

Aus dem Institut für Vektorologie und experimentelle
Gentherapie

Direktorin: Prof. Dr. Dr. B. M. Pützer

**Nachweis der Hepatitis-Viren A-E durch
eine Multiplex-PCR**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Louise Teichmann

Rostock, im April 2010

Dekan: Prof. Dr. E. C. Reisinger

- 1. Gutachter: Prof. Dr. S. Schaefer, Universität Rostock
- 2. Gutachter: Prof. Dr. E. C. Reisinger, Universität Rostock
- 3. Gutachter: Prof. Dr. W. H. Gerlich, Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 08.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Hepatitis-Erkrankung	1
1.1.1 Ätiologie und Klinik	1
1.2 Taxonomie und Epidemiologie.....	4
1.2.1 Hepatitis A Virus.....	4
1.2.2 Hepatitis B Virus.....	4
1.2.3 Hepatitis C Virus.....	5
1.2.4 Hepatitis D Virus	6
1.2.5 Hepatitis E Virus.....	6
2 Materialien und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Plasmide	14
2.1.2 Patientenmaterial	14
2.1.3 Primer.....	15
2.1.4 Chemikalien.....	19
2.1.5 Geräte	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Extraktion von RNA aus Patientenmaterial	21
2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	21
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.2.4 Geldokumentation	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Primerdesign und Einzeltestung.....	27
3.2 Optimierung der PCR.....	32

3.3 Nachweis der Spezifität der Primer	39
3.4 Entwicklung des Multiplex-Protokolls	45
3.4.1 Initialer Ansatz des Multiplex-Protokolls.....	45
3.4.2 Modifizierung der Primer für eine optimierte Multiplex-PCR	49
3.5 Quantifizierung	55
3.6 Anwendbarkeit der Methode	63
4 Diskussion	68
4.1 Amplifikation von 5 verschiedenen hepatotropen Viren in einem Multiplex-Protokoll	68
4.1.1 Optimierung des Systems	69
4.1.2 Spezifität der Ergebnisse	70
4.1.3 Empfindlichkeit des Systems	71
4.2 Vorteile des Multiplex- Protokolls.....	73
5 Zusammenfassung	76
6 Abkürzungsverzeichnis	77
7 Literaturverzeichnis.....	80

1 Einleitung

1.1 Die Hepatitis-Erkrankung

1.1.1 Ätiologie und Klinik

Eine Hepatitis ist eine diffuse oder granulomatöse Infiltration des Lebergewebes mit Entzündungszellen. Diese Entzündung kann durch toxische Substanzen, exogene oder endogene Antigene hervorgerufen werden (Fleig, 2004).

Das Lebergewebe reagiert auf jede Entzündung mit Nekrose, Apoptose und Regeneration, weshalb sich klinisch keine sicheren Unterschiede zwischen den unterschiedlich ausgelösten Hepatitiden feststellen lassen.

Die häufigsten infektiösen Erreger einer Hepatitis in Deutschland sind die hepatotropen Viren Hepatitis A Virus (HAV), Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis C Virus (HCV), Hepatitis D Virus (HDV) und auch Hepatitis E Virus (HEV). Dies sind die klassischen Hepatitis-Erreger. Daneben können auch noch andere Viren, sowie Bakterien, Pilze und Parasiten eine Leberentzündung hervorrufen. Zu den nicht infektiösen Ursachen gehören Alkohol, Medikamente, Autoimmunkrankheiten, akute oder chronische Organabstoßung nach Lebertransplantation, Sarkoidose sowie Mitbeteiligung an nicht-hepatischen entzündlichen Erkrankungen (Kollagenosen, ect.).

Unabhängig vom auslösenden Virus kann sich das klinische Bild einer akuten Virus-Hepatitis völlig unterschiedlich manifestieren.

Das Spektrum reicht von einer völlig inapparent verlaufenden Infektion (zwei Drittel der Fälle, hauptsächlich im Kindesalter), bis zur fulminant verlaufenden Form, die im akuten Leberversagen mit hoher Letalität endet. Insbesondere eine Hepatitis E Infektion während einer Schwangerschaft verläuft in etwa 20 % der Fälle tödlich (Tam et al., 1991).

Die unterschiedlichen Ausprägungen der Hepatitis hängen von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen Alter des Patienten, Immunitätslage, Morbidität und Komorbidität, Gravidität, Art des Erregers einschließlich unbekannter Pathogenität steigender Mutationen, Infektionsdosis sowie Doppelinfektionen mit mehr als einem Agens.

Der Verlauf der Hepatitis wird klinisch in ein Prodromalstadium und ein Stadium der Organmanifestation geteilt.

Das Prodromalstadium dauert ca. 2-7 Tage, wobei subfebrile Temperaturen, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Druckschmerz im rechten Oberbauch auftreten können. Bei Hepatitis B treten eventuell auch Arthralgien und ein flüchtiges Exanthem auf.

Das Stadium der Organmanifestation dauert ca. 4-8 Wochen (je nach Erreger) und kann sowohl ikterisch, als auch anikterisch verlaufen. Es kommt nur etwa in einem Drittel der Fälle zu einem Ikterus. Er tritt zunächst mit Dunkelfärbung des Urins und

Entfärbung des Stuhls in Erscheinung. Danach folgen die Gelbfärbung der Skleren und der Haut, begleitet von Juckreiz, wobei es den Patienten in diesem Stadium meist schon besser geht.

Häufig kommt es zu Lebervergrößerung mit Druckempfindlichkeit, auch leichte Milzvergrößerung und Lymphknotenschwellung sind in einem Teil der Fälle zu beobachten.

Eine wichtige Differenzierung ist die Aufteilung in akute und chronische Hepatitis.

Nur die Hepatitis B, C und D können in chronische Verlaufsformen übergehen, nicht jedoch Hepatitis A und E. Eine chronische Virushepatitis liegt vor, wenn das Virus länger als sechs Monate nachweisbar ist. Bei immunologisch gesunden Erwachsenen geht die HBV-Infektion in etwa 5-10% der Fälle in die chronische Phase über (Schaefer & Gerlich, 2007). Bei Infektionen mit HCV ist dies in ca. 70% der Infektionen der Fall.

Die chronische Hepatitis verläuft häufig über einen längeren Zeitraum klinisch inapparent, kann sich je nach Schweregrad aber auch durch Leistungsminderung, Müdigkeit, uncharakteristische Oberbauchbeschwerden, Druckschmerz in der Lebergegend, ev. Arthralgien, Lebervergrößerung und Konsistenzvermehrung, im entzündlichen Schub eventuell mit Ikterus und Leberhautzeichen, äußern.

Folge der chronischen Hepatitis kann eine Leberzirrhose sein, welche wiederum mit dem erhöhten Risiko eines hepatozellulären

Karzinoms mit entsprechender schlechter Prognose und eventuell Tod einhergeht (Fleig, 2004).

Die fünf klassischen viralen Hepatitis-Erreger werden im folgenden kurz charakterisiert.

Jeder Erreger stammt aus taxonomisch komplett eigenständigen Familien, die nichts miteinander gemein haben, außer der Erkrankung, die sie verursachen.

1.2 Taxonomie und Epidemiologie

1.2.1 Hepatitis A Virus

Das Hepatitis A Virus gehört zu der Familie der Picornaviridae, in der es den einzigen Vertreter der Gattung Hepatovirus darstellt (Tabelle 1). Erst in den 1970er Jahren wurde das Hepatitis A Virus als Auslöser der Hepatitis A identifiziert (Jilg, 2002).

Bei HAV handelt es sich um ein sehr resistentes, einzelsträngiges RNA-Virus, das monatelang in Ab-oder Trinkwasser stabil bleiben kann. Es ist weltweit die häufigste Ursache für eine akute virale Hepatitis. Zur Übertragung kommt es durch fäkal-orale Kontaktinfektion, durch verseuchtes Wasser oder kontaminierte Lebensmittel. Die Durchseuchung beträgt in Deutschland zur Zeit je nach Altersgruppe 5-10% (Robert-Koch-Institut, 2006).

1.2.2 Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus ist ein partiell doppelsträngiges DNA-Virus aus der Familie der Hepadna-Viridae. Es sind acht Genotypen (A-H)

bekannt, deren Verteilung regional verschieden ist (Schaefer, 2007). Das Hepatitis B Virus bedient sich zu seiner Vermehrung einer Reversen Transkriptase (Gerlich & Schaefer, 2002).

Hepatitis B kommt weltweit vor, und ist besonders in Südostasien und dem Nahen und Mittleren Osten endemisch.

Die Übertragung des Virus findet auf parenteralem oder sexuellem Wege statt. Pro Jahr werden in Deutschland ca. 5000 Neuerkrankungen gemeldet.

Die Möglichkeit einer Chronifizierung ist gegeben, aktuell sind ca. 400 Millionen Menschen weltweit chronisch mit Hepatitis B infiziert (McMahon, 2005). Die Folgen der chronischen Infektion können Zirrhose und Krebs sein (Chen et al., 2009).

1.2.3 Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist ein einsträngiges RNA-Virus der Gattung Hepacivirus aus der Familie der Flaviviridae. Es wurde 1988 erstmals identifiziert. Es sind sechs Genotypen und dreißig Subtypen bekannt. Die Hepatitis C ist weltweit verbreitet (Roggendorf, 2002).

Insgesamt sind in Deutschland ca. 400.000-500.000 Menschen chronisch infiziert (Stand 2009).

Die Übertragung erfolgt parenteral oder bei sexuellen Kontakten. Eine Chronifizierung ist möglich, und wesentlich häufiger als bei Hepatitis B (bis zu 80%). Dazu kommt bei einer Chronifizierung das erhöhte Risiko eines Leberzellkarzinoms (Rantala & van de Laar, 2008).

1.2.4 Hepatitis D Virus

Das Hepatitis D Virus ist ein sogenanntes Virusoid, dessen Genom aus einem stark verdrehten einsträngigen RNA-Strang besteht. Es besitzt keine eigene Hülle, weswegen für eine Hepatitis D Infektion eine Hepatitis B Infektion zwingende Voraussetzung ist. Das Virusoid bedient sich des HBsAg-Hüllproteins des HBV, um in die Wirtszelle einzudringen (Hsieh et al., 2006; Salisse & Sureau, 2009).

HDV kommt zwar weltweit vor, besonders aber im Mittelmeerraum, auf der arabischen Halbinsel, in Teilen von Afrika und Süd- und Mittelamerika.

Die Gefahr von HDV liegt in der „Superinfektion“, der nachträglichen Infektion mit HDV nach einer Infektion mit HBV. Dabei nimmt die Leber ungleich mehr Schaden, als bei einer simultanen Infektion. Dazu besteht ein hohes Chronifizierungsrisiko von 70-90% (Su et al., 2006).

Die Erkrankung ist in Deutschland selten. Das RKI berichtet im Jahr 2008 über 7 bestätigte Fälle (Robert-Koch-Institut, 2009).

1.2.5 Hepatitis E Virus

Das Hepatitis E Virus ist ein einsträngiges RNA-Virus, dessen Genom 1990 von Reyes et alii isoliert wurde (Reyes et al., 1990). Früher wurde es zu den Calici-Viren gezählt, heute zu der Familie der Hepeviridae, dessen einzigen Vertreter es darstellt (Schaefer, 2006). Man unterscheidet aktuell vier verschiedene Genotypen: den mexikanischen, US-amerikanischen, asiatisch-afrikanischen und taiwanesischen Genotyp. Alle zeigen enge Verwandtschaft und

gehören zum gleichen Serotyp. Die Hepatitis E kommt fast nur in Asien, Nord- und Ostafrika, sowie Süd- und Mittelamerika vor.

Das Virus wird fäkal-oral übertragen oder über kontaminiertes Wasser oder Lebensmittel, sehr selten parenteral. Ein chronischer Verlauf war bisher nicht bekannt, seit kurzem liegen aber Falldaten zu einer möglichen Chronifizierung vor (Kamar et al., 2008). Meistens verläuft die Erkrankung inapparent (Panda et al., 2006). Allerdings verläuft die Krankheit öfter fulminant als beispielsweise Hepatitis A. Noch ungeklärt ist außerdem die Ursache der hohen Letalität (bis 20%) bei Infektion im letzten Trimenon einer Schwangerschaft (Jilg, 2002).

Im Jahr 2008 wurden 92 Fälle in Deutschland registriert (Robert-Koch-Institut, 2008), wobei auffällig ist, dass die Zahlen in den letzten Jahren kontinuierlich anstiegen.

Tabelle 1: Merkmale der hepatotropen Viren

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Familie/ Genus	Picornaviridae/ Hepatovirus	Hepadnaviridae/ Orthohepadnavirus	Flaviviridae/ Hepacivirus	Satellitenvirus Deltavirus	Hepeviridae/ Hepevirus
Übertra- gung	enteral	parenteral, sexuell, perinatal	perinatal, parenteral, sexuell	parenteral, sexuell	enteral, parenteral selten
Inkuba- tionszeit	15 - 50 d	40 - 180 d	14 - 180 d	20 - 60 d	20 - 60 d
Chronische Verlaufs- form	keine	Erwachsene 10% Neugeborene 90%	50 - 80%	häufig	Einzelfälle beschrieben
Asymp- tomatische Verläufe	95%	80%	häufig	unbekannt	> 99% unter 15a 15 - 20% schwere Verläufe bei Schwangeren
Therapie	keine	Nukleos/tid- Analoga oder Interferon	Interferon in Kombination mit Ribavirin	Interferon	keine
Impfung	inaktiviertes Virus aus Zellkultur	Gentechnisch in Hefen hergestelltes Hüllprotein	keine universell wirksame	Impfung gegen HBV	experimentell

1.3 Fragestellung

Wie beschrieben handelt es sich bei akuten Hepatitiden meist um ein einheitliches Krankheitserscheinungsbild, welches keinen Rückschluss auf die Art des Erregers zulässt. Der unzweifelhafte Nachweis [einer Hepatitis] erfolgt über die Serumspiegelbestimmung der einschlägigen Leberenzym-Aktivitäten, die aus den geschädigten Hepatozyten freigesetzt werden. Werden bei der Bestimmung der Alanin-Aminotransferase-Aktivität (ALAT) Werte über 0,85 $\mu\text{Katal/L}$ (50 U/l) bei Männern und 0,60 $\mu\text{Katal/L}$ (35 U/l) bei Frauen ermittelt, so sind diese eindeutig erhöht und bedürfen der Abklärung (Thomas & Klein, 2006).

Um die Ursache einer Hepatitis im klinischen Alltag abzuklären, bedarf es einer Reihe von klinisch-chemischen Untersuchungen, welche Leberparameter, Entzündungsparameter, Differentialblutbild und Virusdiagnostik umfassen. Prinzipiell ist jede Transaminasenerhöhung klärungsbedürftig, da sich hinter ihr eine Vielzahl ernster viral oder nicht-viral bedingter Erkrankungen verbergen kann.

Für jede viral hervorgerufene Hepatitis existiert bislang eine gängige Nachweismethode. Da das klinische Bild der Krankheit

aber in jede Richtung weisen kann, ist es nach wie vor nötig eine standardisierte Stufendiagnostik zu betreiben. Diese enthält hauptsächlich serologische Nachweise.

Serologische Nachweisverfahren sind gegenwärtig Standard in der Hepatitis-Diagnostik. Sie bieten Vor- und Nachteile gegenüber einem Nukleinsäure-Amplifikationstechnik-Verfahren (NAT), wie der Multiplex-PCR.

Stufendiagnostik:

Stufe 1: Nachweis häufiger Hepatitisviren

Serologische Untersuchung auf HBs-Ag, anti-HBc, anti-HCV, anti-HAV; Bei Verdacht auf Status während der Inkubationszeit oder frühe Erkrankungsphase auch HCV-RNA; ausnahmsweise auch HBV-DNA.

Weiteres Procedere bei positivem Screening:

Anti-HAV IgM, Anti-HBc IgM, evtl. quantitative HBV-DNA-Bestimmung, NAT auf HCV, Anti-HDV, evtl. HDV-RNA;

Stufe 2: NAT auf HBV, HCV und serologischer Nachweis von HEV

Stufe 3 und 4: Nachweis von Herpesviridae und weiterer Viren

Stufe 5: Leberbiopsie

Ab Stufe 3 erfordert die Diagnostik spezialisierte Kenntnisse und eine entsprechende Ausstattung des Labors (Mertens et al., 2004). Geben diese Untersuchungen keinen Anhalt für bakteriologische, mykologische oder parasitäre Ursachen, so wird nach der lokalen epidemiologischen Häufigkeit des Virus, der infektionsepidemiologischen Bedeutung des Nachweises sowie der therapeutischen Konsequenzen des Untersuchungsergebnisses vorgegangen. Weiterhin muss bei der Stufendiagnostik in Betracht gezogen werden, dass positive Nachweise von Herpes-, Adeno-, Entero- und Parvoviren hinsichtlich ihrer ätiologischen Bedeutung erst beurteilt werden können, wenn eine aktive HAV, HBV, HCV und HEV-Infektion ausgeschlossen wurden (Schaefer, 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, eine schnelle und einfache Nachweismethode zu entwickeln, mit der es möglich ist, die differentialdiagnostisch relevanten Erreger einer viralen Hepatitis auf Nukleinsäure-Ebene gezielt zu identifizieren, sowie eine Angabe über die Konzentration des Erregers im Patientenmaterial zu machen.

Eine unzweifelhaft schnelle und einfache Nachweismethode für Viren auf Nukleinsäure-Ebene ist die Polymerase-Ketten-Reaktion. Sie kann DNA amplifizieren, was ihr großes Einsatzgebiet in der Analytik erklärt. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurde sie zudem enorm weiterentwickelt. Heute wären Diagnostik und Forschung ohne dieses biochemische Verfahren nicht mehr

denkbar. Praktischer Nutzen ergibt sich unter anderem in Abstammungstests, Verbrechensaufklärung durch genetischen Fingerabdruck und Diagnostik und Bekämpfung von Krankheiten. Vor allem letzteres ist Gegenstand intensiver Forschung. Die Multiplex-PCR gewinnt hier in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung, da es mit ihrer Hilfe möglich ist, verschiedene Ursachen und Faktoren einer Krankheit und Korrelationen zueinander besser zu untersuchen. Dies ist in nahezu allen Krankheitsgebieten möglich, insbesondere aber in der Krebsforschung verbreitet. Auch in der Diagnostik von Viruserkrankungen spielt die Multiplex-PCR bereits eine große Rolle, wie zahlreiche Untersuchungen zeigen. Der Nutzen liegt z.B. in der schnellen Identifizierung verschiedener Genotypen eines Virus (Chung et al., 2008), in der Erkennung ob spezielle Viruserkrankungen mit anderen Erkrankungen korrelieren (Fakhry et al., 2008), oder in der Entwicklung von Screenings (Adami et al., 2004). All diese Untersuchungen haben natürlich den Zweck eine Viruserkrankung auf diese Weise besser behandeln zu können, zu wissen in welchen Gebieten man mit welchem Genotyp rechnen muß, zu wissen, ob die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken mit einer bestimmten Viruserkrankung höher ist als ohne, oder wie sinnvoll es ist, Blutspenden auf seltene Viren zu testen.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Basis für einen möglichen Routine-Nukleinsäurenachweis für die fünf klassischen Hepatitisserreger zu schaffen.

Zu Beginn stellten sich die Fragen, ob es möglich ist, Monoplex-PCR-Nachweise für HAV, HBV, HCV, HDV und HEV zu einem Multiplex-PCR-Protokoll zusammenzufügen, wie sensitiv ein solcher Nachweis wäre, welcher Nutzen daraus gezogen werden könnte, und ob ein solches Multiplex-PCR-Protokoll übertragbar wäre in die Routinediagnostik eines virologischen Labors.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmide

Die verwendeten Plasmide enthielten Monomere oder Multimere des kompletten viralen Genoms.

HAV-Plasmid: pT7-187 (1ng/μl)

HBV-Plasmid: p HBV 991 (1ng/μl)

HDV-Plasmid: p50LB3 (5,15μg/μl)

HEV-Plasmid: psK-HEV2

2.1.2 Patientenmaterial

An Patientenmaterial wurden im Laufe der Arbeit humane Seren verwendet, die teilweise von Einsendungen der Diagnostik stammten, teils von Prof. Gerlich, Gießen, oder Prof. Jilg, Regensburg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Das Material wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Seren waren vor Beginn der Experimente mit Standardverfahren positiv getestet worden.

Für die Überprüfung der Praxistauglichkeit wurden folgende Seren verwendet:

HAV w10044	HCV w2174	HDV 08-11000	
HAV w14444	HCV w627	HDV 08-11100	
	HCV 13	HDV 08-11199	
HBV w5731	HDV 08-10658	HDV 08-11249	HEV w16456
HBV w8223	HDV 08-10744	HDV 08-09572	HEV w16112
HBV w237	HDV 08-10698	HDV 08-09380	HEV w12

2.1.3 Primer

Alle Primer, die in dieser Arbeit aufgeführt sind, wurden von der MWG-Biotech AG in Ebersberg, Deutschland, hergestellt.

Primer für die Multiplex-PCR:

HAVs71-87	5` -CCG CCG TTT GCC TAG GC-3` 17 Basenpaare Tm= 60,0°C; Anteil G/C 71%
HAVas320-291	5` -CCC AAT TTA GAC TCC TAC AGC T-3` 22 Basenpaare Tm=58,4°C; Anteil G/C 45%
Amplifikatlänge: 249	
HBVS3s	5` -TGC CTC ATC TTC TTR TTG GTT CT-3` 23 Basenpaare Tm=58,0°C; Anteil G/C 41 %

HBVS3as 5` -CCC CAA WAC CAV ATC ATC CAT ATA-
3`

24 Basenpaare

Tm=58,7°C; Anteil G/C 40%

Amplifikatlänge: **336**

Ger-HCV-NCR-s 5` -TGC GGA ACC GGT GAG TAC A-3`

19 Basenpaare

Tm=58,8°C; Anteil G/C 58%

Ger-HCV-NCR-as 5` -CTT AAG GTT TAG GAT TCG TGC TCA T-
3`

25 Basenpaare

Tm=59,7°C; Anteil G/C 40%

Amplifikatlänge: **217**

HRO-HDV2s 5` -CCG GCY GGG CAA CAT TC-3`

-719-73 17 Basenpaare

Tm=58,8°C; Anteil G/C 68%

HRO-HDVas 5` -GTC CGA CCT GGG CAT CC-3`

-871-855as 16 Basenpaare

Tm=60,0°C; Anteil G/C 72 %

Amplifikatlänge: **184**

HEV3-s 5` -GGC GGT GGT TTC TGG GG-3`
17 Basenpaare
Tm=60,0°C; Anteil G/C 71%

HEV3-as 5` -GCG AAG GGG TTG GTT GGA-3`
18 Basenpaare
Tm=58,2°C; Anteil G/C 61%

Amplifikatlänge: **97**

HAV-s 5` -TCA CCG CCG TTT GCC TAG-3`
18 Basenpaare
Tm=58,2°C; Anteil G/C 55%

HAV-as 5` -GGA GAG CCC TGG AAG AAA GA-3`
20 Basenpaare
Tm=59,4°C; Anteil G/C 55%

Amplifikatlänge: **187**

HRO-HDVs
(689-702) 5` -GGC CGG CAT GGT CCC-3`
15 Basenpaare
Tm=58,8°C; Anteil G/C 80%

HRO-HDVas 5` -TTC GGG TCG GCA TGG C-3`

(904-889) 16 Basenpaare
Tm=56,9°C; Anteil G/C 69%

Amplifikatlänge: **216**

HRO-HDV_s 5` -TGG CCG GCA TGG TCC C-3`
(687-709) 16 Basenpaare
Tm=59,4°C; Anteil G/C 75%

HRO-HDV_{as} 5` -CTT CGG GTC GGC ATG GC-3`
(907-877) 17 Basenpaare
Tm=60,0°C; Anteil G/C 71%

Amplifikatlänge: **219**

HDV2-s 5` -CTC CAG AGG ACC CCT TCA-3`
18 Basenpaare
Tm=58,2°C; Anteil G/C 61%

HDV2-as 5` -CCC GGG ATA AGC CTC ACT-3`
18 Basenpaare
Tm=58,2°C; Anteil G/C 61%

Amplifikatlänge: **179**

HDV3-s 5` -CTC CAG AGG ACC CCT TCA-3`
18 Basenpaare
Tm=58,2°C; Anteil G/C 61%

HDV3-as 5` -CCC GGG ATA AGC CTC ACT-3`
18 Basenpaare
Tm=58,2°C; Anteil G/C 61%

Amplifikatlänge: **178**

2.1.4 Chemikalien

Ethidiumbromidlösung 10mg/ml	BIO-RAD, München
Seakem® LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Nuclease Free Water	Promega, Mannheim
High Pure Viral RNA Kit	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Quanti Tect SYBR Green RT-PCR Kit	
HotStartTaq DNA Polymerase	
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Buffer:	
dNTP mix, (including dUTP)	
SYBR Green I	
ROX passive reference dye	
5 mm MgCl ₂	Qiagen, Hilden

TBE-Puffer:

Trisborate	SERVA, Heidelberg
Borsäure	MERCK, Darmstadt
EDTA	MERCK, Darmstadt

100 bp DNA Ladder	Invitrogen life technologies, Karlsruhe
-------------------	--

2.1.5 Geräte

DNA-Thermo-Cycler	PTC-200 DNA Engine Cycler MJ Research Inc., Waltham, MA, USA.
Cycler-Software	Opticon Monitor 3.1, BIO-RAD, München
Gelelektrophorese	Power-Pac 3000, BIO-RAD, München
RNA-Extraktion	Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg
Kamera	Olympus
Kamera-Software	Argus X1 V.3

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion von RNA aus Patientenmaterial

Zur Isolation der RNA aus Patientenserum wurde das High Pure Viral RNA Kit (Roche) verwendet. Dazu wurden 200 µl Serum zunächst mit einer Working Solution versetzt. Darauf folgten einige Bindungs- und Auswaschvorgänge mit zwischenzeitlichem Zentrifugieren. Zum Schluss wurde mit Elutions Puffer das genetische Material gelöst und stand nach einem letzten Zentrifugieren zur Verfügung. Die extrahierte RNA wurde entweder sofort für die RT-PCR verwendet oder aufgrund ihrer Instabilität bei – 80° Grad gelagert.

2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, die 1983 entwickelt wurde (Mullis et al., 1992), ist heute eines der wichtigsten biochemischen Verfahren in der modernen DNA-Analytik und Grundlage derselben. Mit ihr ist es möglich, spezifische Sequenzen eines Genoms aus geringsten Ausgangsmengen in vitro zu vervielfältigen, um sie dann zu analysieren oder weiterzuverarbeiten. Das Grundprinzip läuft wie folgt ab: Im ersten Schritt wird die DNA in einer *Denaturierungsphase* bei ca. 95 ° Celsius in die Einzelstränge aufgespalten. In der zweiten Phase der PCR, der *Annealing-Phase*, die bei möglichst optimalen Arbeitstemperaturen der Primer stattfindet, legen sich die Primer an die ihnen komplementären Stellen der DNA an. Dazu werden im Vorfeld möglichst konservierte Bereiche im zu untersuchenden Genom herausgesucht. Die Primer

sind kleine Oligonukleotide mit einem 3`OH-Ende. Dieses benützt die DNA-Polymerase als Startpunkt für ihre Kettensynthese. In der darauf folgenden *Extensionsphase* (ca. 72 °C) fügen sich mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase Nukleotid-Bausteine an die Primer und den komplementären DNA-Strang an. Auf diese Weise entstehen zwei Kopien des ursprünglichen Genomabschnitts. Mit erneutem Erhitzen auf die Denaturierungstemperatur beginnt der zweite PCR-Zyklus. Nach ca. 35-40 Zyklen liegen meist ausreichend Kopien des gewünschten Genabschnitts vor.

Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Varianten der PCR. Mit einigen von ihnen ist es nicht nur möglich spezifische Genabschnitte zu amplifizieren, sondern auch die Menge der in den Proben initial vorhandenen DNA-Abschnitte zu quantifizieren.

Dadurch erlaubt die PCR auch die Bestimmung von z.B. Keimbelastungen und Viruskonzentrationen.

Während dieser Arbeit wurde stets ein 50 µl Reaktionsansatz verwendet, welcher folgende Bestandteile enthielt:

25 µl	Mastermix (Quanti Tect SYBR Green RT-PCR Kit)
1 µl	s-Primer, MWG-Biotech AG, Ebersberg
1 µl	as-Primer, MWG-Biotech AG, Ebersberg
1- 6,6 µl	Template
ad 50 µl	H ₂ O

2.2.2.1 Hot Start- PCR

Eine Hot Start- PCR unterscheidet sich von der Grundmethode nur geringfügig. Die hitzestabile Taq-Polymerase ist schon bei Zimmertemperatur in der Lage kleinere Fragmente zu polymerisieren. Das Annealing ist jedoch bei diesen niedrigen Temperaturen unspezifisch, was zu unspezifischen Produkten führt. Um dies zu verhindern, bedienen wir uns einer Hot Start-Taq-Polymerase, die erst bei Temperaturen ab ca. 93°C aktiviert wird. Zu diesem Zeitpunkt haben die Primer schon spezifisch an die DNA gebunden, und es kommt zu deutlich weniger Artefakten.

2.2.2.2 Real-Time-PCR

Ein Verfahren, welches eine relativ bequeme Art der Quantifizierung bietet, ist die Real-Time-PCR im Thermo-Cycler. Sie beruht auf der herkömmlichen Polymerase-Ketten-Reaktion. Bei der Real-Time-PCR wird die Produktakkumulation der Genamplifikate in Echt-Zeit verfolgt.

Abhängig von der Menge der Amplifikate wird nach jedem Zyklus der PCR Fluoreszenzlicht generiert, welches gemessen wird. Die Beobachtung in Echt-Zeit ist bei diesem quantitativen Verfahren nötig, um die exponentielle Phase der Reaktion zu identifizieren, weil nur in dieser optimale Reaktionsbedingungen herrschen und die Amplifikationseffizienzen näherungsweise konstant sind.

Durch die Beobachtung in Echt-Zeit entfallen die nachträglichen Quantifizierungen, die bei anderen quantifizierenden Verfahren notwendig sind.

Die Emission des Fluoreszenzlichts kann mit verschiedenen Verfahren erreicht werden. Wir verwendeten bei dieser Arbeit den

interkalierenden Farbstoff SYBR[®] Green I. Dieser Farbstoff bindet relativ sequenzunspezifisch an eine kleine Furche in doppelsträngiger DNA. Dort gebunden fluoresziert er nach Anregung mit blauem Licht etwa 1000fach stärker als im freien Zustand, weswegen er sehr gut geeignet ist, die Vervielfältigung des PCR-Produkts sichtbar zu machen (Wilhelm, 2003).

In dieser Arbeit wurde bei jedem Experiment zuerst eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt und die Produkte in den meisten Fällen zusätzlich im Gel ausgewertet.

2.2.2.3 RT-PCR (Reverse Transkriptase- PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion ist die Taq-Polymerase das Schlüsselenzym. Ohne sie ist es nicht möglich, die DNA zu vervielfältigen. Die Taq-Polymerase ist jedoch nicht in der Lage RNA zu amplifizieren, da sie eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Um auch RNA in der PCR vervielfältigen zu können, wurde aus Retroviren eine RNA-abhängige DNA-Polymerase isoliert. Mit diesem Enzym ist es möglich, RNA in cDNA umzuschreiben. Die reverse Transkription wird durch die virusspezifischen Primer gestartet. Dieses Oligonukleotid dient nun als Startmatrize für die Kettenverlängerung. Eine zur Polymerase gehörende Ribonuclease hydrolysiert den RNA-Strang des RNA-DNA-Hybridstrangs, wodurch die reverse Transkriptase im zweiten Durchlauf einen kompletten DNA-Strang synthetisieren kann (Löffler & Petrides, 1998). An diesen Vorgang kann unmittelbar eine PCR angeschlossen werden. In dieser Arbeit enthielt der PCR-Mastermix von Anfang an das

Enzym Reverse Transkriptase, da von den fünf hepatotropen Viren, die untersucht wurden, vier RNA als primäres Genom enthalten.

2.2.2.4 Multiplex-PCR

Eine Multiplex-PCR unterscheidet sich von einer normalen PCR durch ihren Ansatz. Bei der Multiplex-PCR werden mehrere Primer in einen Probenansatz gegeben, die unterschiedliche Targets spezifisch generieren sollen. Dies muß eine Multiplex-PCR leisten können, ohne dass es zur Amplifizierung unspezifischer Sequenzen kommt (Henegariu et al., 1997; Elnifro et al., 2000) Die Schwierigkeit bestand darin, für alle Primerpaare optimale Bedingungen zu schaffen und so die Ergebnisse der Multiplex-PCR zu optimieren.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden 2 g des Agarose-Pulvers in 100 ml TBE-Puffer gelöst und über drei Minuten in der Mikrowelle, Bosch, Deutschland, aufgekocht. Nach kurzer Abkühlung wurden 2 Mikroliter Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] pro Gel hinzugegeben und dann in die Gelelektrophorese-Form gegossen.

Die für Seakem ® LE Agarose angegebenen Trenngrößen für PCR-Produkte liegen bei einem 2%igen Gel zwischen 100-200 Basenpaaren.

Jeweils 10 Mikroliter einer Probe wurde mit 5 Mikroliter Bromphenolblau (Auftragspuffer) versetzt, davon wurden 10 Mikroliter in die Gel-Taschen eingefüllt. Bei 40 V liefen die PCR-

Produkte im TBE-Puffer 40 Minuten lang. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen.

2.2.4 Geldokumentation

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente in den Polyacrylamidgelen wurden auf einem Transilluminator unter Durchlicht mit einer Kamera (Olympus) dokumentiert. Die aufgezeichneten Graustufenbilder konnten mit der dazugehörigen Software (Argus XI V.3) bearbeitet werden. Die Feinjustierung von Helligkeit und Kontrast, sowie Zuschnitt der relevanten Abschnitte der Bilddateien war damit möglich.

3 Ergebnisse

3.1 Primerdesign und Einzeltestung

Der erste Schritt auf dem Weg zur Multiplex PCR war der Umstieg von der konventionellen PCR auf die quantitative Real-Time-PCR mit dem DNA-Engine, Peltier Thermal Cycler und dem Opticon Monitor Programm.

Dazu wurden zu Beginn der Arbeit fünf Primerpaare ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer an möglichst konservierte Abschnitte des zu untersuchenden Genoms binden würden. Je mehr Genotypen eines Virus eine bestimmte Abfolge an Basenpaaren an einer bestimmten Stelle ihres Genoms haben, desto konservierter ist diese Sequenz. Als Primer wurden initial Primer aus dem Nationalen Referenzlabor für Hepatitis B und Hepatitis D, Leiter Prof. Dr. Dr. Gerlich, für HBV, HCV und HDV verwendet. Zusätzlich wurden aus der Literatur Primer für Hepatitis A und E herausgesucht. Bei den Primerpaaren aus dem Referenzlabor war bekannt, dass bei der Auswahl strikt auf möglichst hohe Konservierung der Zielsequenz der Primer geachtet worden war. Für die Auswahl der HBV, HCV und HDV-Primer waren alle bekannten Serotypen und Varianten berücksichtigt worden. Für HAV und HEV wurden Primer aus der Literatur herausgesucht, die ebenfalls die virale Variabilität berücksichtigten. Zur Absicherung wurden die Primer für HEV und HAV noch einmal mit allen in der Genbank gespeicherten entsprechenden Sequenzen mit dem Programm Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) analysiert.

Tabelle 2: Initial verwendete Primerpaare zum Multiplex-Nachweis der hepatotropen Viren

Primer	Sequenz	GC-Anteil	Tm in °C	Basenpaare	Länge
HAV-s	TCA CCG	0,61	58,2	18	187
HAV-as	GGA GAG	0,55	59,4	20	
HBVS3s	TGC TCT	0,41	58,0	23	336
HBVS3as	CCC CAA	0,40	58,7	24	
Ger-HCV-NCR-s	TGC GGA	0,58	58,8	19	217
Ger-HCV-NCR-as	CCT AAG	0,40	59,7	25	
HDV 2-s	CTC CAG	0,61	58,2	18	179
HDV2-as	CCC GGG	0,61	58,2	18	
HEV3-s	GGC GGT	0,71	60,0	17	97
HEV3-as	GCG AAG	0,61	58,2	18	

Der Reaktionsansatz war zu Beginn folgendermaßen zusammengesetzt:

25	µl RT-PCR-Mix
1	µl Primer s-Strang
1	µl Primer as-Strang
1	µl Probe Template
22	µl H ₂ O

Für diese erste Testung wurden noch unterschiedliche Konzentrationen an Probenmaterial beigegeben. Für HAV, HBV, HDV und HEV wurden Plasmide als Probe genutzt, für HCV wurde RNA aus einem Patienten-Serum extrahiert. Alle Primer wurden mit demselben PCR-Protokoll auf Funktionalität getestet.

- Protokoll:
1. 30 Min 53 °C
 2. 15 Min 95 °C
 3. 15 s 94 °C
 4. 30 s 53 °C
 5. 30 s 72 °C
 6. Kühlen bei 4 °C

Die Schritte 2, 3, 4, und 5 wurden pro Versuch 45 Male wiederholt. Zunächst wurden alle Primer nur semiquantitativ getestet. Mit allen ausgewählten Primerpaaren gelang initial die Amplifikation der spezifischen Templates. Die Abbildungen 3.1.1 bis 3.1.5 geben die Versuche wieder.

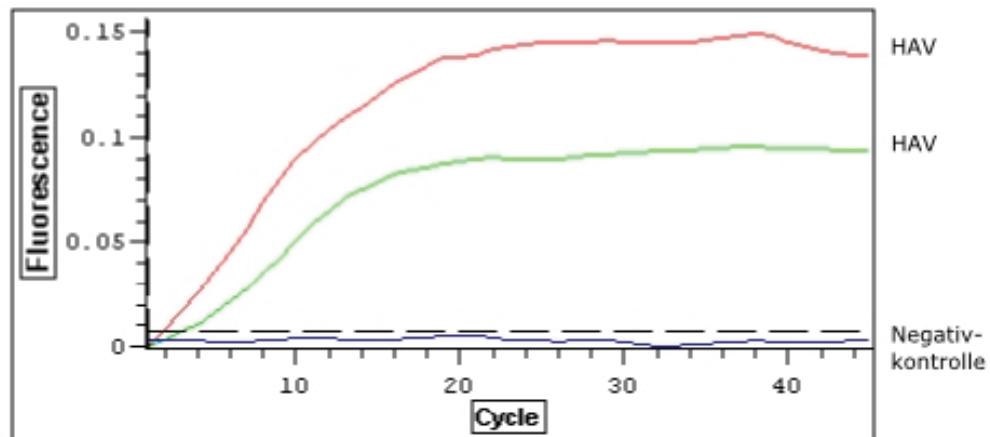


Abb. 3.1.1: Quantitative HAV-Monoplex-PCR

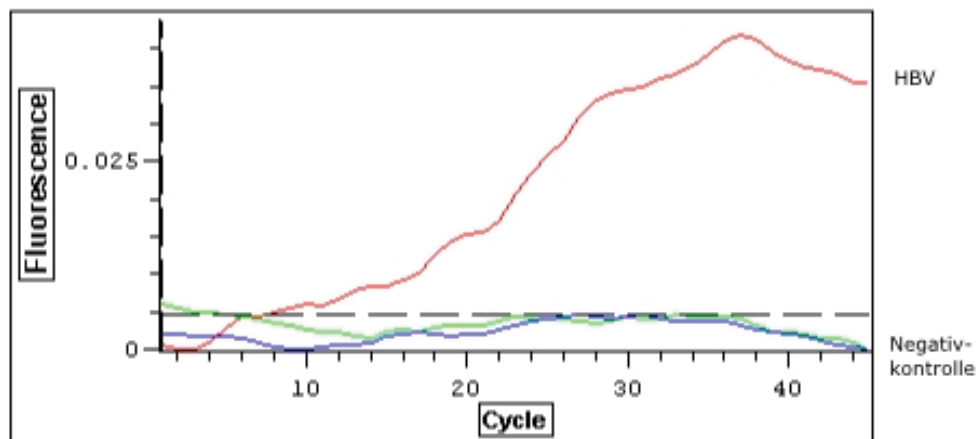


Abb. 3.1.2: Quantitative HBV-Monoplex-PCR

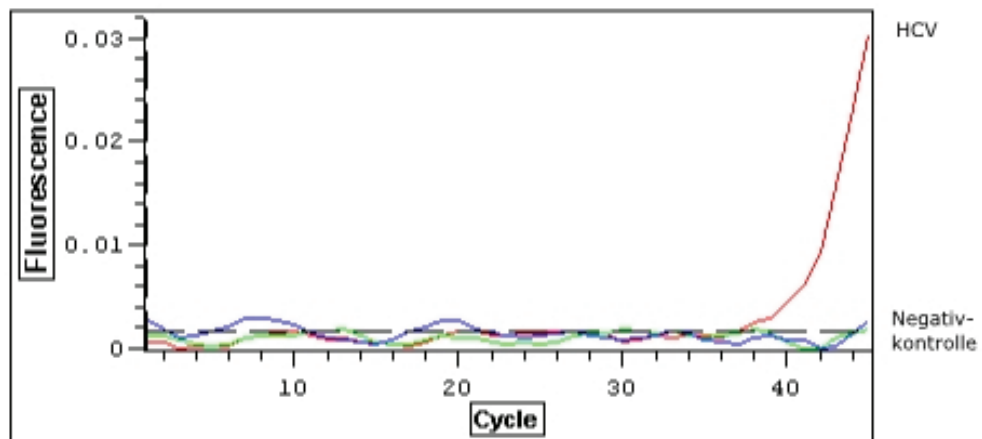


Abb. 3.1.3: Quantitative HCV-Monoplex-PCR

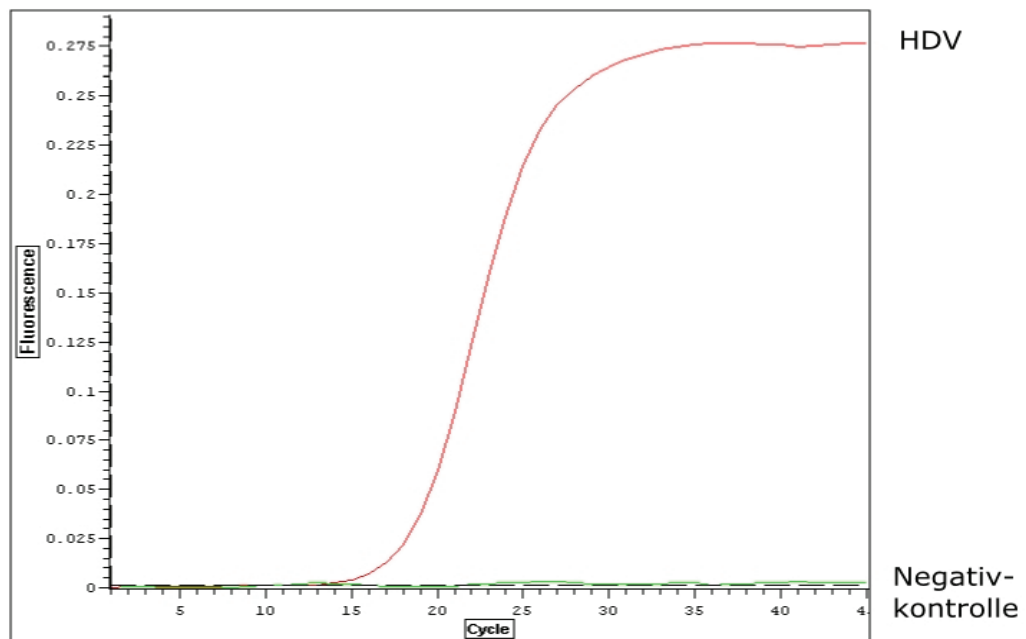


Abb. 3.1.4: Quantitative HDV-Monoplex-PCR

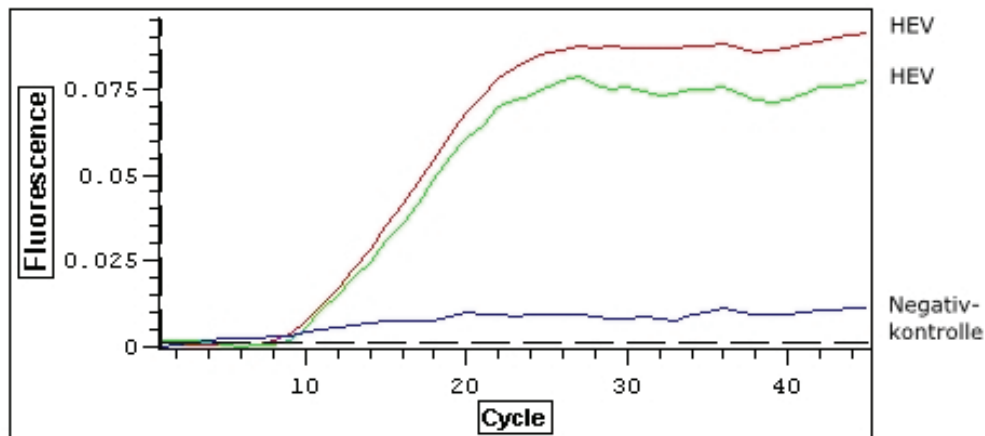


Abb. 3.1.5: Quantitative HEV-Monoplex-PCR

Um die Amplifikate später eindeutig voneinander unterscheiden zu können, wurden die Primer zusätzlich so gewählt, dass die Längen ihrer PCR-Produkte sich eindeutig unterschieden. Eine Zuordnung der Amplifikate zu einem bestimmten Virus sollte damit im Gel später möglich sein.

Noch vor Beginn weiterer Versuche wurden die HDV- und HAV-Primer überarbeitet, um eine ideale Amplifikatlänge zu erzeugen. Letztendlich mußten sie mehrmals überarbeitet werden, weswegen in der Arbeit mehrere Versionen beider Primer-Paare vorkommen. Das endgültige Multiplex-Protokoll wurde mit den oben verwendeten Primern ausgeführt.

3.2 Optimierung der PCR

Um festzustellen, bei welcher Temperatur in der Annealingphase ein Primerpaar optimal arbeitet, wurde folgender Versuch durchgeführt:

In insgesamt 49 Reagiergefäße wurde ein kompletter Probenansatz gefüllt. Also z.B. 7 x HAV, 7 x HBV, usw. In jedem Gefäß betrug die RNA-Konzentration 1 ng/ Template. Im Thermocycler wurde folgender Temperaturgradient eingestellt:

Tube 1: 51,2° C

Tube 2: 52,0° C

Tube 3: 53,0° C

Tube 4: 54,2° C

Tube 5: 55,2° C

Tube 6: 56,0° C

Tube 7: 57,0° C

Die PCR erfolgte mit diesem Programm:

- Protokoll:
1. 30 Min 53 °C
 2. 15 Min 95 °C
 3. 15 s 94 °C
 4. 30 s bei Temperaturen zwischen
51,2°C und 57,0°C
 5. 30 s 72 °C
 6. Kühlung bei 4 °C

Tabelle 3: Modifizierte Primerpaare zum Multiplex-Nachweis der hepatotropen Viren

Primer	Sequenz	GC-Anteil	Tm in °C	Basenpaare	Länge
HAV-s	TCA CCG	0,61	58,2	18	174
HAV-as	GGA GAG	0,55	59,4	20	
HBVS3s	TGC TCT	0,41	58,0	23	336
HBVS3as	CCC CAA	0,40	58,7	24	
Ger-HCV-NCR-s	TGC GGA	0,58	58,8	19	217
Ger-HCV-NCR-as	CCT AAG	0,40	59,7	25	
HRO-HDV (687-709)	TGG CCG	0,75	59,4	16	219
HRO-HDV (907-877)	CTT CGG	0,71	60,0	17	
HEV3-s	GGC GGT	0,71	60,0	17	97
HEV3-as	GCG AAG	0,61	58,2	18	

Die Abbildungen 3.2.1 bis 3.2.5 geben die Ergebnisse des Temperaturgradientversuchs wieder.

								
Label	HAV	HAV	HAV	HAV	HAV	HAV	H2O	HAV
Annealing-Temperatur	51,2 °C	52,0 °C	53,0 °C	54,2 °C	55,2 °C	56,0 °C	57,0 °C	57,0 °C
C(t)	11,3	13,1	23,6	32,2	36,9	30,2	24,7	4,3

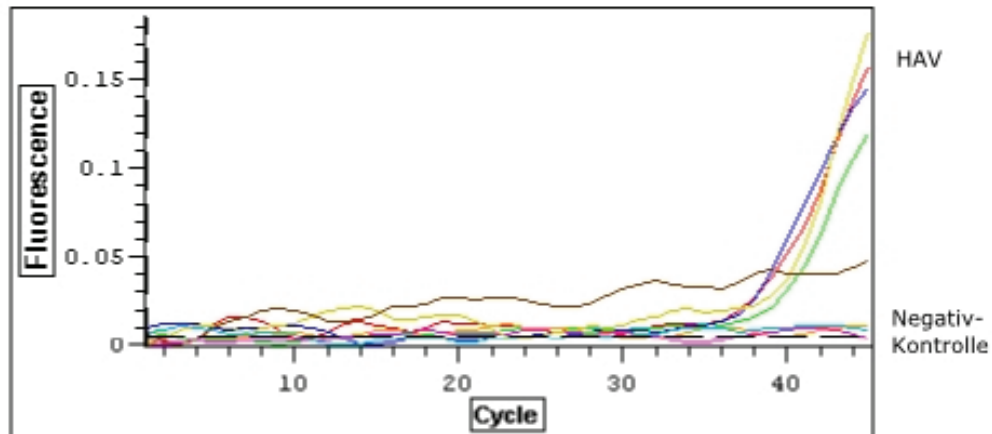


Abb. 3.2.1: Quantitative HAV-Monoplex-PCR mit Temperaturgradient zur Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur

								
Label	HBV	HBV	HBV	HBV	HBV	HBV	H2O	HBV
Annealing-Temperatur	51,2 °C	52,0 °C	53,0 °C	54,2 °C	55,2 °C	56,0 °C	57,0 °C	57,0 °C
C(t)	4,4	11,6	13,5	12,3	10,2	11,7	40,7	6,9

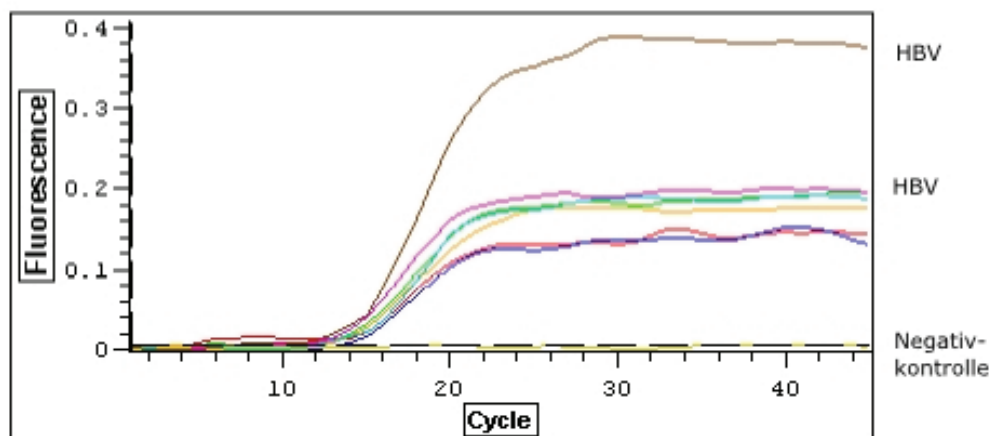


Abb. 3.2.2: Quantitative HBV-Monoplex-PCR mit Temperaturgradient zur Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur

								
Label	HCV	HCV	HCV	HCV	HCV	HCV	H2O	HCV
Annealing-Temperatur	51,2 °C	52,0 °C	53,0 °C	54,2 °C	55,2 °C	56,0 °C	57,0 °C	57,0 °C
C(t)	30,7	19,2	7,3	30,6	32,3	30,1	2,5	10,4

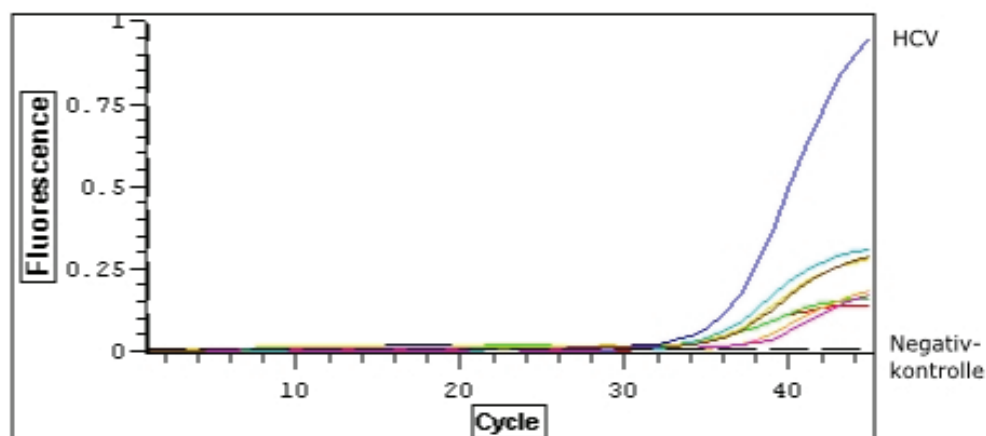


Abb. 3.2.3: Quantitative HCV-Monoplex-PCR mit Temperaturgradient zur Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur

								
Label	HDV	HDV	HDV	HDV	HDV	HDV	H2O	HDV
Annealing-Temperatur	51,2 °C	52,0 °C	53,0 °C	54,2 °C	55,2 °C	56,0 °C	57,0 °C	57,0 °C
C(t)	14,4	4,7	13,9	6,2	12,8	16,1	35,7	12,1

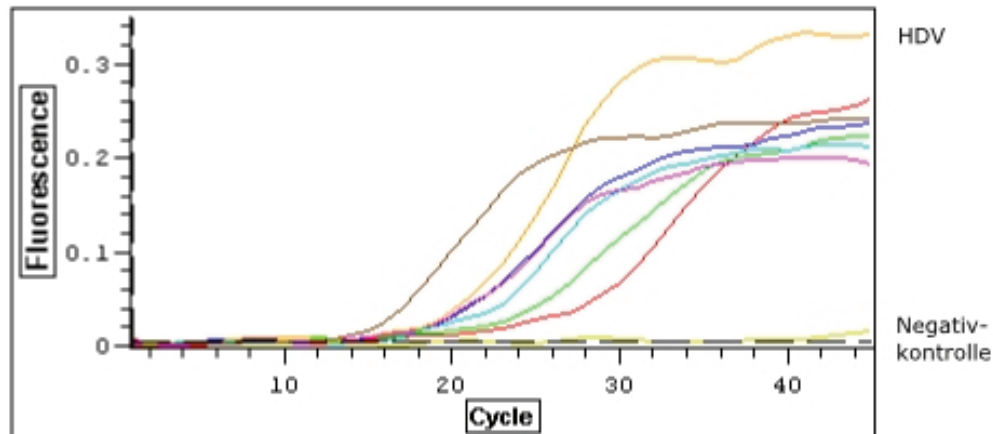


Abb. 3.2.4: Quantitative HDV-Monoplex-PCR mit Temperaturgradient zur Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur

								
Label	HEV	HEV	HEV	HEV	HEV	HEV	H2O	HEV
Annealing-Temperatur	51,2 °C	52,0 °C	53,0 °C	54,2 °C	55,2 °C	56,0 °C	57,0 °C	57,0 °C
C(t)	22,9	21,2	17,9	21,2	11,0	19,8	21,0	21,3

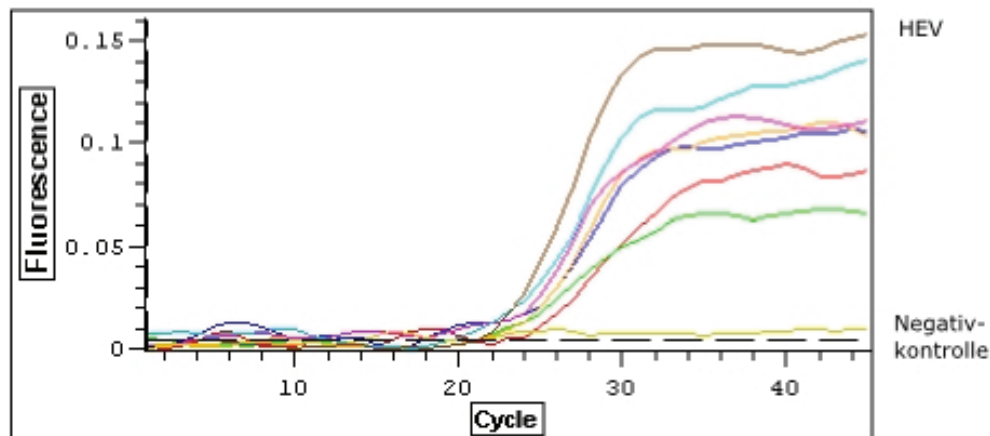


Abb. 3.2.5: Quantitative HEV-Monoplex-PCR mit Temperaturgradient zur Ermittlung der optimalen Annealing Temperatur

Nach Auswertung der quantitativen PCR ergaben sich divergierende Arbeitsoptima der Primer:

HAV: 51-53° C

HBV: 55-57° C

HCV: 53° C

HDV: 54° C oder 57° C

HEV: 56° C

In der Konsequenz dieser Ergebnisse entschlossen wir uns die HAV-Primer um wenige Basenpaare zu verlängern, um die Arbeitstemperatur zu erhöhen und damit der optimalen Annealing Temperatur der anderen Primer anzunähern. Ebenso erfuhren die HDV-Primer eine Verkürzung um 3 Basenpaare um ihre Arbeitstemperatur zu erniedrigen.

Die neuen Primer lauteten also zu diesem Zeitpunkt:

HAVs71-87 und HAVas320-291

Amplifikatlänge: 249

HRO-HDVs(689-702) und HRO-HDVas (904-889)

Amplifikatlänge: 216

Die neuen Primer wurden demselben quantitativen Test unterzogen wie die Vorgänger (3.1) und erwiesen sich als gleich sensitiv.

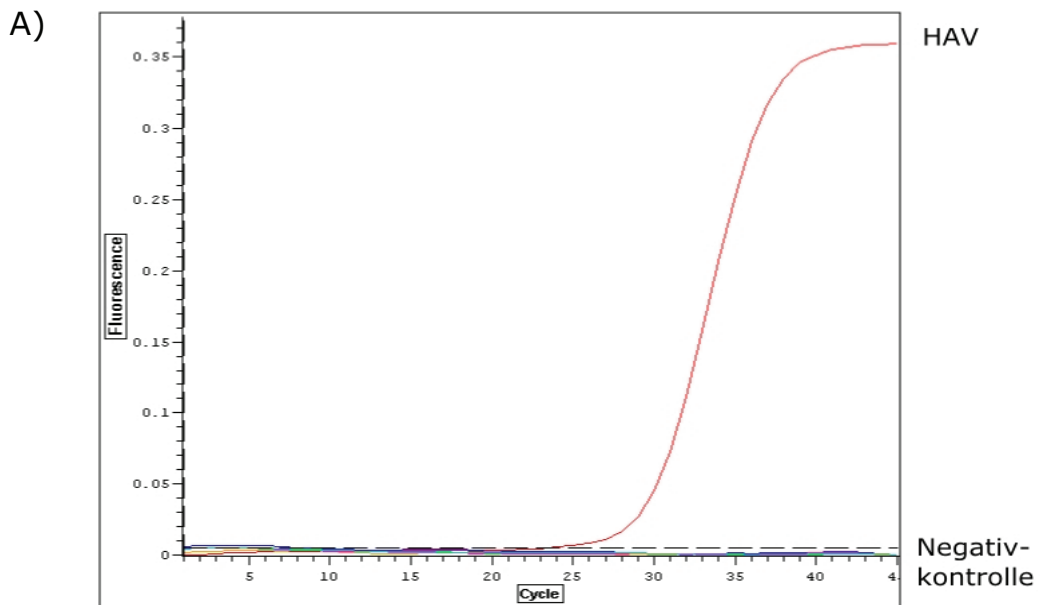
3.3 Nachweis der Spezifität der Primer

Der nächste Schritt auf dem Weg zur Multiplex-PCR war eine Testreihe, bei der die getesteten Primer-Paare nur spezifische Produkte mit dem spezifischen Target generieren sollten.

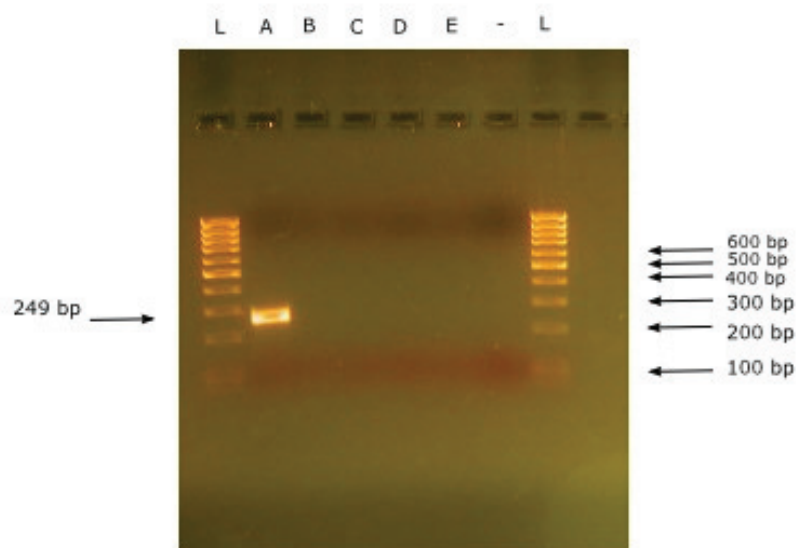
Hierzu wurden die Hepatitis Viren A – E jeweils mit einem für das entsprechende Virus spezifischen Primerpaar getestet. Die Konzentration der Proben betrug 1 ng/µl, das Volumen der Proben zwischen 0,84 und 6,6 µl.

Dazu wurde ein Ansatz vorbereitet, in dem alle sechs Röhrchen mit z.B. HAV-Primern ausgestattet wurden. Als Probe wurde in Röhrchen 1 HAV-RNA gegeben, in 2 HBV-DNA, in 3 HCV-RNA, in 4 HDV-RNA und in 5 HEV-RNA. Ziel war es, einen eindeutigen Anstieg der Fluoreszenz nur in dem Röhrchen mit zusammenpassenden Primern und DNA zu erhalten. Die anderen Proben sollten negative Ergebnisse liefern. Ebenso sollte im Gel nur die Bande aus dem entsprechenden Röhrchen auf der errechneten Höhe sichtbar sein.

Dieser Versuch gelang bei allen fünf Primerpaaren. Die nachfolgenden Abbildungen 3.3.1 bis einschließlich 3.3.5 geben die Ergebnisse dieser Versuche wieder.

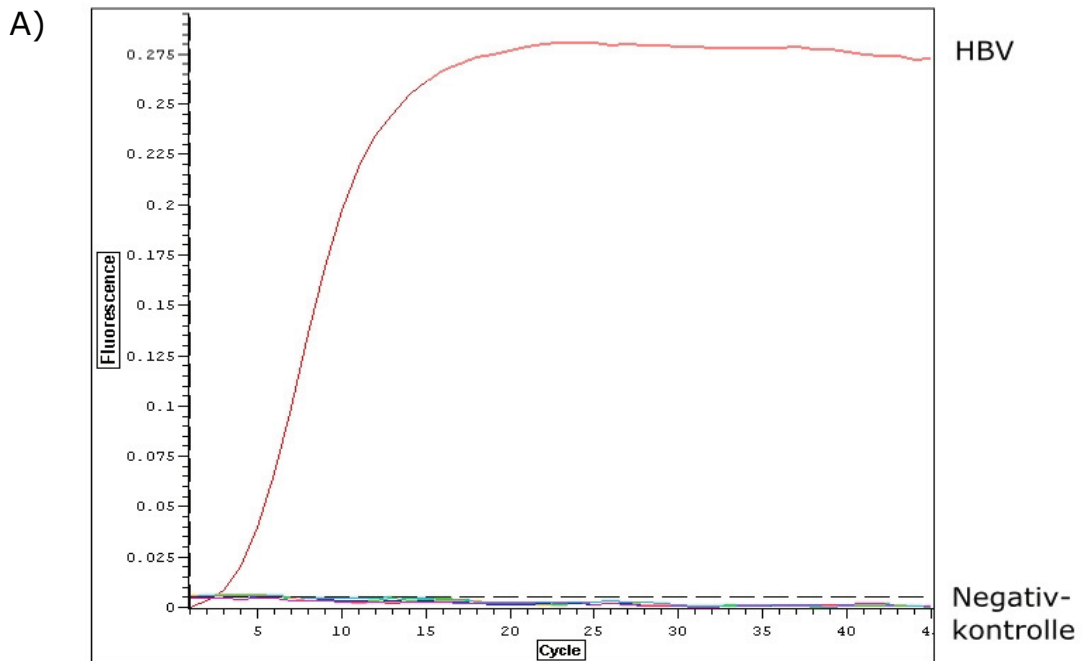


B)



3.3.1 A: Spezifischer HAV-Nachweis, B: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HAVs71-87 und HAVas320-291, spezifisch für HAV-RNA.

In den Spuren wurde die PCR mit dem Primerpaar HAVs71-87 und HAVas320-291 durchgeführt und mit HAV, HBV, HCV, HDV und HEV getestet. Die spezifische Bande liegt bei 249 bp. Spur A: HAV; Spur B: HBV; Spur C: HCV; Spur D: HDV; Spur E: HEV; Spur -: Negativkontrolle; Spur L: Längenstandard;



B)

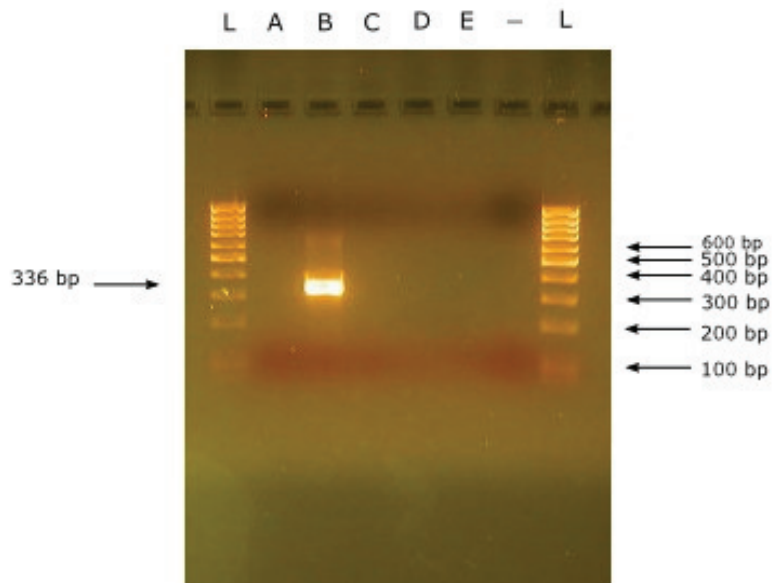


Abb. 3.3.2 A: Spezifischer HBV-Nachweis, B: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HBVS3s und HBVS3as, spezifisch für HBV-DNA.

In den Spuren wurde die PCR mit dem Primerpaar HBVS3s und HBVS3as durchgeführt und mit HAV, HBV, HCV, HDV und HEV getestet. Die spezifische Bande liegt bei 336 bp. Spur A: HAV; Spur B: HBV; Spur C: HCV; Spur D: HDV; Spur E: HEV; Spur -: Negativkontrolle; Spur L: Längenstandard;

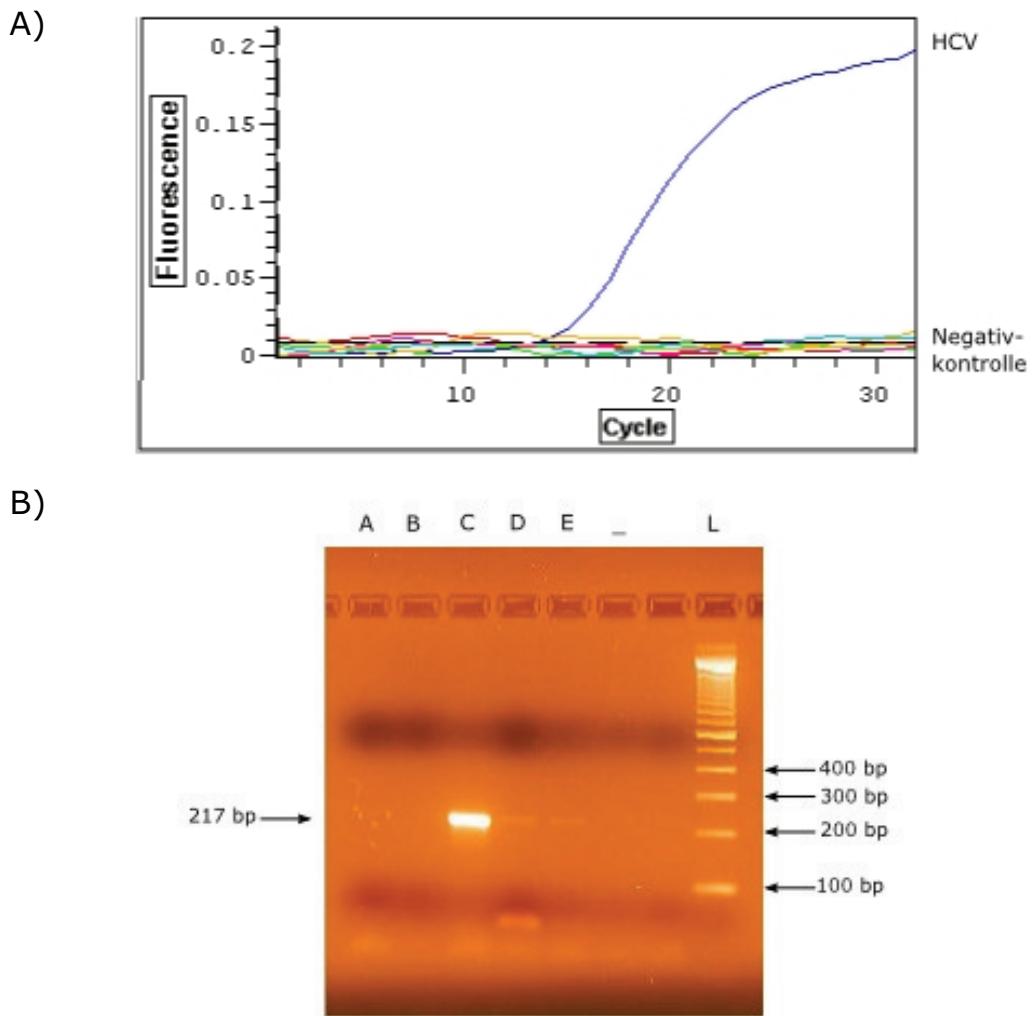


Abb. 3.3.3 A: Spezifischer HCV-Nachweis, B: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar Ger-HCV-NCR-s und Ger-HCV-NCR-as, spezifisch für HCV-RNA.

In den Spuren wurde die PCR mit dem Primerpaar Ger-HCV-NCR-s und Ger-HCV-NCR-as durchgeführt und mit HAV, HBV, HCV, HDV und HEV getestet. Die spezifische Bande liegt bei 217 bp. Spur A: HAV; Spur B: HBV; Spur C: HCV; Spur D: HDV; Spur E: HEV; Spur -: Negativkontrolle; Spur L: Längenstandard;

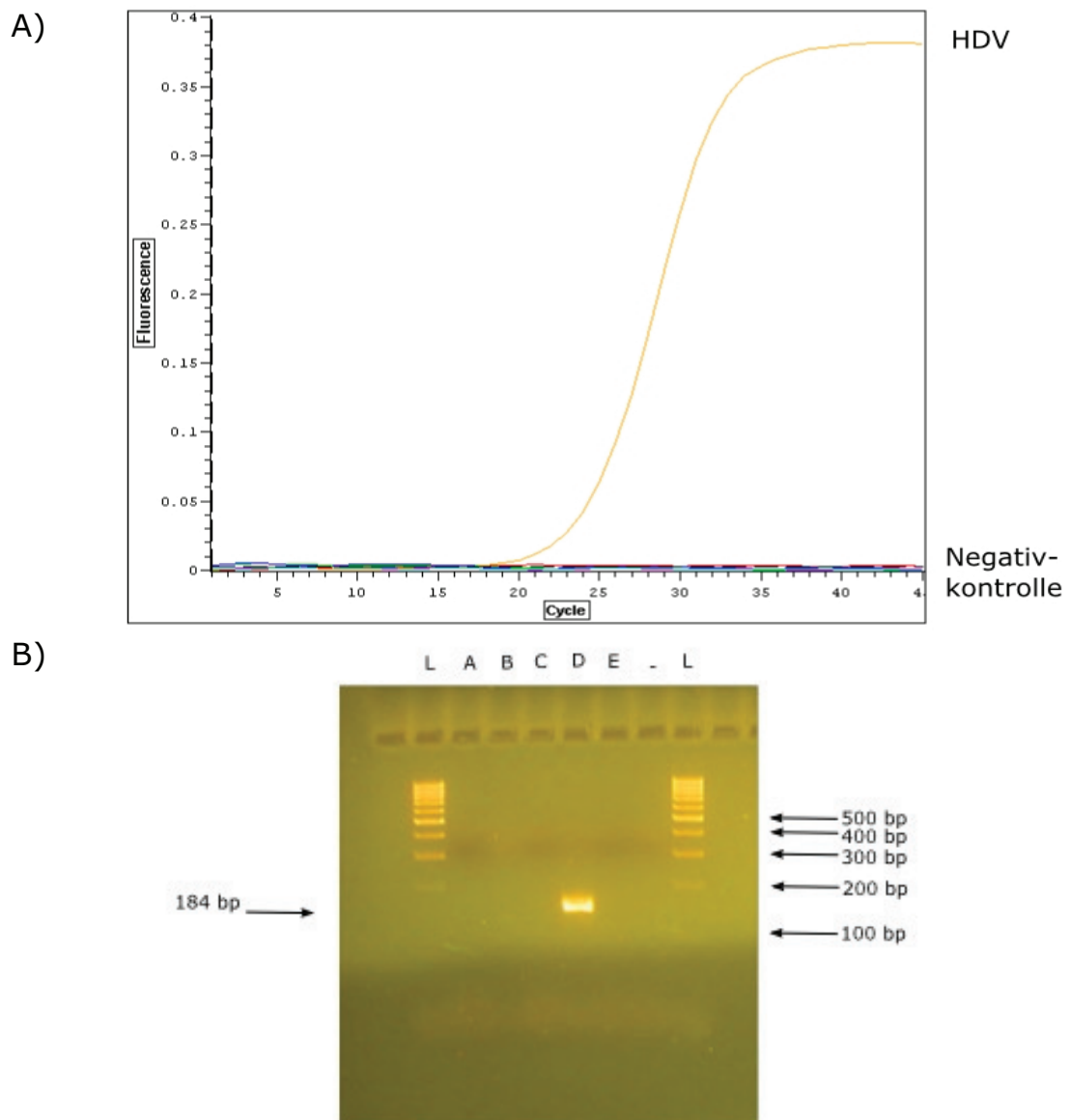


Abb. 3.3.4 A: Spezifischer HDV Nachweis, B: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HRO-HDV2s-719-73 und HRO-HDVas-871-855as, spezifisch für HDV-RNA.

In den Spuren wurde die PCR mit dem Primerpaar HRO-HDV2s-719-73 und HRO-HDVas-871-855as durchgeführt und mit HAV, HBV, HCV, HDV und HEV getestet. Die spezifische Bande liegt bei 184 bp. Spur A: HAV; Spur B: HBV; Spur C: HCV; Spur D: HDV; Spur E: HEV; Spur -: Negativkontrolle; Spur L: Längenstandard;

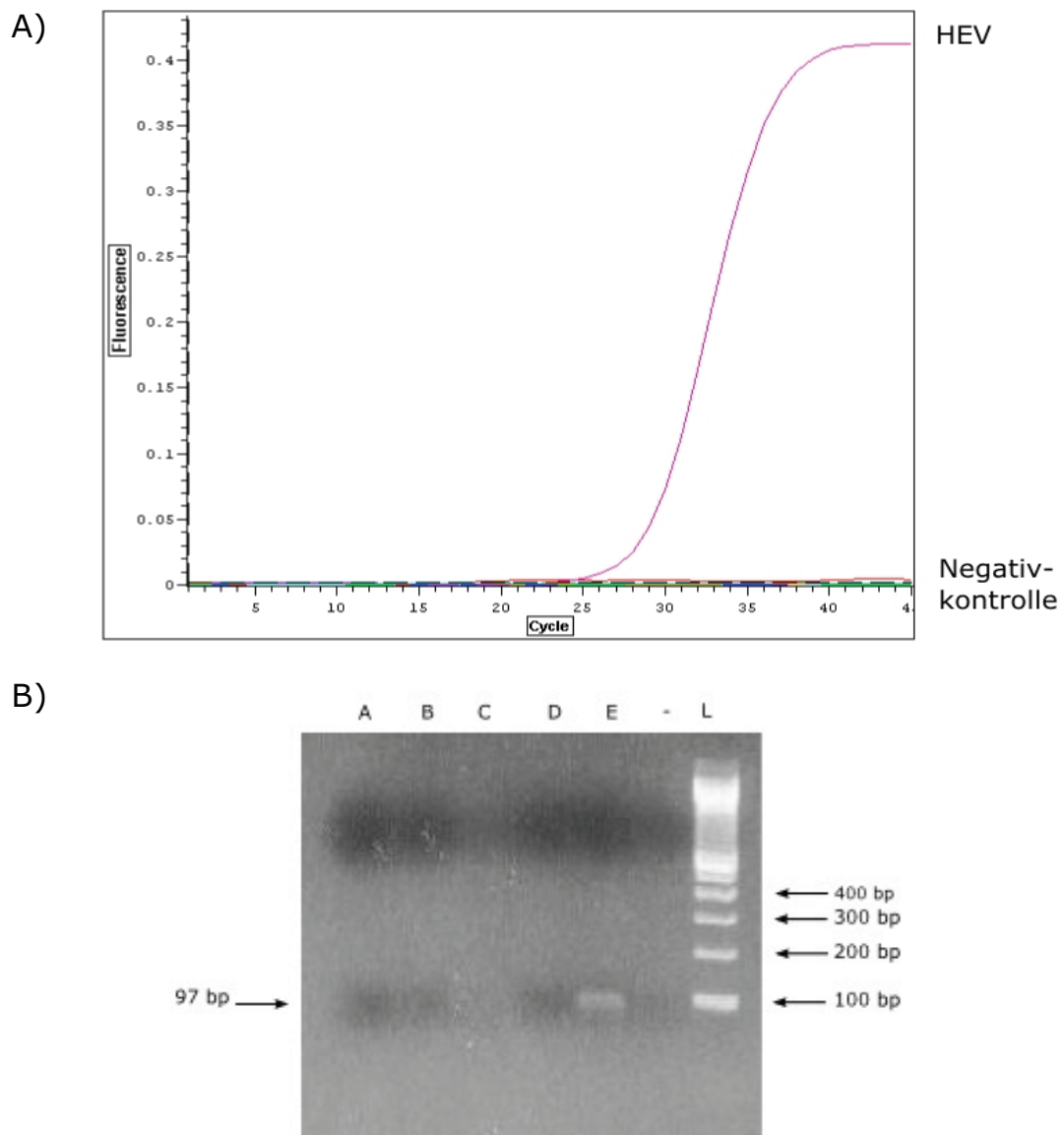


Abb. 3.3.5 A.: Quantitativer HEV-Nachweis, B: Spezifität der Amplifikation mit dem Primerpaar HEV3-s und HEV3-as, spezifisch für HEV-RNA.

In den Spuren wurde die PCR mit dem Primerpaar HEV3-s und HEV3-as durchgeführt und mit HAV, HBV, HCV, HDV und HEV getestet. Die spezifische Bande liegt bei 97 bp. Spur A: HAV; Spur B: HBV; Spur C: HCV; Spur D: HDV; Spur E: HEV; Spur -: Negativkontrolle; Spur L: Längenstandard;

3.4 Entwicklung des Multiplex-Protokolls

3.4.1 Initialer Ansatz des Multiplex-Protokolls

Die im vorherigen Abschnitt gezeigten Ergebnisse belegen, dass die von uns gewählten Primer spezifisch sind und auch bei der verwendeten sehr hohen Konzentration am Template keine unspezifischen Amplifikationen zeigten. Aus diesem Grund entschlossen wir uns zum Multiplex-Versuchsaufbau. Der allererste Versuchsaufbau wurde noch vor Abschluß der vorherigen Versuchsreihe durchgeführt, weswegen dabei noch HDV-Primer der Anfangsphase verwendet wurden.

In sechs Versuchsröhrchen wurden alle 5 Primer-Paare zugegeben, dazu in jeweils eins HAV, HBV, HCV, HDV und HEV-Template. Die zu diesem Zeitpunkt benutzen Primer:

Tabelle 4: Verwendete Primer, Anfangssequenz, GC-Anteil, Schmelztemperatur der Primer und Länge des Amplifikats im ersten Multiplex-PCR-Ansatz

Primer	Sequenz	GC-Anteil	Tm in °C	Basenpaare	Länge
HAVs (71-87)	CCG CCG	0,71	60,0	17	249
HAVas (320-291)	CCC AAT	0,45	58,4	22	
HBVS3s	TGC TCT	0,41	58,0	23	336
HBVS3as	CCC CAA	0,40	58,7	24	
Ger-HCV-NCR-s	TGC GGA	0,58	58,8	19	217
Ger-HCV-NCR-as	CCT AAG	0,40	59,7	25	
HRO-HDV (689-702)	GGC CGG	0,80	58,8	15	216
HRO-HDV (904-889)	TCC GGG	0,69	56,9	16	
HEV3-s	GGC GGT	0,71	60,0	17	97
HEV3-as	GCG AAG	0,61	58,2	18	

Ansatz: 10µl Primer
Template (Konzentration 1ng)
25µl RT-PCR-Mix
H₂O auf 50µl

Das PCR-Protokoll wurde folgendermaßen aufgebaut:

1. 30 Min 53 °C
2. 15 Min 95 °C
3. 15 s 94 °C
4. 30 s 53 °C
5. 30 s 72 °C
6. Kühlen bei 4 °C

Die Abbildungen 3.4.1 bis 3.4.4 geben die Ergebnisse der Multiplex-Versuche wieder.

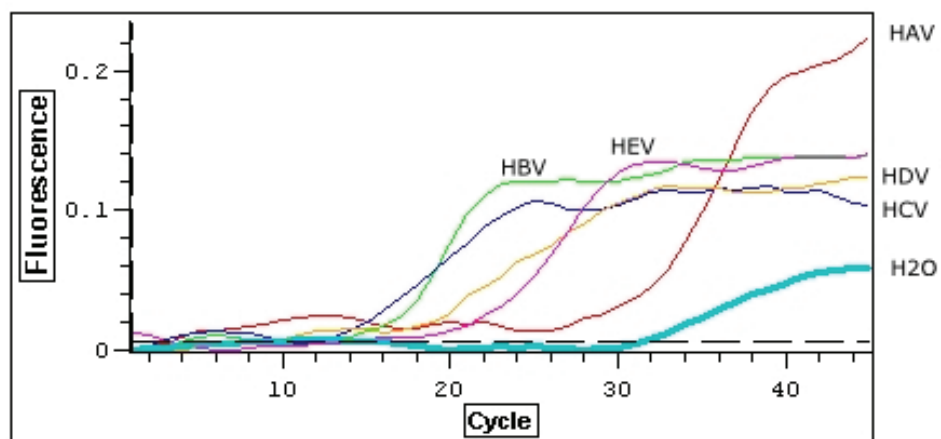


Abb. 3.4.1: Quantitative Multiplex-PCR

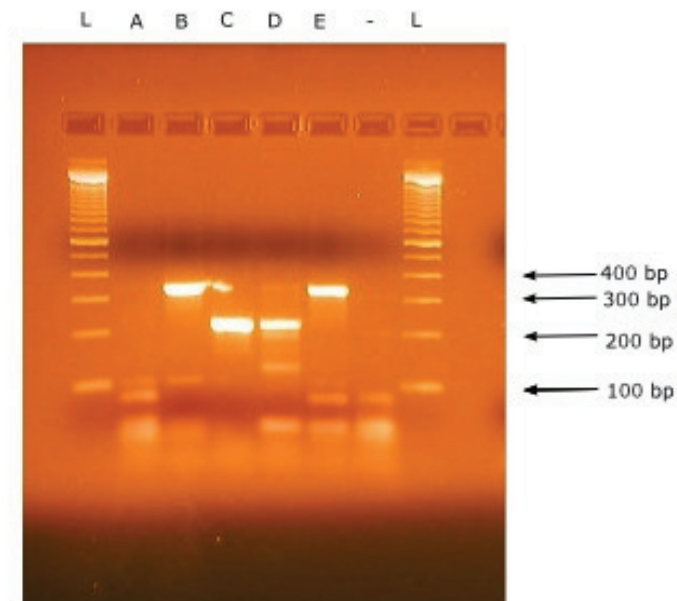


Abb. 3.4.2. Multiplex-PCR.

In den Spuren A- E wurde eine Multiplex-PCR mit 5 Primerpaaren durchgeführt.

In Spur A, B, C, D, E wurde jeweils 10 ng/μl HAV, bzw. HBV, HCV usw. zugegeben. - = Negativprobe; L = Längenstandard; Zusätzlich leichte Kontaminationen in allen Spuren;

Das Ergebnis der ersten Multiplex-PCR war einerseits vielversprechend, andererseits verbesserungsbedürftig. Spur A zeigte keinen HAV-Nachweis, die HAV-Bande wäre auf Höhe 249 zu erwarten gewesen; Spur B zeigte eine angefärbte Bande bei 336 bp, also HBV-Nachweis; Spur C zeigte eine angefärbte Bande bei 217 bp, HCV-Nachweis; Spur D zeigte eine Bande bei 216 bp, HDV-Nachweis; Spur E eine schwache bei 97 bp, HEV-Nachweis, zusätzlich eine deutliche HBV-Bande;

3.4.2 Modifizierung der Primer für eine optimierte Multiplex-PCR

Ein Ziel nach diesem Versuch war eine erneute Verkürzung der HDV-Primer um einen deutlichen Amplifikatslängenunterschied zwischen HCV und HDV zu erreichen. Dies gelang, in dem zuerst der as-Primer von HDV überarbeitet wurde, und später der s-Primer. Leider tauchte noch während der weiteren Optimierung der HDV-Primer ein weiteres Problem auf. Sowohl alte, als auch neue HDV-Primer produzierten im Gel Doppelbanden bei 200 und ca. 130 bp. Daher beschlossen wir die HDV-Primer noch einmal zu verkürzen und verschiedene Kombinationen auszuprobieren. Schließlich gelang es die optimale Kombination zu finden.

Die neuen HDV-Primer lauteten:

HRO-HDV2s-719-73 und HRO-HDVas-871-855as

Amplifikatlänge: 184 bp.

Nach Optimierung der Primer (siehe Tabelle) gelang der Multiplex-Ansatz mit folgendem Protokoll:

Tabelle 5: Optimierte Primer, Anfangssequenz, GC-Anteil, Schmelztemperatur der Primer und Länge des Amplifikats im zweiten Multiplex-PCR-Ansatz

Primer	Sequenz	GC-Anteil	Tm in °C	Amplifikatlänge
HAVs71-87	CCG CCG	0,71	60,0	249
HAVas320-291	CCC AAT	0,45	58,4	
HBVS3s	TGC TCT	0,41	58,0	336
HBVS3as	CCC CAA	0,40	58,7	
Ger-HCV-NCR-s	TGC GGA	0,58	58,8	217
Ger-HCV-NCR-as	CCT AAG	0,40	59,7	
HRO-HDV2s-719-73	CCG GCY	0,68	58,8	184
HRO-HDVas-871-855as	GTC CGA	0,72	60,0	
HEV3-s	GGC GGT	0,71	60,0	97
HEV3-as	GCG AAG	0,61	58,2	

Ansatz: 10µl Primer
Template (Konzentration 1ng)
25µl RT-PCR-Mix
H₂O auf 50µl

Das PCR-Protokoll wurde folgendermaßen aufgebaut:

1. 30 Min 53 °C
2. 15 Min 95 °C
3. 15 s 94 °C
4. 30 s 53 °C
5. 30 s 72 °C
6. Kühlen bei 4 °C

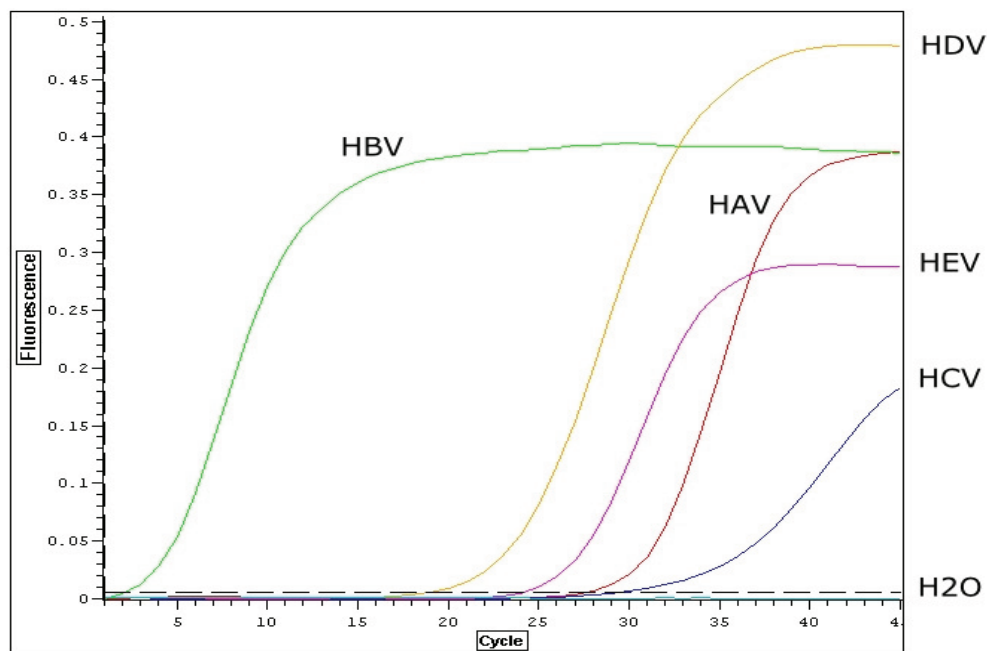


Abb. 3.4.3: Quantitative Multiplex-PCR mit optimiertem Protokoll

Ergebnis: Es zeigten sich Banden im Gel auf genau den Höhen, die erwartet wurden. Die Multiplex-PCR zeigte, dass je aufgetragenem Reaktionsansatz nur eine Bande im Gel auftrat. Die

Wanderungsgeschwindigkeit, die anhand des Standards die abgeschätzte Größe dieses Amplifikats ergab, dass sie der Größe der erwarteten spezifischen Produkte entsprachen.

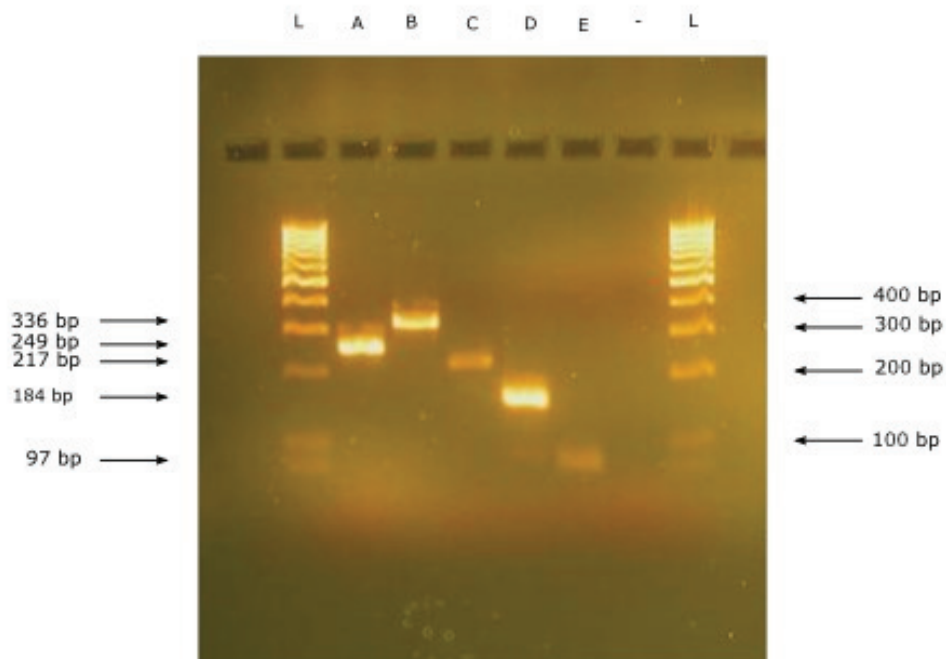


Abb. 3.4.4: Multiplex-PCR.

In den Spuren A- E wurde eine Multiplex-PCR mit 5 Primerpaaren (Tabelle 5) durchgeführt. Spur A: HAV-Nachweis; Spur B: HBV-Nachweis; Spur C: HCV-Nachweis; Spur D: HDV-Nachweis; Spur E: HEV-Nachweis; - = Negativprobe; L = Längenstandard;

Obwohl dieses Multiplex-Protokoll das gewünschte Ergebnis brachte, wurden die HDV-Primer im späteren Verlauf noch einmal ausgetauscht, da sie im Anwendungsversuch der Methode mit normalen Seren scheiterten. Die endgültig angewendeten HDV-Primer lauteten:

HDV3-s und HDV3-as; Amplifikatlänge: 178 bp.

Tabelle 6: Erneut optimierte Primer, Anfangssequenz, GC-Anteil, Schmelztemperatur der Primer und Länge des Amplifikats im endgültigen Moltiplex-PCR-Ansatz

Primer	Sequenz	GC-Anteil	Tm in °C	Amplifikatlänge
HAVs71-87	CCG CCG	0,71	60,0	249
HAVas320-291	CCC AAT	0,45	58,4	
HBVS3s	TGC TCT	0,41	58,0	336
HBVS3as	CCC CAA	0,40	58,7	
Ger-HCV-NCR-s	TGC GGA	0,58	58,8	217
Ger-HCV-NCR-as	CCT AAG	0,40	59,7	
HDV3s	CTC CAG	0,61	58,2	178
HDV3as	CCC GGG	0,61	58,2	
HEV3-s	GGC GGT	0,71	60,0	97
HEV3-as	GCG AAG	0,61	58,2	

Ansatz: 10µl Primer
Template (Konzentration 1ng)
25µl RT-PCR-Mix
H₂O auf 50µl

Das PCR-Protokoll wurde folgendermaßen aufgebaut:

1. 30 Min 53 °C
2. 15 Min 95 °C
3. 15 s 94 °C
4. 30 s 53 °C
5. 30 s 72 °C
6. Kühlen bei 4 °C

Ergebnis:

Auch dieser Multiplex-Ansatz gelang.

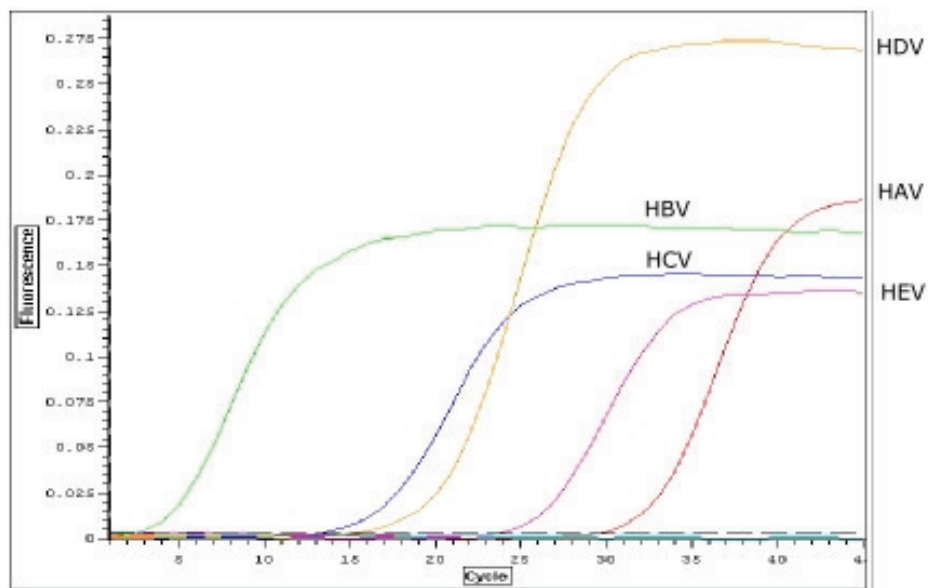


Abb. 3.4.5: Quantitative Multiplex-PCR mit endgültigem Protokoll

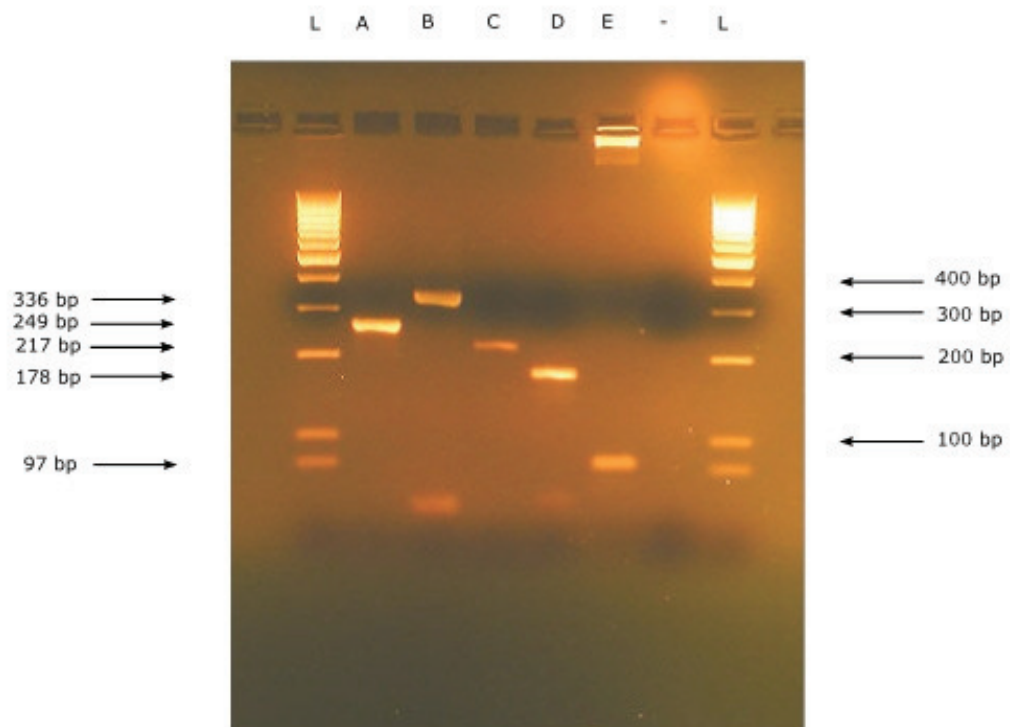


Abb. 3.4.6: Multiplex-PCR. In den Spuren A- E wurde eine Multiplex-PCR mit 5 Primerpaaren (Tabelle 6) durchgeführt. Spur A: HAV-Nachweis; Spur B: HBV-Nachweis; Spur C: HCV-Nachweis; Spur D: HDV-Nachweis; Spur E: HEV-Nachweis; - = Negativprobe; L = Längenstandard;

3.5 Quantifizierung

Um die Empfindlichkeit der Multiplex-PCR festzustellen, wurde anhand von positiven Seren bekannter Konzentration die virenspezifischen PCR-Produkte quantitativ ermittelt. Anschließend wurde in Verdünnungsreihen die Sensitivität der getesteten Primerpaare bestimmt.

Im DNA-Thermo-Cycler wurden die folgenden Primerpaare benutzt: HAVs 71-87, HAVas320-291, HBVS3s, HBVS3as, Ger-HCV-NCR-s,

Ger-HCV-NCR-as, HRO-HDV2s-719-73, HRO-HDVas-871-855as, HEV3-s und HEV3-as. Als Positivkontrolle dienten bei HBV und HCV je ein Referenzserum mit bekannter Konzentration, für HBV mit $1,0 \times 10^9$ GE/ml, für HCV (W627) mit 5.480.000 GE/ml. Für HAV, HDV und HEV wurden Plasmide mit einer bekannten Konzentration von 100 pg/ml, was 10^9 GE/ml entspricht, verwendet.

Diese Proben wurden in den Verdünnungstufen 10^{-1} bis inklusive 10^{-9} eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde immer steriles Wasser mitgeführt.

Die Protokolle des DNA-Thermo-Cyclers sind in Abbildung 3.5.1 bis 3.5.5 dargestellt. Der zeitliche Verlauf der PCR und der Anstieg der Fluoreszenz sind erkennbar, bei HCV ist sogar der verspätete Anstieg nach jeder weiteren Verdünnung deutlich erkennbar. Die Ergebnisse der Hot Start-PCR nach Auswertung des Agarosegels sind in den Abbildungen 3.5.6 bis 3.5.9 dargestellt.

HAV					
Verdünnung	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5
C(t)	8,4	14,3	14,2	24,4	16,8
					
Verdünnung	10^4	10^3	10^2	10	H2O
C(t)	4,3	17,3	18,0	16,2	17,3

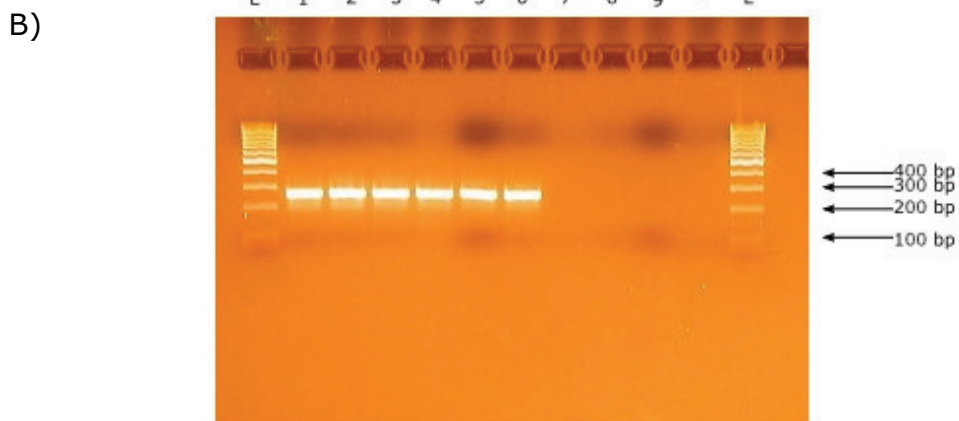
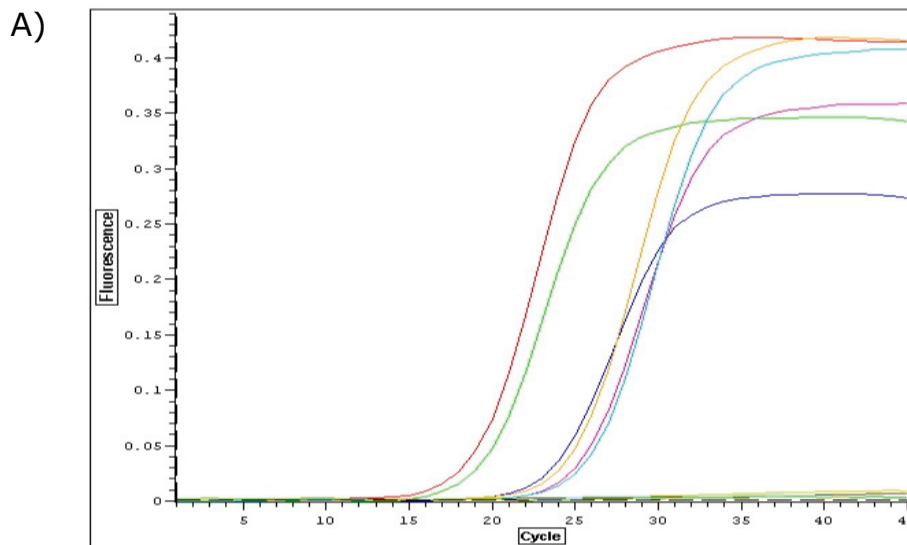
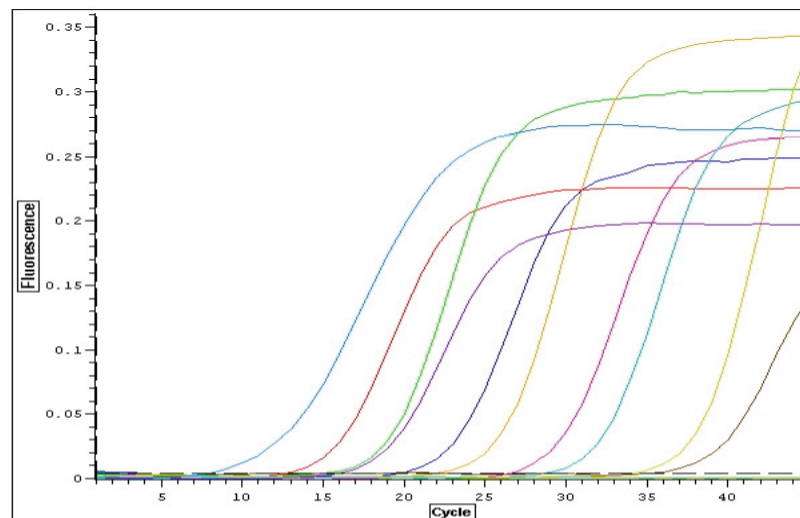


Abb. 3.5.1 A: DNA-Thermo-Cycler-Protokoll mit HAV-Nachweis in verschiedenen Verdünnungen, B: Nachweis der Sensitivitätsgrenze der PCR für HAV

Dargestellt sind die HAV-Banden in der Höhe von 249 bp. Ein positives Signal zeigt sich bis inklusive Spur 6 (10^6 -fache Verdünnung). Die Empfindlichkeit kann bis zur Konzentration von 10^4 Kopien/ml nachgewiesen werden. - = Negativkontrolle; L= Längenstandard; 1-9 enthalten 10 bis 10^9 -fache Verdünnungen des Referenzserums;

HBV						
Verdünnung	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
C(t)	12,6	15,1	19,7	21,9	26,4	28,6
						
Verdünnung	10^3	10^2	10		H2O	H2O
C(t)	34,1	34,8	15,9		N/A	N/A

A)



B)

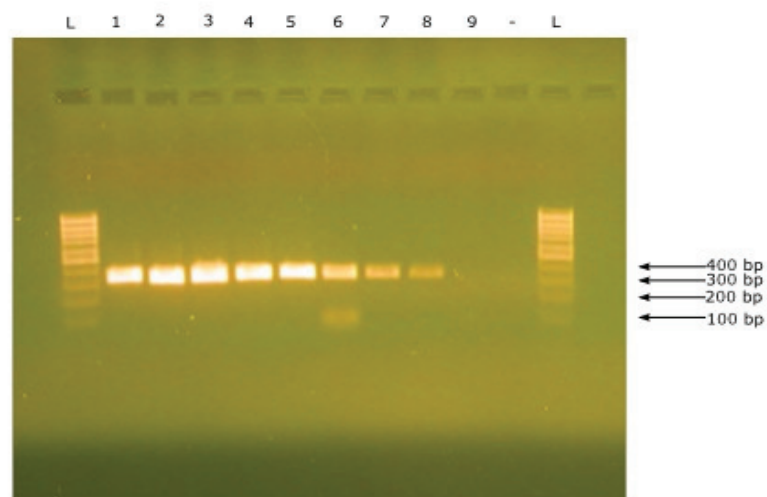
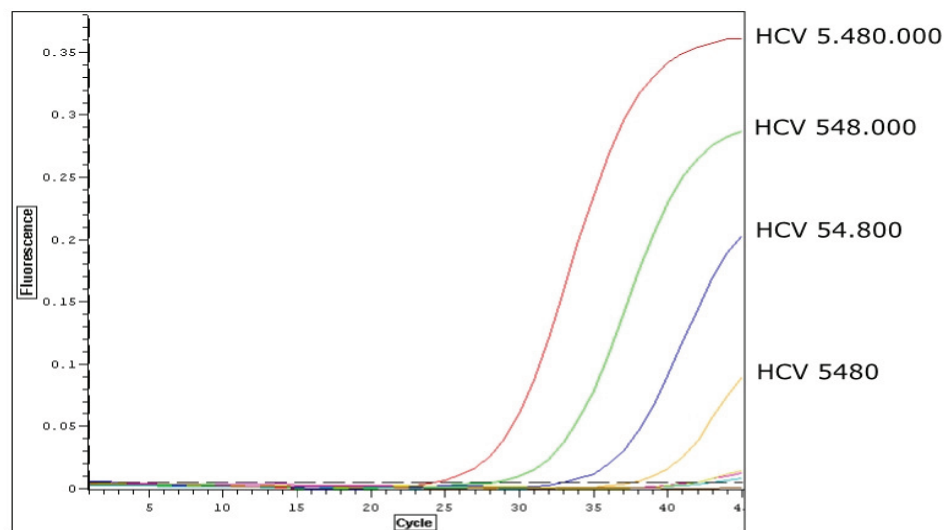


Abb. 3.5.2 A: DNA-Thermo-Cycler-Protokoll mit HBV-Nachweis und Verdünnungen, B: Nachweis der Sensitivitätsgrenze der PCR für HBV

Dargestellt sind die HBV-Banden in der Höhe von 336 bp. Ein positives Signal zeigt sich bis inklusive Spur 8 (10^8 -fache Verdünnung). Die Empfindlichkeit kann bis zur Konzentration von 100 Kopien/ml nachgewiesen werden. - = Negativkontrolle; L= Längenstandard; 1-9 enthalten 10 bis 10^9 -fache Verdünnungen des Referenzserums;

HCV						
Verdünnung	5.480.000	548.000	54.800	5480	548	54,8
C(t)	24,6	28,5	33,1	37,8	42,0	43,1
						
Verdünnung	5,48	H2O				
C(t)	42,0	N/A				

A)



B)

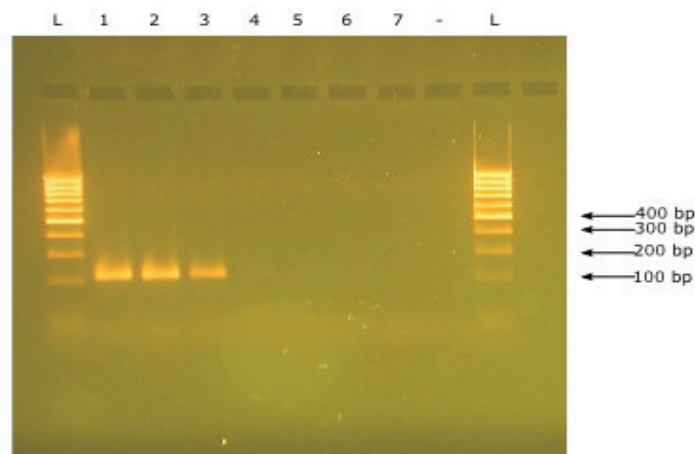
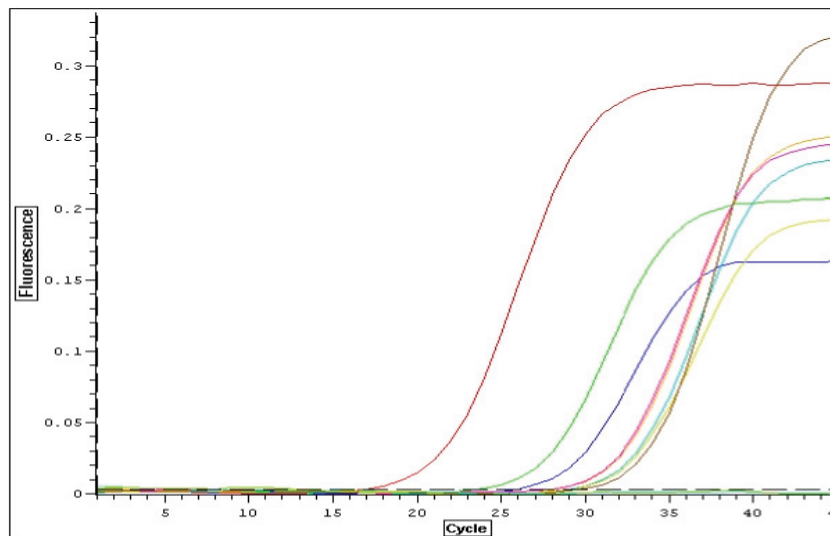


Abb. 3.5.3 A: DNA-Thermo-Cycler-Protokoll für HCV-Nachweis und Verdünnungen, B: Nachweis der Sensitivitätsgrenze der PCR für HCV

Dargestellt sind die HCV-Banden in der Höhe von 217 bp. Ein positives Signal zeigt sich bis inklusive Spur 3 (10^3 -fache Verdünnung). Die Empfindlichkeit kann bis zur Konzentration von 50.000 Kopien/ml nachgewiesen werden. - = Negativkontrolle; L= Längenstandard; 1-7 enthalten 10 bis 10^7 -fache Verdünnungen des Referenzserums;

HDV						
Verdünnung	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
C(t)	16,9	23,6	25,9	28,2	28,0	29,0
						
Verdünnung	10^3	10^2	10			H2O
C(t)	29,2	29,8	12,7			N/A

A)



B)

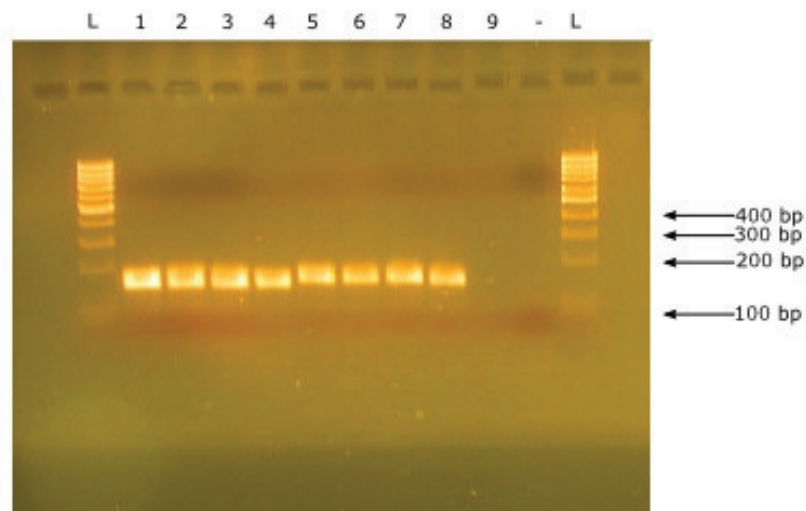


Abb. 3.5.4 A: DNA-Thermo-Cycler-Protokoll für HDV-Nachweis und Verdünnungen, B: Nachweis der Sensitivitätsgrenze der PCR für HDV Dargestellt sind die HDV-Banden in der Höhe von 184 bp. Ein positives Signal zeigt sich bis inklusive Spur 8 (10^8 -fache Verdünnung). Die Empfindlichkeit kann bis zur Konzentration von 10^2 Kopien/ml nachgewiesen werden. - = Negativkontrolle; L= Längenstandard; 1-9 enthalten 10 bis 10^9 -fache Verdünnungen des Referenzserums;

HEV						
Verdünnung	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
C(t)	25,3	28,4	30,1	34,9	33,4	42,7
						
Verdünnung	10^3	10^2			10	H2O
C(t)	35,1	31,1			N/A	N/A

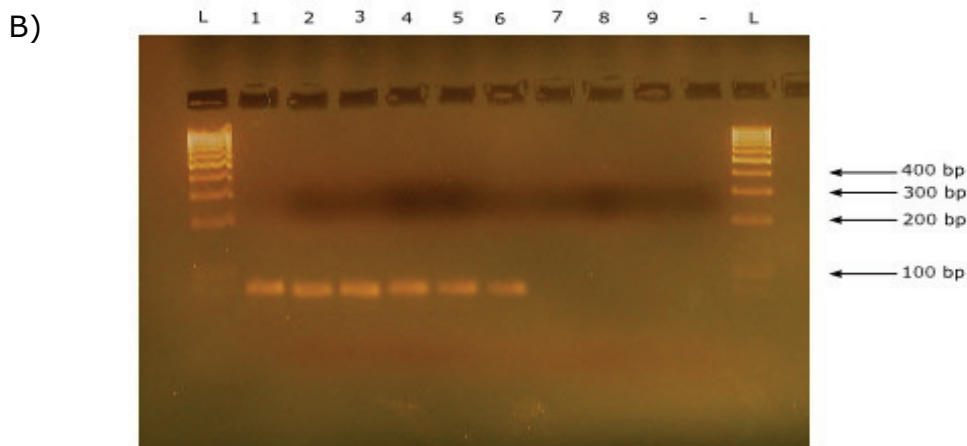
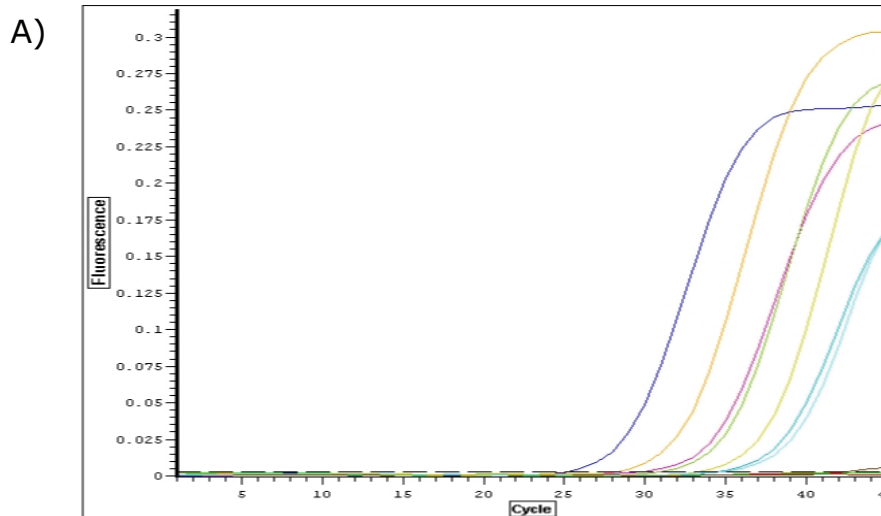


Abb. 3.5.5 A: DNA-Thermo-Cycler-Protokoll für HEV-Nachweis und Verdünnungen, B: Nachweis der Sensitivitätsgrenze der PCR für HEV

Dargestellt sind die HEV-Banden in der Höhe von 97 bp. Ein positives Signal zeigt sich bis inklusive Spur 6 (10^6 -fache Verdünnung). Die Empfindlichkeit kann bis zur Konzentration von 10^4 Kopien/ml nachgewiesen werden. - = Negativkontrolle; L= Längenstandard; 1-9 enthalten 10 bis 10^9 -fache Verdünnungen des Referenzserums;

Da das Referenzserum von HCV von Beginn an eine geringere Konzentration von Genomäquivalenten pro ml enthielt, als das HBV-Serum und die Plasmide, lassen sich die Ergebnisse nicht unmittelbar vergleichen. Das HCV-Serum enthielt nur ca. $1,0 \times 10^5$ bis $1,0 \times 10^6$ GE/ml, während das HBV-Serum $1,0 \times 10^9$ GE/ml enthielt. Dies bedeutet, dass die Spuren 1,2 und eventuell 3 in den Abbildungen 3.5.5, 3.5.6, 3.5.8 und 3.5.9 für einen unmittelbaren Vergleich wegfallen müssten. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Empfindlichkeit der HAV-Primer bei etwa 10^4 GE/ml, die der HBV-Primer bei etwa 10^2 GE/ml, die der HCV-Primer bei etwa 10^5 , eventuell 10^4 GE/ml, die der HDV-Primer bei etwa 10^2 GE/ml und die der HEV-Primer bei etwa 10^4 GE/ml lagen. Zusätzlich ist interessant, dass die quantitative Bestimmung der HCV-Primer noch einen eindeutigen Anstieg bei 5000 Kopien/ml bei HCV zeigt, was ein zusätzliches Indiz für die etwas bessere Empfindlichkeit von 10^4 GE/ml ist.

Beim Vergleich der Empfindlichkeiten der quantitativen PCR mit den Ergebnissen im Gel, zeigt sich Folgendes:

Tabelle 7: Vergleich der Sensitivität Gel vs. Thermo-Cycler

Template	OM-Empfindlichkeit	Gel-Empfindlichkeit
HAV	Ab 10^3 Kopien kein Nachweis (Graph) mehr vorhanden	Ab 10^3 Kopien/ ml kein Nachweis (Bande) mehr vorhanden
HBV	Quantitativer Nachweis (Graph) durchweg vorhanden, außer in Negativ-Probe	Ab 10 Kopien kein Nachweis (Bande) mehr vorhanden
HCV	Quantitativer Nachweis (Graph) sogar in regelmäßigen Abstufungen durchweg vorhanden, außer in Negativ-Probe	Ab 5000 Kopien/ ml kein Nachweis mehr vorhanden
HDV	Quantitativer Nachweis (Graph) durchweg vorhanden, außer in Negativ-Proben	Ab 10 Kopien kein Nachweis (Bande) mehr vorhanden
HEV	Quantitativer Nachweis (Graph) durchweg vorhanden außer in Negativ-Proben	Ab 10^3 Kopien kein Nachweis (Bande) mehr vorhanden

3.6 Anwendbarkeit der Methode

Nach allen anderen Versuchen wollten wir die Anwendbarkeit der Multiplex-PCR und ihre Übertragung in den medizinischen Bereich

überprüfen. Hierzu wurden verschiedene Seren, die bekanntermaßen positiv auf einen der fünf Erreger waren, mit dem Multiplex-Protokoll getestet. Als Positivkontrolle dienten die bei den vorangehenden Versuchen genutzten Plasmide, bzw. das HCV-Serum Nr. 1. Als Negativ-Kontrolle wurde steriles Wasser mitgeführt. Bei dieser Versuchsreihe wurden die endgültigen, ebenfalls spezifisch getesteten HDV-Primer verwendet. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 3.6.1 bis 3.6.5.

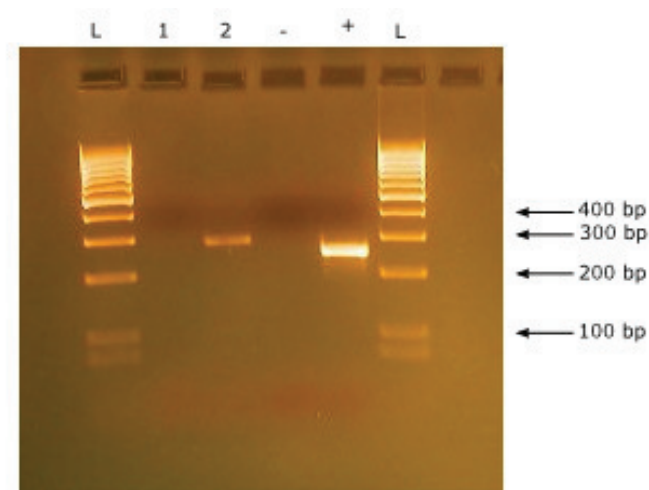


Abb. 3.6.1: Nachweis der Anwendbarkeit der Methode mit HAV-Seren

Dargestellt ist der positive Nachweis von einer HAV-Bande bei 249 bp in der Spur 2; Kein Nachweis in Spur 1; - = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle

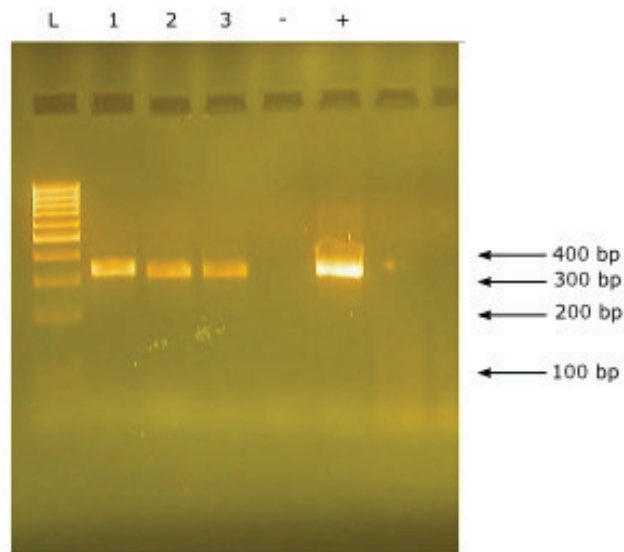


Abb. 3.6.2: Nachweis der Anwendbarkeit der Methode mit HBV-Seren

Dargestellt ist der positive Nachweis von HBV-Banden bei 336 bp in den Spuren 1-3; - = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle;

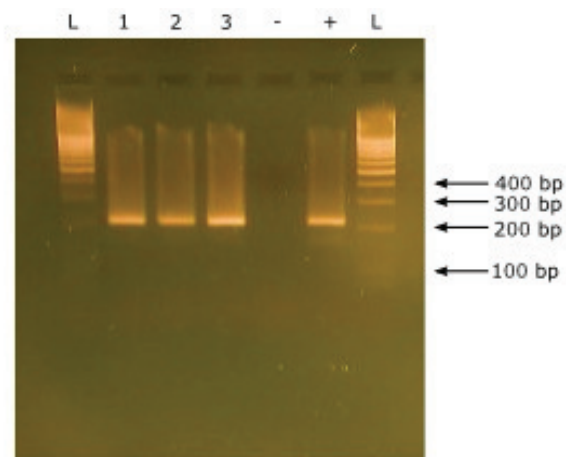


Abb. 3.6.3: Nachweis der Anwendbarkeit der Methode mit HCV-Seren

Dargestellt ist der positive Nachweis von HCV-Banden bei 217 bp in den Spuren 1-3; - = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle;

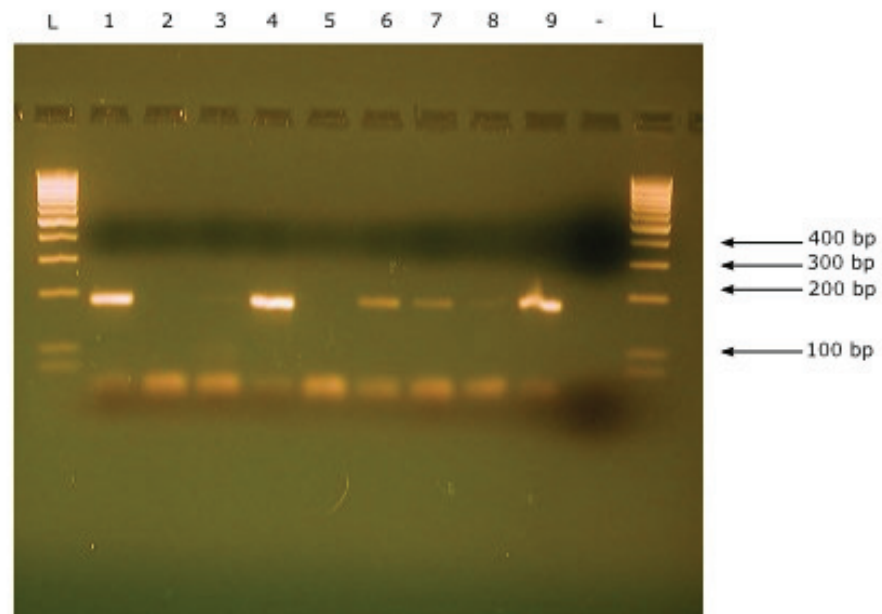


Abb. 3.6.4: Nachweis der Anwendbarkeit der Methode mit HDV-Seren

Dargestellt ist der positive Nachweis von HDV-Banden bei 178 bp in den Spuren 1,4,6,7,8 und 9; - = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle;

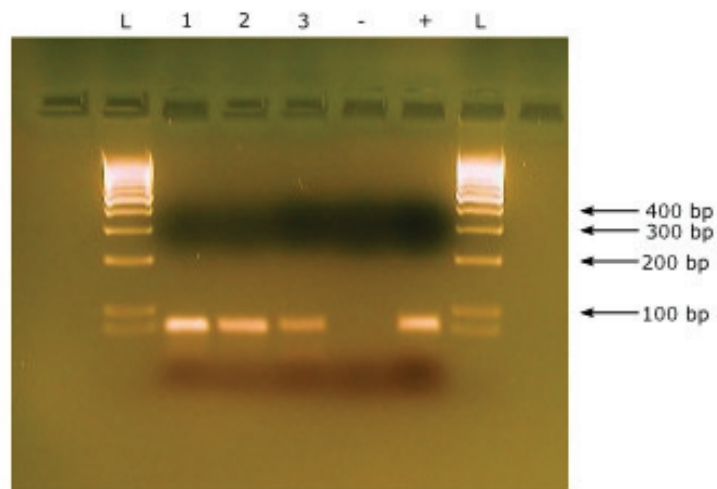


Abb. 3.6.5: Nachweis der Anwendbarkeit der Methode mit HEV-Seren

Dargestellt ist der positive Nachweis von HEV-Banden bei 97 bp in den Spuren 1-3; - = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle;

4 Diskussion

4.1 Amplifikation von 5 verschiedenen hepatotropen Viren in einem Multiplex-Protokoll

Die Diagnostik von Infektionskrankheiten ist durch die Entwicklung moderner molekularbiologischer Methoden wie der PCR in den letzten Jahren und Jahrzehnten, revolutioniert worden. Die PCR bietet grundsätzlich eine hohe Sensitivität bei der Erfassung jeder beliebigen Genomsequenz und ist zudem leicht anwendbar. Die Entwicklung der Real-Time-PCR hat darüber hinaus zu einer Steigerung der Sensitivität und zur Möglichkeit der Quantifizierung der zu untersuchenden Proben beigetragen.

Weitere Vorteile sind epidemiologische Studien, die anhand der PCR-Ergebnisse Rückschlüsse über die Verbreitung gewisser Viren- oder Bakterienstämme zulassen und die Möglichkeit das Outcome von Patienten nach Behandlung einer Infektionserkrankung zu beobachten (Ratcliff et al., 2007).

In der letzten Zeit hat sich gezeigt, dass vor allem die Schnelligkeit der Methode von Vorteil ist, z.B. bei der Diagnose von lebensbedrohlichen Krankheiten wie der Vogelgrippe (H5N1) oder einer Herpes simplex Enzephalitis (Whiley et al., 2004; Whiley & Sloots, 2005).

Die Verwendung von mehreren Primern in einem Multiplex-PCR-Protokoll hat weite Verbreitung gefunden, seit der ersten Beschreibung eines solchen Protokolls von Chamberlain et al. 1988

(Chamberlain et al., 1988). Bislang existierte jedoch kein Multiplex-PCR-Protokoll, das in einem Schritt die Differenzierung der fünf hepatotropen Viren ermöglicht.

In dieser Arbeit war das Hauptziel darauf ausgerichtet, eine Methode zu entwickeln, die in der Akutphase einer Hepatitis möglichst schnell und bequem einen sicheren Rückschluss auf den Erreger zulässt und eine Angabe über die Konzentration des Erregers machen kann.

Die neu entwickelte Multiplex-PCR ist in der Lage fünf hepatotrope Viren aus fünf verschiedenen Gattungen zeitgleich zu differenzieren. Die Methode liefert empfindliche und spezifische Ergebnisse.

4.1.1 Optimierung des Systems

Um eine optimal funktionierende Multiplex-PCR zu generieren, war es wichtig auf verschiedene Parameter zu achten. Zum Beispiel wurde die Temperatur in der Annealingphase variiert, um die optimale Arbeitstemperatur jedes Primerpaares herauszufinden. Die Temperatur in der Annealingphase darf weder zu hoch noch zu niedrig sein. Bei zu hohen Temperaturen können keine auswertbaren Banden entstehen, da die spezifische Interaktion zwischen Primer und Template gestört wird. Bei zu niedrigen Temperaturen ist ein unspezifisches Anlagern der Primer möglich, was zu niedriger Sensitivität und Spezifität führt (Henegariu et al., 1997).

Auch die Schmelztemperatur der Primer ist ein wichtiger Parameter. Je größer der C/G-Anteil im Primer im Verhältnis zum

A/T-Anteil, desto höher ist die Schmelztemperatur (T_m), die er benötigt. Ebenso spielt die Länge des Primers eine Rolle (Kirschberg et al., 2004).

Interessanterweise ist es nicht nötig in einer Multiplex-PCR Primerpaare zu verwenden, die nahezu gleiche Schmelztemperaturen (T_m) besitzen, da sie nicht zwingend gleich gut bei dieser Temperatur in der Annealing Phase arbeiten (Ratcliff et al., 2007).

Im Fall unseres Protokolls lag die Schwierigkeit darin, eine Annealingtemperatur zu finden, bei der alle fünf Primerpaare ein akzeptables Ergebnis liefern. Nach Auswertung einer Vielzahl von Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde mit 53°C die optimale Annealing-Temperatur ermittelt, die auch trotz einiger Verkürzung oder Verlängerung des einen oder anderen Primers Bestand hatte (Abb. 3.2.1-3.2.5).

4.1.2 Spezifität der Ergebnisse

Abschnitt 3.3 sollte zeigen, dass die Primer spezifisch nur ihr Target amplifizieren und nicht mit anderen Genomen im Multiplex-Ansatz reagieren. Alle diese Tests haben gezeigt, dass die endgültigen Primerpaare hochspezifisch sind und es zu keinen unspezifischen Reaktionen kam. Dies ist die Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit der Multiplex-PCR. Zu Beginn der Testreihen kam es noch zu falsch-positiven Ergebnissen, die jedoch auf Kontaminationen zurückgeführt werden konnten. Kontaminationen sind die häufigste Ursache für falsch-positive Ergebnisse. Diese lassen sich vermeiden, wenn verschiedene Regeln beachtet

werden, wie z.B. die strikte Rauntrennung der verschiedenen Arbeitsschritte, ein direkter Arbeitsgang ohne Unterbrechungen, oder die Verwendung von Einzel-Deckeln für die Probenbehältnisse. Diese sollten selbstverständlich nur geöffnet werden, wenn sie gerade gebraucht werden (Ratcliff et al., 2007). Die Beachtung dieser Regeln führte letztendlich zu unseren Ergebnissen.

4.1.3 Empfindlichkeit des Systems

Es konnten unterschiedliche Empfindlichkeiten für alle fünf Primerpaare eruiert werden. HAV wies eine Sensitivität von 10^4 , HBV eine von 10^2 , HCV eine von 10^4 bis 10^5 , HDV eine von 10^2 und HEV eine von 10^4 GE/ml auf. Diese Sensitivitäten reichen für eine Routine-Diagnostik insgesamt noch nicht aus.

Publizierte Nachweisgrenzen einer einfachen quantitativen PCR liegen teilweise deutlich unter der Sensitivität des Multiplex-Protokolls:

Für HAV z.B. liegt in publizierten quantitativen NAT-Verfahren die gefundene Viruslast bei 10^3 - 10^4 GE/ml Plasma, ermittelt in einem Zeitraum bis zu 70 Tagen nach Auftreten des Ikterus (Normann et al., 2004). Andere Publikationen gehen sogar von $2,0 \times 10^2$ Kopien aus (Costafreda et al., 2006).

Bei HBV gilt als unterer Grenzwert eine Viruslast von 10^3 GE/ml noch als infektiös (Gerlich, 2004; Gerlich & Schaefer, 2004).

Für HCV existiert ein internationaler HCV-RNA-Standard, jedoch haben verschiedene Evaluationen ergeben, dass noch immer bei mehr als 10% der vergleichend untersuchten Seren Diskrepanzen in der HCV-RNA-Konzentration von mehr als dem Dreifachen

auftreten. Die untere Nachweisgrenze befindet sich laut verschiedener Literatur zwischen 20 und 100 GE/ml, im Schnitt 50 GE/ml. Proben, bei denen HDV nicht nachweisbar ist, wird ein HDV-Gehalt von unter 100 GE/ml unterstellt. Die untere Nachweisgrenze wird also in diesem Bereich angenommen (Yamashiro et al., 2004; Le Gal et al., 2005).

Publikationen, in denen HEV per NAT-Verfahren nachgewiesen wird, gehen von einer unteren Nachweisgrenze von 10 GE/ml aus (Orru et al., 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit reichen nicht an die Schwellenwerte dieser Publikationen heran. Insbesondere bei HCV und HEV sind die Resultate noch ausbaufähig.

Jedoch war die primäre Zielsetzung dieser Arbeit nicht eine Multiplex-PCR zu generieren, die eine höhere Sensitivität als die Monoplex-PCR aufweist. Ziel war eine spezifische Multiplex-PCR, deren Empfindlichkeit ausreicht, um bei einem Patienten mit akuter Transaminasenerhöhung im Serum das auslösende Agens nachzuweisen.

Tabelle 8: Vergleich Sensitivität der Multiplex-PCR vs. Konzentration in der akuten Krankheitsphase

Template	Empfindlichkeit der Multiplex-PCR in GE/ml	Typische Konzentration in der akuten Phase in GE/ml
HAV	10^4	10^3 - 10^4
HBV	10^2	10^5 - 10^7
HCV	10^4 bis 10^5	10^3 - 10^7
HDV	10^2	10^4 - 10^6 *
HEV	10^4	10^1 - 10^4

*Daten nur für chronische Hepatitis D erhältlich.

Dieses Ziel wurde erreicht.

4.2 Vorteile des Multiplex- Protokolls

Die NAT-Verfahren haben wie bereits eingangs erwähnt in den letzten Jahren enorme Fortschritte erzielt und erlangen zunehmende Bedeutung in der Diagnostik in molekularbiologischen Labors. Alle Vorteile, die eine PCR bietet, konnten wir bei diesem Multiplex-Protokoll jedoch nicht nutzen. Dazu gehört die Tatsache, dass eine PCR bereits im Inkubationsstadium einer Erkrankung Auskunft über eine mögliche Ansteckung geben kann. Dies wäre z.B. in der Transfusionsmedizin nützlich, da so einige diagnostische Fenster, wie z.B. für HCV weiter schrumpfen würden. Hierfür ist der Multiplex-Ansatz jedoch noch nicht sensitiv genug. Für eine Anwendung in der Transfusionsmedizin wären Empfindlichkeiten

von 10^2 GE/ml minimal notwendig, da auch die bisher gängigen serologischen und NAT-Nachweise sich in dieser Größenordnung bewegen.

Hier läge Potential für kommende Arbeiten. Auch zur Quantifizierung der Viruslast eines Patienten ist dieses Protokoll unnötig. Hier reicht eine normale Monoplex-PCR, die möglichst sensitiv ist.

Ebenso genügt eine normale Monoplex-PCR oder ein serologischer Nachweis bei der Fragestellung ob es nach Exposition mit einem bekannten Erreger zu einer Infektion gekommen ist.

Nichtsdestotrotz bietet die Multiplex-PCR gegenüber der Routine-Diagnostik den entscheidenden Vorteil, wesentlich schneller und weniger aufwändig in der Handhabung zu sein, als die Stufendiagnostik. Bei einem Patienten mit unklarer Transaminasenerhöhung und typischer Klinik kann eine Blutprobe mit dem Multiplex-Ansatz innerhalb von 2,5 h Aufklärung über den Erreger und eine ungefähre Konzentrationsangabe bringen, während die Stufendiagnostik mehrere und dadurch zeitintensivere Tests benötigt. Dies kann z.B. bei einer HEV-Infektion nützlich sein, auf die in der Stufendiagnostik erst relativ spät getestet wird, da es sich um eine seltene Erkrankung in Deutschland handelt. Die Multiplex-PCR hätte das Ergebnis, noch bevor ein Verdacht in Richtung HEV gelenkt worden wäre, was unter Umständen Leben retten kann. Das gleiche gilt für eine simultane Superinfektion mit

HDV bei einem HBV-Patienten. Zusätzlich kann das Multiplex-Protokoll nach Ausreifung kostensparend sein, wenn nur noch ein Test-Kit, statt z.B. fünf verwendet werden müssen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Monoplex-PCR-Protokolle mit speziell ausgesuchten Primer-Paaren erfolgreich zu einem Multiplex-Protokoll zusammengefügt.

Mit Hilfe eines Computer-Programms wurden fünf Primerpaare, die eine größtmögliche Konservierung aufweisen sollten, entwickelt und mit verschiedenen Tests auf ihre ideale Arbeitstemperatur und Spezifität geprüft.

Unter den optimierten Bedingungen erwies sich das Multiplex-Protokoll als hochspezifisch. Die PCR war in der Lage sowohl verschiedene Plasmide, als auch einige ausgewählte Patientenseren zu amplifizieren. Die Empfindlichkeiten, die sich von 10^2 bis 10^5 GE/ml erstrecken, sind für die Zielstellung befriedigend.

Hiermit steht nun eine schnelle und einfache Methode für die Amplifizierung der fünf klassischen viralen Hepatitis-Erreger zur Verfügung.

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
as	antisense
ALAT	Alanin-Aminotransferase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Celsius
cDNA	complementäre DNA
CT-Wert	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
G	Guanin
GE/ml	Genom/Äquivalente pro ml
g	Gramm
h	Stunde(n)
HA-Ag	Hepatitis-A-Antigen
HAV	Hepatitis-A-Virus

HBc	Hepatitis-B-core
HBcAg	Hepatitis-B-core-Antigen
HBe	Hepatitis-B-e
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBs	Hepatitis-B-surface
HBsAg	Hepatitis-B-surface-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEV	Hepatitis-E-Virus
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IU	International Units
Kb	Kilobase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute(n)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
NAT	Nukleinsäure-Amplifikationstechnik
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
RKI	Robert-Koch-Institut

RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	hier: Reverse-Transkriptase-PCR
s	sense
s	Sekunde(n)
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur
TBE	Tris-Phosphat-EDTA
U	Units/Enzymeinheiten
U/l	Units/Liter
V	Volt

7 Literaturverzeichnis

- Adami, V., Falasca, E., Dorotea, L., Malangone, W., Astori, G., Marini, L., Biffoni, F., Rinaldi, C., Degrassi, A. & Pipan, C. (2004) Qualitative multiplex RT-PCR for simultaneous detection of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in plasma samples. *Clin Microbiol Infect*, **10**, 1075-1080.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. & Caskey, C. T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, **16**, 11141-11156.
- Chen, C. J., Yang, H. I. & Iloeje, U. H. (2009) Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology*, **49**, S72-84.
- Chung, J. Y., Han, T. H., Kim, S. W. & Hwang, E. S. (2008) Genotype variability of human metapneumovirus, South Korea. *J Med Virol*, **80**, 902-905.
- Costafreda, M. I., Bosch, A. & Pinto, R. M. (2006) Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 3846-3855.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. & Klapper, P. E. (2000) Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*, **13**, 559-570.
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A. & Gillison, M. L. (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, **100**, 261-269.

- Fleig, W. E. (2004) In *Innere Medizin* (eds W. E. Berdel, M. Böhm, M. Classen, V. Diehl, K. Kochsiek & W.-H. Schmiegel), pp. 1259- 1272. Urban und Fischer, München, Jena.
- Gerlich, W. H. (2004) Hepatitis B und C. Übertragungsgefahr auf Patienten durch infiziertes medizinisches Personal. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, **47**, 369- 378.
- Gerlich, W. H. & Schaefer, S. (2002) In *Lehrbuch der Klinischen Virologie* (eds W. H. Gerlich & W. Dörr), pp. 191- 210. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Gerlich, W. H. & Schaefer, S. (2004) In *Übertragungsrisiko von HBV, HCV und HIV durch infiziertes medizinisches Personal* (eds R. S. Roß & M. Roggendorf), pp. 11- 28. Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Wien, Zagreb.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, **23**, 504-511.
- Hsieh, T. H., Liu, C. J., Chen, D. S. & Chen, P. J. (2006) Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *J Formos Med Assoc*, **105**, 869-881.
- Jilg, W. (2002) In *Lehrbuch der Klinischen Virologie* (eds W. H. Gerlich & W. Dörr), pp. 278- 283. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J. M., Ouezzani, L., Peron, J. M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J. P., Izopet, J. & Rostaing, L. (2008) Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, **358**, 811-817.
- Kirschberg, O., Schüttler, C., Repp, R. & Schaefer, S. (2004) A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus-Genotypes A-F. *J Clin Virol*, **29**, 39-43.

- Le Gal, F., Gordien, E., Affolabi, D., Hanslik, T., Alloui, C., Deny, P. & Gault, E. (2005) Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. *J Clin Microbiol*, **43**, 2363-2369.
- Löffler, G. & Petrides, P. E. (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin.
- McMahon, B. J. (2005) Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis*, **25 Suppl 1**, 3-8.
- Mertens, T., Haller, O. & Klenk, H.-D. (2004) *Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten*, Urban & Fischer.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Normann, A., Jung, C., Vallbracht, A. & Flehmig, B. (2004) Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients. *J Med Virol*, **72**, 10-16.
- Orru, G., Masia, G., Orru, G., Romano, L., Piras, V. & Coppola, R. C. (2004) Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *J Virol Methods*, **118**, 77-82.
- Panda, S. K., Thakral, D. & Rehman, S. (2006) Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*.
- Rantala, M. & van de Laar, M. J. (2008) Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. *Euro Surveill*, **13**.
- Ratcliff, R. M., Chang, G., Kok, T. & Sloots, T. P. (2007) Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol*, **9**, 87-102.
- Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Fry, K. E. & Bradley, D. W. (1990) Isolation of a cDNA from the

virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, **247**, 1335-1339.

Robert-Koch-Institut (2006) Ratgeber Infektionskrankheiten pp. 88- 89.

Robert-Koch-Institut (2008) Epidemiologisches Bulletin - Hepatitis E - Epidemiologie und Risikofaktoren in Deutschland.

Robert-Koch-Institut (2009) Epidemiologisches Bulletin - Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland - Virushepatitis B, C und D im Jahr 2008.

Roggendorf, M. (2002) In *Lehrbuch der Klinischen Virologie* (eds W. H. Gerlich & W. Dörr), pp. 216- 225. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Salisse, J. & Sureau, C. (2009) A function essential to viral entry underlies the hepatitis B virus "a" determinant. *J Virol*.

Schaefer, S. (2007) Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*, **13**, 14-21.

Schaefer, S. & Gerlich, W. H. (2007) In *The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice* (eds J. Rodés, J. P. Benhamou, M. Rizzetto, J. Reichen & A. Blei), pp. 9.1.5- 9.1.30. Blackwell Publishing, Oxford.

Schaefer, S. e. a. (2006) *MiQ 25: Diagnostik von Infektionen der Leber* Urban & Fischer Verlag, München.

Su, C. W., Huang, Y. H., Huo, T. I., Shih, H. H., Sheen, I. J., Chen, S. W., Lee, P. C., Lee, S. D. & Wu, J. C. (2006) Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology*, **130**, 1625-1635.

Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E. & Reyes, G. R. (1991) Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, **185**, 120-131.

- Thomas, L. & Klein, G. (2006) Neue vorläufige Normalbereiche für neun Serumenzyme. *Deutsches Ärzteblatt*, **103**, C338- C339.
- Whiley, D. M., Mackay, I. M., Syrmis, M. W., Witt, M. J. & Sloots, T. P. (2004) Detection and differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 by a duplex LightCycler PCR that incorporates an internal control PCR reaction. *J Clin Virol*, **30**, 32-38.
- Whiley, D. M. & Sloots, T. P. (2005) A 5'-nuclease real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of a broad range of influenza A subtypes, including H5N1. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **53**, 335-337.
- Wilhelm, J. (2003) *Entwicklung real-time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik*. Gießen.
- Yamashiro, T., Nagayama, K., Enomoto, N., Watanabe, H., Miyagi, T., Nakasone, H., Sakugawa, H. & Watanabe, M. (2004) Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *J Infect Dis*, **189**, 1151-1157.

Thesen zur Dissertation

Nachweis der Hepatitis-Viren A-E durch eine Multiplex-PCR

- 1.** Die virale Hepatitis-Erkrankung verursacht ein Krankheitsbild, dass keinen Rückschluß auf den spezifischen viralen Erreger zulässt. Um den genauen Erreger der Hepatitis-Erkrankung zu identifizieren und ggfs. spezifische Therapie einzuleiten sind zeit- und kostenintensive serologische Nachweisverfahren zur Zeit Standard. Seltene Erreger werden u. U. erst sehr spät erkannt.
- 2.** In dieser Arbeit wurde ein Nukleinsäure-Nachweis-Verfahren entwickelt, welches die gängigsten viralen Erreger einer Hepatitis-Erkrankung in einem Arbeitsgang identifizieren kann.
- 3.** Gleichzeitig wurde untersucht, wie spezifisch und wie sensitiv diese Methode im Gegensatz zu den Standard-Verfahren ist.
- 4.** Das Multiplex-Protokoll war in der Lage sowohl verschiedene Plasmide, als auch ausgewählte Patientenserum hochspezifisch zu amplifizieren.
- 5.** Die Empfindlichkeiten lagen zwischen 10^2 und 10^5 Genkopien/ml.
- 6.** Die Standard-NAT-Verfahren zeigen im Schnitt eine höhere Sensitivität, als das Multiplex-Protokoll.
- 7.** Im Vergleich zu den Standard-Diagnostik-Verfahren stellt das Multiplex-Protokoll eine zeitsparendere und einfache Methode für einen spezifischen viralen Hepatitis-Nachweis dar.
- 8.** Die Sensitivität der Routine-Diagnostik liegt derzeit noch über der des Multiplex-Protokolls, anzustreben wäre in kommenden Arbeiten eine Annäherung an diese.
- 9.** Es steht damit eine schnelle und einfache, sowie hochspezifische NAT-Methode für einen simultanen fünffachen viralen Hepatitis-Nachweis zur Verfügung.

10. Die Vorteile des Multiplex-Protokolls liegen in einer schnelleren Identifizierung des Erregers bei unklarer Transaminasenerhöhung, in der Transfusionsmedizin, bei Superinfektionen, sowie bei Infektion mit eher seltenen viralen Erregern.

