GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

QIAGEN®

Schlussbericht

Förderkennzeichen:

01ES0832

Vorhaben:

"Verbund: Symptom-orientierte Multiplex-PCR zur Diagnostik von akuten respiratorischen Infektionen (SYMP-ARI), TP3: Entwicklung einer Multiplex-PCR und Evaluation in einer klinischen Studie"

Laufzeit des Vorhabens:

01.05.2009 – 30.04.2012

Ausführende Stelle:

QIAGEN Hamburg GmbH, Dr. Claudia van de Sand

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde im Rahmen des Programms zur medizinischen Genomforschung mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01ES0832 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Ver-öffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltverzeichnis

I. Kurze Darstellung 3

1. Aufgabenstellung 3
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde 4
3. Planung und Ablauf des Vorhabens 4
4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde 5
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen. 7

II. Eingehende Darstellung 8

1. Verwendung der Zuwendung und das erzielte Ergebnis im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele 8
2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 13
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 14
4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans 14
5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 15
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses 15

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Infektionen des unteren Respirationstraktes (LRTI Lower respiratory tract infections) sind, vor allem in Hochrisiko-Patienten, die Hauptverursacher von Morbidität, Hospitalisierung und Antibiotika-Gabe. Trotz der großen klinischen Relevanz solcher Infektionen bleibt die Ethologie in zahlreichen Fällen oft unklar. Da akute respiratorische Infektionen durch verschiedene Viren, Bakterien (und Pilze) verursacht werden, wird eine differenzierte Therapie benötigt. Zudem erfordert die steigende Anzahl der verursachenden Pathogene bei akuten respiratorischen Erkrankungen eine schnelle Entscheidung bezüglich der Therapie und möglicher Patienten-Isolierung. Dazu müssen bestehende diagnostische Tests verbessert werden, um traditionelle und neu auftretende respiratorische Viren detektieren zu können. Das gleiche gilt für atypische Bakterien. Demnach ist eine schnelle und sichere Detektion aller Pathogene, die akute respiratorische Infektionen verursachen können, unbedingt notwendig. Keiner der aktuell verfügbaren PCR-Tests ermöglicht es, im Hochdurchsatz und in kurzer Zeit eine große Anzahl von Proben zu analysieren und dabei multiple virale und bakterielle Pathogene zu detektieren. Neue Tests sollten daher diesen Erfordernissen von Kliniken und Diagnostik-Laboren nachkommen, indem eine sensitive und spezifische Detektion respiratorischer Pathogene ermöglicht wird. Außerdem sollte solch ein Test den Vertretern des allgemeinen Gesundheitswesens bei einer schnellen Identifikation von verursachenden Pathogenen bei in der Population großflächig auftretenden Infektionen des Respirationstraktes helfen. In Kliniken soll solch ein Test zu einem verbesserten, effizienten Patienten-Management maßgeblich beitragen.

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung eines Multiplex-Assays basierend auf der QIAplex-Technologie zur Detektion 19 viraler und 4 bakterieller Pathogene, die beim Menschen akute respiratorische Infektionen (ARI) verursachen, um die oben beschriebene Notwendigkeit einer schnellen und effizienten Diagnostik zu bedienen. Die Entwicklung einer solchen SYMP-ARI Multiplex Methode wie auch die Optimierung der Nukleinsäure-Aufreinigung aus klinischen Proben wurden von der QIAGEN Hamburg GmbH durchgeführt. An der Universitätsklinik Freiburg, in der Abteilung für Virologie, wurden die Goldstandard PCR-Tests entwickelt und die klinischen Studien durchgeführt. Die Patientenrekrutierung und die Probensammlung für die klinische Studie wurde maßgeblich von der CAPNETZ Stiftung durchgeführt.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Für die Durchführung des Vorhabens konnten die drei Zuwendungsempfänger bereits wichtige Vorkenntnisse vorweisen. Die QIAGEN Hamburg GmbH besitzt eingehende Erfahrung mit Multiplex PCR-Assays zur simultanen Detektion von verschiedensten Erregern und vertreibt bereits einige Multiplex PCR-Assays erfolgreich als RUO-Produkte. Zudem besitzt QIAGEN langjährige Erfahrung in der Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren aus klinischen Proben. Die CAPNETZ Stiftung stellt ein wichtiges Zentrum zur Rekrutierung von Patienten und zur Sammlung von Patientenproben dar und ermöglichte somit im SYMP-ARI Vorhaben die Realisierung einer umfangreichen klinischen Studie. Die virologische Abteilung der Universitätsklinik Freiburg hat langjährige Erfahrung mit respiratorisch erkrankten Patienten im Erwachsenen- und Kindesalter und besitzt bereits zahlreiche Real-Time PCR basierte Assays zur Detektion von human pathogenen Erregern. Solche Real-Time PCR Assays dienten in der Entwicklung und Validierung des neuen Multiplex-Assays als Goldstandard, so dass die Sensitivität und Spezifität des SYMP-ARI Assays überprüft werden konnte.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das vorliegende SYMP-ARI Vorhaben war auf eine Laufzeit von drei Jahren ausgelegt. Die Arbeitspakete des Antragsstellers 3, der QIAGEN Hamburg GmbH, gliederten sich wie folgt: Das Arbeitspaket I beinhaltete die Test-Entwicklung des SYMP-ARI Assays und die präklinische Validierung. Aufgrund der komplexen Sequenzlage einzelner Viren, wie beispielsweise Rhino- und Adenovirus, musste mehr Zeit als ursprünglich geplant investiert werden, um sowohl spezifische als auch sensitive Primer- und Sonden-Designs zu identifizieren. Der erste Meilenstein, die Fertigstellung des Multiplex-Tests zur initialen technischen Validierung, konnte zum 31.01.2010 erfolgreich erreicht werden. Im Folgenden konnte bis Ende 2010 die präklinische Studie, die durch Dr. M. Panning, Universität Freiburg durchgeführt wurde, erfolgreich abgeschlossen und die klinische Studie begonnen werden. Vor Beginn der klinischen Studien konnte die Methodik der Nukleinsäure-Aufreinigung durch Arbeiten bei der QIAGEN Hamburg GmbH ebenfalls optimiert werden, deren erfolgreiche Anwendung in der präklinischen Studie bestätigt werden konnte (Arbeitspaket II). Damit war der 2. Meilenstein erreicht, wie im Zwischenbericht vom 30.09.2010 geschildert wurde. Der 3. Meilenstein zum Abschluss der Testphase des neu entwickelten Multiplex-Tests konnte am 31.10.2012 mit dem Ende der klinischen Studie erreicht werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Seitens der QIAGEN Hamburg GmbH wurde der neue Multiplex-Assay zur Detektion von viralen und bakteriellen respiratorischen Pathogenen auf Basis der QIAplex-Technologie entwickelt. Die QIAplex-Technologie ermöglicht es, alle im Panel enthaltenen Erreger in einem Ansatz zu detektieren und zu differenzieren. Zunächst werden erregerspezifische Abschnitte der in der Probe enthaltenen Pathogen-Nukleinsäure mittels der proprietären Multiplex-PCR amplifiziert und mit Biotin markiert. Die entstandenen Produkte werden in einem zweiten Schritt an pathogenspezifische Detektionsoligonukleotide hybridisiert und zusätzlich über einen Biotin-Streptavidin-Komplex mit Phycoerythrin markiert. Die Detektionsoligonukleotide sind an farbkodierte Mikrospheren gekoppelt, so dass dieser Komplex auf der LiquiChip Plattform (xMAP Technologie) detektiert und analysiert werden kann.

Für den neu zu entwickelnden Multiplex-Assay SYMP-ARI wurden zahlreiche Sequenz- und Literatur-Recherchen durchgeführt, um die Sequenzlage der enthaltenen Pathogene zu überprüfen sowie um neue Primer zu entwickeln oder zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde die NCBI-Datenbank verwendet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Im Folgenden ist eine Auswahl an relevanter Literatur gelistet:

Balada-Llasat, J. M., H. LaRue, C. Kelly, L. Rigali, and P. Pancholi. 2011. Evaluation of commercial ResPlex II v2.0, MultiCode-PLx, and xTAG respiratory viral panels for the diagnosis of respiratory viral infections in adults. J Clin Virol **50:**42-5.

Bezerra, P. G., M. C. Britto, J. B. Correia, C. Duarte Mdo, A. M. Fonceca, K. Rose, M. J. Hopkins, L. E. Cuevas, and P. S. McNamara. 2011. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. PLoS One **6:**e18928.

Brunstein, J. D., C. L. Cline, S. McKinney, and E. Thomas. 2008. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. J Clin Microbiol **46:**97-102.

Dare, R., S. Sanghavi, A. Bullotta, M. C. Keightley, K. S. George, R. M. Wadowsky, D. L. Paterson, K. R. McCurry, T. A. Reinhart, S. Husain, and C. R. Rinaldo. 2007. Diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. J Clin Microbiol **45:**548-52.

Dare, R. K., A. M. Fry, M. Chittaganpitch, P. Sawanpanyalert, S. J. Olsen, and D. D. Erdman. 2007. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. J Infect Dis **196:**1321-8.

Dumke, R., N. Schurwanz, M. Lenz, M. Schuppler, C. Luck, and E. Jacobs. 2007. Sensitive detection of Mycoplasma pneumoniae in human respiratory tract samples by optimized real-time PCR approach. J Clin Microbiol **45:**2726-30.

Faux, C. E., K. E. Arden, S. B. Lambert, M. D. Nissen, T. M. Nolan, A. B. Chang, T. P. Sloots, and I. M. Mackay. 2011. Usefulness of published PCR primers in detecting human rhinovirus infection. Emerg Infect Dis **17:**296-8.

Franz, A., O. Adams, R. Willems, L. Bonzel, N. Neuhausen, S. Schweizer-Krantz, J. U. Ruggeberg, R. Willers, B. Henrich, H. Schroten, and T. Tenenbaum. 2010. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. J Clin Virol **48:**239-45.

Gunson, R. N., and W. F. Carman. 2011. During the summer 2009 outbreak of "swine flu" in Scotland what respiratory pathogens were diagnosed as H1N1/2009? BMC Infect Dis **11:**192.

Heim, A., C. Ebnet, G. Harste, and P. Pring-Akerblom. 2003. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. J Med Virol **70:**228-39.

Huck, B., G. Scharf, D. Neumann-Haefelin, W. Puppe, J. Weigl, and V. Falcone. 2006. Novel human metapneumovirus sublineage. Emerg Infect Dis **12:**147-50.

McErlean P, Shackelton LA, Andrews E, Webster DR, Lambert SB, et al. 2008. Distinguishing Molecular Features and Clinical Characteristics of a Putative New Rhinovirus Species, Human Rhinovirus C (HRV C). PLoS ONE **3(4)**: e1847.

Neske, F., K. Blessing, F. Tollmann, J. Schubert, A. Rethwilm, H. W. Kreth, and B. Weissbrich. 2007. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. J Clin Microbiol **45:**2116-22.

Probert, W. S., J. Ely, K. Schrader, J. Atwell, A. Nossoff, and S. Kwan. 2008. Identification and evaluation of new target sequences for specific detection of Bordetella pertussis by real-time PCR. J Clin Microbiol **46:**3228-31.

Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, M. F. Beersma, A. C. Kroes, and E. C. Claas. 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza a and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. J Clin Microbiol **42:**1564-9.

van de Pol, A. C., A. M. van Loon, T. F. Wolfs, N. J. Jansen, M. Nijhuis, E. K. Breteler, R. Schuurman, and J. W. Rossen. 2007. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms. J Clin Microbiol **45:**2260-2.

Welti, M., K. Jaton, M. Altwegg, R. Sahli, A. Wenger, and J. Bille. 2003. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract secretions. Diagn Microbiol Infect Dis **45:**85-95.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Das Vorhaben wurde in Zusammenarbeit mit Dr. med. Marcus Panning (Abteilung für Virologie, Universitätsklinikum Freiburg, Hermann-Herder-Str. 11, 79104 Freiburg) und der CAPNETZ STIFTUNG (G. Barten, CAPNETZ STIFTUNG, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover) durchgeführt.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und das erzielte Ergebnis im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Arbeitspaket I: Testentwicklung und Validierung

1.1 Definition des Design-Inputs für Multiplex-PCR:

Die Definition des Design-Inputs erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Projektkoordinator, Dr. Marcus Panning, Universität Freiburg, und den Beteiligten von CAPNETZ, indem festgelegt wurde, welche Pathogene mit dem SYMP-ARI Tests nachgewiesen werden sollen. Darüber hinaus wurde besprochen, dass es sich um einen Multiplex-Assay handeln muss, der die simultane Detektion einer Vielzahl von sowohl RNA- als auch DNA-Erregern ermöglicht.

1.2 Design und Evaluierung von Multiplex-Primern und Sonden entsprechend dem Design-Input:

Basierend auf Sequenzrecherchen zu allen im SYMP-ARI Panel enthaltenen Erregern wurden Primer und Sonden entwickelt, die eine spezifische Amplifikation und Detektion der Nukleinsäuren aller interessierenden Pathogene ermöglichen sollen. Dafür wurden sämtliche publizierten Sequenzen der jeweiligen Erreger herangezogen und pathogenspezifische Alignments erstellt. Anhand dieser Arbeiten konnten spezifische Oligonukleotide definiert werden, die gewährleisten, dass alle Subtypen und Stämme eines jeden Virus bzw. Bakteriums detektiert werden können. Gleichzeitig wurde über Sequenzrecherchen sichergestellt, dass die erforderliche Spezifität gewährleistet ist und keine kreuzreaktiven Oligonukleotide eingesetzt werden.

1.3 Entwicklung und Implementierung einer internen Kontrolle:

Es wurde in das zu entwickelnde Panel eine heterologe Interne Kontrolle implementiert, durch deren parallel zur Analyse der klinischen Probe durchgeführten Amplifikation und Detektion gezeigt und damit sichergestellt werden kann, dass der gesamte experimentelle Ablauf (Nukleinsäure-Aufreinigung, Multiplex-PCR, Hybridisierung) fehlerfrei durchgeführt wurde und keine technischen Probleme aufgetreten sind.

1.4 Optimierung von Real-Time PCR-Tests:

Um die zu entwickelnde SYMP-ARI Multiplex-PCR bezüglich ihrer pathogenspezifischen Performance analytisch überprüfen zu können, wurden individuelle Real-Time PCR-Systeme verwendet, die in den Laboren von Dr. Marcus Panning, Universität Freiburg, entwickelt wurden. Diese Real-Time PCR-Tests dienen als „Goldstandard“, mit denen vergleichende Analysen bezüglich Sensitivität und Spezifität der zu untersuchenden Pathogene vorgenommen wurden.

1.5 Analytische Validierung des SYMP-ARI QIAplex Tests zur Diagnose von ARI:

Nach Fertigstellung des Multiplex-Assays wurde im Rahmen der analytischen Evaluierung ein analytischer cutoff basierend auf statistischen Analysen ermittelt. Dieser beträgt 190 mfi und stellt den Wert dar, oberhalb dessen ein Signal als eindeutig positiv gewertet wird. Folglich entsprechen alle Signalstärken <190 mfi einem negativen Ergebnis.

Arbeitspaket II: Nukleinsäure-Aufreinigung

1.6 Universelles Lysis-Protokoll und Proben-Präparation:

Ziel von Arbeitspaket II war die Entwicklung eines universellen Lysis-Protokolls, das für die Aufreinigung von bakteriellen und viralen Nukleinsäuren aus respiratorischen Proben verwendet werden kann. Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die Chemie „QIAamp MinElute Virus Spin“ für alle im SYMP-ARI Panel enthaltenen Pathogene verwendet werden kann, wurde die Präparation auf die automatisierten Plattform QIAcube transferiert. Eine heterologe Interne Kontrolle wurde in allen Proben während der Aufreinigung mitgeführt, um die Aufreinigungseffizienz zu kontrollieren. Die Konzentration der Internen Kontrolle wurde optimiert, ein stabiles Signal zu generieren, ohne einen kompetitiven Einfluss auf die Detektion der spezifischen Nukleinsäure zu nehmen. Im Rahmen der präklinischen Validierung konnte die Funktionalität der automatisierten Aufreinigung durch Testung klinischer Proben erfolgreich verifiziert werden.

Meilensteine

1. Meilenstein: Fertigstellung des Multiplex-Tests zur initialen technischen Validierung

Der im Rahmen dieses Vorhabens entwickelte SYMP-ARI Multiplex-Assay wurde im Zuge seiner Entwicklung optimiert und damit für die Verwendung in der Klinik entwickelt. So wurde beispielsweise Anfang 2010 das neue Primer/Detection-Oligo-Design für die gemeinsame Detektion von ADVB, ADVE und ADVC implementiert und zahlreiche Anpassungen hinsichtlich der Enzym/Pufferchemie, des Temperaturprofiles, der Hybridisierungskonditionen und der Konzentration einzelner Primer zur Verbesserung der Sensitivität des Panels vorgenommen.

Im Februar 2010 wurde eine erste Test-Version des SYMP-ARI Assays an den Projektpartner Dr. Marcus Panning (Universität Freiburg, Abteilung Virologie) übergeben, um initiale präklinische Analysen durchzuführen. Vor allem die Spezifität des Panels sollte anhand der Testung von klinischen Proben untersucht werden, die mittels Real-Time-PCR (RT-PCR) durch Dr. Marcus Panning in Freiburg vorcharakterisiert wurden. Innerhalb dieser Untersuchungen fielen diskrepante Proben in Verbindung mit der Detektion von Rhinoviren auf. Diese diskrepanten Proben wurden entweder als Enteroviren (Signal im Coxsackievirus/Echovirus-Kanal) detektiert oder sie zeigten sowohl ein Rhino- als auch ein Enterosignal, während die Referenzmethode diese Proben als Rhinovirus-positiv charakterisierte. Literaturrecherchen ergaben, dass kürzlich eine neue Rhinovirus-Gruppe, Rhinovirus C, neu beschrieben wurde[1], die näher analysiert wurde, um einen möglichen Zusammenhang mit den oben beschriebenen Kreuzreaktivitäten aufzudecken. Vertreter der Rhinovirus C Gruppe unterscheiden sich auf Sequenzebene deutlich von Vertretern der beiden Rhinovirusgruppen A und B, wodurch die diskrepanten Proben zu erklären sind. Da eine Unterscheidung zwischen Rhinovirus und Enterovirus klinisch gewünscht ist, musste das Design der Primer und Detection Oligos (De-Oligos) zur Amplifikation und Detektion von Rhino- und Enteroviren überarbeitet werden. Dabei wurden Lage und Sequenz der Primer und Sonden optimiert und verschiedene neue Designs mittels Multiplex-PCR bezüglich Sensitivität und Spezifität getestet. Das optimierte Design wurde abschließend vergleichend zum Ursprungsdesign analysiert. Mit dem bisherigen Design war es nicht möglich, Rhinoviren der Gruppe C spezifisch und ohne Kreuzreaktivität mit Enteroviren nachzuweisen. Die Analyse der gleichen Proben unter Verwendung des neuen Primer und Detectionoligo Designs für Rhino- und Enteroviren dagegen zeigte, dass alle Rhinovirus C positiven Proben eindeutig als Rhinovirus-positive Probe detektiert werden konnten. Damit konnte gezeigt werden, dass durch das neue Design die angestrebte Optimierung bezüglich Spezifität der Rhino- und Entero-Systeme erfolgreich umgesetzt wurde.

Der 1. Meilenstein wurde aufgrund der komplexen Genetik einiger Viren und der damit verbundenen, sehr aufwändigen Testentwicklung 4 Wochen später als ursprünglich geplant erreicht (31.01.2010).

2. Meilenstein, Teil 1: Abschluss der präklinischen Validierung

Erste klinische Versuche wurden im Juni 2010 von Dr. M. Panning mit 53 vorcharakterisierten klinischen Proben in der Abteilung für Virologie an der Universität Freiburg durchgeführt. Die Proben waren zuvor mit individuellen RealTime-PCR Assays charakterisiert worden, so dass die Ct-Werte der RT-PCR mit den mfi-Werten des SYMP-ARI Multiplex Assays verglichen

[1] McErlean P, Shackelton LA, Andrews E, Webster DR, Lambert SB, et al. (2008). Distinguishing Molecular Features and Clinical Characteristics of a Putative New Rhinovirus Species, *Human Rhinovirus C* (HRV C). PLoS ONE 3(4): e1847.

werden konnten. Diese Versuche haben gezeigt, dass das SYMP-ARI Panel eine sehr gute Performance in der Klinik zeigt.

Die in dem SYMP-ARI Vorhaben definierte präklinische Studie wurde August 2010 gestartet. Dabei wurden 300 prospektiv gesammelte Patientenproben sowohl mit individuellen RT-PCR Assays als auch mit dem SYMP-ARI Assay an der Universität Freiburg, Abteilung Virologie, untersucht. Insgesamt konnte eine ansprechende Spezifität und Sensitivität des SYMP-ARI Assays verzeichnet werden. Neben der Großzahl an übereinstimmend detektierten Pathogenen wurden in dem getesteten Pool insgesamt 70 Proben als diskrepant gewertet. Diese Proben wurden mittels Sequenzierung eingehend untersucht und die Ergebnisse detailliert im 2. Zwischenbericht (Berichtszeitraum 01.01.2010 – 31.12.2010) dargestellt.

In Übereinstimmung mit allen Verbundpartnern wurde basierend auf den erfolgsversprechenden Ergebnissen der präklinischen Studie im direkten Anschluss Ende 2010 die klinische Studie an der Universität Freiburg, Abteilung Virologie, begonnen.

2. Meilenstein, Teil 2: Optimierung der Aufreinigung nach Arbeitspaket 2

Ein wichtiger Aspekt des Vorhabens war neben der SYMP-ARI Assay-Entwicklung die Etablierung einer universellen Aufreinigungschemie zur Extraktion bakterieller und viraler Nukleinsäuren, die automatisiert auf der Plattform QIAcube erfolgen sollte. Als Ausgangspunkt der Optimierung wurde die Chemie „QIAamp MinElute Virus Spin“ verwendet, die initial für die Aufreinigung von viralen Nukleinsäuren entwickelt worden ist. In einem direkten Vergleich mit der für bakterielle Nukleinsäuren optimalen Chemie „QIAamp DNA mini“ konnte gezeigt werden, dass die QIAamp MinElute Chemie ebenfalls zur Extraktion der DNA der im Panel enthaltenen bakteriellen Pathogene geeignet ist. Weitere Versuche mit verdünnten Proben sowie mit gemischten Proben zur Simulation von Koinfektionen haben gezeigt, dass alle getesteten Pathogene sowohl individuell, als auch als gemischte Probe sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden konnten. Die Chemie QIAamp MinElute Virus Spin im Zusammenspiel mit der automatisierten Plattform QIAcube ist demnach als Aufreinigungssystem für alle im SYMP-ARI Panel enthaltenen Pathogene geeignet. Da alle Verdünnungen in UTM (Universelles Transport-Medium) als klassische Matrix für respiratorische Patientenproben hergestellt wurden, konnte analytisch gezeigt werden, dass die Aufreinigung von simulierten klinischen Proben erfolgreich ist.

3. Meilenstein: Abschluss der Testphase des neu entwickelten Multiplex-Tests

Während der respiratorischen Saisons 2010/2011 und 2011/2012 wurde die klinische Studie mit dem neu entwickelten Multiplex-Assay durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 2500 Patientenproben gesammelt (CAPNETZ, Freiburg) und mit der von QIAGEN etablierten Aufreinigungs-Methode und dem entwickelten SYMP-ARI Assay getestet. Die Detektionsrate des neu entwickelten Multiplex-Assays zeigte sich über den gesamten Zeitraum der Analysen als stabil und zuverlässig, so dass die Test-Phase als erfolgreich gewertet werden konnte. Die klinische Studie konnte am 31.10.2012 wie geplant abgeschlossen werden. Insgesamt wurden 2500 Patientenproben im Rahmen der klinischen Studie getestet.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Verwendungsnachweis

Förderkennzeichen 01ES0832

1. Nachkalkulation der gesamten Selbstkosten

1.1 Position		Gesamtvorkalkulation (€)	Gesamtnachkalkulation (€)*)
0813	Material	120.000,00	175.540,31
0823	FE-Fremdleistungen	0,00	0,00
0837	Personalkosten	846.145,00	932.295,47
0838	Reisekosten	6.800,00	2.269,09
0847	Abschreibungen auf vorhaben-spezifische Anlagen	39.001,00	9.355,13
0848	Abschreibungen auf sonstige ge-nutzte Anlagen des FE-Bereichs	0,00	0,00
0850	sonstige unmittelbare Vorhaben-kosten	0,00	0,00
0855	**Summe** unmittelbare Vorhaben-kosten (Pos. 0813 – 0850)	1.011.946,00	1.119.460,00
0856	Kosten innerbetrieblicher Leistungen	0,00	0,00
0860	Verwaltungskosten	0,00	0,00
0881	**gesamte Selbstkosten des Vorhabens** (Summe Pos. 0855 – 0860)	1.011.946,00	1.119.460,00

*) **In der Gesamtnachkalkulation dürfen als mit Marktpreisen kalkulierte Teilleistungen höchstens 20 v.H. des der Bewilligung zugrunde liegenden Selbstkostenhöchstbetrages angesetzt werden.**

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Sowohl die wissenschaftlichen als auch die technischen Ansprüche an die Entwicklung des SYMP-ARI Assays können als erfüllt angesehen werden. Eine abschließende Beurteilung der klinischen Performance kann erfolgen, sobald die klinische Studie an der Universität Freiburg abgeschlossen und ausgewertet ist. Zusätzlich zur Erreichung dieser Ziele konnte durch die enge Zusammenarbeit der 3 Antragsteller ein konstruktiver und intensiver Wissenstransfer zwischen allen Beteiligten etabliert werden. Darauf basierend wurden und werden Ergebnisse und Erkenntnisse aus diesem Projekt auf allen Ebenen diskutiert, bewertet und für zukünftige Nutzungen eingesetzt. So werden beispielsweise nach Abschluss der klinischen Studie (31.10.2012) umfassende epidemiologische Erkenntnisse bezüglich Koinfektionen abgeleitet werden können, die in Publikationen der Wissenschaft zugänglich gemacht werden sollen.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Zuge des oben genannten Teilvorhabens sollte durch die QIAGEN Hamburg GmbH eine Multiplex-PCR entwickelt werden, die die parallele Detektion und Differenzierung von 19 Viren und 4 atypischen Bakterien in einer Patientenprobe ermöglicht.

Wie den vorliegenden Zwischenberichten zu entnehmen ist, konnte ein den analytischen und klinischen Ansprüchen gerecht werdendes Multiplex-PCR Assay (SYMP-ARI) erfolgreich entwickelt werden. Unter Anwendung der proprietären QIAplex Technologie konnte die parallele Amplifikation von 23 spezifischen Targets und einer Internen Kontrolle realisiert werden. Die in der Multiplex-PCR amplifizierten Produkte müssen im Anschluss an pathogenspezifische Detektionsoligonukleotide hybridisiert werden, die wiederum an farbkodierte Mikrospheren gekoppelt sind. Dieser Komplex kann auf der LiquiChip Plattform (xMAP Technologie) detektiert und analysiert werden.

Zu den im ursprünglichen Antrag formulierten Verwertungszielen des SYMP-ARI Projektes gehörte neben den oben genannten, das resultierende Assay in der molekularen Diagnostik als kommerzielles Test-System anzubieten. Die Vermarktung sollte durch die QIAGEN GmbH erfolgen. Abhängig vom Erfolg der analytischen und klinischen Performance sollte die Möglichkeit einer solchen Verwertung im Zusammenhang mit einer aktuellen Marktanalyse evaluiert werden. Nach aktuellem Stand kann davon ausgegangen werden, dass das SYMP-ARI Assay die für eine Multiplex-PCR erforderliche Performance in der Analyse klinischer Proben erfüllt. Die marktwirtschaftliche Entwicklung der letzten Jahre hat gezeigt, dass das Interesse an Multiplex-Assays in der molekularen Diagnostik zugenommen hat, so dass eine Platzierung des SYMP-ARI Assays im Markt grundsätzlich denkbar wäre.

Losgelöst von diesen Punkten hat sich eine Situation ergeben, die die kommerzielle Vermarktung des SYMP-ARI Assays in Frage stellt. Im Anschluss an die Multiplex-PCR, die auf dem ABI9700 Thermocycler durchgeführt wird, erfolgt die Detektion auf der Luminex Plattform, deren kommerzielle Nutzung durch Lizenzen kontrolliert wird. Lizenzeigener ist in diesem Fall die Luminex Corporation. Die Vergabe von Lizenzen durch Luminex ist zeitlich begrenzt, so auch die Lizenz von QIAGEN. Trotz weitreichender Bemühungen, die Lizenz-abhängige Nutzung der Detektions-Plattform auch weiterhin zu ermöglich, konnte eine Vertragsverlängerung durch den Lizenzeigner Luminex Corp. nicht realisiert werden. Da die Kommerzialisierung des erfolgreich entwickelten SYMP-ARI Multiplex-Assays auch von der Anwendung auf der Luminex-Plattform abhängt, ist durch die aktuelle Lizenz-Situation eine direkte Vermarktung nicht mehr möglich.

5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Vorhabens sind keine Ergebnisse von dritter Stelle bekannt geworden, die für die Durchführung des Projektes relevant waren.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

1) Poster-Präsentation 2010:
26th Clinical Virology Symposium, Daytona Beach, Florida, US, 25.-28. April 2010
“SYMP ARI - A novel multiplex-PCR for the differentiated analysis of respiratory pathogens based on QIAplex technology”

2) Vortrag 2011:
QCMD Scientific Advisory Meeting 2011, 31. August – 02. September 2011
“Catching the Cold: Multiplex testing for respiratory pathogens”

3) Poster-Präsentation 2012:
28th Clinical Virology Symposium, Daytona Beach, Florida, US, 22.-25. April 2012
“Clinical Evaluation of a novel multiplex-PCR for the differentiated detection of respiratory pathogens based on QIAplex technology”

4) Veröffentlichung (Paper) 2012:
Performance of a novel microarray multiplex PCR for the detection of 23 respiratory pathogens (SYMP-ARI study).
Bierbaum S, Königsfeld N, Besazza N, Blessing K, Rücker G, Kontny U, Berner R, Schumacher M, Forster J, Falcone V, van de Sand C, Essig A, Huzly D, Rohde G, Neumann-Haefelin D, Panning M.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Oct;31(10):2851-61. Epub 2012 May 30