

## Standardisierung und Validierung für das Lebensmittelbuch

Beide Parameter, die Bestimmung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses, erwiesen sich für die Trinkwasseraufbereitung und -verteilung als so robust und aussagekräftig, dass sich frühe Anwender, darunter zwei grosse Wasserversorger der Schweiz, unter der Führung der Eawag und des SVGW (Schweizerischer Verein des Gas- und Wasserfaches) entschieden, die Methode zu standardisieren und validieren. Mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von ca. 5% für die TZZ und ca. 10% für das Verhältnis LNA/HNA-Zellen, fiel die Validierung äusserst erfolgreich aus. Deshalb hat das BAG die TZZ-LNA/HNA-Bestimmung mittels DZ als schnelle Alternative zur traditionellen AMK-Bestimmung (Nr. 56 / E.1) ins Schweizerische Lebensmittelhandbuch (SLMB) aufzunehmen. Die Methode (Nr. 333/1) [15] wird heute vom BAG empfohlen, und ein Handbuch mit Erklärungen und Tipps ist verfügbar [19].

## Die Zukunft

Online-Messung der TZZ und des LNA/HNA-Verhältnisses [20], schnelle Detektion und Quantifizierung von Krankheitserregern innerhalb von ein bis zwei Stunden [7,8], und die Evaluierung von Desinfektionsprozessen vom Rohwasser [21–24], über die Aufbereitung und Verteilung bis ins Haus zum Hahn des Konsumenten, werden heute entwickelt und teilweise auf dem Markt bereits angeboten. Der Autor ist überzeugt, dass die Aufnahme der TZZ-Basismethode in das SLMB erst der Anfang eines Umbruchs in der mikrobiologischen Trinkwasseranalytik darstellt, denn das Potential der DZ-Methodik ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft.

Korrespondenz:  
microbes-in-water@bluewin.ch

### Dank

Finanziert wurden unsere Arbeiten primär durch die Eawag, WW Zürich, EU (TECHNEAU), BAFU, BAG, Velux-Stiftung, BAG, das KTI, Evian-Da-None, AwwaRF, SVGW, und Nestlé Waters. Ihnen, sowie all meinen Mitarbeiter/-innen und beteiligten externen Partnern, danke ich für die langjährige, fruchtbare Zusammenarbeit.

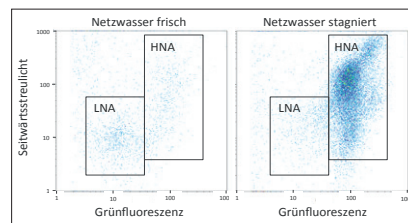


Abbildung 3: Die «dot plot»-Darstellung der DZ-Resultate einer Wasserprobe nach Anfärben mit SYBR Green I (jeder Punkt entspricht einer Zelle) zeigt die Veränderung des Fingerabdrucks eines Grundwassers, das als Trinkwasser direkt ins Netz eingespeist wurde und über Nacht stagnierte. Die Auftragung der Intensität des 488-nm-Laserstreulichts (SSC, side scatter) gegen Grün-Fluoreszenz-Intensität (520 nm) ermöglicht es, grosse, stark fluoreszierende Zellen (HNA) von kleinen, schwach fluoreszierenden Zellen (LNA) zu unterscheiden. Das Aufwachsen der HNA-Zellfraktion nach Stagnation ist klar zu erkennen. Quelle: [19]

### Referenzen

Die vollständige Literaturliste und Abbildungen finden Sie online unter: [www.sulm.ch/pipette](http://www.sulm.ch/pipette) → Aktuelle Ausgabe (Nr. 5-2013)

Michael Huber, Jürg Böni und Alexandra Trkola<sup>1</sup>

# Molekulare virologische Diagnostik im Wandel

Next Generation Sequencing auf dem Weg in die diagnostische Routine?

**Nukleinsäure-Sequenzierungstechnologien der neusten Generation generieren Millionen von Sequenzen in einem Sequenziervorgang. Schon bald könnte diese Technologie zur Beantwortung unterschiedlicher Fragen in die Routine der virologischen und mikrobiologischen Diagnostik Einzug halten.**

Der modernen Diagnostik steht eine Vielzahl von Methoden für den direkten Nachweis von Viren zur Verfügung. Herkömmliche Verfahren (Virusvermehrung in Zellkultur, Visualisierung von Viren durch Elektronenmikroskopie, Detektion von viralen Antigenen) wurden zunehmend durch sequenzspezifische molekulare Methoden ergänzt. Sie haben die Diagnostik deutlich verbessert, da sie den Nachweis viraler Nukleinsäuren und damit die Bestimmung von schwach konzentrierten und schwer kultivierbaren Viren ermöglichen. Aus Kostengründen muss sich ein Diagnostiklabor auf spe-

zialisierte Analysen der klinisch wichtigsten Erreger und damit nur auf einen Bruchteil der mehr als 200 derzeit bekannten humanpathogenen Viren [1–3] beschränken. Spezifische molekulare Tests stehen daher nur für ein relativ enges Spektrum von Viren zur Verfügung. Neben dem direkten Virusnachweis ist die Detektion von Mutationen zur sequenzbasierten, d.h. genotypischen Resistenzbestimmung eine weitere wichtige Anwendung der molekularen Diagnostik.

In den letzten Jahren hat die Technologie zur Sequenzierung von Nukleinsäuren gewaltige Fortschritte gemacht. Die neuen Methoden, bekannt als Next Generation Sequencing (NGS), zeichnen sich gegenüber

der traditionellen Sanger Sequenzierung durch einen viel höheren Output an Sequenzen aus. Es sind derzeit verschiedene Verfahren in Gebrauch, die alle auf einem ähnlichen Grundprinzip basieren: Mehrere Millionen von DNA-Molekülen werden auf einem Chip immobilisiert und direkt in situ und individuell sequenziert. Hochdurchsatzsequenziergeräte generieren dabei mehr als 1000 Mio. Sequenzen pro Analyse, die kompakteren Tischgeräten etwa 10 Mio. Vor allem Letztere sind für den Einsatz in der Diagnostik von Interesse, da sie einen kosteneffizienten Einsatz der neuen Sequenzertechnologie bei genügend hoher Kapazität erlauben (Tabelle 1). Dieser Technologiesprung eröffnet faszinierende

<sup>1</sup> Dr. Michael Huber, PD Dr. Jürg Böni und Prof. Dr. Alexandra Trkola, Institut für Medizinische Virologie, Universität Zürich

neue Möglichkeiten. Wir wollen uns in diesem Artikel auf zwei Anwendungen von NGS in der Diagnostik beschränken: die Detektion von Minoritätsmutationen und die Analyse des viralen Metagenoms.

### Detektion von Minoritätsmutationen

Eine Analyse der Medikamentenresistenz wird z.B. bei akuter HIV-Infektion und bei Therapieversagen durchgeführt und ermöglicht, diejenigen antiretroviralen Medikamente auszu-

## In den letzten Jahren hat die Technologie zur Sequenzierung von Nukleinsäuren gewaltige Fortschritte gemacht.

wählen, gegen die die HI-Viren des Patienten keine bekannten Resistenzen besitzen. Konventionelle Sanger Sequenzierung ist insofern limitiert in der Bestimmung von Resistenzmutationen, als sie eine einzelne Konsensussequenz der gesamten Viruspopula-

tion generiert. Mutationen, die mit einer Frequenz von weniger als ca. 20% vorliegen, werden nicht erkannt [4–6]. Mittels NGS werden jedoch von jeder einzelnen Nukleotidposition mehrerer Tausende Sequenzen generiert, so dass eine Bestimmung der verschiedenen Nukleotidfrequenzen bis in den einstelligen Prozentbereich möglich ist [7]. Auch Mutationen, die nur in einer kleinen Minderheit vorkommen, sogenannte Minority Variants, werden dadurch sichtbar und Resistenzen, die sonst unerkannt geblieben wären, können detektiert werden. Der Nutzen besteht darin, dass frühzei-

tig Ereignisse in der Resistenzentwicklung oder noch vorhandene resistente Viren nachgewiesen werden können [8,9]. Die Relevanz gewisser Minoritätsmutationen für den klinischen Verlauf der HIV Infektion wurde in mehreren Studien nachgewiesen [10–16]. Wie bei allen Technologien gibt es auch Limitierungen. NGS hat eine höhere Fehlerrate als die Sanger Sequenzierung (Tabelle 1) und die globale Rekonstruktion von Haplotypen, das heisst die korrekte Verknüpfung überlappender Sequenzen zu vollständigen Genomen individueller Virusvarianten, bleibt ein noch ungelöstes Problem [17, 18].

Plattform	Amplifikation	Sequenzierung	Laufzeit (h)	Sequenzen (Mio.)	Sequenzlänge (Nukleotide)	Output (Mio. Nukleotide)	Kosten pro Mio. Nukleotide (\$)	Fehlerrate (%)
Sanger Sequenzierung	PCR	Kettenabbruch	1	0.000016	700	0.01	15'000	< 0.001
FLX+ (454/Roche)	Emulsions-PCR	Synthese (Pyrophosphat)	23	1	700	1000	7	1
GS Junior (454/Roche)	Emulsions-PCR	Synthese (Pyrophosphat)	10	0.1	500	50	22	1
HiSeq (Illumina)	Brücken-PCR	Synthese (reversible Terminatoren)	48 - 240	3000	2*100	300'000	0.1	> 0.1
MiSeq (Illumina)	Brücken-PCR	Synthese (reversible Terminatoren)	5 - 65	10 - 25	2*300	15'000	0.1	> 0.1
SOLiD 5500xl (Life Technologies)	Emulsions-PCR	Ligation (Octamers mit 2 Basen Kodierung)	8	1400	75	240'000	0.07	> 0.01
PGM 318 (IonTorrent)	Emulsions-PCR	Synthese (ApH)	4 - 7	5.5	400	2000	0.9	1
RS II (PacBio)	keine, Einzelmoleküle	Synthese	14	0.05	4000	8*50	11 - 180	16

Tabelle 1: Next Generation Sequenzierungsgeräte, angepasst von [52]

## High Multiplex Real-Time PCR Products Automated on NIMBUS IVD / STARlet

### Anyplex™ II HPV 28 Detection

Simultaneous detection, genotyping & semi-quantification of 19 high-risk HPV genotypes and 9 low-risk HPV genotypes

### Anyplex™ II STI-7 Detection

Simultaneous detection, differentiation and semi-quantification of 7 major STI pathogens

### Anyplex™ II RV16 Detection

Simultaneous detection, differentiation and semi-quantification of 16 respiratory viruses

### Anyplex™ II RB5 Detection

Simultaneous detection, differentiation and semi-quantification of 5 respiratory bacteria



BÜHLMANN Laboratories AG  
CH-4124 Schönenbuch/Basel  
E-mail: info@buhlmannlabs.ch

Phone: +41 61 487 12 12  
Fax: +41 61 487 12 34  
www.buhlmannlabs.ch

### Analyse des viralen Metagenoms

Bei einem wesentlichen Teil alltäglicher Infektionen wie akuter Gastroenteritis und Atemwegsentszündung, aber auch bei Enzephalitiden, bei denen eine virale Infektion vermutet wird, bleibt der Ursprung unbestimmt und man weiss nicht, ob bekannte oder noch unentdeckte Erreger diese Infektionen verursachen. Während schwach oder nicht pathogene Virusinfektionen oft nicht von klinischer Bedeutung sind und daher nicht immer diagnostiziert werden müssen, können diese bei Personen mit geschwächtem Immunsystem eine ständige Bedrohung darstellen [19, 20].

Die Nukleinsäure-Amplifikation mittels einer unspezifischen PCR in Kombination mit NGS ermöglicht eine unvoreingenommene und umfassende Sequenzierung aller Nukleinsäuren in einer Probe [21]. Durch den unspezifischen Zugang ist es möglich, ohne präzise Vorkenntnis einer Virussequenz, Viren in einem Untersuchungsmaterial nachzuweisen und das virale Metagenom zu erfassen, d.h. alle darin enthaltenen Virusarten zu identifizieren und ihre relative Häufigkeit zu bestimmen. Die Identifikation der viralen Sequenzen erfolgt mittels einer Suche nach Übereinstimmungen in einer Datenbank. Theoretisch kann jedes Virus, kultivierbar oder nicht kultivierbar, bekannt oder unbekannt, detektiert werden und das Verfahren kann für alle Arten von viralen Genomen, also DNA und RNA angewendet werden. Dieser Ansatz bietet eine neue Dimension in der Diagnose, der Charakterisierung und dem Management viraler Infektionen.

Mehrere Studien haben diese Technologie in den letzten Jahren verwendet, um den Umfang des Viroms in vielfältigen biologischen und Umweltproben zu erforschen, einschliesslich menschlicher und tierischer Darminhalte [22–30], Blut [31, 32], Gewebe [33–36] und Atemwegsekrete [37–40]. Zahlreiche neue Viren wurden dabei entdeckt und ein Bild des humanen Viroms beginnt sich abzuzeichnen [41–44]. Im Gegensatz zur Mikrobiologie, wo die Bestimmung des Mikrobioms bereits weitverbreitet ist [45–47], steckt die Virologie immer noch in den Anfängen.

Metagenom-Informationen sind klinisch relevant, weil sie auch Co-Infektionen wiedergeben. Mehrere Studien haben aufgezeigt, dass virale Co-Infektionen häufig auftreten, aber mit den herkömmlichen Diagnose-Algorithmen unterdetektiert werden [48–51]. Man geht davon aus, dass die erhaltenen Virusprofile massgeblich zur Aufklärung bisher unbestimmter Ätiologien von Infektionen beitragen werden. Die Analyse des viralen Metagenoms soll deshalb als Ergänzung dort zum Einsatz kommen, wo mit den konventionellen Mitteln der Virusdiagnostik kein Erfolg erzielt, die Ursache aber weiterhin in einer Virusinfektion vermutet wird. Die systematische Erfassung des spezifische Viroms könnte so bei verschiedenen Erkrankungen helfen, Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern sowie die Diagnostik masszuschneiden.

Natürlich bleibt heute die Viromanalyse selbst ein teures Verfahren. Bedenkt man jedoch, dass ein Einsatz zur richtigen Zeit eine Vielzahl von Einzelanalysen mittels Routineverfahren erspart, kann sich eine signifikante Reduktion der Kosten ergeben. Durch die rechtzeitige Bestimmung des infektiösen Agens ist eine bessere Patientenversorgung und gegebenenfalls auch eine Reduktion nosokomialer Infektionen möglich. NGS-Methoden werden die herkömmlichen Methoden der Diagnostik vorerst nur ergänzen. Speziell die molekularen, PCR-basierenden Analysen sind hochsensitiv und spezifisch und werden noch lange unverzichtbar bleiben.

### Schlussfolgerungen

Next Generation Sequencing eröffnet zahlreiche neue Perspektiven für die Virus-Diagnostik, wie die Identifikation der Erreger in unklaren klinischen Situationen, die sensitivere Erfassung von Resistenzmutationen und die Möglichkeit, durch diese neuen Daten sowohl Diagnostik als auch Behandlung viraler Erkrankungen anzupassen. Die neuen Methoden sind offener und informativer als die konventionellen Tests und werden zunehmend die bisherigen molekularbiologische Methoden ergänzen, wenn nicht sogar ablösen. Schreitet die technische Entwicklung in diesem Masse voran, wer-

## Le diagnostic virologique moléculaire en mutation: le séquençage de nouvelle génération en voie de devenir un outil diagnostique de routine?

Au cours de ces dernières années, la technologie de séquençage d'acides nucléiques a fait d'immenses progrès. Les nouvelles méthodes, connues sous le terme de «séquençage de nouvelle génération» (NGS), se distinguent du traditionnel séquençage de Sanger par un rendement de séquences bien plus élevé. Des appareils compacts sont désormais en mesure de générer plus de 10 millions de séquences par analyse. Lors de l'analyse de mutations de résistance, le NGS génère des milliers de séquences pour chaque position de nucléotide. Des mutations rares (moins de 10%) sont ainsi mises en évidence et des résistances, qui autrement demeureraient inconnues, peuvent être détectées à un stade précoce.

L'association de l'amplification indépendante de la séquence et du NGS permet un séquençage impartial et global de tous les acides nucléiques d'un échantillon et facilite l'identification de tous les virus contenus dans cet échantillon, ainsi que la détermination de leur fréquence relative. Les profils viraux obtenus joueront un rôle déterminant pour élucider des étiologies indéterminées d'infections.

den sie bald auch schneller und billiger sein. Am Institut für Medizinische Virologie der Universität Zürich arbeiten wir daran, NGS in der diagnostischen Routine zu etablieren.

Korrespondenz:  
Huber.Michael@virology.uzh.ch

### Referenzen

Die vollständige Literaturliste finden Sie online unter: [www.sulm.ch/pipette](http://www.sulm.ch/pipette) → Aktuelle Ausgabe (Nr. 5-2013)