

B. Schweiger · H. Timm
Robert Koch-Institut, Berlin

Die TaqMan-PCR: Schnelle Typisierung und Subtypisie- rung von Influenzaviren direkt aus Patientenmaterial

Zusammenfassung

Schnellverfahren zum Nachweis von Influenzaviren sind vor allem für nationale Surveillance-systeme von großer Bedeutung. Kommerziell verfügbare Tests sind aufgrund der geringeren Sensitivität und Spezifität nur bedingt einsetzbar. Wir beschreiben die Entwicklung und Evaluierung einer TaqMan-PCR zur Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren direkt aus Rachenabstrichen von Patienten. Die Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde und die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgen simultan während der PCR, so dass die aufwendige Produktanalyse entfällt. Die TaqMan-PCR ist ein sehr spezifisches Verfahren und sensitiver als die Virusanzucht. Untersuchungen mit mehr als 2600 Proben während der Saison 1999/2000 haben gezeigt, dass diese Methode zum schnellen Nachweis einer Influenzavirusinfektion sehr sicher und zuverlässig ist. Das Ergebnis liegt in wenigen Stunden vor und ermöglicht eine aktuelle Einschätzung der epidemiologischen Situation.

Schlüsselwörter

TaqMan-PCR · Influenza A · Influenza B · Typisierung und Subtypisierung · Influenzaüberwachung

Die Influenza zählt noch immer zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten des Menschen. Influenzaviren werden in die Typen A, B und C unterteilt, von denen aber nur Influenza A- und B-Viren von epidemiologischer Bedeutung sind. Aufgrund der antigenen Eigenschaften der beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) werden die Influenza A-Viren in 15 HA- und 9 NA-Subtypen untergliedert. Auslöser von Pandemien und Epidemien waren seit 1918 die HA-Subtypen H1, H2 und H3 sowie die NA-Subtypen N1 und N2. Ursache für die ständig auftretenden Epidemien ist die hohe Variabilität des Influenzavirus. Die beiden Oberflächenproteine des Virus unterliegen einer als Antigen drift bezeichneten sukzessiven Veränderung, die durch eine Anhäufung von Punktmutationen im Genom hervorgerufen wird. Bei einem Antigen shift hingegen kommt es zu einem Reassortment ganzer Gensegmente. Ein solcher Antigen shift lag den beiden großen Pandemien 1957 und 1968 zugrunde [1]. Es entstand ein Virus mit völlig veränderten Oberflächenproteinen, gegen das keine schützenden Antikörper in der Bevölkerung vorhanden waren. Um neue Subtypen und das Entstehen von Driftvarianten so früh wie möglich zu erkennen, wird weltweit eine intensive Influenza-surveillance durchgeführt.

Für den Nachweis einer Influenzavirusinfektion steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Besonders für die Surveillance von Bedeutung ist die klassische Virusanzucht mithilfe von Zellkulturen oder im embryonierten Hühnerei. Eine endgültige Identifizierung des angezüchteten Virus erfolgt gewöhnlich durch Immunfluoreszenz oder Enzymimmunoassay (ELISA). Der Hämagglutinationshemmtest (HAT) wird zur Subtypisierung von Influenza A-Viren, aber vor allem für die serologische Feincharakterisierung eingesetzt. Diese Methoden sind sehr sensitiv, bedingen aber für die Virus-kultivierung das Vorhandensein vermehrungsfähiger Partikel in der Patientenprobe. Da die Virusanzucht sehr zeitaufwendig ist und zwei bis drei Wochen in Anspruch nehmen kann, werden alternativ oder zusätzlich Schnellteste wie Immunfluoreszenz oder ELISA direkt aus Patientenmaterial durchgeführt [2, 3, 4]. Diese Techniken besitzen jedoch eine geringere Sensitivität und Spezifität. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine sehr sensitive und spezifische Methode, die sowohl für die Typisierung als auch für die Subtypisierung von Influenzaviren beschrieben wurde. Eine Charakterisierung der amplifizierten Genregion erfolgte überwiegend mittels Gelelektrophorese [5, 6, 7, 8]. Andere Gruppen wählten für den spezifischen Nachweis des PCR-Produktes (Amplifikat) Sondenhy-

“Für die Influenzasurveillance ist die klassische Virusanzucht von Bedeutung. Diese ist jedoch sehr zeitaufwendig!”

Dr. Brunhilde Schweiger
Nationales Referenzzentrum für Influenza,
Robert Koch-Institut,
Nordufer 20, 13353 Berlin,
E-Mail: SchweigerB@rki.de

B. Schweiger · H. Timm

A TaqMan-PCR for rapid typing and subtyping of influenza viruses in clinical specimens

Abstract

Procedures for rapid detection of influenza viruses are especially important for national surveillance programs. The application of available rapid tests is restricted because of their limited sensitivity and specificity. Therefore a TaqMan-PCR was developed for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. Time-consuming post-PCR analysis is avoided since hybridization with a fluorogenic probe and quantification of the amplified product is performed simultaneously during PCR cycling. The TaqMan-PCR was much more sensitive than virus culture and revealed an excellent correlation for typing and subtyping of influenza viruses when samples were positive by both methods. Surveillance work during the season 1999/2000 with more than 2,600 throat swabs proved the reliability of the new method for rapid detection of influenza viruses. Results are available within a few hours allowing a more relevant evaluation of the current epidemiological situation.

Keywords

TaqMan-PCR · Influenza A · Influenza B · Typing and Subtyping · Surveillance

Tabelle 1
Primer und Sonden für die Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren

Typ/Subtyp	Primer/Sonde	Sequenz	Koordinaten
A	AM-151	5' CATGGAATGGCTAAAGACAAGACC	151–174
	AM-397	5' AAGTGCACCAGCAGAATAACTGAG	374–397
	Sonde AM-245	5' CTGCAGCGTAGACGCTTTGTCCAAATG	245–272
A/H1	HA1–583	5' GGTGTTTCATACCCGTCTAACAT	583–605
	HA1–895	5' GTGTTTGACACTTCGCGTCACAT	873–895
	Sonde HA1–783	5' TGCCTCAAATATTATTGTGCCCCGGGT	756–783
A/H3	HA3–115	5' GCTACTGAGCTGTTCCAGAGTTC	115–137
	HA3–375	5' GAAGTCTTCATTGATAAATCCAG	352–375
	HA3–399	5' ATTCTGAGCGACTCCAGTCC	380–399
A/N1	Sonde HA3–208	5' CTATTGGGAGACCTCATTGTGATGG	208–233
	NA1–1078	5' ATGTAATGGTGTGGATAGGAAG	1078–1102
	NA1–1352	5' AATGCTGCTCCACTAGTCCAG	1331–1352
A/N2	Sonde NA1–1138	5' TGATTTGGGATCCTAATGGATGGACAG	1138–1164
	NA2–560	5' AAGCATGGCTGCATGTTTGTG	560–580
	NA2–858	5' ACCAGGATATCGAGGATAACAGGA	835–858
B	Sonde NA2–821	5' TGCTGAGCACTTCTGACAATGGGCT	796–821
	BHA-188	5' AGACCAGAGGGAACTATGCC	188–209
	BHA-347	5' CTGTCGTGCATTATAGGAAAGCAC	324–347
	Sonde BHA-273	5' ACCTTCGGCAAAGCTCAATACTCCA	273–299

bridisierung [9, 10], Nested-PCR [11, 12] oder PCR-Enzymimmunoassay [13, 14].

Der Einsatz der PCR und der sich anschließenden Methoden zur Amplifikat-analyse in diagnostischen Laboratorien erfordert, dass diese Techniken einfach, schnell und reproduzierbar durchführbar sind. Ein solches Verfahren ist die TaqMan-PCR basierend auf der 5'-3'-Nuclease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase [15, 16, 17]. Das spezifische Amplifikat wird mit Hilfe einer fluoreszenzmarkierten Sonde bereits während der PCR durch Online-Messung detektiert, so dass eine anschließende Produktanalyse entfällt. In dieser Arbeit wird die Anwendung des TaqMan-Prinzips für die Entwicklung einer PCR zur Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren beschrieben. Influenza A- und Influenza B-spezifische Primer/Sonden-Sets ermöglichen einen schnellen Nachweis von Influenzaviren im Patientenmaterial. Influenza A-positive Proben werden mit HA- und NA-spezifischen Systemen weiter differenziert. Das hier vorgestellte PCR-Verfahren zur Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren ist besonders attraktiv, da viel Zeit eingespart und somit ein höherer Probendurchsatz möglich wird. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung von Kontaminationen, da jeglicher Umgang mit Amplifikaten entfällt.

Material und Methoden

Virusstämme und Patientenmaterial

Alle eingesetzten Influenzavirus-Referenzstämme sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Vermehrung dieser Viren erfolgte im embryonierten Hühner-riemen. Rachenabstriche von Patienten mit influenzaverdächtiger Symptomatik wurden in ein Röhrchen mit Transportpuffer überführt und auf dem Postweg an unser Labor geschickt. Die Abstriche wurden überwiegend von Ärzten entnommen, die im Sentinel der Arbeitsgemeinschaft Influenza [18] mitwirken. Mit dem Patientenmaterial wurde sowohl eine PCR als auch eine Viruskultivierung durchgeführt. Die Virusanzucht erfolgte auf MDCK-Zellen, einer permanenten Hundenierenzelllinie. Zur Identifikation der angezüchteten Viren wurde die Immunfluoreszenz und zur weiteren Charakterisierung der Influenzaviren der Hämagglutinationshemmtest eingesetzt [19].

RNA-Extraktion, reverse Transkription und PCR

Die virale RNA wurde mithilfe eines kommerziellen Kits (QIAamp Viral RNA Kit, Qiagen, Hilden) extrahiert und an-

Tabelle 2

Evaluierung der Spezifität der TaqMan-PCR mit Influenzavirus-Referenzstämmen

Virusstamm	DeltaR _n Typ B-PCR	Typ A-PCR	Subtyp A H1-PCR	Subtyp A H3-PCR
Influenza A/H1N1				
A/PR/8/34	0	1.800	1.600	0
A/Singapore/6/86	0	1.650	1.600	0
A/Taiwan/1/86	0	1.750	1.950	0
A/Texas/36/91	0	1.800	1.900	0
A/Bayern/7/95	0	1.900	2.150	0
A/Beijing/262/95	0	2.000	2.200	0
Influenza A/H3N2				
A/Leningrad/360/86	0	1.950	0	2.000
A/Sichuan/2/87	0	1.850	0	2.000
A/Shanghai/11/87	0	2.250	0	2.150
A/England/427/88	0	2.500	0	2.400
A/Guizhou/54/89	0	1.950	0	1.800
A/Beijing/353/89	0	2.600	0	2.300
A/Beijing/32/92	0	2.100	0	2.000
A/Shangdong/9/93	0	2.400	0	2.200
A/Johannesburg/33/94	0	2.500	0	2.550
A/Wuhan/353/95	0	2.150	0	2.250
A/Nanchang/933/95	0	1.950	0	2.100
A/Sydney/5/97	0	2.300	0	2.500
A/Moscow/10/99	0	2.500	0	2.400
Influenza B				
B/USSR/100/83	2.350	0	0	0
B/Ann Arbor/1/86	1.900	0	0	0
B/Victoria/2/87	2.300	0	0	0
B/Yamagata/16/88	2.100	0	0	0
B/Panama/45/90	1.950	0	0	0
B/Quindao/102/91	2.200	0	0	0
B/Beijing/184/93	2.000	0	0	0
B/Harbin/7/94	2.400	0	0	0
B/Belarus/1/95	2.500	0	0	0
B/Yamanshi/166/98	2.300	0	0	0

Die PCR lief jeweils 45 Zyklen mit den für die Typisierung und Subtypisierung spezifischen Primer/Sonden-Systemen. DeltaR_n: Reporterfluoreszenz

schließlich revers transkribiert. Die PCR wurde als Nested-PCR (12, 14) oder als TaqMan-PCR durchgeführt:

Nested-PCR. Zum Nachweis von Influenza A- und Influenza B-RNA sowie zur Differenzierung des HA-Gens von Influenza A-Viren wurden Primer eingesetzt, die an das M-Gen sowie an das HA-Gen dieser Viren binden [12]. Für die Differenzierung der NA-Subtypen wurde ein PCR-DNA-Enzymimmunoassay gewählt [14]. **TaqMan-PCR.** Die zur Typisierung und Subtypisierung eingesetzten Primer und Sonden sowie deren Bindungsstellen am viralen Genom sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Der PCR-Mix entsprach

dem der Nested-PCR, ausgenommen 4 mM MgCl₂ und der jeweils spezifischen Sonde in einer Konzentration von 200 nM. Die Sonden bestanden aus einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid, das am 5'-Ende den Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und intern den Quencherfarbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) besitzt. Die TaqMan-PCR lief in einer Mikrotiterplatte im 96-Lochplatten-Format über 45 Zyklen. Zur Verhinderung einer eventuellen Kontamination wurde zusätzlich vor jeder PCR eine Uracil-N-Glykosylase (UNG)-Behandlung durchgeführt.

Die Auswertung der TaqMan-PCR erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Die Analyse der Platte wurde bei einer Wellenlänge von 518 nm (FAM) und 582 nm (TAMRA) vorgenommen. Zur Normierung des Reporter-signal (R_n) diente die passive Referenz ROX. Die Messwerte wurden als DeltaR_n und C_T ausgewiesen. DeltaR_n gibt die Differenz zwischen einer alle Reagenzien und das Template enthaltenden Probe und einer alle Reagenzien enthaltenden Negativprobe an. Der C_T (threshold cycle)-Wert gibt den Zyklus an, bei dem erstmals ein positives Reporter-signal gemessen wird.

Sequenzanalyse. Eine 548-Basenpaar-Region (Nt 43-Nt 501) der HA1-Domäne des HA-Gens wurde mittels PCR amplifiziert, das PCR-Produkt gereinigt und direkt mit dem Big Dye Terminator-Sequenzkit (Applied Biosystems, Warrington, UK) einer zyklischen Sequenzierung unterworfen. Auftrennung und Analyse der Produkte erfolgten mithilfe eines automatisierten Systems (Applied Biosystems).

Ergebnisse

Entwicklung von Primer/Sonden-Sets

Zur Differenzierung der Influenzaviren in die Typen A und B wurden zwei Primer/Sonden-Systeme aufgebaut. Zur Subtypisierung von Influenza A-Viren wurden vier weitere Systeme für den Nachweis der HA-Subtypen H1 und H3 sowie der NA-Subtypen N1 und N2 entwickelt. Eine Zusammenstellung der Primer und Sonden mit den entsprechenden Bindungsstellen am viralen Genom gibt Tabelle 1. Zum Nachweis von Influenza A-Viren wurde das Matrix(M)-Protein gewählt. Hochkonservierte Regionen für das Design von Sonde und Primer wurden nach Sequenzvergleich von zwölf Influenza A-Stämmen ermittelt. Diese Stämme repräsentierten die Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2. Die Sequenzen wurden der Datenbank entnommen ebenso wie die für einen hochpathogenen Geflügelstamm des Subtyps H7N7. Das Primerpaar AM-151/AM-397 und die Sonde AM-245 zeigten 100% Homologie mit allen verfügbaren Sequenzen, ausgenommen einer Mutation am 5'-Ende des Stammes A/Singapore/1/57 (H2N2). Für das Design des Sonden/Primer

565	A/Guizhou/54/89	CATCAGGCAC	<u>CCTGGAGTTT</u>	<u>ATCAATGAAG</u>	<u>GCTTC</u> <u>AAATTG</u>	<u>GACTGGAGTC</u>	<u>GCTCAGAGTG</u>	GGGGAAGCTA
566	A/Beijing/353/89	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--AA-----
567	A/Hongkong/34/90	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--AA-----
568	A/Beijing/32/92	-----	-----	-----	-----	-----	-----GA-----	-----
569	A/Guandong/32/92	-----	-----	-----	-----	-----	-----GA-----	-----
570	A/Shangdong/9/93	-----	-----	-----	-----	-----	-----GA-----	-----
571	A/Wuhan/353/95	---C-----	-----	-C-----	-----	-----	-----GA-----	-AAC-----
572	A/Sydney/5/97	---C-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
573	A/Moscow/10/99	---C-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
574	0105-97/98	-----	-----	-C-----	-----	-----	-----A-----	-AAC-----
575	0180-97/98	-----	-----	-C-----	A-----	-----	-----GA-----	-AAC-----
576	0625-97/98	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
577	0863-98/99	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
578	1317-98/99	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
579	1805-98/99	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
580	0139-99/00	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
581	1115-99/00	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
582	1702-99/00	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----T-----	-AAC-----
583	1913-99/00	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
584	2251-99/00	-----	-----	-A-----	A-----	-----	-----A-----	-AAC-----
585								
586								
587								
588								

Abb. 1 ▲ Sequenzanalyse einer Region des HA1-Gens zum Nachweis von Influenza A-Viren des Subtyps H3N2. In das Alignment wurden verschiedene Referenzstämme sowie in Deutschland isolierte Influenza A-H3N2-Viren aus der Saison 1997/1998, 1998/1999 und 1999/2000 integriert. Die Referenzstämme A/Wuhan/359/95, A/Sydney/5/97 und A/Moscow/10/99 wurden am Robert Koch-Institut sequenziert. Die Sequenzen der älteren Referenzstämme wurden der Datenbank entnommen. Die Darstellung enthält nur die Region, die relevant ist für die Bindung der Reverse-Primer HA3-375 und HA3-399. Die direkte Region für die Bindung der Primer ist eingerahmt und unterstrichen

mer-Sets für Influenza B wurden 20 Typ B-Stämme in einen Sequenzvergleich (Alignment) integriert. Der Primer BHA-347 und die Sonde BHA-273 waren absolut homolog mit allen Stämmen. Der Primer BHA-188 zeigte 100% Homologie mit 17 Stämmen, bei drei Stämmen war eine mutierte Base in unmittelbarer Nähe des 5'-Endes nachweisbar.

Zur Entwicklung von Systemen für die Subtypisierung wurde ein Alignment von neun Subtyp N1-Stämmen sowie je-

weils 16 Stämmen der Subtypen N2, H1 und H3 durchgeführt. Eine 100%ige Homologie für alle Primer und Sonden konnte für 90 bis 94% der Stämme gezeigt werden. Divergenzen betrafen nur eine der ersten drei Basen am 5'-Ende.

Sequenzanalyse aktueller Influenza A-Viren des Subtyps H3N2

Während des Primerdesigns standen uns für das HA-Gen des H3-Subtyps

nur Sequenzdaten bis 1994 zur Verfügung. Da für Influenza A-Viren des Subtyps H3N2 eine größere Variabilität nachgewiesen wurde als für den Subtyp H1N1 oder Influenza B-Viren, sollten auch aktuelle Sequenzdaten in die Evaluierung für die H3-Subtyp-PCR integriert werden. Neben den Referenzstämmen A/Wuhan/359/95, A/Sydney/5/97 und A/Moscow/10/99 wurde das HA-Gen von 50 aktuellen H3N2-Stämmen, die während der vergangenen drei Jahre in Deutschland isoliert wurden, sequenziert. Der Primer HA3-115 und die H3-spezifische Sonde waren homolog zu den Referenzstämmen und unseren Isolaten. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse für die Region, wo der Reverse-Primer HA3-375 bindet, sind in Abb. 1 dargestellt. Alle untersuchten A/Wuhan/359/95-like Isolate von 1997/98 hatten an Position 11 vom 3'-Ende des Primers HA3-375 ein Cytosin anstelle eines Thymins. Diese Position war ebenfalls bei dem Stamm A/Sydney/5/97 mutiert. Eine weitere Divergenz war an Position 19 vom 3'-Ende nachweisbar. Für alle analysierten Sydney/5/97-like Viren scheint somit eine Mutation an Position 11 und 19 charakteristisch zu sein. Obwohl eine Divergenz in dieser Entfernung vom 3'-Ende des Primers sehr gut toleriert wird, haben wir HA3-399 als neuen Primer in unsere Studien integriert. Untersuchungen mit Rachenabstrichen während der Saison 1998/1999 ergaben vergleichbare Ergebnisse für die Primer HA3-375 und HA3-399. Der Primer HA3-399 wurde während der letzten Saison 1999/2000 umfassend evaluiert. Die Sequenzanalysen des HA-Gens vom Referenzstamm A/Moscow/10/99 sowie der in der letzten Saison zirkulierenden Influenza A-H3N2-Viren ergaben eine größere Homologie dieser Sydney- und Moscow-like-Viren mit dem Primer HA3-399. Alle analysierten Stämme sind charakterisiert durch eine Divergenz unmittelbar am 5'-Ende des Primers.

Evaluierung der Spezifität und der Sensitivität der TaqMan-PCR

Die Spezifität der einzelnen Primer/Sonden-Systeme wurde mit einer Vielzahl von Referenzstämmen untersucht. Jedes PCR-System zur Typisierung und Subtypisierung wurde insgesamt mit 28 Referenzstämmen, davon zehn Influenza B-Stämmen, sechs Influenza A Subtyp

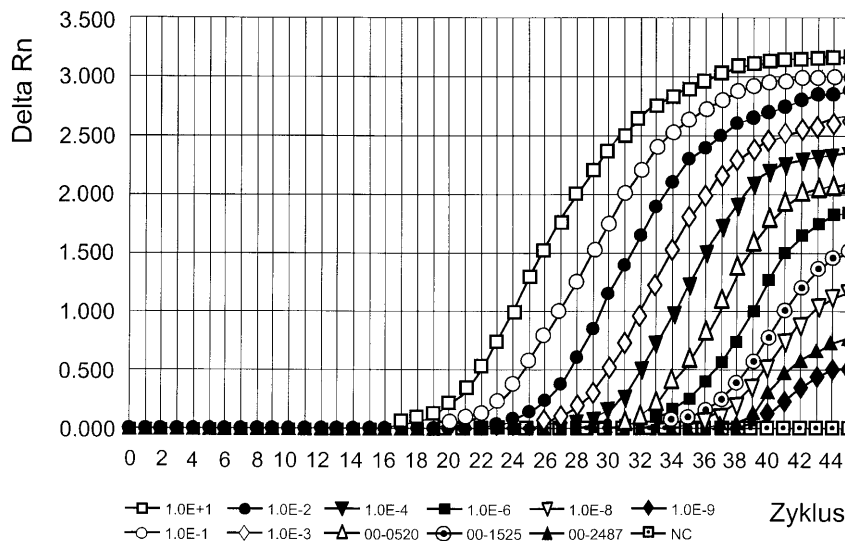


Abb. 2 ▲ Online-Messung während der TaqMan-PCR. Evaluierung der Sensitivität der TaqMan-PCR durch eine serielle Verdünnungsreihe (1.0E+1 bis 1.0E-9) und Nachweis von Influenzavirus-RNA in Rachenabstrichen während der Saison 1999/2000 (00-0520, 00-1525, 00-2487). Die Analyse erfolgte mit dem Primer/Sonden-System zum Nachweis von Influenza A-H3N2-Viren

Tabelle 3
Saison 1999/2000: Typisierung und Subtypisierung von Influenza A-Viren aus Rachenabstrichen

Patientenprobe	Influenza A-PCR		H3-spezifische PCR		Anzucht
	DeltaR _n	C _T	DeltaR _n	C _T	
00-0064	1.700	26	3.500	25	+
00-0358	0.900	34	1.100	35	-
00-0460	1.400	28	2.400	26	+
00-0533	0.800	35	0.200	33	-
00-0623	0.280	36	0.500	35	-
00-0687	0.400	35	0.250	33	-
00-0705	0.250	32	0.300	34	+
00-0831	1.100	30	1.400	30	+
00-1048	0.100	37	0.200	35	-
00-1071	0.150	36	0.300	34	+
00-1314	0.100	37	0.250	35	-
00-1454	0.750	31	0.900	30	+
00-1549	0.700	32	0.700	33	+
00-2371	0.250	38	0.100	39	-
00-2384	1.700	25	2.300	23	+
00-2415	2.200	24	2.500	23	+
00-2418	0.400	34	0.700	33	-
00-2432	0.800	31	1.200	32	-
00-2435	1.000	31	1.200	32	-
00-2449	2.200	24	1.800	25	+
00-2456	0.500	38	0.190	36	-
00-2474	1.700	30	2.200	24	+
00-2477	0.300	35	0.400	32	+
00-2503	0.600	33	0.800	33	+
00-2540	0.600	36	0.400	33	-
00-2568	0.400	33	0.500	32	+
A/Sydney/5/97	2.500	22	2.600	21	
A/Beijing/262/95	0	-	0	-	
B/Yamanashi/166/98	0	-	0	-	
Negativkontrolle	0	-	0	-	

+: positiv; -: negativ

H1N1-Stämmen und 13 Influenza A Subtyp H3N2-Stämmen, evaluiert. Fluoreszenzsignale und somit positive Ergebnisse wurden nur für das jeweils homologe Virus gemessen. Die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse zeigen eine korrekte Typisierung und Subtypisierung dieser Stämme. Die Sensitivität der TaqMan-PCR wurde für jedes Primer/Sonden-System zur Typisierung und Subtypisierung evaluiert. Dazu wurde zuerst die Viruskonzentration ermittelt und eine serielle Verdünnungsreihe der Stämme A/Nanchang/933/95 (H3N2), A/Bayern/7/95 (H1N1) und B/Belarus/1/95 mit der TaqMan-PCR analysiert. Eine Virusverdünnung von 0,1 TCID₅₀ war positiv für alle typ- und subtypspezifischen PCR-Systeme (Abb.

2). Die Sensitivität der TaqMan-PCR wurde des Weiteren mit der Nested-PCR verglichen. Über 100 Rachenabstrichproben aus der Saison 1996/97 wurden retrospektiv mit der TaqMan-PCR analysiert. Aus 56 dieser Proben wurden Influenzaviren angezüchtet. Die TaqMan-PCR war positiv für 73 Abstriche verglichen mit 74 positiven Ergebnissen in der Nested-PCR. Die weitere Subtypisierung von 48 Influenza A-positiven Proben ergab identische Resultate für TaqMan-PCR und Nested-PCR.

Einsatz der TaqMan-PCR für die Influenzasurveillance

Im Rahmen der virologischen Surveillance entnehmen Ärzte stichprobenmäßig

Rachenabstriche von Patienten mit influenzaverdächtiger Symptomatik. Zum Nachweis von Influenzaviren wurden die Abstriche sowohl für die Viruskultivierung als auch für die PCR aufgearbeitet. Die TaqMan-PCR wurde erstmals für die Surveillance in der Saison 1997/98 eingesetzt. Zuerst wurde eine PCR mit typspezifischen Primer/Sonden-Systemen durchgeführt. Das Ergebnis dieser PCR ist nach wenigen Stunden verfügbar im Gegensatz zur Virusanzucht, die bis zu zwei Wochen in Anspruch nehmen kann. Wurde in einem Rachenabstrich Influenza A-RNA nachgewiesen, so folgte eine weitere TaqMan-PCR zur Bestimmung des HA (H1, H3)- und des NA (N1, N2)-Subtyps.

“Durch Einsatz der TaqMan-PCR sind – im Gegensatz zur Virusanzucht – die Ergebnisse bereits nach wenigen Stunden verfügbar.”

Während der Saison 1997/1998 wurden 705 Rachenabstriche untersucht. Aus 125 dieser Abstriche wurden Influenzaviren angezüchtet. Darüber hinaus konnte in weiteren 70 Proben mittels TaqMan-PCR Influenza A-RNA nachgewiesen werden. Alle 195 PCR-positiven Proben enthielten nur Influenza A-Viren, davon repräsentierten elf den Subtyp H1N1 und alle anderen den Subtyp H3N2 (Tabelle 4).

Die virologische Surveillance wurde in den vergangenen beiden Jahren weiter ausgebaut. Während der Saison 1998/1999 erhielten wir 1840 Rachenabstriche. Influenza A-Viren wurden aus Abstrichen von 250 Patienten isoliert. Mit Hilfe der TaqMan-PCR konnten wir zeigen, dass insgesamt 440 dieser 1840 Patienten mit Influenza A-Viren des Subtyps H3N2 infiziert waren. Influenza B wurde durch die PCR in 85 Proben nachgewiesen, die Virusanzucht gelang aus 31 Abstrichen (Tabelle 4).

Während der letzten Influenzasaison 1999/2000 wurden 2613 Rachenabstriche an das Robert Koch-Institut eingeschickt. Typische Ergebnisse für die Online-Messung während der TaqMan-PCR sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Höhe für die gemessene Reporterfluoreszenz und der C_T-Wert, der Zyklus, bei dem erstmals ein positives Signal registriert wird, sind abhängig vom Virusgehalt im Patientenmaterial. Tabelle 3 zeigt

in einer Gegenüberstellung die Höhe des Reportersignals und den C_T -Wert für eine repräsentative Auswahl von anzucht-positiven und anzucht-negativen Rachenabstrichen. Von den insgesamt 2613 Abstrichen waren 729 PCR-positiv für Influenza A. Aus 506 Patientenmaterialien konnten Influenzaviren angezüchtet werden. Auch in dieser Saison dominierte der Subtyp H₃N₂. Der Subtyp H₁N₁ wurde zweimal und Influenza B nur in einer Patientenprobe nachgewiesen (Tabelle 4).

Diskussion

Die Diagnostik einer Influenzavirusinfektion über den Weg der klassischen Virusanzucht wird Speziallaboratorien vorbehalten bleiben. Die Virusisolierung mit anschließender serologischer und molekularbiologischer Feincharakterisierung ist eine der Hauptsäulen zur Überwachung der Influenza. Für eine patientenbezogene Diagnostik ist die Virusisolierung als sehr zeitaufwendiges Verfahren ungeeignet. Kommerziell verfügbare Antigenteste wie Immunfluoreszenz- und ELISA-Teste können innerhalb weniger Stunden im Labor durchgeführt werden. Gut evaluierte ELISA-Teste sind bisher nur für Influenza A bekannt [20, 21]. Seit dem vergangenen Jahr steht ein optischer Immunoassay zur Verfügung, mit dem Influenza A- und B-Viren nachgewiesen werden können. Die Sensitivität von Immunfluoreszenztesten hängt davon ab, dass ausreichend Zellen in der Patientenprobe vorhanden sind und diese sehr schnell das Labor erreicht.

“PCR-Verfahren sind gerade in der Influenzasurveillance von Interesse, da sie einen geringen Zeitaufwand erfordern und die Gefahr der Kontamination maximal reduzieren.”

Die Einschränkungen dieser Verfahren, insbesondere die geringere Sensitivität, motivierten die Suche nach neuen Schnelltesten für die Influenzadiagnostik. Es wurden verschiedene PCR-Verfahren beschrieben, die nur zur Detektion des jeweiligen Subtyps [9, 10, 11, 12, 13] oder auch zur weiteren Sub-

Tabelle 4

Nachweis von Influenzaviren durch TaqMan-PCR und klassische Virusanzucht während der Saison 1997/1998, 1998/1999 und 1999/2000

Material, Typisierung/ Subtypisierung	1997/98	1998/99	1999/00
Untersuchte Rachenabstriche	705	1840	2613
Virusisolierung			
Influenza A	125	250	506
Influenza B	0	31	1
TaqMan-PCR			
Influenza A	195	440	729
Subtyp H ₃ N ₂	187	440	727
Subtyp H ₁ N ₁	8	0	2
Influenza B	0	85	1

typisierung von Influenza A-Viren eingesetzt wurden [5, 7, 8, 12]. All diese PCR-Systeme waren mit Hilfe von Referenzstämmen etabliert worden. Es gibt nur wenige Berichte über die breite Evaluierung mit klinischen Proben [7, 22] oder im Rahmen der Influenzasurveillance [23]. Aufgrund des großen Probenaufkommens während der Influenzasaison sind PCR-Verfahren von Interesse, die weniger zeitaufwendig sind und die Gefahr der Kontamination maximal reduzieren. Diesen Anforderungen wird die TaqMan-PCR gerecht.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode ist so sensitiv, dass eine Nested-PCR entfällt. In einer retrospektiven Studie konnte für die TaqMan-PCR und die in unserem Labor gut evaluierte Nested-PCR eine vergleichbare Sensitivität gezeigt werden. Analysen serieller Verdünnungsreihen von titrierten Virusstocks ergaben ein positives Resultat für Proben mit einer Viruskonzentration von 0,1 TCID₅₀. Dies entspricht einem Nachweis von etwa zehn Viruspartikeln, wenn man eine Partikelrate von 100:1 voraussetzt. Die Nachweisgrenze anderer PCR-Systeme lag zwischen 100 und 200 Partikeln [9, 12, 13, 23]. Wurde auf eine Hybridisierung oder eine Nested-PCR verzichtet und das Amplifikat nur mittels Agarosegel analysiert, so bewegte sich die Detektionsrate zwischen 600 bis 5000 Partikeln [7].

Ein PCR-Protokoll ohne Nested-PCR oder aufwendige Produktanalyse hat neben der Zeitersparnis noch einen weiteren Vorteil: die Kontaminationsgefahr durch Amplifikate ist ausgeschlossen, da die Röhrchen geschlossen bleiben, und eine weitere Analyse der PCR-

Produkte entfällt. Eine Präventivmaßnahme ist das Einfügen eines Uracil-N-Glykosylase (UNG)-Schrittes vor dem Start der PCR, um so einer Kontamination durch frühere PCR-Produkte vorzubeugen. Die Methode garantiert jedoch nicht immer absoluten Erfolg, falsch-positive Ergebnisse wurden trotz UNG-Behandlung berichtet [24, 25]. Deshalb ist es bei einem großen Probenumsatz sehr wichtig, interne und externe Qualitätskontrollen durchzuführen. Dazu gehören getrennte Räume für Probenaufarbeitung, RNA-Extraktion, cDNA-Synthese, Mixvorbereitung, PCR-Lauf und alle Schritte der Produktanalyse. Obwohl bei der TaqMan-PCR die Produktanalyse entfällt, ist in unserem Protokoll ein UNG-Schritt enthalten. Des weiteren sind Negativkontrollen über die ganze Platte verteilt, so dass ein Lauf 20% Negativkontrollen enthält. Die erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die Stabilität von Genomregionen bei Influenzaviren mit besonders hoher Variabilität überwacht werden sollte. Zum Nachweis von H₃-Subtyp-spezifischen Sequenzen wurde das Primerpaar HA₃-115/HA₃-375 aus einer hochkonservierten Region des HA-Gens gewählt. Für die in den Sequenzvergleich integrierten Stämme konnte eine perfekte Korrelation für den Zeitraum 1987 bis 1993 gezeigt werden. Alle A/Wuhan/359/95-like-Isolate, die später von uns isoliert wurden, waren homolog mit dem Primer HA₃-115. Die Homologie der Isolate mit dem Reverse-Primer HA₃-375 betrug zwischen 92% und 96%. Charakteristisch für alle Wuhan-like-Viren war eine Mutation an Position 11 und 19 vom 3'-Ende des Primers. Es ist bekannt, dass

Mutationen, die nicht direkt die ersten Basen vom 3'-Ende des Primers betreffen, gut toleriert werden [26]. Obwohl die Resultate der Saison 1997/1998 und 1998/1999 die Amplifizierbarkeit belegen und eine hohe Detektionsrate nachweisbar war, wurde HA₃-399 als neuer Reverse-Primer entwickelt und getestet. Eine umfangreiche Evaluierung für diesen Primer wurde in der Saison 1999/2000 vorgenommen. Neben einer hohen Sensitivität und Spezifität konnten für den neuen Primer auch eine 100%ige Homologie, das unmittelbare 5'-Ende ausgenommen, gezeigt werden.

Da es bisher nur einige Studien gibt, in denen die PCR für die breite Überwachung während der Influenzasaison eingesetzt wurde, sollte die TaqMan-PCR auch in einer prospektiven Studie evaluiert werden. In der Saison 1997/1998 erhielten wir 705 Rachenabstriche. Aus 125 (18%) der Abstriche wurden Influenza A-Viren angezüchtet, 195 (28%) der Proben waren Influenza A-positiv mit der TaqMan-PCR. Davon entfielen 4% auf den Subtyp H1N1 und 96% auf den Subtyp H3N2. Influenza B wurde in unseren Proben nicht nachgewiesen. Die Saison 1997/1998 war charakterisiert durch eine intensive Zirkulation von Influenza A-Viren, es gab nur drei Influenza B-Isolate während der gesamten Saison. Die prospektive Studie wurde während der Saison 1998/99 fortgeführt. In 440 (24%) von insgesamt 1840 Rachenabstrichen wurde Influenza A-H3N2-RNA nachgewiesen. Aus den von uns untersuchten Patientenproben wurden 31 (1,7%) Influenza B-Viren isoliert. Influenza B-RNA wurde in 85 (4,6%) von 1840 untersuchten Proben nachgewiesen.

Die während der Saison 1997/1998 und 1998/1999 mit einer sehr großen Probenanzahl evaluierte TaqMan-PCR hat sich als sicher und zuverlässig erwiesen. Die Virusanzuchtrate lag zwischen 15 bis 18% und die Positivenquote der PCR bei 28/29%. In jeder Saison wurden mit der TaqMan-PCR etwa 12% mehr Influenzaviren nachgewiesen als durch die Virusanzucht. Analysiert man den Peak – die Zeit mit der höchsten Influenzaaktivität – separat, so beträgt die Quote für die Virusisolierung 21% und die der PCR 44%. Während der sechs Wochen mit der höchsten Influenzaaktivität Ende Januar bis Mitte März 1999 wurden mit der TaqMan-PCR etwa 26% mehr Influenzaviren nachgewiesen als durch die

Anzucht. Dieser Anstieg in der Detektionsrate ist vergleichbar mit den Ergebnissen für die Influenzaüberwachung in England und Wales. Dort wurden mit Hilfe einer Nested-PCR während der Peakphase 20% mehr Viren detektiert als mit der klassischen Viruskultivierung [23].

Die Virusanzucht ist eine sensitive Methode. Sie ist allerdings sehr anfällig und abhängig von einer Reihe verschiedener Faktoren. Dazu zählen ein optimaler Zustand der Zellkultur zum Zeitpunkt der Infektion, die Qualität des Rachenabstriches und der Entnahmetag nach Auftreten der ersten Symptome sowie die Art und Weise des Transportes. Im Rahmen unserer virologischen Surveillance erhalten wir ungekühltes Patientenmaterial, das oft nur einen, aber auch zwei bis drei Tage unterwegs ist. Der Vorteil der PCR besteht darin, dass auch nicht mehr vermehrungsfähige Viren nachgewiesen werden können. Es ist beschrieben, dass die Chance einer positiven Virusisolierung ab dem vierten Tag nach Infektion zunehmend geringer wird, aber ein Nachweis mit der PCR noch sehr erfolgreich geführt werden kann [4].

“Die TaqMan-PCR zum Nachweis einer Influenzavirusinfektion kann sicher, zuverlässig und dabei sensitiver und schneller als die Virusanzucht sein.”

Die mit mehr als 2500 Patientenmaterialien evaluierte TaqMan-PCR wurde auch in der Saison 1999/2000 für die Influenzasurveillance eingesetzt. In diesem Zeitraum wurden 2613 Rachenabstriche aus allen Gebieten der Bundesrepublik untersucht. Mit der TaqMan-PCR wurde in 730 (28%) Abstrichen Influenza-RNA nachgewiesen, die Virusisolierung gelang aus 507 (19%) Patientenproben. Der positive RNA-Nachweis mit der TaqMan-PCR ist somit relativ konstant geblieben. Er lag 1997/98 bei 28%, 1998/99 bei 29% und 1999/2000 bei 28%. Die Nachweisrate bei der Virusisolierung lag 1997/98 bei 18%, 1998/99 bei 15% und 1999/2000 bei 19%. Das Verhältnis zwischen positiver PCR und Virusanzucht unterlag größeren Schwankungen, die auf Störfaktoren bei der Virus-

kultivierung zurückzuführen sind. Die Ergebnisse während der letzten Influenzasaison bestätigen die gute Sensitivität und Spezifität der PCR. Es gab eine vollständige Übereinstimmung zwischen Typisierung und Subtypisierung durch die TaqMan-PCR und der Virusanzucht, wenn die Proben sowohl PCR- als auch anzuchtpositiv waren.

Schlussfolgerung

Die hier vorgestellte TaqMan-PCR zur Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren ist ein sensitives und spezifisches Verfahren, das im Rahmen der Influenzasurveillance evaluiert wurde. Unsere Untersuchungen während der Saison 1999/2000 mit mehr als 2600 Patientenproben haben gezeigt, dass diese Methode zum schnellen Nachweis einer Influenzavirusinfektion sicher und zuverlässig ist. Die TaqMan-PCR ist sensitiver und schneller als die Virusanzucht; das Ergebnis steht noch am Tag des Materialeingangs zur Verfügung. Dieses neue Verfahren zur Schnelldiagnostik ermöglicht vor allem während der Influenzasaison eine stets aktuelle Analyse der epidemiologischen Situation einschließlich der Differenzierung in Typen und Subtypen.

Literatur

1. Murphy BR, Webster RG (1996) Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (eds) Virology, 3rd edn. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, pp 1337–1420
2. Coonrod JD, Karathanasis P, Betts RF, Donofrio JC (1988) Enzyme-linked immunosorbent assay of core antigens for clinical diagnosis of influenza. J Med Virol 25:399–409
3. Gleaves CA, Brown JA (1993) Detection of influenza A in clinical specimens and cell culture fluid by a commercial EIA. Clin Diagn Virol 1:123–127
4. Johnston SL, Siegel CS (1991) A comparison of direct immunofluorescence, shell vial culture, and conventional cell culture for the rapid detection of influenza A and B. Diagn Microbiol Infect Dis 14:131–134
5. Bressoud A, Whitcomb J, Pourzand C, Haller O, Cerutti P (1990) Rapid detection of influenza virus H1 by the polymerase chain reaction. Biochem Biophys Res Commun 167:425–430
6. Donofrio JC, Coonrod JD, Davidson JN, Betts RF (1992) Detection of influenza A and B in respiratory secretions with the polymerase chain reaction. PCR Meth Applicat 1:263–268

7. Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM (1995) Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 33:1180–1184
8. Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, Nakajima K, Nakajima S (1991) Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 35:259–265
9. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, van Beek R, Quint WGV, Masurel N (1992) Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 39:1–13
10. Pisareva M, Bechtereva T, Plyusnin A, Dobretsova A, Kisselev O (1992) PCR-amplification of influenza A virus specific sequences. *Arch Virol* 125:313–318
11. Yamada A, Imanishi J (1992) Detection of influenza B virus in throat swabs using the polymerase chain reaction. *Acta Virol* 36:320–325
12. Zhang W, Evans DH (1991) Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 33:165–189
13. Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH (1994) Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol* 32:623–628
14. Schweiger B, Lange I, Heckler R, Willers H, Schreier E (1994) Rapid detection of influenza A neuraminidase subtypes by cDNA amplification coupled to a simple DNA enzyme immunoassay. *Arch Virol* 139:439–444
15. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (16):7276–7280
16. Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21 (16):3761–3766
17. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4 (6):357–362
18. Szecsenyi J, Uphoff H, Ley S, Brede HD (1995) Influenza surveillance: experiences from establishing a sentinel surveillance system in Germany. *J Epidemiol Community Health* 49:9–13
19. Chakraverty P (1971) Antigenic relationship between influenza B viruses. *Bull World Health Organ* 45:755–766
20. Johnston SLG, Bloy H (1993) Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 31:142–143
21. Leonardi GP, Leib H, Birkhead GS, Smith C, Costello P, Conron W (1994) Comparison of rapid detection methods for influenza A virus and their value in health-care management of institutionalized geriatric patients. *J Clin Microbiol* 32:70–74
22. Claas ECJ, van Milaan AJ, Sprenger MJW, Ruiten-Stuiver M, Arron GI, Rothbarth PH, Masurel N (1993) Prospective application of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosing influenza infections in respiratory samples from a children's hospital. *J Clin Microbiol* 31:2218–2221
23. Ellis JS, Fleming DM, Zambon MC (1997) Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol* 35:2076–2082
24. Espy MJ, Smith TF, Persing DH (1993) Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J Clin Microbiol* 31:2361–2365
25. Schweiger B, Pauli G, Zeichhardt H, Kücherer C (1997) A multicentre quality assessment study to monitor the performance of HIV-1 PCR. *J Virol Meth* 67:45–55
26. Sommer R, Tautz D (1989) Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Res* 17:6749

Ausschreibung

Die Deutsche Zöliakie-Gesellschaft (DZG) hat einen Forschungsfonds eingerichtet zum Zwecke der Förderung der wissenschaftlichen Forschung auf dem Gebiet der Zöliakie/Sprue.

Arbeitsbereich Zöliakie/Sprue

Forschungsförderung im Bereich Zöliakie/Sprue 2001 – ausgeschrieben von der Deutschen Zöliakie-Gesellschaft e.V. (DZG), Stuttgart. Dotation: bis zu DM 20.000,– durch den Forschungsfonds der DZG.

Unterstützt werden Forschungsprojekte auf dem Gebiet der Zöliakie/Sprue mit Arbeitsschwerpunkt an deutschen Instituten oder Kliniken.

Anforderungen der Ausschreibungsbedingungen und Bewerbungen bis 31.12.2000 an die DZG-Geschäftsstelle. Interessierte erhalten vorab nähere Informationen bei der Deutschen Zöliakie-Gesellschaft Stuttgart, Tel: 0711/454514 Fax: 0711/4567817, Email: info@dzg-online.de