

Dr. Ralf Clauberg, Essen

HCV-RNA Messverfahren und ihre Anwendung

Die Individualisierung der Therapie einer chronischen Hepatitis C entsprechend den nationalen und internationalen Empfehlungen erfordert die Anwendung von hochsensitiven Tests, die in einem breiten Bereich ein lineares Verhalten zeigt. Alternativ bietet sich auch die weit verbreitete ergänzende Verwendung eines hochsensitiven qualitativen Tests zu einem mäßig sensitiven quantitativen Test an. Die Ergebnisse zur HCV-RNA Quantifizierung sollten immer in IU/ml angegeben werden.

Generell stehen unterschiedliche technische Verfahren zur Bestimmung der HCV-RNA zur Verfügung. Im quantitativen Bereich kommen vor allem die Polymerase-Ketten Reaktion nach Reverser Transkriptase (RT-PCR) sowie die branched chain DNA (bDNA) zur Anwendung. Bei der RT-PCR handelt es sich um eine klassische Nukleinsäure-amplifikation mittels einer DNA-Polymerase. Zur Quantifizierung werden Real-Time Verfahren eingesetzt, bei denen die neu synthetisierte DNA-Menge in kurzen Abständen kontinuierlich über den Amplifikationsverlauf gemessen wird. Ein Beispiel für ein solches Verfahren ist z.B. das Roche Amplicor System.

Bei der bDNA findet keine Vermehrung der Nukleinsäure, sondern eine Amplifikation des gemessenen Signals mittels verzweigter Hybridisierungs sonden statt. Ein Beispiel für ein solches Verfahren ist das Bayer bDNA System.

Im qualitativen Bereich gibt es noch weitere Verfahren, wie der Transcription mediated Amplification Assay (TMA), welcher sich durch eine besonders hohe Sensitivität auszeichnet (Bayer TMA Nachweisgrenze etwa 10 IU/ml).

Anforderungen an ein ideales System

Ein ideales Messsystem würde sich durch eine niedrige Nachweisschwelle

(≤ 50 IU/ml) sowie einen breiten linearen Bereich (6-7 \log_{10} Stufen, ggf. lässt sich der Bereich durch Vorverdünnung der Proben vergrößern) auszeichnen. Wünschenswert ist außerdem eine gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Werte. RT-PCR Tests können diesen Anforderungen durchaus gerecht werden⁵.

In-House-Verfahren

Neben kommerziellen Test-Kits kommen auch selbstentwickelte „in-house“ RT-PCRs zur Anwendung, zu deren Nachweisgrenze und Linearität kann dann nur das entsprechende Labor Auskunft geben. Alternativ wird oft eine Kombination aus einem hochsensitiven qualitativen System und einem mäßig sensitivem quantitativen System verwendet, z.B. Bayer TMA und bDNA oder auch Roche Amplicor HCV-Monitor und Cobas Taq-Man HCV Assay. Auch eine solche Kombination liefert die zur Individualisierung der Therapie benötigten Informationen.

Sind Laborwerte vergleichbar?

Ein weiteres Problem ist die Vergleichbarkeit der Laborwerte bzw. die uneinheitlichen Angaben der Ergebnisse der quantitativen Tests. Neben den durch die WHO standardisierten IU/ml werden auch Ergebnisse in Kopien/ml angegeben. Eine testunabhängige Umrechnung mittels eines einheitlichen Konversionsfaktors ist dabei leider nicht möglich. In

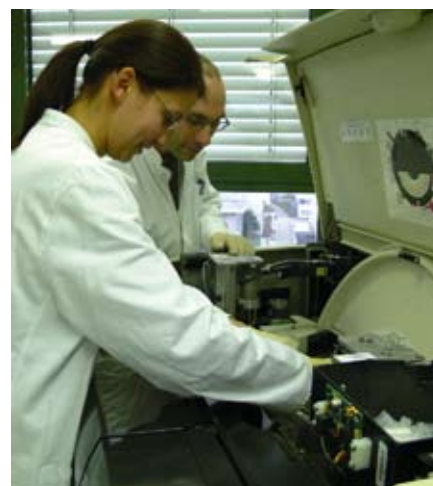


Tabelle 1 sind einige Konversionsfaktoren für gebräuchliche kommerzielle Assays zusammengestellt. Kommen „in-house“-PCRs zur Anwendung, kann eine Umrechnung nur durch das anbietende Labor erfolgen. Die Umrechnung erfordert eine Kalibration des Tests mit Hilfe des WHO Standards. Sobald die jeweilige Methode ihren linearen Bereich verlässt (üblicherweise in den unteren und oberen Grenzen des Messbereichs) ist bei Verwendung eines konstanten Faktors mit einem zunehmenden Fehler zu rechnen.

Ein weiterer Fehler der Messergebnisse kann bei der Bestimmung der Viruslast unterschiedlicher Genotypen erfolgen. Hier sind aber in den letzten Jahren wesentliche Verbesserungen erreicht worden. Sofern das lineare Verhalten der Methode aber gewahrt bleibt, ist die Beurteilung des virologischen Ansprechens anhand des Abfalls der Viruslast problemlos möglich.

Dr. R. Clauberg · Institut für Virologie
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstraße 55 · 45122 Essen
Email: ralf.clauberg@uni-due.de

Literatur

- Zeuzem S.: Individualised treatment of chronic hepatitis C. *Internist (Berl)*. 2005 Jun;47(Supplement 01):S20-S25.
- Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S.: Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Apr 15;23(8):1043-54. Review.
- Dalgard O, Bjoro K, Hellum KB et al. (2004) Treatment with pegylated interferon and ribavirin in HCV infection with genotype 2 or 3 for 14 weeks: a pilot study. *Hepatology* 40: 1260-1265.
- Kamal SM, El Tawil AA, Nakano T et al. (2005) Peginterferon α -2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. *Gut* 54: 858-866.
- Caliendo AM et al.: Multilaboratory comparison of hepatitis C virus viral load assays. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1726-32.
- Sarrazin: *J Gastroenterol Hepatol* 2004 19: S 88-S 93.

Assay	Konversionsfaktor 1 IU -> Kopien/ml
Amplicor HCV Monitor 2.0	2,5
LCx HCV RNA Quantitative Assay	4,3
VERSANT HCV RNA 3.0 (bDNA)	5,2

Tab. 1: nach⁶