem Stamm aus der Stammsammlung des Instituts mit bekannter Konzentration (Nine Mile mit der Konzentration  $9,823 \times 10^5$  Genomkopien/µl) als auch an einer klinischen Probe mit vergleichbarer Ausgangskonzentration getestet (Vaginaltupfer einer Ziege Nr. 37; Konzentration  $1,333 \times 10^5$  Kopien/µl). Von beiden Proben wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, so dass Konzentrationen von  $\sim 10^4$  bis  $\sim 10^0$  Kopien/µl entstanden (mittels *com1*-PCR quantifiziert). Diese Proben wurden im Anschluss amplifiziert.

### 2.2.2.1 REPLI-g® (Qiagen)

Den Herstellerangaben entsprechend wurden zuerst die verschiedenen Puffer hergestellt. Der DLB-Puffer wurde in der mitgelieferten Tube durch Zugabe von 500 µl Nuklease-freiem Wasser synthetisiert.

Denaturierungs- (D1) und Neutralisationspuffer (N1) wurden wie folgt hergestellt:

D1: 9 µl DLB-Puffer + 32 µl Nuklease-freies Wasser

N1: 12 µl Stopp solution + 68 µl Nuklease-freies Wasser

Zur Denaturierung wurden 2,5 µl Probe mit 2,5 µl D1-Puffer gemischt und 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Neutralisationspuffer wurde erneut durchgemischt und zentrifugiert. Ein Mastermix aus 10 µl Wasser, 29 µl des Mini-Reaktionspuffers und 1 µl Mini-DNA-Polymerase wurde auf Eis hergestellt. Dieser wurde komplett mit 10 µl denaturierter Probe versetzt und bei 30 °C für 16 Std. im Thermocycler inkubiert, danach das Enzym für 3 Min. bei 65 °C deaktiviert. Die Amplifikate wurden anschließend bei -20 °C gelagert und weiterverwendet.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten wurde wegen der hohen Deckeltemperatur von 103 °C (Soll 70 °C) die Reaktionstemperatur von 30 °C auf 25 °C herabgesetzt.

### 2.2.2.2 Genomi-Phi V2® (GE-Healthcare)

Nach Mischen von 1 µl Probe mit 9 µl Sample-Puffer wurde die Probe für 3 Min. bei 95 °C hitzedenaturiert und anschließend wieder auf 4 °C abgekühlt.

Zur Amplifikation wurde ein Mastermix aus 9 µl Reaktionspuffer und 1 µl Enzymmix auf Eis hergestellt. Er wurde anschließend vorsichtig mit 10 µl denaturierter Probe vermischt und 16 Std. bei 30 °C im Thermocycler inkubiert. Die Polymerase wurde 10 Min. bei 65 °C deaktiviert. Die Amplifikate wurden bei -20 °C gelagert.

Auch hier wurde die Temperatur der isothermen Reaktion wegen der hohen Deckeltemperatur angepasst und auf 25 °C herabgesetzt.

### 2.2.2.3 GenomePlex® (Sigma-Aldrich)

Die Probe wurde zuerst denaturiert und fragmentiert, indem 10 µl Probe mit 1 µl 10x-Fragmentationspuffer vermischt und bei 95 °C exakt 4 Min. erhitzt wurden. Dann erfolgte die Präparation der Sammlung amplifizierbarer DNA-Stücke. Hier wurde 2 µl 1x-Sammlungspräparierungspuffer und Sammlungsstabilisierungspuffer zu jeder Probe hinzugefügt. Das Ganze wurde 2 Min. bei 95 °C erhitzt und anschließend 1 µl

des Sammlungspräparierungsenzyms dazugegeben. Mit der folgenden Inkubation für je 20 Min. bei 16 °C, 24 °C und 37 °C, dann 5 Min. bei 75 °C und anschließendem Abkühlen auf 4 °C wurde die Sammlungserstellung abgeschlossen.

Zur Amplifikation wurde ein Mastermix aus 7,5 µl 10x Amplifikationsmastermix, 47,5 µl Wasser und 5 µl WGA-DNA-Polymerase hergestellt, dem dann 15 µl der vorbereiteten Sammlung zugegeben wurden. Hieraus ergab sich ein Gesamtvolumen der Reaktion von 75 µl. Die Reaktion lief ebenfalls im Thermocycler ab. Nach einem Denaturierungsschritt von 3 Min. bei 95 °C folgten 14 Zyklen mit 15 Sek. bei 94 °C, 5 Min. bei 65 °C und nach Beendigung der Zyklen das Abkühlen auf 4 °C.

Die Amplifikate wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.2.4 Reamplifikationskit (Sigma)**

Zuerst wurde die Probe mit dem Purification-Kit von Qiagen aufgereinigt. Der Mastermix wurde aus 168 µl des dNTP-Mixes mit einer Konzentration von 10 mM und der gesamten gelieferten Mastermixmenge hergestellt. Überschüssiger Mastermix ist bei -20 °C für sechs Monate lagerfähig.

Im nächsten Schritt wurde der Amplifikationsmix vorbereitet, indem pro Reaktion 49,5 µl Wasser, 10,5 µl vorbereiteter Mastermix und 5 µl WGA-DNA-Polymerase zusammengeführt wurden. Als Probe dienten 10 µl des aufgereinigten Amplifikats.

Die Reaktion lief am Perkin Elmer 9700 wie folgt ab: Das Amplifikat wurde 3 Min. bei 95 °C denaturiert und anschließend in 14 Zyklen mit je 15 Sek. Denaturierung bei 94 °C und 5 Min. Anlagerungszeit bei 65 °C amplifiziert. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Probe auf 4 °C heruntergekühlt. Die Amplifikate wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.2.2.5 REPLI-g® Formalin fixated and Paraffin Embedded Tissue (FFPE)-Kit (Qiagen)**

Das FFPE-Kit wurde zur Amplifikation von DNA aus in Formalin fixiertem oder in Paraffin eingebettetem Gewebe entwickelt. Es ist mit einer Ligase ausgestattet, die die stark fragmentierte DNA des Gewebes in willkürlicher Weise zusammensetzt, um so die erforderliche Mindestlänge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente zu erreichen oder zu übertreffen. Es wird laut Hersteller nur eine Mindestlänge von 500 bp pro Fragment vorausgesetzt.

Da die verwendete DNA nicht mit Formalin oder Paraffin behandelt wurde, mussten die ersten Schritte des Herstellerprotokolls, die die Lyse der Probe betrafen, modifiziert werden. Um die perfekte Ausgangssituation für die Amplifikation der DNA zu finden, wurden die Proben (Nine Mile  $\sim 10^5$  –  $\sim 10^1$  Kopien/ $\mu$ l) an verschiedenen Stellen im Protokoll eingesetzt und in einem Versuch wurde der Lyse-Schritt komplett weggelassen (s. Tabelle 4).

In der Kitbeschreibung sah das Protokoll folgendermaßen aus: Zuerst wurde die FFPE Lysis Solution 1: 10 verdünnt, sodass 100  $\mu$ l Lösung vorlagen. Dazu würde im nächsten Schritt normalerweise das in Paraffin eingebettete Gewebe zugefügt, durchgemischt und zentrifugiert werden. Im vorliegenden Versuch fiel dieser Schritt weg. Nach 10 minütiger Inkubation bei 95 °C und anschließender Abkühlung auf 4 °C wurden 2  $\mu$ l Proteinase K zugegeben, gemischt und zentrifugiert. Es folgte die erneute Inkubation für 60 Min. bei 60 °C, gefolgt von 10 Min. bei 95 °C.

Nach der Abkühlung wurden 10  $\mu$ l des lysierten Materials in ein neues Eppendorfgefäß überführt, wo dann der FFPE-Mastermix hinzugefügt wurde.

Im ersten Versuch wurde der Lyse-Schritt weggelassen, sodass die zugehörigen Puffer und Komponenten in der nachfolgenden Ligation und Amplifikation fehlten. Die Verdünnungsreihe des Nine Mile durchlief im zweiten Versuch den gesamten Lyse-Schritt, im dritten wurde sie nach Ablauf der ersten Inkubationszeit vor dem Zugeben von Proteinase K eingesetzt und im vierten nach dem letzten Inkubationsschritt. Im Gegensatz zu Versuch 1, bei dem die Reagenzien des Lyse-Schritts in der folgenden Amplifikation fehlten, wurden bei Versuch 4 die Proben zu dem Reaktionsgemisch dazugegeben. Dieses hatte vorher ohne Probe die einzelnen Schritte des Protokolls durchlaufen.

**Tabelle 4:** Übersicht Versuchsaufbau REPLI-g® FFPE Kit

Schritt im Protokoll	Zeitpunkt Zugabe 10 µl Probe
	Versuch 1: Weglassen des Lyseschritts
FFPE Lysis Solution verdünnen	Versuch 2: Zugabe vor 1. Inkubation
Inkubation (95 °C für 10 Min.)	
2 µl Proteinase K dazu	Versuch 3: Zugabe nach 1. Inkubation
Inkubation (60 °C für 60 Min. und 95 °C für 10 Min.)	
Abkühlung und Umfüllen	Versuch 4: Zugabe nach 2. Inkubation
Amplifikation mit REPLI-g® Midi Kit	

Der FFPE-Mastermix wurde auf Eis hergestellt und bestand aus 8 µl FFPE-Puffer, 1 µl Ligations-Enzym und 1 µl FFPE-Enzym. Diese 10 µl Mastermix wurden zu 10 µl lysierter oder in unserem Fall unbehandelter Probe in ein Eppendorfgefäß gegeben, durchgemischt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Min. bei 24 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C für 5 Min. gestoppt und die nun verbundenen Fragmente auf 4 °C abgekühlt.

Im nächsten Schritt wurde der Amplifikationsmastermix auf Eis aus je 29 µl REPLI-g® Midi Reaction Buffer und 1 µl REPLI-g® Midi Polymerase hergestellt und direkt mit der ligierten DNA verwendet. Die Reaktion lief 8 Std. bei 30 °C im Thermocycler ab. Durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C wurde auch diese Reaktion beendet. Die gewonnenen Amplifikate wurden bei -20 °C gelagert.

## 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.2.3.1 Real-time-PCR

Die real-time-PCR macht sich den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) zunutze. Hier gibt es zwei Verfahren, die sich im Wesentlichen durch den Einsatz verschiedener SONDENSYSTEME unterscheiden. Während die Taqman-PCR mit nur einer Hydrolyse-Sonde arbeitet, verwendet das sogenannte HybProbe-Format immer zwei Hybridisierungssonden.

Die Hydrolyse-Sonde ist mit einem Fluoreszenzreporter und einem sogenannten Quencher ausgestattet. Solange sich die beiden in räumlicher Nähe zueinander befinden, also die Sonde an das Template angelagert ist, unterdrückt der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters. Erst wenn während der PCR die Sonde



abgelöst wird und somit Quencher und Reporter getrennt werden, wird das vom Reporter ausgesendete Fluoreszenzsignal messbar.

Beim Hybridisierungsformat werden Hybridisierungssonden eingesetzt, von denen eine mit einem Fluoreszenzdonor und eine zweite mit einem Akzeptor ausgestattet ist. Die Sonden binden während der Anlagerungsphase spezifisch an die amplifizierten DNA-Fragmente und somit kommen Akzeptor und Donor in räumliche Nähe. Der Donor wird durch weißes Licht angeregt und emittiert grünes Licht. Ein Teil seiner Energie geht auf den Akzeptor über, sodass dieser rotes Licht emittiert. Dieses rote Licht wird am Ende jedes Anlagerungsschrittes gemessen. Seine Intensität steigt proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes.

Für die hier durchgeführten real-time-PCRs wurden ausschließlich Hybridisierungssonden verwendet.

Bei der im Anschluss durchgeführten Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur kontinuierlich erhöht (z.B. von 40 °C auf 85 °C), bis die DNA an einem für das Amplifikat spezifischen Punkt dissoziiert und wieder einzelsträngig vorliegt. Da der Schmelzpunkt unter anderem von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen abhängt und somit bei einem längeren spezifischen Produkt höher ist als bei beispielsweise Primer-Dimeren, ermöglicht diese Analyse eine Unterscheidung zwischen den beiden Komponenten. Des Weiteren lassen sich anhand von Änderungen der Schmelztemperatur auch SNPs aufspüren und Fehlpaarungen identifizieren.

Alle real-time-PCR-Untersuchungen wurden am Lightcycler® 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

Für alle Protokolle an diesem Gerät wurde der gleiche Mastermix verwendet:

LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit Cat # 2239272 (Roche Diagnostics, Mannheim). Hierbei wurde pro Reaktion 9,6 µl Wasser, 2,4 µl MgCl<sub>2</sub> (4 mM) und 2 µl des LC Fast Start Reaction Mix (1 x) eingesetzt. Die Primer hatten je eine Konzentration von 0,5 µM, die Sonden eine von 0,15 µM.

**Tabelle 5:** Chemikalien für real-time-PCR

<b>LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit Cat # 2239272</b>	<b>Roche Diagnostics, Mannheim</b>
Wasser	5Prime, Hamburg
Primer	TibMolBiol, Berlin

**Tabelle 6:** Primer für real-time-PCRs

	<b>Primer/Sonde</b>	<b>Sequenz (5´-3´)</b>
<b>com1</b>	Primer CB S	GGCCAATTATCAGAACAATCAC
	Primer OMP 4	TTGGAAGTTATCACGCAGTTG
	Sonde CB-LC	AATCCTACTTTTTCTGCGGTTTGAAGG p
	Sonde CB-FL	CCATGTCTTTTTTGAGCTGAGCAAC X
<b>QpH1</b>	Primer QpH1 fw	ATATTCAAGTCCTGGACGATCGA
	Primer QpH1 bk	TCTTCATTCGTTTTGGCTCGATG
	Sonde QpH_FL	TGAACTTCCATTTCTTAAATTTCCAT—FL
	Sonde QpH_LC	LC Red640- TCAATTTTCAGTTCATAAGGAGTTTGGT-PH
<b>QpRS</b>	Primer QpRS_F	GGTGCCGTCACCCTCAG
	Primer QpR	CGCAACCGGCTGTTGTGC
	Sonde Qp_FL	TACGTATGAACCGCAGAATACCG--FL
	Sonde Qp_LC	LC Red640- TCCCTTGGAAGGAATGCTAGAAATTG-PH
<b>Plasmidless</b>	Primer Integr_S	AGCGATAAATGAAGTAATGCCGT
	Primer Integr_R	ATATTCTGTATTAATCGAAAGCGAG
	Sonde Integr_FL	TTTTTATTGATCGCCAATTAGTATGGT--FL
	Sonde Integr_LC	LC Red640- CTTGTTGAACATCAATCACGTCGTT--PH
<b>adaA</b>	Primer <i>adaA</i> _R	TTCTTTTTGGTTAGCGGCGTAG
	Primer <i>adaA</i> _F	CCAGCGAGTTTACGATCAAG
	Sonde <i>adaA</i> _FL	CGTTTCCGAATGGTCATTCTTTTTTAC—FL
	Sonde <i>adaA</i> _LC	LC Red640- AGCATCGATTTTGTCTCTCCACCG-PH
<b>IS1111</b>	Primer 1 CB S4k	GAAACGGGTGTTGAATTGTTG
	Primer 2 CB A2k	TCACATTGCCGCGTTTACT
	Sonde 1 CB LCR	LC Red640-TAATCACCAATCGCTTCGTCC CGGT p
	Sonde 2 CB FLu	GCCACCGCTTTTAATTCCTCCTC--FL

### 2.2.3.1.1 Quantifizierung mittels *com1*

*Com1* kodiert für das *Coxiella outer membrane Protein 1* und ist im Genom einmal vorhanden (z.B. Nine Mile: CBU\_1910, Position 1.829.381 bis 1.830.139). Daher eignet sich die *com1*-PCR hervorragend zur Quantifizierung der Kopienzahl von *Coxiella burnetii*.

Mittels quantitativer real-time-PCR wurde anhand der Fluoreszenzintensität unter Verwendung eines definierten Plasmidstandards (TIB® MolBiol, Berlin, Deutschland) das Gen quantifiziert. Dies ist möglich, da die verwendeten Sonden an die

amplifizierten DNA-Fragmente interkalieren und so die Fluoreszenzintensität mit der Konzentration des Produkts steigern (126).

Die Reaktion wurde nach folgendem Thermoprotokoll durchgeführt: Nach einem Aktivierungsschritt bei 95 °C für 10 Min. folgten 45 Zyklen zur Amplifikation zu je 10 Sek. bei 95 °C, 8 Sek. bei 60 °C und 10 Sek. bei 70 °C. Im Anschluss an die Amplifikation folgte eine Schmelzkurvenanalyse, bei der auf 95 °C für 20 Sek. erhitzt, auf 40 °C für weitere 20 Sek. abgekühlt und schließlich erneut bis auf 85 °C in 0,2 °C/Sek.-Schritten erhitzt wurde.

#### **2.2.3.1.2 Bestimmung des Plasmidtyps**

Die Coxiellen lassen sich fünf verschiedenen Plasmidtypen zuordnen, wobei hier nur drei mittels real-time-PCR mit jeweils plasmidspezifischen Primern und Sonden untersucht wurden. Als Positivkontrolle dienten die aus der Literatur bekannten Stämme Nine Mile für QpH1, Priscilla für QpRS und Scurry für Plasmidless.

Das Thermoprotokoll umfasste ebenfalls einen Aktivierungsschritt, durch den die Polymerase aktiviert werden soll, von 10 Min. bei 95 °C und 45 Zyklen zur Amplifikation mit 10 Sek. bei 95 °C, 10 Sek. bei 50 °C und 10 Sek. bei 72 °C. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei auf 95 °C erhitzt, direkt auf 40 °C abgekühlt, diese Temperatur 30 Sek. gehalten und schließlich in 0,2 °C/Sek.-Schritten bis auf 95 °C erhitzt wurde.

#### **2.2.3.1.3 Bestimmung des *adaA*-Typs**

Das *adaA*-Gen wurde mittels real-time-PCR und genspezifischen Primern und Sonden nachgewiesen.

Das Thermoprotokoll war am Lightcycler 1.5 analog zu dem der *com1*-PCR, abgesehen davon, dass in der Anlagerungsphase 8 Sek. bei 55 °C gehalten wurden und in der Elongationsphase 15 Sek. bei 72 °C.

### 2.2.3.2 Konventionelle PCR

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung bestimmter bekannter Sequenzen innerhalb eines Genoms. Hierzu benötigt man neben der Ausgangs-DNA zwei Oligonukleotid-Primer, die ein Andocken der Polymerase ermöglichen, eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase), Desoxyribonukleotid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP zu gleichen Teilen) und einen Tris-/HCl-Puffer. Die Reaktion beginnt typischerweise mit der Hitzedenaturierung des Doppelstranges bei 94 °C. Im nachfolgenden Anlagerungsschritt wird die Temperatur abgesenkt (auf zw. 55 – 62 °C), sodass die im Überschuss vorhandenen Primer an die zu ihnen komplementäre Stelle der jetzt einzelsträngigen DNA binden können. Der nächste Schritt, bei dem die Temperatur wieder auf zirka 72 °C angehoben wird, ist der Elongationsschritt. Hier liegt das Arbeitsoptimum der *Taq*-Polymerase. Beginnend am 3'-Ende verlängert sie die Primer, bis erneut ein Doppelstrang vorliegt. Anschließend wird durch Erhitzen der neu entstandene Doppelstrang aufgeschmolzen und die Reaktion beginnt von neuem. Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration der Zielsequenz.

Um möglichst viel Amplifikat zu erhalten, kann die Reaktion zwischen 30 und 40 Mal wiederholt werden, bis die Enzyme und Nukleotide verbraucht sind.

#### 2.2.3.2.1 Konventionelle singleplex-PCR

In dieser Arbeit wurden bei der singleplex-PCR mit zwei verschiedenen Taqman-Mastermixen gearbeitet. Der Mix von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) kam bei der Sequenzierung von Lightcyclerprodukten zum Einsatz, während der Mix von Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) für die alternative QpH1-PCR genutzt wurde. Die Reaktionsmische waren wie folgt zusammengesetzt:

**Tabelle 7:** Mastermix für die Singleplex 1

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in einem Reaktionsgefäß (µl)	Firma
PCR-Wasser		5,33	5-Prime
TaqMan 2x PCR Master Mix		10,00	Applied Biosystems
Vorwärtsprimer 10 µM	0,5 µM	1,00	TIB®-MolBiol
Rückwärtsprimer 10 µM	0,5 µM	1,00	TIB®-MolBiol
DNA		2,00	

**Tabelle 8:** Mastermix für die Singleplex 2

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in einem Reaktionsgefäß (µl)	Firma
PCR-Wasser		15,90	5-Prime
PCR-Mix 10x		2,50	Invitrogen
dNTPs	0,2 mM	0,50	Roche
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2,0 mM	1,00	Invitrogen
<i>Taq</i> -Polymerase	1,0 U	0,20	Invitrogen
Vorwärtsprimer 10 µM	0,5 µM	1,25	TIB®-MolBiol
Rückwärtsprimer 10 µM	0,5 µM	1,25	TIB®-MolBiol
DNA		2,50	

Die PCR mit dem Reaktionsmix von Applied Biosystems wurde mit diesem Thermoprotokoll durchgeführt:

**Tabelle 9:** Thermoprotokoll der Singleplex 1

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95	10:00 Min.	1
Denaturierung	95	60 Sek.	40
Anlagerung	60	30 Sek.	
Elongation	72	30 Sek.	

Und schließlich benötigte der Mix von Invitrogen dieses Thermoprofil:

**Tabelle 10:** Thermoprotokoll der Singleplex 2

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	94	2 Min.	1
Denaturierung	94	30 Sek.	35
Anlagerung	52	60 Sek.	
Elongation	72	2 Min.	
Kühlung	10	∞	

Die konventionelle PCR zur Bestimmung des Plasmidtyps deckte ein größeres Stück des QpH1-Plasmids ab und verwendete die folgenden Primer:

**Tabelle 11:** Alternativprimer der QpH1-PCR

	Primer "lang"	Sequenz (5´-3´)
<b>QpH1 alternativ</b>	QpH 11	TGACAAATAGAATTTCTTCATTTTGATG
	QpH 12	GCTTATTTTCTTCCTCGAATCTGAATTA

Das Produkt hatte eine Länge von 1043 bp.

### 2.2.3.2.2 Multiplex-PCR

In einem PCR-Ansatz können auch mehr als nur zwei Primer verwendet werden. Diese Form der PCR nennt man multiplex-PCR. Sie findet in dieser Arbeit besonders Anwendung bei der Analyse der *IS1111*-Elemente und der MLVA-Untersuchung.

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Primer zu kombinieren. Zum Ersten können, wie in der MLVA, mehrere Primerpaare im gleichen Mastermix angewendet oder, wie bei der Analyse der *IS1111*-Verteilung, verschiedene Vorwärtsprimer mit dem gleichen Rückwärtsprimer gepaart werden. Die Fragmente, die hier entstehen, sind unterschiedlich groß, sodass sie mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, unterschieden und identifiziert werden können. Bei der MLVA-Methode wird zur Bestimmung der Länge der amplifizierten Fragmente eine Analyse im Sequencer 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) angeschlossen, die bei dieser Methode gegenüber dem Gel eine höhere Auflösungsstärke aufweist.

### 2.2.3.2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der amplifizierte DNA nach ihrer Größe aufgetrennt werden kann. Hierzu nutzt sie die negative Ladung der DNA.

Als Träger diente im Falle der *IS1111*-Analyse ein dreiprozentiges Gel, weil so eine gute Auftrennung der verschiedenen amplifizierten Fragmente in der multiplex-PCR gewährleistet ist.

Zur Herstellung wurden 3 g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer vermischt und zum Kochen gebracht. Das noch heiße Gemisch wurde in eine Form gegeben, wo mithilfe eines Kamms die Taschen geprägt wurden. Nach kurzer Zeit war das Gel erstarrt und wurde in die Gelelektrophoresekammer eingelegt, sodass die Taschen auf der negativen, schwarzen Seite lagen. Das Ganze wurde abschließend mit 1x TAE-Puffer bedeckt.

Die amplifizierten Fragmente wurden zusammen mit einem Ladepuffer, der die Probe in der Tasche hält, auf das Gel aufgetragen. Es wurden je 2 µl DNA, 3 µl Ladepuffer und zur Verdünnung 2 µl PCR-Wasser eingesetzt.

Unter einer definierten Spannung wandern die Fragmente ihrer Ladung gemäß vom negativen zum positiven Pol durch das Gel. Im Falle der *IS1111*-Analyse wurden 70 V und 400 A für 100 Min. angelegt. In der Mini-Gel-II-Kammer (VWR, Darmstadt Deutschland), 100 V für 90 Min. in der Horizon-58-Kammer (Life Technologies, Regensburg, Deutschland).

Die kurzen Fragmente bewegen sich deutlich schneller durch das Gel als die langen, was zu einer räumlichen Auftrennung der einzelnen Fragmente führt.

Nach der Auftrennung im Gel wurde dieses für zirka 20 Min. mit Gel Red™ (Biotium, Hayward USA) gefärbt. Gel Red™ ist ein Farbstoff, der sich in die Helixstruktur der DNA einlagert. Wird er UV-Licht ausgesetzt, werden Elektronen angeregt, die, wenn sie wieder in ihren Ausgangszustand zurückkehren, sichtbares Licht emittieren und so wird DNA im Gel sichtbar. Die Gele wurden mithilfe von ChemiDoc XRS (Bio-Rad, München, Deutschland) fotografiert und ausgewertet.

**Tabelle 12:** Chemikalien für die Gelelektrophorese

Agarose NEE0 Ultra Rothi Agarose	Roth, Karlsruhe
50x TAE-Puffer (im Haus hergestellt)	242 g TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan) 100 ml 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetra- essigsäure) 57,1 ml 0,2 M Essigsäure Mit NaOH auf pH 8,0 einstellen und mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen Gebrauchslösung 1: 50 verdünnen
100 bp DNA-Leiter equalized (0,05 µg/µl)	Roth, Karlsruhe
Low range DNA-Leiter	Roth, Karlsruhe
DNA-Gel loading Buffer 10x	Eppendorf, Hamburg
GelRed™	Biotium, Hayward USA

## 2.2.4 Typisierungsmethoden

### 2.2.4.1 Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)

Bei der MLVA werden sogenannte Tandemwiederholungen (engl.: tandem repeats) untersucht. Diese Sequenzen treten in einem Genom an bestimmten Stellen in für jeden Genotyp charakteristischer Anzahl auf. Sie wurden mittels *in silico*-Analysen am Nine Mile-Gesamtgenom und mithilfe einer Software, die Tandemwiederholungen findet, ermittelt (127). Mit spezifischen flankierenden Primern, die zuvor mittels *in-silico*-Analysen ausgewählt wurden, lassen sich nun die zu untersuchenden Regionen der Tandemwiederholungen amplifizieren. Hierzu gab es für jeden Genort einen fluoreszenzmarkierten Vorwärtsprimer und einen unmarkierten Rückwärtsprimer. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels Fragmentlängenanalyse entweder am Sequenzierer oder mittels Gelelektrophorese. Für die hier bearbeitete Fragestellung umfassten die Untersuchungen 15 verschiedene MLVA-Marker.



**Tabelle 13:** Primer MLVA-multiplex-PCRs; \* - \*\*\* symbolisieren Konzentration der Primer im Mastermix in Tabelle 14

	<b>Primer/Sonde</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
<b>Multiplex 1</b>	Cbu0448_ms03 L***	<b>6FAM-</b> TGTCGATAAATCGGGAAACTT
	Cbu0448_ms03 R***	ACTGGGAAAAGGAGAAAAAGA
	Cbu1941_ms20 L**	<b>6FAM-</b> CTGAAACCAGTCTTCCCTCAAC
	Cbu1941_ms20 R**	CTTTATCTTGGCCTCGCCCTTC
	Cbu0838_ms27 L*	<b>6FAM-</b> TTTTGAGTAAAGGCAACCCAAT
	Cbu0838_ms27 R*	CAAACGTCGCACTAACTCTACG
	Cox 3 F**	<b>YAK-</b> GCAATCCAGTTGGAAAGAA
	Cox 3 R**	ATTGAAGTAATCCATCGATGATT
	Cox 5 F*	<b>BoTMR-</b> AATGGAGTTTGTAGCAAAGAAA
	Cox 5 R*	AAAGACAAGCAAACGATAAAAA
<b>Multiplex 2</b>	Cbu1941_ms36 L**	<b>6FAM-</b> GAAACCAGTCTTCCCTCAACAG
	Cbu1941_ms36 R**	ATAACCGTCATCGTCACTTCT
	Cox 7 F***	<b>6FAM-</b> ACAGGCCGGTATTCTAACC
	Cox 7 R***	CCTCAGCACCCATTTCAG
	Cbu1963_ms21 L*	<b>YAK-</b> AGCATCTGCCTTCTCAAGTTTC
	Cbu1963_ms21 R*	TGGGAGGTAGAAGAAAAGATGG
	Cbu1351_ms30 L*	<b>BoTMR-</b> ATTCCTCGACATCAACGTCTT
	Cbu1351_ms30 R*	AGTCGATTTGGAAACGGATAAA
	Cbu1980_ms22 L*	<b>6FAM-</b> GGGGTTTGAACATAGCAATACC
	Cbu1980_ms22 R*	CAATATCTCTTTCTCCCGCATT
<b>Multiplex 3</b>	Cbu1435_ms33 L**	<b>6FAM-</b> TAGGCAGAGGACAGAGGACAGT
	Cbu1435_ms33 R**	ATGGATTTAGCCAGCGATAAAA
	Cbu0197_ms23 L**	<b>6FAM-</b> GGACAAAAATCAATAGCCCGTA
	Cbu0197_ms23 R**	GAAAACAGAGTTGTGTGGCTTC
	Cbu1471_ms34 L*	<b>BoTMR-</b> TGACTIONCAGCGACTCGAAGAA
	Cbu1471_ms34 R*	TCGTGCGTTAGTGTGCTTATCT
	Cbu0259_ms24 L**	<b>X-</b> ATGAAGAAAGGATGGAGGGACT
	Cbu0259_ms24 R**	GATAGCCTGGACAGAGGACAGT
	Cbu0033F2**	<b>YAK-</b> gCCCTTgTCATCTTgCgg
	Cbu0033R2**	TCAAgtATTAATgAgCgTCg

Die Reaktion lief in drei multiplex-PCRs ab, deren Mastermixe wie folgt zusammengesetzt waren:

**Tabelle 14:** Mastermix für die MLVA

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in 1 Ansatz (µl)	Firma
Multiplex PCR Kit 2x	1x	12,50	Qiagen, Hilden
Wasser		5,50	5Prime, Hamburg
Primer (je 5 vorwärts und 5 rückwärts) 10 µM	* = 0,1 µM ** = 0,2 µM *** = 0,3 µM	0,25 0,50 0,75	TIB®- MolBiol
DNA		2,50	

Die PCR wurde am Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer nach folgendem Thermoprofil durchgeführt: Nach einer Erhitzungsphase von 15 Min. bei 95 °C folgten 30 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt (30 Sek. bei 94 °C), einem Anlagerungsschritt (90 Sek. bei 58 °C) und einem Amplifikationsschritt (60 Sek. bei 72 °C). Nach Ablauf der Zyklen folgte der 30minütige finale Syntheseschritt bei 60 °C.

Die Fragmentlängenanalyse wurde am 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden alle multiplex-PCR-Ergebnisse 1:10 verdünnt und je 2 µl auf die Sequenzierplatte gegeben. 17,5 µl HIDI formamide (Applied Biosystems) und 0,5 µl Size standard GENESCAN™ 1200 LIZ (Applied Biosystems) wurden zu jeder Probe zugegeben.

Die Platte wurde dann 5 Min. bei 95 °C denaturiert und anschließend zur Fragmentlängenanalyse in den 3130 Genetic Analyzer überführt. Die Auswertung erfolgte mit der GeneMapper Software (Applied Biosystems)

Im Anschluss an die PCR und die Fragmentlängenanalyse folgten die Berechnung der Längen der Tandemwiederholungen und die Zuordnung zu einem MLVA-Typ. Die Berechnung der Länge wurde hier mit folgender Formel durchgeführt:

$$RL = \frac{L - ((R\text{-Start}_{NM} - 5'\text{-Pr-Start}_{NM}) + (3'\text{-Pr-Stop}_{NM} - R\text{-Stop}_{NM}))}{R\text{-Anz}_{NM}}$$

RL = Repeatlänge

- L = Länge PCR-Produkt  
R-Start<sub>NM</sub> = Position Beginn der Tandemwiederholung auf Nine Mile  
5'-Pr-Start<sub>NM</sub> = Position 5'-Ende Startprimer auf Nine Mile  
3'-Pr-Stop<sub>NM</sub> = Position 3'-Ende Stopprimer auf Nine Mile  
R-Anz<sub>NM</sub> = Anzahl der Repeats auf Nine Mile

Die Ergebnisse dieser Berechnung wurden mit einer Datenbank verglichen. Auf diese Weise konnte der MLVA-Typ ermittelt werden.

### 2.2.4.2 IS1111-Analyse

*Coxiella burnetii* weist in seinem Genom mehrere repetitive Elemente auf, die IS1111-Elemente. Denison et al. (2007) nutzten einige dieser Elemente zur Typisierung, indem sie Primer anwandten, die in der unterschiedlich gestalteten, dem Element vorgelagerten Region banden und so mit dem gleichen Rückwärtsprimer Produkte unterschiedlicher Länge, die sich dann im Gel auftrennen ließen, hervorbrachten.

2011 wurden von Bleichert et al. 32 IS-Elemente in sechs multiplex-PCRs zusammengefasst (125). Diese 32 Marker wurden in der vorliegenden Arbeit um zwanzig weitere Marker und damit vier Multiplexe ergänzt.

#### 2.2.4.2.1 Primersynthese IS1111-Multiplex 7 - 10

Bei der IS1111-Typisierung werden nie alle etwaig vorhandenen IS1111-Elemente erfasst. In den letzten Jahren wurden verschiedene multiplex-PCRs entwickelt, um die Untersuchung für den Anwender einfacher zu gestalten. Die Elemente IS 1 – 20 wurden hier näher untersucht und wenn möglich in multiplex-PCRs zusammengefasst.

Aus der Publikation von Denison et al. 2007 gehen die Primersequenzen und die bisherigen Produktlängen hervor. In einem ersten Schritt wurden diese Sequenzen mithilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST; siehe auch 3.1.2.1.1 und 3.1.2.3.1) im Genom lokalisiert. Als Rückwärtsprimer diente der ebenfalls von Bleichert et al. 2011 entwickelte Primer IS-Rev, dessen Produkte 242 bp kürzer als die aus der Publikation von Denison et al. und somit leichter im Gel aufzutrennen waren (125).

**Tabelle 15:** Primerpositionen IS1111 1 – 20 auf dem Nine Mile-Genom (RSA 493)

	<b>Vorwärtsprimerposition in NM</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Rückwärtsprimer (AAATTCATGTTGGCGATT)</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
IS 1	6.478 – 6.496	TAATGGGCGACCAAGTCGA	6.732 – 6.713	258
IS 2	36.414 – 36.433	GGCTGAATGAATGCCTTCCA	36.668 – 36.649	258
IS 3	344.821 – 344.844	AAAAAGACCCCTCAGGTAATGGAA	345.051 – 345.032	234
IS 4	467.169 – 467.151	TTCCGCCATGACCAACTTC	466.897 – 466.916	276
IS 5	501.873 – 501.892	GTCGGTCAACGTCGTACACAT	502.141 – 502.122	272
IS 6	1.022.423 – 1.022.404	CCATTTGCAATAGCCGTGAA	1.022.193 – 1.022.212	235
IS 7	1.034.446 – 1.034.470	GCGGTTTTGGTACAATACTGTTCATT	1.034.699 – 1.034.680	329
IS 8	1.128.517 – 1.128.536	GGCAAGGATGACGAATGGAT	1.128.741 – 1.128.722	228
IS 9	1.163.153 – 1.163.170	GCCTCAGCCGATTCGAG	1.163.398 – 1.163.379	249
IS 10	1.221.371 – 1.221.353	GTGCGGCATTCGTGGTAGA	1.220.891 – 1.220.910	238
IS 11	1.520.548 – 1.520.530	AAAGCCGTTCCCTACCCGTG	1.520.314 – 1.520.333	238
IS 12	1.538.791 – 1.538.769	ACGTAGTTTGGAAAGGATACCC	1.538.509 – 1.538.528	239
IS 13	1.581.642 – 1.581.623	GATGAGCGTCCACCACCTGAA	1.581.352 – 1.581.371	294
IS 14	1.632.824 – 1.632.845	TGCTACCAACAGACTTACGGCA	1.633.058 – 1.633.039	238
IS 15	1.645.900 – 1.645.920	AACGCCCATGTGAGAAACATC	1.646.184 – 1.646.165	288
IS 16	1.689.204 – 1.689.228	ATGACTTCTGATAGGGACTGTGCTC	1.689.468 – 1.689.449	268
IS 17	1.715.514 – 1.715.532	CGAATCGCATTGGCACAGT	1.715.744 – 1.715.725	234
IS 18	1.818.928 – 1.818.950	CGTTTGCTGCTATACGACATGAA	1.819.213 – 1.819.194	289
IS 19	1.877.533 – 1.877.514	GTCGCCCCAGGAGTGTTCCTG	1.878.280 – 1.878.299	288
IS 20	1.898.339 – 1.898.361	ACGTCAATTACATCGAGCATTCA	1.898.562 – 1.898.543	227

Da die genannten Elemente alle im Genom des Stammes Nine Mile (RSA 493) auftreten, diente dieser als Referenzstamm.

Um in der Gelelektrophorese ein brauchbares Bild zu erhalten, sollten die Produktlängen mindestens dreißig Basenpaare auseinander liegen. Aufgrund der sehr ähnlichen Produktlängen ließen sich nur eine Vierer- und mehrere Zweiergruppen bilden. Bei einigen Elementen mussten deshalb die Längen mittels neuer Vorwärtsprimer verändert werden.

Um mögliche Produktlängen zu ermitteln, wurden die Basen für eine neue multiplex-PCR passend abgezählt (s. Abbildung 4) und dadurch gefundene mögliche Primer *in silico* gegen das Nine Mile-Genom abgeglichen. Hier musste besonders darauf geachtet werden, dass die entsprechende Sequenz nur einmal bindet und die Menge an GC-Nukleotiden 80 % nicht über- und 20 % nicht unterschritten wurde. Aufgrund der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich zu A und T kann durch einen gewissen Mindestanteil an G und C eine stabile Bindung des Primers gewährleistet werden.

<b>IS 5 (501.800 – 502.141)</b>					
GAATGACTTT	ATCGGCGAGC	GCACTGGCAT	GGCGTTTGGA	AGTCGCGCTA	CAGACGATCA
TTCGATCCAT	CAGGTCGGTC	AACGTCGTCA	CATCAAGGTC	GGTAATTTGA	AGAGCTTTAT
GTCATCAAG	CGTGTTAATC	ACTAAATTGG	CAAGTTCGGC	ACTTTTCAT	GGATTATTA
ATTAGCCCTC	GGGTAAAAAC	CCCTAATGAT	AAAGGGATTG	TGGATTTCAA	ACAAGTTAGG
GTAAAGGGC	GGGCGCGATT	GAAAGTGGCG	GTTTCAACAA	GTAGCCCAAT	GAAATGGACC
CACCCCTTAA	AGACGGCGTC	ATAATGCGCC	AACATAGAAT	TT	
→ Rev					
→ ALT: 501.873 – 501.892 → 272 bp					
→ NEU: 501.969 – 501.987 → 173 bp					
→ NEU 2. Variante: 501.953 – 501.978 → 192 bp					

**Abbildung 4:** Primerauswahl am Beispiel IS 5; Sequenz aus NCBI-Datenbank: Nine Mile (RSA 493); Rev (grau) = Reverseprimer; ALT (hellblau) = Primer nach Denison; NEU (grün) = neu abgezahlter möglicher Primer; NEU 2. Variante (gelb) = Ersatzvariante zum neuen Primer)

**Tabelle 16:** Neue Primer

	<b>NEU</b>
IS 2	GAAGTAGCCCAATGAAATGG
IS 5	CGGATTATTAATTAGCCC
IS 9	GGGACTATTCTATAGAAACAGG
IS 14	GAGATCGAAGCGGATGCGAT
IS 8	AAGGCTGCGACTCGGCAC
IS 17	GCTAGCGTCGGGTGCGATTG
IS 16	CGACGTTTACTCAATAA AT
IS 10	ATTTGCAAAGAGATAACCATC
IS 15	GCCAAGCAAATACCTCGC
IS 18	CGAATATGCTTTACCTCAA

Als neue Multiplexe wurden dann die folgenden vier nach passenden Produktlängen zusammengefügt:

Multiplex 7: IS 2 (68 bp), IS 3 (234 bp), IS 4 (276 bp), IS 5 (173 bp),  
IS 7 (329 bp)

Multiplex 8: IS 1 (258 bp), IS 9 (169 bp), IS 13 (294 bp), IS 14 (107 bp),  
IS 20 (227 bp)

Multiplex 9: IS 6 (272 bp), IS 12 (239 bp), IS 8 (208 bp), IS 17 (128 bp),  
IS 16 (169 bp)

Multiplex 10: IS 10 (206 bp), IS 11 (238 bp), IS 15 (91 bp),  
IS 18 (157 bp), IS 19 (288 bp)

Anschließend wurde ein Kontrollgel angefertigt, um die korrekte Auftrennung zu überprüfen.

#### **2.2.4.2.2 Primer und Protokolle Multiplex 1 - 10**

Aufgrund der unterschiedlichen Produktlängen ließen sich einige der Elemente in multiplex-PCRs zusammenfassen. In dieser Arbeit wurden die bereits etablierten multiplex-PCRs 1 – 6 und die neu designten multiplex-PCRs 7 – 10 verwendet.

Da in manchen der multiplex-PCRs fünf, in anderen sechs Vorwärtsprimer eingesetzt wurden und bei einigen die Menge an eingesetztem Primer variierte, ergaben sich jeweils individuelle Mastermixe.

**Tabelle 17:** Mastermix Multiplexe 1,4,7 – 10

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in 1 Ansatz ( $\mu$ l)	Firma
Multiplex PCR Kit 2x	1x	6,25	Qiagen, Hilden
Wasser		3,50	5Prime, Hamburg
Vorwärtsprimer (5 x) 10 $\mu$ M	je 0,2 $\mu$ M	je 0,25	TIB®-MolBiol
Rückwärtsprimer 10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,50	TIB®-MolBiol
DNA		1,00	

**Tabelle 18:** Mastermix Multiplexe 2,3

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in 1 Ansatz ( $\mu$ l)	Firma
Multiplex PCR Kit 2x	1x	6,25	Qiagen, Hilden
Wasser		3,25	5Prime, Hamburg
Vorwärtsprimer (6 x) 10 $\mu$ M	je 0,2 $\mu$ M	je 0,25	TIB®-MolBiol
Rückwärtsprimer 10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,50	TIB®-MolBiol
DNA		1,00	

**Tabelle 19:** Mastermix Multiplex 5

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in 1 Ansatz ( $\mu$ l)	Firma
Multiplex PCR Kit 2 x	1 x	6,25	Qiagen, Hilden
Wasser		4,50	5Prime, Hamburg
Vorwärtsprimer (4 x) 10 $\mu$ M	je 0,2 $\mu$ M	je 0,25	TIB®-MolBiol
IS 60 10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,50	TIB®-MolBiol
Rückwärtsprimer 10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	0,50	TIB®-MolBiol
DNA		1,00	

**Tabelle 20:** Mastermix Multiplex 6

Reagenzien	Endkonzentration	Menge in 1 Ansatz (µl)	Firma
Multiplex PCR Kit 2x	1x	6,25	Qiagen, Hilden
Wasser		4,61	5Prime, Hamburg
Vorwärtsprimer (4 x) 10 µM	je 0,2 µM	je 0,25	TIB®-MolBiol
IS 47 und IS 45 10 µM	je 0,2 µM	je 0,50	TIB®-MolBiol
Rückwärtsprimer 10 µM	0,4 µM	0,50	TIB®-MolBiol
DNA		1,00	

**Tabelle 21:** IS1111-multiplex-PCR Primer für insgesamt 52-Elemente

	Primer	Vorwärtsprimer 5'-3'	Fragmentgröße	Rückwärtsprimer IS1111 Rev
<b>Multiplex 1</b>	IS31	CTATTGCTATCCCGCTGTTT	99	AAATTCTATG TTGGCGCATT
	IS34	CCAAACTGCACCCATTTAAC	146	
	IS61	TTTCCATTTAGCCACAAAGC	176	
	IS48	AGGCAAGGCGATATTTTTGT	220	
	IS22	ACGCGGCTTTCTCACTAAC	251	
<b>Multiplex 2</b>	IS40	GAGTCGGGAAGATCCACAG	89	
	IS43	AATTTATCGGTGGGTGGAGT	120	
	IS39	GCTACAGACCCTCCAGATTG	162	
	IS33	AAGCGATTTTATTGACAGCA	180	
	IS35	TTAGCGTTCCTTAAGCCTCCT	228	
<b>Multiplex 3</b>	IS24	CTGCTTCCCTGCAAATCGGA	83	
	IS53	CGCTCCATACGGGCTACTT	102	
	IS49	ATGAAGTCGCTCGAAAAACG	145	
	IS44	CGCTAACGAAGCCGACTCG	175	
	IS55	TCGTGCGTTTTGTAATGGTG	210	
	IS56	CACTGGTTCCTTATTGCCGTA	237	
<b>Multiplex 4</b>	IS26	CAAGTGGTGAAGCGTGAAAA	111	
	IS29	GCTGTTGGGGATGTTGAGAT	142	
	IS54	TGTCGCAACGTAATGAGAGC	165	
	IS21	GCCCTCGTTGTATTTTGTCC	207	
	IS23	GCAGGTCATTGCGTTCTAAA	231	
	IS25/S	AGCCAATGCTGAAACTGC	260	
<b>Multiplex 5</b>	IS60	TTCGTAAGTAGCCCAATGAAA	70	
	IS42	TCAGATTAGGAGCGACACGA	102	



	IS51	ACTGAGCATGGGGTTGTTGT	131	AAATTCTATG TTGGCGCATT
	Ms33 Rev*	ATGGATTTAGCCAGCGATAAAA	158	
	IS46	TTTATGTTCTGGACGCATGG	182	
	IS50	TGCCAAGAGAACGGGTTATT	233	
<b>Multiplex 6</b>	IS47		71	
	IS28	GGTGGGCTTTGCTTCTTACA	129	
	IS41	TCCGGCATAACGATAACCTACTT	173	
	IS57	ACCTCGTTTAAGCGCTGTTC	196	
	IS58	GCAAATCTCAAGGGTTCCA	219	
	IS45	TTCATTTTCGTGCTGGATTT	255	
<b>Multiplex 7</b>	IS2	GAAGTAGCCCAATGAAATGG	68	
	IS3	AAAAGACCCTTCAGGTAATGGAA	234	
	IS4	TTCCGCCATGACCAACTTC	276	
	IS5	CGGATTATTAATTAGCCC	173	
	IS7	GCGGTTTTGGTACAATACTGTCATT	329	
<b>Multiplex 8</b>	IS1	TAATGGGCGACCAAGTCGA	258	
	IS9	GGGACTATTCTATAGAAACAGG	169	
	IS13	GATGAGCGTCCACCACTGAA	294	
	IS14	GAGATCGAAGCGGATGCGAT	107	
	IS20	ACGTCAATTACATCGAGCATTCA	227	
<b>Multiplex 9</b>	IS6	CCATTTGCAATAGCCGTGAA	272	
	IS12	ACGTAGTTTGGAAAGGATACCCG	239	
	IS8	AAGGCTGCGACTCGGCAC	208	
	IS17	GCTAGCGTCCGGTGCATTG	128	
	IS16	CGACGTTTACTCAATAA AT	169	
<b>Multiplex 10</b>	IS10	ATTTGCAAAGAGATACCATC	206	
	IS11	AAAGCCGTTCCCTACCGTG	238	
	IS15	GCCAAGCAAATACCTCGC	91	
	IS18	CGAATATGCTTTACCTCAA	157	
	IS19	GTCGCCAGGAGTGTCTG	288	

\*MS33 Rev = Primer für IS84

Als Positivkontrollen dienten die Stämme Henzerling (RSA 331) für die Multiplexe eins und vier, RT 1140 für die Multiplexe zwei und drei, Priscilla (Q 177) für Nummer sechs, Priscilla und F10 für Multiplex fünf und schließlich Nine Mile (RSA 493) für die Multiplexe 7 – 10.

Am Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer läuft die Reaktion nach folgendem Thermoprotokoll ab:

**Tabelle 22:** Thermoprotokoll IS1111-multiplex-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
Aktivierung der Taq-Polymerase	95	15 Min.	1
Denaturierung	94	30 Sek.	37
Anlagerung	56 (bei MP5+6: 62°)	90 Sek.	
Elongation	72	60 Sek.	
finale Elongation	72	10 Min.	1
Kühlung	10	∞	

## 2.2.5 Sequenzierung

### 2.2.5.1 Aufreinigung der Amplifikate

Zur Aufreinigung wurde das Qiagen QiaQuick® PCR Purification Kit (Hilden, Deutschland) verwendet. Damit sollen überschüssige Salze und Oligonukleotide aus dem PCR-Produkt entfernt werden, um so eine ungestörte Weiterverarbeitung zu gewährleisten.

Zu 50 µl Amplifikat wurden 250 µl Puffer PB zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch auf die bereitgestellten Säulen aufgetragen. Nach Zentrifugierung für 60 Sek. bei 750 g. (Centrifuge 5424, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) wurde die im Sammelbehälter befindliche Flüssigkeit verworfen und die Säulen in dasselbe Gefäß wieder eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden 750 µl Puffer PE auf jede Säule gegeben und wie im letzten Schritt zentrifugiert. Dieser Zentrifugierungsschritt wurde nach dem Verwerfen des Überstandes wiederholt und die Säulen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß umgesetzt. Um nun die in der Säule gesammelte DNA zu lösen, wurden 50 µl EB-Puffer (10 mM TrisCl; pH 8,5) auf die Säulen gegeben und ein letztes Mal 60 Sek. bei 750 g zentrifugiert.

Eine Gelelektrophorese zeigte, ob nach der Aufreinigung noch DNA in der Probe enthalten ist.

### 2.2.5.2 Gelextraktion

Für die Sequenzierung ist es essentiell, dass die verwendeten Primerpaare ein einzelnes, eindeutiges Produkt ergeben. Ist das nicht der Fall, kann es in der Sequenzanalyse zu nicht auswertbaren Mischsequenzen kommen. Zeigten sich bei einer Geluntersuchung mehr als eine Bande pro Primer oder solche, die nicht

eindeutig einem Primer zuzuordnen waren, so kam das QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen zum Einsatz. Dieses Kit ermöglicht es, die einzelnen im Gel sichtbaren Produkte eines Primers zu isolieren und so eine möglichst reine Sequenz von den Fragmenten zu erhalten, die dann für die Sequenzierung verwendet wurden.

Zuerst wurden 1,5 ml Eppendorfgefäße gewogen. Das Gel wurde nach Ablauf der Elektrophorese 20 Min. lang mit Gel Red™ gefärbt. Unter UV-Licht wurden die dann sichtbaren Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in je eines der abgewogenen Eppendorfgefäße überführt. Es folgte ein weiteres Wiegen der nun gefüllten Gefäße. Auf diese Weise wurde das Gewicht des Gelstücks ermittelt. Dem jeweiligen Gelgewicht entsprechend wurde QG-Puffer zugefügt und das Gemisch bei 55 °C für 10 Min. erhitzt, um das Gel zu lösen. Während des Erhitzens wurden die Eppendorfgefäße alle 2 – 3 Min. durchgemischt. Im nächsten Schritt wurde dem nun gelösten Gel abhängig von seinem Ausgangsgewicht Isopropanol zugefügt. Das Ganze wurde durchgemischt und auf eine QIAquick spin column in einem Sammelbehälter aufgebracht. Um die DNA zu binden, erfolgte anschließend die Zentrifugierung in der Eppendorf Centrifuge 5424 für 1 Min. bei 750 g. Die im Sammelbehälter befindliche Flüssigkeit wurde verworfen. Da die Produkte sequenziert werden sollten, musste noch einmal 0,5 ml QG-Puffer auf die Säulen aufgetragen und erneut zentrifugiert werden. Im Anschluss wurde 0,75 ml Waschpuffer PE zugefügt und zwei Mal je 1 Min. zentrifugiert. Der Sammelbehälter wurde im Anschluss verworfen und die Säule in ein sauberes/neues 1,5 ml Eppendorfgefäß umgesetzt. Im nächsten Schritt wurden 35 µl EB-Puffer (10 mM TrisCl; pH 8,5) dazu gegeben und das Ganze 1 Min. stehen gelassen, um anschließend zum letzten Mal 1 Min. bei 750 g zentrifugiert zu werden. Auch hier zeigte ein Kontrollgel, ob noch DNA in der Probe enthalten ist.

### **2.2.5.3 Farbmarkierung**

Die Farbmarkierung wurde mit dem BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit von Qiagen durchgeführt. Es wird je eine PCR mit dem Vorwärts- und eine mit dem Rückwärtsprimer durchgeführt.

Zuerst wurde aus 4 µl Terminator Ready Reaction Mix, 1 µl Primer und 4 µl PCR-Wasser ein Mastermix hergestellt. Die einzusetzende Menge Probe hängt von der Länge des Stückes ab, das sequenziert werden soll.

Der fertige Reaktionsmix wurde er am Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 (-B-) zuerst 1 Min. bei 96 °C aktiviert und im Anschluss in 25 Zyklen zu je 10 Sek. bei 96 °C, 5 Sek. bei 50 °C und 2 Min. bei 60 °C amplifiziert. Vor der weiteren Verarbeitung wurde auf 4 °C abgekühlt.

#### **2.2.5.4 Aufreinigung der markierten Amplifikate**

Die Aufreinigung der Amplifikate nach der Farbmarkierung erfolgte mit dem DyeEx Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland). Hierdurch wurden Farbreste, überschüssige Salze und Oligonukleotide entfernt.

Zuerst wurden die Reaktionsgefäße durch Öffnen um eine Vierteldrehung und Entfernen des Verschlusses am Boden vorbereitet und in die mitgelieferten Sammelbehälter gestellt. Das Ganze wurde dann 3 Min. bei 750 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen in 1,5 ml Eppendorfgefäße verbracht und die Probe komplett auf die Säule aufgetragen. Nach erneuter Zentrifugierung für 3 Min. bei 750 g war die Aufreinigung abgeschlossen.

#### **2.2.5.5 Sequenzierung der PCR-Produkte nach WGA**

Die Sequenzierung wurde teilweise im Haus am 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt oder das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Steigerung der Effizienz zur Analyse an GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) verschickt.

Für die Sequenzierung am Institut wurde 3 µl aufgereinigtes Produkt zusammen mit 12 µl Formamid in eine Sequenzierplatte pipettiert und diese anschließend in das Gerät eingesetzt.

#### **2.2.5.6 Auswertung der Sequenzen**

Die Verwaltung und das Zusammenfügen der Vorwärts- und Rückwärtsstränge der erhaltenen Sequenzen erfolgten mit der Software Bioedit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA). Zur Auswertung und Identifikation der Sequenzen wurde zum einen das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) von NCBI (National Centre of Biotechnology Information, USA) und zum anderen das Multiple

sequence alignment-Programm (MAFFT) von CBRC (Computational Biology Research Centre, AIST, Japan) verwendet.

Mittels BLAST lassen sich gewonnene Sequenzen gegen einzelne in der NCBI vorhandene komplette Genome, wie zum Beispiel das des Nine Mile, gegen bestimmte Teile des Genoms oder gegen die gesamte Datenbank zugleich abgleichen. Dadurch erhält man einen Überblick über alle möglichen Treffer der untersuchten Sequenz. Hat man die Position auf dem Genom gefunden, werden anschließend die in dieser Region bzw. diesen Regionen befindlichen kodierenden Bereiche untersucht, sodass eine Aussage über von der Sequenz abgedeckte Genorte getroffen werden kann. Im Fall der IS-Elemente beispielsweise war der erwartete Genort eine Transposase.

MAFFT ermöglicht den Abgleich mehrerer untersuchter Sequenzen gegeneinander und gegen kurze importierte Sequenzen, wie zum Beispiel die Sequenz des *IS1111*-Elements, inklusive der flankierenden 200 bp. Somit lassen sich nicht nur die vom gleichen Primer bei verschiedenen Proben erzeugten Sequenzen direkt vergleichen, sondern auch deren Position auf einem bestimmten Element bestimmen.

### 2.2.6 Statistik

Die Ergebnisse der MLVA der amplifizierten Proben ermöglichte die Berechnung einer Fehlerrate. Da jeder untersuchte Marker im Idealfall einen Peak in der Fragmentlängenbestimmung mittels Kapillar-Sequenzierer erzeugen soll, werden in der hier durchgeführten Untersuchung im korrekten Fall fünfzehn Peaks (= Markeranzahl) pro Probe erwartet. Die Gesamtzahl der erwarteten Peaks ergibt sich dann aus dem Produkt der Anzahl der untersuchten Proben und der idealen Anzahl an Peaks. Zum Beispiel:  $n = 14$  Proben; 15 Marker mit je einem erwarteten Peak werden untersucht; Gesamtzahl erwarteter Peaks =  $14 \times 15 = 270$ . Die richtigen bzw. falschen oder fehlenden Ergebnisse wurden dann ausgezählt (z.B. 186 richtige Peaks).

Zur Berechnung der Fehlerraten sind folgende Angaben notwendig:

- $n$  = Anzahl der untersuchten Proben
- Anzahl der falschen Peaks, wobei „falsch“ bedeutet: Peak vorhanden, aber falsche Länge
- Anzahl der Doppelpeaks, wobei „Doppelpeak“ bedeutet: zwei oder mehr Peaks unterschiedlicher Länge für den gleichen Marker vorhanden
- fehlende Peaks, wobei „fehlend“ bedeutet: kein Peak vorhanden
- $n \times 15$  = Gesamtmenge gewonnener Werte

Die Fehlerrate errechnete sich aus der Summe aller Fehler (fehlend + falsch + Doppelpeaks) geteilt durch die Gesamtmenge der generierten Werte.

Aus den gewonnenen Daten der *IS1111*-Analyse der WGA-Kits ließen sich die Sensitivität (Richtigpositive / (Richtigpositive + Falschnegative)), Falschnegativen-Rate ( $F_n\text{-Rate} = \text{Falschnegative} / (\text{Richtigpositive} + \text{Falschnegative})$ ), Spezifität (Richtignegative / (Richtignegative + Falschpositive)), Falschpositiven-Rate ( $F_p\text{-Rate} = \text{Falschpositive} / (\text{Richtignegative} + \text{Falschpositive})$ ) und die Falschklassifikationsrate ( $F_k\text{-Rate} = (\text{Falschpositive} + \text{Falschnegative}) / \text{Gesamtsumme der generierten Werte}$ ) berechnen.

Die Gesamtsumme der generierten Werte wurde als Anzahl der möglichen Banden multipliziert mit der Zahl der Proben definiert (zum Beispiel 22 mögliche Banden  $\times$  15 Proben = 330 mögliche positive Ergebnisse).

### **2.2.7 Bestimmung der Gesamt-DNA-Menge**

Die Bestimmung des Gesamt-DNA-Gehalts wurde am Nano Drop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer von peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 4  $\mu\text{l}$  Probe eingesetzt und die Konzentration der DNA in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  spektrophotometrisch erfasst.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gesamtgenom-Amplifizierung

#### 3.1.1 Quantitative Untersuchung

Um die Anwendbarkeit und besonders die Effizienz der verschiedenen WGA-Techniken bei unterschiedlich konzentrierten *Coxiella-burnetii*-Proben zu untersuchen, wurden zwei Verdünnungsreihen (vom Referenzstammes Nine Mile (RSA 493) und von einer klinischen Probe (Vaginaltupfer Nr. 37 / 2009 einer Ziege)) mit vier verschiedenen Gesamtgenom-Amplifizierungskits behandelt. Die Amplifikate wurden anschließend mittels *com1*-real-time-PCR quantifiziert.

##### 3.1.1.1 REPLI-g®

Die Verdünnungsreihe des Nine Mile zeigte nach Anwendung des Kits keinerlei Vermehrung der jeweiligen Ausgangskonzentration. Nach ausgiebiger Fehleranalyse und nach Rücksprache mit dem Hersteller des Kits wurde das Protokoll im Hinblick auf die verwendeten Geräte und Gegebenheiten optimiert. Dies beinhaltete in erster Linie eine Veränderung des Temperaturregimes, insbesondere die Anpassung der Deckeltemperatur (siehe Material und Methoden).

Trotz dieser Veränderungen zeigte sich unabhängig von der eingesetzten Ausgangskonzentration weiterhin beim Material des Nine-Mile-Stammes kein Effekt. Die  $C_t$ -Werte in der *com1*-Quantifizierung blieben nahezu gleich oder verschlechterten sich sogar im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Dieses Phänomen war unabhängig von der eingesetzten Verdünnungsstufe zu beobachten.

**Tabelle 23:** Nine Mile nach REPLI-g®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g®
Nine Mile $\sim 10^4$	9,53E+03	23,99	5,88E+03	24,76
Nine Mile $\sim 10^3$	1,55E+03	27,53	6,60E+02	27,97
Nine Mile $\sim 10^2$	2,95E+02	30,76	6,82E+01	31,30
Nine Mile $\sim 10^1$	7,00E+01	33,5	1,01E+01	34,11
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ

Um die zu niedrige Ausgangsmenge als Grund auszuschließen, wurde eine höhere Anfangskonzentration eingesetzt. Auch dieser Versuch blieb jedoch erfolglos.

**Tabelle 24:** Nine Mile mit hoher Ausgangskonzentration nach REPLI-g®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g®
Nine Mile $\sim 10^6$	6,74E+05	16,84	3,35E+04	20,44
Nine Mile $\sim 10^5$	3,84E+04	20,53	4,71E+03	23,13
Nine Mile $\sim 10^4$	4,60E+03	23,97	3,47E+02	26,73
Nine Mile $\sim 10^3$	2,01E+02	27,28	1,90E+01	30,72

Die verwendete klinische Probe reagierte ganz im Gegensatz zum Referenzstamm sehr erfolgreich auf die Behandlung mit REPLI-g®. Bei allen eingesetzten Verdünnungsstufen wurde eine Steigerung der eingesetzten Kopienzahlen erreicht. So konnten aus anfänglich 17.900 Kopien 8,62 Millionen erzeugt werden und aus 24,7 Kopien sogar 279.000. Einzig bei der niedrigsten Ausgangskonzentration, bei der nur noch eine einzige Genomkopie eingesetzt wurde, konnte nur eine Steigerung um eine Zehnerpotenz erreicht werden.

**Tabelle 25:** Klinische Probe nach REPLI-g®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g®
VT 37 $\sim 10^4$	1,79E+04	23,46	8,62E+06	14,12
VT 37 $\sim 10^3$	2,14E+03	26,82	2,75E+07	12,50
VT 37 $\sim 10^2$	2,12E+02	30,46	1,49E+07	15,20
VT 37 $\sim 10^1$	2,47E+01	33,85	2,79E+05	23,92
VT 37 $\sim 10^0$	3,79E+00	36,81	3,48E+01	32,91

(Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus einem Dreifachansatz; bei  $10^{-5}$  nur aus zwei)

### 3.1.1.2 GenomiPhi®

Abgesehen von der höchsten eingesetzten Ausgangskonzentration ( $\sim 4.500$  Kopien/ $\mu$ l), bei der eine Steigerung von drei  $\log_{10}$ -Stufen zu sehen war, konnte auch das zweite MDA-Kit den Referenzstamm Nine Mile nicht entsprechend amplifizieren.



Wie schon bei REPLI-g® erfolgte auch bei GenomiPhi® eine Anpassung der Amplifikations- und Lagertemperatur. Diese hatte auf die Quantifizierung jedoch auch bei diesem Kit, angewendet beim Referenzstamm, keinen Einfluss.

Die erzielten Ergebnisse des Nine Mile nach Amplifikation mit GenomiPhi® waren nicht konstant und schwankten sehr stark. In einem Versuch mit Dreifachansatz steigerte sich die Kopienzahl von einer Ausgangsmenge von 100 Kopien um vier  $\log_{10}$ -Stufen und im nächsten Versuch ließ sich kein Effekt feststellen. Das Ergebnis war somit schwer einzuschätzen und die Kombination von GenomiPhi® und Nine Mile galt deshalb für Ausgangskonzentrationen  $< 10^3$  Kopien als nicht reproduzierbar.

**Tabelle 26:** Nine Mile nach GenomiPhi®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach GenomiPhi® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach GenomiPhi®
Nine Mile $\sim 10^4$	9,53E+03	23,99	6,35E+06	14,80
Nine Mile $\sim 10^3$	4,39E+03	25,50	2,62E+06	16,71
Nine Mile $\sim 10^2$	4,35E+02	28,59	9,64E+02	28,03
Nine Mile $\sim 10^1$	2,22E+01	32,62	4,43E+01	34,28
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ

Die Amplifikation wurde mit einer höheren eingesetzten Ausgangskonzentration wiederholt. Es wurde ein Nine Mile mit  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l eingesetzt. Die Amplifikation gelang in allen drei Ansätzen.

**Tabelle 27:** Nine Mile hohe Ausgangskonzentration nach GenomiPhi®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach GenomiPhi® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach GenomiPhi®
Nine Mile $\sim 10^6$	6,74E+05	16,84	7,76E+06	13,00
Nine Mile $\sim 10^5$	3,84E+04	20,53	5,35E+06	13,57
Nine Mile $\sim 10^4$	4,60E+03	23,97	6,94E+06	13,30
Nine Mile $\sim 10^3$	2,01E+02	27,28	3,68E+07	13,16

Wie schon bei REPLI-g® beobachtet, zeigte das Kit bei der klinischen Probe wesentlich mehr positive und auch reproduzierbare Effekte. Die endgültig kalkulierten Konzentrationen übertrafen die, die bei der Anwendung von REPLI-g® erreicht wurden. Die Diskrepanz bei den beiden letzten Verdünnungen rührt daher, dass bei

zehn Kopien einer der drei Versuche kein Ergebnis lieferte und bei einer Kopie nur zwei Werte herangezogen werden konnten, die beide allerdings sehr gut waren.

**Tabelle 28:** Klinische Probe nach GenomiPhi®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach GenomiPhi® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach GenomiPhi®
VT 37 $\sim 10^4$	1,05E+04	24,30	9,44E+07	11,86
VT 37 $\sim 10^3$	1,46E+03	26,95	6,21E+07	12,69
VT 37 $\sim 10^2$	1,09E+02	30,47	1,28E+07	14,42
VT 37 $\sim 10^1$	9,82E+00	33,73	1,26E+04	29,08
VT 37 $\sim 10^0$	negativ	negativ	1,26E+04	27,03

### 3.1.1.3 GenomePlex®

Diese Methode lieferte sowohl beim Nine Mile, als auch bei der klinischen Probe von Anfang an in der Quantifizierung mit *com1*-real-time-PCR gute Ergebnisse. Es erreichte bei beiden Verdünnungsreihen im Schnitt eine Steigerung um zwei  $\log_{10}$ -Stufen.

**Tabelle 29:** Nine Mile und klinische Probe nach GenomePlex®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach GenomePlex® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach GenomePlex®
Nine Mile $\sim 10^3$	4,39E+03	25,50	1,75E+05	19,39
Nine Mile $\sim 10^2$	4,35E+02	28,59	5,66E+04	22,29
Nine Mile $\sim 10^1$	2,22E+01	32,62	3,00E+02	29,22
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	3,02E+01	32,74
VT 37 $\sim 10^4$	1,05E+04	24,30	1,90E+06	15,57
VT 37 $\sim 10^3$	1,46E+03	26,95	1,80E+05	19,24
VT 37 $\sim 10^2$	1,09E+02	30,47	2,59E+03	27,61
VT 37 $\sim 10^1$	9,82E+00	33,73	1,56E+02	31,47
VT 37 $\sim 10^0$	negativ	negativ	8,41E+00	34,73*

\*Dieser Wert besteht nur aus einem Ansatz, da die anderen beiden negativ waren

Zu diesem Kit gehörte auch noch ein Reamplifikationskit, mit dem man, laut Hersteller, die Konzentration der entstandenen Amplifikate gegebenenfalls weiter erhöhen und bei Bedarf die entstandene Sammlung amplifizierbarer Stücke immer wieder auffrischen kann.

Durch die Anwendung des Reamplifikationskits konnten die erreichten Kopienzahlen im Schnitt um weitere zwei  $\log_{10}$ -Stufen gesteigert werden, bei manchen

Ausgangskonzentrationen sogar um drei. Somit ergab sich insgesamt eine Amplifikationsrate der nativen Proben des Nine Mile von vier  $\log_{10}$ -Stufen und der klinischen Probe von 3,4  $\log_{10}$ -Stufen.

**Tabelle 30:** Nine Mile und klinische Probe nach GenomePlex® und Reamplifikation

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nach GPlax® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach GPlax®	Konzentration nach GPlax®+Reamp (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach GPlax®+Reamp
Nine Mile $\sim 10^3$	1,75E+05	19,39	2,08E+07	13,04
Nine Mile $\sim 10^2$	5,66E+04	22,29	8,47E+06	14,34
Nine Mile $\sim 10^1$	3,00E+02	29,22	4,85E+05	18,37
Nine Mile $\sim 10^0$	3,02E+01	32,74	5,34E+04	23,56
VT 37 $\sim 10^4$	1,90E+06	15,57	5,86E+06	14,87
VT 37 $\sim 10^3$	1,80E+05	19,24	5,47E+06	14,97
VT 37 $\sim 10^2$	2,59E+03	27,61	1,45E+06	17,96
VT 37 $\sim 10^1$	1,56E+02	31,47	2,56E+05	20,84
VT 37 $\sim 10^0$	8,41E+00	34,73*	2,51E+04	22,74

### 3.1.1.4 REPLI-g® FFPE-Kit

Dieses Kit wurde mit dem durch die präanalytische Behandlung stark fragmentierten Referenzstamm in vier verschiedenen Varianten getestet (s. Tabelle 4). Es wird laut Hersteller nur eine Mindestlänge von 500 bp pro Fragment vorausgesetzt.

Eine adäquate Amplifikation des Referenzstammes war, genau wie beim REPLI-g® Mini Kit, in allen durchgeführten Versuchen nicht möglich.

**Tabelle 31:** Nine Mile nach REPLI-g® FFPE Kit

a) Versuch 1: ohne Lyse-Schritt

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® FFPE (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g® FFPE
Nine Mile $\sim 10^3$	2,45E+03	25,50	5,27E+03	24,42
Nine Mile $\sim 10^2$	3,42E+02	28,59	7,58E+01	31,31
Nine Mile $\sim 10^1$	4,82E+01	32,62	4,26E-01	34,41
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ

## b) Versuch 2: Zugabe der Probe vor 1. Inkubationsschritt

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® FFPE (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g® FFPE
Nine Mile $\sim 10^3$	2,45E+03	25,50	3,81E+01	31,79
Nine Mile $\sim 10^2$	3,42E+02	28,59	negativ	negativ
Nine Mile $\sim 10^1$	4,82E+01	32,62	6,66E+00	34,55
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ

## c) Versuch 3: Zugabe der Probe nach 1. Inkubationsschritt gleichzeitig mit Proteinase K

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® FFPE (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g® FFPE
Nine Mile $\sim 10^3$	2,45E+03	25,50	1,89E+02	29,25
Nine Mile $\sim 10^2$	3,42E+02	28,59	2,71E+01	32,33
Nine Mile $\sim 10^1$	4,82E+01	32,62	negativ	negativ
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	1,14E-01	41,00

## d) Versuch 4: Zugabe der Probe nach Beendigung des Lyse-Schritts

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration nativ (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Konzentration nach REPLI-g® FFPE (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nach REPLI-g® FFPE
Nine Mile $\sim 10^3$	2,45E+03	25,50	4,57E+03	24,5
Nine Mile $\sim 10^2$	3,42E+02	28,59	negativ	negativ
Nine Mile $\sim 10^1$	4,82E+01	32,62	negativ	negativ
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ

Im Anschluss wurde mittels Nano Drop® der Gesamt-DNA-Gehalt der Probe bestimmt, um einen Ausfall des Systems auszuschließen. In allen Fällen unabhängig von der eingesetzten Ausgangsverdünnung erreichten die Proben zwischen 2 – 4  $\mu$ g/ $\mu$ l DNA.

### 3.1.1.5 Kompatibilität und doppelte Anwendung

Zur Überprüfung der Kompatibilität der Systeme untereinander und der Wirksamkeit des Folgekits ohne vorangegangene Amplifikation wurde das Reamplifikationskit von Sigma alleine und dann in Kombination mit REPLI-g® und GenomiPhi® angewendet. Alle drei Methoden waren so angewendet nicht in der Lage die Konzentration (hier durch die Ct-Werte dargestellt) der Probe zu erhöhen. Es kam sogar zu gegenteiligen

Effekt: die niedrigen Ausgangskonzentrationen der Proben wurden durch die Anwendung der Kits so modifiziert und verschlechtert, dass sie in der Quantifizierung nicht mehr aufzufinden waren.

**Tabelle 32:** Nine Mile nach GenomiPhi®/ REPLI-g® mit Reamplifikation

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert nativ	Reamplifikation	GenomiPhi® mit Reamplifikation	REPLI-g® mit Reamplifikation
Nine Mile $\sim 10^3$	25,50	28,01	28,2	24,61
Nine Mile $\sim 10^2$	28,59	29,97	negativ	25,07
Nine Mile $\sim 10^1$	32,62	negativ	negativ	negativ
Nine Mile $\sim 10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ

In der Literatur (128) wurde zur Steigerung der DNA-Menge eine mögliche doppelte Anwendung von REPLI-g® erwähnt. Dieser Ansatz wurde, obwohl nach telefonischer Rücksprache ausdrücklich nicht vom Hersteller empfohlen, anhand der mit dem jeweiligen Kit amplifizierten Verdünnungsreihe der klinischen Probe untersucht. Der Referenzstamm wurde bei dieser Untersuchung nicht bedacht, da er bereits bei der einfachen Anwendung der MDA-Kits Probleme bereitet hatte.

Die Anwendung bei der klinischen Probe war nicht erfolgreich. Bei GenomiPhi® konnte keine der Verdünnungen in der quantitativen Untersuchung eine Steigerung der Konzentration gegenüber der einmaligen Anwendung verzeichnen. Bei REPLI-g® konnte maximal eine Steigerung um eine Zehnerpotenz erreicht werden. Bei  $10^8$  Kopien/ $\mu$ l schien insgesamt eine Maximalkonzentration erreicht zu sein.

**Tabelle 33:** Klinische Probe nach doppelter Anwendung von GenomiPhi®

Probe (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Konzentration 1xGenomiPhi® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert 1xGPhi®	Konzentration 2xGenomiPhi® (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	Ct-Wert 2xGenomiPhi®
VT 37 $\sim 10^4$	9,44E+07	11,86	2,04E+08	9,03
VT 37 $\sim 10^3$	6,21E+07	12,69	6,75E+07	10,64
VT 37 $\sim 10^2$	1,28E+07	14,42	5,56E+07	11,29
VT 37 $\sim 10^1$	1,26E+04	29,08	4,19E+04	24,80*
VT 37 $\sim 10^0$	1,26E+04	27,03	7,91E+03	24,42*

**Tabelle 34:** Klinische Probe nach doppelter Anwendung von REPLI-g®

Probe (~Kopienzahl/µl)	Konzentration 1xREPLI-g® (~Kopienzahl/µl)	Ct-Wert 1xREPLI-g®	Konzentration nach 2xREPLI-g® (~Kopienzahl/µl)	Ct-Wert nach 2xREPLI-g®
VT 37 ~10 <sup>4</sup>	8,62E+06	14,12	5,64E+07	13,49
VT 37 ~10 <sup>3</sup>	2,75E+07	12,50	1,37E+08	12,38
VT 37 ~10 <sup>2</sup>	1,49E+07	15,20	1,05E+08	13,67
VT 37 ~10 <sup>1</sup>	2,79E+05	23,92	7,93E+05	24,72*
VT 37 ~10 <sup>0</sup>	3,48E+01	32,91	6,04E+01	34,74*

\*Die Werte sind Mittelwerte und besonders bei den zwei niedrigsten Konzentrationen haben die Ergebnisse stark geschwankt, deshalb ist die Zahl nicht sehr aussagekräftig

Um eine Hemmung der Reaktion durch eventuell vorhandene Rückstände der ersten Amplifikationsreaktion, wie zum Beispiel Salze, als Ursache auszuschließen, wurden die Amplifikate in einem zweiten Versuch vor der doppelten Anwendung mithilfe des QiaQuick® PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

Die genannte Ausgangskonzentration wurde zuerst 1:10 verdünnt und die aufgereinigte Probe in 30 µl EB-Puffer eluiert, wodurch insgesamt eine Verdünnung von 1:30 vorgenommen wurde.

Bei GenomiPhi® war ohne Aufreinigung gar kein Effekt durch die doppelte Anwendung zu sehen. Mit dem zusätzlichen Aufreinigungsschritt ließ sich im Schnitt eine Steigerung um eine Zehnerpotenz, bei einer Ausgangskonzentration von ca. 1250 Kopien sogar um drei log<sub>10</sub>-Stufen feststellen.

**Tabelle 35:** Klinische Probe nach doppelter Anwendung von GenomiPhi® mit Aufreinigung zwischen beiden Anwendungen (Konz. GenomiPhi® Verdünnung 1:30 angegeben; unverdünnt in Klammern; Ct-Wert bezieht sich auf unverdünnte Probe)

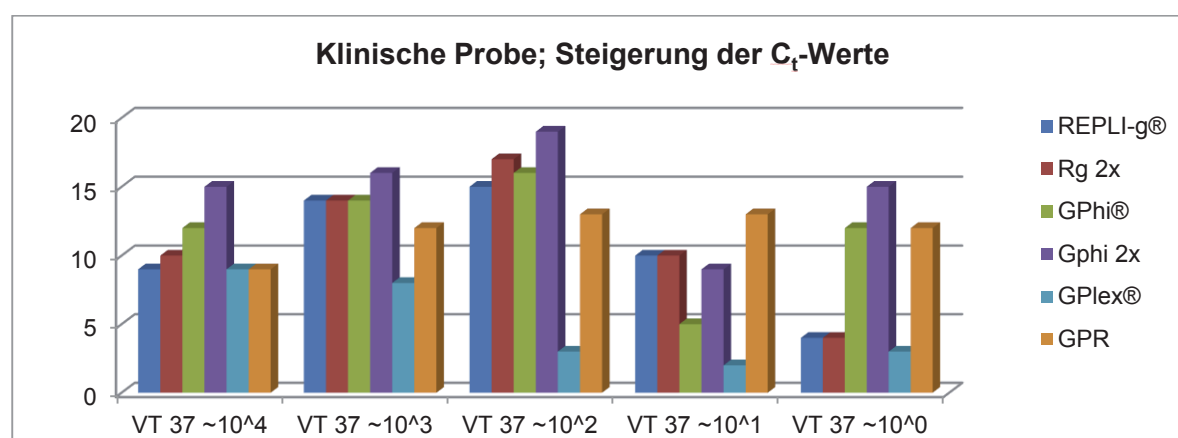
Probe (~Kopienzahl/ µl)	Konzentration 1xGenomiPhi® 1:30 (~Kopienzahl/µl)	Ct-Wert 1xGenomi Phi® (unv.)	Konzentration nach 2xGenomiPhi® (~Kopienzahl/µl)	Ct-Wert nach 2xGenomiPhi®
VT 37 ~10 <sup>4</sup>	3,71E+06 (1,11E+08)	10,72	6,58E+07	10,51
VT 37 ~10 <sup>3</sup>	4,22E+06 (1,26E+08)	10,54	4,34E+07	13,09
VT 37 ~10 <sup>2</sup>	9,44E+05 (2,82E+07)	12,66	2,85E+07	11,19
VT 37 ~10 <sup>1</sup>	1,32E+03 (3,76E+04)	22,03	8,28E+06	20,83
VT 37 ~10 <sup>0</sup>	1,61E-01 (4,79E+01)	31,46	4,98E+01	31,59

Bei REPLI-g® war kein Unterschied zwischen der Reaktion mit und ohne Aufreinigungszwischenschritt feststellbar. Bei beiden Ansätzen war im Schnitt eine Zunahme von einer Zehnerpotenz zu beobachten.

**Tabelle 36:** Klinische Probe nach doppelter Anwendung von REPLI-g® mit Aufreinigung zwischen beiden Anwendungen (Konz. REPLI-g® Verdünnung 1:30 angegeben; unverdünnt in Klammern; Ct-Wert bezieht sich auf unverdünnte Probe)

Probe (~Kopienzahl /µl)	Konzentration 1xREPLI-g® 1:30 (~Kopienzahl/µl)	Ct-Wert 1xREPLI-g® (unv.)	Konzentration nach 2xREPLI-g® (~Kopienzahl/µl)	Ct-Wert nach 2xREPLI-g®
VT 37 ~10 <sup>4</sup>	1,53E+05 (4,59E+06)	14,93	3,21E+06	13,82
VT 37 ~10 <sup>3</sup>	3,05E+05 (9,14E+06)	13,88	2,71E+06	14,11
VT 37 ~10 <sup>2</sup>	3,53E+05 (1,06E+07)	13,66	2,18E+06	16,16
VT 37 ~10 <sup>1</sup>	2,53E+04 (7,58E+05)	17,67	1,83E+05	17,94
VT 37 ~10 <sup>0</sup>	8,23E-01 (2,47E+01)	33,37	negativ	negativ

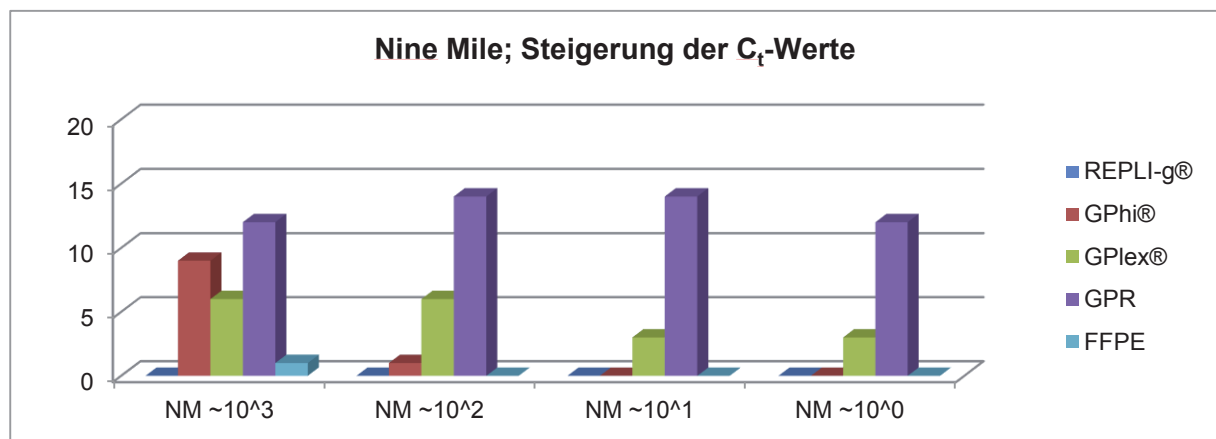
Um einen Überblick über Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen zu erlangen, wurden die jeweiligen  $\Delta C_t$ -Werte ermittelt. Dieser Wert beschreibt die Differenz zwischen dem  $C_t$ -Wert vor und nach der Amplifikation. War der  $C_t$ -Wert nach Amplifikation größer als vorher, so ist der  $\Delta C_t$ -Wert als gleich null definiert worden. Die Steigerung wurde auch bei den doppelten Anwendungen in Bezug auf den nativen Ursprungs- $C_t$ -Wert betrachtet. Eine Veränderung des  $C_t$ -Werts um 3,5 ist mit einer Zehnerpotenz bei der Konzentration gleichzusetzen.



\*bei VT37 10<sup>-5</sup> mit GPhi® war in zwei von drei Fällen die com1-PCR negativ; in einem Steigerung um vier log<sub>10</sub>-Stufen

**Abbildung 5:** Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse für die klinische Probe

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, ist das quantitativ beste WGA-System für die klinische Probe GenomiPhi® doppelt angewendet, wobei für die niedrigen Konzentrationen GenomePlex® mit Reamplifikation teilweise bessere Ergebnisse lieferte. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, scheiden beim Nine Mile REPLI-g® und das FFPE-Kit aus, da beide keine Steigerung der DNA-Menge erreichen konnten. Hier ist GenomePlex® mit Reamplifikation das quantitativ beste System im Hinblick auf die Steigerung der C<sub>t</sub>-Werte.



**Abbildung 6:** Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse für Nine Mile

### 3.1.2 Qualitative Untersuchungen

Für eine adäquate Typisierung ist neben einer suffizienten DNA-Menge auch deren Qualität entscheidend. Daher wurden die Amplifikate im Anschluss an die rein quantitative Untersuchung mit den im Haus etablierten Genotypisierungsmethoden für *Coxiella burnetii* bearbeitet, um herauszufinden, ob die verwendeten WGA-Methoden für die Diagnostik oder sogar für eine ins Detail gehende Genotypisierung und Sequenzierung geeignet sind.

Eine unamplifizierte Verdünnungsreihe der klinischen Probe und des Referenzstammes Nine Mile wurde bei den Untersuchungen als Referenz mitgeführt.

#### 3.1.2.1 Die “housekeeping“-Gene

Die Bestimmung des Plasmidtyps ergab bei der unamplifizierten Verdünnungsreihe den in Deutschland vorherrschenden Typ QpH1. Nach Amplifikation wurde der Typ



QpH1 auch in fast allen amplifizierten Proben der vier Kits ermittelt. Gleiches galt für den *adaA*-Locus. Bei der *IS1111*-real-time-PCR, die auch zur Quantifizierung genutzt werden kann, sah man erwartungsgemäß den größten Anstieg bei den  $C_t$ -Werten. In Tabelle 37 und 38 sind die gemittelten  $C_t$ -Werte der Proben nach Amplifikation mit den jeweiligen Verfahren dargestellt.

**Tabelle 37:** Gemittelte  $C_t$ -Werte der "housekeeping"-Gene nach Amplifikation der Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$ ) der klinischen Probe

VT37 (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	REPLI-g®	GenomiPhi®	GenomePlex®	GenomePlex® + Reamplifikation	
QpH1	$\sim 10^4$	18,40	22,42	22,38	21,97
	$\sim 10^3$	18,16	17,49	26,04	22,04
	$\sim 10^2$	22,43	18,79	30,75	24,90
	$\sim 10^1$	28,94	24,95	negativ	27,95
	$\sim 10^0$	29,35	30,96	negativ	25,09
<i>adaA</i>	$\sim 10^4$	19,47	16,30	16,35	18,99
	$\sim 10^3$	18,03	17,90	19,82	19,49
	$\sim 10^2$	19,91	20,72	28,76	22,88
	$\sim 10^1$	28,39	25,57	30,31	24,09
	$\sim 10^0$	31,91	25,47	32,00	26,03
<i>IS1111</i>	$\sim 10^4$	7,71	5,56	10,43	9,41
	$\sim 10^3$	5,90	6,81	14,76	9,49
	$\sim 10^2$	18,41	6,59	21,08	13,94
	$\sim 10^1$	15,24	8,40	22,31	15,71
	$\sim 10^0$	14,81	16,09	24,39	18,99

**Tabelle 38:** Gemittelte  $C_t$ -Werte der "housekeeping"-Gene nach Amplifikation der Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$ ) des Nine Mile

Nine Mile (~Kopienzahl/ $\mu$ l)	GenomePlex®	GenomePlex® + Reamplifikation	
QpH1	$\sim 10^3$	17,63	17,16
	$\sim 10^2$	27,68	18,54
	$\sim 10^1$	negativ	21,62
	$\sim 10^0$	negativ	25,08
<i>adaA</i>	$\sim 10^3$	19,84	13,94
	$\sim 10^2$	23,98	14,72
	$\sim 10^1$	29,29	19,22
	$\sim 10^0$	31,63	26,22
<i>IS1111</i>	$\sim 10^3$	17,01	11,16
	$\sim 10^2$	20,11	11,74
	$\sim 10^1$	23,40	17,87
	$\sim 10^0$	negativ	23,41

Einzig bei der QpH1-PCR traten Unstimmigkeiten auf. So war einer der drei Versuche nach Anwendung der beiden Sigma-Kits bei allen anderen PCRs zwar stark positiv (u.a.  $10^4$  Kopien/ $\mu$ l bei *com1*), aber bei der Untersuchung des Plasmids negativ. Das Ergebnis wurde in einer Wiederholung verifiziert. Die anschließende Untersuchung des gleichen Genortes mit anderen Primern, die einen größeren Bereich (Position 15.332 – 16.348 statt vorher Position 15.365 – 15.567) des Plasmids abdecken, brachte wieder ein negatives Ergebnis. Dieses Resultat deutet auf eine fehlerhafte Amplifikation des Genortes hin.

#### 3.1.2.1.1 Sequenzierung der “housekeeping“-Gene

Um auszuschließen, dass nicht nur die Zielregion des Primers zufällig richtig amplifiziert wurde oder dass er sich trotz entstandener Fehler anlagern konnte, wurden im Anschluss, soweit möglich, von jeder Ausgangskonzentration von jedem Kit je eine Probe nach Ablauf der PCR zur Sequenzierung eingeschickt und das Ergebnis mit der publizierten *in-silico*-Sequenz des Nine-Mile-Stammes verglichen.

Die Sequenzen von *adaA*, *com1* und QpH1 stimmten in allen untersuchten Proben mit den *in-silico*-Sequenzen der jeweiligen Gene überein. Vereinzelt kam es zu Punktmutationen innerhalb eines Gens. Dies geschah am häufigsten beim *IS1111*-Element. Es handelte sich in fast allen Fällen um zwei übereinanderliegende Peaks, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Die Peaks entstehen als Fluoreszenzsignal einer angelagerten Base. Somit steht ein Doppelpeak für zwei Basen, die gleichermaßen an derselben Stelle gebunden haben und je einen Peak erzeugen können.

Die meisten Fehler traten in den Randregionen der Sequenzen auf. Das Kit, nach dessen Anwendung die meisten Mutationen im Zielgen auftraten, war GenomePlex® von Sigma-Aldrich. Dies konnte besonders mit aber auch ohne anschließende Verwendung des Reamplifikationskits beobachtet werden.

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	10	20	30	40	50
<b>IS1111</b>	CTTATTCCCA	CTCGAATGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37GP-1</b>	-----	-----TGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37GP-2</b>	-----	-----TGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AAMSCAGACA
<b>VT37GP-3</b>	-----	-----TGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AAC <b>TGSS</b> SACA
<b>VT37GPhi-1</b>	-----	-----TGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37GPR-1</b>	-----	-----TGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37Rg-1</b>	-----	-----ATGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37GP-1</b>	CTTATTCCCA	CTCGAATGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37GPhi-1</b>	CTTATTCCCA	CTCGAATGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37GPR-1</b>	CTTATTCCCA	CTCGAATGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
<b>VT37Rg-1</b>	CTTATTCCCA	CTCGAATGTT	GTCGAGGGAC	CAACCCAATA	AACGCCGACA
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	60	70	80	90	100
<b>IS1111</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GP-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GP-2</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GP-3</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GPhi-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GPR-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37Rg-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GP-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GPhi-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37GPR-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC
<b>VT37Rg-1</b>	ACTGCCGGGA	ACGATGAAAT	TGATGAATGT	CACCCACGCT	CGCATAAACC

**Abbildung 7:** Beispielhafter Teil des Alignments der Sequenzen der *IS1111*-real-time-PCR nach WGA (M= A/C ; S= G/C )

### 3.1.2.2 Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)

In der MLVA waren die mit REPLI-g® amplifizierten Proben bis zu einer Ausgangskonzentration von 10<sup>2</sup> Kopien/µl fehlerfrei. Erst darunter produzierte die MLVA an verschiedenen Loci Doppelpeaks oder gar kein Signal. Doppelpeaks entstehen, wenn Produkte verschiedener Länge vorhanden sind.

Die mit GenomiPhi® amplifizierten Proben zeigten in den höheren Konzentrationen wenig Fehler. Nur der Marker Cox 7 machte schon bei einem der drei Ansätze der höchsten Ausgangskonzentration Probleme und erzeugte sowohl hier, als auch bei einem Ansatz der zweithöchsten Ausgangskonzentration für den einen untersuchten Marker mehrere Produkte unterschiedlicher Länge. Die hochkonzentrierten Proben des Nine Mile erzielten mit GenomiPhi® gute Ergebnisse. Nur der Marker ms33 zeigte bis auf eine Ausnahme immer einen Doppelpeak.

GenomePlex® wurde für den Referenzstamm Nine Mile und die klinische Probe sowohl allein, als auch in Kombination mit dem Reamplifikationskit untersucht. Hierbei fiel auf, dass das Kit im Allgemeinen für den Marker ms01 kontinuierlich und unabhängig von der Ausgangskonzentration Schwächen zeigte (94 % fehlend) und dieser in der MLVA kein Signal erzeugte, also die PCR kein Produkt ergab. Auch die Marker ms20 und ms36 fielen auffallend oft aus (ms20: 78 % fehlend; ms36: 70 % fehlend).

Einzelheiten zu den Berechnungen und dem Ursprung der Werte sind im Kapitel 2.2.6 Statistik zu finden.

**Tabelle 39:** MLVA-Ergebnisse Überblick; (n=Anzahl der untersuchten Proben; falsch=Peak vorhanden, aber falsche Länge; Doppelpeak=zwei Peaks unterschiedlicher Länge für den gleichen Marker vorhanden; fehlend=kein Peak vorhanden; n x 15 = Gesamtzahl erwarteter Peaks des Durchgangs)

	VT 37 REPLI- g® n=14	VT 37 GPhi® n=14	VT 37 GPlex® n=13	VT 37 GPR n=13	NM GPlex® n=11	NM GPR n=12	NM* GPhi® n=12
Richtig	186	158	139	117	70	108	167
Falsch	4	4	3	0	7	11	0
Doppelpeak	13	24	6	49	36	25	12
Fehlend	7	24	47	29	52	36	1
Gesamtzahl erwartete Peaks (n x 15)	210	210	195	195	165	180	180

(NM\* = Konzentrationen von  $10^6$  bis einschließlich  $10^3$  eingesetzt)

Wie bei Versuchen mit den unamplifizierten Ausgangsverdünnungen zu sehen war, kann man diese Phänomene auch auf die zu geringe Ausgangsmenge an DNA zurückführen. Es stellten sich bei den unamplifizierten Vorversuchen konzentrationsbedingte Ausfälle bei etwa  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l ein. Um sicher zu gehen, dass die hier gefundenen Fehler nicht auch konzentrationsbedingt entstanden sind, wurde ein Grenzwert von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l als Berechnungsgrundlage für die korrigierten Fehlerangaben verwendet. Somit wurden alle Fehler, die bei den niedrigeren Ausgangskonzentrationen entstanden sind, in der Berechnung zum Beispiel in Tabelle 40 nicht berücksichtigt. Entsprechend wurde auch die Gesamtanzahl der Proben angepasst.

Bei NM\* (s. Tabelle 39; eingesetzte Konzentrationen von  $10^6$  bis einschließlich  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l) war aufgrund der hohen eingesetzten Ausgangskonzentrationen keine Anpassung notwendig.

**Tabelle 40:** Korrigierte Fehlerangaben (= Fehler aus Tabelle 39 – Fehler bei Ausgangskonzentrationen unter  $10^3$  Kopien); n=Anzahl der Proben  $\geq 10^3$  Kopien

	VT 37 REPLI-g® n= 6	VT 37 GPhi® n= 6	VT 37 GPlex® n= 6	VT 37 GPR n= 6	NM GPlex n= 6	NM GPR n= 6
Falsch	0	0	0	0	0	2
Doppelpeak	0	2	0	22	18	6
Fehlend	0	0	9	12	6	8
Gesamtzahl erwartete Peaks (n x 15)	90	90	90	90	90	90

Aus diesen angepassten Werten lässt sich die Fehlerrate errechnen. Hierzu werden alle Fehler addiert und durch die Gesamtzahl geteilt.

**Tabelle 41:** Korrigierte Fehlerrate (Fehlerrate=Fehler(s. Tabelle 40 bzw. 38 bei NM\*)/Gesamt)

	VT 37 REPLI- g® n=6	VT 37 GPhi® n=6	VT 37 GPlex® n=6	VT 37 GPR n=6	NM GPlex® n=6	NM GPR n=6	NM* GPhi® n=12
Fehlerrate	0	0,02	0,1	0,38	0,27	0,18	0,07

Auch die doppelt amplifizierte Proben wurden mittels MLVA untersucht. Hier zeigte sich bei GenomiPhi® im Vergleich zu vorher einzelnen Markern eine deutliche Verschlechterung. Insbesondere der Marker ms33 wurde bei keiner Konzentration in drei Wiederholungen je richtig amplifiziert. Von 30 Ansätzen waren bei diesem Marker sechs mit falschen Längenangaben, fünf negative und vierzehn Proben mit zwei Signalen für unterschiedliche Längen. Schon ab der zweithöchsten Ausgangskonzentration traten bei drei von siebzehn Markern Lücken oder Fehler in der Länge auf (s. Tabelle 42).

Nach der doppelten Anwendung von REPLI-g® traten auch hier die Fehler wesentlich früher auf. Obwohl dieses Kit vorher bis zu einer Ausgangskonzentration von nur hundert Kopien fehlerfrei geblieben war, zeigte es nach doppelter Anwendung

Ausfälle bereits in der niedrigsten Verdünnungsstufe und Doppelpeaks bereits in der nächst höheren. Diese Probleme waren ungleichmäßig über alle siebzehn Marker verteilt und es ließ sich kein Muster erkennen.

**Tabelle 42:** MLVA-Ergebnisse nach doppelter Anwendung, Überblick; (n=Anzahl der untersuchten Proben; falsch=Peak vorhanden, aber falsche Länge; Doppelpeak=zwei Peaks unterschiedlicher Länge für den gleichen Marker vorhanden; fehlend=kein Peak vorhanden;  $n \times 15$  = Gesamtzahl erwarteter Peaks des Durchgangs)

	VT 37 GPhi® doppelt n=30	VT 37 REPLI-g® doppelt n=28
richtig	354	289
falsch	12	22
Doppelpeak	40	74
fehlend	44	35
Gesamtzahl erwartete Peaks	450	420

Nach Abzug der potentiell konzentrationsbedingt entstandenen Fehler ergab sich folgendes Bild:

**Tabelle 43:** Korrigierte Fehlerangaben (= Fehler aus Tabelle 42– Fehler bei Ausgangskonzentrationen unter  $10^3$  Kopien; n= Anzahl der Proben  $\geq 10^3$  Kopien; Fehlerrate=Fehler (s. Tabelle 42) /Gesamtzahl erwarteter Peaks des Durchgangs)

	VT 37 GPhi® doppelt n=12	VT 37 REPLI-g® doppelt n=12
Falsch	1	0
Doppelpeak	11	16
Fehlend	2	9
Gesamtzahl erwartete Peaks	180	180
Fehlerrate	0,08	0,14

Die doppelte Amplifikation wurde mit einem zusätzlichen Aufreinigungsschritt zwischen den Anwendungen wiederholt. Die MLVA-Ergebnisse verzeichneten eine Besserung. Auffällig war, dass bei REPLI-g® der Marker ms33 nie korrekt amplifiziert wurde. In elf Fällen zeigte sich ein Doppelpeak und einmal war die Länge nicht korrekt. Bei GenomiPhi® ließen sich die Fehler keinem besonderen Marker zuordnen.

**Tabelle 44:** MLVA-Ergebnisse nach doppelter Anwendung mit Aufreinigung als Zwischenschritt; Überblick; (n=Anzahl der untersuchten Proben; falsch=Peak vorhanden, aber falsche Länge; Doppelpeak=zwei Peaks unterschiedlicher Länge für den gleichen Marker vorhanden; fehlend=kein Peak vorhanden;  $n \times 15$  = Gesamtzahl erwarteter Peaks des Durchgangs)

	VT 37 GPhi® doppelt mit Aufreinigung n=14	VT 37 REPLI-g® doppelt mit Aufreinigung n=12
Richtig	169	154
Falsch	8	1
Doppelpeak	9	15
Fehlend	24	10
Gesamtzahl erwartete Peaks	210	180

Auch hier wurden die potentiell konzentrationsbedingten Fehler bei einer Ausgangskonzentration von unter  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l abgezogen und nicht in die Berechnung mit einbezogen.

**Tabelle 45:** Korrigierte Fehlerangaben (= Fehler aus Tabelle 44 – Fehler bei Ausgangskonzentrationen unter  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l; n= Anzahl der Proben  $\geq 10^3$  Kopien; Fehlerrate = Fehler (s. Tabelle 44) / Gesamtzahl erwarteter Peaks des Durchgangs)

	VT 37 GPhi® doppelt mit Aufreinigung n=6	VT 37 REPLI-g® doppelt mit Aufreinigung n=6
Falsch	0	1
Doppelpeak	1	8
Fehlend	1	1
Gesamtzahl erwartete Peaks	90	90
Fehlerrate	0,02	0,11

Im Vergleich zur doppelten Anwendung ohne Aufreinigungsschritt haben sich die Fehlerraten reduziert.

### 3.1.2.3 IS1111-Analyse

Im Anschluss folgte die Untersuchung auf die Verteilung der IS1111-Elemente. Die Untersuchung beschränkte sich in diesem Abschnitt auf die Multiplexe 1 – 4 und damit auf 22 IS1111-Elemente.

Sowohl bei REPLI-g®, als auch bei GenomiPhi® traten in den hohen Konzentrationen bei der Multiplex 3 eine bzw. zwei Zusatzbanden auf. Diese wurden im Anschluss noch mittels einer singleplex-PCR bestätigt. Die Zusatzbanden lagen auf Höhe der

IS1111-Elemente 55 bzw. 56. Die einzelne Untersuchung ergab bei der klinischen Probe nach Behandlung mit GenomiPhi® in den Ausgangskonzentrationen  $10^4$  und  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l je zwei Banden, in der Ausgangskonzentration von  $10^2$  Kopien/ $\mu$ l sogar drei Banden. Bei REPLI-g® ergab sich in der singleplex-PCR nur ein Produkt, welches zusammen mit den anderen Banden anschließend zur Überprüfung sequenziert wurde (s. 3.1.2.3.1 Sequenzierung der Zusatzbanden).

Mit abnehmender Konzentration fielen mehr Banden aus. Dieses Phänomen wurde bereits an der Ausgangsverdünnungsreihe beobachtet.

Der Nine-Mile-Stamm war in unamplifiziertem Zustand konzentrationsunabhängig für die meisten der (in den vier Multiplexen) untersuchten Elemente negativ. Nach der Amplifikation zeigte er insbesondere nach Anwendung von GenomePlex® (einschließlich anschließender Verwendung des Reamplifikationskits), aber auch in den sehr hohen Konzentrationen nach GenomiPhi® mehrere „neue“ Banden. Diese stimmten von der Größe her zum Teil mit den spezifischen Banden überein. Es gab aber auch unspezifische Banden, deren Größe außerhalb der erwarteten Werte lag.

Bei Ausgangskonzentrationen von  $10^4$  und  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l konnte eine Extrabande nach alleiniger Anwendung von GenomePlex® festgestellt werden, die zur Produktgröße von IS 49 passt. Die anderen bei hohen Ausgangskonzentrationen gefundenen neuen Banden ließen sich den Elementen IS 22, IS 44, IS 26 und IS 29 zuordnen, was durch entsprechende singleplex-PCRs der IS-Elemente bestätigt werden konnte.

Bei Ausgangskonzentrationen von  $10^6$  bis  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l des Nine Mile wurden nach der Anwendung von GenomiPhi® ebenfalls neue Banden festgestellt. Diese waren den Elementen IS 35, IS 48, IS 22, IS 49 und IS 53 zuzuordnen.

Die in der singleplex-PCR bei GenomePlex® und bei GenomiPhi® bestätigten Banden wurden zusätzlich zur Sequenzanalyse eingeschickt, um zu evaluieren, ob es sich um echte oder falsche Ergebnisse handelte (s. Kapitel 3.1.6.3.1).

Erzeugte ein Primer In der singleplex-PCR-Untersuchung mehr als eine Bande (z.B. NM GPR IS 26), so wurden diese aus dem Gel ausgestochen und einzeln sequenziert (s. Kapitel 3.1.6.3.1).



Die Sequenzierung der Falschpositiven sollte auch darüber Aufschluss geben, ob es sich um „echte“ Falschpositive handelt oder um synthetische Sequenzen. „Echte“ Falschpositive sind definiert als Falschpositive, deren Sequenz mit der zu erwartenden Sequenz des echten Elements übereinstimmt. „Falsche“ Falschpositive können eine völlig andere Sequenz aufweisen und nur zufällig die richtige Produktgröße im Gel erzeugen.

### 3.1.2.3.1 Sequenzierung der Zusatzbanden

Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) mit dem Gesamtgenom des Nine Mile und anschließend *in silico* mit einem *IS1111*-Element (ABX78429.1) und den flankierenden 200 bp vor und nach dem Element verglichen. Hierbei wurde besonders nach Hinweisen im Genom gesucht, die die Probleme der Polymerase mit genau dieser Stelle erklären könnten.

Die Sequenzen von den mit dem Sigma-Kit amplifizierten Proben waren durchweg stark fragmentiert. Das heißt, die Sequenzen konnten nicht als Ganzes einem Genort zugeordnet werden, sondern waren mit Bruchstücken von nur wenigen Basen Länge verschiedenen Stellen auf dem Genom außerhalb der erwarteten Genomregion zuzuordnen. Während manche der Fragmente als Teile eines *IS1111*-Elements identifiziert werden konnten, fanden sich andere „Treffer“ in Bereichen, die nichts mit dem erwarteten Genort zu tun hatten, wie z.B. ATPasen oder DNAsen.

So band NM GPR mit der Ausgangsverdünnung  $10^{-1}$  mit den Primern von IS 22 in der Region (CBU\_1986) vor dem Element IS 20, das Produkt von NM GPR  $10^{-1}$  mit den Primern von IS 29 war im Bereich des Elements IS 3 zu finden, das von NM GPR  $10^{-2}$  im Bereich von Element IS 20 und schließlich das Produkt des NM GPR  $10^{-1}$  mit den Primern zu Element IS 44 im Bereich von IS 7.

Um die genaue Verteilung der Sequenzbruchstücke zu zeigen, werden im folgenden Abschnitt zwei Sequenzen beispielhaft genauer beschrieben.

Beim Nine Mile nach GPR mit einer Ausgangskonzentration von  $10^2$  Kopien in Kombination mit den Primern zu Element IS 49 ergab sich ein ca. 440 bp langes Produkt. Bei einem Alignment gegen das Nine Mile-Genom konnten mehrere „Treffer“ gefunden werden, was, wie oben beschrieben, auf eine starke Fragmentierung hindeutete. Das längste Fragment lag im Bereich einer DNase (Cbu\_0502), während

die restlichen „Treffer“ im intergenen Bereich lagen. Das größte Fragment lag mit Position 67 bis 143 auf dem Nine Mile-Genom kurz vor einer gegenläufig identischen, sich wiederholenden Endsequenz. Die restlichen 300 bp der Sequenz waren rein synthetisch, was ein BLAST gegen alle im Netz bei NCBI verfügbaren Genome (nr-Datenbank) bestätigte. Hier gab es keinen einzigen „Treffer“ der Sequenz.

Dem Produkt, welches beim Einsatz der Primer für das Element IS 24 mit Nine Mile zustande kam, wurden in der höchsten Ausgangskonzentration nach Anwendung des Amplifikations- und Reamplifikationskits ebenfalls unerwartete „Treffer“ zugeordnet. Mit über 760 bp war das Produkt das längste der sequenzierten Stücke. Die ersten 450 bp dieser Sequenz lagen im Bereich einer Oligopeptidase A (CBU\_0039). Darauf folgte ein 26 bp langer intergener Bereich (473 – 499 bp) und eine Lipid-A-Disaccharid Synthase (CBU\_0620) von 502 bis 591 bp. Das nächste Fragment von 605 bis 762 bp lag im Bereich einer *IS1111*-Transposase (Start bei 714 bp). Die Fragmenteile waren auch hier relativ weiträumig auf dem Genom verteilt. Es waren in der Gegend zwischen diesen Fragmenten und davor keine sich gegenläufig wiederholende Endsequenz oder sonstige Anzeichen lokaler Sekundärstrukturen zu finden. Nach der Oligopeptidase folgte unmittelbar das *IS1111*-Element (IS) 2.

Die neuen Banden, die nach der Amplifikation des hoch konzentrierten Nine Mile mit GenomiPhi<sup>®</sup> entstanden, lagen im Bereich der Elemente IS 35, 22 und 49. Die erhaltenen Sequenzen konnten eindeutig den richtigen Regionen zugeordnet werden. Die mit GenomiPhi<sup>®</sup> amplifizierte klinische Probe war nach PCR mit den Primern von IS 56 der richtigen Region für das Element IS 56 zuzuordnen, sowie auch die Sequenz der Extrabande von REPLI-g<sup>®</sup> mit den Primern von IS 56.

Die Sequenzen, die von GenomiPhi<sup>®</sup> amplifiziert und mit IS 55-Primern untersucht wurden, lieferten einen Treffer in der Region ABX78204.1, die vor einer Transposase liegt. Auch hier handelte es sich um einen genauen Treffer der Region des gesuchten IS-Elements 55, obwohl dieses im unamplifizierten Zustand nicht in der klinischen Probe zu finden war.

### **3.1.2.3.2 Statistische Auswertung *IS1111*-Analyse**

Betrachtete man die Ergebnisse zusammengefasst in einer sogenannten Wahrheitsmatrix, ergab sich folgendes Bild: Falschnegative sind definiert als PCR

negativ, obwohl das Element unabhängig von der Konzentration beim Ausgangsmaterial vorkommt. Falschpositive sind die im Ausgangsmaterial nicht vorhandenen Elemente, die in der PCR nach Amplifikation ein Produkt erzeugten. Einzelheiten zur Berechnung sind im Kapitel 2.2.6 Statistik zu finden.

**Tabelle 46:** Ergebnisse *IS1111*-Analyse Überblick; klinische Probe und Nine Mile nach jeweiligem Kit; Element nativ vorhanden = im Ausgangsmaterial PCR positiv; Element nativ nicht vorhanden = im Ausgangsmaterial PCR negativ; Gegenüberstellung: echt positiv = positive PCR + Element nativ vorhanden; falsch positiv = positive PCR + Element nativ nicht vorhanden; echt negativ = negative PCR + Element nativ nicht vorhanden; falsch negativ = negative PCR + Element nativ vorhanden; n = 22 mögliche Banden pro Probe x 15 Proben (NM 12 Proben) = 330 (NM 264) mögliche Banden insgesamt)

<b>VT 37 REPLI-g® (n=330)</b>	<b>Element nativ vorhanden</b>	<b>Element nativ nicht vorhanden</b>
PCR nach WGA positiv	197	5
PCR nach WGA negativ	28	100

<b>VT 37 GenomiPhi® (n=330)</b>	<b>Element nativ vorhanden</b>	<b>Element nativ nicht vorhanden</b>
PCR nach WGA positiv	176	9
PCR nach WGA negativ	49	96

<b>VT37 GenomePlex® (n=330)</b>	<b>Element nativ vorhanden</b>	<b>Element nativ nicht vorhanden</b>
PCR nach WGA positiv	177	1
PCR nach WGA negativ	48	104

<b>VT 37 GenomePlex® + Reamplifikation (n=330)</b>	<b>Element nativ vorhanden</b>	<b>Element nativ nicht vorhanden</b>
PCR nach WGA positiv	184	6
PCR nach WGA negativ	41	99

<b>VT 37 REPLI-g® doppelt + Aufreinigung (n=330)</b>	<b>Element nativ vorhanden</b>	<b>Element nativ nicht vorhanden</b>
PCR nach WGA positiv	213	11
PCR nach WGA negativ	12	94

<b>VT 37 GenomiPhi® doppelt + Aufreinigung (n=330)</b>	<b>Element nativ vorhanden</b>	<b>Element nativ nicht vorhanden</b>
PCR nach WGA positiv	216	9
PCR nach WGA negativ	9	96

Nine Mile GenomePlex® (n=264)	Element <i>in silico</i> vorhanden	Element <i>in silico</i> nicht vorhanden
PCR nach WGA positiv	0	18
PCR nach WGA negativ	0	246

Nine Mile (hoch konzentriert) GenomiPhi® (n= 264)	Element <i>in silico</i> vorhanden	Element <i>in silico</i> nicht vorhanden
PCR nach WGA positiv	0	28
PCR nach WGA negativ	0	236

Aus diesen Angaben wurden Sensitivität, Falschnegativen-Rate, Spezifität, Falschpositiven-Rate und Falschklassifikationsrate berechnet.

**Tabelle 47:** Statistik aus *IS1111*-Analysen

(Sensitivität = Richtigpositive/Richtigpositive + Falschnegative; Falschnegativen-Rate (Fn-Rate) = Falschnegative/ Richtigpositive + Falschnegative; Spezifität = Richtignegative/ Richtignegative + Falschpositive; Falschpositiven-Rate (Fp-Rate) = Falschpositive/ Richtignegative + Falschpositive; Falschklassifikationsrate (Fk-Rate) = Falschpositive + Falschnegative/Gesamtsumme möglicher Banden)

	VT 37 REPLI- g®	VT 37 GPhi®	VT 37 GPlex®	VT 37 GPR	VT 37 Rg 2x	VT 37 GPhi ® 2x	NM GPlex®	NM GPR	NM* GPhi®
Sensitivität	0,88	0,78	0,79	0,82	0,95	0,96	0,00	0,00	0,00
Fn-Rate	0,12	0,22	0,21	0,18	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00
Spezifität	0,95	0,91	0,99	0,94	0,86	0,89	0,93	0,75	0,89
Fp-Rate	0,05	0,09	0,01	0,06	0,14	0,11	0,07	0,25	0,11
Fk-Rate	0,10	0,18	0,15	0,14	0,08	0,06	0,07	0,25	0,11

Die Falschnegativen müssen weiter unterteilt werden. Wie schon bei der MLVA – Untersuchung beschrieben, könnten einige dieser Ausfälle konzentrationsbedingt sein und dürften so in der Berechnung nicht berücksichtigt werden. In der unamplifizierten Ausgangsverdünnung ließ sich die Grenze in etwa bei 100 Kopien ziehen. Um wie bei der MLVA einen Sicherheitsabstand einzuhalten, wurden alle Ausfälle, die bei einer Ausgangskonzentration von unter 1000 Kopien entstanden sind, abgezogen und in der Berechnung der korrigierten Fehlerangaben nicht berücksichtigt. Auch die Gesamtsumme der Proben wurde entsprechend angepasst (n=132).

**Tabelle 48:** korrigierte Fehlerangaben in Bezug auf Tabelle 46

n=132	Falschnegative	konzentrationsbedingt	korrigierte Fn-Rate
VT 37 REPLI-g®	19	9	0,14
VT 37 REPLI-g® 2x	0	12	0,00
VT 37 GPhi®	28	21	0,21
VT 37 GPhi® 2x	0	9	0,00
VT 37 GPlex®	25	23	0,19
VT 37 GPlex® + Reamp	22	19	0,17

In Tabelle 49 wurden die gewonnenen Ergebnisse in Bezug zu den jeweils eingesetzten Ausgangskonzentrationen gesetzt.

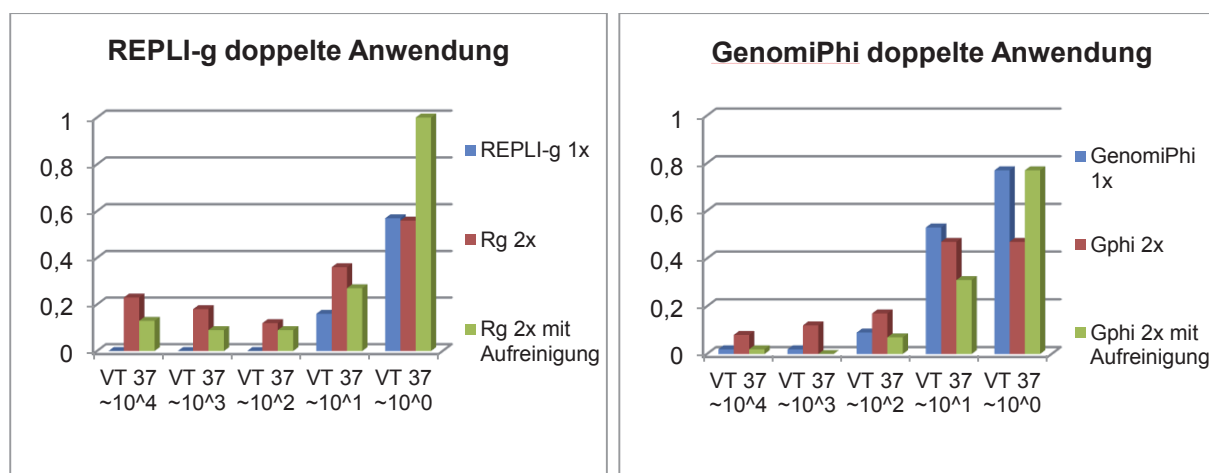
### 3.1.3 Zusammenfassung der qualitativen Ergebnisse

Mithilfe der durchgeführten Analysen ließ sich die Qualität der Amplifikate beurteilen. Die Ergebnisse wurden hier noch einmal zusammengefasst. Zur Berechnung der in Tabelle 49 angegebenen Fehlerraten wurde die Summe aller Fehler beim Dreifachansatz einer Konzentration durch die Gesamtzahl der untersuchten Parameter geteilt. So ergab sich in Bezug auf die Konzentrationen nach der qualitativen Untersuchung mittels MLVA folgendes Bild, wobei der rote Rahmen adäquate Ergebnisse umfasst:

**Tabelle 49:** Zusammenfassung MLVA-Fehlerraten der klinischen Probe; die doppelte Anwendung mit Aufreinigungsschritt ist in Klammern dargestellt; n.a. = in der *com1*-PCR nicht messbar; der Rahmen umfasst die adäquaten Ergebnisse; Fehlerrate = Summe der Fehler im Dreifachansatz der jeweiligen Konzentration / Gesamtsumme untersuchter Parameter)

Probe	REPLI-g®	Rg 2x	GPhi®	GPhi 2x	GPlex®	GPR
VT 37 ~10 <sup>4</sup>	0,00	0,23 (0,13)	0,02	0,08 (0,02)	0,13	0,38
VT 37 ~10 <sup>3</sup>	0,00	0,18 (0,09)	0,02	0,12 (0,00)	0,07	0,38
VT 37 ~10 <sup>2</sup>	0,00	0,12 (0,09)	0,09	0,17 (0,07)	0,35	0,40
VT 37 ~10 <sup>1</sup>	0,16	0,36 (0,27)	0,53	0,47 (0,31)	0,44	0,40
VT 37 ~10 <sup>0</sup>	0,57	0,56 (n.a.)	0,77	0,47 (0,77)	0,73	0,53

Die doppelten Anwendungen von REPLI-g® und GenomiPhi® mit und ohne Aufreinigungsschritt wurden in der folgenden Abbildung veranschaulicht.



**Abbildung 8:** Vergleich der MLVA-Fehlerraten der jeweiligen doppelten Anwendung mit und ohne Zwischenaufreinigungsschritt

Für die *IS1111*-Analyse der klinischen Probe wurden noch einmal die Falschklassifikationsraten in Bezug auf die Konzentrationen gegenübergestellt. Bei der doppelten Anwendung sind nur die Ergebnisse mit zwischengeschaltetem Aufreinigungsschritt angegeben.

**Tabelle 50:** Zusammenfassung *IS1111*-Falschklassifikationsrate der klinischen Probe; der Rahmen umfasst die adäquaten Ergebnisse

Probe	REPLI-g®	Rg 2x	GPhi®	GPhi® 2x	GPlex®	GPR
VT 37 ~10 <sup>4</sup>	0,03	0,01	0,06	0,01	0,02	0,02
VT 37 ~10 <sup>3</sup>	0,03	0,01	0,05	0,01	0,02	0,02
VT 37 ~10 <sup>2</sup>	0,02	0,01	0,06	0,01	0,06	0,08
VT 37 ~10 <sup>1</sup>	0,20	0,02	0,20	0,02	0,20	0,15
VT 37 ~10 <sup>0</sup>	0,23	0,03	0,51	0,02	0,45	0,45

Damit war REPLI-g® von Qiagen das qualitativ beste WGA-System für den Einsatz an einer klinischen nicht fragmentierten Probe. Es ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Typisierungsmethoden und der Präsentation der Kits feststellen.

## **3.2 Herdenuntersuchung Oberer Lindenhof Mai 2009**

Die Proben wurden mittels *com1*-, *IS1111*-, QpH1-, *adaA*-PCRs, MLVA und aller zehn verfügbaren *IS1111*-Multiplexe untersucht.

### **3.2.1 Die “housekeeping“-Gene Mai 2009**

Von den 120 untersuchten, typisierbaren Proben (s. Tabelle 3) wurde zuerst eine Quantifizierung mittels *com1*-real-time-PCR durchgeführt. Die meisten der Proben bewegten sich zwischen  $10^2$  und  $10^4$  Kopien Ausgangskonzentration. Alle Proben waren *adaA* positiv und zeigten das in Deutschland vorherrschende Plasmid QpH1.

### **3.2.2 Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) Mai 2009**

Die MLVA-Untersuchung ergab einen einheitlichen MLVA-Typ.

Die Längenverteilung der untersuchten fünfzehn MLVA-Marker ist in der folgenden Tabelle beschrieben. Aus den Fragmentlängen ließ sich die Anzahl der Wiederholungen berechnen. Auch diese sind in der Tabelle angegeben.

**Tabelle 51:** MLVA-Ergebnisse Mai 2009

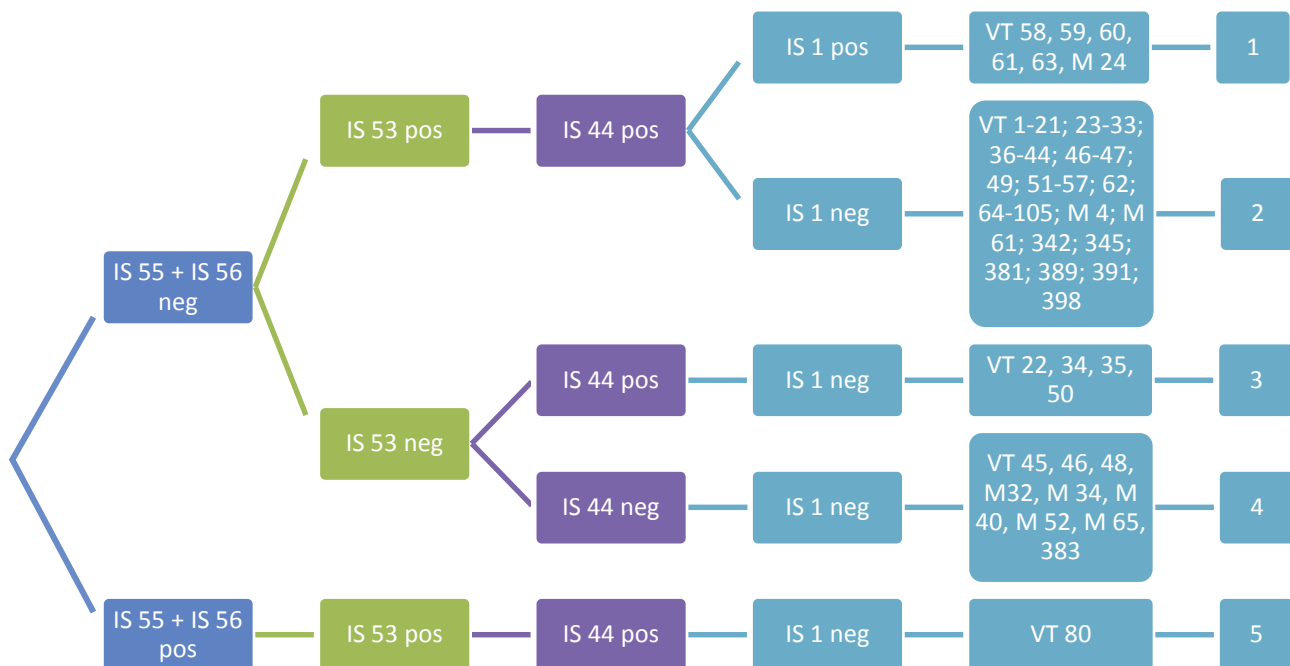
Marker	ms03	ms20	ms27	Cox3 (ms26)	ms36	Cox7 (ms31)	ms21	Cox5 (ms28)	ms30	ms33	ms22	ms23	ms34	Cbu0033 (ms01)	ms24
Fragment- länge	227,54	473,18	266,25	186,93	545,86	120,4	207,02	131,18	298,27	220,0	240,78	112,63	199,78	239,05	196,99
Repeat- Anzahl	7	18	3	9	12	2	6	4	5	4	6	3	4	4	9



### 3.2.3 IS1111-Verteilung Mai 2009

Die Untersuchung des Verteilungsmusters der *IS1111*-Elemente erfolgte unter Anwendung von zehn multiplex-PCRs. Hier wurden die sechs bereits von Bleichert et al. 2011 etablierten Multiplexe (125) sowie die in dieser Arbeit neu entwickelten vier Multiplexe zusammengefasst. Insgesamt konnten so 52 Elemente abgedeckt werden.

In 89 % der untersuchten Elemente stimmten die Proben überein. Die Varianzen in den restlichen 11 % wurden mittels singleplex-PCR nachuntersucht, wobei Abweichungen bei den Elementen IS 55, IS 56, IS 53, IS 44 und IS 1 bestätigt werden konnten.



**Abbildung 9:** *IS1111*-Verteilung Oberer Lindenhof Mai 2009

Innerhalb der untersuchten Population wurden damit fünf verschiedene *IS1111*-Varianten gefunden, wobei Variante 2 mit  $n = 100$  dominiert, gefolgt von Gruppe 4 mit  $n = 9$ . Die Gruppen 1 und 3 sind in etwa gleich groß mit  $n = 6$  bzw.  $n = 4$ , während die Gruppe 5 aus nur einer Probe besteht.

In der ersten Lampperiode ließen sich somit ein identischer MLVA-Typ und fünf *IS1111*-Varianten bei einheitlichem Plasmid- und *adaA*-Typ identifizieren.

**Tabelle 52:** Häufigkeitsverteilung der fünf Genotypen von Mai 2009

	<i>IS1111</i> - Typ 1	<i>IS1111</i> - Typ 2	<i>IS1111</i> - Typ 3	<i>IS1111</i> - Typ 4	<i>IS1111</i> - Typ 5
MLVA-Typ I	6	100	4	9	1

Der einheitliche MLVA-Typ konnte durch die *IS1111*-Analyse in fünf weitere Gruppen unterteilt werden. Mit der Gruppe, die dem MLVA-Typ I und dem *IS1111*-Typ 2 zuzuordnen war, ließ sich mit 100 zugehörigen Proben ein vorherrschender Klon identifizieren.

### 3.3 Herdenuntersuchung Oberer Lindenhof Juni – September 2009

Aufgrund der veterinärmedizinischen Intervention am Oberen Lindenhof, der damit einhergehenden geringeren Ausscheidungs- und Infektionsrate sowie Schwierigkeiten mit dem Probentransport und der -lagerung bestand die zweite, typisierbare Stichprobe aus nur 25 Proben. Wegen des teils sehr niedrigen Probenvolumens bei ausreichender Konzentration ( $10^3$  Kopien/ $\mu$ l) wurden einige der Proben vor der Genotypisierung mit REPLI-g® amplifiziert (3191; 793; 796; 2077; 2118). Alle Proben wurden ebenfalls mittels *com1*-, *IS1111*-, QpH1-, *adaA*-PCRs, MLVA und aller zehn verfügbaren *IS1111*-multiplex-PCRs untersucht.

#### 3.3.1 Die “housekeeping“-Gene Juni – September 2009

Die 25 untersuchten Proben zeigten in der *com1*-Quantifizierung Werte zwischen  $10^0$  und  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l. Sie waren alle *adaA*-positiv und besaßen das Plasmid QpH1.

#### 3.3.2 Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) Juni – September 2009

Die MLVA der Proben aus der zweiten Lammperiode zeigte, bis auf Probe Nummer 2072, einen einheitlichen MLVA-Typ. Auffällig war, dass bei dem Marker ms33 immer mindestens zwei Peaks zu sehen waren, die sich regelmäßig in allen Proben wiederfanden. Auch bei denen von Mai 2009 wurde dieses Phänomen beobachtet. In einer singleplex-PCR konnte dem Marker in allen Fällen eindeutig eine

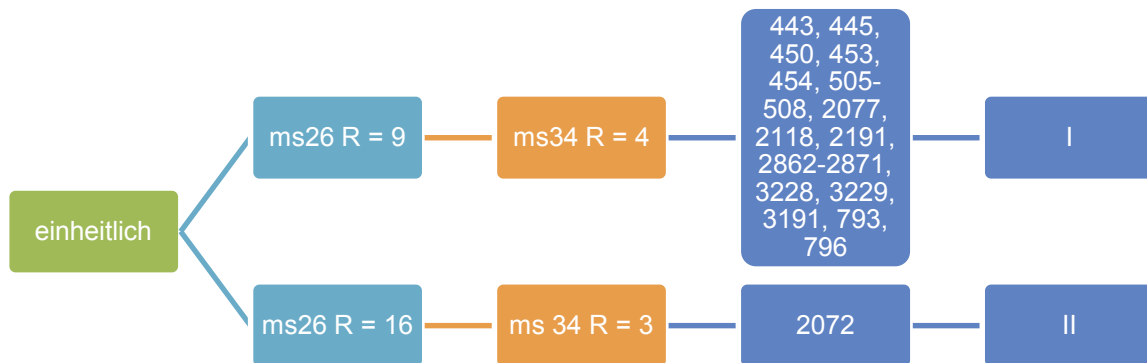
---

Fragmentlänge von 220 bp zugeordnet werden. Nummer 2072 unterschied sich in zwei Markern und stellt einen eigenen neuen MLVA-Typ dar.

**Tabelle 53:** MLVA-Ergebnisse Oberer Lindenhof 20.07. - 13.09.2009; abweichende Fragmentlängen von Nummer 2072 in Klammern angegeben

Marker	ms03	ms20	ms27	Cox3 (ms26)	ms36	Cox7 (ms31)	ms21	Cox5 (ms28)	ms30	ms33	ms22	ms23	ms34	Cbu003 3 (ms01)	ms24
Fragment- länge	227,8	472,5	265,9	186,94 (248,12)	545,43	121	207,1	131,03	297,9	220,63	240,8	113,8	199,58 (194,1)	240	197
Repeat- Anzahl	7	18	3	9 (16)	12	2	6	4	5	4	6	3	4 (3)	4	9

Damit ergaben sich für die Lampperiode im Herbst 2009 zwei unterschiedliche MLVA-Typen:

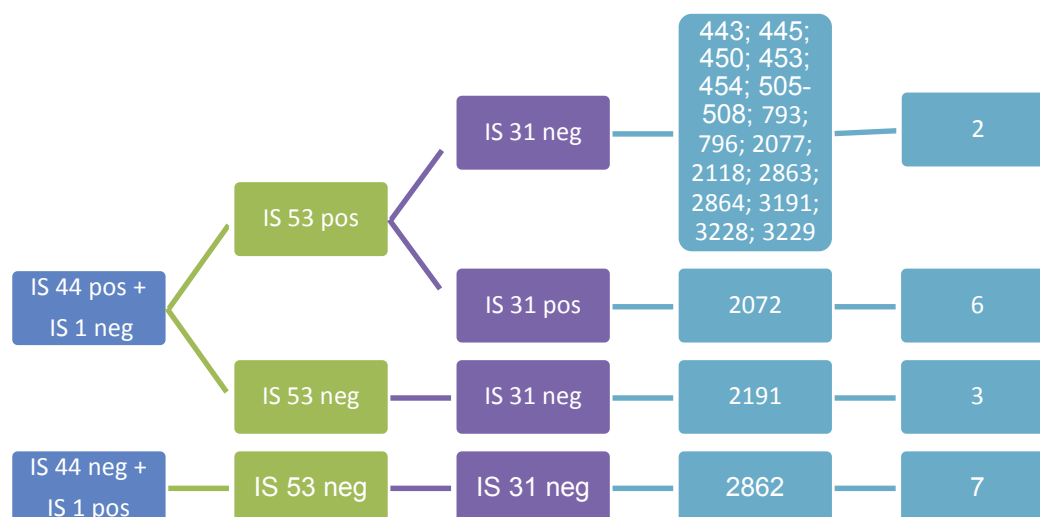


**Abbildung 10:** MLVA-Verteilung Oberer Lindenhof Juni – September 2009; R=Anzahl der Repeats (dt.: Wiederholungen)

Mit 24 Proben war der MLVA-Typ aus Gruppe I der vorherrschende im Herbst 2009. Gruppe II war nur einmal vertreten. Bezogen auf die Gruppen aus Mai 2009 ließen sich die acht Proben dem vorherrschenden Typ I zuordnen.

### 3.3.3 *IS1111*-Verteilung Juni – September 2009

Die Untersuchung der *IS1111*-Verteilung ergab vier verschiedene *IS1111*-Typen, von denen zwei (Gruppe 6 und 7) neu und die anderen beiden bereits in den Proben vom Mai 2009 zu finden waren. Die einzelnen Gruppen wurden durch singleplex-PCRs bestätigt. Die Proben Nummer 2865, 2866, 2870 und 2871, die 2009 bereits MLVA untersucht wurden, waren 2012 zur Bearbeitung leider nicht mehr vorhanden. Daher liegt von diesen Proben keine *IS1111*-Analyse vor.



**Abbildung 11:** IS1111-Verteilung Oberer Lindenhof Juni – September 2009

Achtzehn Proben konnten der im Mai 2009 vorherrschenden Gruppe 2 zugeordnet werden, während Probe Nummer 2191 mit Gruppe 3 aus der ersten Lampperiode übereinstimmte. Mit Probe 2072 in Gruppe 6 und 2862 in Gruppe 7 der zweiten untersuchten Lampperiode konnten zwei neue Genotypen identifiziert werden.

Die im Herbst 2009 gewonnenen Proben ließen sich also in vier Genotypen einteilen.

**Tabelle 54:** Häufigkeitsverteilung der 3 Genotypen am Oberen Lindenhof vom 20.07.-13.09.2009

	IS1111-Typ 2	IS1111-Typ 3	IS1111-Typ 6	IS1111-Typ 7
MLVA-Typ I	18	1	0	1
MLVA-Typ II	0	0	1	0

In diesem Probenintervall konnte der vorherrschende Klon aus der ersten Lampperiode bestätigt und ebenfalls als vorherrschend identifiziert werden.

Als Besonderheit stammten vier der untersuchten, typisierbaren Proben von dem selben Tier. Es lagen Woll- (3229), Kot- (3191), Milch- (2072) und Vaginaltupferproben (2191) vor. Der Genotyp in Wolle und im Kot stimmte mit dem vorherrschenden Genotyp überein. Diese beiden Proben wurden am selben Tag genommen. Die Milchprobe, etwa zehn Tage später, ergab einen anderen Genotyp

(*IS1111*-Gruppe 6) und der Vaginaltupfer, der weitere achtzehn Tage später genommen wurde, konnte der *IS1111*-Gruppe 3 zugeordnet werden.

### **3.4 Proben 2010 – 2011**

Um den Umfang der Proben, die nach Ende des Ausbruchs vom Mai 2009 genommen wurden, zu vergrößern, wurde eine schwach positive Probe (Nummer 20.826 vom 16.12.2011) ausgewählt und mit REPLI-g® amplifiziert. Probe Nummer 16.192 vom 17.12.2010 konnte ohne Amplifizierung genutzt werden.

#### **3.4.1 Die “housekeeping“-Gene 2010 – 2011**

Die Proben (s. Tabelle 3) waren bereits vor der Amplifikation mittels *IS1111*-real-time-PCR untersucht worden. Sie waren *adaA*-positiv und zeigten alle das Plasmid QpH1.

#### **3.4.2 Multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) 2010 – 2011**

Die Proben Nummer 16.192 vom Dezember 2010 und Nummer 20.826 vom 16.12.2011 konnten dem vorherrschenden MLVA-Typ der Gruppe I der ersten Lampperiode zugeordnet werden.

#### **3.4.3 *IS1111*-Verteilung 2010 – 2011**

Die Probe vom Dezember 2010 entsprach in ihrer *IS1111*-Verteilung der bestehenden Gruppe 2. Der Kottupfer vom 16.12.2011 konnte der Gruppe 6 zugeordnet werden.

Probe 16.192 von Dezember 2010 stammte vom selben Schaf wie die Milchprobe Nummer 2077 von August 2009. Sie wiesen beide den gleichen Genotyp auf und konnten dem vorherrschenden Klon zugeordnet werden.

Bei genauerer Betrachtung der Verteilung der *IS1111*-Elemente aller untersuchten Proben zeigt sich, dass sie sich in nur sechs Elementen unterscheiden: IS 1, IS 31,

IS 44, IS 53, IS 55 und IS 56. In der folgenden Tabelle wird die Häufigkeit, mit der die einzelnen Elemente in der untersuchten Population auftraten, dargestellt.

**Tabelle 55:** Häufigkeitsverteilung der IS-Elemente in Prozent

Element	Prozent positiv	Prozent negativ
IS 34, 61, 48, 22, 33, 35, 24, 26, 29, 54, 21, 23, 25, 60, 47, 28, 2, 5, 3, 7,4, 9, 13, 17, 16, 8, 6, 12, 15, 18,19	100,0	0,0
IS 44	93,7	6,3
IS 53	89,5	10,5
IS 1	4,2	95,8
IS 31	1,4	98,6
IS 56	0,7	99,3
IS 55	0,7	99,3
IS 40, 43, 39, 49, 42, 84, 46, 50, 41, 57, 45, 58, 14, 20, 10, 11	0,0	100,0

Somit waren 89 % der untersuchten IS-Elemente in der untersuchten Population stabil. IS 55 und 56 korrelierten miteinander, sodass zur Steigerung der Diskriminierung nur eines der Elemente betrachtet werden musste.

### 3.5 Zusammenhang mit dem Phänotyp

Da die Proben von unterschiedlichen Tierarten stammen und aus unterschiedlichen Materialien bestehen, wurden die erzielten Ergebnisse im Zusammenhang mit diesen Merkmalen ausgewertet.

Die Proben der Schafe konnten vier, die der Ziegen sechs verschiedenen Genotypen zugeordnet werden, wobei bei beiden Spezies der Genotyp I – 2 (I – II = MLVA-Typ; 1 – 7 = IS1111-Typ) der vorherrschende war. Nur I – 2, I – 3 und I – 4 kamen sowohl bei Ziegen als auch bei Schafen vor, während I – 6 und II – 6 nur bei Schafen und die restlichen Genotypen nur bei Ziegen zu finden waren.



**Tabelle 56:** Verteilung der Genotypen im Zusammenhang mit der Spezies; I - II = MLVA-Typ; 1 - 5 = IS1111-Typ

Genotyp	Schaf (n = 22)	Ziege (n = 121)
I – 1	0	6
I – 2	17	102
I – 3	2	3
I – 4	1	8
I – 5	0	1
I – 6	1	0
II – 6	1	0
I – 7	0	1

In Bezug auf die einzelnen IS-Elemente traten die Varianzen bei IS 53 und 44 bei beiden Spezies auf, die bei IS 31 nur beim Schaf und die bei IS 55, 56 und IS 1 nur bei der Ziege.

Abgesehen von der Milch war der Genotyp I – 2 auch bezogen auf das Probenmaterial in allen Fällen vorherrschend. Die Vaginaltupfer wiesen fünf verschiedene Genotypen auf, Blut, Nasentupfer und Kot zwei, Wolle und sonstige Proben nur einen. Die Milchproben ließen sich in vier Genotypen unterteilen.

**Tabelle 57:** Verteilung der Genotypen im Zusammenhang mit dem Probenmaterial; I - II = MLVA-Typ; 1 - 5 = IS1111-Typ; NT = Nasentupfer; Sonstige = Hauttupfer, Umgebungsprobe

Genotyp	VT	Blut	Wolle	Kot	Milch	NT	Sonstige
I – 1	5	0	0	0	1	0	0
I – 2	94	13	2	2	3	4	2
I – 3	5	0	0	0	0	0	0
I – 4	3	1	0	0	5	0	0
I – 5	1	0	0	0	0	0	0
I – 6	0	0	0	1	0	0	0
II – 6	0	0	0	0	1	0	0
I – 7	0	0	0	0	0	1	0

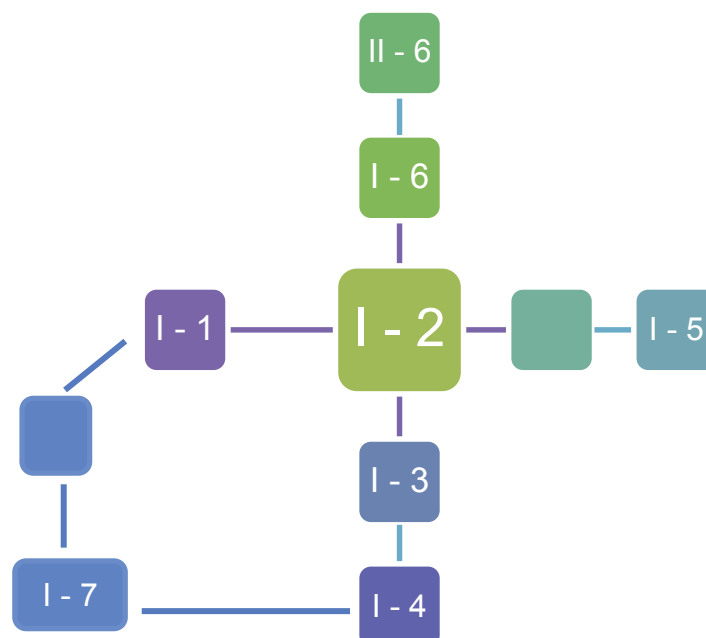
Die untersuchten Proben stammten von vier verschiedenen Zeitpunkten. Es konnte jedoch kein zeitlicher Zusammenhang zwischen den Varianzen beobachtet werden.

**Tabelle 58:** Verteilung der Genotypen im Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Probennahme; I - II = MLVA-Typ; 1 - 5 = *IS1111*-Typ

Genotyp	Mai 09	Herbst 09	2010	2011
I - 1	6	0	0	0
I - 2	100	18	1	0
I - 3	4	1	0	0
I - 4	9	0	0	0
I - 5	1	0	0	0
I - 6	0	0	0	1
II - 6	0	1	0	0
I - 7	0	1	0	0

### 3.6 Phylogenie und Vergleich mit Stammsammlung

Die Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Stämme gestaltet sich aufgrund der Diversität bei den verschiedenen Analysen (MLVA und vor allem *IS1111*-Analyse) schwierig. Ausgehend von dem vorherrschenden Genotyp I - 2 als zentralem Punkt lässt sich die Phylogenese wie folgt darstellen:



**Abbildung 12:** Verwandtschaftsverhältnisse aller gefundenen Genotypen; Jede Linie steht für einen Unterschied bei den *IS*-Elementen, bzw. bei II - 6 für einen unterschiedlichen MLVA-Typ; die leeren Boxen dienen als Platzhalter, wenn mehr als ein Unterschied zwischen zwei Genotypen zu finden und kein weiterer gefundener Genotyp dazwischen einzuordnen war

Beim Vergleich mit den Genotypen der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr in München ließen sich 24 Stämme, die denselben MLVA-Typ aufwiesen wie der hier vorherrschende Klon, identifizieren. Zwölf dieser Stämme stammen von Ziegen, sieben von Schafen, zwei von Rindern, zwei aus Zeckenpools und einer von Damwild. Das älteste Isolat wurde 1998 in Baden-Württemberg in einem Rind gefunden. Von da an tauchte der Klon immer wieder besonders in Süddeutschland (sechzehn aus Baden-Württemberg, vier aus Bayern) aber auch vereinzelt in Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen auf.

Von den 24 Stämmen wurden zwölf mittels *IS1111*-Analyse untersucht (124). Sie ließen sich in weitere zehn Subtypen einteilen, von denen einer (Nr. 2595; Schaf, 1999, Niedersachsen) mit dem hier vorherrschenden Klon identisch war. Die anderen waren den hier gefundenen Subtypen zwar ähnlich, unterschieden sich aber mindestens in einem Element und waren keiner der vorgefundenen Gruppen zuzuordnen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Evaluierung der WGA-Kits

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine nachweislich mit Q-Fieber infizierte Herde kleiner Wiederkäuer über einen zeitlichen Verlauf beprobt und die Proben, soweit möglich, typisiert. Im Ausbruchsgeschehen waren erwartungsgemäß die meisten Proben stark positiv, während nach tierärztlicher Intervention sowohl die Konzentration des Erregers in den Proben als auch die Zahl der positiven Proben deutlich abnahm (s. Abbildung 3). Die für eine differenzierende Typisierung von *Coxiella burnetii* notwendige Mindestmenge an DNA wird, wie hier auch zu beobachten war (s. 2.1.1), häufig in klinischen Proben von Humanpatienten, subklinisch infizierten oder wie im vorliegenden Fall geimpften Tieren nicht erreicht. Um eine untersuchungsfähige Menge aus den Proben zu erhalten, können verschiedene kommerzielle Kits zur Gesamtgenomvermehrung verwendet werden, deren Eignung für *C. burnetii* hier evaluiert wurde.

#### 4.1.1 Quantitative Untersuchung

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung nach Amplifikation der klinischen Probe (VT 37; 05.2009) waren bei allen WGA-Kits ähnlich. REPLI-g® konnte eine durchschnittliche Steigerung der Kopienzahl/ $\mu\text{l}$  um 3,2  $\log_{10}$ -Stufen, GenomiPhi® um vier, GenomePlex® alleine um 1,6 und gemeinsam mit der Reamplifikation um 3,8  $\log_{10}$ -Stufen erreichen. Auch bei der niedrigsten Ausgangskonzentration von nur einer Genomkopie/ $\mu\text{l}$  erreichten sowohl GenomiPhi® als auch GenomePlex® in Kombination mit Reamplifikation eine Steigerung von vier  $\log_{10}$ -Stufen, während REPLI-g® nur eine Steigerung von einer Zehnerpotenz gelang.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse trotz der identischen Ausgangsbedingungen ist im System der Methoden zu suchen. Die Sensitivität einer Reaktion hängt von der Polymerase, den Primern und den verwendeten Puffern ab. Die zwei MDA-Kits verwenden eine andere Polymerase als GenomePlex®. Allerdings ließe die Polymerase als Ursache ein schlechtes Ergebnis bei beiden MDA-Methoden erwarten, was bei GenomiPhi® aber nicht der Fall war. Die

Pufferzusammensetzung ist nicht genau bekannt und deshalb schwer zu beurteilen im Hinblick auf eine mögliche, ungenügende Vervielfältigung der Reaktion. Alle Kits verwenden willkürliche Hexamerprimer. Es ist denkbar, dass die Auswahl der Hexamere in dem einen Kit besser zur Amplifikation von *Coxiella* geeignet ist als die in dem anderen. Bei einem anderen Erreger könnte das Ergebnis umgekehrt sein. Die Kits wurden auch an einer sehr niedrig konzentrierten *Francisella*-Probe erprobt, wobei hier konträr zu den Ergebnissen bei den Coxiellen Repli-g® die Amplifikation besser gelang als GenomiPhi® (Daten nicht gezeigt). Diese Entdeckung macht die Primerzusammensetzung und Kompatibilität zum Erreger als Ursache für die Differenzen wahrscheinlicher.

Die Amplifikation des Referenzstammes Nine Mile mit GenomiPhi® brachte im Schnitt eine Steigerung der Kopienzahl/µl um 1,25 log<sub>10</sub>-Stufen, bei sehr hohen Ausgangskonzentrationen (10<sup>4</sup> bis 10<sup>6</sup> Kopien/µl) um 1,33. GenomePlex® verzeichnete eine Steigerung um 1,5 log<sub>10</sub>-Stufen ohne und um 2 weitere mit Reamplifikation. REPLI-g® konnte hingegen keine Steigerung der Konzentration des Referenzstamms bewirken.

Diese starken Effizienzunterschiede (ca. 2,5 log<sub>10</sub>-Stufen) der MDA-Kits, REPLI-g® und GenomiPhi® bei der klinischen Probe im Vergleich zum Referenzstamm lassen sich am ehesten mit der Vorbehandlung der Probe erklären.

Nelson et al. stellten fest, dass DNA für WGA zirkulär und vor allem nicht zu stark fragmentiert sein soll (122) und auch in den Kitbeschreibungen von GenomiPhi® und REPLI-g® wird eine Mindestfragmentlänge der eingesetzten DNA von 2 kb genannt. Prinzipiell liegt prokaryotische DNA zirkulär vor, allerdings sind vor der Verwendung in der WGA verschiedene Inaktivierungs- und Extraktionsverfahren notwendig, die die Zirkularität aufheben. Die Coxiellen-Stämme, wie der Nine Mile, die am Institut das L3-Labor verlassen, werden durch Hitzebehandlung (2 x 30 Min. bei 100°C) inaktiviert, wobei es zu einer Fragmentierung der DNA kommen kann (129). Die Fragmentlänge des untersuchten Stammes Nine Mile (RSA 493) lag in der Gelelektrophorese-Untersuchung durchschnittlich bei zirka 1 kb Länge. Die vormals zirkuläre DNA wurde durch die Fragmentierung geöffnet und die DNA-Fragmente dadurch linear ausgerichtet.

Werden die Fragmente also zum Beispiel durch Inaktivierungsmethoden zu kurz, ist eine adäquate Amplifizierung durch die Phi29-Polymerase, zumindest bei REPLI-g®, nicht mehr möglich. Dies konnte experimentell nachgewiesen werden, indem die klinische Probe auf die gleiche Art wie der Nine Mile vorbehandelt wurde. Die anschließende Amplifikation mit REPLI-g® war nicht erfolgreich. Entfällt der Inaktivierungsschritt, bleibt die Größe der Fragmente bei > 2 kb und beide MDA-Methoden funktionieren einwandfrei.

Die genannten Probleme treten bei GenomePlex® nicht auf. Hier wird in der Kitbeschreibung eine Mindestfragmentlänge von 200 bp verlangt, die auch beim hitzeinaktivierten Referenzstamm gewährleistet ist. Die Effizienz der Sigma-Methode ist bei fragmentierter DNA mit 1,5 bzw. zwei  $\log_{10}$ -Stufen Steigerung der Kopienzahl/ $\mu\text{l}$  höher als die von GenomiPhi® (1,25  $\log_{10}$ -Stufen) und REPLI-g® (keine Steigerung). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Wirksamkeit der MDA-basierten Methoden stark von der präanalytischen Behandlung der Proben abhängig ist.

Dagegen bleibt ungeklärt, warum bei hohen Ausgangskonzentrationen ab  $10^3$  Kopien GenomiPhi® trotzdem die fragmentierte DNA entsprechend amplifizieren konnte, wenn auch weniger effizient im Vergleich zu GenomePlex® und dem Reamplifikationskit.

GenomiPhi® ist, genau wie REPLI-g®, für die wesentlich größere eukaryotische DNA entwickelt worden. Dies wird bei genauerer Betrachtung der Systeme deutlich. Die durchschnittliche Länge der gewonnenen Amplifikate beträgt 10 kb (Handbuch GenomiPhi®, GE-Healthcare). Aufgrund der verwendeten zufälligen Hexamerprimer werden die Fragmente in jedem Amplifizierungsschritt kürzer. Das heißt, um ein entsprechend langes Produkt zu erzielen, müssen die Fragmentlängen der zu amplifizierenden Stücke bedeutend länger als diese 10 kb sein. Laut Hersteller funktioniert die Amplifikation kleinerer Fragmente bis zu einer Mindestfragmentgröße von 3 kb bei zirkulärem Template noch einwandfrei. So findet etwa bei Plasmiden eine sogenannte „Rolling Circle Amplification“ (frei: Amplifikation des rollenden Kreises) statt, bei der die Polymerase im Kreis wie auf einem „unendlichen Fragment“ amplifiziert, sodass lange Produkte entstehen. Hingegen ist bei genomischer DNA wegen der ohnehin sehr langen Stränge die Zirkularität nicht essentiell.

Die hitzebehandelte DNA des Referenzstammes Nine Mile (RSA 493) ist durch die präanalytische Behandlung, wie beschrieben, weder zirkulär noch größer als 10 kb. Die Frage ist, warum die Amplifikation von 1-kb-Fragmenten mit GenomiPhi® dennoch funktioniert und das nur bei hohen Ausgangskonzentrationen (bei GenomiPhi® > 10<sup>3</sup> Kopien/μl). Ein Erklärungsansatz wäre, dass die Hexamerprimer willkürlich über die gesamte Fragmentlänge verteilt binden, sodass unterschiedlich große Amplifikate in jedem Zyklus entstehen. Diese werden in den folgenden Amplifikationsschritten immer kürzer, bis eine spätere Weiterverarbeitung mit PCRs oder anderen Methoden nicht mehr möglich ist. Wird allerdings eine hohe Ausgangskonzentration von 1-kb-Fragmenten eingesetzt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine größere Anzahl längerer Produkte entsteht. Diese sind in darauffolgenden PCRs detektierbar und nutzbar für weitere molekularbiologische Untersuchungen wie etwa die Typisierung.

Sollte das der Grund sein, warum GenomiPhi® bei einer hohen Ausgangskonzentration des Referenzstammes trotz der zu geringen Fragmentlänge funktioniert, lässt sich aber noch nicht erklären, warum das REPLI-g®-Kit nicht ebenfalls diese Ergebnisse erbringt. Im direkten Vergleich der Kitbestandteile bzw. der Protokolle liegt der Hauptunterschied nur in der verwendeten Denaturierungsmethode. Während GenomiPhi® thermisch denaturiert, nutzt REPLI-g® den laut Hersteller schonenderen Weg der alkalischen Denaturierung. Beide Verfahren basieren auf der gleichen Methode (MDA) und der identischen Polymerase. Auch Rücksprachen bzw. Anfragen bei den Herstellern erbrachten keine Erklärung für die ermittelten Ergebnisse und Diskrepanzen.

Um das Problem der geringen Fragmentlängen zu umgehen, bietet Qiagen ein Kit an, das für Proben mit stark fragmentierter DNA gedacht ist. Dieses Kit wurde für die Anwendung an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material entwickelt.

In der durchgeführten Untersuchung (s. 3.1.4) wurde statt des Gewebes die aufgereinigte DNA eingesetzt, wobei allerdings die Amplifikation in allen Versuchen misslang. Im ersten Versuch wurde der Lyseschritt komplett weggelassen. Das dadurch bedingte Fehlen der FFPE-Lysis-Solution könnte zu einem Missverhältnis der Puffer geführt und somit die Reaktion behindert haben. Betrachtet man die Ergebnisse der anderen Ansätze, bei denen die DNA zu verschiedenen Zeitpunkten zum Reaktionsgemisch gegeben wurde, lässt sich der fehlende Puffer als

Fehlerursache jedoch ausschließen. In den anderen Versuchen wurden alle mitgelieferten Puffer eingesetzt und trotzdem funktioniert die Amplifikation nicht (s. 3.1.4). Auch eine Beschädigung der DNA durch die Erhitzungsschritte wurde als mögliche Ursache für den Misserfolg in Betracht gezogen. Die Amplifikation funktionierte allerdings auch dann nicht, wenn die Probe erst nach Ablauf aller Erhitzungsschritte zugegeben wurde. Hierfür gibt es zwei mögliche Ursachen: Entweder erfolgt im Rahmen des Ligationsschrittes eine Alteration der DNA, welche die Amplifikation verhindert oder die Ligation funktioniert nicht. Das nachfolgende REPLI-g® Midi Kit kann aufgrund der weiterhin zu stark fragmentierten Ausgangs-DNA aus den bereits diskutierten Gründen nichts bewirken. Um einen Ausfall des Systems auszuschließen, wurde die Gesamt-DNA-Menge der Amplifikate gemessen. Der Hersteller (Qiagen) äußerte die Vermutung, dass das DNA-Maximum des Systems bereits durch die Amplifikation von beispielsweise Zellkulturresten erreicht sein könnte und damit eine Zunahme der Coxiellen-DNA gehemmt wurde. Aufgrund der hohen gemessenen DNA-Menge in der Probe (zwischen 2 – 4 µg/µl) erscheint dieser Erklärungsansatz möglich. Das Ergebnis verdeutlicht die Notwendigkeit einer zellfreien Anzuchtmethode, die die vorhandene Fremd-DNA im Material minimieren könnte.

Wie in den Handbüchern der jeweiligen Kits beschrieben, muss eine bestimmte DNA-Mindestmenge (1 ng/µl) eingesetzt werden, um ein adäquates Ergebnis zu erzielen. Diese Untergrenze der eingesetzten DNA-Konzentration für eine einwandfreie Amplifikation ist wegen der geringen Konzentrationen der Proben nicht auf die Anwendung bei *Coxiella burnetii* übertragbar. In der Quantifizierung traten zuweilen hohe Schwankungen auf, was insbesondere bei den niedrigsten Ausgangskonzentrationen von nur einer Kopie/µl auffällig war. Hier konnte entweder keine oder nur eine geringe Steigerung um eine Zehnerpotenz erreicht werden, in Einzelfällen eine maximale Steigerung um vier log<sub>10</sub>-Stufen. Diese vier log<sub>10</sub>-Stufen sind initial betrachtet ein sehr gutes Ergebnis, ließen sich allerdings in den folgenden Versuchen nicht wiederholen. Dies bedeutet, dass keine zuverlässige, reproduzierbare Amplifikation möglich war.

Da es sich bei der Reaktion um eine unspezifische Amplifikation handelt, ist wahrscheinlich, dass auch Fehler in der Genrepräsentation mit der eingesetzten DNA-Konzentration gekoppelt sind. Hutchison et al. zeigten, dass Konzentration und



Kopienzahl der eingesetzten DNA entscheidend für die Qualität des Amplifikationsproduktes sind, wobei aber auch das eingesetzte Reaktionsvolumen eine Rolle zu spielen schien. Ein kleineres Reaktionsvolumen (3 µl) resultierte in weniger unspezifischer DNA verglichen mit 15 – 30 µl Reaktionsvolumen (117).

Raghunathan et al. Fanden heraus, dass die meisten Fehler bei nur einer eingesetzten Kopie auftreten (118), was Wu et al. mithilfe einer Verdünnungsreihe bestätigen konnten. Die Grenze der möglichen Amplifikation war hier bei einer eingesetzten Masse von 10 fg DNA erreicht (119).

Bei den untersuchten Proben wird diese genannte Mindestmenge deutlich überschritten. Die geringstmögliche Ausgangsmenge, die eine adäquate und reproduzierbare Amplifikation ermöglicht, liegt in der vorliegenden Untersuchung bei  $10^2$  Kopien/µl und damit bei 200 fg (eine Kopie wiegt ~2 fg). Bei geringerer Konzentration kommt es vereinzelt zur erfolgreichen Amplifikation, wobei das Ergebnis nicht einwandfrei reproduzierbar ist. Zu bedenken ist, dass es sich bei den eingesetzten Materialien um eine klinische Probe bzw. einen Zellkulturüberstand handelt, in denen sich auch Fremd-DNA befindet. So lässt sich auch die Differenz zur im Kit-Handbuch oder in der Literatur publizierten notwendigen Mindestmenge erklären, wo unter anderem reinste Coxiellen-DNA, aus den Vakuolen der Wirtszellen extrahiert, eingesetzt wurde (130).

Um die gewonnene DNA-Menge weiter zu steigern bzw. um einen schwindenden Stock aufzufrischen, wurden verschiedene Varianten und Kombinationen der einzelnen Systeme untersucht.

Die Kombination der MDA-Kits mit dem Reamplifikationskit von Sigma ermöglichte keine Steigerung der DNA-Konzentration. Im Gegenteil, die Systeme sind, wie nach den vorliegenden Ergebnissen zu erwarten, nicht kompatibel und somit ist von einer Kombination abzuraten. Die im ersten Schritt der Amplifikation entstandene Bibliothek besteht aus DNA-Fragmenten von durchschnittlich 500 bp Länge. Wie bereits erläutert, reicht dies nicht aus, um eine adäquate Amplifizierung durch die MDA-Methoden zu gewährleisten.

Die doppelte Anwendung der MDA-Kits resultierte nur teilweise in einer größeren DNA-Menge. Diese blieb weitestgehend unverändert bei deutlich schlechterer Qualität (s. 3.1.1.5 Kompatibilität und doppelte Anwendung und Tabellen 36, 50 und

51). Der Hersteller (Qiagen) erläuterte, dass das Kit für diese Anwendung ohnehin nicht geeignet sei und es daher von seiner Seite aus keine Erklärung für das Phänomen gebe. Bei Nelson et al. (122) ist davon die Rede, dass die MDA-Methode zirkuläre DNA bevorzugt. Aufgrund des Mechanismus der MDA liegt nach Amplifizierung keine zirkuläre, sondern lineare DNA vor. Dies könnte dazu führen, dass die Phi29-Polymerase nicht mehr arbeiten kann. Im Gegensatz zu den Ausführungen von Nelson et al. wies der Hersteller darauf hin, dass die Phi29-Polymerase, wie bereits erläutert, mit linearer DNA problemlos funktioniert und es nur auf die Fragmentlängen und die Reinheit der eingesetzten DNA ankommt. Dennoch lassen sich so eventuell die quantitativen und qualitativen Einbußen erklären.

Die Möglichkeit, dass Salze oder Pufferrückstände der ersten Amplifikation die erneute Reaktion behindern, wurde mit Einführung eines Aufreinigungsschritts überprüft. Die Ergebnisse waren quantitativ betrachtet allerdings unverändert. Die qualitative Untersuchung zeigte bei beiden Kits eine deutliche Verbesserung gegenüber der Amplifikation ohne Aufreinigungsschritt (s. 3.1.1.5 und 3.1.2.2; Tabelle 49 und Tabelle 50). Daher erscheinen Rückstände aus der vorangegangenen PCR als hemmende Komponenten wahrscheinlich.

Eine Möglichkeit, das Problem der Linearität der Amplifikate zu beheben, wäre das Einführen eines Rezirkularisierungsschritts vor der zweiten Anwendung der MDA-Methoden, um somit eine ideale Ausgangssituation für eine doppelte Anwendung herzustellen. Ein weiterer Lösungsansatz zur doppelten Anwendung wäre die Kombination mit einem Kit, das bei hohen Konzentrationen zuverlässig mit wenigen Fehlern lineare, fragmentierte DNA amplifiziert. Hierzu würde sich theoretisch das Sigma-Kit eignen, jedoch produziert es in der MLVA und in der *IS1111*-Untersuchung bereits bei der höchsten eingesetzten Ausgangskonzentration massive Fehler (s. 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Damit wäre eine spätere Weiternutzung der Proben für forensische Fragestellungen ausgeschlossen.

#### **4.1.2 Qualitative Untersuchung**

Neben der adäquaten DNA-Menge nach Amplifikation ist für eine erfolgreiche Typisierung auch die Qualität der Amplifikate entscheidend.

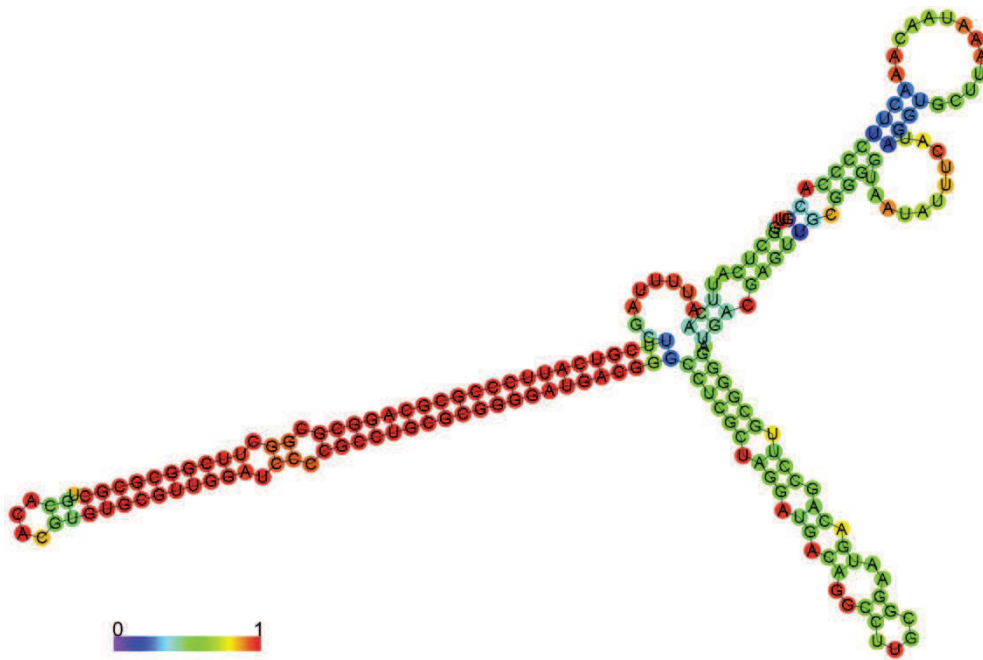
Mit der Amplifikation der "housekeeping"-Gene hatte keines der Kits große Schwierigkeiten. Nur in einem Fall, beim QpH1-Plasmid, ist bei GenomePlex® die Amplifikation fehlerhaft verlaufen, was durch ein negatives PCR-Ergebnis sichtbar wurde. Auch die Sequenzanalysen der "housekeeping"-Gene bestätigten, bis auf einige wenige Punktmutationen im Vergleich zur *in silico*-Sequenz des Nine Mile (RSA 493) im Produkt der *IS1111*-Lightcycler-PCR, ebenfalls die fehlerfreie Amplifikation (s. Abbildung 7). Im Gegensatz dazu, erbrachte die qualitative Untersuchung sowohl in der MLVA als auch in der *IS1111*-Analyse deutliche Abweichungen vom unamplifizierten Ausgangsmaterial.

Dass die Amplifikation der *IS1111*-Regionen und der *tandem repeats* der Polymerase Probleme bereiten kann, lässt sich durch die Struktur der Zielsequenzen der jeweiligen PCR erklären (131, 132). Bei der *com1*-PCR beispielsweise wird nach einem kodierenden Bereich des Genoms gesucht. Dieser Teil muss so aufgebaut sein, dass auch die erregereigene Polymerase ihn ablesen und unter anderem entsprechende mRNA generieren kann, um das kodierte Protein zu exprimieren. Es handelt sich um einen relativ kurzen Bereich (z.B. *com1* mit 170 bp), der in der Regel keine Sekundärstrukturen aufweist. Im Gegensatz dazu stellen die Insertionssequenzen (IS-Elemente) und die *tandem repeats* besondere Strukturen dar. Sie sind variable und mobile Genorte mit häufig ausgeprägten Sekundärstrukturen. Diese Formationen, zum Beispiel Haarnadelstrukturen, kommen bei repetitiven Elementen aufgrund der intramolekularen Renaturierung besonders häufig vor. Wird eine PCR-Untersuchung mit einer thermostabilen Polymerase, wie zum Beispiel der *Taq*-Polymerase, durchgeführt, so soll die hohe Temperatur (94 °C) des ersten Schritts des Zyklus für ein Denaturieren der doppelsträngigen DNA und der etwaigen Sekundärstrukturen sorgen. Es ist jedoch zu bedenken, dass Bereiche mit hohem G- und C-Gehalt auch bei 94 °C schlecht denaturieren und somit weiterhin bei der Primeranlagerung Probleme bereiten können (133). In der vorliegenden Studie zeigte die GenomePlex®-Amplifikation deutlich mehr Schwierigkeiten mit den besonderen Strukturen der *tandem repeats* und *IS1111*-Elemente, obwohl die Reaktion mit der *high-fidelity*-Polymerase ebenfalls einen Denaturierungsschritt bei 94 °C umfasst. Es kommt unabhängig von der Konzentration zu Fehlern und Ausfällen besonders in der MLVA. Bei der Phi29-Polymerase handelt es sich um eine thermolabile Polymerase, deren Wirkoptimum bei 30 °C liegt. Bei dieser Temperatur bleiben Sekundärstrukturen, die sich

intramolekular bilden, intakt und könnten so ein Hindernis für die weitere Amplifikation darstellen. Dennoch hat diese Polymerase mit Sekundärstrukturen selten Schwierigkeiten (134). Eine mögliche Erklärung bieten die von den MDA-Kits verwendeten Puffer. Diese könnten Chemikalien, ähnlich dem von Wu et al. beschriebenen Spermidin oder Einzelstrangbindeprotein, enthalten, die die gebildeten Sekundärstrukturen lösen (119, 135). Die diesbezüglichen Herstellerangaben konnten die Theorie weder bestätigen noch entkräften. Aufgrund der Datenlage ist damit die Reaktionstemperatur alleine als Ursache für die Probleme insbesondere der OmniPlex<sup>®</sup>-Library-Methode ausgeschlossen.

Diese Beobachtungen werden durch die Ergebnisse von Hite et al. unterstützt. Diese bemerkten, dass die Genauigkeit der Amplifikation speziell von Dinukleotid-Wiederholungen bei einer thermolabilen Polymerase mit einer DNA-Synthesetemperatur von 37 °C größer ist als bei einer thermostabilen Polymerase mit 72 °C (132).

In einigen Fällen ließen sich die Ausfälle an bestimmten Markern festmachen (ms01, 20, 33 und 36). Diese Beobachtung kombiniert mit dem Auftreten der Probleme in allen Konzentrationen spricht gegen einen Fehler des Systems. Es deutet eher auf eine Besonderheit im Bereich dieser Marker hin. Bei genauerer Betrachtung von ms20 und ms36 fällt auf, dass die beiden Marker miteinander korrelieren. Ms36 stellt eine kürzere Version von ms20 dar. In der Sequenz von ms33, der bei allen Kits auffällig häufig Schwierigkeiten machte, findet sich in einigen Fällen ein IS-Element, was die Probleme erklären könnte. Ms01 verfügt über eine sich gegenläufig wiederholende Sequenz, die eine sehr stabile Haarnadelstruktur mit 81 bp bildet. An der Stelle, die auf diese Struktur folgt, kommt es zur sogenannten Polymerase-*Slippage*. In Abbildung 13 wird deutlich, dass die Haarnadelstruktur über sehr starke Bindungen und eine hohe Basenpaarungswahrscheinlichkeit verfügt (*RNAfold* Web Server; Institut für theoretische Chemie, Universität Wien; (136)). Diese Haarnadelstruktur kann bereits die bakterieneigene Polymerase stören (131, 133, 137). Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass im Falle von ms01 dieses Phänomen die Ursache für die Probleme der *high-fidelity*-Polymerase darstellt.



**Abbildung 13:** Sekundärstruktur am Marker ms01; die Farben geben die Basenpaarungswahrscheinlichkeit an (rot = 100 %; lila = 0 %); Quelle: *RNAfold* WebServer (Universität Wien)

Bei Betrachtung der Variabilität der beschriebenen Genbereiche wird die Relevanz der Amplifikationsschwierigkeiten mit diesen besonderen Sequenzen deutlich. Bei den “housekeeping“-Genen handelt es sich um intragene Bereiche, die hoch konserviert sind. Diese Gene können zur eindeutigen Identifikation des Erregers genutzt werden. Varianzen innerhalb der Sequenzen würden in falschnegativen Ergebnissen resultieren. Im Gegensatz dazu sind sichtbare Reaktionen des Erregers bzw. Varianten in intergenen Regionen erwünscht, um sie für eine differenzierende Typisierung nutzen zu können. Aus diesem Grund ist die inadäquate Amplifikation solcher Regionen problematisch im Hinblick auf das Typisierungsergebnis (132).

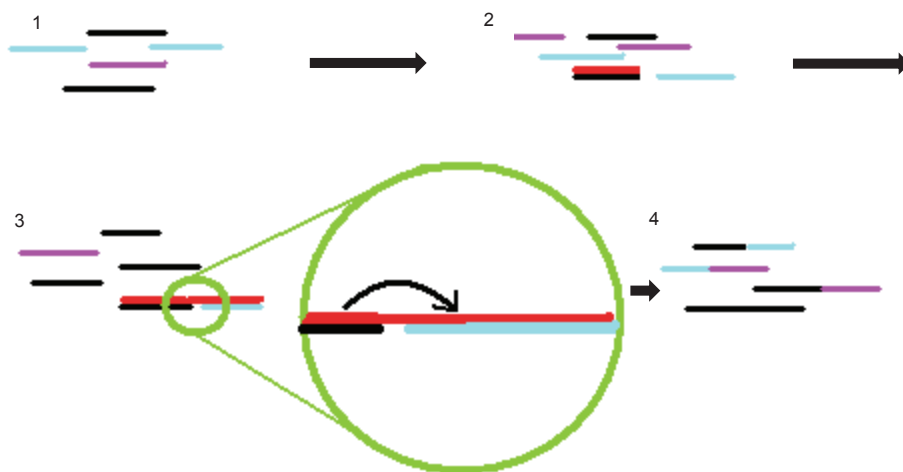
Durch die Sequenzanalysen der falschpositiven *IS1111*-Elemente (s. 3.1.2.3.1) konnten die Probleme der Polymerase mit den repetitiven Elementen und Sonderstrukturen, wie lokalen Sekundärstrukturen, bestätigt werden.

In der *IS1111*-Untersuchung des mit GenomePlex® amplifizierten Referenzstammes Nine Mile wurden einige falschpositive Ergebnisse identifiziert. Die Sequenzierung der zusätzlich entstandenen Banden ergab stark fragmentierte, teils völlig synthetische Stränge, viele falsch zugeordnete oder falsch zusammengefügte Abschnitte und nie einen zusammenhängenden, passenden Strang. Im Fall des IS 49-Markers konnte mit einer sich gegenläufig wiederholenden Endsequenz und

der damit einhergehenden lokalen Sekundärstruktur ein mögliches Problem der Polymerase aufgedeckt werden. Dieses synthetische Stück war tatsächlich auch im BLAST gegen die NCBI-Datenbank nicht zu finden. Damit lässt sich eine Kontamination der Ausgangs-DNA als Ursache ausschließen. Es handelt sich vielmehr um eine vollkommene Fehlfunktion der Sigma-Amplifikation.

An anderen Stellen, zum Beispiel bei IS 24, konnten die Sequenzen Regionen anderer IS-Elemente zugeordnet werden. Dieses Phänomen der fragmentierten Sequenzen, die teils in einem nicht zum Primer passenden IS-Element binden, trat vor allem bei sehr hohen Konzentrationen von hitzebehandelter DNA auf. Aufgrund der Tatsache, dass der IS-Vorwärtsprimer an vom IS-Rückwärtsprimer weit entfernten Stellen auf dem Genom gebunden hat, ist eine Mutation im Bereich des IS-Vorwärtsprimers nicht auszuschließen. Allerdings kann der IS-Vorwärtsprimer auch dann richtig auf dem Genom binden, wenn kein IS-Element an dieser Stelle vorhanden ist. Er findet die potentiellen Insertionsstellen, an denen nicht notwendigerweise bereits eine Insertion stattgefunden haben muss. Erst wenn der IS-Rückwärtsprimer sich innerhalb von 3.000 bp Entfernung anlagert, entsteht bei idealen PCR-Bedingungen ein Produkt. Das erklärt allerdings noch nicht, warum eine Sequenz aus mehreren Fragmenten besteht, die mehrere 100.000 Basenpaare auseinanderliegen.

Wie oben bereits erwähnt, waren diese Phänomene besonders bei sehr hohen Ausgangskonzentrationen und bei hitzebehandelter, somit stark fragmentierter DNA zu finden. Betrachtet man den Mechanismus der OmniPlex<sup>®</sup>-Methode genauer, lässt sich eine mögliche Erklärung finden: Die während der Präparation der Amplifikationsbibliothek gebildeten Fragmente werden von der Polymerase mit gewolltem Mismatchpriming (universelle Primer lagern sich an das Template an) amplifiziert. Die Fragmente liegen hierbei wegen ihrer hohen Konzentration auf engstem Raum sehr nah beieinander. Somit ist es möglich, dass die Polymerase nach Amplifikation eines Stückes auf das am nächsten liegende Ende eines anderen Fragments überspringt, die Synthese fortsetzt und somit eine Chimäre (Mischsequenz) erzeugt (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14 :** Möglicher Mechanismus der Chimärenbildung bei der OmniPlex<sup>®</sup>-Methode; 1: Dicht beieinander liegende Fragmente der Amplifikationsbibliothek; 2: Polymerase (rot) beginnt Amplifikation; 3: Polymerase „springt“ auf benachbartes Fragment und fährt mit Amplifikation fort; 4: Entstandene Chimären

GenomiPhi<sup>®</sup> zeigte in den drei höchsten Ausgangskonzentrationen der klinischen Probe ebenfalls zusätzliche Banden, deren Größe auf die Produkte von den IS-Elementen IS 55 und IS 56 passte. Die Sequenzen waren im Gegensatz zur Sigma-Methode nur in einem Fall fragmentiert. In den anderen Fällen konnten sie der Region des IS-Elements zugeordnet werden, was bedeutet, dass es sich um echte Positive handelt.

REPLI-g<sup>®</sup> zeigte nur einmal eine zusätzliche Bande, die ebenfalls dem IS-Element 56 zugeordnet werden konnte, was mittels Sequenzanalyse bestätigt wurde.

Die beiden Elemente waren im unamplifizierten Ausgangsmaterial nicht nachweisbar, nach der Amplifikation konnten sie jedoch aufgefunden werden. Eine Kontamination der Ausgangsprobe als Ursache ist unwahrscheinlich, da sie nie offen mit anderen *Coxiella*-Proben, die das Element besitzen, in Berührung kam. Auch in dem Raum, in dem die Gelanalysen durchgeführt wurden, befand sich zeitgleich kein anderer Coxiellen-Stamm. Mit Hilfe der Sequenzierung wurde ausgeschlossen, dass eine mit dem IS-Element zufällig gleichgroße Chimäre vorlag. Denkbar wäre auch, dass es sich bei den Coxiellen in der Probe um eine Mischpopulation handelt. Das würde bedeuten, dass einige wenige Coxiellen die IS-Elemente besitzen, die Mehrzahl aber nicht. Nach Amplifikation sind nun diese Einzelexemplare für die PCR detektierbar



geworden. Somit würde die fehlende Bande in den anderen Reaktionen in Wirklichkeit ein falschnegatives Ergebnis darstellen und darauf hinweisen, dass eine bisher unentdeckte Mischpopulation vorliegt. In der MLVA weist die potentielle Mischpopulation keinen zusätzlichen Typ auf.

In Bezug auf die besonderen Eigenschaften der Insertionssequenzen lässt sich auch eine weitere Möglichkeit diskutieren: Es ist denkbar, dass durch die Amplifikationsreaktion die Transposase „angeregt“ wurde und in der Folge an die beiden Insertionsstellen ein *IS1111*-Element kopiert worden ist. Wie bereits erwähnt, ist allerdings über die der Insertion zugrundeliegenden Mechanismen zu wenig bekannt, um diese Theorie bestätigen zu können.

Weitere Zusatzbanden der beiden MDA-Methoden lagen vollkommen außerhalb der erwarteten Größen und spielten somit diagnostisch keine Rolle. Eine Sequenzierung dieser Banden ergab auch hier eine Chimärenbildung.

Die MDA-Methoden haben schon in der Vergangenheit Probleme mit unspezifischer Amplifikation von Primerdimeren oder von Kontaminationen, mit der Bildung von DNA-Chimären und mit Fehlern in der Repräsentation einzelner Genorte gezeigt (116). Die Literatur bietet einige Verbesserungsvorschläge, wie die Anwendung von modifizierten Puffern bei dem REPLI-g®-Kit von Qiagen (119) oder die Modifizierung der Hexamerprimer an, um den störenden Hintergrund zu reduzieren (107).

Lasken und Stockwell (120) haben die Entstehung solcher DNA-Chimären nach Anwendung der MDA-Methode genauer untersucht. Diese bilden sich durch initiale Vergrößerung der unspezifischen Primer, gefolgt von der Ablösung dieser 3'-Enden und Repriming auf einem zweiten Fragment am 5'-Ende, bevorzugt an Stellen, an denen sich kurze komplementäre Bereiche befinden. 85 % der Chimären bestehen aus zwei Segmenten, die in gegenläufiger Richtung verbunden sind (120). Zhang et al. haben gezeigt, dass mit MDA generierte Produkte in bis zu 50 % der Fälle Chimären als Einfügungen enthielten. Mithilfe einer umfangreichen enzymatischen Vorbehandlung des Amplifikats vor der Sequenzierung gelang es ihm, die Chimären um 80 % (von 50 % auf 6 %) zu reduzieren (121).

Lasken und Stockwell bestätigten außerdem, dass die Verwendung der S1-Nuklease, durch den Verdau während der MDA auftretender einzelsträngiger Regionen, die Bildung von Chimären bremsen kann (120). Einige dieser



Verbesserungsvorschläge wurden von den Herstellern in die heute verwendeten Kits eingearbeitet.

Die Schwächen der Kits sind vielfältig. Bei hohen Ausgangskonzentrationen entstehen Zusatzbanden und im Fall des Sigma-Kits sogar vollkommen synthetische Sequenzen. Bei den niedrigen Konzentrationen, bei denen eine Amplifikation gerade noch gelingt, produzieren sie Fehler, die sich in der MLVA zum Beispiel durch Ausfall von Markern oder im Falle der *IS1111*-Untersuchung durch Ausfälle von Banden bemerkbar machen (s. 3.1.2.2 und 3.1.2.3).

Zur Reduktion der Fehlerrate bei den niedrigen Konzentrationen bei MDA gibt es einige Vorschläge in der Literatur. Durch die sorgfältige Vermeidung von Kontaminationen mit Fremd-DNA gelang es Marcy et al. nur 0,36 – 1 % unspezifische Sequenzen zu produzieren (138). Wu et al. Stellten fest, dass bei der Amplifikation eines Bakterienmixes aus *Rhodopseudomonas*, *Shewanella* und *Nitrosomonas* zu gleichen Teilen die Unterschiede in den Fehlerraten der einzelnen Bakterien bei geringen Konzentrationen niedriger waren als bei höheren (119). Die durchschnittliche Fehlerrate in der Genrepräsentation insgesamt war viel höher (1,5 – 6 x) als bei nur einer eingesetzten Spezies. Wie beschrieben, handelte es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben ebenfalls entweder um klinisches Material oder um Zellkulturüberstand und damit in keinem Fall um reine Coxiellen-DNA, sondern um Mischproben mit anderen Zellpopulationen. Das könnte ein weiterer Faktor sein, warum die Amplifikate mit geringster Ausgangskonzentration die meisten Fehler aufweisen.

Mit dem erwähnten modifizierten Puffer, bei dem Einzelstrangbindeprotein und Spermidin von *E.coli* zugefügt wurden, konnten Wu et al. die Sensitivität der Reaktion an einer Verdünnungsreihe von genomischer DNA von einer Spezies auf das Zehnfache steigern (119). Die Fehlerraten waren im Schnitt bei 1 fg Einsatz allerdings mehr als dreimal so hoch wie bei 10 fg eingesetzter DNA. Bei 10 fg und 100 fg Einsatz waren die Fehlerraten auch mit Einsatz des modifizierten Puffers gleich, aber doppelt so hoch wie bei 1 ng. Ob dieser Puffer oder ähnliche Substanzen in die aktuellen Kits integriert wurden, um so für eine optimale Amplifikation zu sorgen, obliegt der Geheimhaltung der Hersteller.

Die höchste hier eingesetzte Konzentration lag bei 200.000 fg/µl (0,2 ng) Ausgangswert, die niedrigste bei nur 20 fg/µl (0,00002 ng) und damit immer noch im Mittelfeld von Wus Untersuchung. Die niedrige Ausgangskonzentration kombiniert mit der Unreinheit des Materials sind mit hoher Wahrscheinlichkeit für die schlechte Qualität der Amplifikate verantwortlich. Leider sind gerade diese Proben, die nur sehr wenig DNA enthalten, am interessantesten für die WGA-Anwendungen. Die Idee, mit WGA eine klinische, sehr gering konzentrierte Probe hochzuamplifizieren, um eine Typisierung des Materials zu ermöglichen, hat sich bei den Untersuchungen mit *Coxiella burnetii* als nicht erfolgreich erwiesen. In den entsprechenden Proben muss mindestens ein DNA-Gehalt von 100 Kopien/µl (entspricht 200 fg) enthalten sein. Neue Systeme, wie zum Beispiel das PicoPlex™ WGA-Kit (Rubicon Genomics, USA) zur Gesamtgenom-Amplifizierung aus einzelnen Zellen, sollen für die Amplifizierung geringster DNA-Mengen geeignet sein. Diese einzelnen Zellen müssen eine hohe Qualität aufweisen. Bereits in der Präparation, beim Waschen der Zellen, muss jede Kontamination zum Beispiel mit Magnesium, Calcium oder Pufferrückständen vermieden werden. Auch Rückstände von Färbungen oder Paraffin können Probleme bereiten. Die Zellen müssen aufgereinigt sein und einzeln vorliegen. Für die direkte Anwendung an klinischem Material ist dieses System demnach wahrscheinlich auch nicht geeignet, was aber überprüft werden müsste. Für die Amplifizierung von in Zellkultur angezüchteten Coxiellen könnte das Kit allerdings eine Alternative zu den hier untersuchten Methoden bieten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass WGA grundsätzlich für Diagnostik und Typisierung von *Coxiella burnetii* geeignet ist, wenn einige Aspekte beachtet werden. Für einen forensischen Ansatz und den direkten Einsatz an klinischem (nicht hitzebehandeltem) Material ist nach den hier vorliegenden Ergebnissen das REPLI-g® Kit am besten geeignet. Bis einschließlich zu einer Ausgangskonzentration von 100 Kopien/µl ermöglicht es eine einwandfreie und fast fehlerlose Genotypisierung der Amplifikate. GenomiPhi® produzierte in der MLVA bei 100 Kopien bereits Fehler und erzeugte in der IS1111-Analyse auch mehr Falschpositive als REPLI-g®. Das Sigma-Kit ist für klinische Proben, die Gesamtgenom-sequenziert oder auch typisiert werden sollen, ungeeignet. Fehler treten unabhängig von der eingesetzten DNA-Konzentration und im Besonderen bei den höchsten Ausgangskonzentrationen auf.

Je nach Aufbereitung der DNA ist weiter zu beachten: Bei fragmentierter DNA mit Längen  $< 2$  kb ist REPLI-g® ungeeignet. GenomiPhi® liefert hier hingegen ab einer ausreichend hohen Ausgangskonzentration von mindestens  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l (entspricht 2000 fg) gute Ergebnisse. Es produziert weniger Fehler als das Sigma-Kit und erreicht eine zufriedenstellende Steigerung der Kopienzahl/ $\mu$ l. GenomePlex® mit und auch ohne Reamplifikation ist für Anwendungen geeignet, die z.B. im Rahmen der Diagnostik von extrem niedrig konzentriertem Ausgangsmaterial eine Genzielregion zur Identifikation bestimmen. Dies trifft unabhängig von der Präparationsmethode der DNA (hitzebehandelter bzw. nicht hitzebehandelter DNA) zu. Zur Typisierung sollte man eines der anderen Kits bevorzugen. Für das ebenfalls betrachtete FFPE-Kit stellt die in der Probe vorhandene Fremd-DNA aus der Zellkultur ein Problem dar. Die Möglichkeiten der zellfreien Anzucht sollten weiter untersucht werden, um dieses System eventuell für die fragmentierte DNA nutzbar zu machen

In Bezug auf die alltägliche Anwendung ist der Nutzen dennoch zweifelhaft, da die verwendeten Typisierungsmethoden, MLVA und *IS1111*-Analyse, in einem Maße sensitiv sind (ca. 1000 Kopien pro Ansatz), dass eine Amplifikation der meisten Proben nicht nötig ist. Die insgesamt 42 % der niedriger konzentrierten Proben vom Oberen Lindenhof konnten dennoch nicht typisiert werden, da die Technik in diesen niedrig konzentrierten Bereichen ( $< 100$  Kopien/ $\mu$ l) nicht adäquat funktioniert. Lediglich zum Aufstocken der Menge höher konzentrierter klinischer Proben erscheint eine Verwendung praktikabel. Dies ist auch im Hinblick auf die immer mehr an Bedeutung gewinnende Gesamtgenom-Sequenzierung relevant. Hier könnte klinisches Material auf  $10^7 - 10^8$  Kopien/ $\mu$ l gesteigert und dadurch eine Genomanalyse ermöglicht werden.

## **4.2 Herdenuntersuchung Oberer Lindenhof**

### **4.2.1 Typisierungsmethoden**

Die Herdenuntersuchung (147 Proben) ergab von Mai 2009 bis Dezember 2011 in der MLVA zwei, in der *IS1111*-Analyse sieben und in Kombination der beiden Methoden acht verschiedene Genotypen.

Die verwendeten Typisierungsmethoden MLVA- und *IS1111*-Analyse sind sensitiv (bis zu einer Mindestkonzentration von 1.000 Kopien/ $\mu$ l einwandfrei) und verfügen über

eine hohe Diskriminierungsrate. Sie wurden in der vorliegenden Studie mit aufgereinigtem, klinischem Material ohne vorherige Anzucht durchgeführt. Damit sind Verfälschungen, die *in vitro* durch das etwaig bevorzugte Wachstum eines Klons entstehen können, ausgeschlossen. Die Ergebnisse spiegeln somit das klonale Muster wieder, das konkret in der Herde vorhanden ist.

Im Unterschied zu ähnlichen früheren Untersuchungen in den Niederlanden, wo nur drei bzw. zehn Marker hinzugezogen wurden (83, 84), umfasste die hier durchgeführte Analyse fünfzehn Marker. Wie Le Fleche et al. bemerkten, sorgt dies für eine beträchtliche Erhöhung der Diskriminierungsfähigkeit der Methode (139). Wären die hier vorliegenden Proben mit den drei MLVA-Markern von Klaassen et al. 2009 oder den zehn von Roest et al. 2011 untersucht worden, so wäre nur eine Differenzierung in zwei MLVA-Typen (dank des Markers ms34) möglich gewesen. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie die MLVA mit der *IS1111*-Analyse kombiniert. Die zwei MLVA-Genotypen ließen sich so weiter unterteilen, was beweist, dass eine kombinierte Anwendung im Vergleich zum solitären Einsatz ein differenzierteres Typisierungsergebnis liefern kann.

Eine Erklärung für die höhere Differenzierung ist, dass die *IS1111*-Analyse 52 Marker umfasst, während die MLVA nur fünfzehn Bereiche betrachtet.

Eine weitere mögliche Ursache ist im Aufbau und den Eigenschaften der Strukturen zu sehen. Während die *tandem repeats* aus kurzen Sequenzen bestehen, die sich für jeden Stamm spezifisch in unterschiedlicher Anzahl an bestimmten Stellen im Genom wiederholen, ist das *IS1111*-Element selbst hoch konserviert. Es kann im Genom an sogenannten Insertionsstellen eingebaut werden. Im Genom des Nine Mile zum Beispiel sind fünfzig dieser Insertionsstellen gefunden worden. Diese Stellen sind prädestiniert für Veränderungen im Genom. Während eine solche Transposition zirka alle 10 Millionen Zellteilungen passiert, wird im Chromosom von einer Mutationsrate von  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$  pro Zellteilung ausgegangen (140). Dies ist ein Zeichen für die höhere Variabilität dieser Regionen. Allerdings ist der genaue Mechanismus, wann und warum es zu den Insertionen kommt, bisher nicht bekannt. Bei den *tandem repeats* differiert die Mutationsrate stark, je nach Länge des Markers. Aufgrund dessen lässt sich auch schwer abschätzen, bei welcher Methode die größere Varianz zu erwarten ist.

Neunundachtzig % der hier untersuchten IS-Elemente sind stabil. Die restlichen 11 % stellen die variablen, das heißt aktiven IS-Elemente dar.

Der genaue Mechanismus, wie und wann es zu einer Insertion oder Deletion kommt, ist nicht bekannt. Denkbar wäre, dass es im Gegensatz zu den Ausführungen von Denison et al. 2007 (90) keine Deletions-, sondern nur Insertionsereignisse gibt. Das würde bedeuten, dass die Proben mit weniger IS-Elementen phylogenetisch älter sind als solche mit mehr Elementen. Der hier vorherrschende Typ könnte also aus einem der Typen mit weniger Elementen hervorgegangen sein. Sollte das der Fall sein, würden sich die *IS1111*-Elemente als Phylogeniemarkers eignen. Für diese Theorie gibt es im Genom allerdings keine Beweise und weitere Untersuchungen müssen folgen.

Die neu entwickelten Multiplexe 7 – 10 stellen mit 38 % mehr als ein Drittel der untersuchten Marker. Aber nur in einem Fall konnten sie die Einteilung der Gruppen beeinflussen. 95 % der verwendeten zwanzig Elemente waren stabil. Die vier *IS1111*-Typen, die durch die Multiplexe 1 – 6 eingeteilt wurden, konnten dank der zusätzlichen Analyse weiter differenziert werden, so dass sechs unterschiedliche Gruppen entstanden. Die Einbeziehung der zusätzlichen IS-Elemente und damit der vier zusätzlichen Multiplexe war im Hinblick auf die erwartete nahe Verwandtschaft der Subtypen in einer Population für eine differenzierende Typisierung dennoch sinnvoll. Allgemein ist die Diskriminierungsrate höher, je mehr Elemente untersucht werden, allerdings muss auch der Zeit- und Materialfaktor zu deren Nutzenabwägung mit einbezogen werden. In dem konkret vorliegenden Fall war der Gewinn an Information relativ gering. Da allerdings die IS-Elemente in jedem *Coxiella*-Stamm individuell verteilt sind, müssen, um eine tragfähige Aussage über die Diskriminierungsrate der Multiplexe 7 – 10 treffen zu können, weitere Stämme untersucht werden.

Auch in der MLVA wurden zwei Genotypen gefunden, die sich in zwei Markern (ms26 und ms34) unterscheiden. Dieser MLVA-Klon tauchte im Herbst 2009 einmalig auf und wurde in keiner anderen Probe beobachtet. Dafür gibt es verschiedene mögliche Ursachen. Der Klon könnte einen anderen Ursprung haben als der vorherrschende Typ oder er hat die größte Entwicklung durchgemacht. Dafür spricht, dass diese Probe auch in der *IS1111*-Analyse einer eigenen Gruppe angehört (Gruppe 6). Beim

Vergleich mit der Stammsammlung konnte der MLVA-Typ vier verschiedenen Stämmen zugeordnet werden, unter anderem einem humanen Stamm, der 1946 in Griechenland isoliert wurde und einem weiteren, ebenfalls humanen Stamm aus Rumänien. Allerdings stimmte der *IS1111*-Typ nicht überein. Eine mögliche Erklärung für diese Übereinstimmung könnten die Zukäufe bzw. die geliehenen Deckböcke sein. Dagegen spricht, dass diese ausschließlich von regionalen Züchtern aus Baden-Württemberg kamen und vor der Ankunft mittels PCR und ELISA negativ auf Q-Fieber getestet wurden. Hier lässt sich keine Verbindung zu Rumänien oder Griechenland ziehen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Kontamination der Probe mit einem Stamm der Stammsammlung. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da die Proben nie gemeinsam in einem Raum aufbewahrt oder bearbeitet wurden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass es sich um eine zufällige Übereinstimmung handelt, da der *IS1111*-Typ nicht identisch ist, und der MLVA-Typ dem vorherrschenden sehr stark ähnelt.

Trotz der teils widrigen äußeren Umstände wie Wirtswechsel und Bekämpfungsmaßnahmen (Antibiose, Impfung und Keulung) und trotz der hoch differenzierenden Methoden konnte ein vorherrschender Klon identifiziert werden. Die zusätzlich gefundenen genotypischen Varianzen deuten auf mikroevolutionäre Veränderungen der Erregerpopulation hin. Was der Nutzen für den Erreger selbst ist, bleibt ungewiss. Bisweilen ist es nur ein messbares Anzeichen der ständigen Weiterentwicklung der Coxiellen innerhalb einer infizierten Herde, was in den Niederlanden durch verschiedene Autoren beschrieben wurde (83, 84, 141). Auch im vorliegenden Fall handelt es sich also eher um einen dominanten Klon mit vielen Mikrovarianten.

#### **4.2.2 Zusammenhang mit dem Phänotyp**

Auf dem Hof lebten zu Beginn des Ausbruchs im Mai 2009 Schafe und Ziegen. Sowohl in der ersten, als auch in der zweiten Lampperiode im Herbst 2009 wurden von beiden Spezies Proben genommen. Nach Keulung der Ziegen im September 2009 konnten in den folgenden Probenentnahmeintervallen nur noch Schafe untersucht werden. Insgesamt wiesen 83 % der Proben den vorherrschenden Klon auf, 77 % der Schafe und 84 % der Ziegen. Die Korrelation zwischen Wirtsspezies und gefundenem Genotyp ergab zwei Genotypen nur bei den Schafen, drei

Mischtypen, während drei ausschließlich bei den Ziegen vorkamen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es sich bei den vorkommenden Typen um Ziegen bevorzugende Stämme handelt, die sich erst später an Schafe angepasst haben. Diese Annahme wird gestützt durch die zu Beginn der Probennahme bei den Ziegen ausgeprägtere Klinik und Seroprävalenz (123). Dagegen spricht, dass der vorherrschende Genotyp I – 2 auch bei den Schafen den dominanten Klon darstellt. Außerdem stellt der geringere Umfang der Schafproben (22 Schaf- gegenüber 121 Ziegenproben), neun davon von Mai 2009, einen Unsicherheitsfaktor dar.

Es lässt sich nicht rekonstruieren, ob die Schafe oder die Ziegen zuerst betroffen waren und damit bleibt ungewiss, ob es sich um einen tatsächlichen Wirtswechsel des Erregers oder um eine zu geringe Beprobung des Schafbestands handelt. Auch eine evolutionäre Zuordnung der einzelnen aufgetretenen Schaf- bzw. Ziegenbevorzugenden Genotypen ist aufgrund der Probensituation erschwert. Die höhere Varianz der Genotypen konnte bei den Ziegen beobachtet werden. Allerdings ist diese Tatsache wegen der geringen Anzahl der Schafproben kritisch zu beurteilen.

Das Probenmaterial betreffend lässt sich ebenfalls keine eindeutige Korrelation feststellen. Die Milchproben der ersten Lammperiode unterteilen sich in drei verschiedene Genotypen und die der zweiten Lammperiode in zwei, wobei hier der Genotyp I – 4 der vorherrschende war. Es lässt sich diskutieren, ob der in der Milch vorherrschende Klon besser an das Euter angepasst ist als der sonst vorherrschende Typ I – 2. Bei Milchkühen wurden Untersuchungen zur genotypischen Epidemiologie von *Staphylococcus aureus* durchgeführt, wobei ebenfalls unterschiedliche Genotypen in Hautläsionen und im Euter gefunden werden konnten. Dies ließ darauf schließen, dass manche Genotypen besser an das Euter angepasst sind als andere (142). Allerdings müsste der Probenumfang der Milchproben erhöht werden, um diese Theorie für *Coxiella burnetii* zu bestätigen.

Interessant ist auch, ob in einem einzigen Tier zwei verschiedene Genotypen gefunden werden konnten. Tatsächlich ist dies im Falle eines Schafs gelungen (s. 3.3.3 *IS1111-Verteilung*). Es lagen Kot-, Woll-, Milch- und Vaginaltupferproben vor, von einem zweiten eine Milch- und eine Umgebungsprobe. Kot und Wolle des ersten Schafs wiesen denselben Genotyp auf, während Milch und Vaginaltupfer je einer eigenen Gruppe angehörten. Eine mögliche Ursache könnte in den unterschiedlichen Probeentnahmezeitpunkten zu sehen sein. Die Abstände betragen



zwischen zehn und achtzehn Tagen. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die Coxiellen sich innerhalb dieser kurzen Zeit zweimal so verändern. Wahrscheinlicher ist, dass, wie zum Beispiel auch bei Yersinien-Infektionen beim Schwein in Kot und Tonsillen (143), in einem Tier gleichzeitig mehrere Genotypen des Erregers vorkommen können und so über die Milch ein anderer Genotyp ausgeschieden wird als über den Kot. Es wäre denkbar, dass der Erreger im Reproduktionstrakt einem anderen Selektionsdruck unterliegt als beispielsweise im Darm. Die Tatsache, dass Wolle und Kot den gleichen Genotyp aufweisen, lässt sich durch eine mögliche Kontamination der Wolle mit dem Kot des Tieres erklären. Die Proben des zweiten Schafs wurden im Abstand von sechzehn Monaten genommen. Sie wiesen den gleichen Genotyp auf und konnten dem vorherrschenden Typ 1 – 2 zugeordnet werden.

Die vorliegende Untersuchung bestätigt, dass eine Herdentypisierung mittels Vaginaltupferproben möglich ist. Fünf der acht Genotypen konnten in Vaginaltupfern nachgewiesen werden. Die restlichen drei Typen kamen je nur einmal in Kot, Milch und in einem Nasentupfer vor.

Diese Art der Beprobung ist, im Vergleich zur Blutentnahme, deutlich leichter durchzuführen. Das heißt, der Zeit- und Materialaufwand und damit nicht zuletzt die finanzielle Belastung des Besitzers für die Probenentnahme und -aufbereitung sind geringer, was sich zusätzlich positiv auf die Mitarbeit des Bauern bzw. des Schäfers auswirken kann.

Die Beprobung erfolgte kontinuierlich über zwei Jahre, wobei in der vorliegenden Studie 145 positive Proben von Mai und Herbst 2009, eine aus 2010 und eine aus 2011 untersucht wurden (s. Abbildung 3 und Tabelle 3). Die daraus generierten Ergebnisse wurden, soweit möglich, in einen zeitlichen Zusammenhang gebracht, sodass die Entwicklung der Genotypen beurteilt werden sollte. Möglicherweise dem geringen Probenumfang geschuldet ließ sich allerdings keine Korrelation feststellen. Im Herbst kamen im Vergleich zur ersten Lampperiode zwei Genotypen dazu, die sich allerdings in den Proben der folgenden Jahre nicht wiederfanden. Das ist kein unerwartetes Ergebnis, da der Probenumfang 2010 und 2011 je nur eine Probe umfasste und deshalb eine Aussage über den dort vorherrschenden Klon schwierig bzw. nicht möglich ist. Dennoch lässt sich feststellen, dass der vorherrschende Klon



des ersten Probenentnahmeintervalls auch in der zweiten Lampperiode den dominanten Typ darstellte und auch in der Probe von 2010 nachgewiesen werden konnte. Das bedeutet, dass der dominante Klon trotz des Verlustes des vermeintlichen Hauptwirtes persistierte und sich von ihm im Laufe der Zeit verschiedene Mikrovarianten abspalteten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 2009 zunächst ein Ausbruchsgeschehen mit entsprechender Symptomatik bei Mensch und Tier vorlag, einhergehend mit einer hohen Erregerlast. Die Ziegen waren hierbei klinisch mehr betroffen als die Schafe.

In den auf die erste Lampperiode folgenden Monaten wurden Maßnahmen, wie Einzeltierbehandlung, Impfung und im September Keulung der Ziegen, getroffen. Die Auswirkungen dieser Maßnahmen machten sich durch eine deutlich geringer ausgeprägte Klinik, wie keine Neuinfektionen, keine Aborte und keine lebensschwachen Nachkommen, bemerkbar. Allerdings bestand weiterhin eine Erregerpersistenz, die an positiven Proben nachweisbar war. Hier war aber die Anzahl der reaktiven Proben und die Höhe der Erregerlast deutlich geringer (62).

An dieser Stelle wird die Bedeutung der Überwachung von dauerhaft infizierten Populationen offensichtlich. Trotz der Behandlung, Impfung und Keulung reaktiver Tiere persistierte der Erreger in in der Herde weiterhin. Eine permanente Kontrolle gewährleistet eine erfolgreiche Bekämpfung. Bleibt ein positives, ungeimpftes Ausscheidertier im Bestand, so ist eine Reinfektion der restlichen oder auch Neuinfektion von naiven Zukäufen wahrscheinlich.

Der Rückgang der Humaninfektionen ist aufgrund der nachweislich geringeren Ausscheidung des Erregers nach Impfung (62, 144) höchstwahrscheinlich auf die eingeleiteten Maßnahmen zurückzuführen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Menschen bereits in der ersten Lampperiode serokonvertierten und somit in den folgenden Monaten immun waren. Nicht auszuschließen ist allerdings auch, dass es sich in der zweiten Lampperiode beziehungsweise in den folgenden Jahren um einen weniger virulenten Klon handelte, wobei die Virulenz durch Mikrovariationen abgenommen haben könnte. Dagegen spricht allerdings, dass der dominante Subtyp mit dem vorherrschenden Klon der ersten Lampperiode identisch ist. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass sich innerhalb des Klons und seiner Virulenzfaktoren nicht detektierbare Veränderungen abgespielt haben. Zwar erscheint der Klon nach

der Genotypisierung gleich, aber um alle genomischen Veränderungen zu erfassen, wäre eine Gesamtgenom-Sequenzierung notwendig.

### 4.2.3 Vergleich mit anderen Erregern und Epidemiologie

Untersuchungen an anderen Erregern bestätigen das Ergebnis, dass in einer infizierten Herde häufig eine Mischpopulation von mehreren Genotypen eines Erregers zu finden ist. Die Ursachen dafür sind nicht bekannt. Eine mögliche Begründung lieferte Fernandez, der *Mykobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in der Rinderpopulation in Rheinland-Pfalz untersuchte. Er identifizierte zwei vorherrschende Genotypen und postulierte, dass die Varianten ursächlich dafür seien, dass die Stämme effektiver übertragen werden oder mehr Tiere erkranken (145). Der hier vorherrschende *Coxiella*-Klon scheint in der Lage zu sein, Ziegen und Schafe effektiv erkranken zu lassen und auch Menschen zu infizieren, jedoch scheinen die Schafe in geringerem Umfang betroffen zu sein. Wie bereits erwähnt müsste der Probenumfang der Schafproben erhöht werden, um hierüber eine genauere Aussage treffen zu können.

Prinzipiell ist es nicht auszuschließen, dass die gefundenen Klone besser übertragbar und virulenter sind als andere. Allerdings ist die Frage, warum genau dieser Klon oder eben diese Variante genau zu diesem Zeitpunkt eine Herde erkranken lässt, noch unbeantwortet. Die vorgefundenen Mikrovarianten deuten darauf hin, dass der Erreger einem kontinuierlichen Wandel unterliegt. Besonders die mobilen Elemente (*IS1111*) sorgen für eine hohe Varianz zwischen den einzelnen Klonen. Aufgrund der bis heute nicht bekannten Virulenzfaktoren der Coxiellen, ist diese phänotypische Überlegung molekularbiologisch nicht sicher nachweisbar.

Der im vorliegenden Fall vorherrschende Klon (Genotyp I – 2) ließ sich in Bezug auf das MLVA-Ergebnis einem bekannten, hauptsächlich in Süddeutschland nachgewiesenen Typ zuordnen (s. 3.6 Phylogenie und Vergleich mit Stammsammlung). Von den 24 diesem MLVA-Typ zugehörigen und in der Stammsammlung vorhandenen Isolaten stimmte einer auch in der *IS1111*-Untersuchung mit dem am Oberen Lindenhof vorherrschenden Genotyp überein (Nr. 2595; Schaf; Abortmaterial; 1999; Niedersachsen). Roest et al. (84) vermuteten in den Niederlanden das Auftreten eines eventuell virulenteren Klons als Abortauslöser, wobei sie die Einzigartigkeit des Subtyps als Ursache für das Ausmaß

des Ausbruchs ansahen. Der hier vorliegende Klon und einige von ihm ableitbare Mikrovarianten wurden seit 1998 regelmäßig, über ganz Süddeutschland verteilt, in Schafen, Ziegen, Rindern bei Ausbrüchen und in Zecken nachgewiesen. Vorbehaltlich der Limitationen von Genotypisierungsverfahren kann es somit als bewiesen gelten, dass es sich bei dem dominanten Klon am Oberen Lindenhof nicht um einen einzigartigen Subtyp handelt. Um eine genaue Unterscheidung der Typen zu ermöglichen und kleinste Varianzen zu detektieren, müsste eine Gesamtgenom-Sequenzierung durchgeführt werden.

Das frühere Auftreten des Klons unterstützt die Theorie von Tilburg et al. (141), die ebenfalls postulierten, dass es sich in den Niederlanden um einen einzelnen eingeführten Klon handelte, der sich über die Zeit graduell verändert und sich über das Land ausgebreitet hat. Betrachtet man die Spur des hier vorliegenden Klons, so lässt er sich bis ins Jahr 1998, wo er das erste Mal bei einem Rind in Baden-Württemberg isoliert wurde, zurückverfolgen. Die danach folgenden Isolate stammen aus ganz Süddeutschland und vereinzelt aus Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen. Die geringen Unterschiede, die nur in der *IS1111*-Analyse sichtbar wurden, sprechen für das Vorliegen von Mikrovarianten eines Ursprungsklons, der sich, wie Tilburg sagt, graduell verändert und über das ganze Land verbreitet hat. Der hier vorliegende Subtyp könnte sich also soweit verändert haben, dass er bei Kontakt mit der Ziegen- bzw. Schafherde einen Ausbruch verursachen konnte. Ähnliches bemerkten auch Roest et al. (84). Sie vermuteten zwischen den Ziegen in den Niederlanden eine Art „mikrobielle Verwandtschaft“, was bedeutet, dass der Klon schon da war, bevor der Ausbruch begann und erst durch bestimmte externe Umstände und/oder Veränderungen im Erreger zum Ausbruch führte (84). Im Falle des Oberen Lindenhofs wird vermutet, dass ein Auszubildender mit seinem Hund den Erreger mitgebracht hat, da, wie später bekannt wurde, deren Heimathof 2008 einen bestätigten Q-Fieber-Ausbruch zu verzeichnen hatte (123). Allerdings gibt es für diese Theorie keine Untersuchungen und keine Beweise, da weder von dem Hund, noch von dem Auszubildenden Proben untersucht wurden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Tiere sich beim Weidegang durch Zeckenstiche infiziert haben. Allerdings wurden in der gesamten Beprobungsphase weder auf Schafen noch auf Hunden noch in der Vegetation Zecken gefunden, die man hätte untersuchen können. Aus diesem Grund liegen über etwaige Zeckeninfektionen keine Daten vor. Die Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr enthält jedoch

zwei Stämme aus Zeckensammelproben aus Baden-Württemberg, die in der MLVA mit dem vorherrschenden Klon vom Oberen Lindenhof übereinstimmen. Ob das aber ein Hinweis darauf ist, dass die Zecken als Infektionsquelle oder als Zeugnis für die Durchseuchung der Populationen in Süddeutschland infrage kommen, ist spekulativ. Letzteres ist aufgrund der hohen Ausbruchsdichte in Süddeutschland nicht unwahrscheinlich. Die Ausbreitung der Infektion unter den Tieren und die Übertragung des Erregers von den Ziegen auf die Schafe oder gegebenenfalls umgekehrt, scheint auf deren räumliche Nähe zueinander zurückzuführen zu sein. Außerdem weideten beide Herden auf derselben Weide und wurden von denselben Pflegern, die selbst auch serokonvertierten, betreut. Ähnliches vermuteten Roest et al. (29), die die große Dichte an Ziegenfarmen und auch das Wachstum der Milchziegenindustrie für das Ausmaß des Q-Fieber-Ausbruchs in den Niederlanden verantwortlich machten.

Die große Variabilität des Erregers kann Folgen für die Präventions- und Bekämpfungsmaßnahmen haben. Bei Untersuchungen mit anderen Erregern und hochinfektiösen Erkrankungen wurde auf diese Problematik hingewiesen. Fulton et al. (146) stellten z.B. bei ihren Untersuchungen zu Boviner Virusdiarrhö fest, dass die genetische und antigenetische Vielfalt die Bekämpfung der Krankheit erschweren. In dem speziellen Fall fanden sich gleichzeitig zwei Genotypen in einer Herde. Fulton et al. begründeten ihre Beobachtungen damit, dass der vorhandene Impfstoff nur einen der beiden Genotypen abdeckt (146). Fernandez et al. 2012 beforschten die Paratuberkulose des Rindes und schlugen vor, aus dem in einer Herde vorherrschenden Klon einen herdenspezifischen Impfstoff zu generieren und so die genetische Diversität für sich zu nutzen (145). Im Fall der Paratuberkulose scheint das Verwenden von lokalbasierten Impfstoffen effizient zu sein. Im Fall von Q-Fieber hat die Impfung mit Coxevac (inaktivierter Nine Mile Phase I) erst vor einem Jahr begonnen und ihre Wirkung ist bislang in freien Rinder- und Ziegenbetrieben als zufriedenstellend beurteilt worden. Der Impfstoff verhindert nicht die Erkrankung, sorgt aber für eine Reduktion der Ausscheidung (144). Auch am Oberen Lindenhof konnte das beobachtet werden (62), obwohl er an Schafen und während der Trächtigkeit angewandt wurde, für die er nicht zugelassen ist. Beim Ausbruch in den Niederlanden konnte die Impfung der Ziegen zu Beginn die weiteren humanen Neuinfektionen nicht aufhalten, was aber nicht zuletzt eher der großen Zahl an infizierten Tieren und dem damit hohen Infektionsdruck zu schulden ist. Mittlerweile

aber ist es zu einer deutlich verringerten Inzidenz in den betroffenen Provinzen gekommen. Es bleibt fraglich, ob eine lokalbasierte Impfung auch in einem Ausbruchsgeschehen dieses Ausmaßes in einer Population besser angeschlagen hätte. Aufgrund der verschiedenen Genotypen, der großen Unterschiede zum Nine Mile und des geringen Wissens um die Virulenzfaktoren der Coxiellen sollten weitere Untersuchungen in Richtung eines lokalbasierten Impfstoffes folgen.

Zum ersten Mal konnte hier ein Einblick in die Herdendynamik von *Coxiella burnetii* in Bezug auf das Auftreten, den Nachweis und die genotypische Varianz über einen definierten Zeitraum gewonnen werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Coxiellen, ähnlich wie andere Krankheitserreger, im Ausbruchsgeschehen einen vorherrschenden Klon einschließlich abgeleiteter Mikrovarianten zeigen, der aber auch persistieren kann. Somit spielen nicht nur erregerbezogene sondern auch ggf. variable wirtassoziierte Faktoren eine wichtige Rolle im Infektionsgeschehen. Die große Variabilität des Genoms ist in vielen Fällen Grundlage und Ursache für den epidemiologischen Erfolg eines Erregers. Die häufig zu beobachtenden Resistenzbildungen gegen Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin bestätigen diese Aussage.

Weiterführende Untersuchungen zur Entwicklung von lokalbasierten Impfstoffen erscheinen, vor allem aufgrund der Vielzahl der gefundenen Genotypen, der großen Unterschiede zum Nine Mile und der weitgehend noch unbekanntem Virulenzfaktoren, notwendig.

## II. Zusammenfassung

*Coxiella burnetii*, der Erreger der Zoonose Q-Fieber, wird im Normalfall serologisch diagnostiziert. Die PCR-Untersuchung ermöglicht nicht nur den Nachweis einer akuten Infektion in der frühen Phase der Erkrankung, sondern wird auch zur Überwachung und Kontrolle subklinisch infizierter Herden kleiner und großer Wiederkäuer verwendet. Aufgrund der häufig sehr geringen DNA-Menge in klinischem Material ist der Nachweis von *Coxiella burnetii* oft eine Herausforderung. Auch die Typisierung gestaltet sich wegen der geringen Ausgangs-DNA-Menge schwierig, da die Methoden eine gewisse Anfangskonzentration verlangen, um adäquate Ergebnisse zu generieren. Seit einiger Zeit wird die Gesamtgenom-Amplifizierung als mögliche Lösung des Problems der zu geringen DNA-Menge diskutiert.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene WGA-Kits auf ihre Nutzbarkeit und Eignung für die Typisierung einer Verdünnungsreihe einer klinischen Probe von einer infizierten Ziege und des Referenzstammes Nine Mile untersucht. Es handelte sich um zwei MDA-Kits, REPLI-g<sup>®</sup> von Qiagen und GenomiPhi<sup>®</sup> V2 von GE-Healthcare, sowie eine OmniPlex<sup>®</sup>-Library-Variante, GenomePlex<sup>®</sup> mit Reamplifikation von Sigma. Die Amplifikate wurden mit verschiedenen Genotypisierungsmethoden, wie real-time-PCR der *adaA*-Region, Bestimmung des Plasmidtyps, MLVA und *IS1111*-Analyse, untersucht. Anschließend wurden die PCR-Produkte sequenziert, um etwaige Basenpaar-Abweichungen zu identifizieren.

Bei der fragmentierten DNA des Referenzstammes Nine Mile konnte REPLI-g<sup>®</sup> keine Steigerung der Konzentration bewirken, während GenomiPhi<sup>®</sup> ab einer Ausgangskonzentration von 1.000 Kopien/µl gute Ergebnisse lieferte. Im Gegensatz dazu funktionierten beide Techniken mit der klinischen Probe einwandfrei. Nur die OmniPlex<sup>®</sup>-Library-Methode konnte beide Proben adäquat amplifizieren. Allerdings deckten sich diese Ergebnisse nicht mit denen der qualitativen Untersuchung. REPLI-g<sup>®</sup> gelang eine akkurate Amplifikation der klinischen Probe ab einer Ausgangskonzentration von 100 Kopien/µl und schnitt damit am besten ab. GenomiPhi<sup>®</sup> war nur eine Zehnerpotenz weniger effektiv und lieferte ebenfalls gute Ergebnisse. Die OmniPlex<sup>®</sup>-Library-Methode zeigte große Probleme mit der Amplifikation der repetitiven DNA-Elemente, was durch konzentrationsunabhängig fehlende MLVA-Marker deutlich wurde.

WGA ist prinzipiell für den Einsatz in der *Coxiella*-Diagnostik und der Genotypisierung geeignet, wenn bestimmte Faktoren beachtet werden. Verwendet man fragmentierte DNA mit einer Länge von < 2 kb, so ist eine Anwendung von REPLI-g® obsolet, während GenomiPhi® ab 1.000 Kopien/µl Ausgangskonzentration gut funktioniert. GenomePlex® war für die Amplifikation der fragmentierten DNA ebenfalls gut geeignet, wobei dieses Kit ein großes Fehlerpotential aufwies. Damit ist es zwar zur Verbesserung der Sensitivität der diagnostischen PCR sehr gut, zur Typisierung allerdings nicht geeignet, da es mit den bei *Coxiella burnetii* häufig vorkommenden repetitiven Elementen große Probleme hatte. Auch für eine Gesamtgenom-Sequenzierung kommt dieses Kit den vorliegenden Ergebnissen zu Folge nicht infrage. Nicht fragmentierte DNA betreffend, stellt REPLI-g® das Kit der Wahl dar.

Im Anschluss wurde die genotypische Dynamik von *Coxiella burnetii* in einer dauerhaft Q-Fieber-positiven Herde kleiner Wiederkäuer, die über einen Zeitraum von zwei Jahren kontinuierlich beprobt wurde, untersucht. Hierzu wurden die bei der WGA genannten Genotypisierungsverfahren ("housekeeping"-Gene, MLVA, IS1111-Analyse) genutzt.

Es bot sich die einmalige Gelegenheit, einen Einblick in die genotypische Vielfalt nicht nur während eines Ausbruchs, sondern auch in den darauffolgenden Ablammungen zu bekommen. Über den zeitlichen Verlauf konnten acht verschiedene Genotypen identifiziert werden, von denen einer bei 84 % der Tiere vorkam und damit durchgängig den dominanten Subtyp darstellte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen in den Niederlanden und Frankreich, wo innerhalb eines Ausbruchs ebenfalls ein einzelner dominanter Klon gefunden wurde. Der vorherrschende Genotyp stimmte mit einem in Süddeutschland häufig isolierten Stamm überein.



### III. Summary

*Coxiella burnetii*, the causative organism of the zoonosis Q fever, is normally diagnosed by antibody determination. In the very early stages of the disease PCR has become a useful complementary method to confirm acute Q fever. In addition, PCR is also a successful tool to screen subclinical infected herds of e.g. cows, goats and sheep, the major source for human infections. Due to the very low amount of DNA in clinical material, detection of *C. burnetii* is a challenge. In addition, typing methods also need a starting quantity to produce appropriate results. WGA has become a useful tool in forensic and genomic analysis when the primary amount of DNA-containing material is too low to apply genomic methods in a sufficient quality.

Therefore, we studied the usefulness and applicability of WGA with *C. burnetii* DNA from clinical derived material from an infected herd and from the reference strain Nine Mile with four different kits. The REPLI-g® Mini Kit from Qiagen and the GenomiPhi® V2 Kit from GE-Healthcare, both based on MDA, whereas Sigma's GenomePlex® WGA 2 and the reamplification kit worked with the Omniplex® library method. The amplicates were analysed with different genotyping techniques including real-time PCR of *adaA*, plasmid determination, MLVA and *IS1111*-analysis. Afterwards, sequencing of the products was done to identify base pair deviations.

Fragmented DNA from the Nine Mile strain did not work with REPLI-g® whereas GenomiPhi® achieved good results with a starting amount of at least 1,000 copies. Contrary to these findings, both techniques worked perfectly well with clinical samples. Only the Omniplex® library technique enlarged sufficiently with both sample types. These results were completely different concerning the quality of the amplified materials. REPLI-g® gave the best results for the clinical sample. Accurate amplification was possible for up to a starting amount of 100 copies/µl. GenomiPhi® was just one log<sub>10</sub> amount less effective but overall it succeeded with quite good results. The OmniPlex® library method showed huge troubles with repetitive elements in the DNA becoming apparent by missing MLVA markers, no matter what initial quantity was used.

WGA is suitable for diagnostic and typing issues of *C. burnetii*, but there are some features to be considered. Using fragmented DNA (length < 2kb) REPLI-g® is obsolete, while GenomiPhi® works fine with a sufficient amount of starting material.



GenomePlex® works fine with fragmented DNA but has an enormous error potential and is therefore not suitable for typing techniques. Regarding the non-fragmented clinical sample, the best kit to use is the REPLI-g® Kit. In addition our results have had importance for the application of WGA-methods in whole genome sequencing of *C. burnetii*, making some techniques like the OmniPlex® not suitable for this purpose.

Additionally we investigated the genotypical dynamics of *Coxiella burnetii* in an infected herd of small ruminants. It was a unique opportunity to follow an infected herd of both goats and sheep through an outbreak and the following lambing season. Samples (vaginal swabs, blood, faeces, wool and dust) were taken continuously over two years and examined with the named genotyping methods, housekeepinggenes, MLVA and *IS1111*-typing. Some samples were amplified with the REPLI-g® Kit prior to genotyping. We found eight different genotypes during our investigation with one predominant clone that occurred in 84 % of the animals. These findings match the results generated in the Netherlands two years ago, where they found one predominant clone in the infected goat herds. Our subtype matches to a known one circulating in southern Germany before.

## IV. Literaturverzeichnis

1. Derrick EH. "Q" fever a new fever entity: clinical features. diagnosis, and laboratory investigation 11. *Med J Aust.* 1937;11:281-99.
2. Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Med J Aust.* 1937;2:299-305.
3. Kaplan MM, Bertagna P. The geographical distribution of Q fever. *Bull World Health Organ.* 1955;13:829-60.
4. Hilbink F, Penrose M, Kovacova E, Kazar J. Q fever is absent from New Zealand. *International journal of epidemiology.* 1993;22(5):945-9.
5. Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, et al. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol.* 1989 171(8):4202-6.
6. McCaul TF, Williams JC. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of Bacteriology.* 1981;147(3):1063-76.
7. Babudieri B. Q fever: a zoonosis. *Adv Vet Sci.* 1959;5:82-182.
8. Ariel BM, Khavkin TN, Amosenkova NI. Interaction between *Coxiellae burnetii* and the cells in experimental Q-rickettsiosis. Histologic and electron microscope studies. *Pathologia et microbiologia.* 1973;39(6):412-23.
9. Baca OG, Scott TO, Akporiaye ET, DeBlassie R, Crissman HA. Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 1985;47(2):366-9.
10. Hackstadt T, Williams JC. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1981;78(5):3240-4.
11. Baca OG, Paretsky D. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiological reviews.* 1983;47(2):127-49.
12. Amano K, Williams JC. Sensitivity of *Coxiella burnetii* peptidoglycan to lysozyme hydrolysis and correlation of sacculus rigidity with peptidoglycan-associated proteins. *J Bacteriol.* 1984;160(3):989-93.
13. Moos A, Hackstadt T. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect Immun.* 1987;55(5):1144-50.
14. Krt B. The influence of *Coxiella burnetii* phase I and phase II antigens on the serological diagnosis of Q fever in cattle. *SlovVetRes.* 2003;40:203-8.

15. Thompson HA, Hoover TA, Vodkin MH, Shaw EI. Do Chromosomal Deletions in the Lipopolysaccharide Biosynthetic Regions Explain All Cases of Phase Variation in *Coxiella burnetii* Strains? *Annals of The New York Academy of Sciences*. 2003;990(1):664--70.
16. Setiyono A, Ogawa M, Cai Y, Shiga S, Kishimoto T, Kurane I. New Criteria for Immunofluorescence Assay for Q Fever Diagnosis in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(11):5555-9.
17. Maurin M, Raoult D. Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4):518-53.
18. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary research*. 2005;36(3):327-49.
19. Lang GH. Coxiellosis (Q fever) in animals. In: CRC Press BR, FL, editor. *Q fever: The disease*: Marrie, T. J.; 1990. p. 23–48.
20. Vaidya VM, Malik SV, Bhilegaonkar KN, Rathore RS, Kaur S, Barbuddhe SB. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2010;33(4):307-21.
21. Zhang GQ, Samuel JE. Identification and cloning potentially protective antigens of *Coxiella burnetii* using sera from mice experimentally infected with Nine Mile phase I. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;990:510–20.
22. Guatteo R, Beaudeau F, Joly A, Seegers H. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Veterinary research*. 2007;38(6):849-60.
23. Ho T, Hotta A, Zhang GQ, Nguyen SV, Ogawa M, Yamaguchi T, et al. Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. *Microbiol Immunol*. 1998;42:81-5.
24. Ho T, Htwe KK, Kako N, Kim HB, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1998;60(7):859-61.
25. Rodolakis A, Berri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, et al. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of dairy science*. 2007;90(12):5352-60.
26. Okimoto N, Asaoka N, Osaki K, al. e. Clinical features of Q fever pneumonia. *Respirology*. 2004;9:278-82.
27. Marrie TJ, Raoult D. Q fever--a review and issues for the next century. *International journal of antimicrobial agents*. 1997;8(3):145-61.
28. Berri M, Rousset E, Champion JL, Arricau-Bouvery N, Russo P, Pepin M, et al. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Vet Rec*. 2003;153(9):269-70.

29. Roest HIJ, Tilburg JJHC, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld FG, Klaassen CHW, et al. The Q fever epidemic in the Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol Infect.* 2011a;139:1–12.
30. Tigertt WD, Benenson AS, Gochenour WS. Airborne Q fever. *Bacteriological reviews.* 1961;25:285-93.
31. Ormsbee R, Peacock M, Gerloff R, Tallent G, Wike D. Limits of rickettsial infectivity. *Infect Immun.* 1978;19(1):239-45.
32. Benson WW, Brock DW, Mather J. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a Q-fever infected herd *Public health reports.* 1963;78:707-10.
33. Krumbiegel ER, Wisniewski HJ. Q fever in the Milwaukee area. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. *Archives of environmental health.* 1970;21(1):63-5.
34. Rousset E, Arricau Bouvery N, Souriau A, Huard C, Rodolakis A, Pepin M, et al. Les Modalités de Transmission de la Fièvre Q à l'Homme. *Bulletin Epidémiologique.* 2003.
35. Q-Fieber: Übertragung von *Coxiella burnetii* durch den Verzehr von Lebensmitteln tierischer Herkunft unwahrscheinlich [press release]. Bundesinstitut für Risikobewertung, März 2010 2010.
36. Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Veterinary Microbiology.* 2010;140(3–4):297-309.
37. Berri M, Rousset E, Champion JL, Russo P, Rodolakis A. Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Research in Veterinary Science.* 2007;83(1):47-52.
38. Selbitz HJ. Q-Fieber. In: Behrens H, Ganter M, Hiepe T, editors. *Lehrbuch der Schafkrankheiten: Parey;* 2001.
39. Stöber M. Q-Fieber. In: Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, editors. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.* Stuttgart: Parey; 2006.
40. Tissot-Dupont H, Raoult D. Q fever. *Infectious disease clinics of North America.* 2008;22(3):505-14, ix.
41. Benenson AS, Tigertt WD. Studies on Q fever in man. *Transactions of the Association of American Physicians.* 1956;69:98-104.
42. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* 1998;36(7):1823-34.

43. Brouqui P, Dupont HT, Drancourt M, Berland Y, Etienne J, Leport C, et al. Chronic Q fever. Ninety-two cases from France, including 27 cases without endocarditis. *Archives of internal medicine*. 1993;153(5):642-8.
44. Fenollar F, Fournier PE, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):4919-24.
45. Ayres JG, Flint N, Smith EG, Tunnicliffe WS, Fletcher TJ, Hammond K, et al. Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 1998;91(2):105-23.
46. Hickie I, Davenport T, Wakefield D, Vollmer-Conna U, Cameron B, Vernon SD, et al. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2006;333(7568):575.
47. Frangoulidis D, Kimmig P, Wagner-Wiening C, Henning K. *Coxiella burnetii* (Q-Fieber). In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, editors. *MIQ 27 - Hochpathogene Erreger-Biologische Kampfstoffe*. 2. München: Elsevier; 2008.
48. Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Archives of internal medicine*. 2002;162(6):701-4.
49. Carcopino X, Raoult D, Bretelle F, Boubli L, Stein A. Q Fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1166:79-89.
50. Forland F, Jansen A, de Carvalho Gomes H, Nøkleby H, Escriva A-B, Coulombier D, et al. Risk assessment on Q fever. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2010.
51. Kovacova E, Kazar J. Q fever--still a query and underestimated infectious disease. *Acta Virol*. 2002;46(4):193-210.
52. Frangoulidis D. Einsatz molekularer Typisierungsmethoden zur Untersuchung von Q-Fiebersausbrüchen. *Wehrmedizinische Monatsschrift*. 2012;56(4):90-5.
53. Ormsbee RA. The growth of *Coxiella burnetii* in embryonated eggs. *J Bacteriol*. 1952;63(1):73-86.
54. Gil-Grande R, Aguado JM, Pastor C, Garcia-Bravo M, Gomez-Pellico C, Soriano F, et al. Conventional viral cultures and shell vial assay for diagnosis of apparently culture-negative *Coxiella burnetii* endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14(1):64-7.

55. Schneeberger PM, Hermans MHA, van Hannen EJ, Schellekens JJA, Leenders ACAP, Wever PC. Real-Time PCR with Serum Samples Is Indispensable for Early Diagnosis of Acute Q Fever Clinical and Vaccine Immunology. 2010;17(2):286-90.
56. Sekeyová Z, Roux V, Raoult D. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mucZ* sequence comparison. FEMS Microbiology Letters. 1999;180(1):61-7.
57. Muramatsu Y, Yanase T, Okabayashi T, Ueno H, Morita C. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. Appl Environ Microbiol. 1997;63(6):2142-6.
58. Nguyen SV, Hirai K. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. FEMS Microbiology Letters. 1999;180(2):249-54.
59. Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, Trotta RF. Q-fever: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Mayo Clinic Proceedings. 2008;83(5):574-9.
60. Marmion BP, Harris R, Storm P, Helbig K, Penttila I, Worswick D, et al. Q Fever Research Group (QRG), Adelaide: activities-exit summary 1980-2004. Ann N Y Acad Sci. 2005;1063:181-6.
61. Ackland JR, Worswick DA, Marmion BP. Vaccine prophylaxis of Q fever: a follow-up study of the efficacy of Q-Vax (CSL) 1985 - 1990. Med J Aust. 1994;160(11):704 - 8.
62. Eibach R, Bothe F, Runge M, Ganter M. Long-term monitoring of a *Coxiella burnetii*-infected sheep flock after vaccination and antibiotic treatment under field conditions. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2013;126(1-2):3-9.
63. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. Emerg Infect Dis. 2002;8(2):225-30.
64. Bioterrorism Agents/Diseases. <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>: Centers for Disease Control and Prevention, 2012.
65. Noah DL, Huebner KD, Darling RG, Waeckerle JF. The history and threat of biological warfare and terrorism. Emerg Med Clin North Am. 2002;20(2):255-71.
66. Alibek K. The Soviet Union's anti-agricultural biological weapons. Ann N Y Acad Sci. 1999;894:18-9.
67. Heni E, Germer WD. Q(ueensland)-Fieber in Deutschland. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946). 1948;73(39-40):472-6.

68. Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis* 2001;7:798-6.
69. Robert Koch Institut. Aufklärung eines Q-Fieber Ausbruchs durch Erkrankung eines Film-Teams [Detection of a Q fever outbreak through illness in a film crew]. *Epidemiologisches Bulletin*. 2002;37:316-7.
70. Porten K, Rissland J, Tigges A, Broll S, Hopp W, Lunemann M, et al. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC infectious diseases*. 2006;6:147.
71. Gilsdorf A, Kroh C, Grimm S, Jensen E, Wagner-Wiening C, Alpers K. Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiology and infection*. 2008;136(8):1084-7.
72. Dijkstra F, van der Hoek W, Wijers N, Schimmer B, Rietveld A, Wijkmans CJ, et al. The 2007-2010 Q fever epidemic in The Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2012;64(1):3-12.
73. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(9):5455-60.
74. Yeaman MR, Baca OG. Unexpected antibiotic susceptibility of a chronic isolate of *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;590:297-305.
75. Savinelli EA, Mallavia LP. Comparison of *Coxiella burnetii* Plasmids to Homologous Chromosomal Sequences Present in a Plasmidless Endocarditis-Causing Isolate. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;590(1):523-33.
76. Valková D, Kazár J. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;125(2-3):275-80.
77. Willems H, Ritter M, Jager C, Thiele D. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J Bacteriol*. 1997;179(10):3293-7.
78. Jager C, Lautenschlager S, Willems H, Baljer G. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet Microbiol*. 2002;89(2-3):161-6.
79. Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J Gen Microbiol*. 1991;137(2):269-76.
80. Jager C, Willems H, Thiele D, Baljer G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiology and infection*. 1998;120(2):157-64.



81. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, et al. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1211-7.
82. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006;6:38.
83. Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):613-4.
84. Roest HIJ, Ruuls RC, Tilburg JJHC, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CHW, Vellema P, et al. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011b;17(668–675).
85. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 1998;62(3):725-74.
86. Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol.* 1992;174(17):5540-8.
87. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* 1998;282:754–9.
88. Coleman SA, Fischer ER, Howe D, Mead DJ, Heinzen RA. Temporal Analysis of *Coxiella burnetii* Morphological Differentiation. *Journal of Bacteriology.* 2004;186(21):7344-52.
89. Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, Fournier P-E, Barbe V, Samson D, et al. Mechanisms of Evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science.* 2001;293(5537):2093-8.
90. Denison A, Thompson H, Massung R. IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiology.* 2007;7(1):91.
91. Massung RF, Cutler SJ, Frangoulidis D. Molecular typing of *Coxiella burnetii* (Q fever) *Adv Exp Med Biol.* 2012;984:381-96.
92. Zhang G, To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect Immun.* 2005;73(3):1561-7.
93. Frangoulidis D, Splettstoesser WD, Landt O, Dehnhardt J, Henning K, Hilbert A, et al. Microevolution of the chromosomal region of acute disease antigen A (*adaA*) in the query (Q) fever agent *Coxiella burnetii*. *PloS one.* 2013;8(1):e53440.



94. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*. 1983;132(1):6-13.
95. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, S.V. T. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-5.
96. Telenius Hk, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. 1992;13(3):718-25.
97. Cheung VG, Nelson SF. Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(25):14676-9.
98. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(13):5847-51.
99. Paunio T, Reima I, Syvanen AC. Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, PCR amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. *Clin Chem*. 1996;42(9):1382-90.
100. Chaparro PJP, McCulloch JA, Cerdeira LT, Al-Dilaimi A, Canto de Sá LL, de Oliveira R, et al. Whole genome sequencing of environmental *Vibrio cholerae* O1 from 10 nanograms of DNA using short reads. *J Microbiol Methods*. 2011;87:208-12.
101. Rodrigue S, Maimstrom RR, Berlin AM, Birren BW, Henn MR, Chisholm SW. Whole Genome Amplification and *De novo* Assembly of Single Bacterial Cells. *PLoS one*. 2009;4(9):e6864.
102. Seth-Smith HMB, Harris SR, Skilton RJ, Radebe FM, Golparian D, Shipitsyna E, et al. Whole-genome sequences of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples without culture. *Genome Res*. 2013;23(5):855-66.
103. Joneja A, Huang X. Linear nicking endonuclease-mediated strand-displacement DNA amplification. *Anal Biochem*. 2011;414(1):58-69.
104. Dean F, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi A, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:5261 - 6.
105. Esteban J, Salas M, Blanco L. Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem*. 1993;268:2719 - 26.

106. Lizardi P, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas D, Ward D. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* 1998;19:225 - 32.
107. Lage JM, Leamon JH, Pejovic T, Hamann S, Lacey M, Dillon D, et al. Whole genome analysis of genetic alterations in small DNA samples using hyperbranched strand displacement amplification and array-CGH. *Genome Res.* 2003;13(2):294-307.
108. Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, et al. Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature Protocols.* 2006;1(4):1965-70.
109. Dean F, Nelson J, Giesler T, Lasken R. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 2001;11:1095 - 9.
110. Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, Du Y, Sun Z, Wu X, et al. Unbiased Whole-Genome Amplification Directly From Clinical Samples. *Genome Research.* 2003;13(5):954-64.
111. Alsmadi OA, Bornarth CJ, Song W, Wisniewski M, Du J, Brockman JP, et al. High accuracy genotyping directly from genomic DNA using a rolling circle amplification based assay. *BMC genomics.* 2003;4(1):21.
112. Schneider PM, Balogh K, Naveran N, al. e. Whole genome amplification—the solution for a common problem in forensic casework? *Int Congress Ser.* 2004;1261:24-6.
113. Pruet A, Favello T, Mueller E. Whole Genome Amplification: Moving Beyond the Limits of Traditional PCR. *Life Science (Sigma).* 2004;5:2-7.
114. Barker DL, Hansen MST, Faruqi AF, Giannola D, Irsula OR, Lasken RS, et al. Two Methods of Whole-Genome Amplification Enable Accurate Genotyping Across a 2320-SNP Linkage Panel. *Genome Research.* 2004;14(5):901-7.
115. Park JW, Beaty TH, Boyce P, Scott AF, McIntosh I. Comparing Whole-Genome Amplification Methods and Sources of Biological Samples for Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping. *Clinical Chemistry.* 2005;51(8):1520-3.
116. Binga EK, Lasken RS, Neufeld JD. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *The ISME journal.* 2008;2(3):233-41.
117. Hutchison CA, 3rd, Smith HO, Pfannkoch C, Venter JC. Cell-free cloning using phi29 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(48):17332-6.

118. Raghunathan A, Ferguson H, Bornarth C, Driscoll M, Lasken R. Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:3342 - 7.
119. Wu L, Liu X, Schadt CW, Zhou J. Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:4931–41.
120. Lasken R, Stockwell T. Mechanism of chimera formation during the Multiple Displacement Amplification reaction. *BMC Biotechnology.* 2007;7(1):19.
121. Zhang K, Martiny A, Reppas N, Barry K, Malek J, Chisholm S, et al. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat Biotechnol.* 2006;24:680 - 6.
122. Nelson J, Cai Y, Giesler T, Farchaus J, Sundaram S, Ortiz-Rivera M, et al. TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *BioTechniques.* 2002(Suppl):44 - 7.
123. Eibach R, Bothe F, Runge M, Fischer SF, Philipp W, Ganter M. Q fever: Baseline Monitoring of a Sheep and a Goat Flock associated with Human Infections *Epidemiology and infection.* 2012;140(11):1939-49.
124. Bleichert P. Molekulargenetische Typisierung des Q-Fieber- Erregers *Coxiella burnetii* mittels Multispacer- Sequence-Typing (MST) und IS1111-Verteilung München: Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf 2011.
125. Bleichert P, Hanczaruk M, Stasun L, Frangoulidis D. Genetic differentiation of *Coxiella burnetii* isolates based on the analysis of 32 is1111 locations. In: *Disease tIMoRaR*, editor. Heraklion, Greece 2011.
126. Howe GB, Loveless BM, Norwood D, Craw P, Waag D, England M, et al. Real-time PCR for the early detection and quantification of *Coxiella burnetii* as an alternative to the murine bioassay. *Molecular and cellular probes.* 2009;23(3-4):127-31.
127. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(2):573-80.
128. Siegl A. Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme: Etablierung Einzelzell-basierter Methoden für die Charakterisierung von Schwamm-assoziierten Bakterien 2009.
129. Stepanauskas R, Sieracki ME. Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(21):9052-7.
130. Beare PA, Howe D, Cockrell DC, Heinzen RA. Efficient method of cloning the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(12):4048-54.

131. Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR methods and applications*. 1991;1(1):17-24.
132. Hite JM, Eckert KA, Cheng KC. Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of d(C-A)<sub>n</sub>d(G-T)<sub>n</sub> microsatellite repeats. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(12):2429-34.
133. Dutton CM, Paynton C, Sommer SS. General method for amplifying regions of very high G + C content. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(12):2953-4.
134. Blanco L, Bernad A, Lazaro J, Martin G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*. 1989;264:8935 - 40.
135. Wan CY, Wilkins TA. Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. *PCR methods and applications*. 1993;3(3):208-10.
136. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Res* 2008.
137. Zhang YJ, Pan HY, Gao SJ. Reverse transcription slippage over the mRNA secondary structure of the LIP1 gene. *Biotechniques*. 2001;31(6):1286, 8, 90, passim.
138. Marcy Y, Ishoey T, Lasken RS, Stockwell TB, Walenz BP, Halpern AL, et al. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS genetics*. 2007;3(9):1702-8.
139. Le Fleche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck JL, Vergnaud G. High resolution, on-line identification of strains from the Mycobacterium tuberculosis complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol*. 2002;2:37.
140. Jordan IK, Kondrashov FA, Rogozin IB, Tatusov RL, Wolf YI, Koonin EV. Constant relative rate of protein evolution and detection of functional diversification among bacterial, archaeal and eukaryotic proteins. *Genome biology*. 2001;2(12):Research0053.
141. Tilburg JJ, Roest HJ, Buffet S, Nabuurs-Franssen MH, Horrevorts AM, Raoult D, et al. Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(5):887-9.
142. Larsen HD, Sloth KH, Elsberg C, Enevoldsen C, Pedersen LH, Eriksen NH, et al. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Vet Microbiol*. 2000;71(1-2):89-101.
143. Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala B. High Prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on Pig Offal in Southern Germany: A Slaughtering Technique Problem. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001;24(3):457-63.

144. Arricau-Bouvery N, Souriaua A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):374-7.
145. Fernández Silva JA. Diagnosis, genotyping and epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in dairy cattle. Gießen: Universitätsbibliothek; 2012.
146. Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, d'Offay JM, Helman RG, et al. Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2000;12(1):33-8.

## V. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr Dr. Dimitrios Frangoulidis, der in jeder verzweifelten Minute immer motivierende Worte gefunden hat. Außerdem danke ich Mathias Walter für die unermüdliche Unterstützung nicht nur bei der Erstellung von Statistiken.

Meinem Doktorvater an der LMU Prof. Dr. Reinhard Straubinger danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und seinen wissenschaftlichen Rat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Claudia Kahlhofer für ihren besonderen Einsatz danken, als die MLVA mich wahnsinnig zu machen drohte. Mein Dank gilt auch den anderen Mitarbeitern der TE 40, die mich im Labor das Laufen gelehrt haben.

Ich danke Prof. Dr. Herrmann Meyer für seinen geduldigen, wissenschaftlichen Rat und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Martin Ganter der Klinik für kleine Klautiere der Stiftung tierärztliche Hochschule Hannover bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung der Proben. Außerdem danke ich Friederike Bothe für die vielen Telefonate und ihren wissenschaftlichen Rat.

Ich danke Anika Hübner, dass sie mir die Zeit am Institut besonders im Büro immer so viel kürzer hat scheinen lassen.

Ich danke meiner Mutter für ihre endlosen Rechtschreibkorrekturen, ihre Ideen und ihre motivierenden Worte und Maximilian Weigand für seine Geduld und seinen unermüdlichen Glauben an meine Fähigkeiten.

Ich danke meinen Freunden einfach dafür, dass sie immer da sind.

Ich danke dem Passierschein A 38 (Asterix erobert Rom), der mich insbesondere im letzten Jahr am Institut begleitet hat.