

## Klinische Virologie

# PCR zur optimierten Diagnose viraler Infekte

HANS NITSCHKO

MAX VON PETTENKOFER-INSTITUT, LMU MÜNCHEN

Die Einführung von PCR-Verfahren zur Routinediagnostik viraler Erreger in der klinischen Virologie hat eine Vielfalt besonderer Herausforderungen mit sich gebracht, wie sie in dieser Art und Kombination in anderen Fächern vielleicht nicht auftreten. Unterschiedlichstes Probenmaterial, inhibitorische Substanzen, hohes Kontaminationsrisiko und begrenzte Probenmengen limitieren häufig eine solide Nukleinsäure-Analytik.

The introduction of PCR methods for routine diagnostic of viral pathogens in clinical virology has introduced new challenges, some of them unique and specific to the field. Different types of specimen, inhibitory substances, a high risk of contamination and small sample size often limit robust nucleic acid testing.

### Warum „wir brauchen nur noch schnell ein paar PCR-Versuche“ oft lange dauern kann

Die Internet-Suchmaschine liefert unter dem Stichwort „PCR“ knapp 30 Millionen Einträge. Auch Abbildungen zu diesem Begriff in zum Teil exquisiter, „selbsterklärender“ Form sind nicht selten, etwa 1,3 Millionen an der Zahl. In „PubMed“ finden sich knapp 18.000 Seiten mit Originalarbeiten zur PCR. Gibt es tatsächlich noch PCR-Probleme?

Das Problem sitzt mir häufig in Form von Personen gegenüber, die nur noch ganz schnell zum Abschluss und zur Abrundung

► **Abb. 1:** Primer Picornaviren – HIV. **A**, Überraschenderweise ist es relativ einfach ein einziges Primerpaar zu finden, das gleichzeitig Viren mit klinisch völlig unterschiedlicher Symptomatik, wie z. B. das Poliovirus und das Rhinovirus detektieren kann. Die Erreger sind sich genetisch relativ ähnlich<sup>[5]</sup>. **B**, Weitaus schwieriger als vielleicht angenommen ist es jedoch Primer zu „designen“, die zuverlässig alle bekannten HIV-Isolate vergleichbar effizient nachweisen können. Selbst jahrzehntelange, intensive Suche nach optimalen Primern für die PCR, hat bis heute kein Primerpaar identifiziert, das alle bekannten HIV-Isolate<sup>[6]</sup> mit vergleichbar hoher Effizienz detektiert. Grund ist die sehr hohe genetische Variabilität des HI-Virus.

eines Manuskripts, das Ende nächster Woche zur Publikation eingereicht werden soll, ein paar bestätigende PCR-Untersuchungen machen möchten. Erstaunlicherweise stürzen erste vorsichtige Nachfragen zum beabsichtigten Versuchsablauf viele der Experimentatoren in ein von mir unbeabsichtigtes Entsetzen, nachdenkliches Schweigen oder intensives Nachdenken.

Meine Fragen zu den geplanten Experimenten sind also offensichtlich echt fies, wie z. B.: Gibt es geeignete Positiv- und Negativkontrollen und welchen quantitativen Unterschied zwischen einem Zustand A (angeregt) und B (basal) soll denn die PCR-Analyse einer RNA oder DNA zuverlässig und reproduzierbar nachweisen können? An schlechten Tagen frage ich sogar nach der Art des Untersuchungsmaterials. Wenn Sie bis hierher gele-

#### A Geeignetes Primerpaar zur Amplifikation von Polioviren und Rhinoviren, in der „5'-nicht-translatierten Region“ der genannten Viren:

KKKKKKVKKVKKKKVVKVKKK ~~~~~ KVKKKKVVKVKKKKKKKV

Primer 1

Primer 2

**K:** in allen Polio- und Rhinovirus-Isolaten konservierte Nukleotidposition

**V:** variable Position bei einigen wenigen Poliovirus-Isolaten

**V:** variable Position bei einigen wenigen Rhinovirus-Isolaten

~~~~~: zu amplifizierende Region in der 5'-nicht-translatierten Region

(Mit diesen Primern ließen sich übrigens auch alle bekannten Coxsackie-A-Viren, Coxsackie-B-Viren und Echoviren nachweisen.)

#### B Primerpaar zur Amplifikation unterschiedlicher HIV-Isolate in der gag-Region des Virus:

Primer 1

VKKKKKKKKKKKKVKKKKKKKKVKKKKKKKK ~~~~~

~~~~~ KKVKKVKKVKKVKKVKKVKKVKKVKKVKKV

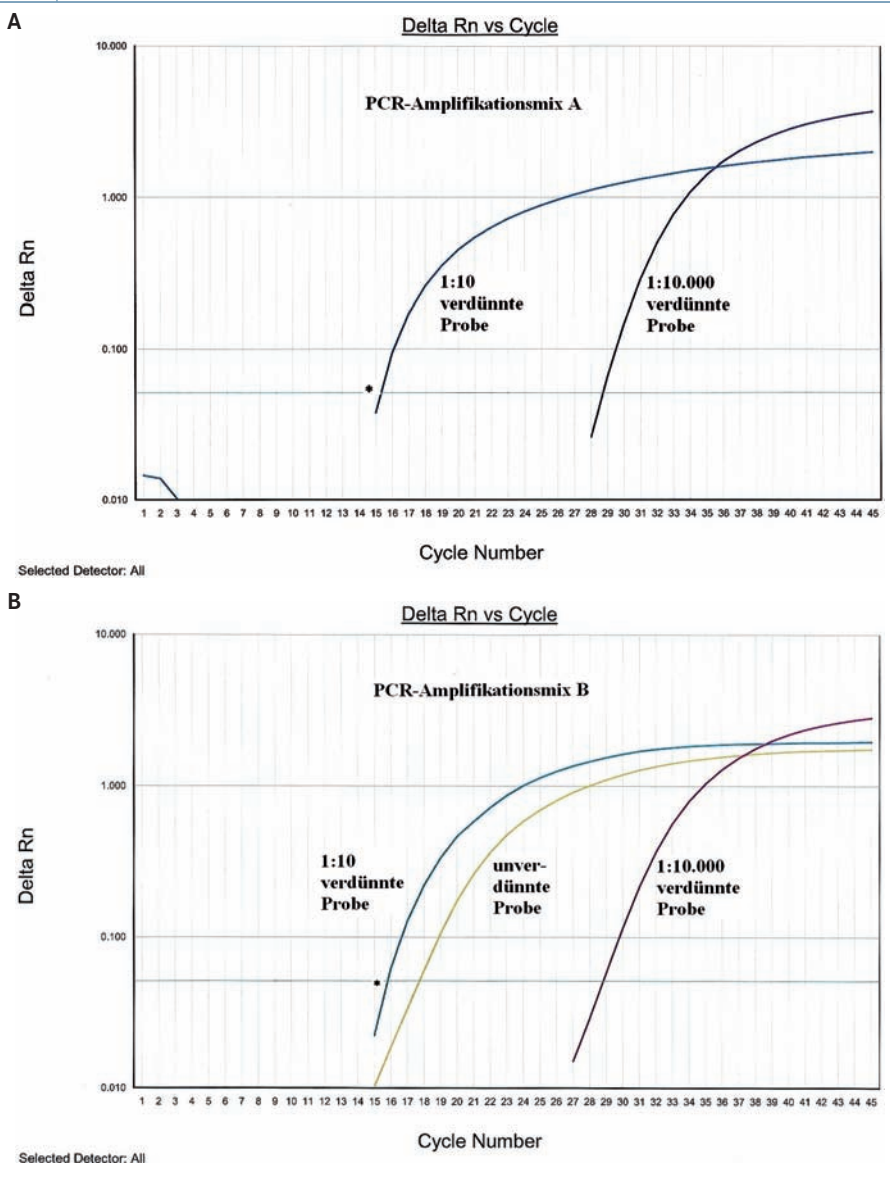
Primer 2

**K:** konservierte Nukleotidpositionen in unterschiedlichen HIV-Isolaten

**V:** variable Nukleotidpositionen in unterschiedlichen HIV-Isolaten

~~~~~: zu amplifizierende Region in der gag-Region des HIV

(Die 12 rot markierten variablen Positionen in der Bindungsregion für Primer 2 kommen zwar nicht alle gleichzeitig in einem einzigen HIV-Isolat vor, aber fünf mismatches zwischen Primer und komplementärer Bindungsregion auf der HIV-RNA werden durchaus beobachtet.)



▲ **Abb. 2** : Quantitative Detektion von Adenovirus-DNA mittels Real-Time-PCR. Eine Adenovirus-positive Probe wurde mit zwei verschiedenen kommerziellen „Mastermischen“ quantitativ analysiert. Zur Detektion der amplifizierten DNA wurde eine fluoreszenzmarkierte Sonde eingesetzt. Je mehr Adenovirus-DNA ursprünglich in der Probe vorhanden ist, desto früher wird das Fluoreszenzsignal positiv. Die Proben wurden unter sonst identischen Bedingungen unverdünnt und in einer 1:10 bzw. einer 1:10.000 Verdünnung einmal mit dem „Mastermix“ A, bzw. dem „Mastermix“ B getestet. **A**, Mit Mastermix A werden nur zwei positive Signale erhalten. Die unverdünnte Probe bleibt auf Grund von Inhibition komplett negativ und wird nicht detektiert! Erst nach Verdünnung (1:10, bei Zyklus 16, Schnittpunkt mit der „cut-off“-Linie: ★ bzw. 1:10.000) wird die Adenovirus-DNA nachweisbar. **B**, Bei Verwendung von Mastermix B wird auch in der unverdünnten Probe ein Signal erhalten, allerdings ist auch hier eindeutig Inhibition zu beobachten, denn in der Verdünnungsstufe 1:10 wird die Probe bereits nach etwa 16 PCR-Zyklen detektiert: ★ während die unverdünnte Probe erst nach etwa 18 Zyklen ein positives Signal liefert. Bei beiden „Mastermischen“ ergeben sich bei einer starken Verdünnung der Probe (1:10.000) identische Ergebnisse (Proben etwa in Zyklus 29 positiv), d. h. verdünnte DNA wird von beiden „Mischen“ mit gleicher Effizienz amplifiziert.

sen haben, und die angesprochenen Fragen für Ihre PCR-Analytik umfassend beantworten können, rufen Sie mich bitte an – ich hätte da ein paar Fragen ...

### Untersuchungsmaterial – ein bisschen dies, ein bisschen das

Die Problematik beginnt schon bei der außerordentlichen Vielfalt des zu untersuchenden

Probenmaterials. Flüssiges Untersuchungsmaterial wie z. B. Serum, Plasma oder Urin, bei dem von einer weitgehend homogenen Verteilung der Viruspartikel in der Probe ausgegangen werden kann und das verhältnismäßig leicht aufzuarbeiten ist, bereitet insbesondere bei quantitativen Virusnachweisen (*viral load*-Messungen) erheblich weniger Kopfzerbrechen, als ein Stückchen Haut-

gewebe oder eine Darmbiopsie. Für letzteres Material findet sich in der Regel kaum ein kommerzielles, gut evaluiertes Nukleinsäureextraktions- und Amplifikationsprotokoll, hier sind oft selbst hergestellte *homebrew*-Verfahren angesagt.

### Quantifizierung und Viruslastmessung – sind 5.000 Viren viel?

Bei Serum- oder Plasmaproben ist ein Untersuchungsergebnis in der Form „5.000 Viruspartikel/ml Serum“ in der Regel sehr sinnvoll und im Rahmen einer entsprechenden Fragestellung meist auch aussagekräftig. Was aber eine Menge von 200 Cytomegalievirus (CMV)-DNA-Kopien in einem kleinen Stückchen Darm klinisch bedeuten könnte, erschließt sich durchaus nicht in jedem Fall unmittelbar. Hier stellt sich die Frage: 200 Kopien pro was eigentlich genau? 200 Viren in einer Zelle oder je 1 nicht-infektiöses CMV-DNA-Molekül in 200 Zellen?

### Echt viel Virus – und manchmal ein Hauch von Kontamination

Ein weiterer kritischer Punkt sind die enormen quantitativen Unterschiede, die für bestimmte Viren in Untersuchungsmaterialien gemessen werden können. Hepatitis-B-Viren (HBV) erreichen im Blut leicht Konzentrationen von  $10^{11}$  Virupartikeln/ml, aber auch sehr geringe Virusmengen können häufig gefunden werden (z. B. bei therapierten Patienten). Sie dürfen sicher sein, dass sich die einzige, sehr schwach positive Probe ihrer PCR-Analyse mit rechnerisch 17,4 Kopien HBV-Kopien/ml in Position C4 ihrer Mikrotiterplatte befindet und von zwei Proben auf den Positionen C3 und C5 umrahmt wird, die enorm hohe HBV-DNA-Konzentrationen enthalten. Glauben Sie wirklich, dass diese Probe positiv ist oder betrachten wir *de facto* nur Kontamination<sup>[1]</sup> (für Insider: UNG hilft hier gar nix!)?

### Reproduzierbarkeit oder Aberglaube

Sie werden diesen Test vielleicht einfachheitshalber wiederholen (er wird übrigens mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit negativ ausfallen) und folgen dann der nirgendwo dokumentierten, aber sehr alten und bewährten Laborregel: Das Wiederholungsergebnis ist das „richtigere“. Zwar verschwindet das erste Ergebnis nicht automatisch, aber da Sie beim Wiederholungstest jetzt besonders aufgepasst haben (was ein wenig suggeriert, dass Sie üblicherweise nicht 100%ig aufmerksam arbeiten), ist die alternative Sichtweise, dass

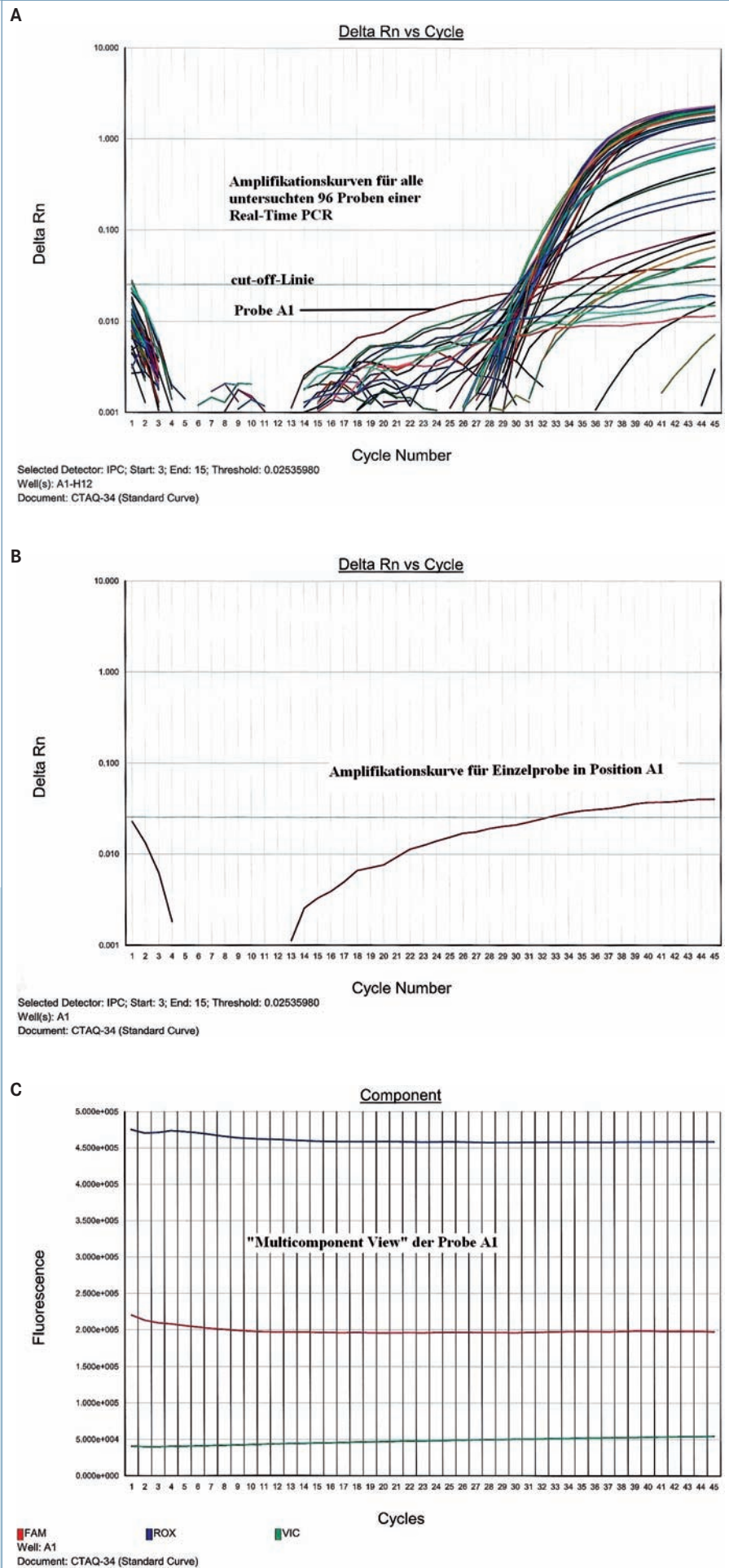
die Probe in der Zeit zwischen Durchführung von Test 1 und 2 degradiert sein könnte, unzulässig.

### Primer, Sonden und Spezifität

Der nächste kritische Punkt betrifft die Wahl von Primer und Sonden. Auch hier könnten Sie ein Problem haben, das weitaus komplexer ist, als zunächst erwartet. Insbesondere bei RNA-Viren, die bei ihrer Replikation in der Zelle aufgrund ihrer „unzuverlässigen“ Polymerasen eine sehr hohe Variabilität viraler Genome erzeugen<sup>[2]</sup>, ist es in Einzelfällen oft außergewöhnlich schwierig, überhaupt einen einzigen Abschnitt im viralen Genom zu identifizieren, der in allen beschriebenen klinischen Isolaten eines bestimmten Virus konserviert ist und von einem Primerpaar sicher erfasst werden kann.

Tatsächlich ist es leichter, ein Primerpaar zu finden, das zuverlässig alle Varianten des Poliovirus (Erreger der Kinderlähmung) und gleichzeitig diverse Rhinoviren (Schnupfen-Erreger) amplifiziert<sup>[3]</sup>, als ein Primerpaar zu „designen“, das alle bekannten Varianten des Humanen Immunodefizienz-Virus (HIV) mit vergleichbarer Empfindlichkeit detektiert (**Abb. 1**); ein Problem, das auch nach jahrzehntelanger Optimierung der HIV-PCR durch

► **Abb. 3:** A, Abhängig vom Vorhandensein inhibitorischer Substanzen können sich unterschiedliche Amplifikationskurven für die hier zu 96 Einzelproben zugegebenen, internen RNA-Kontrollen ergeben. Im gezeigten Beispiel zeigen diese in der Mehrzahl der Proben einen relativ steilen Anstieg der Fluoreszenz (keine Inhibition) und überschreiten, nach etwa 31 Amplifikationszyklen die „cut-off-Linie“. Allerdings gibt es auch viele Proben, bei denen die Fluoreszenzwerte nur sehr verzögert ansteigen und solche, die zwar einen Signalanstieg zeigen, aber die cut-off-Linie nicht überschreiten. **B**, Amplifikationskurve der internen Kontrolle in der Probe A1 (siehe **Abb. 3a**): Die hier gezeigte „Amplifikationskurve“ ist ein typisches Beispiel für die Problematik, die beim Arbeiten mit Patientenproben auftritt. Zwar lässt sich ein Fluoreszenzsignal-Anstieg schon ab dem 13. Zyklus beobachten, allerdings nicht mit typischem Verlauf, d.h. einer Phase linearen Anstiegs. Die Amplifikationskurve überschreitet zwar die cut-off Linie etwa bei Zyklus 32, allerdings nur minimal. **C**, Um eine Abklärung für die Probe A1 zu erreichen, ist es möglich, den Verlauf der Fluoreszenzwerte für die einzelnen Farbstoffe über die gesamten 45 PCR-Zyklen zu verfolgen. Dabei zeigt sich, dass die Fluoreszenzwerte für die Probe A1 über alle PCR-Zyklen nahezu unverändert bleiben, d.h. es hat keinerlei Amplifikation stattgefunden.





viele Forschergruppen noch immer nicht vollständig gelöst ist.

### Inhibition – echt krass

In vielen klinischen Probenmaterialien finden sich Substanzen, die die PCR erheblich inhibieren können<sup>[4]</sup>. Trotz aller Fortschritte bei der Entwicklung neuer effizienter Nukleinsäureextraktionsmethoden lassen sich inhibitorische Substanzen nicht immer vollständig entfernen. Auch verschiedenste, gebrauchsfertige, kommerzielle PCR-Amplifikationsmische reagieren im Einzelfall offensichtlich ganz unterschiedlich auf Präsenz von PCR-Inhibitoren in der aufgereinigten Nukleinsäure (**Abb. 2**). Eine 1:10-Verdünnung des Probenmaterials vor oder nach der Extraktion löst diese Problematik zwar in der Mehrzahl der Fälle, dies resultiert aber in Mehrarbeit oder verminderter Sensitivität des Tests. Man könnte nun meinen, im geeigneten Beispiel einfach zum Mastermix des Herstellers B greifen zu können, aber Vorsicht – eine andere Patientenprobe kann zum umgekehrten Ergebnis führen.

### Inhibition, schlechte Amplifikations-effizienz, nicht exakt passende Primer oder doch negativ?

Die in Prospekten gern gezeigten optimalen Amplifikationskurven für die Real Time-PCR gibt es in der täglichen Praxis auch – manchmal. Allerdings warten „suboptimale“ Kurvenverläufe gleichfalls auf Interpretation (**Abb. 3**). Ein solches oder ähnliches Bild findet sich bei Untersuchung von klinischem Probenmaterial häufig. Die Entscheidung, ob eine individuelle Probe wegen noch vorhandener Inhibitoren, der Präsenz von in großem

Überschuss vorhandener Wirts-Zell-DNA bei zellhaltigem Untersuchungsmaterial, Mutationen im Primer- oder Sondenbereich des Virus oder gar wegen Problemen der Auswertesoftware des Real Time-Thermocyclers nur schlecht amplifizierbar zu sein scheint, ist oft nicht einfach zu treffen.

### Positiv- und Negativkontrollen

Wir kommen zurück zu „guten“ Positiv- und Negativkontrollen – eigentlich ein absolutes Muss. Hierfür gibt es leider keine allgemein verbindliche Antwort. Prinzipiell ist jedoch eine gut definierte Positivkontrolle (bekannte RNA/DNA-Menge in geeigneter Verdünnung, bekannte Sequenz/bekanntes Virusisolat; geeignete Matrix, internationaler Standard) sehr viel besser geeignet, als eine Kontrolle, über die nicht viel mehr gesagt werden kann, als dass sie schon immer eingesetzt wurde. Unterschiedliche Negativkontrollen können z. B. verschiedene Phasen des Versuchsablaufs (Präanalytik, Extraktion der RNA/DNA, cDNA-Synthese etc.) sinnvoll kontrollieren.

### Schlusswort

Das Gefährlichste im Bereich der PCR-Analytik ist wohl die Tatsache, dass in der Regel zumindest einige der Proben, besonders bei intensiver und häufiger Testwiederholung, letztendlich immer positiv werden. Also Vorsicht bei der Interpretation der Daten!

### Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Eberle für die Überlassung wichtiger Daten und Frau H. Mairhofer für die Entwicklung vieler unserer Testsysteme. ■

### Literatur

- [1] Kwok, S., Higuchi, R. (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237–238.
- [2] Agol, V. I. (2006): Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299: 211–259.
- [3] Kares, S., Lönnrot, M., Vuorinen, P., Oikarinen, S., Taurianen, S., Hyöty, H. (2004): Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using LightCycler. *J. Clin. Virol.* 29: 99–104.
- [4] Thiemann, F., Cullen, P. M., Klein, H.-G. (2006): Leitfaden Molekulare Diagnostik. Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- [5] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- [6] HIV-database: [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov).

### Korrespondenzadresse:

Dr. Hans Nitschko  
Max von Pettenkofer-Institut  
Lehrstuhl Virologie  
Pettenkoferstraße 9a  
D-80336 München  
Tel.: 089-5160-5265  
Fax: 089-5160-5273  
[nitschko@mvp.uni-muenchen.de](mailto:nitschko@mvp.uni-muenchen.de)  
[www.mvp.uni-muenchen.de](http://www.mvp.uni-muenchen.de)

### AUTORIN



#### Hans Nitschko

Jahrgang 1955. 1976–1982 Biologiestudium an der Universität Stuttgart, 1987 Promotion an der Universität Stuttgart, 1987–1990 Postdoc an der Washington University Medical School in St. Louis, USA, 1990–1993 Postdoc Abt. Retrovirologie, Prof. Dr. von der Helm, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München. Seit 1994 Bereichsleitung Molekulare Diagnostik, Lehrstuhl Virologie, Prof. Dr. U. Koszinowski.