

Abschlussbericht Teilprojekt 2.2

Projekttitlel: Qualitätskontrolle virologischer Untersuchungen

Projektleiter: Prof. Dr. med. Michael Roggendorf
Universitätsklinikum Essen
Institut für Virologie
Hufelandstr. 55
45122 Essen

Telefon: +49 (0) 201 / 723-3550

Fax: +49 (0) 201 / 723-5929

E-Mail: roggendorf@uni-due.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Hauptziel des Projektes war die Standardisierung der Verfahren zum diagnostischen Nachweis unterschiedlicher Marker der HCV-Infektion. Diese Aufgabenstellung umfasste auch die Beurteilung neuer, kommerziell erhältlicher Test-Kits sowie die Herstellung und Distribution entsprechender Arbeitsreagenzien als Sekundärstandards für die HCV-Diagnostik.

2. Voraussetzungen

Heute sind etliche hoch sensitive und spezifische Tests für den qualitativen und quantitativen HCV-RNA-Nachweis auf dem in vitro-Diagnostika-Markt erhältlich, die überwiegend die Erwartungen der Anwender erfüllen und analytisch zuverlässige Resultate erbringen. Eine wichtige Aufgabe des HepNet bestand darin, den bereits erreichten hohen diagnostischen Qualitätsstandard in den teilnehmenden Laboratorien und Instituten nicht nur aufrecht zu erhalten, sondern nach Möglichkeit noch zu verbessern. Dies sollte durch eine weitgehende Standardisierung der zur HCV-Diagnostik eingesetzten Verfahren und Methoden erreicht werden.

3. Zusammenarbeit mit anderen HepNet Stellen

Das Projekt stand allen Teilnehmern des HepNet offen. Die vorgehaltenen diagnostischen Reagenzien, wie das HCV-Genotypisierungs-Panel und diverse Plasmide, die Genomfragmente verschiedener HCV-Typen enthielten, wurden auf Wunsch zur Verfügung gestellt.

II. Eingehende Darstellung

In den vergangenen Jahren wurde im Nationalen Referenzzentrum für Hepatitis C, das seit Mitte der 1990er Jahre am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen angesiedelt ist, ein sog. HCV-Genotypisierungs-Panel aufgebaut. Die extensiv charakterisierten Proben dieser Sammlung enthalten Isolate aller wesentlichen HCV-Geno- und –Subtypen. Um die Nachfrage nach diesen Referenzstämmen aus dem HepNet zu decken, wurden im Jahr 2006 die Materialien des Panels ergänzt und neue Varianten des Genotypen 6 einbezogen (Tabelle 1).

Tab. II 1: Charakteristika der in den Proben des HCV-Genotypisierungs-Panels enthaltenen HCV-Varianten.

Probe	PCR Amplicor	Quantification		Inno-Lipa HCV 2	GEN- ETI-K DEIA	Genotyping		Seq uenc ing ³
		Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 (IU/ml))	VERSANT bDNA 3.0 (IU/ml)			PCR with type-specific primers Widell ¹ Ohno ²		
1a	positive	$6,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	1a/b	1°	1a	1a	1a
1b	positive	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	1b	1b	1b	n. t.	1b
2a	positive	$3,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	2a/c	2a	2a	2a	2a
2b	positive	$1,5 \times 10^5$	$7,7 \times 10^4$	2b	2b	2b	2b	2b
2c	positive	$3,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	2a/c	2c	n. t.	n. t.	2c
2i	positive	$1,2 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$	2a/c	2	n. t.	n. t.	2i
3a	positive	$3,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	3a	3a	3a	3a	3a
4	positive	$2,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	4c/d	4	n. t.	4	4
5a	positive	$1,1 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	5a	5	n. t.	5	5a

Widell et al.: J. Med. Virol. 44: 272 - 279 (1994),² Ohno et al.: J. Clin. Microbiol. 35: 201 - 207 (1997), n. t.: not typable,³ With primers from HCV core region (Viazov et al.: J. Med. Virol 53: 36 - 40 [1997]).

Laut der Rückmeldungen, die wir von am HepNet beteiligten Laboratorien erhielten, wurde dieses Panel nicht nur zur Standardisierung von HCV-Genotypisierungstechniken verwandt, sondern diente ebenfalls als plattformübergreifender Qualitätskontrollstandard für alle anderen Methoden zum HCV-RNA-Nachweis.

In Zusammenarbeit mit Prof Dr. H. Zeichhardt und Dr. H-P Grunert (Charité, CBF, Institut der Virologie, Berlin) sowie dem Nationalen Referenzzentrum für Hepatitis C wurde erstmals in Deutschland ein INSTAND Ringversuch zur HCV-Genotypisierung durchgeführt. Die umfassend charakterisierten Probenmaterialien wurden vom Institut für Virologie des Essener Universitätsklinikums zur Verfügung gestellt und nach Lyophilisation an die teilnehmenden 94 Laboratorien versandt. Die erhaltenen Ergebnisse belegten, dass ungeachtet der Vielfalt der eingesetzten Typisierungsverfahren in 92,6 – 98,9 % der Fälle eine korrekte Genotypzuordnung erhalten wurde, allerdings hinsichtlich der Subtypisierung der Isolate zum Teil nicht unerhebliche Defizite bestanden. Ende des Jahres 2007 fand ein zweiter derartiger Ringversuch statt, dessen Ergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorliegen. Eine entsprechende Publikation befindet sich in Vorbereitung.

Im vorangegangenen Berichtszeitraum wurde eine Reihe von Plasmiden hergestellt, die für die 5'-UTR und die Core-Region des HCV kodieren und von den wichtigsten HCV-Typen und Subtypen – darunter 1b, 1a, 2, 3, 4 und 6 – abstammen. Diese Plasmide wurden für die in vitro-Aufbereitung von RNA-Transkripten verwandt, die unter anderem notwendig sind für die Abschätzung der analytischen Sensitivität von ‚in-house‘-Tests und kommerziell erhältlichen Kits zum qualitativen und quantitativen HCV-RNA-Nachweis.

Gemeinsam mit den Nationalen Referenzzentrum für Hepatitis C wurden im Rahmen des HepNet-Projekts 2.2 auch verschiedene neuartige Genotypisierungsverfahren in den der Markteinführung vorangehenden sog. „beta-Trials“ ausführlich evaluiert.

Dem in vielen diagnostischen Laboratorien vorherrschenden Trend, zur Typisierung der HCV-Isolate 5'UTR-Amplikate zu verwenden, die bereits im Zuge der qualitativen HCV-RNA-Detektion generiert wurden, kommt eine Technik nach, die den Nachweis von HCV RNA mittels hoch sensitiver transkriptions-vermittelter Amplifikation mit dem wohl bekannten und erprobten „line probe“-Format zur Typisierung verbindet (TMA-LiPA). Mit diesem Verfahren wurden 100 HCV-Varianten charakterisiert und die Ergebnisse mit denjenigen verglichen, die mit der originalen Erstgenerations-Version des LiPA bzw. mittels eines DNA-Enzymimmuno-Assays (DEIA) ermittelt werden konnten. Diskrepante Genotyp- oder Subtyp-Zuordnungen wurden durch Sequenzierung eines HCV-Core- und NS5B-Fragments mit anschließender phylogenetischer Analyse aufgelöst. TMA-LiPA wies den Genotyp aller 100 HCV-Isolate korrekt nach. Hinsichtlich der Subtypisierung insbesondere von Varianten der Genotypen 1 und 2 erwies sich der Test jedoch mit einer Richtigkeit von 82 % bzw. 53 % im Vergleich zu den nicht-5'UTR-basierten Verfahren als wenig effektiv.

Eine zweite Evaluation widmete sich dem VERSANT HCV Genotyping Assay, Version 2. die neben der 5'UTR auch Sequenzinformationen aus der benachbarten Core-Region einbezieht und so nach Angaben des Herstellers zu einer besseren Unterscheidung von 1a- und 1b-Isolaten sowie zu einer verlässlichen Erkennung von Varianten führen soll, die dem in Europa noch raren Genotypen 6 zugehören. Die mit diesem Assay identifizierten HCV-Genotypen und -Subtypen stimmten in allen Fällen mit den Resultaten des DEIA und der phylogenetischen Analysen überein. Insbesondere wurden alle 64 HCV-Varianten, die zu den Subtypen 1a oder 1b gehörten, richtig klassifiziert und auch Isolate der Subtypen 6e und 6f wurden zutreffend erkannt. Mit der zweiten Generation des VERSANT HCV Genotyping Assays konnten also die Schwächen des rein 5'UTR-basierten Vorgänger-Tests weitgehend behoben werden, so dass die Technik ein auch zukünftig zuverlässiges Werkzeug für die HCV-Typisierung in klinischen Laboren darstellen dürfte.