

Aus dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Fachbehörde des Freistaates Bayern

Präsident: Walter Jonas

**Typisierung der Enteroviren aus Entero-/Rhinoviren-positiven Surveillance-
Proben aus dem Erregermonitoring Bayern Influenza Sentinel (EMBIS)**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julian Möller

aus Hamburg

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Rieder

Mitberichterstatter: PD Dr. Dr. Albrecht von Brunn
Prof. Dr. Holger Rüssmann
Prof. Dr. Thomas Löscher

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2022

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Grundlagen der Virologie	3
1.1.1. Aufbau eines Virions.....	4
1.1.2. Replikation	5
1.1.3. Pathogenese	6
1.1.4. Immunreaktion auf virale Infektionen.....	7
1.2. Enteroviren.....	8
1.2.1. Klinische Manifestationen, Krankheitsverlauf, Behandlung	14
1.2.2. Epidemiologie der Enteroviren	17
1.2.3. Diagnostik	18
1.2.3.1. Antisera.....	19
1.2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion	19
1.3. EMBIS Studie	21
2. Fragestellung	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1. Zellkultur.....	24
3.1.1. Verwendete Geräte und Chemikalien.....	24
3.1.2. Start einer neuen Zelllinie permanenter Zellen	26
3.1.3. Virusisolierung	31
3.1.4. Titration	35
3.1.5. Kopenhagen-Test.....	35
3.2. Polymerase-Kettenreaktion	37
3.2.1. Verwendete Geräte und Chemikalien.....	38
3.2.2. Primer	40
3.2.3. RNA-Extraktion	41
3.2.4. Quantitative „real time“-RT-PCR	42
3.2.5. Nested-PCR	44
3.2.5.1. 5'-NTR.....	45
3.2.5.2. Seminested-VP1-PCR	46
3.2.6. Kapillargelchip-Elektrophorese.....	49
3.2.7. Klassische Gelelektrophorese.....	52
3.3. Sequenzierung	53

3.4. Homologieuntersuchung	54
3.5. Nationales Referenzzentrum	55
4. Ergebnisse.....	56
4.1. Virusisolierung und Titration.....	56
4.2. Kopenhagen-Test	59
4.3. PCR	61
4.3.1. qRT-PCR	61
4.3.2. Kapillargelchip-Elektrophorese 5'-NTR.....	65
4.3.3. Gelelektrophorese VP1.....	66
4.4. Sequenzanalyse der PCR-Produkte.....	68
4.4.1 Sequenzanalyse des 5'-NTR-PCR-Produktes	68
4.4.2 Sequenzanalyse des VP1-PCR-Produktes.....	68
4.5. Nationales Referenzzentrum	70
5. Auswertung.....	72
5.1. Virusisolierung und Passagen	72
5.2 Titration.....	72
5.3. Kopenhagen-Test	73
5.4. PCR-Produkte	74
5.4.1. qRT-PCR.....	74
5.4.2. 5'-NTR	74
5.4.3. VP1	74
5.4.4. Sequenzierung und Homologieuntersuchung	75
5.5. Nationales Referenzzentrum	75
6. Diskussion	76
6.1. EMBIS und Zellkultur.....	76
6.2. Neutralisationstest	78
6.3. PCR und NRZ Ergebnisse.....	79
7. Zusammenfassung	84
8. Literaturverzeichnis	86
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	90
10. Danksagung	93
11. Eidesstattliche Versicherung	94

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<i>Abbildung</i>
AG	<i>Antigen</i>
BIS	<i>Bayrisches Influenzasentinel</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention (Behörde der USA)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CODEHOP	<i>Consensu-degenerate hybrid-oligonucleotideprimers</i>
CPE	<i>Zytopathischer Effekt</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CV A	<i>Coxsackie Virus A</i>
CV B	<i>Coxsackie Virus B</i>
Cy5	<i>Cyanine-5</i>
D68	<i>Synonym für EV 68</i>
ddNTP's	<i>Didesoxynukleotidtriphosphate</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
dNTP's	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphate</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E	<i>Echovirus</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EMBIS	<i>Erregermonitoring im bayrischen Influenzasentinel</i>
EV	<i>Enterovirus</i>
FAM	<i>6-Carboxylfluorescein</i>
FKS	<i>Fetales Kälberserum</i>
Gbp	<i>Gigabasenpaare</i>
HIV	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
HRV	<i>Humanes Rhinovirus</i>
HSV	<i>Herpes-simplex-Virus</i>
ICAM	<i>Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül</i>
IRES	<i>Interne ribosomale Eintrittsstelle</i>
kb	<i>Kilobasenpaare</i>
L	<i>Ladder</i>
LBM	<i>Lim und Benyesh-Melnick</i>
LGL	<i>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit</i>
Mbp	<i>Megabasenpaare</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i>
MM	<i>Mastermix</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NK	<i>Natürliche Killerzellen</i>
NRZ	<i>Nationales Referenzzentrum</i>
NTR	<i>nicht-translatierte Region</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline (Phosphat-Puffer)</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)</i>
pDC	<i>plasmazytoide Dendritische Zellen</i>
PV	<i>Poliovirus</i>
qRT-PCR	<i>Real Time Quantitative PCR</i>
RD-Zellen	<i>humane Rhabdomyosarkom-Zellen</i>
RKI	<i>Robert Koch-Institut</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT-Ansatz	<i>Reverse-Transkription-Ansatz</i>
RV	<i>Rhinovirus</i>
Tab.	<i>Tabelle</i>
TAMRA	<i>5-Carboxytetramethylrhodamin</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris-Borat-EDTA</i>
TCID ₅₀	<i>Tissue Culture Infection Dose 50</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
UV-Licht	<i>Ultraviolettes Licht</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
VP	<i>Virales Protein</i>
VPg	<i>Viral protein genome-linked</i>
VZV	<i>Varizella-Zoster-Virus</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der Virologie

Viren sind sehr kleine Partikel unbelebter Materie, welche keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, unfähig zur Bewegung sind und sich nicht selbstständig vermehren können. Sie beherbergen jedoch genetisches Material und sind dadurch, unter Ausnutzung des Wirtsstoffwechsels, zur Replikation fähig. Das genetische Material vieler Viren unterliegt unterdes auch einer steten mikroevolutionären Veränderung durch Mutation. Insofern sind die Viren eine Zwischenform von belebter und lebloser Natur, somit sind sie Grenzgänger der Natur. Auf jeden Fall zählt die Virologie als Teildisziplin der Mikrobiologie zur Wissenschaft des Lebendigen.

Mikroben als Ursache biologischer Vorgänge wie Gärung, Fäulnis oder Krankheiten zu erkennen, wurden erst nach der Entwicklung des Mikroskops im 17. Jahrhundert möglich. Jedoch dauerte es bis Mitte des 19. Jahrhunderts bis durch Louis Pasteur der Zusammenhang dieser Vorgänge und dem Leben der Mikroben aufgeklärt wurde (vgl. Doerr, 2010). Später entwickelte sich die Virologie aus der Problematik heraus, dass bestimmte infektiöse Krankheiten nicht mit den Postulaten von Koch und Henle in Einklang gebracht werden konnten. Beide Herren forderten eine Mikrobe als Ursache einer Krankheit und formulierten folgende vier Postulate:

1. Von allen Patienten derselben Krankheit, solle dieselbe Mikrobe isolierbar sein.
2. Die isolierte Mikrobe solle *ex vivo* vermehrbar sein.
3. Die Inokulation der Mikrobe bei einem empfänglichen Wirt, soll zur entsprechenden Krankheit führen.
4. Von diesem Wirt soll wieder die gleiche Mikrobe isolierbar sein.

Da sich die Erreger einer viralen Krankheit natürlich nicht in Nährlösungen anzüchten ließen und auch mit dem Lichtmikroskop nicht darstellbar waren, sah man zwei von vier Postulaten nicht erfüllt. Iwanosky und Beijerinck stellten Ende des 19. Jahrhunderts bei Untersuchungen zum Erreger der Tabakmosaikkrankheit fest, dass sich der Erreger nicht durch übliche mikrobiologische Filtrationsmethoden herausfiltern ließ, wohl aber

die Infektiosität durch verdünnende Titrationsreihen beseitigt werden kann. Alles Indizien, die damals für ein Gift sprachen, weshalb man solchen Erregern den Namen Virus, vom lateinischen Wort für Gift oder Schleim, gab. Später wurde zur Abgrenzung für tatsächliche Giftstoffe, das griechische Wort für Gift „Toxin“ verwendet und der Begriff Virus für virale, also giftähnliche, Erreger reserviert (vgl. Doerr, 2010).

1.1.1. Aufbau eines Virions

Der Aufbau des einzelnen Viruspartikels, des sogenannten Virions, besteht üblicherweise aus dem Erbgut, welches von einer Proteinkapsel geschützt wird. Diese Kapselproteine heißen Kapside, die Einheit von Erbgut (Nukleinsäure) und Kapsid wird Nukleokapsid genannt. Beim Nukleokapsid kommen zwei unterschiedliche Symmetriefformen vor, die Helix und der Ikosaeder. Diese Symmetriefformen werden durch die Kapsomere, Untereinheiten der Kapside, bestimmt und dienen zur taxonomischen Einteilung. Die Symmetriefform wird ermittelt indem gleiche Molekülpositionen miteinander in der Simulation verbunden werden. Die so erhaltene Form ist entweder eine Helix oder ein Ikosaeder, entspricht aber nicht der tatsächlichen Morphologie des Virions.

Viele Viren sind nicht komplexer aufgebaut als ein Nukleokapsid, es gibt allerdings auch Viren, die noch über zusätzliche Proteinkapseln und über eine Hülle verfügen. Die Hülle entspringt in der Regel der Zellmembran der Wirtszelle. Je nach Virusgattung (Genus) kommen als Genom sowohl RNA als auch DNA vor. Die Nukleinsäuren können als Doppelstränge oder Einzelstränge vorliegen, letztere als Plus-(+)-Strang oder als Minus(-)-Strang vorliegen. Bei (-)-Strängen kodiert in erster Linie der komplementäre Strang das Erbgut. Grundsätzlich liegt bei RNA-Viren eine höhere Mutationsrate vor, bedingt durch die geringe Ablesetreue der RNA-Polymerase. Dies führt bei der Replikation zur Entstehung einer Vielzahl geringfügig unterschiedlicher Nachkommen, den Quasispezies, welche mitunter verantwortlich gemacht werden für unterschiedliche Krankheitsverläufe, die bei Patienten mit dem gleichen Erreger festzustellen sind.

Die Genomgröße von Viren wird anhand der Anzahl an Basen in der Nukleinsäure gemessen und hat eine enorme Bandbreite von gerade mal 1,7 kb beim Hepatitis-D-Virus bis hin zu 1,18 Mbp beim Mimivirus. Das menschliche Genom hat im Vergleich

dazu ungefähr 3 Gbp. Allerdings existieren im viralen Genom zahlreiche Mechanismen zur Erhöhung des Informationsgehalts (vgl. Braun & Bartenschlager, 2010).

1.1.2. Replikation

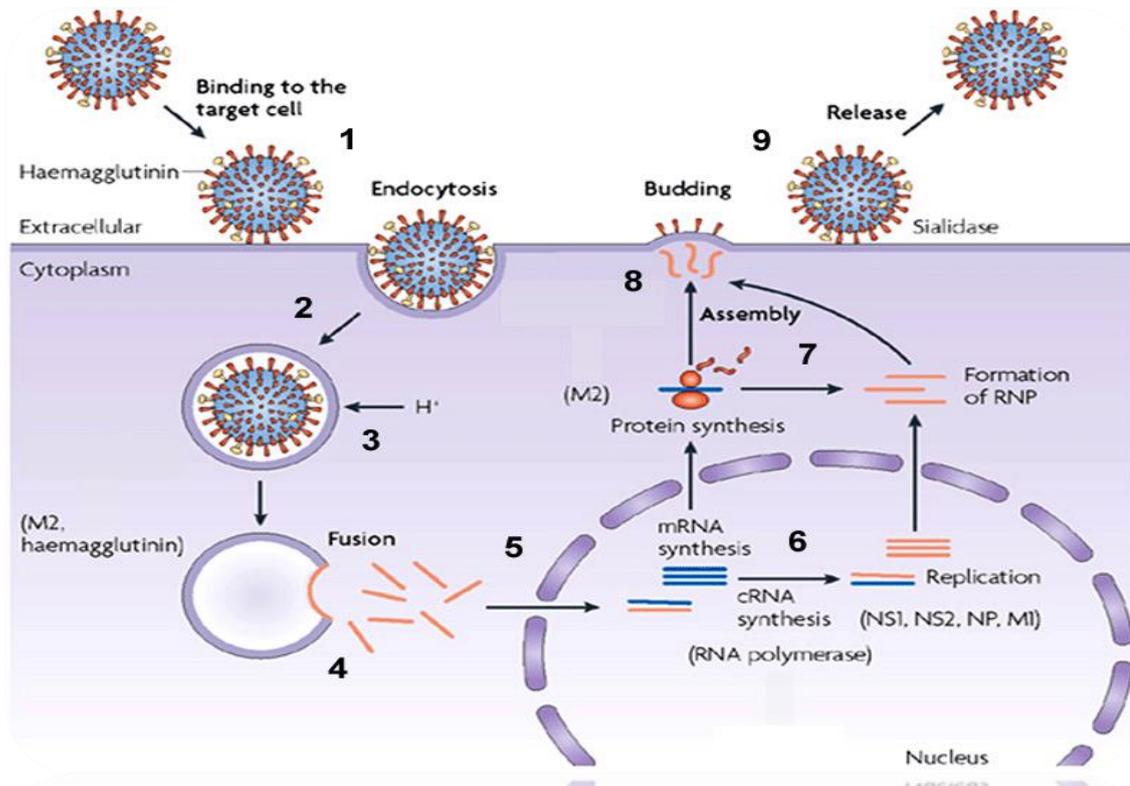


Abbildung 1: Replikationszyklus am Beispiel Influenza: 1. Das Virion bindet über das Oberflächenprotein Hämagglutinin an die Wirtszellenmembran 2. Endozytose 3. Ansäuerung im Endosom 4. Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran 5. Freigesetztes virales Genom gelangt in den Zellkern 6. Expression des Genoms und Replikation 7. Weitere Komponenten werden im Zytosol synthetisiert 8. Virale Komponenten akkumulieren an der Membran, wo die Fertigstellung des neuen Virions stattfindet 9. Freisetzung des Virions durch Knospung // Quelle: (Scolari, 2009)

Das Leben des Virus beginnt erst mit Eintritt in eine geeignete Wirtszelle. Wie in Abbildung 1 gezeigt wird der Prozess vom Eintritt eines Virions bis zum Austritt fertiger neuer Virionen in verschiedene Phasen eingeteilt. Zuerst kommt es zur unspezifischen Adsorption an die Wirtszelle und anschließend, entweder Rezeptorvermittelt oder ebenfalls unspezifisch, zum Eindringen des Virions in die Zelle. Diese

ersten beiden Phasen werden Adsorption und Penetration genannt. Im Anschluss wird die virale Nukleinsäure an ihrem Bestimmungsort freigesetzt (Uncoating) und dabei vom Kapsid befreit. Im Zellkern kommt es zur Vermehrung des Erbgutes (Replikation) und zur Produktion von Kapsiden, aus denen neue Virionen im Zytosol zusammengesetzt werden (Assembly). Die Freisetzung neuer Virionen aus der Wirtszelle kann durch Knospung (Budding), Exozytose oder Lyse der Wirtszelle geschehen. Letzter Mechanismus wird unter dem Begriff lytischer Zyklus beschrieben (Abb.2). Der lytische Zyklus bedingt eine von mehreren Formen des zytopathischen Effekts (CPE) des Virus auf die Wirtszellen.

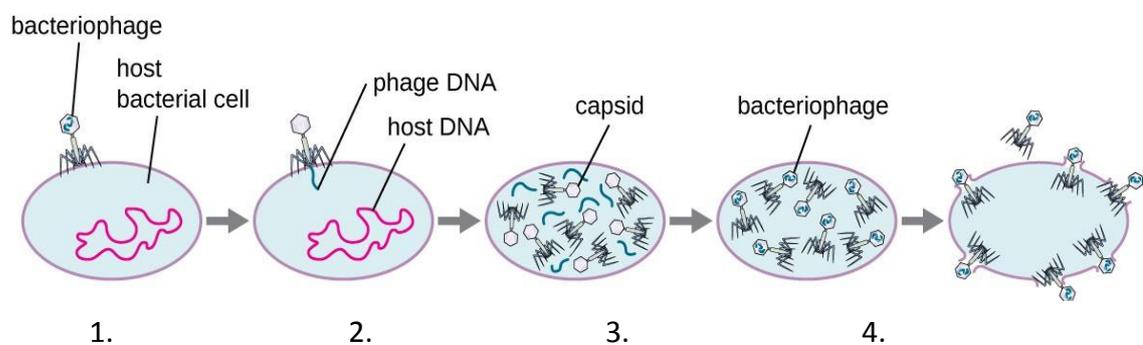


Abbildung 2: Lytischer Zyklus am Beispiel eines Bakteriophagen: 1. Bindung des Virions an die Membran der Wirtszelle 2. Virales Genom dringt in die Zelle ein 3. Expression und Replikation des Genoms 4. Fertigung neuer Virionen 5. Freisetzung der Virionen durch Untergang der Wirtszelle // Quelle: (Parker et al., 2016)

1.1.3. Pathogenese

Zu Beginn einer Infektion steht der Eintritt der Virionen in den Wirtsorganismus. Übertragen werden virale Partikel beispielsweise als Tröpfcheninfektion, Schmierinfektion oder durch Austausch von Körperflüssigkeiten. Als Eintrittspforten beim Menschen kommen natürliche Körperöffnungen wie Mund und Nase, Verletzungen der Haut, aber auch Insektenstiche oder „needle sharing“ in Betracht. Es erfolgt üblicherweise eine Virusvermehrung im lokalen Gewebe der Eintrittspforte. Von dort kommt es ggf. zur Ausbreitung über die Lymph- und Blutbahn und schließlich gelangt das Virus an sein Zielorgan, dessen Zellen durch ihre Membran und Rezeptoren

auf der Oberfläche, die Adsorption und Penetration begünstigen. Der Infektionsverlauf hängt vom Virus, dem Wirt und deren Interaktion ab. Die Art des Verlaufs, also akut, subakut, chronisch oder latent, hängt allerdings überwiegend vom Virus ab. So können beispielsweise das Herpes-simplex-Virus (HSV) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV) entlang peripherer Nerven wandern und in Ganglien persistieren, selbst wenn die akute Infektion abgeklungen ist. Es kommt zur Latenzphase ohne Krankheitszeichen. Bei Verschlechterung der immunologischen Situation des Wirtes, kann das Virus im Dermatom des entsprechenden Nervens wieder eine akute Infektion auslösen. Die Fähigkeit Nervengewebe zu befallen nennt man Neurotropismus. Durch die Blut-Hirn-Schranke des zentralen Nervensystems (ZNS), ist hier das Immunsystem nur eingeschränkt wirksam, wodurch es Viren (z. B. HIV) möglich wird, sich hier quasi zu „verstecken“ und eine latente bzw. chronische Infektion auszulösen.

1.1.4. Immunreaktion auf virale Infektionen

Dem menschlichen Körper stehen zwei unterschiedliche Immunsysteme zur Abwehr viraler Infektionen zur Verfügung. Zum einen gibt es die angeborene Immunabwehr, welche sich aus mehreren Teilsystemen zusammensetzt. Die potentiellen Wirtszellen exprimieren permanent antivirale Proteine, welche die Virusvermehrung intrazellulär behindern sollen. Zudem verfügen sie über intrazelluläre Rezeptoren, welche vornehmlich virale Nukleinsäuren erkennen und über unterschiedliche Signalwege die Produktion antiviraler Zytokine fördern. Hierbei ist das Interferonsystem besonders zu erwähnen. Zytokine verbreiten sich im Gewebe und über das Blut im gesamten Organismus und stimulieren zelluläre Prozesse zur Abwehr der viralen Infektion, wie z. B. die Bildung antiviraler Proteine. Des Weiteren spielen mobile Effektorzellen, wie Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) oder plasmazytoide dendritische Zellen (pDC), eine große Rolle. Letztere verfügen über verschiedene Toll-like-Rezeptoren (z. B. TLR3, 7 und 8) im Zellinneren, welche durch phagozytierte virale Partikel zur Freisetzung von Interferonen stimuliert werden. Makrophagen dagegen erkennen virale Antigene, welche durch MHC-1-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden. Dies führt auch zur Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen. Die angeborene Immunabwehr reagiert durch verschiedene Regulationsmechanismen schnell und unspezifisch, aber zeitlich begrenzt (zur Übersicht: Haller, 2010).

Zum anderen gibt es die erworbene Immunabwehr. Sie benötigt Zeit, um spezifisch gegen Krankheitserreger vorzugehen und diese Zeit verschafft ihr die angeborene Abwehr. Kernkompetenz der erworbenen Immunität ist die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene des Erregers sowie Abtötung infizierter Zellen. T- und B-Zellen besitzen hochvariable Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die strukturell einem spezifischen Antikörper ähneln. Antigenpräsentierende Zellen wandern in die regionalen Lymphgewebe, sobald sie körperfremde Antigene, z. B. einen Viruspartikel, phagozytiert haben. Dort präsentieren sie die Antigene über MHC den T-Zellen. Die antigenspezifischen Rezeptoren der T-Zellen werden durch den Kontakt mit dem Antigenfragment der pDC aktiviert und zur Proliferation angeregt. Zytotoxische T-Zellen patrouillieren daraufhin im Organismus nach ihrem spezifischen Antigen und lysieren Zellen, welche es, als Ausdruck ihrer Pathogenität, auf ihrer Oberfläche präsentieren. T-Helferzellen stimulieren B-Zellen gleicher Spezifität zur Proliferation und Produktion von spezifischen Antikörpern. Die Antikörper binden an die Antigene auf der Oberfläche von Erregern und machen sie damit teilweise direkt unschädlich. Zum einen jedoch erfolgt nur eine Opsonierung, was Fresszellen zur Phagozytose befähigt und auch zur Virolyse durch Komplementaktivierung führen kann. Zum anderen können die Antikörper auch an die Antigene in MHC-Molekülen infizierter Zellen binden und damit die präsentierende Zelle zur gezielten Vernichtung durch NK-Zellen und des Komplements freigeben (zur Übersicht: Hengel & Halenius, 2010).

1.2. Enteroviren

Die Familie der Picornaviren ist eine stetig wachsende taxonomische Zusammenfassung sehr kleiner ikosaederförmiger (Abb. 3), unbehüllter Viren mit einzelsträngiger Plusstrang-RNA und einer Genomgröße von 6,7 – 10,1 kb. Von der geringen Größe des Genoms im Vergleich mit anderen Virenfamilien leitet sich auch der Name „Pico-RNA-Viren“ ab. Die Familie umfasst 35 Genera und darin insgesamt 80 Spezies (vgl. 10. ICTV Report, Zell *et al.*, 2017).

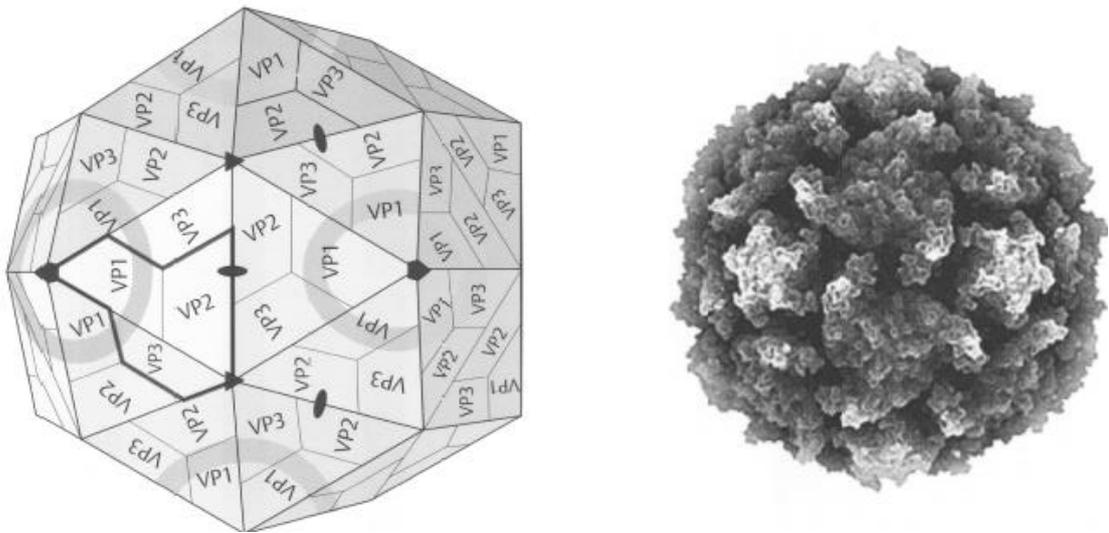


Abbildung 3: Links: Schematische Darstellung des Icosaeders eines Poliovirions; Rechts: 3D Computermodell // Quelle: (E. Wimmer & A. Paul, 2010)

Die Enteroviren (EV) stellen innerhalb dieser Familie ein Genus (Gattung) mit insgesamt 15 Spezies dar; er umfasst circa 300 Genotypen. Die frühere taxonomische Einteilung der EV auf Basis von serologischen Methoden, dem Anzuchtverhalten oder unterschiedlichen Pathogenitätsmuster in Säuglingsmäusen, ist längst phylogenetischen Untersuchungen (Abb. 4) gewichen. Wobei die Namen einzelner Serotypen noch von der alten Taxonomie zeugen. Bei dem phylogenetischen Verfahren gilt ein festgelegtes Maß an Übereinstimmung des genetischen Codes im Hinblick auf definierte Genomabschnitte als Demarkationsgrenze für die taxonomische Einordnung. So wurden Gruppen nah verwandter EV als Cluster in die Spezies EV A bis L und Rhinoviren (RV) A bis C eingeteilt. Tabelle 1 zeigt nur die humanpathogenen Cluster der EV A-D und RV auf.

Tabelle 1: Taxonomische Zuordnung humanpathogener Enterovirustypen in Cluster// Quelle (Zugriff am 12.07.2020): <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>

EV Cluster	Virustypen
EV-A	CV-A 2-8, 10, 12, 14, 16 und EV-A 71, 76, 89, 90, 91, 92, 114, 119-125
EV-B	CV-B 1-6 und CV-A 9 und E 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29, 30-33 und

EV Cluster	Virustypen
	EV-B 69, 73, 74, 75, 77-88, 93, 97-101, 106, 107, 110-114
EV-C	PV 1-3 und CV-A 1, 11, 13, 17, 19-22, 24 und EV-C 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116, 117, 118
EV-D	EV-D 68, 70, 94, 111
RV-A	RV-A 1, 2, 7-13, 15,16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 53-68, 71, 73-78, 80, 81, 82, 85, 88, 89, 90, 94, 96, 100-109
RV-B	RV-B 3-6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91, 92, 93, 97, 99-106
RV-C	RV-C 1-57

¹ CV = Coxsackie Virus ; PV = Polio Virus ; RV = Rhinovirus

Dass die phylogenetische Verwandtschaft nicht unbedingt mit der taxonomischen Einteilung nach phänotypischen Eigenschaften korrespondiert, sieht man beispielsweise an der Verteilung der Coxsackieviren A auf die aktuellen Spezies EV A, B und C.

Abbildung 5 zeigt eine Übersicht verschiedener und sehr unterschiedlicher Rezeptoren, die EV und andere Picornaviren zum Eintritt in die Zellen benutzen. Hierbei lässt sich weder innerhalb der Familie, noch innerhalb des Genus EV eine Einheitlichkeit der benötigten Rezeptoren feststellen. Es werden strukturell und funktionell vollkommen unterschiedliche Rezeptoren sogar von sehr nahe verwandten Virusclustern verwendet. So lässt sich z. B. feststellen, dass der Großteil der humanen Rhinoviren (HRV) den ICAM-1-Rezeptor, während nur ein kleiner Teil den VLDL-Rezeptor verwendet. Zwei grundverschiedene Rezeptoren und dennoch wird dieselbe Krankheit in demselben Gewebe ausgelöst. Mit dem rezeptorvermittelten Eintritt des Virions in die Wirtszelle geht oftmals schon eine Destabilisierung des Kapsids einher, sodass das Genom kurz darauf ins Zytoplasma freigesetzt werden kann. Das Genom der Enteroviren repliziert im Gegensatz zu anderen Viren unabhängig vom Zellkern im Zytoplasma.

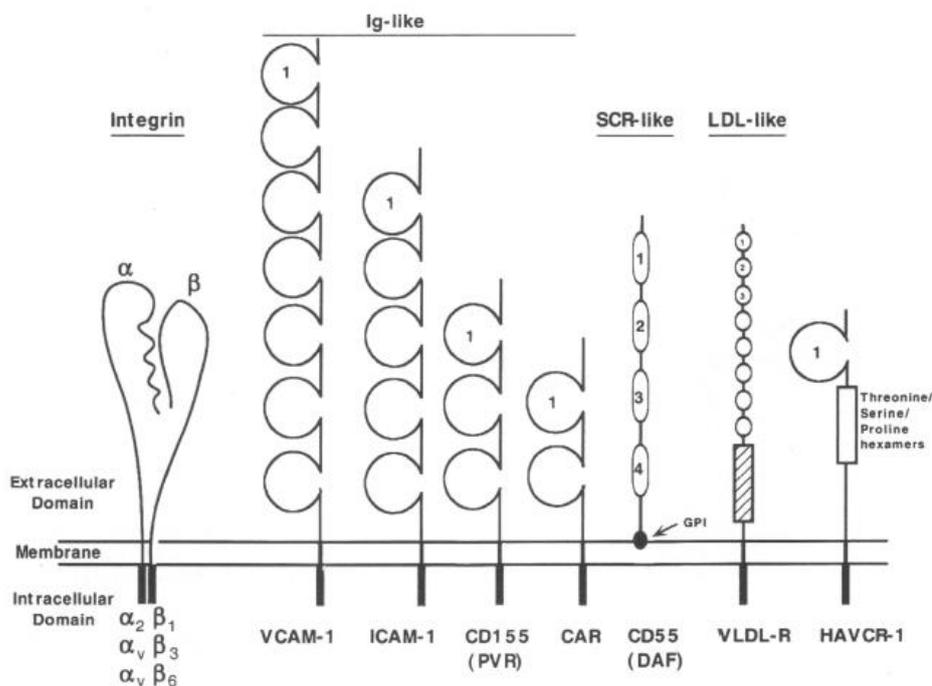


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Picornavirus-Rezeptoren // Quelle: (E Wimmer & A. Paul, 2010)

Das Genom der EV (Abb. 6) ist aufgrund seiner geringen Größe gezwungen seine Information möglichst kompakt zu halten. Es besteht aus einer nicht-translatierten Region am 5'-Ende (5'-NTR), einem einzigen offenen Leserahmen für ein langes Polypeptid, einer nicht-translatierten Region am 3'-Ende (3'-NTR) und daran anschließend einem poly(A)-Schwanz. Zudem ist das 5'-Ende kovalent an das kleine Virusprotein „genome-linked“ (VPg) gebunden. Die 5'-NTR ist ca. 600 – 1300 Nukleotide lang und enthält zwei unterschiedliche Strukturen. Zum einen die Kleeblattstruktur („cloverleaf“), welche maßgeblich an der Bildung des Replikationskomplexes beteiligt ist. Zusammen mit der 3'-NTR ermöglicht sie den Eintritt der viralen Polymerase 3D^{pol} und somit die Synthese eines Minusstranges, der wiederum dann zur Synthese neuer Genome dient. Zum anderen enthält die 5'-NTR die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES-Struktur). Sie ermöglicht den Eintritt der viralen RNA in die zellulären Ribosomen. Zwar könnte die virale Plusstrang-RNA direkt von den zellulären Ribosomen als mRNA verwendet werden, jedoch fehlt ihnen die cap-Struktur am 5'-Ende, welche unerlässlich ist für die Translation durch die Ribosomen. Mit der IRES-Struktur haben die Viren einen Weg gefunden cap-unabhängig die Ribosomen auf ihre RNA anzusetzen und zur Translation zu bringen. Das lange Polyprotein wird unterteilt in den strukturellen Abschnitt P1, welcher die vier Kapsidproteine VP1-4 enthält. Die Abschnitte P2 und P3 enthalten nicht-strukturelle Proteine wie z. B. die virale Polymerase 3D^{pol} und andere Enzyme und Proteine, welche für Regulierung der Replikation, Proteinsynthese und anschließend der Zusammensetzung der Virionen aus Kapsiden und Genom zuständig sind.

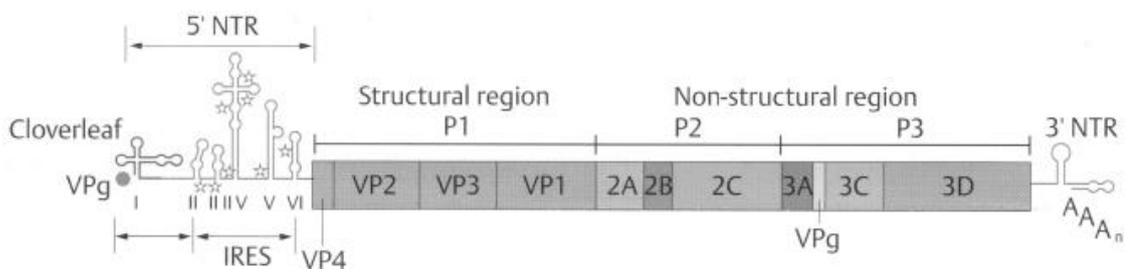


Abbildung 6: Detaillierte Darstellung eines Entervirus-Genoms am Beispiel von Polio //
Quelle: (E Wimmer & A. Paul, 2010)

Das Polyprotein verfügt zudem über autoprotolytische Fähigkeiten, wodurch es bereits im *status nascendi* teilweise gespalten wird. Sobald die viruseigenen Proteasen auf diese Weise aus dem Polyprotein gespalten wurden, werden sie aktiv und spalten es weiter in die funktionellen und strukturellen Bestandteile. Die Zusammensetzung der neuen Virionen erfolgt aus 60 Kopien der vier Kapsidproteinen und dem Replikat des Genoms, welches zudem noch am 5'-Ende kovalent an das VPg gebunden wird. Die Freisetzung findet per Zellyse statt. Dies bedingt eine typische morphologische Veränderung der Wirtszelle, was in der Labordiagnostik zytopathischer Effekt genannt wird (zur Übersicht: E Wimmer & A. Paul, 2010).

1.2.1. Klinische Manifestationen, Krankheitsverlauf, Behandlung

Bedingt durch die Ableseungenauigkeit der viralen Polymerase, welche in einer Fehlerrate von 1:10.000 Nukleotiden resultiert und dem Fehlen von „proofreading“-Mechanismen, entstehen statt identischer Nachkommen ein sogenannter ‘Mutantenschwarm‘. Es kommt schon im Laufe der Infektion zur Bildung von ‘Quasispezies‘, weil sich jedes Replikat theoretisch um eine Mutation unterscheidet. Dadurch ist es manchen Viren (z. B. Influenza-Viren) möglich die Antigenstruktur so schnell zu verändern, dass nach überstandener Infektion keine Immunität gegen den Erreger vorliegt. Es entstehen genotypisch fast identische Nachkommen, die aber serologisch nicht von den gleichen Antikörpern gebunden werden können. Der ursprüngliche Erreger teilt sich dadurch in mehrere Serotypen auf. Allerdings hat nicht jedes Virus die Fähigkeit sich auf diesem Wege der Immunantwort des Wirtes zu entziehen. Das Poliovirus beispielsweise weißt lediglich drei Serotypen auf und das trotz Jahrtausender langer Existenz. Das bedeutet, dass eine Impfung gegen diese drei Serotypen zu einer lebenslangen Immunität führt. Von allen EV ist Polio das einzige Virus, gegen das ein aktiver Impfstoff vorliegt. Zudem gibt es noch keine kausale Behandlungsmöglichkeit mittels Chemotherapie bei Infektionen durch EV. Jedoch kann gegen Polio und in manchen anderen Fällen eine Therapie mittels Antikörpern, also eine passive Immunisierung vorgenommen werden (vgl. Zhang *et al.*, 2015)

Von allen Enteroviruspezies enthalten lediglich EV A, B, C und D und RV A, B, und C humanpathogene Stämme (Tab. 1). Für sie stellt der Mensch zugleich das einzige natürliche Reservoir dar (vgl. Zeichenhardt & Grunert, 2010). Die übrigen Spezies sind

tierpathogen und spielen für diese Arbeit im Weiteren keine Rolle. Die RV nehmen unter den EV insofern eine Sonderstellung ein, als dass sie, wie bereits der Name (Rhis gr. = Nase) andeutet, hauptsächlich Erreger des oberen Respirationstrakt sind und, soweit bekannt, ausschließlich in respiratorischem Epithel proliferieren. Der Wortstamm Entero kommt ebenfalls aus dem Griechischen und bedeutet „Darm“, welcher für die meisten Enteroviren das Zielorgan mit der größten Virusvermehrung darstellt. Nach einer mittleren Inkubationszeit von 7 - 14 Tagen kommt es im Darmepithel zu einer starken Virusvermehrung, welche eine Viruslast von $10^6 - 10^9$ Viren pro Gramm Stuhl hervorruft. Diese hohe Viruslast begründet auch, warum zum Nachweis von EV üblicherweise Stuhlproben das Untersuchungsmedium der Wahl ist. Jedoch haben die meisten EV auch einen pharyngo-lymphoidalen Tropismus, weshalb die primäre Infektion im Rachenraum stattfindet. Dort können die Erreger bereits kurze Zeit nach der Infektion nachgewiesen werden.

Der Infektionsweg kann daher sowohl respiratorisch sein, als auch fäkal-oral. In Entwicklungsländern spielt die Kontamination von Trinkwasser eine bedeutende Rolle für die Übertragung. In Industrieländern sind besonders Kinder von Infektionen betroffen, da die Erreger durch fehlendes Hygienebewusstsein fäkal-oral durch Schmierinfektion, über Spielzeug, direkten Kontakt, Handtücher etc. weitergegeben werden. Zudem sind die unbehüllten EV besonders umweltstabil und auch durch handelsübliche alkoholische Desinfektionsmittel nicht zu zerstören. Die meisten EV weisen dazu noch eine ausgeprägte Säurefestigkeit auf, sodass sie die Magenpassage unbeschadet überstehen. Wohingegen RV bei einem pH-Wert unter 5 abgetötet werden. (vgl. Zeichenhardt & Grunert, 2010).

Die klinischen Manifestationen einer EV-Infektion erstrecken sich nicht bloß auf die Organe der größten Virusvermehrung, den Darm und Rachenraum, sondern präsentieren sich äußerst vielgestaltig (Tab. 2).

Tabelle 2: Klinische Erscheinungen von Enterovirus-Infektionen// Quelle: (Melnick, 1996; Pallansch & Roos, 2007)

Klinisches Erscheinungsbild	Virustypen
Exantheme	CV-A 4, 5, 6, 9, 16 und CV-B 5
Aseptische Meningitis	PV 1-3 und CV-A 2, 4, 7, 9, 10 und CV-B 1, 2, 3, 4, 5, 6 und E 1-7, 9, 11, 13-21, 25, 27, 30, 31 und EV 71
Hand- Fuß- Mundkrankheit	CV-A 5, 10, 16 und EV 71
Hepatitis	CV-A 4, 9 und CV B 5 und E 4, 9
Diabetes	CV-A 9 und CV-B 1-5
Konjunktividen	CV-A 24 und E 7,11 und EV 70
Respiratorische Infekte	CV-A 9, 16, 21, 24 und CV-B 4, 5 und E 4, 9, 11, 20, 25 und EV 68
Myokarditis und Perikarditis	CV-A 4, 14 ,16 und CV-B 1-5 und E 1, 6, 9, 19
Paralysen	PV 1-3 und CV-A 7,9 und CV-B 2-5 und E 4, 6, 9, 11, 30 und EV 70, 71, 85, 89, 90, 91, 96, 97, 100
Pankreatitis	CV-B 1,2
Herpangina	CV-A 2-6, 8, 10
Bornholmsche Krankheit (Pleurodynie, Myalgie)	CV-B 1-5
Uncharakteristische Fiebererkrankungen	Wahrscheinlich die meisten

Durch eine kurze Phase der Virämie, innerhalb der auch ein Virennachweis im Blut gelingen kann, infizieren die EV praktisch jedes Organsystem. Krankheitsverläufe von enteroviralen Infektionen weisen eine enorme Bandbreite auf, von relativ harmlosen Symptomen, wie unspezifischer Fiebererkrankung, Infektion des oberen Respirationstraktes oder dermatologischen Effloreszenzen (z. B. Exantheme und Herpangina), bis zu schwerwiegenden Erkrankung, wie Poliomyelitis, Myokarditis, Hepatitis oder Diabetes. Zudem sind viele Krankheitsbilder nicht streng an einen bestimmten Erreger gebunden. Wiederum kann sich auch eine Infektion mit demselben

Erreger ebenfalls sehr unterschiedlich manifestieren. Beispielsweise kann CV A 10 Herpangina, akute lymphatische Pharyngitis und die Hand-Fuß-Mundkrankheit verursachen. Und verschiedene Formen der Paralyse können durch mehrere Virustypen der EV Cluster A-D hervorgerufen werden (vgl. Melnick, 1996; Pallansch & Roos, 2007).

1.2.2. Epidemiologie der Enteroviren

1909 wurde das Poliomyelitis-Virus als erstes Enterovirus überhaupt beschrieben (Landsteiner & Popper, 1909). Dieses führte paradoxerweise erst ab Ende des 19. Jahrhunderts im mehrjährigen Turnus zu Epidemien, nachdem der krankheitsverhütende Stellenwert der Hygiene erkannt und in den Industrieländern zu entsprechenden Maßnahmen geführt hatte, wie Abwasserentsorgung, sauberes Trinkwasser etc.. Durch die verbesserte Hygiene waren die Erreger nicht mehr omnipräsent und führten somit nicht zwangsläufig schon im Kleinstkindalter zur Infektion (vgl. Zeichenhardt & Grunert, 2010). Während die Infektion mit dem Poliomyelitis-Virus im Kleinstkindalter überwiegend mild bis subklinisch verläuft, auch bedingt durch den „Nestschutz“ der in der Muttermilch enthaltenen Antikörper, kann sie im höheren Kindesalter zu den bekannten Symptomen einer schlaffen Lähmung führen. Durch die Entwicklung verschiedener Impfstoffe in den 1950er Jahren, konnte die Inzidenz von Poliofällen nach Angaben der WHO von 100.000 jährlich weltweit auf ca. 1.000 gesenkt werden. In weiten Teilen der Welt gilt das Poliovirus als ausgerottet. Obwohl Polio das bekannteste Enterovirus ist, ist es doch bei weitem nicht das einzige humanpathogene Enterovirus von klinischer Bedeutung. Auf Neonatalstationen sind beispielsweise auch heute noch verschiedene EV-Typen und Parechoviren (eine weitere Gattung der Picornaviridae) gefürchtet für sepsisähnliche Infektionen, Myo- und Periokarditis, Enzephalitis und schwere Diarrhö, die letal verlaufen können.

EV-Infektionen sind weltweit verbreitet. In den gemäßigten Zonen kommen die meisten Infektionen im Sommer und Herbst vor. In subtropischen und tropischen Ländern finden die Infektionen das ganze Jahr über statt. Mehr als 90 % aller EV-Infektionen verlaufen inapparent, jedoch mit Virusausscheidung (vgl. Zeichenhardt & Grunert, 2010).

Überregionale Epidemien durch non-polio-Enteroviren gibt es z. B. seit ca. 20 Jahren in Südostasien verursacht durch EV A-71. Dort kam es zu mehreren Epidemien und Ausbrüchen der Hand-Fuß-Mund-Krankheit sowie zu schweren neurologischen Symptomen und Todesfällen bei Kindern. In den USA werden laut CDC Angaben seit 1987 regelmäßig EV-D68-Infektionen festgestellt (Quelle (Zugriff am 24.1.2019): <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/ev-d68.html>). 2014 führte EV-D68 (EV68) erst in Amerika zu einer Epidemie, später wurde der Erreger auch in Europa nachgewiesen. Wobei auch in Europa schon vorher das Auftreten von EV-D68 seit 2008 zu beobachten war (Meijer *et al.*, 2012; Renois *et al.*, 2013). EV-D68 zeigt ähnlich den Rhinoviren einen ausgeprägten respiratorischen Tropismus und ist nicht magensäurebeständig und daher aus Stuhlproben nicht nachweisbar. Im Verlauf der Erkrankung zeigte sich oft erst Fieber und Symptome eines respiratorischen Infekts, im späteren Verlauf auch teilweise schlaffe Lähmungen wie bei einer Polio-Infektion. Der Nachweis von EV-D68 gelang allerdings nur in 20 % der Fälle von schlaffer Lähmung (vgl. Liana *et al.*, 2015). Bislang basierte das Überwachungssystem der WHO für Polio auf der Untersuchung von Stuhlproben, welche von allen Meningitispatienten mit EV-Nachweis im Liquor genommen werden. In Dänemark wurde nach den EV-D68-Ausbrüchen in den USA, das Überwachungssystem für EV auf die Untersuchung von respiratorischen Proben erweitert. Während einer Testphase wurden zwischen Januar 2015 und Oktober 2016 respiratorische Proben von 221 EV-positiven Patienten untersucht und dabei u.a. 15 Fälle von EV-D68 und EV-C-Stämmen nachgewiesen. Seit 2009 ist außerdem das Auftreten neuer EV der Spezies C zu verzeichnen, die einen respiratorischen Tropismus zeigen und neben respiratorischen Krankheitszeichen auch polioähnliche Symptome auslösen können (vgl. Barnadas *et al.*, 2017).

1.2.3. Diagnostik

Zu Beginn der Enterovirusdiagnostik standen Tierversuche mit Primaten. So gelang es Landsteiner und Popper erstmals das Poliovirus als Erreger der Poliomyelitis nachzuweisen, indem eine sterilfiltrierte, d. h. bakterienfreie Suspension vom Liquor eines achtjährigen Poliopatients zwei Affen intraperitoneal injiziert wurde. Der Rhesusaffe entwickelte daraufhin das Vollbild einer akuten Polimyelitis (Landsteiner &

Popper, 1909). Armstrong gelang es 1939 den Lansing Stamm des Poliovirus in Mäusen zu passagieren (Armstrong, 1939). 1949 beschrieben Enders *et al.* dann auch die erfolgreiche Passage des Virus *in vitro* per Zellkultur von humanem, embryonalen Gewebe (Enders *et al.*, 1949).

1.2.3.1. Antiseren

Die ursprüngliche Methode EV nachzuweisen und zu typisieren war eine serologische Methode mittels spezifischer Antikörper. In den 1950er Jahren wurden von Lim und Benyesh-Melnick (LBM) verschiedene Antiseren-Pools aus Affen- und Kaninchenseren dafür entwickelt (vgl. Lim & Benyesh-Melnick, 1960). In den 1960er Jahren gelang es Hampil und Melnick diese LBM Antiserenpools in großer Menge aus Pferdeserum herzustellen, welche ab 1973 weltweit zum Einsatz kamen (vgl. Melnick *et al.*, 1973). Insgesamt wurde mit den Pools das gesamte damals bekannte Spektrum von 61 EV-Serotypen abgedeckt.

Für die Typisierung mittels der Antiserenpools wurde eine Virusisolation auf Zellkultur, zumeist Zellen aus Affennieren, oder durch Inokulation von Säuglingsmäusen, vorgenommen. Das erhaltene Isolat wurde verdünnt, aliquotiert und mit Antiseren versetzt. Zeigte sich bei einer erneuten Inokulation der Mäuse bzw. Beimpfung der Zellkultur keine Virusvermehrung (Neutralisation), konnte anhand des verwendeten Antiserums auf den entsprechenden Virustyp geschlossen werden. Die Virusvermehrung in der Zellkultur wurde mikroskopisch festgestellt, da EV typische morphologische Veränderungen an den Wirtszellen verursachen.

Seit der Erkenntnis, dass sich das Poliovirus hauptsächlich im Zentralnervensystem und Verdauungstrakt vermehrt (vgl. Paul, 1971; Sabin & Ward, 1941), waren Liquor und Stuhlproben die verwendeten Probenmaterialien. Durch das Aufkommen respiratorischer EV, wie des EV-D68, wird aber auch zunehmend respiratorisches Material wie Rachen- oder Nasenabstrich in der EV-Diagnostik verwendet.

1.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (kurz PCR, engl. für „polymerase chain reaction“) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Amplifikation von DNA. Auch ein virales RNA-Genom kann amplifiziert werden, wenn es zuvor mittels des Enzyms Reverse

Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben wurde. Der Reaktionsansatz wird in einem speziellen Gerät, dem Thermocycler, zyklisch auf verschiedene Temperaturen erhitzt und abgekühlt. Bei einer bestimmten Temperatur wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Anschließend lagern sich spezifische Oligonukleotide, die Primer, jeweils an eine komplementäre Region der DNA an. Sie dienen als Startsequenz für das Enzym Taq-Polymerase, welches aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird und durch seine Thermostabilität auch bei Temperaturen von 100°C nicht denaturiert. Durch den Einsatz dieses speziellen Enzyms ist es möglich, denselben Ansatz mehreren thermischen Zyklen zu unterwerfen, ohne das Enzym nach jedem Zyklus erneut zugeben zu müssen. Die Primer sind spezifisch für eine bestimmte DNA-Region hergestellt, sodass sich nur die DNA-Abschnitte vervielfältigen, welche durch die Primer markiert wurden. Die PCR setzt sich aus drei Phasen je Zyklus zusammen. In der ersten Phase wird die DNA bei ca. 95 °C aufgeschmolzen. In Phase 2 binden die Primer an die komplementäre Region der Einzelstränge bei einer Temperatur zwischen 50 und 60 °C. In Phase 3 erfolgt die Elongation des komplementären Strangs von den Primern ausgehend durch die Taq-Polymerase bei einer Temperatur zwischen 60 und 72 °C.

Moderne Diagnostik von EV erfolgt überwiegend mittels verschiedener PCR-Verfahren. Beispielsweise wird aus einem Probenpool mit unbekanntem Erregern in erster Instanz eine Multiplex-PCR durchgeführt. Jede Probe wird in einem Ansatz mit mehreren spezifischen Primern und dazugehörigen Sonden analysiert. Mit Hilfe spezifischer Primer und Sonden können verschiedene Virus-Genera nachgewiesen werden. Falls die Probe entsprechendes genetisches Material enthält, kommt es zur Amplifikation der spezifischen Genregion. Dies kann je nach Verfahren zu einem spezifischen Signal aufgrund der fluoreszenzmarkierten Sonden führen oder gelelektrophoretisch festgestellt werden.

Zur weiteren Typisierung der EV können spezifisch amplifizierte Gensegmente molekularbiologisch mittels Sequenzierung untersucht werden. Die erhaltenen Sequenzen werden dann in Gendatenbanken eingespeist und mit den darin enthaltenen Sequenzen bekannter Viren verglichen. Auf diese Weise erhält man bei erfolgreicher Sequenzierung eine Liste homologer Sequenzen und somit den gewünschten Genotyp.

1.3. EMBIS Studie

Zur Überwachung der Grippeaktivität in Bayern wurde 2009 ein Netzwerk aus niedergelassenen Ärzten gegründet, das Bayern Influenza Sentinel (BIS). Alle teilnehmenden Ärzte senden zwei Rachenabstriche pro Woche (Sigma-Swab® in Sigma-Virocult®-Medium, Fa. Medical Wire & Equipment Co.) von zufällig ausgewählten Patienten mit akuter Atemwegsinfektion an das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL). Das BIS wird ganzjährig durchgeführt, mit Schwerpunkt auf KW 40 bis KW 15. Im Rahmen dieser dauerhaften Influenzaüberwachung wurde 2013/14 das Projekt Erregermonitoring im Bayern Influenza Sentinel (EMBIS) gestartet, zu dem Zeitpunkt, als die Influenza-positiv-Rate die 20 % Schwelle überstieg (Abb. 7).

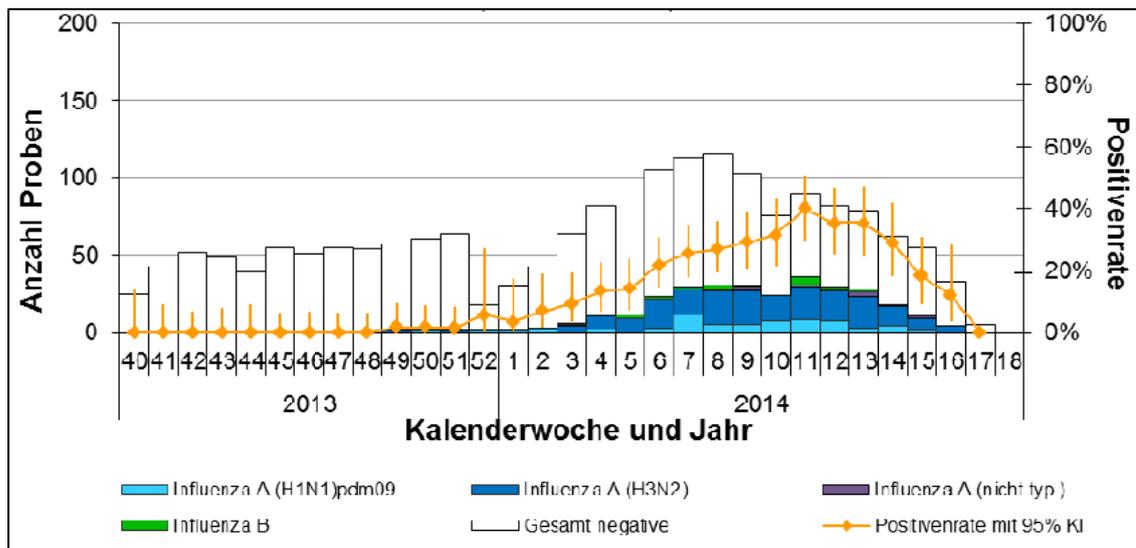


Abbildung 7: Labornachweise der Probeneinsendungen im BIS: Rachenabstriche //Quelle: LGL-Monitor InfEpi Ausgabe zur 17. Meldewoche 2014

Hierbei wurden alle eingesendeten influenza negativen Proben mittels xTag RVP („respiratory viruses PCR“) der Fa. Luminex, einem Multiplex-PCR-Verfahren speziell für respiratorische Viren, auf 16 verschiedene virale Erreger getestet. Insgesamt wurden 616 Proben untersucht, wovon 17 %, das sind 105 Proben, positiv auf Entero-/Rhinoviren getestet wurden (Abb. 8). Diese 105 Proben wurden als Ausgangsmaterial für die Erstellung der vorliegenden Doktorarbeit verwendet und dafür pseudonymisiert.

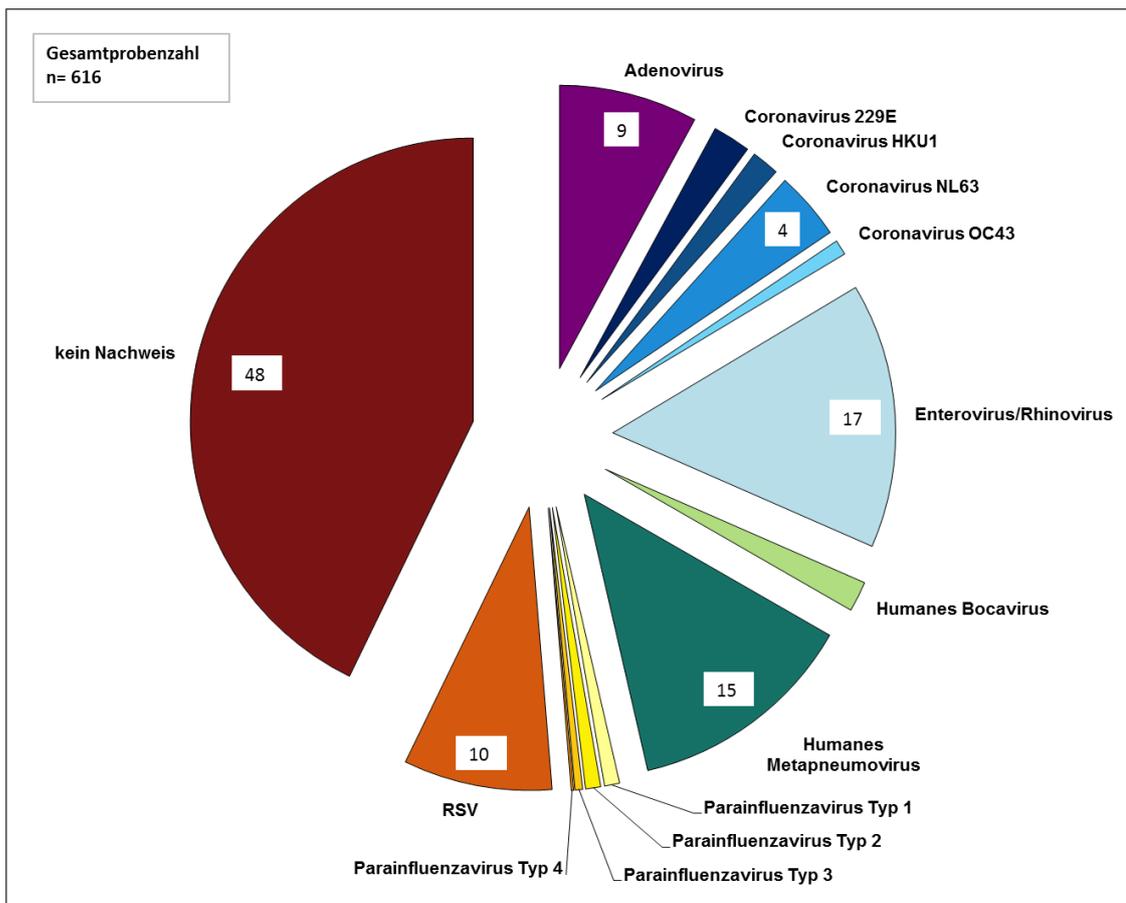


Abbildung 8: Ergebnisse der EMBIS Studie von KW40 2013- KW17 2014; Erregernachweis in Prozent// Quelle: Susanne Heinzinger, LGL

2. Fragestellung

Seit einigen Jahren wird das Auftreten von Infektionen mit bestimmten EV-Typen beobachtet, welche nicht aus den üblicherweise eingesandten Stuhlproben diagnostiziert werden können. An erster Stelle ist hier EV-D68 zu nennen nebst anderen EV der Spezies C, welche sich nur aus respiratorischen Proben nachweisen lassen. Im Verlauf der Erkrankung zeigen sich oft erst Fieber und Symptome eines respiratorischen Infekts, im späteren Verlauf auch teilweise schlaife Lähmungen wie bei einer Polio-Infektion. Für die EMBIS-Studie von 2013/2014 wurden 616 respiratorische Proben von Patienten mit Grippesymptomen zusammengetragen. Hiervon waren 105 positiv auf Entero- und Rhinoviren getestet worden.

- I. Zuvorderst galt es den Anteil der Enteroviren aus dem gemeinsamen Pool der Entero- und Rhinovirus-positiven Proben der EMBIS-Studie zu ermitteln.
- II. Vor dem Hintergrund des Aufkommens von EV-68, EV-70 und anderer respiratorischer Enteroviren der EV-C-Spezies, welche sich nur aus respiratorischen Proben nachweisen lassen, sollte herausgefunden werden, inwieweit sich diese aus den respiratorischen Proben der EMBIS-Studie in Bayern typisieren lassen. Deshalb sollte im Einzelnen bestimmt werden, welcher EV-Typ vorlag.
- III. Einerseits wurden zur Typisierung der EV die am LGL etablierten Methoden der Virusisolierung per Zellkultur und anschließender Identifizierung mittels des Neutralisationstest unter Verwendung der LBM-Antiseren-Pools herangezogen.
- IV. Da nicht alle EV mit Hilfe des Neutralisationstestes identifiziert werden können sollte andererseits überprüft werden, ob durch die PCR der 5'-NTR-Region und anschließender Sequenzanalyse eine eindeutige Typisierung der respiratorischen EV möglich ist.
- V. Falls die 5'-NTR-Region zur Identifizierung der EV nicht den gewünschten Erfolg liefert, sollte eine alternative PCR-Methode unter Verwendung der VP1-Region etabliert und zur Typisierung der vorliegenden respiratorischen EV Einsatz finden.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

Permanente Zellkulturen:

- RD-Zellen: Rhabdomyosarkoma-Zellen, human
ATCC, Bestellnummer: CCL-136, Charge: 59400542
Lagerung: Flüssigstickstoff -196 °C

Zellkulturmedien und Reagenzien:

Gebrauchslagerung im Kühlschrank, Langzeitlagerung bei -20 °C

- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen-Strep), 100x, Tissue Culture Grade, sterilfiltriert, Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml (Fa. Sigma-Aldrich)
- Fetales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert (Fa. Gibco)
- Trypsin (0,05 %) mit EDTA (0,02 %, Ethylendiamintetraacetat), 100 ml (Fa. Genaxxon), zum Gebrauch mit 1 ml Pen-Strep versetzt
- Enterovirus-Antisera-LBM-Typing-Pools-Stocklösung (A-H): je in 10 ml MEM ohne FKS lösen (10x) und in 500 µl Portionen aliquotiert lagern
- Enterovirus-Antisera-LBM-Typing-Pools-Arbeitslösung (1x): Stocklösung 1:10 mit MEM ohne FKS verdünnen, in 120 µl, 240 µl und 360 µl Aliquots lagern

Lagerung im Kühlschrank

- Kulturmedien:
 - 500 ml MEM Earle's Medium mit stabilem Glutamin (Fa. Millipore)
 - 500 ml DMEM Medium mit Glukose, stabilem Glutamin (Glutamax) und Pyruvat (Fa. Gibco)
 - 50 ml Fetales Kälberserum
 - PBS Dulbecco (Phosphate Buffered Saline) ohne Calcium und Magnesium (Fa. Biochrome)
- Isopropanol

Lagerung bei Raumtemperatur

- Kohrsolin-Lösung (3 %)
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- Mycoplasma Off-Spray
- Trypanblaulösung (0,5%)

Benötigte Materialien:

- Eppendorf-Pipetten für 100 µl und 1.000 µl
- Pipettierhilfe für Einmalpipetten
- Multipette für Combitips
- Spitzen mit Filtereinsatz, steril (100 µl und 1.000 µl)
- Aspirationspipetten, einzeln verpackt, steril (2 ml)
- Einmalpipetten, einzeln verpackt, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml)
- Combitips, einzeln verpackt, steril (10 ml; 1 Hub = 200 µl)
- Ethanol-resistenter und wasserfester Stift
- Zellkulturflaschen mit Filtereinsatz im Deckel (T75), steril
- 24-Well-Platten mit Deckel, einzeln verpackt, steril
- 96-Well-Platten mit Deckel, einzeln verpackt, steril
- 50 ml Polypropylen-Röhrchen, selbststehend mit Deckel, steril
- 15 ml Plastikröhrchen, steril
- Reaktionsgefäße, 1,5 ml, steril
- Ständer für Kryoröhrchen, Reaktionsgefäße und andere Röhrchen
- 3 ml Spritzen, einzeln verpackt
- Gelber Abwurfbehälter für infektiösen Abfall
- Kryoröhrchen (cryo tube), 1,8 ml mit Außengewinde, steril
- Spritzenvorsatzfilter, Membran regenerierter Cellulose, mit Porengröße 0,2 µm , einzeln verpackt, Fa. Sartorius

Benötigte Geräte:

- Absaugpumpensystem mit autoklavierbaren Auffangbehälter
- Zwei Sicherheitswerkbänke für das ZK-Arbeiten mit und ohne Probenmaterial
- Kühlschrank 4 - 8 °C
- Tiefkühlschränke -20°C und -80 °C
- Cryo-Behälter für Konservierung von Zellen
- Zwei CO₂ -Brutschränke, 37 °C mit 5 % CO₂, für das Inkubieren mit und ohne Probenmaterial
- Umkehrmikroskop mit Plattenteller, Objektiv 10x, Okular 10x (Fa. Leica)
- Zentrifuge, 1500 UpM - nur für Zellkulturen zu verwenden
- Wasserbad, auf 30 - 37 °C einstellbar
- PCR-Cycler (Fa. Agilent)
- Mr. Frosty Freezing Container
- Mini Cooler
- Kryoschläuche zum Konservieren der Masterbank
- Bunsenbrenner
- Metallpinzette
- Probenköcher aus Aluminium für flüssigen Stickstoff-Tank
- Kryohandschuhe
- Spritzschutzvisier
- Vortex-Schüttler
- Plattenrüttler (Micro-Shaker)

3.1.2. Start einer neuen Zelllinie permanenter Zellen

Um vorhandene lebensfähige Viren aus den Patientenproben zu vermehren und für weitere Untersuchungen nutzbar zu machen, wurde eine für EV-spezifische Zelllinie mit dem Probenmaterial beimpft und inkubiert. Die Virusvermehrung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Es wurden Monolayer bildende permanente humane Rhabdomyosarkom-Zellen (RD-Zellen) verwendet, da diese in der Routine des Labors standardmäßig Einsatz fanden. Zudem handelte es sich um ein zertifiziertes Labor, das durch Teilnahme an Ringversuchen auch regelmäßig extern überprüft wird. Permanente Zellen sind immortalisierte Zellen, deren Wachstum nur durch Nährstoff- oder

Platzmangel begrenzt wird. Im Falle der RD-Zellen sind dies Krebszellen aus dem Rhabdomyosarkom eines 7-jährigen Kaukasischen Mädchens. Die verwendeten RD-Zellen wurden kommerziell erworben und bei -196 °C im Flüssigstickstofftank gelagert. Vor der Verwendung der Zelllinie für die Virusisolierung, wurde eine Masterbank und eine Arbeitsbank angelegt, das heißt die kleine Menge an erworbenen Zellen wurde vermehrt und wieder bei -196 °C konserviert, um auf Dauer Zellen mit vergleichbarer Passagenzahl verfügbar zu haben. Das verwendete Kulturmedium hierfür war DMEM, ein nährstoffreiches Medium angereichert mit Glukose, stabilem Glutamin und Pyruvat sowie versetzt mit 10 % FKS und 1x Pen-Strep.

Anlegen der Master- und Arbeitsbank und Trypanblaufärbung

Das Kulturmedium DMEM wurde im Wasserbad vorgewärmt auf 37°C, ebenso das Kryoröhrchen mit den neu erworbenen Zellen. In ein 15 ml Röhrchen wurden 2 ml Kulturmedium gegeben, der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens hinzu pipettiert, das Röhrchen bei 1500 UpM 5 Minuten lang zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und die sedimentierten Zellen am Boden mit 2ml Kulturmedium resuspendiert.

Um die Vitalität der Zellen abzuschätzen, wurde an dieser Stelle eine Trypanblaufärbung ohne Berechnung der Zellzahl vorgenommen. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung (0,5%) vermischt, die Zellsuspension in eine Zählkammer platziert und unter dem Durchlicht-Mikroskop betrachtet. Der Farbstoff kann durch die Membran vitaler Zellen nicht eindringen und daher erscheinen sie gelblich, wohingegen avitale Zellen blau gefärbt sind (Abb. 9). Eine Vitalität von $\geq 30\%$ war für eine Zellvermehrung ausreichend.

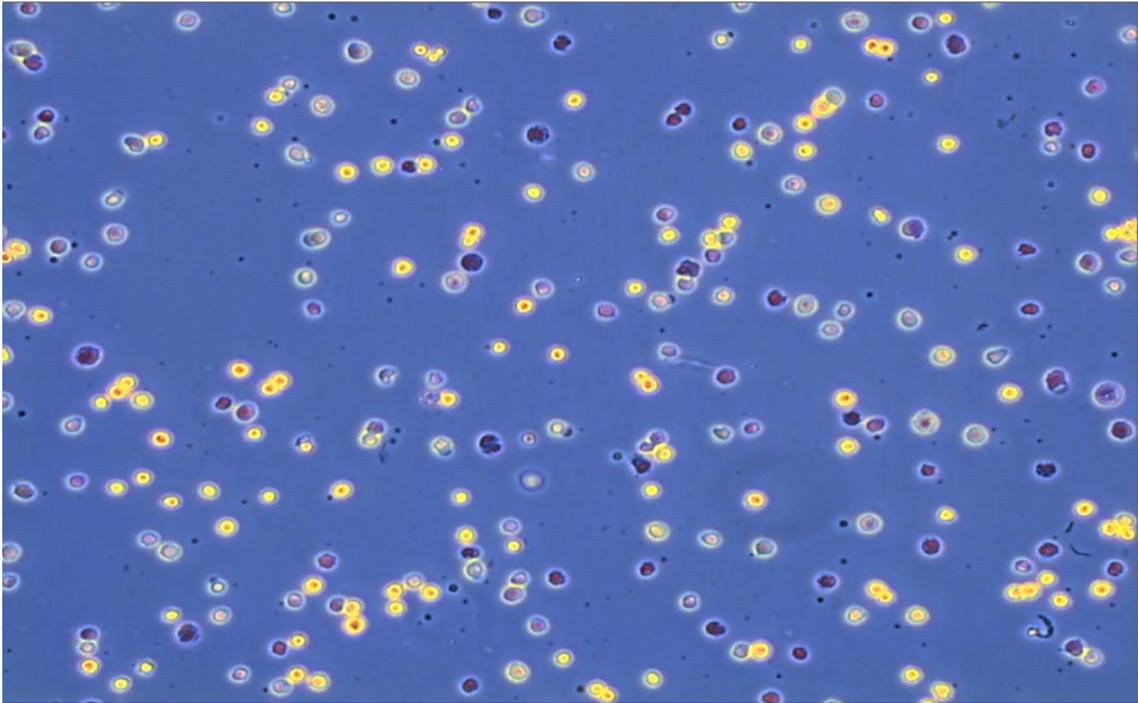


Abbildung 9: RD-Zellen im Lichtmikroskop nach Trypanblaufärbung

Die verbleibende Zellsuspension (ca. 2 ml) wurde nun in zwei 75T-Zellkulturflaschen mit je 30 ml DMEM-Kulturmedium verteilt und diese anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Sobald eine Konfluenz von 90 – 100 % erreicht war (Abb. 10), wurde die Kultur auf Vermehrung gesplittet, d. h. die Zellen wurden geerntet und auf drei neue Flaschen mit frischem Medium verteilt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt, sodass am Ende neun 75T-Flaschen mit je 90 – 100 % Konfluenz erzielt wurden. Die Zellen aus acht Flaschen wurden geerntet, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellsediment in 8 ml Einfriermedium aus 90 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen zu je 1 ml bei -196 °C als sogenannte Masterbank konserviert. Zur langsamen Abkühlung der Zellen wurden die Kryoröhrchen in ein „Mister Frosty“-Gefäß gestellt, über Nacht auf -80 °C abgekühlt und am nächsten Tag in den Flüssigstickstoff-Tank zur Lagerung überführt. Die Zellen der 9. Flasche wurden auf die gleiche Weise auf Vermehrung gesplittet bis neun 75T-Flaschen erzielt wurden. Die Zellen aus acht Flaschen wurden, wie die Zellen der Masterbank, geerntet und bei -196 °C als sogenannte Arbeitsbank konserviert. Die Zellen der 9. Flasche wurden nun ihrer Verwendung im Laboralltag zugeführt.

Allgemeine Handhabung der Zellkultur

Im Wasserbad bei 37 °C wurden das Kulturmedium MEM mit stabilem Glutamin, der Waschpuffer PBS und die Trypsinlösung vorgewärmt. Die zu splittende Zellkultur in einer 75T-Flasche wurde unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet, um die Zelldichte/Konfluenz zu bestimmen. Hier konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellzahl pro Flasche und der Konfluenz angenommen werden: $9,4 \times 10^6$ Zellen pro 75T-Flasche entsprechen einer Konfluenz von 100 %. Die Konfluenz ist ein wichtiger Faktor, um beim Splitten der Zellen eine bestimmte Startkonzentration an Zellen in der neuen Kultur zu erreichen. Lag diese im festgelegten Normbereich zwischen 90 und 100 %, wurde in der Sterilbank das verbrauchte Medium zuerst abgesaugt. Da die Zellen adhäsiv am Boden der Flasche haften, ist von einem zu vernachlässigenden Verlust an vitalen Zellen auszugehen. Anschließend wurde die 75T-Flasche mit 10 ml PBS gewaschen, um mehrwertige Kationen zu binden, welche die Aktivität des Enzyms Trypsin hemmen würden. Trypsin spaltet die adhäsive Verbindung der Zellen zum Flaschenboden. Deshalb wurde der Zellrasen mit 2 ml Trypsinlösung geflutet und für 2 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um die Enzymaktivität zu steigern. Danach wurde optisch kontrolliert ob sich der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst hatte, ggf. wurde durch Ausklopfen nachgeholfen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml MEM versetzt, um die weitere Enzymaktivität des Trypsins, durch die enthaltenen Kationen aus dem FKS, zu inhibieren. Daraus resultiert eine Zellsuspension von insgesamt ca. $9,4 \times 10^6$ Zellen in 12 ml. Entsprechend der gewünschten Startkonfluenz für die neue Zellkultur wurde die gewonnene Zellsuspension verdünnt. Für 75T-Flaschen, die erst eine Woche später geerntet werden sollten, wurde eine Konfluenz von 10 % gewählt und dem gemäß 1,2 ml Zellsuspension mit Medium auf 20 ml aufgefüllt und in eine neue 75T-Flasche pipettiert.

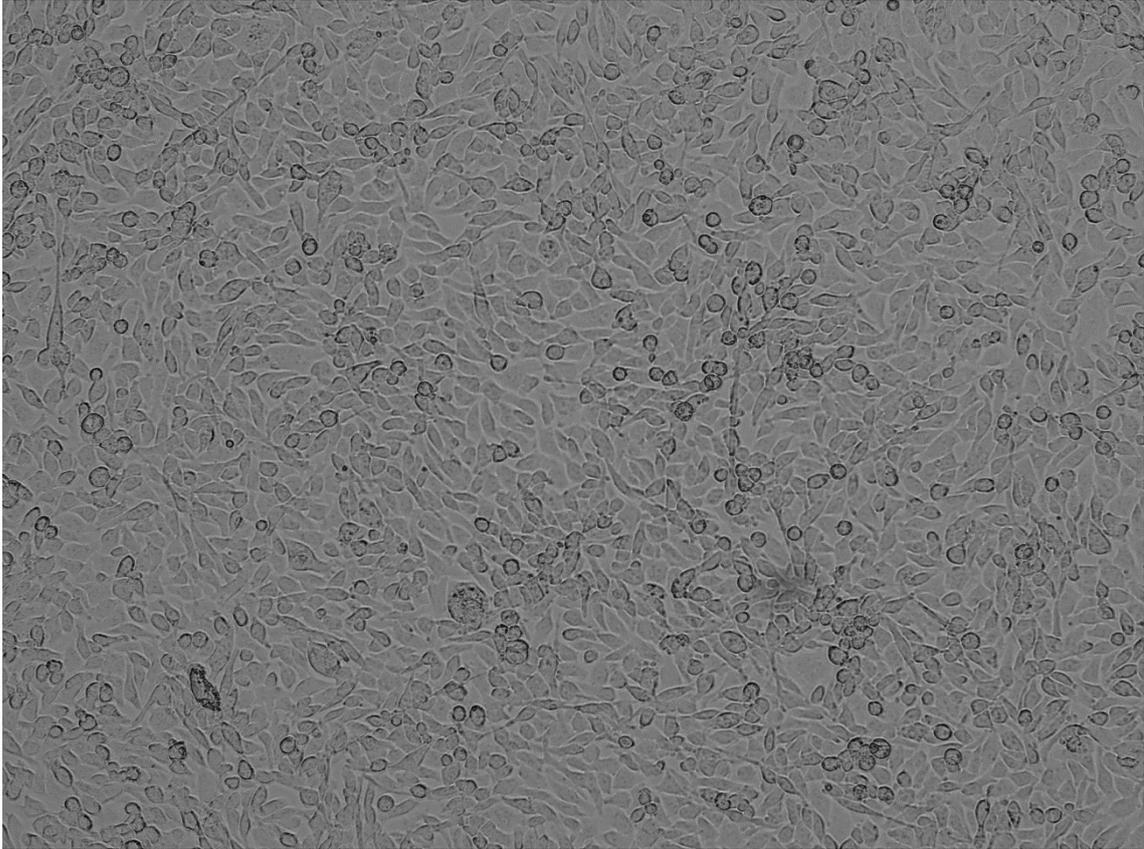


Abbildung 10: RD-Zellen in 75T-Flasche, 100 % Konfluenz, CPE 0.

Für eine 24-Well-Platte wurde angenommen, dass 100 % Konfluenz einer Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen entsprechen. Die Startkonfluenz wurde auf 20 % festgelegt, damit innerhalb von 2 Tagen eine Konfluenz von 90 – 100 % erzielt werden konnte. Das Füllvolumen pro Näpfchen beträgt 1 ml und die benötigte Menge Zellsuspension, welche für 24 Wells benötigt wird, wurde wie folgt berechnet:

$$x = \frac{c \times z \times w}{k \times f} \times 12 \text{ ml}$$

c = gewünschte Startkonfluenz pro Well (in %); z = Zellzahl pro Well bei 100 % Konfluenz; w = Anzahl der Wells; k = Konfluenz der gesplitteten Flasche (in %); f = Zellzahl pro Flasche bei 100 % Konfluenz.

3.1.3. Virusisolierung

Die Virusisolierung bezeichnet den ersten Schritt der Zellkultur. Hierbei wird die Viruskonzentration der Patientenprobe stark vermehrt. Voraussetzung ist, dass genug lebensfähige Viren in der Probe enthalten sind und diese auf der verwendeten Zelllinie anwachsen können. Das Probenmaterial bestehend aus der Abstrichsuspension (Sigma-Virocult®) entstammte dem eingelagerten Probenpool der EMBIS-Studie. Die Proben wurden bei -80 °C konserviert, für den Untersuchungszeitraum bei -20 °C zwischengelagert und nur für die notwendigen Arbeitsschritte der Virusisolierung kurz aufgetaut. Für die Virusisolierung wurde eine Zellkultur auf 24-Well-Platten mit 90 – 100 % Konfluenz des Zellrasens verwendet. Es wurden je Probe 500 µl Suspension entnommen. Diese wurde mit 100 µl verbrauchtem, sterilem Zellkulturmedium gestreckt und mit einer 3 ml Spritze und einem Spritzenvorsatzfilter mit 0,2 µm Porendurchmesser sterilfiltriert. Das Sterilfiltrieren war notwendig, da die Mundhöhle eine Unmenge an Bakterien, Pilzen und Viren beherbergt. Es sollten aber lediglich Viren den Filter passieren und dafür ein entsprechender Porendurchmesser gewählt, welcher die deutlich größeren Bakterien und Pilze im Filter zurückhält. Diese könnten ansonsten ebenfalls auf der Zellkultur anwachsen und diese so kontaminieren, dass sie für weitere Untersuchungen unbrauchbar wären. Die Streckung der Probe erfolgte aus technischen Gründen. Einerseits um das Totraumvolumen des Filters zu kompensieren und andererseits durch ein höheres Spülvolumen die potentiell vorhandenen Bindungsstellen der Membran mit Proteinen aus dem Medium zu sättigen, damit weniger Viren durch die Membran zurückgehalten werden.

Aus 600 µl Suspension wurden 450 µl Filtrat erhalten. Jede Virusisolierung wurde als Doppelansatz durchgeführt. Dazu wurden je 110 µl in zwei Näpfchen der 24-Well-Platte pipettiert. Die restliche Suspension wurde in Kryoröhrchen bei -80°C konserviert. Auf jeder Platte wurden im Doppelansatz je zwei Näpfchen der Zellkultur nicht beimpft und so als Negativkontrolle mitgeführt. Je Platte wurde zudem zwei Näpfchen als Positivkontrolle geführt, welche mit dem Überstand einer Positivkontrolle einer anderen Virusisolierung aus der Routine beimpft wurde, deren Erreger bekannt war (E6) und zu einem raschem und deutlichem CPE geführt hatte.

Nach 2 Tagen Inkubationszeit wurden die beimpften Platten mikroskopisch betrachtet und der Zustand der Zellen beurteilt. Zeigten sich morphologische Veränderungen und ein Absterben des Zellrasens, wurde dies als zytopathischer Effekt (CPE) und damit als Zeichen für eine Virusvermehrung angesehen. Je nach Ausmaß wurde der CPE in 4 Stufen unterteilt (Tab. 3). Die Abbildungen 11 bis 14 zeigen die dazugehörigen mikroskopischen Bilder der entsprechenden CPE-Stufen 1 bis 4.

Tabelle 3: Beschreibung der Kriterien zur Einteilung des zytopathischen Effekts (CPE)

CPE 1	Einige Abkugelungen, aber überwiegend intakter Zellrasen.
CPE 2	Deutlich vermehrte Abkugelungen und ca. 60% intakter Zellrasen.
CPE 3	Ca. 80% Abkugelungen, viele aufschwimmende Zellen, maximal 20% intakter Zellrasen.
CPE 4	„Alles schwimmt“ d.h. kein Zellrasen mehr erkennbar, Zellen schwimmen frei im Medium.

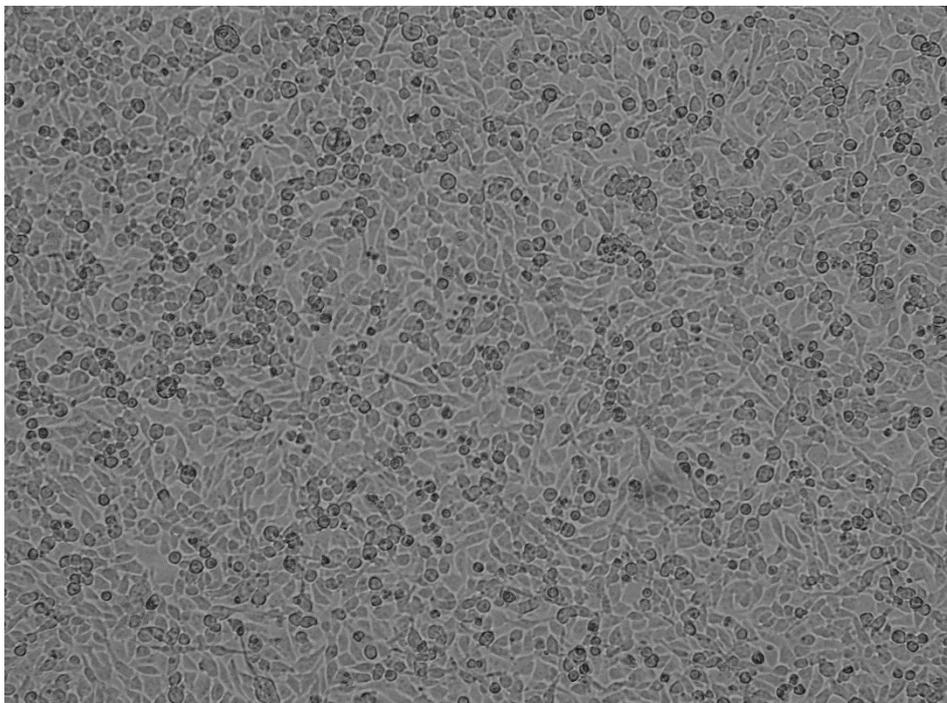


Abbildung 11: Einige abgekugelte Zellen, aber überwiegend intakter Zellrasen.

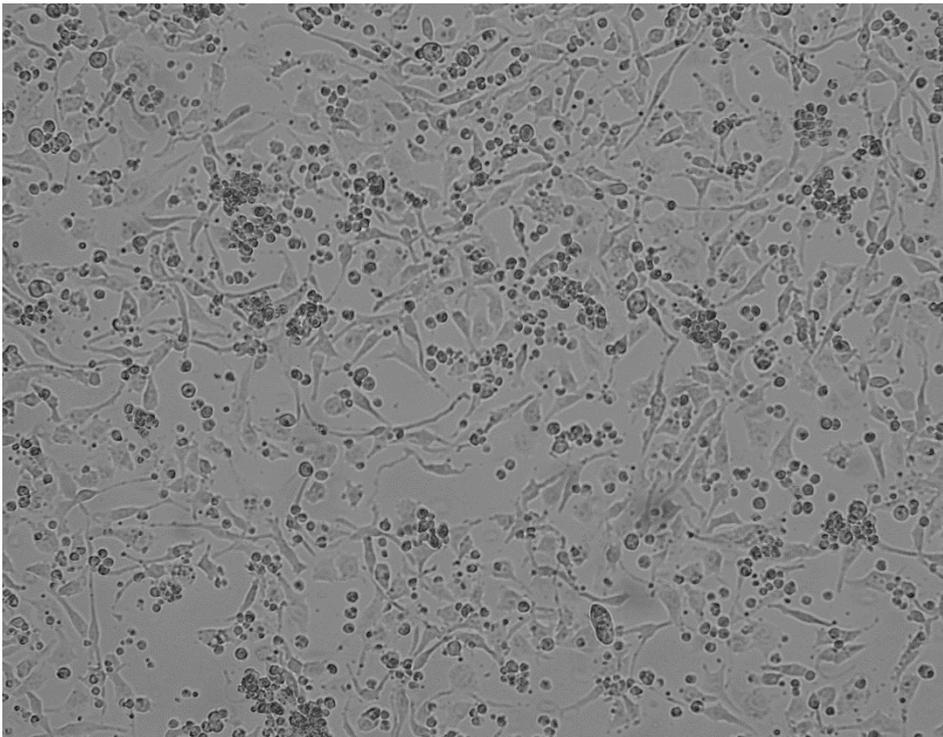


Abbildung 12: CPE 2 - Deutlich vermehrte Zell-Abkugelungen, noch ca. 60% intakter Zellrasen.

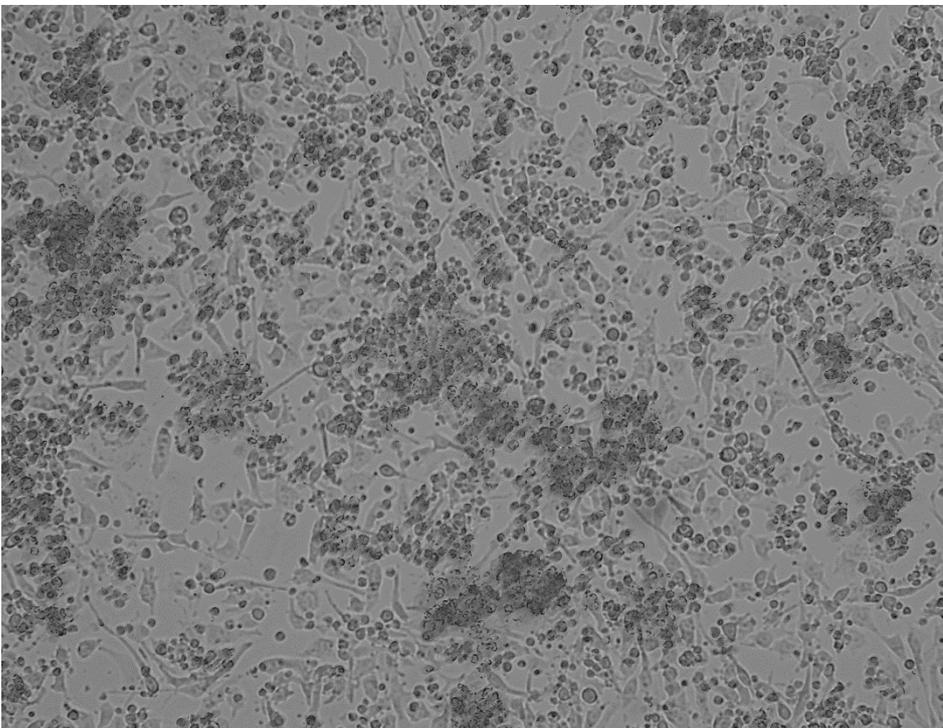


Abbildung 13: CPE 3 - Ca. 80% Zell-Abkugelungen, viele aufschwimmende Zellen, maximal 20% intakter Zellrasen.

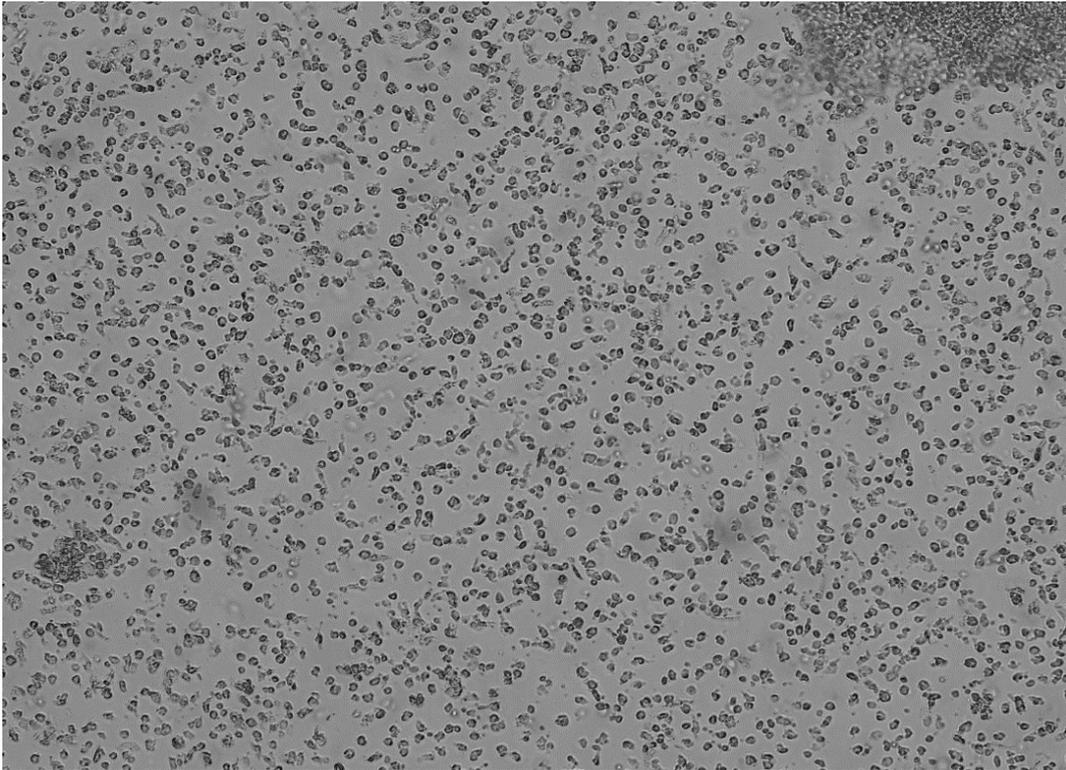


Abbildung 14: CPE 4 - „Alles schwimmt“ d.h. kein Zellrasen mehr erkennbar, Zellen schwimmen frei im Medium.

Nach der Isolierung wurden immer zwei Passagen der Kultur durchgeführt. Dies um einen potentiellen CPE von einem möglichen zytotoxischen Effekt zu diskriminieren. Dieser könnte u.a. durch Toxine in der Abstrichsuspension verursacht werden. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Nährstoffe einer Platte mit der Zeit verbrauchen, wodurch die Zellen ihren Stoffwechsel herunterfahren und auch die Virusvermehrung letztlich zum Erliegen kommt. Deshalb wurde auch ohne erkennbaren CPE in der Isolierung, die Kultur zweimal passagiert. Dies mit dem Ziel einem Virus mit langsamer Vermehrungsrate, niedriger Virulenz oder einer Probe mit niedriger Viruskonzentration mehr Zeit zur Replikation zu geben. Für die Passage wurde eine neue 24-Well-Platte mit Zellkultur vorbereitet und nach Erreichen einer Konfluenz von 90 – 100 %, wurden je 110 µl aus jedem Napf der Isolierung in ein entsprechendes Napf der neuen Passage-Platte überführt.

Zeigte sich bei einer Probe ein deutlicher CPE, wurde der gesamte Überstand der positiven Wells abpipettiert und sterilfiltriert, um freischwimmende Zellen abzutrennen

und Sterilität in Bezug auf Bakterien und Pilze sicherzustellen. Das Filtrat wurde bei -20 °C konserviert. Die CPE-negativen Zellkulturen wurden nach der zweiten Passage verworfen.

3.1.4 Titration

Von dem Überstand jeder positiven Probe wurde per Titration eine Verdünnungsreihe erstellt. Bedingung hierfür war, dass ein deutlicher CPE von mindestens dreifach positiv zu sehen ist. Für die Verdünnungsreihe wurde in 10 Nöpfchen einer 24-Well-Platte je 450 µl MEM (plus Pen-Strep, ohne FKS) vorgelegt. Dann wurde in das erste Well 50 µl des konservierten Filtrats (s. 3.1.3) pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren durchgemischt. Als nächstes wurden 50 µl vom ersten Nöpfchen ins zweite pipettiert und vermischt und so weiter fort bis zum letzten Nöpfchen, sodass Schritt für Schritt die Konzentration viraler Partikel um den Faktor 10 abnahm. Aus jedem Nöpfchen der Verdünnungsreihe wurden je 100 µl in zwei Nöpfchen einer 24-Well-Platte mit 90 – 100 % konfluenter Zellkultur pipettiert. Diese Platte wurde, wie bei der Isolierung, im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 2, 3 und 4 Tagen Inkubationszeit wurde mikroskopisch festgestellt, bis zu welcher Verdünnungsstufe CPEs auftreten. Als Zielverdünnung für den Kopenhagen-Test wurde jener Titer gewählt, welcher näherungsweise 100 – 300 TCID₅₀ entsprach. TCID₅₀ bezeichnet die Konzentration, bei der 50 % der Zellen infiziert sind. Als TCID₅₀ wurde jene Titrierungsstufe angenommen, welche in der Verdünnungsreihe als letztes noch einen CPE zeigte. Zwei Zehnerpotenzen oberhalb dieser Verdünnungsstufe wurde als 100 – 300 TCID₅₀ festgelegt.

3.1.5. Kopenhagen-Test

Für diesen Neutralisationstest wurde der LBM-Antiseren-Pool, bestehend aus 8 Antiseren des WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research in Kopenhagen verwendet. Die isolierte Virussuspension (Filtrat) wurde auf den, bei der Titration ermittelten Wert, von 100 – 300 TCID₅₀ verdünnt.



Abbildung 15: Kopenhagen-Test: links: Ansatz zur Inkubation von Antiseren und Virussuspension; rechts: Zellkultur mit inkubiertem Ansatz. Probennummern wurden geschwärzt.

Dafür wurde auf einer 24-Well-Platte jeweils 540 µl MEM (+ AB, ohne FKS) pro Näpfchen vorgelegt, wobei das Näpfchen der Zielverdünnung mit der doppelten Menge beschickt wurde. 60 µl der aufgetauten Filtrats aus der Virusisolierung wurden ins erste Well gegeben und mit der Pipette gemischt. Dann wurden 60 µl auf gleiche Weise ins nächste Well überführt und so weiter fort, wobei in das letzte Well die doppelte Menge überführt wurde, sodass 1200 µl verdünnte Virussuspension erzielt wurden. Von dieser wurden je 110 µl in 8 Näpfchen einer 96-Well-Platte gegeben, 220 µl in eines für die Positivkontrolle (als AG für Antigen bezeichnet) und 220 µl Medium in ein weiteres Näpfchen für die Negativ- und Sterilitätskontrolle. Von den 8 Antiseren mit den Namen A, B, C, D, E, F, G, H wurden je 110 µl in ein Well mit 110 µl Virussuspension gegeben und mit der Pipette vermischt (Abb. 15). Danach kam die Platte für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Brutschrank, um dem Ansatz Zeit für die Antigen-Antikörper-Komplexbildung zu geben.

Im Anschluss wurden, wieder im Sinne des Doppelansatzes, zweimal je 110 µl aus jedem Well der 96-Well-Platte in ein Well einer ausreichend konfluent bewachsenen 24-Well-Platte überführt. Diese wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 2, 3 und 4 Tagen wurde die Platte mikroskopisch auf CPEs untersucht. Wenn bei einem Ansatz mit einem bestimmten Antiserum kein CPE oder im Vergleich zu den anderen Ansätzen ein sehr schwacher CPE auftrat, wurde von einer Neutralisation des Virus durch die Antikörper im entsprechenden Serum ausgegangen. Anhand des Neutralisationsschemas in Abbildung 16 wurde entsprechend dem

Neutralisationsmuster der zugehörige Erregertyp festgestellt. Zeigen z. B. die Wells mit den Antiseren C und D keinen CPE, so handelt es sich laut Liste um den Virustyp E6.

If neutralized by pool(s):	Virus is:*	If neutralized by pool(s):	Virus is:*
A	E15	CD	E6
B	E21	CE	CB5
C	E24	CF	P1
D	E25	CG	CB3
E	E11	CH	E12
F	E27	DE	E13
G	E31	DF	E14
H	CA16	DG	E16
		DH	P3
AB	CA7	EF	E18
AC	CB1	EG	E17
AD	E33	EH	E22
AE	CB4	FG	E20
AF	E7	FH	CB6
AG	E4	GH	E23
AH	E1	ACF	E29
		AEG	E5
BC	E2	BDF	E26
BD	CB2	BFH	E9
BE	P2	CEG	E30
BF	E19	DEH	E32
BG	CA9		
BH	E3		

Abbildung 16: Neutralisationsschema LBM Pool A-H zum Kopenhagen-Test. Hiermit wird der Virustyp anhand der Neutralisationsmuster bestimmt // Quelle: (Melnick & Wimberly, 1985)

3.2. Polymerase-Kettenreaktion

Verschiedene PCR-Verfahren und verschiedene Primer wurden zur Typisierung der Proben eingesetzt. Um eine qualitative und quantitative Aussage über den Erfolg der DNA-Amplifikation machen zu können, wurden beim Verfahren der „Nested“-PCR, im Anschluss eine gelelektrophoretische Untersuchung angeschlossen. Bei der qRT-PCR wurden während der Amplifikation Marker eingesetzt, deren emittierte Lichtstrahlung proportional zur amplifizierten DNA Menge ist. Das Lichtsignal wurde von entsprechenden Sensoren im Thermocycler detektiert und ausgewertet.

3.2.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

Reagenzien:

- Experion DNA 1K Analysis Kit; Fa. Bio-Rad
- 5x RT-Puffer; Fa. Invitrogen
- PCR Nucleotide; Fa. Roche
- Reverse Transkriptase, MMLV-RT; Fa. Invitrogen
- Protector RNase Inhibitor; Fa. Roche
- PCR Master 1; Fa. Roche
- H₂O, RNase frei
- H₂O, steril
- Ethanol 99,8%
- MEM Earle´s Medium
- QuantiTect Virus + Rox Vial Kit; Fa. Qiagen
- Human Enterovirus Real-Time RT-PCR (FAM) Kit (Dia-Ent-050.Vs1); Fa. Diagenode
- RNA Extraktions- und Inhibitionskontrolle (Cy5) Kit (Dia-Ent/RNA-050.Vs1); Fa. Diagenode
- QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit; Fa. Qiagen
- Reagent DX; Fa. Qiagen
- One-Step RT-PCR Kit; Fa. Qiagen
- Hot Star Taq Master Mix Kit; Fa. Qiagen
- Primer E1, E2, E3 und E8; Fa. TIB MolBiol
- Primer AN 32, 33, 34, 35 und 222, 224; Fa. Ella Biotech
- Qiaquick, PCR Purification Kit; Fa. Qiagen
- 100 bp Gene Ruler, Fa. Thermo Fisher Scientific
- Ampuwa Wasser
- Agarosegel, Fa. Invitrogen
- DNA loading buffer, Fa. Invitrogen
- TBE-Puffer, Fa. Invitrogen

Materialien:

- Ethanol-resistenter und wasserfester Stift
- Einmalhandschuhe
- 10 ml Kunststoffröhrchen
- Safe Lock Tubes 2,0 ml (DNase-frei)
- Spin Column Collection Tubes, Fa. Thermo Fisher Scientific
- Sterile Piptettenspitzen mit Filter
- Matrix 0,75 ml, 2D Tubes, Storage Tubes and Seals, Fa. Thermo Scientific
- 10 ml Einwegpipetten
- High Vol CO-RE Tip mit Filter, 1000 µl
- Std. Vol CO-RE Tip mit Filter, 300 µl

Geräte:

- Sicherheitswerkbank
- Vortex-Schüttler
- Laborzentrifuge
- Kühlschrank 2-8°C und Gefrierschrank -20°C
- Microlab Star; Fa. Hamilton
- Mx 3000P und Mx 3005P Real-Time PCR Systeme; Fa. Stratagene
- Thermocycler; Fa. Stratagene
- MicroAmp optimal 96-Well Reaction Plate mit Barcode; Fa. ABI
- Optical Adhesive Cover Starter Kit mit Compression Pad; Fa. ABI
- Scanner
- Plattenzentrifuge
- Experion Automated Electrophoresis System; Fa. Bio-Rad
- Pipetten, variabel einstellbar
- Mastercycler nexus gradient; Fa. Eppendorf
- Extraktionsautomat Microlab Star; Fa. Hamilton
- SeqMan Pro, Fa. DNA Star

3.2.2. Primer

Die Primersequenzen entsprechen der internationalen Nomenklatur nicht nur die Anfangsbuchstaben der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Sondern es werden auch Buchstaben verwendet, die Mehrdeutigkeit ausdrücken (Liébecq, 1992). Weiterhin gibt es sogenannte Wobble-Basen, wie z. B. Inosin (I), die eine Bindung an alle 4 Basen ermöglichen. Mehrdeutigkeiten wie z.B. durch „W“ ausgedrückt bedeuten, dass ein Gemisch an Sequenzen vorliegt in dem jeweils für „W“ ein „A“ oder „T“ eingefügt wurde. Man spricht hier von degenerierten Primern, die dazu eingesetzt werden können homologe Genomabschnitte in verschiedenen Spezies zu amplifizieren (Iserle et al., 2013; Telenius et al., 1992). Tabellen 4 - 6 zeigen die verwendeten Primer für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR-Methoden.

Tabelle 4: qRT-PCR Primer des Diagenode Kit// Quelle: (Read & Kurtz, 1999)

Primer Name	Primer Koordinaten	Primer Orientierung	Primer Sequenz (5' - 3')
unbekannt	454-470	Outer sense	CGGCCCTGAATGCGGC
unbekannt	647-630	Outer antisense	CACCGGATGGCCAATCCA
unbekannt	457-474	Inner sense	CCCCTGAATGCGGCTAAT
unbekannt	603-584	Inner antisense	ATTGTCACCATAAGCAGCCA

§ Der Kit gibt die Literaturquelle an, jedoch nicht welche der darin gelisteten Primer (inner oder outer) für die 5'-NTR-qRT-PCR herangezogen werden.

Tabelle 5: Primer der 5' NTR nested-PCR, Fa. MWG// Quelle: (Pusch et al., 2005)

Primer Name	Primer Koordinaten	Primer Orientierung	Primer Sequenz (5'-3')
E1	168-191	Outer sense	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG
E2	609-581	Outer antisense	ATTGTCACCATAAGCAGCCA
E5	248-267	Inner sense	TACTTCGAGAAACCYAGTA
E8	566-547	Inner antisense	AACACGGACACCCAAAGTA

Tabelle 6: Primer der VP1 nested-PCR// Quelle: (Nix *et al.*, 2006)

Primer Name	Primer Koordinaten	Primer Orientierung	Primer Sequenz
AN32	3009-3002	Outer antisense	GTYTGCCA
AN33	3009-3002	Outer antisense	GAYTGCCA
AN34	3111-3104	Outer antisense	CCRTCRTA
AN35	3009-3002	Outer antisense	RCTYTGCCA
224	1977-1996	Outer sense	GCIATGYTIGGIACICAYRT
222	2969-2951	Outer antisense	CICCIGGIGGIAYRWACAT
AN88	2977-2951	Inner antisense	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT
AN89	2602-2627	Inner sense	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG

3.2.3 RNA-Extraktion

Zur Durchführung der PCRs wurde die genomischen Nukleinsäuren potentiell vorhandener Viren aus der Probensuspension bzw. dem Zellkulturüberstand extrahiert und aufgereinigt. Dafür wurde ein automatisches Verfahren mit Hilfe des Laborroboters Microlab Star verwendet. Die benötigten Reagenzien entstammten dem QIAamp Virus BioRobot 9604 Kit. Zusätzlich zu den Probenröhrchen wurden jeweils eine Positivkontrolle zur Überprüfung des Extraktionsverfahrens und drei Negativkontrollen für den Ausschluss von Kreuzkontaminationen in dem Extraktionsautomaten mitgeführt. Als Extraktionskontrolle wurde eine Probe eines definierten Virusstammes verwendet, hier war es CV B5. Als Negativkontrolle wurden drei Proben mitgeführt: die NaCl-Lösung, RNase-freies Wasser und der Mastermix. Für die qRT-PCR wurde zudem eine sogenannte „Interne Kontrolle“ eingesetzt, welche jedem einzelnen Ansatz

zugegeben wurde, mit Ausnahme der drei genannte Negativkontrollen. Dies war ein tierpathogenes Virus der Klasse Ea1 mit der Viruslast 10.000 TCID₅₀/ml, welches ebenfalls Teil des PCR-Kits für EV ist.

Im ersten Schritt wurden 200 µl Probensuspension in eine Kavität einer Deep-Well-Platte pipettiert in die 300 µl Lysepuffer AL, versetzt mit 5,6 µg Carrier-RNA, sowie 10 µl Interne-Kontrolle vorgelegt wurden. Zur Lyse der Viruspartikel wurde 20 µl Protease K zugesetzt und die Platte bei Raumtemperatur im Thermoblock für 10 Minuten inkubiert. Die Carrier-RNA sollte RNA-Verluste durch unspezifische Adhäsion an Kunststoffoberflächen während des weiteren Verfahrens minimieren. Nach der Zugabe von 240 µl Ethanol je Probe zum Stoppen der Lyse, wurden die Suspensionen aus der Deep-Well-Platte in eine QIAamp 96 Platte überführt. Hier wurde nun die RNA mit verschiedenen Waschpuffern gereinigt, einmal mit 600 µl AW1 und zweimal mit je 750 µl AW2 je Probe. Das Waschen ohne RNA-Verlust wurde durch die Bindung der RNA an die Silikamembran im sauren pH-Bereich möglich, sodass die Suspension und anschließend auch die Waschpuffer mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt werden konnten. Dieser Schritt der Aufreinigung hatte zum Ziel etwaige Substanzen zu entfernen, welche die PCR später beeinträchtigen könnten, wie z.B. Proteine, Harnstoff, Heparin, Salze etc. Im Anschluss an den letzten Waschgang, wurde die RNA mittels 100 µl Elutionspuffer AVE eluiert. Dies ist eine wässrige Lösung, wodurch die RNA von der Silikatmembran abgelöst wird. Die Eluate wurden in „2D-Matrix Storage Tubes and Seals“ pipettiert und entweder sofort weiter verwendet oder bei -80 °C konserviert.

3.2.4. Quantitative „real time“-RT-PCR

Bei der quantitativen „real time“ RT-PCR (kurz qRT-PCR) handelt es sich um ein „one step“-RT-PCR-Verfahren, welches Echtzeit-RT-PCR und Reverse Transkription der enteroviralen RNA in einem Ansatz vereint. Das Untersuchungsmaterial war RNA-Extrakt aus sterilfiltrierter Abstrichsuspension. Zudem wurde eine routinemäßig verwendete Cox B5 Probe in der Verdünnung 10⁻² als Positivkontrolle mitgeführt. Der Ansatz aller benötigten Reagenzien für die PCR wird Mastermix (MM) genannt und wurde in Tabelle 7 für einen Ansatz exemplarisch aufgelistet.

Tabelle 7: Mastermix qRT-PCR

Reagenz	Menge
QuantiTectVirus NR PCR Mastermix 5×	5 µl
QuantiTectVirus RT Mix 100×	0,25 µl
Primer Probe Enterovirus FAM Kanal	2,5 µl
Primer Probe Cy5 Kanal	2,5 µl
RNase Inhibitor	0,75 µl
H ₂ O	9 µl
Extrahierte RNA	5 µl
Gesamtmenge je Ansatz	25 µl

Das kommerziell erworbene Human Enterovirus Real-Time-PCR-Kit (FAM) der Fa. Diagenode enthält spezifische Primer und eine Sonde für die 5'-NTR-Region des enteroviralen Genoms. Die Sonde ist zur quantitativen Erfassung der Amplifikation mit dem Fluorochrom FAM sowie dem Quencher TAMRA markiert. Es handelt sich hierbei um eine Hydrolyse-Sonde, welche einen Reporter- und einen Quencher-Farbstoff besitzt. Solange beide Farbstoffe nah zusammen sind unterdrückt der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters. Bei der Amplifikation wird die Fluoreszenzunterdrückung des Reporter-Farbstoffes (FAM) durch die Hydrolyse der Sonde und damit Abtrennung des Quenchers, aufgehoben. Je mehr DNA amplifiziert wird, desto stärker nimmt das Fluoreszenzsignal FAM zu und zwar proportional zu der Menge der PCR-Produkte. Im Unterschied dazu ist die Sonde für die Interne Kontrolle mit dem Fluorochrom Cy5 markiert. Dieses emittiert eine andere Wellenlänge des Lichts und lässt sich dadurch vom FAM-Signal diskriminieren. Die Amplifikation wurde am Thermocycler Mx3005p der Fa. Stratagene mit der in Tabelle 8 angegebenen Konfiguration durchgeführt.

Tabelle 8: Thermoprofil der PCR; Kanalverstärkung FAM und iCy5 je 4x.

Temperatur in °C	Dauer in Minuten	Zyklen
50	20:00	1
95	05:00	1
95	00:30	45
55	00:30	
68	00:30	

3.2.5. Nested-PCR

Neben der qRT-PCR wurde noch ein weiteres PCR-Verfahren eingesetzt, die sogenannte „nested-PCR“. Hierbei wurden zwei PCRs ineinander geschachtelt. Zuerst ein größerer Genomabschnitt amplifiziert und anschließend ein kleinerer innerhalb des ersten Amplifikats. Dieses ‘geschachtelte‘ Vorgehen gab der PCR auch den Namen „nested“ (engl. für geschachtelt) und zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität aus, da mit beiden Primerpaaren zusammen eine Amplifikation von 70 Zyklen erreicht wurde. Außerdem wurde durch den zweiten Schritt der PCR auch die Spezifität der Amplifikation erhöht. Somit wurden im ersten Schritt relativ unspezifische Primer verwendet, welche durch ihre geringe Stringenz (Maß für eine notwendige Nukleotidkomplementarität) ein breites Spektrum an Sequenzvariationen amplifiziert. Im zweiten PCR-Schritt wurde dann ein Primerpaar verwendet, das für die gesuchte Virusspezies spezifischer ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene „nested“-PCRs durchgeführt. Zum einen von der Enterovirus-Genregion 5‘-NTR („non translated region“) und zum andern von der VP1-Region („virus capsid protein“). Sowohl die Produkte der 1. PCR, als auch der 2. PCR wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Untersuchungsmaterial diente der RNA-Extrakt aus sterilfiltriertem Zellkulturüberstand.

3.2.5.1. 5'-NTR

Für die „nested“-PCR der 5'-NTR erfolgte im ersten Schritt die Reverse Transkription der RNA in cDNA (Tab. 9 und 12). Im Anschluss wurde eine 1. PCR mit dem Primerpaar E1 und E2 durchgeführt (Tab. 10 und 13). Die Amplifikate wurden 1:50 verdünnt und in einem neuen Ansatz mit dem „nested“-Primerpaar E5 und E8 einer 2. PCR unterworfen (Tab. 11 und 13).

PCR Ansätze und Thermoprofile:

Tabelle 9: RT-Ansatz der 5'NTR „nested“ PCR

Reagenzien	Menge
H ₂ O RNase frei	20,0 µl
5x RT Puffer	10,0 µl
PCR Nucleotide, 10 mM	2,5 µl
DTT, 0,1 M	2,5 µl
Primer E2	2,5 µl
Rev_Transkriptase, MMLV-RT	1,25 µl
RNase Inhibitor	1,25 µl
Extrahierte RNA	10,0 µl
<u>Gesamtmenge</u>	<u>50 µl</u>

Tabelle 10: Ansatz für die 1. PCR der 5'NTR „nested“ PCR

Reagenzien	Menge
H ₂ O, steril	13,0 µl
PCR Master 1, Fa. Roche	25,0 µl
Primer E1, 25 µM	1,0 µl
Primer E2, 25 µM	1,0 µl
RT-Ansatz	10,0 µl
<u>Gesamtmenge</u>	<u>50 µl</u>

Tabelle 11: Ansatz für die 2. PCR der 5´NTR „nested“ PCR

Reagenzien	Menge
H ₂ O, steril	19,0 µl
PCR Master 1, Fa. Roche	25,0 µl
Primer E5, 25 µM	1,0 µl
Primer E8, 25 µM	1,0 µl
1:50 Verdünnung der 1.PCR	4,0 µl
<u>Gesamtmenge</u>	<u>50 µl</u>

Tabelle 12: Thermoprofil reverse Transkription

Temperatur in °C	Dauer in Minuten	Zyklen
37	30:00	1
95	05:00	1
4	Halten	1

Tabelle 13: Thermoprofil der PCR des nested PCR-Verfahrens 1. und 2. PCR

Temperatur in °C	Dauer in Minuten	Zyklen
95	00:30	35
55	01:00	
72	01:00	
4	Halten	1

3.2.5.2. Seminested-VP1-PCR

Für die PCR der VP1-Region wurde ein sogenanntes „seminested“ PCR-Verfahren angewendet. Hierbei werden äußere und innere Primer teils währende beider PCR-Schritte verwendet. Die Reverse Transkription und die erste PCR wurden in einem Schritt als „one step“ RT-PCR gemacht (Tab.14 und 16). Anschließend wurden die Amplifikate in einem neuen Ansatz mit den Primern des zweiten Schritts der 2. PCR unterzogen (Tab. 15 und 17). Bei beiden Ansätzen wurde für die Annealing-Temperatur

(Hybridisierung der Primer) ein Temperatur-Gradient ausgewählt, damit die optimale Annealing-Temperatur leichter gefunden werden konnte (Tab.18).

Tabelle 14: One-step RT/PCR der VP1 Region

Reagenzien	Menge
H ₂ O RNase frei	14,1 µl
5x RT-PCR Puffer	5,0 µl
10 mM dNTP's	1,0 µl
Primer AN32, 33, 34, 35 (je 25 µM)	0,5 µl
Primer 222 (25 µM)	0,5 µl
Primer 224 (25 µM)	0,5 µl
RNasin (40 U/µl)	0,4 µl
Enzym-Mix (RT-TaqPol)*	1,0 µl
Extrahierte RNA	2,5 µl
<u>Gesamtmenge</u>	<u>25 µl</u>

* One-Step RT-PCR-Kit, Fa. Qiagen

Tabelle 15: Ansatz 2. PCR der VP1 „nested“ PCR

Reagenzien	Menge
H ₂ O RNase frei	10,5 µl
Hot Start Master-Mix*	12,5 µl
Primer AN 88 (25 µM)	0,5 µl
Primer AN 89 (25 µM)	0,5 µl
Amplifikat aus 1. PCR	1,0 µl
<u>Gesamtmenge</u>	<u>25 µl</u>

* Hot Star Taq Master Mix Kit, Fa. Qiagen

Tabelle 16: Thermoprofil 1. PCR

Temperatur in °C	Dauer in Minuten	Zyklen
94	00:30	

40,6 - 44,5 °C Gradient	00:30	35
72	00:30	
4	Halten	

Tabelle 17: Thermoprofil 2. PCR

Temperatur in °C	Dauer in Minuten	Zyklen
94	00:30	35
40,6 - 44,5 °C Gradient	00:30	
72	00:30	
4	Halten	1

Tabelle 18: Temperaturgradient der PCR

<u>Position</u>	<u>Temperatur</u>
1	40,6 °C
2	40,6 °C
3	40,9 °C
4	41,4 °C
5	42,1 °C
6	42,9 °C
7	43,7 °C
8	44,5 °C
9	45,3 °C
10	46,0 °C
11	46,5 °C
12	46,8 °C

3.2.6. Kapillargelchip-Elektrophorese

Zum Nachweis von Amplifikaten aus der 5'-NTR „nested“-PCR, wurden die Proben nach der PCR mittels einer speziellen Kapillargel-Gelelektrophorese auf einem Chip, dem Experion-System der Firma Bio-Rad, untersucht. Die Gelelektrophorese allgemein ist ein bewährtes Verfahren um Moleküle ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierfür wird beispielsweise ein Agarosegel verwendet, welches in einem elektrolytischen Pufferbad gelagert ist. Entlang einer Linie befinden sich vorgefertigten Vertiefungen in die jeweiligen Proben pipettiert werden. Durch Anlegen eine Spannung an das Elektrolytbad wird ein elektrisches Feld erzeugt, in welchem sich die Moleküle entsprechend ihrer Ladung zur jeweils andersgeladenen Elektrode bewegen, d. h. die negativ geladene DNA wandert zum positiven Pol (Anode). Dabei trennen sie sich dabei entsprechend ihrer Größe auf, weil das Agarosegel als Molekülfilter wirkt und größere Moleküle dieses langsamer passieren als kleinere. Um die Moleküle für das Auge sichtbar zu machen, können diese mit speziellen Farbstoffen eingefärbt werden. Für DNA kann beispielsweise Ethidiumbromid verwendet werden. Ethidiumbromid ist eine mutagene Substanz, welche zwischen die Basen der DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Somit stellt sich unter UV-Licht ein Bandenmuster dar, wobei jede Bande einem Molekül oder mehreren Molekülen ähnlicher Größe entspricht. Experion ist eine Kapillargel-Elektrophorese mit einem Chip-System, welches nach dem gleichen Grundprinzip funktioniert wie eine klassische Gelelektrophorese, jedoch findet die Auftrennung der Moleküle aller Proben in gelgefüllten, präzise geätzten Mikrokanälen (Kapillaren) einer Quarzglasplatte statt (Abb. 17). Durch Anlegen individueller Spannungen an die einzelnen Probenöpfchen, können alle in einem gemeinsamen Auftrennkanal analysiert werden, an dessen Ende ein Laser die Fluoreszenzdauer und -intensität vorüberziehender Moleküle erfasst. Die so gemessenen Signale, werden von der Software in das bekannte Bandenmuster umgerechnet und sind wesentlich präziser als die Beurteilung mit Augenmaß, außerdem reproduzierbar und zeitsparender.

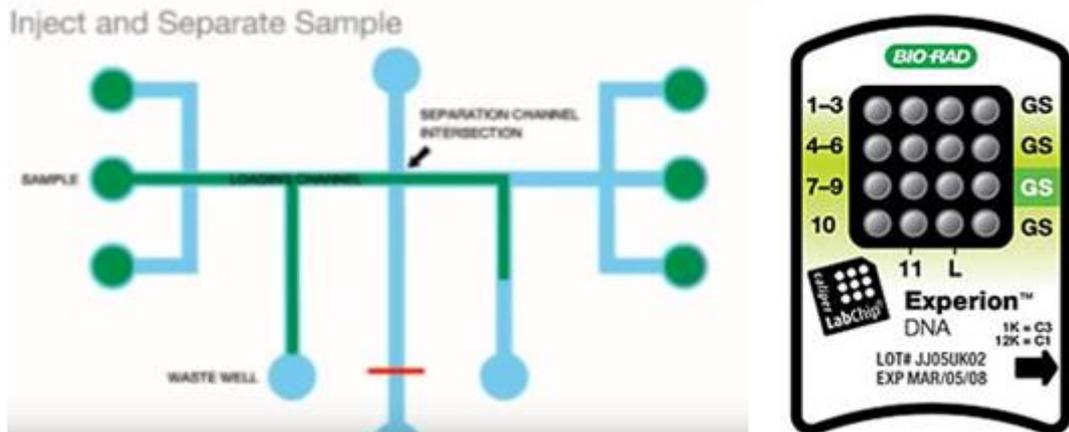


Abbildung 17: Schaubild Kapillargel-Elektrophorese-Chip der Fa. Bio-Rad. Der rote Strich symbolisiert den Laserdetektor. Die grünen Kreise sind die Proben-Näpfchen,

Vorbereitung des Chips:

Das Experion DNA Analysis Kit 1K enthält 4 unterschiedlich gefärbte Fläschchen, welche bei 4°C gelagert und vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und gevortext wurden. Im ersten Schritt wurden 12,5 µl Farbstoff aus dem blauen Röhrchen mit 250 µl Gelsuspension aus dem grünen Röhrchen vermischt und gevortext. Anschließend wurde die Suspension in ein Spinnfiltrerröhrchen gegeben und 15 Minuten bei 2400 zentrifugiert. 9 µl des Zentrifugats wurde dann in das Näpfchen mit der weißen Beschriftung „GS“ des Chips gegeben. Der Chip wurde dann in der Primingstation positioniert und dort automatisch vorbereitet für die Elektrophorese. Hiernach wurden je 9 µl Zentrifugat in die 3 Näpfchen mit schwarzer Beschriftung „GS“ pipettiert und 5 µl Puffer aus dem gelben Röhrchen in alle nicht mit „GS“ beschrifteten Felder gegeben. In das Feld „L“ wurde 1 µl von der sogenannten „DNA-Ladder“ aus dem roten Röhrchen gegeben, welche als Maßstab bzw. Referenz mitgeführt wurde und Banden während der Elektrophorese erzeugt, welche DNA-Stücke mit definierter Größe entsprechen. Jedem Molekül der „DNA-Ladder“ ist eine bestimmte Migrationszeit zugeordnet, anhand derer errechnet wurde, welche Größe ein Molekül bei gegebener Migrationszeit hat (Tab. 19).

Tabelle 19: Migrationszeiten der DNA-Ladder bei der Kapillargelchip-Elektrophorese

Migrationszeit in Sekunden	Nukleotidgröße in bp
37,85	25
39,85	50
44,95	100
49,25	150
53,50	200
62,00	300
69,35	400
74,60	500
81,70	700
83,90	850
85,50	1000
89,30	1500

Die übrigen 11 Nöpfchen wurden nun mit je 1 µl Probenmaterial, also dem PCR-Produkt, je eines mit dem jeweiligen Mastermix ohne RNA, MEM- Kulturmedium und Cox B5 10^{-2} beschickt. Nun wurde der Chip in der Experion Vortex Station 1 Minute gemischt.

Gelelektrophorese:

Der Chip wurde im Anschluss an die Vorbereitung in der Experion Elektrophorese Station positioniert und das Gerät gestartet. Die Auswertung erfolgte innerhalb einer halben Stunde mittels der Experion-Software am Rechner. Sowohl eine Visualisierung als klassisches Bandmuster, als auch eine tabellarische Übersicht aller DNA-Fragmente mitsamt ihrer Größe und der Menge waren hier möglich (Abb. 18).

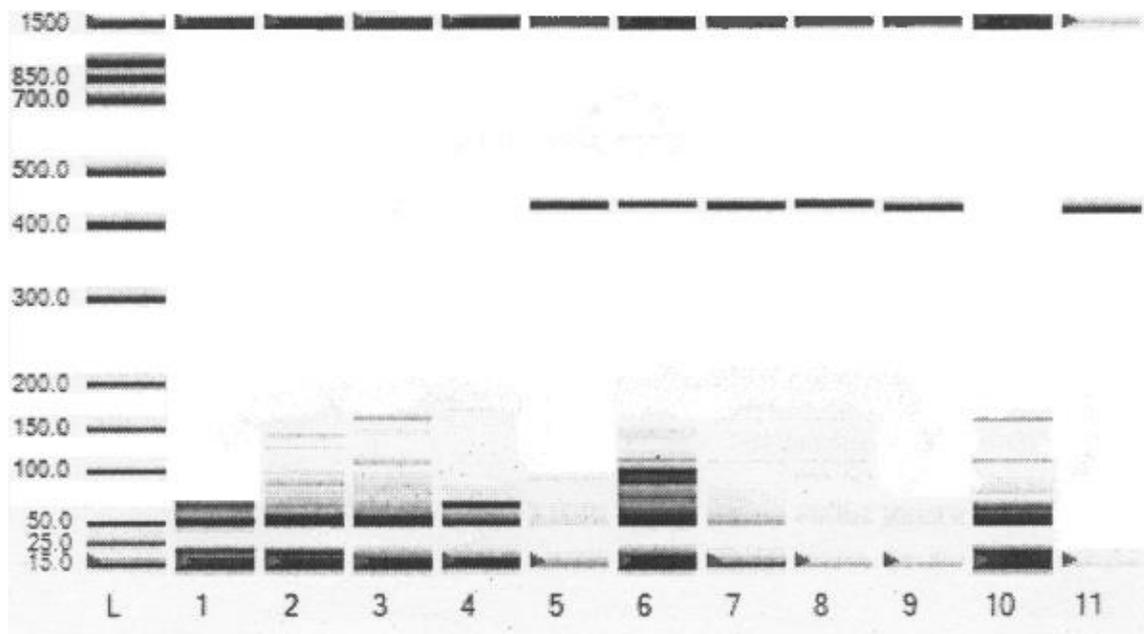


Abbildung 18: Visualisierung der Ergebnisse der Gelchipelektrophorese als Bandenmuster. Die Banden zeigen DNA-Fragmente der PCR Amplifikation ihrer Größe nach aufgetrennt. L = Bandenmuster der DNA- Ladder; Spuren 1-11 = Bandenmuster der Proben

3.2.7. Klassische Gelelektrophorese

Für die Bewertung der PCR-Produkte der VP1-Region wurden die Amplifikate in einem 1,2 %-igem Agarosegel aufgetrennt. 300 ml TBE-Puffer wurden mit 4,5 g Agarose vermischt und bei 600 Watt in der Mikrowelle erwärmt. Dann wurden 18 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und verrührt. Anschließend wurde das Gel noch flüssig in die Gelkammer gefüllt und dort für ca. 30 min ausgehärtet. Das einhängen von Kämmen während diesem Arbeitsschritt, sorgte für präformierte Taschen im Gel. Das feste Gel wurde dann in die Gelelektrophorese-Kammer eingelegt und mit TBE-Puffer bedeckt. Die präformierten Taschen wurden nun mit den Reagenzien gefüllt. Für die DNA-Ladder wurden 10 µl Ampuwa Wasser, 4 µl DNA loading buffer (6x) und 6 µl 100 bp Gene Ruler in die entsprechenden Taschen pipettiert. Von den Amplifikaten wurden jeweils 7 µl mit 3 µl DNA loading buffer (6x) und 10 µl Ampuwa Wasser in die entsprechenden Taschen pipettiert. Nicht benötigte Taschen wurden mit 20 µl Ampuwa

Wasser gefüllt. Der Betrieb der Elektrophorese erfolgte mit 160 Ampere für 1 h. Anschließend wurde das Gel unter Sicherheitsvorkehrungen aus der Elektrophorese entnommen, mit destilliertem Wasser abgespült und in die Fotokammer eingelegt. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar. Die Dokumentation erfolgte mit einer Polaroid Kamera (Abb. 19).

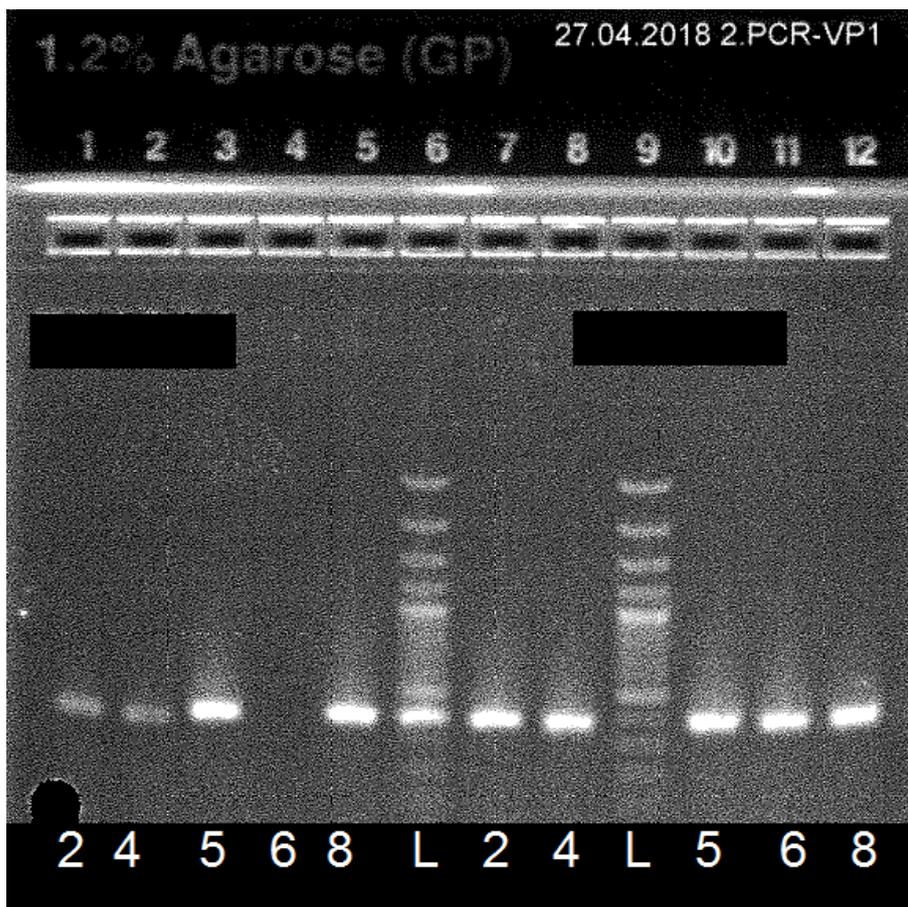


Abbildung 19: Klassische Agarose-Gelelektrophorese; Ziffern 2-8 (unten): PCR-Produkte vom Temperaturgradienten zweier Proben. Die Banden zeigen DNA-Fragmente der PCR Amplifikation ihrer Größe nach aufgetrennt. L = DNA-Ladder (hervorgehobene Banden: 1000 bp und 500 bp); Probennummern geschwärzt

3.3. Sequenzierung

Konnten PCR-Produkte in der erwarteten Länge durch die Elektrophoreseverfahren nachgewiesen werden, wurde eine Aufschlüsselung der Basensequenz vorgenommen. Hierfür wurden die PCR Produkte zuerst mit dem Qiaquick-Kit aufgereinigt und dabei

von Primern, Nukleotiden etc. befreit. Hierzu wurden jeweils 25 µl PCR-Produkt mehrfach mit wechselnden Mengen Puffer-PB in Collection Tubes mit Silikat-Säulchen zum Waschen versetzt und zentrifugiert. Aufgereinigte PCR-Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Sequenzanalyse wurden die aufgereinigten PCR-Produkte und dazu separat die verwendeten Primer an ein externes Labor gesandt (Fa. GATC und später Fa. Eurofins), welches für Sequenzierungen spezialisiert ist. Mittels der Sanger-Methode wurden die genaue Basenabfolge der eingesandten PCR-Produkte vorwärts- und rückwärts analysiert. Hierzu wurden Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP's) eingesetzt, welche beim Einbau in den DNA-Strang während der Polymerasekettenreaktion zum Kettenabbruch führen. Durch Einsatz markierter ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen war es möglich, diese mit einem Laser zum Fluoreszieren anzuregen. Im Anschluss an die Amplifizierung wurde mit Hilfe einer Kapillargelelektrophorese mit Einsatz eines Lasers die Basenabfolge anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale direkt ermittelt. Die DNA-Stücke laufen größenabhängig unterschiedlich schnell durch die Kapillare, wodurch die Sequenzabfolge gegeben ist. Über ein Login-Verfahren auf der Firmenwebseite konnten die Ergebnisse der Sequenzierung als zip-Datei heruntergeladen werden.

3.4. Homologieuntersuchung

Je Probe enthielt die Datei 2 Sequenzen, jeweils eine für den Forward- und eine für die Reverse-Primer. Diese beiden Sequenzen wurden mit dem Programm SeqMan Pro einer Alinierung (Alignment) unterzogen, d. h. es wurden die Sequenzen so deckungsgleich wie möglich übereinander gelegt, so dass eine Consensus-Sequenz daraus errechnet wurde. Die Sequenzen wurden aber auch manuell nachbearbeitet, überprüft und beschnitten. Technisch bedingt kommt es an der Bindungsstelle des Primers am 5'-Ende und ca. 20 - 30 bp distal zu keinem brauchbaren Sequenziererergebnis. Bedingt hierdurch erhält man beim Alinieren an jedem Ende eine einzelsträngige Sequenz, die nicht durch die Sequenz des komplementären Strangs bestätigt werden konnte. Zur Erhöhung der Sequenzqualität wurden die erhaltenen Chromogramme so bearbeitet, d. h. ein

sogenanntes „Trimming“ durchgeführt, dass überlagerte Sequenzen und uneindeutige Abschnitte, welche vor allem am Anfang und Ende der Sequenz des Chromogramms vorkommen, abgeschnitten wurden.

Anhand des Chromogramms wurde in der ganzen Länge der Sequenz nach kleinen Buchstaben gesucht, welche das System verwendet, wenn ein Basenpaar nicht sicher errechnet werden konnte. Hier ist die manuelle Betrachtung der Peaks notwendig, um gegebenenfalls eine Entscheidung aufgrund der Signalstärke, Steilheit der Peaks und Vergleich der Sequenz beider Stränge, treffen zu können. Am Ende der Nachbearbeitung ergibt sich aus dem „pairwise“-Alignment eine Consensus-Sequenz, die als „Contig“ abgespeichert wurde.

Mit dieser Consensus-Sequenz wurde ein sogenannter „Blast“ durchgeführt, d. h. die Sequenz wurde in eine Datenbank eingespeist und mit allen verfügbaren Sequenzen der Datenbank verglichen. Das Ergebnis des Blast-Vorgangs ist ein Alignment mit homologen Sequenzen aus der Datenbank, wodurch der Sequenz ein mögliches Virus zugeordnet werden kann. Je höher der angegebene Score, desto länger ist die homologe Region und desto sicherer ist das Virus zu identifizieren. Verwendet wurde die Datenbank „Genbank“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Adresse:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

3.5. Nationales Referenzzentrum

Zur Überprüfung der eigenen Methoden und zur Ergebnissicherung, wurden von allen Proben, welche in der Zellkultur einen positiven CPE zeigten, je 300 – 400 µl vom Isolat und mindestens 140 µl der Abstrichsuspension ans Nationale Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren des Robert Koch-Instituts (NRZ) in Berlin geschickt. Dort ist normalerweise eine Typisierung aller bekannten Entervirustypen möglich. Das wurde als wichtig angesehen, da weder der Kopenhagen-Test jeden EV-Typ identifizieren, noch die Homologieuntersuchung der Genomsequenzen in jedem Falle zweifelsfreie Ergebnisse liefern konnten.

4. Ergebnisse

4.1. Virusisolierung und Titration

Die Virusisolierung bezeichnet den ersten Schritt der Zellkultur. Hierbei wurde die Viruskonzentration in Patientenproben mit vermehrungsfähigen Virionen auf RD-Zellkultur stark erhöht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Virusisolierung aller 105 Patientenproben aufgelistet. Da jeweils ein Doppelansatz gemacht wurde, gibt die erste Zahl den CPE des oberen Wells, die zweite Zahl des unteren Wells an. Insgesamt zeigten 10 von 105 Proben eine CPE, wobei nur 8 Proben auch nach der Passage noch einen CPE zeigten (Tab. 20).

Tabelle 20: Ergebnisse Virusisolierung

Probennummer	CPE Isolierung	CPE 1. Passage	CPE 2. Passage
1	00	00	00
2	00	00	00
3	00	00	00
4	00	00	00
5	00	00	00
6	00	00	00
7	00	00	00
8	00	00	00
9	00	00	00
10	00	00	00
11	00	00	00
12	00	00	00
13	00	00	00
14	00	00	00
15	00	00	00
16	00	00	00
17	00	00	00
18	00	00	00
19	00	00	00
20	00	00	00
21	00	00	00
22	00	00	00
23	00	00	00

Probennummer	CPE Isolierung	CPE 1. Passage	CPE 2. Passage
24	00	00	00
25	00	00	00
26	00	00	00
27	33	44	44
28	00	00	00
29	00	00	00
30	00	00	00
31	00	00	00
32	00	00	00
33	00	00	00
34	00	00	00
35	00	00	00
36	33	44	44
37	00	00	00
38	00	00	00
39	00	00	00
40	00	00	00
41	00	00	00
42	00	00	00
43	00	00	00
44	00	00	00
45	00	00	00
46	00	00	00
47	00	00	00
48	00	00	00
49	00	00	00
50	00	00	00
51	00	00	00
52	00	00	00
53	00	00	00
54	00	00	00
55	00	00	00
56	00	00	00
57	00	00	00
58	00	00	00
59	00	00	00
60	00	00	00
61	00	00	00
62	00	00	00
63	00	00	00

Probennummer	CPE Isolierung	CPE 1. Passage	CPE 2. Passage
64	00	00	00
65	00	00	00
66	11	00	00
67	00	00	00
68	00	00	00
69	00	00	00
70	00	00	00
71	00	00	00
72	12	00	00
73	00	00	00
74	00	00	00
75	34	44	44
76	00	40	40
77	00	00	00
78	00	00	00
79	00	00	00
80	00	00	00
81	00	00	00
82	00	00	00
83	00	00	00
84	00	44	44
85	00	00	00
86	00	00	00
87	00	00	00
88	00	00	00
89	00	00	00
90	00	00	00
91	00	00	00
92	00	00	00
93	00	00	00
94	00	00	00
95	00	00	00
96	00	00	00
97	44	44	44
98	12	44	44
99	00	00	00
100	00	00	00
101	00	00	00
102	44	44	44
103	00	00	00

Probennummer	CPE Isolierung	CPE 1. Passage	CPE 2. Passage
104	00	00	00
105	00	00	00
106 (Positivkontrolle)	33	44	44

Für alle Proben, die einen CPE nach Passagierung zeigten, wurde per Titration der individuelle TCID₅₀ bestimmt. In der Tabelle ist jeder Verdünnungsstufe ein CPE zugeordnet, welcher dem CPE der letzten Ableseung der Doppelproben entspricht (Tab. 21). Die Zahl 44 bedeutet beispielsweise, dass beide Wells der Doppelprobe einen CPE von vier erreichten.

Tabelle 21: Ergebnisse der Titration

Probennummer	CPE der verschiedenen Verdünnungsstufen									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
27	44	44	44	44	44	03	00	00	00	00
36	44	44	44	44	04	00	00	00	00	00
75	44	44	44	44	44	04	00	00	00	00
76	44	44	44	44	30	00	04	00	00	00
84	44	44	44	44	44	44	44	44	44	04
97	44	44	44	44	44	44	34	03	00	00
98	44	44	44	44	44	44	44	44	44	40
102	44	44	44	44	44	33	03	00	00	00
106 (Positivkontrolle)	44	44	32	22	20	00	00	00	00	00

4.2. Kopenhagen-Test

Für den Neutralisationstest wurde der LBM-Antiseren-Pool, bestehend aus 8 Antiseren des WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research in Kopenhagen verwendet. Die angegebenen Ergebnisse der mikroskopischen Beurteilung der Zellkultur auf CPEs beziehen sich auf den Tag der Ableseung, an dem die Positivkontrollen (AG-Näpfchen ohne Antiserum) deutlich positiv waren, also der CPE

des Doppelansatzes zwischen 33 und 44 lagen, wohingegen andere Nöpfchen neutralisiert (CPE von 00) blieben (Tab.22).

Tabelle 22: Ergebnisse Kopenhagen-Test

Proben- nummer	Ver- dünnung	Antigen und Antiseren									Neutrali- sation
		AG	A	B	C	D	E	F	G	H	
27	10 ⁻³	44	4 4	-							
36	10 ⁻³	44	4 4	-							
75	10 ⁻⁵	43	4 4	0 0	4 0	0 0	0 4	4 1	4 1	1 4	BD
75	10 ⁻⁴	44	4 0	0 0	4 4	4 4	4 0	0 0	4 0	4 4	BF
75	10 ⁻³	44	4 4	-							
76	10 ⁻⁴	33	0 0	3 3	3 0	0 0	3 0	0 0	0 0	0 3	ADFG
76	10 ⁻³	44	4 4	-							
76	10 ⁻²	44	4 4	-							
76	10 ⁻¹	44	4 4	-							
84	10 ⁻⁹	00	0 0	-							
84	10 ⁻⁷	00	0 0	4 4	4 0	0 0	2 0	0 3	0 0	0 0	-
84	10 ⁻⁵	04	4 4	-							
84	10 ⁻⁴	44	4 4	4 4	4 4	4 4	0 4	4 4	4 4	4 4	-
97	10 ⁻⁵	44	4 0	0 4	4 4	4 3	4 0	4 4	3 3	4 4	-
97	10 ⁻⁵	44	1 2	0 4	4 4	0 1	1 3	0 0	4 0	4 4	-
97	10 ⁻⁴	44	4 4	-							
98	10 ⁻⁷	40	0	0	0	0	4	0	0	0	-

Probennummer	Verdünnung	Antigen und Antiseren									Neutralisation
		AG	A	B	C	D	E	F	G	H	
			0	0	0	0	0	0	0	0	
98	10 ⁻⁶	44	0 4	4 4	0 4	4 4	4 0	4 4	4 4	4 4	-
98	10 ⁻⁶	44	4 4	1 4	-						
102	10 ⁻⁵	44	0 3	3 3	3 3	3 3	3 3	4 3	3 3	3 0	-
102	10 ⁻⁴	44	4 4	-							
102	10 ⁻³	44	4 4	-							
106 (Positivkontrolle)	10 ⁻¹	44	3 3	2 2	0 2	0 0	3 0	0 0	3 0	3 3	DF

4.3. PCR

4.3.1. qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde das kommerziell erworbene Human Enterovirus Real-Time-PCR-Kit der Fa. Diagenode mit den Primern nach (Read & Kurtz, 1999) verwendet. Die Ergebnisse der qRT-PCR unter Anwendung des Diagenode-Kits zur Identifizierung von EV wurden in der Tabelle 23 zusammengefasst. In der Spalte „FAM-Signal als Ct-Wert“ ist ersichtlich, ob der Farbstoff FAM ein Signal gesendet hat oder nicht. Ein positives Signal deutet auf das Vorhandensein von EV hin. In der Spalte für Interne Kontrolle „CY5-Signal als Ct-Wert“ wurde der Übersichtlichkeit halber nur ein „+“ eingetragen, sofern CY5 ein deutliches Signal gesendet hat, welches zwischen Ct 27 und 30 lag, und ein „negativ“, wenn ein Signal ausblieb.

Tabelle 23: Ergebnisse qRT-PCR

Probennummer	FAM-Signal als Ct-Wert	CY5-Signal als Ct-Wert
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-	+
13	-	+
14	-	+
15	-	+
16	-	+
17	-	+
18	-	+
19	-	+
20	-	+
21	-	+
22	-	+
23	-	+
24	-	+
25	-	+
26	-	+
27	-	+
28	-	+
29	-	+
30	-	+
31	-	+
32	-	+
33	-	+
34	-	+
35	-	+
36	-	+
37	-	+

Probennummer	FAM-Signal als Ct-Wert	CY5-Signal als Ct-Wert
38	-	+
39	-	+
40	-	+
41	-	+
42	-	+
43	-	+
44	-	+
45	-	+
46	-	+
47	-	+
48	-	+
49	-	+
50	-	+
51	-	+
52	-	+
53	-	+
54	-	+
55	-	+
56	-	+
57	-	+
58	-	+
59	-	+
60	-	+
61	-	+
62	-	+
63	-	+
64	-	+
65	-	+
66	-	+
67	-	+
68	-	+
69	-	+
70	-	+
71	-	+
72	-	+
73	-	+
74	-	+
75	23,83	+
76	-	+

Probennummer	FAM-Signal als Ct-Wert	CY5-Signal als Ct-Wert
77	-	-
78	-	+
79	-	+
80	-	+
81	-	+
82	-	+
83	-	+
84	26,36	+
85	-	+
86	-	+
87	-	+
88	-	+
89	-	+
90	-	+
91	-	+
92	-	+
93	-	+
94	-	+
95	-	+
96	-	+
97	25,96	+
98	22,95	+
99	-	+
100	-	+
101	-	+
102	23,27	+
103	-	+
104	-	-
105	-	+
COX B5 10 ⁻² (Positivkontrolle)	21,20	+
Diagenode positiv	32,59	n.a.*
Diagenode negativ	-	n.a.
H ₂ O	-	n.a.
H ₂ O	-	n.a.
MM	-	n.a.
NaCl	-	n.a.

* n.a. = nicht angewendet

4.3.2. Kapillargelchip-Elektrophorese 5'-NTR

Zum Nachweis von Amplifikaten aus der 5'-NTR „nested“-PCR, wurden die Proben nach der PCR mittels einer speziellen Kapillargelchip-Elektrophorese aus dem Experion-System der Firma Bio-Rad, untersucht. Die Ergebnisse der beiden Durchgänge der „nested“-PCR der 5'-NTR-Region werden in den nachfolgenden beiden Tabellen numerisch dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden nur die Peaks dargestellt, welche +/- 20 bp im Bereich des erwarteten DNA-Fragments lagen. Für die 1. PCR wird ein Amplifikat mit der Länge von 442 bp (Tab. 24) und für die 2. PCR eine Länge von 319 bp (Tab. 25) erwartet. Für Proben ohne Peak im erwarteten Bereich wurden die zwei höchsten Peaks angegeben.

Tabelle 24: Gelelektrophorese 1. PCR der 5'-NTR-nested-PCR

Well-Nr.	Probe	Molekülgröße in bp	Migrationszeit in Sekunden	Konzentration in ng/µl	Relativer Anteil in %
1	MM	50	39,87	2,04	51,79
		21	37,02	0,96	24,51
2	MEM	54	40,29	2,44	63,06
		20	36,93	0,94	24,33
3	27	53	40,13	1,38	41,96
		50	39,82	1,23	37,67
4	36	69	41,77	2,99	54,40
		50	39,83	2,50	45,60
5	75	437	71,28	10,20	76,95
		50	39,89	2,38	17,96
6	76	n. a.*	n. a.	n. a.	n. a.
		n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
7	84	53	40,16	2,73	50,55
		438	71,37	0,40	7,46
8	97	436	71,22	4,98	58,30
		49	39,79	2,56	30,05
9	98	439	71,39	10,92	76,34
		54	40,22	1,99	13,91
10	102	433	71,07	14,02	78,61
		54	40,23	2,71	15,18
11	Cox B5 10 ⁻²	428	70,79	27,15	94,82
		53	40,14	0,86	3,01

* n.a. = nicht auswertbar

Tabelle 25: Gelelektrophorese 2. PCR der 5'-NTR nested PCR

Well-Nr.	Probe	Molekülgröße in bp	Migrationszeit in Sekunden	Konzentration in ng/µl	Relativer Anteil in %
1	MM	-	-	-	-
		-	-	-	-
2	MEM	-	-	-	-
		-	-	-	-
3	27	325	63,92	12,37	100,00
		-	-	-	-
4	36	326	63,99	12,09	100,00
		-	-	-	-
5	75	324	63,87	19,26	94,16
		410	70,00	0,99	4,85
6	76	n. a. *	n. a.	n. a.	n. a.
		n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
7	84	323	63,83	15,24	100,00
		-	-	-	-
8	97	324	63,84	19,54	96,30
		403	69,65	0,36	1,76
9	98	324	63,85	18,90	98,91
		408	69,94	0,11	0,60
10	102	323	63,77	18,24	93,67
		405	69,78	0,56	2,89
11	Cox B5 10 ⁻²	318	63,41	11,56	76,57
		398	69,32	1,86	12,29

* n.a. = nicht auswertbar

4.3.3. Gelelektrophorese VP1

Für die Bewertung der PCR-Produkte der VP1-Region wurden die Amplifikate in einem 1,2-prozentigem Agarosegel aufgetrennt. Die Ergebnisse der Elektrophorese der beiden Durchgänge der „nested“-PCR der VP1-Region wurden im Folgenden grafisch dargestellt. Die Größe des 1. PCR-Produktes beträgt 992 bp. Nur Probe 98 zeigt eine Bande (Abb. 20). Die Größe des 2. PCR-Produktes beträgt 375 bp. Alle Proben zeigen eine deutliche Bande im erwarteten Bereich (Abb. 21).

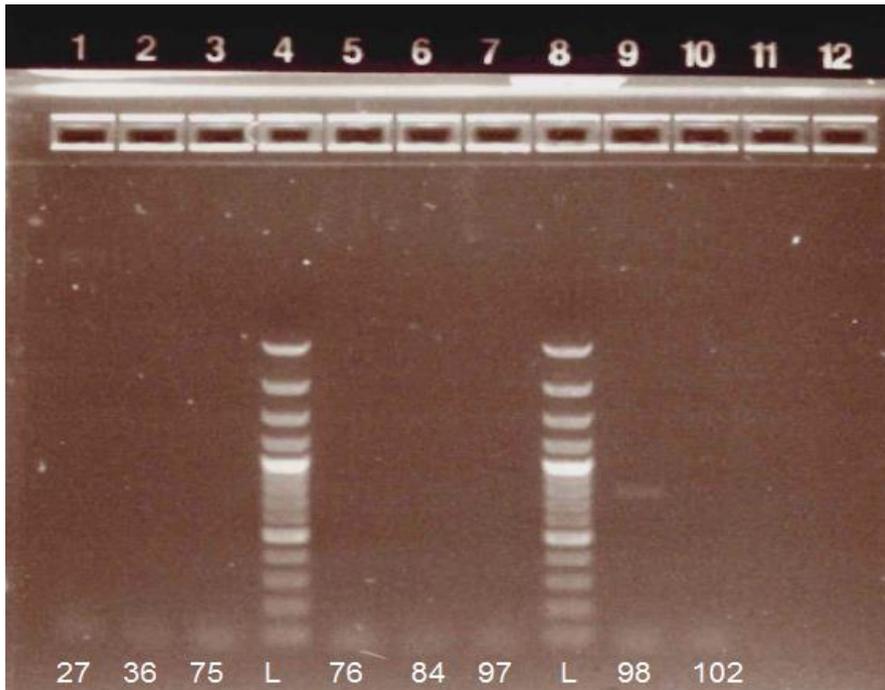


Abbildung 20: Gelelektrophorese der VP1 seminested-PCR, 1. Schritt; nur Probe 98 zeigt eine entsprechende Bande; L = DNA-Ladder (hervorgehobene Banden: 1000 bp und 500 bp)

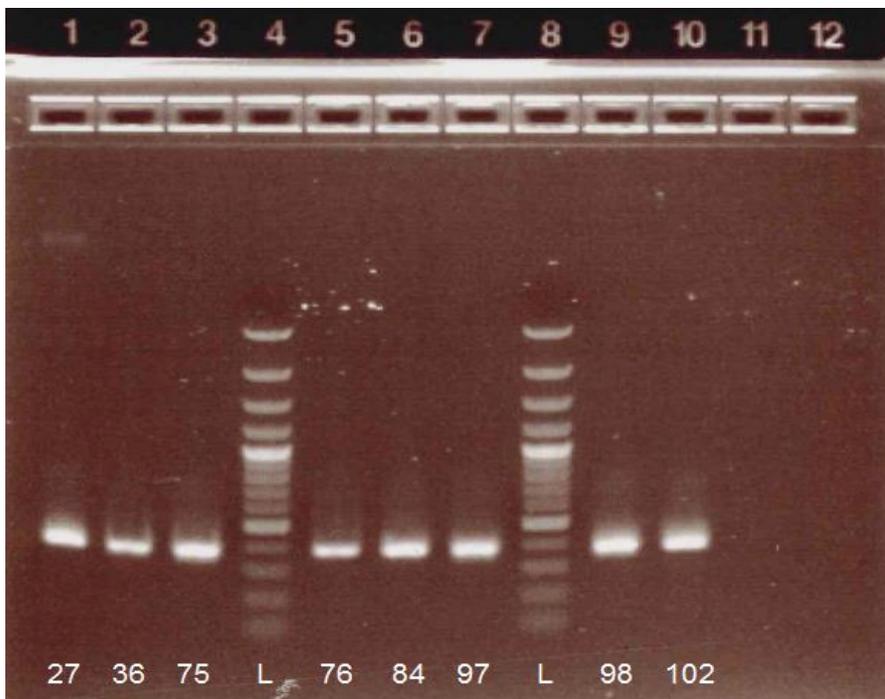


Abbildung 21: Gelelektrophorese der VP1 seminested-PCR, 2. Schritt; alle Proben zeigen eine deutliche Bande im erwarteten Bereich; L = DNA-Ladder (hervorgehobene Banden: 1000 bp und 500 bp)

4.4. Sequenzanalyse der PCR-Produkte

4.4.1 Sequenzanalyse des 5'-NTR-PCR-Produktes

Die PCR-Produkte wurden mit dem Qiaquick-Kit der Fa. Qiagen aufgereinigt und an das externe Labor der Firmen GATC bzw. Eurofins geschickt. Die erhaltenen Sequenzen aus der 5'-NTR-PCR ergaben keine verwertbaren Ergebnisse in der Sequenzanalyse. Weder beim Alinieren konnten die Forward- und Reverse-Sequenzen zu eindeutigen Consensus-Sequenzen formiert, noch die Consensus-Sequenzen beim Blasten einem eindeutigen Virustyp zugeordnet werden.

4.4.2 Sequenzanalyse des VP1-PCR-Produktes

Je Probe wurde die Forward- und Reverse-Sequenz mit der Software SeqMan Pro aliniert und eine Consensus-Sequenz erstellt wie Abbildung 22 am Beispiel von Probe 76 zeigt.



Abbildung 22: Darstellung eines Ausschnitts des Chromatogramms der Probe 76 mit Hilfe der SeqMan Pro-Software; blau hinterlegte Sequenz wurde abgeschnitten.

Die erhaltene Consensus-Sequenz wurde wie in Kapitel 3.4. bereits beschrieben geblastet, d. h. mit den Sequenzen der „Genbank“ einem Alignment unterzogen. Am Beispiel von Probe 76 zeigen Abbildung 23 und 24 exemplarisch das Ergebnis eines Blasts. Die Consensus-Sequenz der Probe 76 weist eine Identität von 96 % zu Coxsackievirus A6 (CV A6) auf.

Download		GenBank		Graphics	
Coxsackievirus A6 isolate 7HFMD/PL14/2014 capsid protein VP1 gene, partial cds					
Sequence ID: KX865268.1 Length: 618 Number of Matches: 1					
Range 1: 231 to 535		GenBank		Graphics	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
503 bits(272)	2e-138	292/305(96%)	0/305(0%)	Plus/Minus	
Query	1	GGCGTCGTGCTATCATTGAGGNTGGACACAAAAGTGAAGTCTGCATCAAAGCGCATGTAT	60		
Sbjct	535	GGCGTCGTGCTATCATTGAGGTTGGACACAAAAGTGAAGTCTGCATCAAAGCGCATGTAT	476		
Query	61	GTTGACAGCTCTAGTTTGGCGCCGCTGCTGCACGAAGCCCATCACATCTATGGGCCAAACT	120		
Sbjct	475	GTTGACAGCTCTAGTTTGGCGCCGCTGCTGCACGAAGCCCATCACATCTATGGGCCAAACT	416		
Query	121	GTGTACCCATCCAGGCTGGTGCCCGAATCCTTCACCTNCACAACCCCTACCAACCCTGCA	180		
Sbjct	415	GTGTACCCATCCAGGCTAGTGCCCGAATCCTTCACCTCCACAACCCCTACCAACCCTGCA	356		
Query	181	CGAGAGTAAAAGTGTTCACACTCGCCTCATTGACCCCGTTTCGATTCATCACACAGCGA	240		
Sbjct	355	CGAGAGTAAAAGTGTTCACACTCGCCTCATTGACCCCGTTTCGATTCATCACACAGCGA	296		
Query	241	GTCTCAATAAGGTTCTCATCACTAGCATTAGAAGTCTCCNNTNCTNACTGCTGTCAGT	300		
Sbjct	295	GTCTCAATAAGGTTCTCATCACTAGCATTAGAAGTCTCCCGTTTCTGCAGCTTGCAGT	236		
Query	301	GCTGG	305		
Sbjct	235	GCTGG	231		

Abbildung 23: Alignment der Genbank: VP1-Consensus-Sequenz (Query) zeigt Alignment mit Coxsackievirus A6-Sequenz aus der Genbank

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Coxsackievirus A6 isolate 7HFMD/PL14/2014 capsid protein VP1 gene, partial cds	503	503	99%	2e-138	96%	KX865268.1
<input type="checkbox"/> Coxsackievirus A6 isolate GZ6632-CHN-2011 VP1 gene, partial cds	503	503	99%	2e-138	96%	KF639922.1
<input type="checkbox"/> Coxsackievirus A6 isolate 13HFMD/PL02/2015 capsid protein VP1 gene, partial cds	497	497	99%	7e-137	95%	KX865271.1
<input type="checkbox"/> Coxsackievirus A6 isolate V7/Ed/UK/2013 polyprotein gene, partial cds	497	497	99%	7e-137	95%	KP144342.1
<input type="checkbox"/> Coxsackievirus A6 isolate GZ14885-CNH-2010 VP1 gene, partial cds	497	497	99%	7e-137	95%	KF535179.1
<input type="checkbox"/> Coxsackievirus A6 isolate 2570/Arhangelsk-Talazh RUS/2014 VP1 gene, partial cds	496	496	91%	3e-136	98%	KT218610.1

Abbildung 24: Genbank-Blast-Ergebnis am Beispiel von Probe 76

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse der VP1-PCR-Produkte sind im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tab. 26). Aufgrund der Eindeutigkeit der Blast-Resultate, wird auf die Darstellung der einzelnen Blast-Parameter verzichtet und nur der Virustyp angegeben.

Tabelle 26: Ergebnisse der Sequenzanalyse VP1

Probennummer	Blast-Ergebnis
27	CV A4
36	CV A6
75	CV A6
76	CV A6
84	CV A10
97	CV A4
98	CV A10
102	CV A4

4.5. Nationales Referenzzentrum

Zur Überprüfung der eigenen Methoden wurden alle Proben mit positivem CPE in der Zellkultur auch ans Nationale Referenzzentrum für Poliomyelitis und Enteroviren des

Robert Koch-Instituts nach Berlin geschickt. Die Ergebnisse der Untersuchungen durch das NRZ sind in folgender Tabelle (Tab. 27) zusammengefasst.

Tabelle 27: NRZ-Erregernachweis

Probennummer	Erregernachweis
27	CV A4
36	CV A6
75	CV A6
76	CV A6
84	CV A10
97	CV A4
98	CV A10
102	CV A4

5. Auswertung

5.1. Virusisolierung und Passagen

Isolierung: Die Proben Nummer 27, 36, 66, 72, 75, 97, 98 und 102 zeigen einen deutlichen CPE. Dies entspricht einem relativen Anteil an allen Proben von 6,67 %.

1. Passage: Die Proben Nummer 27, 36, 75, 76, 84, 97, 98, 102 zeigten einen deutlichen CPE. Dies entspricht einem relativen Anteil an allen Proben von 6,67 %. Die Proben Nummer 66 und 72 zeigten keinen CPE mehr. Die Probe Nummer 76 zeigte nur in einem Nöpfchen einen CPE.

2. Passage: Die Proben Nummer 27, 36, 75, 76, 84, 97, 98, 102 zeigten einen deutlichen CPE. Dies entspricht einem relativen Anteil an allen Proben von 6,67 %. Die Probe Nummer 76 zeigte nur in einem Nöpfchen einen CPE.

Die Positivkontrolle zeigte beim Isolierungsschritt und bei beiden Passagen stets einen deutlichen CPE.

5.2 Titration

Ziel der Titration war es eine geeignete Verdünnung für den Kopenhagen-Test zu ermitteln. Dazu wurde 100 – 300 TCID₅₀ herangezogen. Für einige Proben wurden abweichend von dieser Zielverdünnung auch weitere Verdünnungsstufen im Kopenhagen-Test verwendet, da erste Tests mit der gewählten Zielverdünnung ein unklares Neutralisationsergebnis zeigten (Tab. 28).

Tabelle 28: Gewählte Verdünnungen für den Neutralisationstest

Probennummer	Gewählte Verdünnung
27	10 ⁻³
36	10 ⁻³
75	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵
76	10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴
84	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁹
97	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵

Probennummer	Gewählte Verdünnung
98	10^{-6} , 10^{-7}
102	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}
Positivkontrolle	10^{-1}

5.3. Kopenhagen-Test

Beim Kopenhagen-Test handelt es sich um einen Neutralisationstest bei dem die Antiseren-Pools A-H gegen EV-Spezies eingesetzt wurden. Keine Neutralisation bei 100 - 300 TCID₅₀ zeigten die Proben-Nummern 27, 36, 75, 76, 84, 97, 98 und 102. Dies entspricht einem relativen Anteil an CPE-positiven Proben von 100 %.

Eine Neutralisation bei abweichenden Verdünnungen zeigten die Proben Nummer 75 und 76. Dies entspricht einem relativen Anteil von 25 %.

Probe Nummer 75 wurde bei einer Verdünnung von 10^{-5} durch die Antiseren-Pools B und D neutralisiert, das entspricht dem Neutralisationsmuster (Abb. 16) von CV B2. Bei Verdünnung 10^{-4} wurde B und F neutralisiert, was E19 entspricht.

Probe Nummer 76 wurde durch die Antiseren-Pools A, D, F und G bei Verdünnung 10^{-4} neutralisiert, das entspricht keinem vorgegebenen Neutralisationsmuster (Abb. 16).

Die Positivkontrolle E6 zeigte bei einer Verdünnung, die 100 - 300 TCID₅₀ entspricht, eine Neutralisation durch die Antiseren-Pools C und D, das entspricht dem Neutralisationsmuster von E6.

5.4. PCR-Produkte

5.4.1. qRT-PCR

Von 105 untersuchten Proben wurden 5 positiv auf EV getestet, das entspricht 4,76 %.

Zwei Proben hatten kein auswertbares Signal im CY5-Kanal, das entspricht 1,90%.

5.4.2. 5'-NTR

Für die 1. PCR konnte im Kapillargelchip-Elektrophorese-Verfahren bei 6 von 8 Proben eine deutliche Fraktion mit Molekülen in der erwarteten Größe gemessen werden, das entspricht 75%.

Für die 2. PCR konnte im Kapillargelchip-Elektrophorese-Verfahren bei 8 von 8 Proben eine deutliche Fraktion mit Molekülen in der erwarteten Größe gemessen werden, das entspricht 100%.

5.4.3. VP1

Durch die Anwendung eines Temperaturgradienten sollte die optimale Hybridisierungstemperatur ermittelt werden. Das Ergebnis der Gradienten-PCR erbrachte bei allen angewandten Temperaturen eine entsprechende Bande, d. h. jede Temperatur des Gradienten ist für das Primer-Annealing einer VP1-PCR geeignet. Da andere Labore die Annealing-Temperatur der VP1-PCR auf 42 °C setzen, wird diese auch hier hervorgehoben.

Für die 1. PCR konnte im Agarose-Gelelektrophorese-Verfahren nur bei 1 von 8 Proben eine deutliche Bande im erwarteten Bereich festgestellt werden, das entspricht 12,5 %.

Für die 2. PCR konnte im Agarose-Gelelektrophorese-Verfahren bei allen 8 Proben eine deutliche Bande im erwarteten Bereich festgestellt werden, das entspricht 100 %.

5.4.4. Sequenzierung und Homologieuntersuchung

Die Sequenzierung und Homologieuntersuchung aller PCR-Produkte der 5'-NTR-Region ergab keinerlei verwertbare Ergebnisse, das entspricht 0%.

Die Sequenzierung und Homologieuntersuchung aller PCR-Produkte der VP1-Region ergab bei allen 8 Proben eindeutige Ergebnisse, das entspricht 100%.

5.5. Nationales Referenzzentrum

Bei 8 von 8 eingesendeten Proben konnte das NRZ einen eindeutigen Erregernachweis bringen, das entspricht 100 %.

Alle Erregernachweise des NRZ deckten sich mit unseren Ergebnissen aus der Homologieuntersuchung der VP1 PCR-Produkte, das entspricht 100 %.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es den Anteil an EV aus dem Pool der EV- und RV-positiven Proben aus der EMBIS-Grippestudie zu ermitteln und weiterhin die EV zu typisieren und dabei die etablierten Zellkultur-Methoden mit in der Routine am LGL noch nicht standardisierten molekularbiologischen Methoden (PCR und Sequenzierung) auf Anwendbarkeit bei respiratorischen EV zu überprüfen.

6.1. EMBIS und Zellkultur

105 Proben standen aus der EMBIS Studie zur Verfügung, die mittels einer Multiplex-PCR (xTag RVP) der Fa. Luminex positiv auf RV/EV getestet worden waren. Für die Isolierung der Viren wurden RD-Zellen in der Zellkultur verwendet. Nach zwei Passagen zeigte sich bei 8 Proben ein deutlicher CPE. Zwei Proben hatten nur in der Isolierung einen CPE, was als zytotoxischer Effekte durch etwaige Toxine interpretiert wurde, da sich in den folgenden Passagen keine CPEs einstellten. Dass nur bei knapp 7% der Proben ein CPE zu sehen war, wirft natürlich die Frage auf wieso in 93% der Proben kein CPE auftrat. Sowohl EV, als auch RV sind per Zellkultur vermehrungsfähig und zeigen beide einen typischen CPE (Zeichenhardt & Grunert, 2010). Im Gegensatz zu EV, ist jedoch die Isolierung von RV aufgrund unterschiedlicher Suszeptibilität mit RD-Zellen nicht möglich, hier würden beispielsweise HeLa- oder HELF-Zellen benötigt (Arruda et al., 1996). Also war in der Zellkultur eine Vermehrung von RV nicht zu erwarten und entsprechend wenig Proben mit einem CPE. Doch es stellt sich die Frage, ob eine Quote von 7% EV bei EV/RV-positiven Proben der üblichen Verteilung auch im internationalen Vergleich entspricht? Hier muss gesehen werden, dass die Grippezeit nicht die typische EV-Zeit ist, wohl aber die Zeit der RV. EV-Epidemien treten in gemäßigten Klimazonen gewöhnlich im Sommer und Herbst auf (Zeichenhardt & Grunert, 2010). Man kann sich aber fragen, ob die respiratorischen EV nicht von dem typischen EV-Auftreten abweichen und eher dem der RV entsprechen. In der Provinz Yunnan in China wurde im Zeitraum 2006 - 2010 das Auftreten von respiratorischen EV festgestellt, so wie es jahreszeitlich typisch für EV ist (Tang et al., 2014). In Holland konnte man ähnliches feststellen, jedoch gab es auch in der Grippezeit kleinere Anstiege bei den respiratorischen EV (Abb. 25).

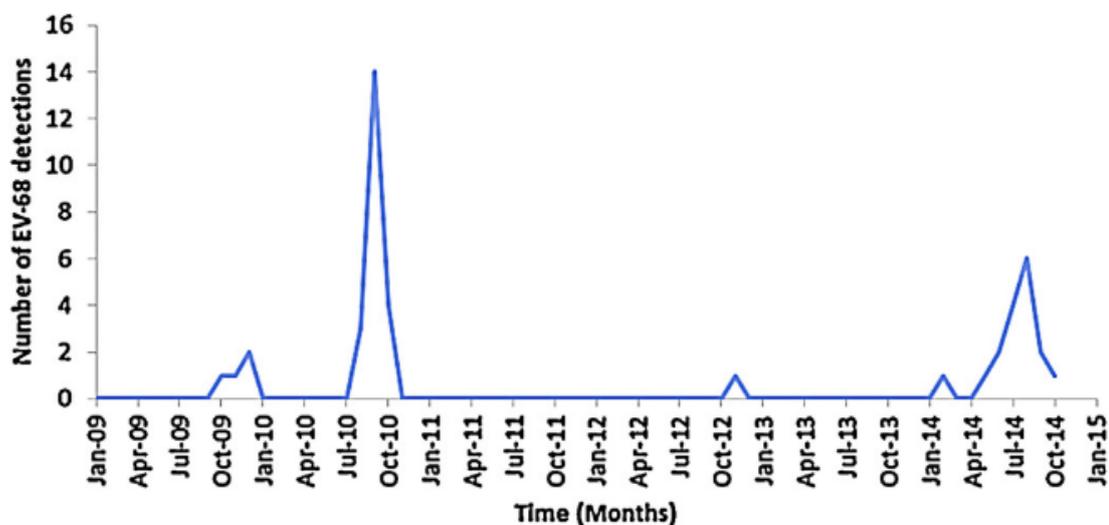


Abbildung 25: Auftreten von EV D68 in Holland im Zeitraum 2009-2014// Quelle: (Poelman et al., 2015)

Der erste große Ausbruch von EV D68 in den USA 2014, fiel in die Sommermonate und damit in den EV-üblichen Zeitraum (Oermann et al., 2015), ebenso ein großer Ausbruch in Schweden 2015 (Dyrdak et al., 2016). In Dänemark allerdings wurden im Zeitraum Januar 2015 bis Oktober 2016 sechs EV-C-positive und neun EV D68-positive Proben gefunden, wobei die EV-C Fälle allesamt im Zeitraum November bis März auftraten (Barnadas et al., 2017). Das geringe Auftreten von EV während der EMBIS-Studie entspricht somit den Erwartungen im internationalen Vergleich. Allerdings hätte man im Rahmen der EMBIS-Studie schon hoffen dürfen, respiratorische EV zu finden. Die fehlende Nachweise solcher EV-C-Fälle könnten chronologische Gründe haben. Von größeren EV-C-Ausbrüchen wird erst seit 2016 berichtet, die EMBIS Studie war aber schon 2013/2014. Zudem zeigen die EV-C eine besonders hohe genetische Divergenz in der 5'-NTR Region, weshalb sie von vielen 5'-NTR-PCRs trotz breiter Spezifität nicht detektiert werden konnten (Liana et al., 2015). An welche Region des EV/RV-Genoms die Primer der Multiplex-PCR xTag RVP binden, hat die Firma Luminex leider nicht veröffentlicht (Merante et al., 2007). Eine Nachweisbarkeit von EV-D68 lässt sich allerdings einer behördlichen Produktbeschreibung entnehmen (Zugriff am 17.3.2020: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/K112781.pdf).

Weiterhin könnte man vermuten, dass die neuen Stämme der EV-C Gruppe andere Wachstumsbedingungen an die Zellkultur stellen und auf RD-Zellen nicht zu propagieren sind. Eine Studie aus dem Jahr 2012 deutet zumindest darauf hin, dass manche EV-C nicht auf den üblichen Zellkulturen der Routine anwachsen (Lukashev et al., 2012). Die Frage inwiefern RD-Zellen für bestimmte respiratorische EV ungeeignet sein könnten, lässt sich nicht abschließend anhand unserer Ergebnisse klären, da sich in den PCR-Ergebnissen keine EV-positiven Proben fanden, die nicht auch in der Zellkultur einen CPE gezeigt hätten. Allerdings wurden die Primer des Diagenode-Kits für die Untersuchung aller 105 Proben auf EV verwendet. Diese Primer binden in der 5'-NTR-Region (Read & Kurtz, 1999), was wie bereits erwähnt ein Risiko beinhaltet nicht alle EV-C-Typen detektieren zu können.

Wenn man die Ergebnisse der EMBIS-Studie selbst anschaut, stellt man fest dass in 48 % der Proben kein Virusnachweis möglich war. Das steht im Kontrast zu den wissenschaftlich untersuchten Werten für die Sensitivität der xTag RVP Multiplex-PCR, die mit 88,6 % (Pabbaraju et al., 2011) bis 97% (Mahony et al., 2007) angegeben wird. Der hohe Anteil nicht identifizierbarer Proben wird mit der Möglichkeit einer bakteriellen oder allergischen Ursache für die Symptome begründet. In einer vorangegangenen Studie war dieser Anteil mit 27 % zwar auch schon erheblich, jedoch deutlich geringer (vgl. Campe et al., 2016). Welche EV sich in 48 % der unidentifizierten Proben verbergen könnten, lässt sich an dieser Stelle nicht abschätzen.

6.2. Neutralisationstest

Für den Neutralisationstest wurde der LBM Antiseren-Pool verwendet, welcher vom WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research in Kopenhagen betreut wird und diesem auch den Namen gab. Für keine der 8 CPE-positiven Proben konnte eine Neutralisation bei 100 - 300 TCID₅₀ erzielt werden, die einer gültigen Kombination aus dem Neutralisationsschema entspricht. Versuche die Viruslast in der Titration zu variieren brachten nur bei einer Probe eine stimmige Neutralisation. Diese stimmte aber nicht mit dem Ergebnis des NRZ und der Sequenzierung überein und muss daher als falsch angesehen werden. Man kann also resümieren, dass der LBM Antiseren-Pool ungeeignet war, die EV aus der EMBIS-Studie zu typisieren. Allerdings

ist dies retrospektiv nicht auf ein Versagen des Tests zurückzuführen, denn aus den positiven Proben wurden später CV A4, CV A6 und CV A10 typisiert. Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass diese überhaupt nicht mit dem LBM Pool A-H typisierbar sind. Die Antiseren wurden in den 1960er Jahren entwickelt und waren ab 1973 weltweit im Einsatz. Weil es damals nicht möglich war alle bekannten Serotypen in der Zellkultur anzuzüchten, waren nur die Pools A-H für die Zellkultur bestimmt, die Pools J-P für die Virusisolation in Säuglingsmäusen (Lim & Benyesh-Melnick, 1960; Melnick et al., 1973). Letztere Antiseren sind allerdings Speziallaboren wie dem NRZ vorbehalten. Die Frage ob die Antiseren der LBM Pools A-H heute noch anwendbar sind, lässt sich anhand unserer Untersuchungen nicht ermessen. Bending befand sie im Jahre 2005 mit einer Ausnahme allerdings für immer noch anwendbar (Bendig & Earl, 2005). Beurteilen können wir bloß, dass der Kopenhagen-Test sich im Rahmen unserer Untersuchungen für nutzlos erwiesen hat. Was retrospektiv nicht verwundert, denn die LBM-Pools waren nur für die Typisierung von den damals bekannten 61 Serotypen gedacht. Mittlerweile gibt es 75 Serotypen und noch weit mehr Genotypen (Zell et al., 2017). Für alle neuen Serotypen und zur Unterscheidung der Genotypen sind die LBM-Antiseren nicht verwendbar. Die stellen somit keine Option dar, will man neue respiratorische EV typisieren.

6.3. PCR und NRZ Ergebnisse

Parallel zur Zellkultur wurde eine qRT-PCR aller Probe mit dem Diagenode-Kit durchgeführt. Hierbei ließen sich bei 5 Proben EV detektieren, 3 Proben mit positiven CPE in der Zellkultur zeigten kein Signal im FAM-Kanal. Wenn nur das FAM-Signal aber nicht die Interne Kontrolle ausbleibt, ist die enterovirale RNA für gewöhnlich unter der Nachweisgrenze. Möglicherweise ist auch bei der RNA-Extraktion trotz Einsatz eines RNA-Carriers virales Material schwach positiver Proben durch unspezifische Adhäsion verloren gegangen. Eine Inhibitor der PCR kommt bei den meisten Proben nicht in Betracht, da alle bis auf zwei Proben (Nummer 77 und 104, s. Tab. 22) ein positives Cy5-Signal erbrachten. Möglicherweise enthielten die drei CPE-positiven, aber qRT-PCR-negativen Proben zu wenig virales Material für den molekularen Nachweis, da die Zellkultur durch die intensive Vermehrung der Viren eine deutlich

höhere Sensitivität aufweist. So zeigte sich bei Probe 76 auch erst in der weiteren Passagierung des Zellkulturüberstandes einen CPE, was für einen sehr geringen Virustiter spricht. Die beiden anderen CPE-positiven, aber qRT-PCR-negativen Proben waren allerdings schon beim ersten Schritt der Isolierung stark positiv, was einen geringen Virustiter widerspricht. Die Gründe für die fehlende qRT-PCR-Detektion könnten hier allerdings auch bei den Primern des Kits liegen. Diese binden in der 5'-NTR-Region (Read & Kurtz, 1999), welche sich bei unseren Proben im Zuge der Sequenzierung als wenig konserviert erwiesen hatte. Inwieweit die genetische Divergenz in dieser Region für eine mangelhafte Bindungsfähigkeit der Primer verantwortlich ist, kann vermutet werden, ist aber nicht abschließend zu beantworten.

Bei beiden Proben (Nummer 77 und 104), die sowohl in der Zellkultur keinen CPE als auch in der qRT-PCR kein positives FAM-Signal zeigten, fehlte allerdings das Cy5-Signal der Internen Kontrolle. Das ist normalerweise ein Indiz für eine toxische Inhibition der PCR, RNase-Kontamination oder Fehler bei der Extraktion. Weder die Negativ- noch die Positivkontrollen geben Grund eine Kontamination oder Kreuzkontamination zu vermuten. Was hier der genaue Grund für das Fehlen des Cy5-Signals war, lässt sich retrospektiv nicht mehr eruieren. Da bei der sensitiveren Methode der Zellkultur kein CPE und auch kein cytotoxischer Effekt auftraten, ist bei den Proben 77 und 104 von EV-negativen Proben auszugehen.

Von den Überständen aller 8 Proben, die einen CPE in der Zellkultur aufwiesen, wurde eine „nested“-PCR der 5'-NTR-Region durchgeführt. Bei allen 8 Proben zeigten sich bei der Kontrolle des 2. PCR-Produktes durch eine Kapillargelchip-Elektrophorese eine sichtbare Menge an Amplifikaten der berechneten Länge von 323 - 326 bp (Tab. 24), was der zu erwartenden Größe von 319 bp entspricht. Bei 5 von 8 Proben wurde zusätzlich auch eine kleinere Fraktion von Amplifikaten (Anteil von 1 – 12 %) gefunden, die deutlich größer, mit einer Molekülgröße zwischen 398 und 410 bp, berechnet wurden. Dies lässt auf eine Übertragung des Amplifikates aus dem 1. Schritt der „nested“-PCR oder einer unspezifischen Bindung der Primer vermuten.

Das entsprechende PCR-Produkt jeder Probe wurde aufgereinigt, sequenziert und die erhaltene Sequenz zur Typisierung mit der Gendatenbank geblastet. Bei allen 8 Proben zeigte sich, dass das Alinieren der beiden komplementären Sequenzen keine stimmige Consensus-Sequenz erbrachte. Auch mit manuellem Nachbereiten war keine wirklich eindeutige Consensus-Sequenz herzustellen. Das Ergebnis des Blastens entsprach diesem Eindruck, denn keine Probe konnte eindeutig einem Virustyp zugeordnet werden. Die verwendeten Primer der Fa. MWG waren 2005 von Pusch *et al.* zur Untersuchung von Abwässern auf Grundlage eines E30-Genoms kreiert worden (Pusch *et al.*, 2005). Die Passung der Primer steht außer Frage, sonst würde die Hauptfraktion der Amplifikate nicht annäherungsweise der erwarteten Größe entsprechen. Allerdings zeigt die Abweichung von 4 - 7 bp, dass die 5'-NTR-Region nicht komplett konserviert ist.

Zurück zu den 5 Proben, die eine Minorfraktion von 1 – 12 % der Gesamtmenge des PCR-Produktes mit einem zusätzlichen längeren Amplifikat von 80 – 90 bp aufweisen (Tab. 24). Dass es sich hier um eine Verschleppung aus dem 1. Schritt der nested-PCR handelt ist eher unwahrscheinlich, da das Amplifikat um 30 – 40 bp kürzer ist als die theoretische Länge von 442 bp. Dies lässt darauf schließen, dass die Primer höchst wahrscheinlich in einer anderen Region, d. h. unspezifisch, gebunden haben. So wie es Liana *et al.* schon für EV-C postulierte (Liana *et al.*, 2015), lässt unsere Untersuchung den Verdacht zu, dass die 5'-NTR-Region auch bei weiteren EV-Typen aus respiratorischen Proben nicht ausreichend konserviert ist, um eine erfolgreiche Typisierung mittels Sequenzierung durchzuführen. Auf der anderen Seite ist die Sequenz der 5'-NTR-Region bei manchen Clustern von EV-Typen so stark konserviert, dass in der zu amplifizierenden Region nur sehr wenige Nukleotid-Austausche vorliegen, d. h. diese Region sehr konserviert ist, so dass sie für eine Differenzierung der EV-(Sero)typen nicht ausreichend divergent ist (mündliche Information von Prof. Dietrich, NRZ für EV, Berlin).

Nachdem die „nested“-PCR der 5'-NTR-Region keine brauchbaren Ergebnisse lieferte, wurde überlegt eine RT-PCR der VP1-Region zu etablieren. Nix *et al.* hatten 2006 mit ihren sogenannten CODEHOP-Primern sehr überzeugende Ergebnisse erzielen können, sowohl bei der Detektion als auch bei der Sequenzierung von EV. Durch einen

degenerierten Kern des Primers soll sichergestellt sein dass alle EV-Typen erfasst werden. Am 5'-Ende stellt eine nicht-degenerierte Sequenz sicher, dass die Bindung zum Komplementärstrang ausreichend stark ist und somit Hybridisierungstemperaturen so hoch gewählt werden können, dass wenig unspezifische Amplifikate entstehen (Nix et al., 2006). Diese PCR im Labor des LGL zu etablieren war Jahre zuvor bereits gescheitert. Und so musste mit neuen Reagenzien und neuen Materialien erstmals das Verfahren etabliert werden. Hierfür wurde die Ermittlung der passenden Hybridisierungstemperatur als größte Herausforderung gesehen. Im ersten PCR-Schritt sind 42 °C empfohlen und im zweiten 60 °C (Nix et al., 2006). Wir haben über einen Temperaturgradienten für das Annealing der Primer ein mühsames Optimieren dieses Schrittes verkürzen können. Für beide PCR-Schritte konnten wir eine Annealing-Temperatur von 42 °C als geeignet herausarbeiten. Entgegen der Empfehlung von Nix *et al.* die Annealing-Temperatur des 2. PCR-Schrittes auf 60 °C zu erhöhen, folgten wir der Erfahrung des NRZ für EV, beide Annealing-Schritte bei 42 °C durchzuführen.

Von den Überständen aller 8 CPE-positiver Zellkultur-Proben wurde eine seminested-RT-PCR der VP1-Region durchgeführt. Nach Abschluss der PCR wurde das Amplifikat mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Sequenzierung der aufgereinigten Amplifikate erbrachte deutlich lesbare Chromatogramme, die nur minimal an den 5'- und 3'-Enden getrimmt werden mussten. Beim Alinment der beiden komplementären Sequenzstränge wurden eindeutige Consensus-Sequenzen erzielt, die absolut eindeutige Ergebnisse beim Blasten mit den Sequenzen der Genbank erbrachten. Inwieweit sich die Anwendbarkeit dieses seminested-RT-PCR-Verfahrens zur Amplifikation der VP1-Region auf respiratorische EV erstreckt, besonders die neuen Typen des EV-C-Clusters, wird durch unsere Ergebnisse nicht abgedeckt. Midgley *et al.* betont aber, dass bei ihren RT-PCR-Untersuchungen der VP1-Region, aufgrund der hohen genetischen Diversität, nicht alle EV-D68 detektiert werden konnten. Daher werden von ihnen PCRs der 5'-NTR-, VP1- und VP2-Region parallel angewandt (Midgley et al., 2015).

Im Rahmen unserer Untersuchung konnten alle Proben erfolgreich sequenziert und anschließend mit Hilfe der Genbank typisiert werden; es liegen folgende Coxsackieviren vor: 3 x CV A4, 3 x CV A6 und 2 x CV A10. Diese sind nicht besonders als

Erreger respiratorischer Krankheiten bekannt. Sie können, wie bereits in der Einleitung beschrieben, diverse Krankheitsbilder verursachen und werden beispielsweise mit Herpangina, akuter Lymphatischer Pharyngitis und Exanthenen in Verbindung gebracht (Melnick, 1996; Pallansch & Roos, 2007). Das RKI nennt weiterhin ausdrücklich CV A6 und A10 als häufige Verursacher der Hand-Fuß-Mund Krankheit (Zugriff am 17.3.2020:

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HFMK.html#doc3711596bodyText2). Auch in einer großen Studie aus Asien mit mehr als 12.000 Rachenabstrichen, war unter 71 EV-positiven Proben kein einziger CV A4, 6 oder 10 (Rutvisuttinunt et al., 2017). Aber Bayern scheint hier dennoch keine Besonderheit zu sein, denn auch 2014 in Holland war CV A6 der zweithäufigste EV nach EV D68 und CV A4 wurde auch gefunden (Poelman et al., 2015).

Da die VP1-PCR hiermit am LGL neu etabliert und erstmals erfolgreich durchgeführt wurde, wollten wir unsere Ergebnisse durch das NRZ für EV bestätigt sehen.

Erfreulicherweise stimmen unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen des NRZ zu 100 % überein, insofern kann man von einer korrekten Typisierung ausgehen. Die seminested-RT-PCR der VP1-Region hat sich zur Typisierung respiratorischer EV im Rahmen unserer Untersuchungen sehr gut bewährt, müsste aber für einen routinemäßigen Einsatz am LGL mit weiteren EV aus verschiedenen Clustern verifiziert werden.

7. Zusammenfassung

Zur Zeit der Erstellung dieser Arbeit wurden am LGL in der Humanvirologie standardmäßig EV aus Stuhlproben untersucht. Dazu wurde jede Probe molekular mit einer real-time-RT-PCR von Diagenode qualitativ und bei positivem Befund beziehungsweise auf Anforderung parallel auch serologisch mit einem Neutralisationstest analysiert. Seit einigen Jahren wird das Auftreten von respiratorischen Infektionen mit bestimmten EV-Typen beobachtet, die nicht durch die übliche Diagnostik aus Stuhlproben nachzuweisen sind. Dazu zählen EV-D68 und andere EV der Spezies C, welche die Untersuchung von respiratorischen Proben voraussetzen. In der Wintersaison 2013/2014 wurden im Rahmen des Bayern Influenza Sentinel (BIS) ab einer Influenza-Positivrate von 20 % alle influenzanegativen Proben in die anhängende EMBIS-Studie am LGL weitergeleitet. Somit wurden 616 respiratorische Proben von influenzanegativen Patienten mit Grippesymptomen gesammelt. Mit Hilfe einer Multiplex-PCR für 16 weitere respiratorische Viren wurden aus diesem Pool 105 EV- und RV-positive Proben identifiziert.

Das Ziel dieser Arbeit war es den Anteil der EV aus den 105 Proben zu ermitteln und diese mit den am LGL etablierten serologischen und molekularen Methoden zu typisieren. Eine qRT-PCR mit den Primern des EV-Kits der Fa. Diagenode (Read & Kurtz, 1999) lieferte bei 5 von 105 Proben (4,8 %) ein positives Signal für EV. Die parallel dazu durchgeführte EV-spezifische Virusisolierung auf RD-Zellen gelang in 8 von 105 Proben (7,6 %) und stellt somit aufgrund der Virusvermehrung eine sensitivere Methode dar. Die serologische Typisierung dieser 8 Proben im Neutralisationstest mit den kommerziell erhältlichen LBM-Antiseren-Pools A bis H ergab erstaunlicherweise für keine einzige Probe ein verwertbares Neutralisationsmuster, d. h. die gesuchten EV-Typen wurden mit den vorhandenen Antiseren-Pools nicht abgedeckt.

Im weiteren Teil dieser Arbeit wurde somit versucht die Typisierung der in der Zellkultur isolierten EV auf molekularem Wege durchzuführen. Eine „nested“-PCR der Zellkulturüberstände mit den 5'-NTR-Primern (Pusch et al., 2005) war am LGL für EV etabliert, aber nicht akkreditiert. Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte resultierte in Sequenzen beider Richtungen, die jedoch keine hochwertige Consensus-Sequenz ergaben. Somit war es nicht verwunderlich, dass ein Alignment mit den

Sequenzen der Genbank keine eindeutige Typisierung lieferte. Die 5'-NTR-Region der EV ist anscheinend zu konserviert und dadurch nicht geeignet für eine exakte EV-Typisierung.

Mit Hilfe der erfolgreichen Etablierung der „seminested“-PCR unter Heranziehung der VP1-Region (Nix et al., 2006) gelang die Typisierung der acht EV-Isolate. Die getrimmte hochwertige Consensus-Sequenzen lieferte beim Blast mit den Sequenzen der Genbank eindeutige Typisierungsergebnisse. Es wurden Coxsackie-Viren der Typen A4, A6 und A10 identifiziert, die tatsächlich nicht mit den Antigen-Pools des etablierten Neutralisationstests zu typisieren gewesen wären. Abschließend wurden zur Bestätigung der Ergebnisse der neu etablierten VP1-PCR alle acht Proben ans NRZ für EV in Berlin weitergeleitet, deren Typisierung unsere Ergebnisse vollständig verifizierte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Erweiterung des Methodenspektrums in der Humanvirologie am LGL eine erfolgreiche Typisierung gelang. Dies setzt aber eine Kombination zweier Methoden voraus, die Virusvermehrung in der Zellkultur mit anschließender Amplifikation und Sequenzanalyse der VP1-Region. Der erste Schritt zur Verifizierung der molekularen EV-Typisierung mittels VP1-Region wurde durch diese Arbeit getan, weitere Untersuchungen mit respiratorischen Proben auch außerhalb der Grippe-Saison sind jedoch noch notwendig.

8. Literaturverzeichnis

- Armstrong, C. (1939). Successful Transfer of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus from the Cotton Rat to the White Mouse. *Public Health Reports (1896-1970)*, 54(52), 2302-2305. doi:10.2307/4583135
- Arruda, E., Crump, C. E., Rollins, B. S., Ohlin, A., & Hayden, F. G. (1996). Comparative susceptibilities of human embryonic fibroblasts and HeLa cells for isolation of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol*, 34(5), 1277-1279.
- Barnadas, C., Midgley, S. E., Skov, M. N., Jensen, L., Poulsen, M. W., & Fischer, T. K. (2017). An enhanced Enterovirus surveillance system allows identification and characterization of rare and emerging respiratory enteroviruses in Denmark, 2015–16. *Journal of Clinical Virology*, 93, 40-44. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.017>
- Bendig, J., & Earl, P. (2005). The Lim Benyesh-Melnick antiserum pools for serotyping human enterovirus cell culture isolates--still useful, but may fail to identify current strains of echovirus 18. *J Virol Methods*, 127(1), 96-99. doi:10.1016/j.jviromet.2005.03.003
- Braun, R. W., & Bartenschlager, R. (2010). Biologische Grundlagen und Taxonomie. In H. W. Doerr & W. H. Gerlich (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Campe, H., Heinzinger, S., Hartberger, C., & Sing, A. (2016). Clinical symptoms cannot predict influenza infection during the 2013 influenza season in Bavaria, Germany. *Epidemiol Infect*, 144(5), 1045-1051. doi:10.1017/s0950268815002228
- Doerr, H. W. (2010). Historische Entwicklung und Grundbegriffe. In H. W. Doerr & W. H. Gerlich (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Dyrdak, R., Grabbe, M., Hammas, B., Ekwall, J., Hansson, K. E., Luthander, J., . . . Albert, J. (2016). Outbreak of enterovirus D68 of the new B3 lineage in Stockholm, Sweden, August to September 2016. *Euro Surveill*, 21(46). doi:10.2807/1560-7917.Es.2016.21.46.30403
- Enders, J. F., Weller, T. H., & Robbins, F. C. (1949). Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. *Science*, 109(2822), 85-87. doi:10.1126/science.109.2822.85
- Haller, O. (2010). Angeborene Immunabwehr. In H. W. Doerr & J. Aberle (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Hengel, H., & Halenius, A. (2010). Adaptive Immunabwehr. In H. W. Doerr & J. Aberle (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Iserte, J. A., Stephan, B. I., Goni, S. E., Borio, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Lozano, M. E. (2013). Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnol Res Int*, 2013, 383646. doi:10.1155/2013/383646
- Landsteiner, K., & Popper, E. (1909). Übertragung des Poliomyelitis acuta auf Affen. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie*, 2, 377-390.

- Liana, M. H., Melinda, D. P., Brenton, J. N., & Ronald, B. T. (2015). Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. *Emerging Infectious Disease journal*, 21(10), 1858. doi:10.3201/eid2110.150759
- Liébecq, C. I. U. o. B. (1992). *Biochemical nomenclature and related documents*. London u.a.: Portland Press.
- Lim, K. A., & Benyesh-Melnick, M. (1960). Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and ECHO). *J Immunol*, 84, 309-317.
- Lukashev, A. N., Drexler, J. F., Kotova, V. O., Amjaga, E. N., Reznik, V. I., Gmyl, A. P., . . . Drosten, C. (2012). Novel serotypes 105 and 116 are members of distinct subgroups of Human enterovirus C. *Journal of General Virology*, 93(11), 2357-2362. doi:<https://doi.org/10.1099/vir.0.043216-0>
- Mahony, J., Chong, S., Merante, F., Yaghoubian, S., Sinha, T., Lisle, C., & Janeczko, R. (2007). Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2965. doi:10.1128/JCM.02436-06
- Meijer, A., van der Sanden, S., Snijders, B. E., Jaramillo-Gutierrez, G., Bont, L., van der Ent, C. K., . . . Koopmans, M. P. (2012). Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in The Netherlands in 2010. *Virology*, 423(1), 49-57. doi:10.1016/j.virol.2011.11.021
- Melnick, J. L. (1996). My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol*, 50, 1-24. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.1
- Melnick, J. L., Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J., & Ho, H. H. (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ*, 48(3), 263-268.
- Melnick, J. L., & Wimberly, I. L. (1985). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: new LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull World Health Organ*, 63(3), 543-550.
- Merante, F., Yaghoubian, S., & Janeczko, R. (2007). Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP Assay). *J Clin Virol*, 40 Suppl 1, S31-35. doi:10.1016/s1386-6532(07)70007-0
- Midgley, S. E., Christiansen, C. B., Poulsen, M. W., Hansen, C. H., & Fischer, T. K. (2015). Emergence of enterovirus D68 in Denmark, June 2014 to February 2015. *Eurosurveillance*, 20(17), 21105. doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.17.21105>
- Nix, W. A., Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2006). Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 44(8), 2698-2704. doi:10.1128/jcm.00542-06
- Oermann, C. M., Schuster, J. E., Conners, G. P., Newland, J. G., Selvarangan, R., & Jackson, M. A. (2015). Enterovirus d68. A focused review and clinical highlights from the 2014 U.S. Outbreak. *Ann Am Thorac Soc*, 12(5), 775-781. doi:10.1513/AnnalsATS.201412-592FR

- Pabbaraju, K., Wong, S., Tokaryk, K. L., Fonseca, K., & Drews, S. J. (2011). Comparison of the Luminex xTAG respiratory viral panel with xTAG respiratory viral panel fast for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol*, *49*(5), 1738-1744. doi:10.1128/jcm.02090-10
- Pallansch, M., & Roos, R. (2007). Fields' virology. In B. N. Fields & D. M. Knipe (Eds.), (pp. 839-893). New York, NY: Raven Press.
- Parker, N., Schneegurt, M., Tu, A.-H. T., Lister, P., & Forster, B. M. (2016). *Microbiology*. Houston, Texas: OpenStax.
- Paul, J. R. (1971). *A history of poliomyelitis*: New Haven & London: Yale Univ, Press.
- Poelman, R., Schölvinc, E. H., Borger, R., Niesters, H. G. M., & van Leer-Buter, C. (2015). The emergence of enterovirus D68 in a Dutch University Medical Center and the necessity for routinely screening for respiratory viruses. *Journal of Clinical Virology*, *62*, 1-5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.11.011>
- Pusch, D., Oh, D.-Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., . . . Schreier, E. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*, *150*(5), 929-947. doi:10.1007/s00705-004-0467-8
- Read, S. J., & Kurtz, J. B. (1999). Laboratory Diagnosis of Common Viral Infections of the Central Nervous System by Using a Single Multiplex PCR Screening Assay. *J Clin Microbiol*, *37*(5), 1352-1355.
- Renois, F., Bouin, A., & Andreoletti, L. (2013). Enterovirus 68 in pediatric patients hospitalized for acute airway diseases. *J Clin Microbiol*, *51*(2), 640-643. doi:10.1128/jcm.02640-12
- Richter, J., Tryfonos, C., Panagiotou, C., Nikolaou, E., Koliou, M., & Christodoulou, C. (2013). Newly emerging C group enteroviruses may elude diagnosis due to a divergent 5'-UTR. *International Journal of Infectious Diseases*, *17*(12), e1245-e1248. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.010>
- Rutvisuttinunt, W., Klungthong, C., Thaisomboonsuk, B., Chinnawirotpisan, P., Ajariyakhajorn, C., Manasatienkij, W., . . . Fernandez, S. (2017). Retrospective use of next-generation sequencing reveals the presence of Enteroviruses in acute influenza-like illness respiratory samples collected in South/South-East Asia during 2010-2013. *J Clin Virol*, *94*, 91-99. doi:10.1016/j.jcv.2017.07.004
- Sabin, A. B., & Ward, R. (1941). THE NATURAL HISTORY OF HUMAN POLIOMYELITIS : I. DISTRIBUTION OF VIRUS IN NERVOUS AND NON-NERVOUS TISSUES. *The Journal of experimental medicine*, *73*(6), 771-793.
- Scolari, S. (2009). *Lateral organization of the transmembrane domain and cytoplasmic tail of influenza virus hemagglutinin revealed by time resolved imaging*.
- Tang, J., Yoshida, H., Ding, Z., Tao, Z., Zhang, J., Tian, B., . . . Zhang, L. (2014). Molecular epidemiology and recombination of human enteroviruses from AFP surveillance in Yunnan, China from 2006 to 2010. *Sci Rep*, *4*, 6058. doi:10.1038/srep06058
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A., & Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, *13*(3), 718-725. doi:10.1016/0888-7543(92)90147-k

- Wimmer, E., & Paul, A. (2010). Picornaviren. In H. W. Doerr & W. H. Gerlich (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Wimmer, E., & Paul, A. (2010). Picornaviren; Grundlagen. In H. W. Doerr & J. Aberle (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Zeichenhardt, H., & Grunert, H. P. (2010). Klinik, Diagnostik und Prävention. In H. W. Doerr & W. H. Gerlich (Eds.), *Medizinische Virologie* (pp. XXVIII, 736 S. :). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., . . . Ictv Report, C. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. Retrieved from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae
- Zhang, Y., Moore, D. D., Nix, W. A., Oberste, M. S., & Weldon, W. C. (2015). Neutralization of Enterovirus D68 isolated from the 2014 US outbreak by commercial intravenous immune globulin products. *J Clin Virol*, *69*, 172-175. doi:10.1016/j.jcv.2015.06.086

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Replikationszyklus am Beispiel Influenza: 1. Das Virion bindet über das Oberflächenprotein Hämagglutinin an die Wirtszellenmembran 2. Endozytose 3. Ansäuerung im Endosom 4. Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran 5. Freigesetztes virales Genom gelangt in den Zellkern 6. Expression des Genoms und Replikation 7. Weitere Komponenten werden im Zytosol synthetisiert 8. Virale Komponenten akkumulieren an der Membran, wo die Fertigstellung des neuen Virions stattfindet 9. Freisetzung des Virions durch Knospung // Quelle: (Scolari, 2009)	5
Abbildung 2: Lytischer Zyklus am Beispiel eines Bakteriophagen: 1. Bindung des Virions an die Membran der Wirtszelle 2. Virales Genom dringt in die Zelle ein 3. Expression und Replikation des Genoms 4. Fertigung neuer Virionen 5. Freisetzung der Virionen durch Untergang der Wirtszelle // Quelle: (Parker et al., 2016)	6
Abbildung 3: Links: Schematische Darstellung des Ikosaeders eines Poliovirions; Rechts: 3D Computermodell // Quelle: (E. Wimmer & A. Paul, 2010)	9
Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum humanpathogener Enteroviren. Errechnet mit der Maximum Composite Likelihood Method. Die Zahlen an den Ästen geben die Anzahl an Basensubstitutionen pro Seite an// Quelle: (Richter <i>et al.</i> , 2013).....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Picornavirus-Rezeptoren // Quelle: (E Wimmer & A. Paul, 2010)	12
Abbildung 6: Detaillierte Darstellung eines Entervorius-Genoms am Beispiel von Polio // Quelle: (E Wimmer & A. Paul, 2010)	13
Abbildung 7: Labornachweise der Probeneinsendungen im BIS: Rachenabstriche //Quelle: LGL-Monitor InfEpi Ausgabe zur 17. Meldewoche 2014.....	21
Abbildung 8: Ergebnisse der EMBIS Studie von KW40 2013- KW17 2014; Erregernachweis in Prozent// Quelle: Susanne Heinzinger, LGL.....	22
Abbildung 9: RD-Zellen im Lichtmikroskop nach Trypanblaufärbung	28
Abbildung 10: RD-Zellen in 75T-Flasche, 100 % Konfluenz, CPE 0.	30
Abbildung 11: Einige abgekugelte Zellen, aber überwiegend intakter Zellrasen.....	32
Abbildung 12: CPE 2 - Deutlich vermehrte Zell-Abkugelungen, noch ca. 60% intakter Zellrasen.....	33
Abbildung 13: CPE 3 - Ca. 80% Zell-Abkugelungen, viele aufschwimmende Zellen, maximal 20% intakter Zellrasen.	33
Abbildung 14: CPE 4 - „Alles schwimmt“ d.h. kein Zellrasen mehr erkennbar, Zellen schwimmen frei im Medium.	34

Abbildung 15: Kopenhagen-Test: links: Ansatz zur Inkubation von Antiseren und Virussuspension; rechts: Zellkultur mit inkubiertem Ansatz. Probennummern wurden geschwärzt.	36
Abbildung 16: Neutralisationsschema LBM Pool A-H zum Kopenhagen-Test. Hiermit wird der Virustyp anhand der Neutralisationsmuster bestimmt // Quelle: (Melnick & Wimberly, 1985).....	37
Abbildung 17: Schaubild Kapillargel-Elektrophorese-Chip der Fa. Bio-Rad. Der rote Strich symbolisiert den Laserdetektor. Die grünen Kreise sind die Proben-Näpfcchen,.....	50
Abbildung 18: Visualisierung der Ergebnisse der Gelchipelektrophorese als Bandenmuster. Die Banden zeigen DNA-Fragmente der PCR Amplifikation ihrer Größe nach aufgetrennt. L = Bandenmuster der DNA- Ladder; Spuren 1-11 = Bandenmuster der Proben.....	52
Abbildung 19: Klassische Agarose-Gelelektrophorese; Ziffern 2-8 (unten): PCR-Produkte vom Temperaturgradienten zweier Proben. Die Banden zeigen DNA-Fragmente der PCR Amplifikation ihrer Größe nach aufgetrennt. L = DNA-Ladder (hervorgehobene Banden: 1000 bp und 500 bp); Probennummern geschwärzt.....	53
Abbildung 20: Gelelektrophorese der VP1 seminested-PCR, 1. Schritt; nur Probe 98 zeigt eine entsprechende Bande; L = DNA-Ladder (hervorgehobene Banden: 1000 bp und 500 bp).....	67
Abbildung 21: Gelelektrophorese der VP1 seminested-PCR, 2. Schritt; alle Proben zeigen eine deutliche Bande im erwarteten Bereich; L = DNA-Ladder (hervorgehobene Banden: 1000 bp und 500 bp).....	67
Abbildung 22: Darstellung eines Ausschnitts des Chromatogramms der Probe 76 mit Hilfe der SeqMan Pro-Software; blau hinterlegte Sequenz wurde abgeschnitten.....	68
Abbildung 23: Alignment der Genbank: VP1-Consensus-Sequenz (Query) zeigt Alignment mit Coxsackievirus A6-Sequenz aus der Genbank.....	69
Abbildung 24: Genbank-Blast-Ergebnis am Beispiel von Probe 76	70
Abbildung 25: Auftreten von EV D68 in Holland im Zeitraum 2009-2014// Quelle: (Poelman et al., 2015)	77
Tabelle 1: Taxonomische Zuordnung humanpathogener Enterovirustypen in Cluster// Quelle (Zugriff am 12.07.2020): http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm	9
Tabelle 2: Klinische Erscheinungen von Enterovirus-Infektionen// Quelle: (Melnick, 1996; Pallansch & Roos, 2007)	16

Tabelle 3: Beschreibung der Kriterien zur Einteilung des zytopathischen Effekts (CPE).....	32
Tabelle 4: qRT-PCR Primer des Diagenode Kit// Quelle: (Read & Kurtz, 1999).....	40
Tabelle 5: Primer der 5' NTR nested-PCR, Fa. MWG// Quelle: (Pusch <i>et al.</i> , 2005)....	40
Tabelle 6: Primer der VP1 nested-PCR// Quelle: (Nix <i>et al.</i> , 2006)	41
Tabelle 7: Mastermix qRT-PCR	43
Tabelle 8: Thermoprofil der PCR; Kanalverstärkung FAM und iCy5 je 4x.	44
Tabelle 9: RT-Ansatz der 5' NTR „nested“ PCR	45
Tabelle 10: Ansatz für die 1. PCR der 5' NTR „nested“ PCR	45
Tabelle 11: Ansatz für die 2. PCR der 5' NTR „nested“ PCR	46
Tabelle 12: Thermoprofil reverse Transkription	46
Tabelle 13: Thermoprofil der PCR des nested PCR-Verfahrens 1. und 2. PCR	46
Tabelle 14: One-step RT/PCR der VP1 Region	47
Tabelle 15: Ansatz 2. PCR der VP1 „nested“ PCR	47
Tabelle 16: Thermoprofil 1. PCR	47
Tabelle 17: Thermoprofil 2. PCR	48
Tabelle 18: Temperaturgradient der PCR	48
Tabelle 19: Migrationszeiten der DNA-Ladder bei der Kapillargelchip-Elektrophorese.....	51
Tabelle 20: Ergebnisse Virusisolierung.....	56
Tabelle 21: Ergebnisse der Titration.....	59
Tabelle 22: Ergebnisse Kopenhagen-Test	60
Tabelle 23: Ergebnisse qRT-PCR.....	62
Tabelle 24: Gelelektrophorese 1. PCR der 5' NTR-nested-PCR.....	65
Tabelle 25: Gelelektrophorese 2. PCR der 5'-NTR nested PCR.....	66
Tabelle 26: Ergebnisse der Sequenzanalyse VP1	70
Tabelle 27: NRZ-Erregernachweis	71
Tabelle 28: Gewählte Verdünnungen für den Neutralisationstest	72

10. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Bei dem Präsidenten Herrn Walter Jonas und Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Sing bedanke ich mich für die Genehmigung die Arbeit am LGL, Abteilung Humanvirologie, durchführen zu können, für die Bereitstellung der EMBIS-Proben sowie für die Benutzung der benötigten Geräte.

Frau Prof. Dr. Gabriele Rieder gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die unermüdliche und hervorragende fachliche Unterstützung während des ganzen Prozesses.

Den technischen Assistentinnen am LGL danke ich für die Unterstützung in den Laboren. Besonderer Dank gilt auch Frau Christine Hartberger für die Unterstützung bei den PCRs.

Es ist mir zuletzt eine Herzensangelegenheit, mich bei meinen Eltern zu bedanken, die mich zu jeder Zeit bedingungslos unterstützt haben.

11. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Julian Möller (geb. 30.09.1989 in Hamburg), an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „**Typisierung der Enteroviren aus Entero-/Rhinoviren-positiven Surveillance-Proben aus dem Erregermonitoring Bayern Influenza Sentinel (EMBIS)**“, selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen, keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Erding den 14.06.2022

Julian Möller