

ROBERT KOCH INSTITUT



**Prävalenz und Charakterisierung von HCV
in HIV-Neudiagnosen vor Einführung der HCV-spezifischen
antiviralen Medikamente im Jahr 2011**

Bachelorarbeit
Zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science (B.Sc.)

von
Johanna Riege (363733)

Betreuerin: Dr. Patrycja Machnowska
Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Bannert
Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

Berlin, Mai 2019

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	3
1.1 Summary.....	5
2. Abkürzungsverzeichnis.....	7
3. Einleitung.....	9
3.1 Klassifizierung, Virusaufbau und Genom	9
3.1.1 Klassifizierung	9
3.1.2 Virusaufbau.....	9
3.1.3 HCV Genom.....	10
3.2 Infektionsverlauf und Diagnose	11
3.3 Übertragungswege	13
3.4 HIV/HCV-Koinfektionen	14
3.5 Therapie.....	15
3.6 Epidemiologie	17
3.6.1 Prävalenz.....	17
3.6.2 Geno- und Subtypverteilung.....	18
3.6.3 Situation innerhalb Deutschlands	19
3.7 Zielstellung.....	20
4. Materialien und Methoden.....	21
4.1 Materialien.....	21
4.1.1 Geräte.....	21
4.1.2 Reagenzien.....	21
4.1.3 Kits	21
4.1.4 Kontrollen	22
4.1.5 Equipment	22
4.1.6 Gerätesoftware.....	22
4.1.7 Webtools.....	22
4.1.8 Primer	23
4.1.9 Sonden	23
4.2 Methoden	23
4.2.1 Arbeitsablauf.....	23
4.2.2 Enzymimmunoassay (ELISA).....	24
4.2.3 Nukleinsäure-Extraktion.....	25

4.2.4	Quantitative Real-time PCR.....	26
4.2.5	Geno-und Subtypisierung	28
4.2.5.1	cDNA-Synthese.....	28
4.2.5.2	Nested-PCR zur Geno-und Subtypisierung.....	30
4.2.5.3	Agarosegelelektrophorese	35
4.2.5.4	Sequenzierung nach Sanger und Auswertung.....	36
4.2.6	Immunoblot	38
5.	Ergebnisse.....	40
5.1	Überblick.....	40
5.2	Quantitative Real-time PCR.....	40
5.3	Immunoblot	41
5.4	Nested-PCR zur Geno- und Subtypisierung.....	42
5.5	Sequenzierung	43
5.6	Bestimmung der HCV-Positivrate.....	44
5.6.1	Auswertung nach soziodemografischen Daten.....	45
5.6.1.1	Geschlecht.....	45
5.6.1.2	Herkunft	46
5.6.1.3	Alter.....	50
5.6.1.4	Transmissionsgruppe	52
5.7	Geno- und Subtypverteilung.....	53
5.7.1	Subtypverteilung in den Geschlechtern.....	55
5.7.2	Subtypverteilung in Personen unterschiedlicher Herkunft.....	55
5.7.3	Vergleich der Geno- und Subtypverteilung in den einzelnen Risikogruppen.....	56
5.8	Statistik	57
6.	Diskussion	58
6.1	HCV-Seropositivrate in HIV-Neudiagnosen 2009-2011.....	58
6.2	Geno- und Subtypverteilung in HCV-Infektionen der HIV-Neudiagnosen zwischen 2009-2011..	59
6.3	Einfluss soziodemografischer Faktoren auf HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen 2009-2011 .	61
7.	Schlussfolgerung.....	64
8.	Literaturverzeichnis	65
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	70
10.	Danksagung.....	71
11.	Anhang.....	72

1. Zusammenfassung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) gehört zu den durch Blut übertragenen Erregern mit der höchsten Bedeutung für die öffentliche Gesundheit. Aufgrund ähnlicher Transmissionswege werden HIV/HCV-Koinfektionen häufig beobachtet, insbesondere bei intravenösen Drogengebrauchern (IVD) und Männern, die Sex mit Männern, haben (MSM). Mit der Zulassung hocheffektiver, nebenwirkungsarmer antiviraler HCV-Medikamente (engl.: direct acting antivirals (DAA)) im Jahr 2011 wurde die Voraussetzung für die Eliminierung von HCV-Infektionen in der Zukunft geschaffen.

Ziel dieser Bachelorarbeit ist es einen Überblick über den Anteil von HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen vor Einführung der Hepatitis-C-DAA-Therapie im Jahr 2011 in Deutschland zu gewinnen. Die Ergebnisse dieser Studie sollen als Basis für nachfolgende Studien zur Beurteilung des potentiellen Einflusses der DAA-Therapie auf den Anteil und die Art der HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen in Deutschland dienen.

Dazu wurden filtergetrocknete Serumproben/Plasmaproben (DSS/DPS) von 1511 HIV-Neuinfizierten, mit HIV-Erstdiagnose zwischen Oktober 2009 und Juni 2011, auf HCV untersucht. Die Proben wurden zunächst mittels Enzymimmunoassay (ELISA) serologisch auf HCV untersucht. Aus den DSS/DPS ELISA-reaktiver Proben wurden die Nukleinsäuren extrahiert und anschließend mithilfe einer quantitativen PCR (qPCR) auf das Vorhandensein von HCV-RNA untersucht. Proben mit einem positiven Nachweis von HCV-RNA wurden mittels nested-PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung weiter analysiert, um den HCV-Geno- und Subtyp zu bestimmen. Die Charakterisierung der identifizierten HCV-Infektionen erfolgte auf Basis der demografischen Verteilung im untersuchten Studienpanel, bezüglich Geschlecht, Alter, Herkunft und der Transmissionsgruppe.

In den 1511 untersuchten DSS/DPS von HIV-Neuinfizierten in Deutschland wurde ein Anteil von 5,4% als HCV-seropositiv identifiziert. Darunter befanden sich 4,1% mit aktiver HCV-Infektion und 1,3% mit ausgeheilte HCV-Infektion. Die Untersuchung der HCV-RNA-positiven Proben zeigte, dass hauptsächlich Genotyp 1-Infektionen (57,5%) mit Subtyp 1a (38,3%), gefolgt vom Genotyp 3 (29,8%) mit ausschließlich Subtyp 3a, vorlagen.

Das untersuchte Studienpanel bestand hauptsächlich aus Männern (85,1%), dennoch wurde vergleichsweise ein höherer Anteil an Frauen HCV-seropositiv getestet (4,6% vs. 10,0%).

Innerhalb der verschiedenen Altersgruppen konnte der höchste Anteil an HCV-Seropositiven in der Altersgruppe der 25- bis 29-Jährigen (7,8%) identifiziert werden. In Personen nicht-deutscher Herkunft wurde ein höherer Anteil HCV-seropositiv getestet, als in Personen deutscher Herkunft (8,0% vs. 4,4%). Die Mehrheit kam dabei aus Osteuropa (59,3%) und gab IVD als wahrscheinliche Transmissionsgruppe (50,0%) an. In IVDs, unabhängig davon welcher Herkunft, wurde mit 75,5% ein sehr hoher Anteil HCV-seropositiv getestet. Diese Gruppe wies im Vergleich zu den anderen Transmissionsgruppen ein 98,8-fach höheres Risiko einer HCV-Infektion auf. In MSM wurde nur ein geringer Anteil von 2,0% HCV-seropositiv getestet.

1.1 Summary

The hepatitis c virus (HCV) is a blood-borne human pathogen and a major public health problem. Due to similar transmission routes, HIV/HCV coinfections often occur together, especially among high risk groups like intravenous drug users (IVD) and men who have sex with men (MSM). The approval of highly effective, low-side-effect direct acting antivirals (DAA) in 2011 created a precondition for the elimination of HCV infections in the future.

The aim of this bachelor thesis is to get an overview of HCV infections in individuals newly diagnosed with HIV before the introduction of the new HCV direct acting antivirals in Germany in 2011. The results of this study should serve as a basis for further analysis to assess the potential impact of DAA therapy on the proportion and characteristics of HCV infections in new HIV diagnoses in Germany.

Therefore filter-dried serum/plasma spots (DSS/DPS) of 1511 newly HIV infected individuals, who were diagnosed with HIV between October 2009 and June 2011, were screened for Hepatitis C. The samples were first serologically analysed of HCV by an enzyme immunoassay (ELISA). Nucleic acids were then extracted from the ELISA reactive samples and further analysed for the presence of HCV RNA using quantitative PCR (qPCR). Samples with positive detection of HCV RNA were further analysed by nested-PCR, followed by Sanger-Sequencing to identify the HCV geno- and subtype. The characterisation of identified HCV infections was based on the demographic distribution of the study cohort in terms of gender, age, origin and transmission group.

In the 1511 analysed samples a proportion of 5.4% was identified as HCV seropositive. Among the 5.4% HCV seropositive individuals 4.1% had an active HCV infection whilst 1.3% had a resolved HCV infection. The analysis of HCV RNA positive samples for HCV genotyping showed that 57.5% had a genotype 1 infection with mainly subtype 1a (38.3%), followed by genotype 3 (29.8%) with only subtype 3a.

The study cohort mainly consisted of men (85.1%) but a comparatively higher proportion of women was tested HCV seropositive (4.6% vs. 10.0%). Within the different age groups, the highest proportion of HCV seropositive individuals was identified in the age group between 25 and 29 years (7.8%). Based on the origin, a higher proportion of individuals with non-German origin was tested HCV seropositive, compared to persons with German origin (8.0% vs. 4.4%).

The majority of non-Germans came from Eastern Europe (59.3%) and specified IVD as the most likely transmission group (50.0%). In IVDs, independent of their origin, a very high proportion of HCV seropositive individuals was identified (75.5%). This risk group had a 98.8-fold higher chance of getting infected with HCV compared to the other transmission groups. In MSM, only 2.0% were tested HCV seropositive.

2. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	engl.: complementary DNA (komplementäre DNA)
DAA	engl.: Direct-acting antivirals (direkte antiviral wirkende Substanzen)
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNSA	engl.: DNA (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPS	engl.: dried plasma spots (auf Filterpapier getrocknetes Plasma)
DSS	engl.: dried serum spots (auf Filterpapier getrocknetes Serum)
DTT	Dithiothreitol
ELISA	engl.: enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzymimmunoassay)
qeq	Genomäquivalent
GT	Genotyp
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IgG	Immunoglobulin G
IRES	engl.: internal ribosomal entry site (interne ribosomale Eintrittsstelle)
IVD	engl.: intravenous drug use (intravenöser Drogengebrauch)
IU	engl.: international unit (Internationale Einheit)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	engl.: messenger RNA (Boten-RNA)
MSM	engl.: men who have sex with men (Männer, die Sex mit Männern haben)
n	Anzahl
NK	Negativkontrolle
nt	Nukleotide

ORF	engl.: open reading frame (offener Leserahmen)
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PI	Protease Inhibitor
PK	Positivkontrolle
RdRp	engl.: RNA-dependent RNA polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RNSA	engl.: RNA (Ribonukleinsäure)
RNasin	engl.: Ribonuclease Inhibitor (Ribonuklease Hemmer)
rpm	engl.: rotations/ revolution per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UTR	engl.: untranslated Region (untranslatierter Bereich)
WHO	engl.: World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

3. Einleitung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist global einer der Hauptverursacher von Leberentzündungen und gehört neben HIV zu den im sexuellen Kontext und durch Blut übertragenen Erregern mit der höchsten Bedeutung für die öffentliche Gesundheit. In den frühen 1970er Jahren als Hepatitis-non-A, non-B Virus bezeichnet, konnte das Virus 1989 als eigenständiger Erreger molekularbiologisch erstmals identifiziert werden (Alter, *et al.*, 1989, Choo *et al.*, 1989).

3.1 Klassifizierung, Virusaufbau und Genom

3.1.1 Klassifizierung

Das Hepatitis-C-Virus (Abb. 1) ist ein behülltes, einzelsträngiges, hepatotropes RNA-Virus der Gattung *Hepacivirus* und gehört zur Familie der *Flaviviridae*.

Bedingt durch die hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) und den durch das Immunsystem des Wirts ausgeübten Druck, zeigt HCV eine hohe genetische Vielfalt. Basierend auf der Diversität des Genoms sind derzeit sieben strukturell unterschiedliche Genotypen (GT 1-7) mit 86 bestätigten Subtypen bekannt (Ordeig *et al.*, 2018). Die höchste Variabilität wird dabei in der Aminosäuresequenz in der hypervariable Region der E1 und E2 Glykoproteine beobachtet. Die Genome verschiedener Genotypen unterscheiden sich auf dem Nukleotidlevel zu mindestens 30% voneinander (Smith *et al.*, 2014). Die Subtypen innerhalb der einzelnen Genotypen variieren zwischen 20%-25% bezüglich ihres Nukleotidlevels. Die Unterscheidung in einzelne Geno- und Subtypen ist notwendig, um ein individuelles Therapieregime zu erstellen, aber kann auch dabei helfen die Dynamik der Epidemie durch Beobachtung zirkulierender Subtypen besser zu verstehen (Sarrazin, *et al.*, 2018).

3.1.2 Virusaufbau

Das infektiöse Virion besitzt einen Durchmesser von 55-56 µm und besteht aus einem sphärischen Nukleokapsid, das von einer lipidhaltigen Hülle umgeben ist (Bradley *et al.*, 1985; Yu *et al.*, 2007). Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit ein oder mehreren in Form von Spikes verankerten Oberflächenproteinen, den E1 und E2 Glykoproteinen (Yu *et al.*, 2007). Das Nukleokapsid ist aus mehreren Kopien eines Coreproteins und der einzelsträngigen Virus RNA mit positiver Polarität ((+)ssRNA) aufgebaut (Chevaliez and Pawlotsky, 2006).

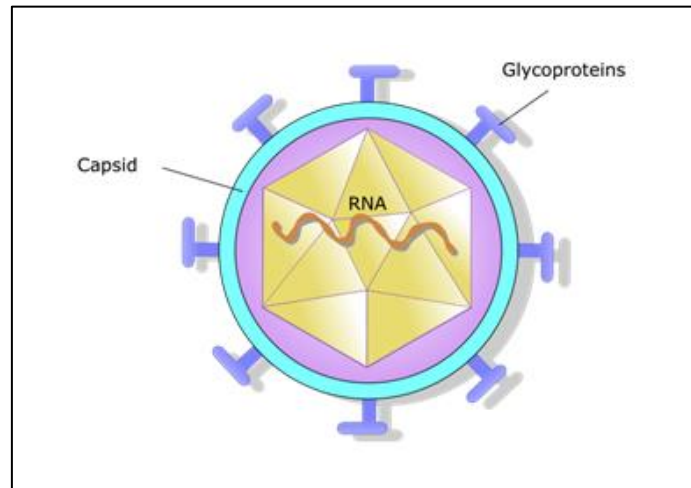


Abbildung 1: Modell eines HCV-Partikels. Bearbeitet nach Quelle: (Wee, 2017), abgerufen am: 12.12.2018.

3.1.3 HCV Genom

Das HCV Genom besteht aus einem langen offenen Leserahmen (open reading frame; ORF) mit rund 9500 Nukleotiden (nt) und wird von einem 5'- sowie 3'-untranslatierten Ende (engl.: untranslated Region; UTR) flankiert (Abb. 2). Das ORF kodiert für ein einziges Polyprotein von etwa 3015 Aminosäuren Länge und wird ko- und posttranslational von viralen und zellulären Proteasen in zehn reife Strukturproteine und Nicht-Strukturproteinen gespalten. Drei Strukturproteine (Core, E1 und E2) befinden sich am Aminoende des Polyproteins und sieben Nicht-Strukturproteine (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) verteilen sich über die restliche Länge des Polyproteins (Abb. 2)(Lauer and Walker, 2001).

Die 5' UTR des langen ORFs ist hoch konserviert und besteht aus vier Domänen, die die Genomreplikation und die Proteintranslation steuern sowie die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) bilden. Die 3' UTR ist ebenfalls hoch konserviert und ist an der Replikation sowie Stabilisation der RNA beteiligt (Shi and Lai, 2006).

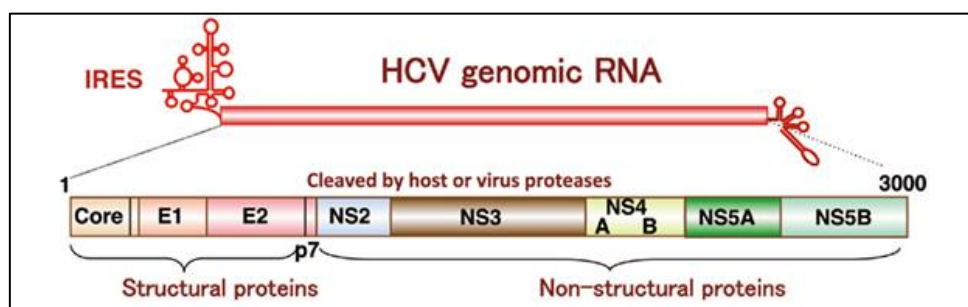


Abbildung 2: Aufbau des HCV-RNA Genoms. Bearbeitet nach Quelle: (Moriishi and Matsuura, 2012).

3.2 Infektionsverlauf und Diagnose

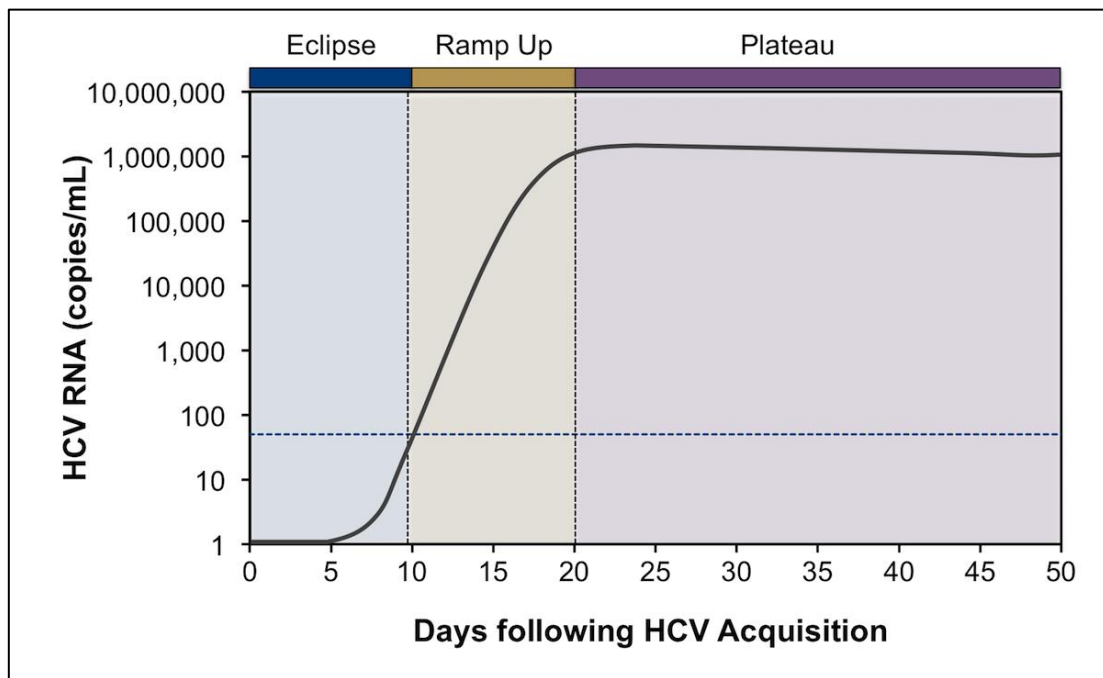
Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus können sowohl akut als auch chronisch verlaufen. Unter einer akuten HCV-Infektion versteht man eine kürzer als 6 Monate bestehende Infektion mit HCV. Bei 15%-40% der Betroffenen kommt es innerhalb dieser Zeit zu einer spontanen Ausheilung der Infektion (Westbrook and Dusheiko, 2015). Die Faktoren, die eine spontane Ausheilung begünstigen, sind bislang nicht im Detail aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene genetische Faktoren, wie das „IL28b inheritance“ Allel, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit das Virus zu eliminieren, assoziiert sind (Grebely *et al.*, 2014). In etwa 60%-80% der Fälle verläuft eine HCV-Infektion chronisch (länger als 6 Monate bestehende Infektion, mit nachweisbarer HCV-RNA im Blut) (World Health Organization, 2017). Akute sowie chronische HCV-Infektionen verlaufen oftmals asymptomatisch oder mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, unspezifischen Oberbauchbeschwerden und Leistungsinsuffizienz und werden deswegen oft erst spät diagnostiziert (Westbrook and Dusheiko, 2015).

Aufgrund der späten Diagnose kommt es bei 15%-30% der chronisch Infizierten in den darauffolgenden 20-30 Jahren zu Spätfolgen, wie Leberzirrhosen oder Leberzellkarzinomen (Hofstraat, *et al.*, 2017, World Health Organization, 2017).

Um Betroffene optimal behandeln zu können, muss eine Hepatitis-C-Infektion diagnostiziert und molekular charakterisiert werden. Die Diagnostik von HCV läuft nach einem vorgegebenen Ablaufschema (Abb. 4).

HCV-RNA kann bereits 1 bis 2 Wochen nach Infektion im Blut der infizierten Person detektiert werden. Die Zeit zwischen Infektion und Detektion viraler RNA wird „Eclipse Phase“ genannt, gefolgt vom sogenannten „Ramp Up“ in der die RNA Replikation exponentiell steigt. Die Entwicklung spezifischer Antikörper (Serokonversion) findet meist innerhalb von 2 Wochen bis 6 Monaten nach der Infektion statt (Abb. 3). Die Phase, in der die HCV-Antikörper noch nicht nachweisbar sind, wird auch „serologisches Fenster“ genannt. Mit den heutigen Methoden sind HCV-Antikörper nach rund 7 bis 8 Wochen der Infektion messbar (World Health Organization, 2018). Das HCV-Antigen ist bereits vor Serokonversion nachweisbar.

A



B

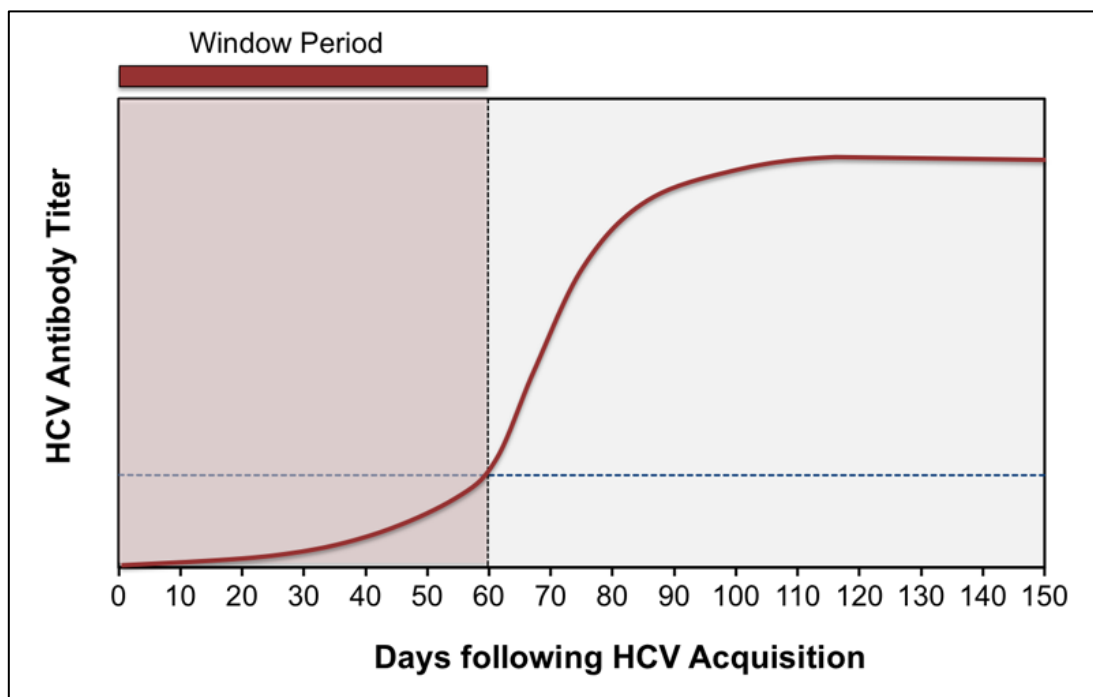


Abbildung 3: Verlauf der HCV-RNA (Kopien/ml, A) sowie des HCV-Antikörper Titers (B) nach erfolgter HCV-Infektion.
Quelle: (Fox & Spach, 2018).

Um eine HCV-Infektion nachzuweisen, wird Serum in einem sogenannten Suchtest untersucht. Bei diesem handelt es sich um einen Enzymimmunoassay (ELISA), der HCV-Antikörper (anti-HCV) detektieren kann. Heutzutage werden in der Diagnostik kommerzielle ELISA-Kits der 4. Generation verwendet, die neben HCV-Antikörpern auch HCV-Antigene nachweisen können.

Bei einer positiven Reaktion erfolgt ein Bestätigungstest zum direkten Erreger-Nachweis mittels Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT). Wird HCV-RNA nachgewiesen, wird von einer „aktiven“ oder virämischen Infektion gesprochen. Im Falle eines negativen Tests auf HCV-RNA sollte ein anschließender Immunoblot auf weitere HCV-Antikörper durchgeführt werden. Fällt der Immunoblot, bei negativem HCV-RNA-Nachweis positiv aus, spricht man von einem bestätigten Nachweis der HCV-Antikörper und die Infektion gilt als „ausgeheilt“. Ein Nachweis von HCV-RNA, bei gleichzeitigem negativem Immunoblot-Ergebnis, spricht für eine sehr frühe Diagnose im Stadium vor oder während der Serokonversion (Sarrazin, *et al.*, 2018).

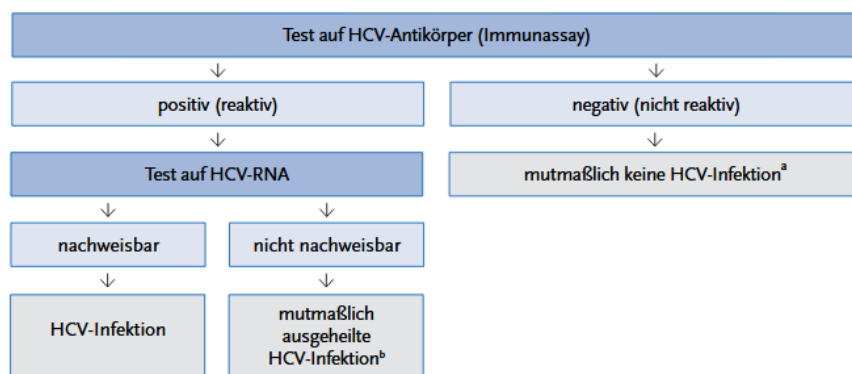


Abbildung 4: Diagnostischer Ablauf bei Verdacht einer Hepatitis-C-Infektion. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. Bearbeitet nach Quelle: (GBE-Themenheft: Hepatitis C, Robert Koch-Institut, 2016).

3.3 Übertragungswege

HCV wird fast ausschließlich durch Blut übertragen, wobei bereits kleinste Mengen virushaltigen Bluts ausreichend sind (GBE-Themenheft: Hepatitis C, Robert Koch-Institut, 2016).

Eine Ansteckungsgefahr besteht so lange wie HCV-RNA im Blut nachweisbar ist, was bedeutet, dass ein Risiko der Übertragung auch vor Serokonversion besteht (Epidemiologisches Bulletin Nr.29, Robert Koch-Institut, 2018). Der hauptsächliche Übertragungsweg ist das gemeinsame Verwenden von Utensilien bei intravenösen Drogengebern (IVD). Die hohe Stabilität des Virus in der Umwelt und auf Flächen begünstigt die Übertragung durch kontaminierte Nadeln, Löffel und Sniefröhrchen (GBE-Themenheft: Hepatitis C, Robert Koch-Institut, 2016). Auch die Übertragung über sexuelle Kontakte ist möglich, wobei insbesondere verletzungsträchtige Sexualpraktiken und häufig wechselnde Sexualpartner/innen das Risiko einer Infektion erhöhen. Somit stellen vor allem Männer, die Sex mit Männern haben (MSM) eine Risikogruppe dar. Früher galt auch der Erhalt von Blutprodukten als Risikofaktor. Seit 1991

werden in Deutschland Blutspenden und Spenderorgane jedoch auf das Hepatitis-C-Virus untersucht, sodass die Übertragung durch Transfusionen und Organtransplantationen deutlich gesenkt werden konnte (Prati, 2006). In Entwicklungsländern allerdings sind insbesondere kontaminierte Blutprodukte sowie kontaminierte Instrumente während einer medizinischen Behandlung der Haupttransmissionsweg (Morozov and Lagaye, 2018). Beruflich bedingte Infektionen sowie vertikale Übertragung von Mutter zu Kind sind ebenfalls ein möglicher, aber ein sehr selten vorkommender Übertragungsweg (GBE-Themenheft: Hepatitis C, Robert Koch-Institut, 2016).

3.4 HIV/HCV-Koinfektionen

HIV/HCV-Koinfektionen kommen aufgrund gleicher Transmissionswege besonders häufig vor. Laut WHO sind von den weltweit rund 36,7 Millionen HIV-Infizierten im Jahr 2015 2,3 Millionen (6,3%) HCV-positiv. Geschätzt sind davon über die Hälfte (1,36 Millionen; 59,1%) derzeitige Drogenkonsumenten (World Health Organization, 2017). Studien zeigen, dass HIV/HCV-Koinfektionen mit einem höheren Progressionsrisiko zur höhergradigen Leberfibrose und zum Leberzellkarzinom assoziiert sind. Zudem besteht die Assoziation mit einer erhöhten HCV-Replikation sowie einer geringeren Wahrscheinlichkeit HCV spontan auszuheilen (Chen, Feeney and Chung, 2014). Der genaue Interaktionsmechanismus beider Viren ist jedoch noch nicht im Detail bekannt. Allerdings könnte der bei einer HIV-Infektion auftretende quantitative Verlust an T-Gedächtniszellen für die erhöhte HCV-RNA-Konzentration bei einer Koinfektion verantwortlich sein (Hernandez & Sherman, 2011). HIV/HCV-Koinfektionen sind insbesondere unter IVDs und MSM häufig. Aber auch die Übertragungsraten von Mutter zu Kind steigt bei Koinfektionen drastisch. Das Risiko einer Übertragung des Hepatitis-C-Virus erhöht sich bei einer zusätzlichen HIV-Infektion der Mutter um das Zwei- bis Dreifache (Pappalardo, 2003, Epidemiologisches Bulletin Nr.29, Robert Koch-Institut, 2018).

3.5 Therapie

Erste Versuche HCV-Infektionen zu heilen basierten auf der Verabreichung von antiviral wirkenden Interferonen. Von 2001 bis 2011 galt die Kombination eines Pegyliertem-Alfa-Interferons mit Ribavirin als Standardbehandlung (Abb. 6). Beide Präparate wurden über einen Zeitraum von 24 bis 48 Wochen eingenommen. Ein anhaltendes virologisches Ansprechen (engl.: „sustained virological response“ (SVR), bei dem das Virus nicht mehr im Blut des Patienten nachgewiesen werden kann) wurde jedoch nur in rund 60% der Patienten beobachtet und war stark vom HCV-Genotyp abhängig (Calvaruso and Crax, 2011). Zudem traten nicht selten erhebliche Nebenwirkungen während der Behandlung auf (KBV & Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2001).

Mitte 2011 wurde die erste Generation antiretroviraler Medikamente (engl.: direct-acting antivirals; DAAs) eingeführt (Zulassung in Deutschland: Juli 2011; Zulassung in den USA: Mai 2011) (European Medicine Agency, 2011). Dabei handelt es sich um NS3/4A Protease Inhibitoren (PI), die durch die Blockade der viralen Protease die Translation und Polyprotein-Prozessierung des Virus verhindern (Abb. 5) (HIVreport, Deutsche AIDS-Hilfe, 2011). 2014 wurde die zweite Generation DAAs zugelassen, die, zusätzlich zu den NS3/4A-Protease-Inhibitoren, zwei neue Medikamentenklassen beinhaltet: Inhibitoren des NS5A-Komplexes, die die Zusammensetzung der Virionen und die Freisetzung der Viren verhindert sowie Inhibitoren der NS5B Polymerase, welche die Replikation blocken (Abb. 5) (Spengler, 2018).

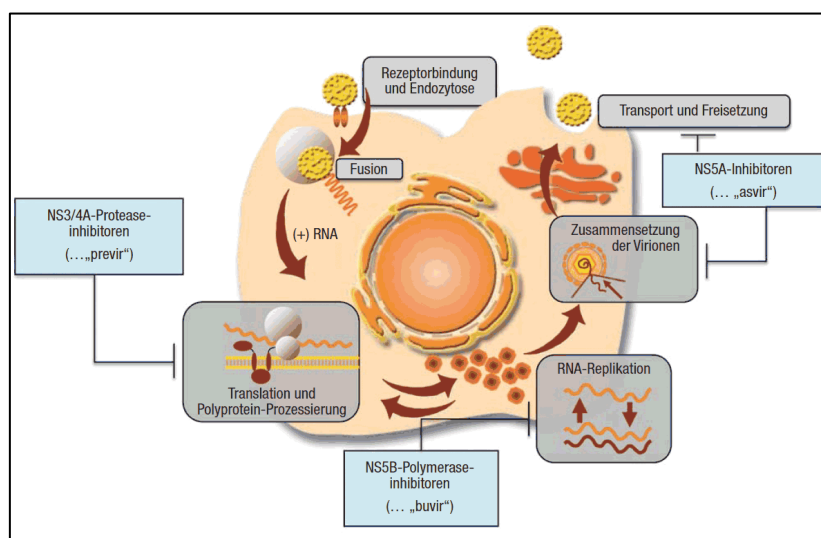


Abbildung 5: Angriffspunkte der derzeitigen antiviralen Medikamente. Quelle: (Zeuzem, 2017).

Im Gegensatz zur ersten Generation zeigen die Inhibitoren der zweiten Generation ein erhöhtes intrinsisches, antivirales Potenzial sowie eine geringere Anfälligkeit gegenüber viraler Resistenzbildung. Weiterhin wird die DAA-Therapie in den meisten Fällen gut vertragen, ermöglicht aufgrund des großen Therapiespektrums und viraler Kombinationsmöglichkeiten eine sehr effektive Behandlung über alle Genotypen hinweg sowie in vorbehandelten Personen mit Leberzirrhose und Personen mit Koinfektionen wie HIV (Epidemiologisches Bulletin Nr.29, Robert Koch-Institut, 2018). Heutzutage lassen sich rund 95% der HCV-Infizierten innerhalb weniger Wochen aufgrund des enormen Fortschritts der letzten Jahre heilen (World Health Organization, 2017).



Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der HCV Medikamentenentwicklung von 1970 bis 2016. Quelle: (Cure Hepatitis C, 2016), abgerufen am 18.12.2018.

3.6 Epidemiologie

3.6.1 Prävalenz

Nach Schätzungen der WHO waren im Jahr 2015 weltweit 71 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert (World Health Organization, 2017). Jährlich infizieren sich geschätzte 1,75 Millionen Menschen neu mit HCV, während im selben Zeitraum etwa 399.000 Menschen an den Spätfolgen einer HCV-Infektion versterben (World Health Organization, 2017).

Die HCV-Prävalenz variiert weltweit stark in den unterschiedlichen Regionen (Abb. 7). Niedrige Prävalenzen virämischer Infektionen (zwischen 0-0,8%) sind insbesondere in Westeuropa, Kanada und in Teilen Asiens zu finden. In Nordafrika und Osteuropa hingegen ist die Verbreitung von HCV in der Bevölkerung sehr hoch, mit einer virämischen Prävalenz von 6,3% in Ägypten und 3,3% in Russland (Blach *et al.*, 2017).

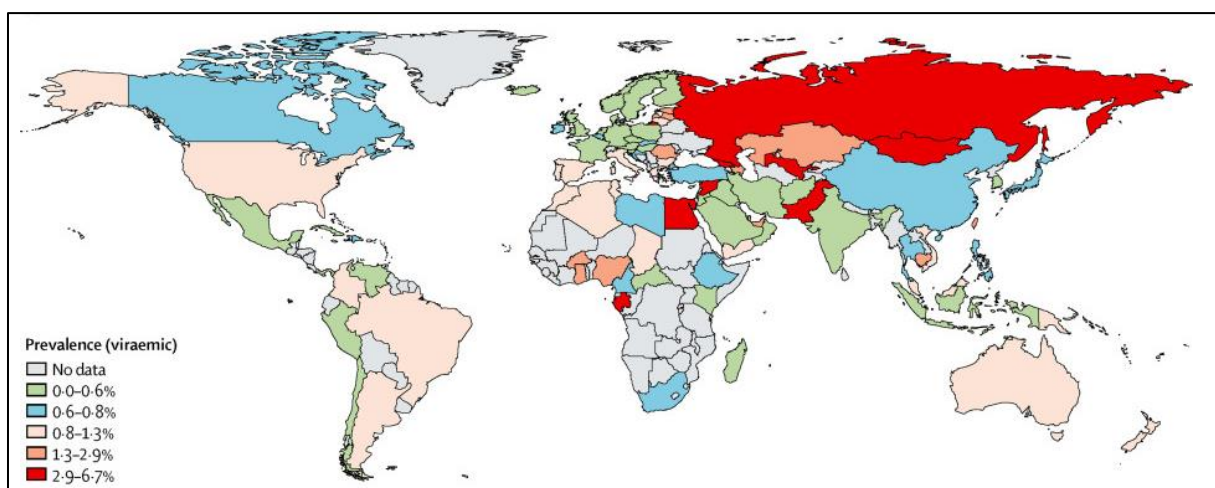


Abbildung 7: Schätzung der virämischen HCV-Prävalenz weltweit (Ende 2015). Quelle: (Blach *et al.*, 2017).

Insgesamt wird der Anteil virämischer HCV-Infektionen weltweit auf 1,1% geschätzt. Die globale HCV-Antikörperprävalenz liegt dagegen bei etwa 1,6% (Gower *et al.*, 2014). Innerhalb der WHO-Region Europa misst die Spanne der Antikörperprävalenz zwischen 0,1 % in Irland und bis zu 13 % in Usbekistan (Epidemiologisches Bulletin, Nr.31, Robert Koch-Institut, 2018).

Mit der Zulassung der DAAs im Jahr 2011 steht eine effektive, sichere und gut verträgliche Therapie zur Verfügung, sodass in Zukunft mit einem Rückgang der Prävalenz zu rechnen sein kann (Epidemiologisches Bulletin Nr.29, Robert Koch-Institut, 2018). Neueren Studien zufolge wird in ersten Ländern bereits von einem Rückgang der Prävalenz

berichtet, unter anderem in Ägypten (Epidemiologisches Bulletin, Nr.30, Robert Koch-Institut, 2017).

3.6.2 Geno- und Subtypverteilung

Genotyp 1 stellt mit 44% den weltweit am weitesten verbreiteten Genotyp dar, gefolgt von Genotyp 3 mit 25% und Genotyp 4 mit 15% (Abb. 8) (Blach *et al.*, 2017). Infektionen mit dem HCV-Genotyp 2 treten weltweit in 13% der Fälle auf (Gower *et al.*, 2014). Genotyp 5 spielt nur eine sehr untergeordnete Rolle bei weniger als 1% der Infizierten weltweit (Abb. 8) (Epidemiologisches Bulletin, Nr.31, Robert Koch-Institut, 2018). In Europa, Nordamerika und Australien sind schätzungsweise 46% der HCV-positiven Personen mit dem Genotyp 1 infiziert, 30% mit dem Genotyp 3 und 23% mit den Genotypen 2,4 und 6 (Epidemiologisches Bulletin, Nr.31, Robert Koch-Institut 2018).

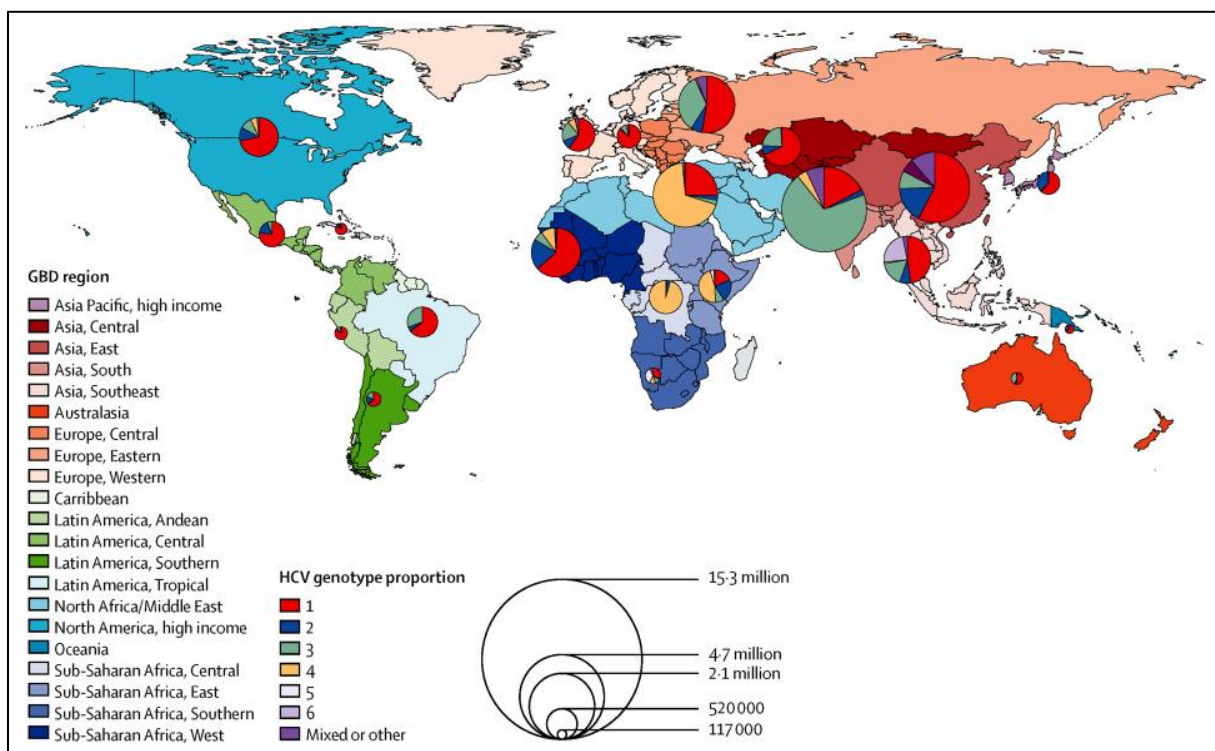


Abbildung 8: Modell der HCV-Genotypverteilung inklusive virämischer HCV-Infektionen der Global Burden Disease (GBD) Regionen 2015. Bearbeitet nach Quelle:(Blach *et al.*, 2017).

3.6.3 Situation innerhalb Deutschlands

Deutschland zählt laut einer „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ im internationalen Vergleich zu den Ländern mit niedriger Prävalenz für Hepatitis C, mit einer HCV-Antikörperprävalenz in der deutschen Allgemeinbevölkerung von 0,3% (95% Konfidenzintervall (KI) 0,1–0,5%) zwischen 2008 bis 2011 (Poethko-Müller *et al.*, 2013). Wie in anderen industrialisierten Ländern, zählen MSM, IVD, „IVD in Haft“ und Migranten aus HCV-Hochprävalenzländern zu den Risikogruppen.

HCV ist nach §7 Abs. 1 Satz 1 Nr. 22 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) meldepflichtig. Basierend darauf wurden dem Robert Koch-Institut (RKI) im Jahr 2017 4.798 Erstdiagnosen übermittelt, was einer Anzahl an Neuinfektionen (Inzidenz) von 5,8 Erstdiagnosen/100.000 Einwohner entspricht. Frauen sind in der Regel deutlich weniger oft von einer HCV-Infektion betroffen als Männer. Die Inzidenz der Erstdiagnosen lag bei den Männern mit rund 8,2 Erstdiagnosen/100.000 Einwohnern fast doppelt so hoch wie in der weiblichen Bevölkerung (mit 3,5/100.000 Einwohner). Sowohl bei Männern als auch Frauen sind HCV-Infektionen bei den 30- bis 39-Jährigen besonders häufig (Abb. 9). Die Inzidenz im Kindesalter (<15 Jahre) war mit 0,3 Erstdiagnosen/100.000 Einwohner gering. Generell ist in den letzten Jahren ein Rückgang der Zahlen zu beobachten (Epidemiologisches Bulletin Nr.29, Robert Koch-Institut, 2018). Wurden für das Jahr 2004 noch insgesamt 9044 Fälle von HCV-Erstdiagnosen übermittelt, waren es 2017 nur 4798 erstdiagnostizierte HCV-Fälle. Daten zu der Prävalenz von HCV in HIV-infizierten sind nicht vorhanden.

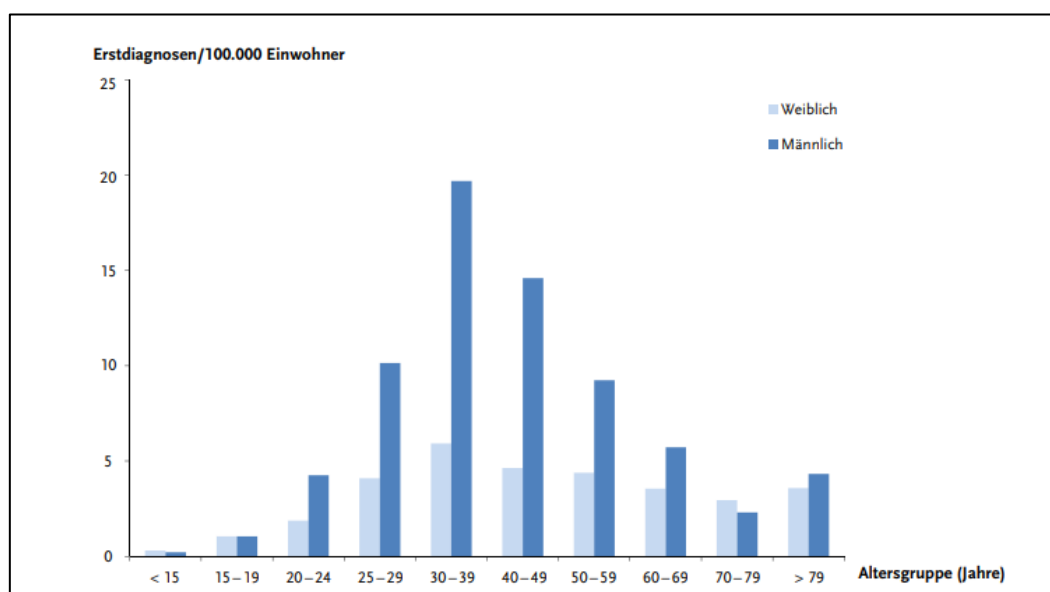


Abbildung 9: Zahl der übermittelten HCV-Erstdiagnosen pro 100.000 Einwohner nach Alter und Geschlecht innerhalb Deutschlands im Jahr 2017. Quelle: (Epidemiologisches Bulletin Nr.29, Robert Koch-Institut, 2018).

3.7 Zielstellung

Ziel dieser Bachelorarbeit ist es einen Überblick über den Anteil von HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen vor Einführung der Hepatitis-C-DAA-Therapie im Jahr 2011 in Deutschland zu gewinnen. Im Rahmen der molekularen Surveillance von HIV am Robert Koch-Institut senden 82 Labore in ganz Deutschland dem Institut, zusammen mit einem anonymisierten Meldebogen, auf Filterpapier getropfte Serum- oder Plasmareste (dried serum spots; DSS or dried serum spots; DPS) der HIV-Neuinfizierten zu. Diese dienen als Ausgangsmaterial für die Identifikation und molekulare Charakterisierung von HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen im Zuge dieser Bachelorarbeit.

Mittels Enzymimmunoassay (ELISA) werden die Proben serologisch auf eine HCV-Infektion untersucht. Die von ELISA-positiven Proben extrahierten Nukleinsäuren werden anschließend mithilfe einer quantitativen PCR (qPCR) auf das Vorhandensein von HCV-RNA und damit einer aktiven (virämischen) HCV-Infektion analysiert. ELISA-positiv, aber qPCR-negativ Proben werden mittels Immunoblot auf eine bereits ausgeheilte HCV-Infektion untersucht. Die virale RNA aus den virämischen HCV-Infektionen wird zuerst in cDNA umgeschrieben und mittels nested-PCR sowie anschließender Sanger-Sequenzierung zur Bestimmung zirkulierender HCV-Geno- und Subtypen untersucht. Insgesamt können aus den erhobenen Daten, zusammen mit den Angaben aus den Meldebögen, die HCV-Positivrate in HIV-Neudiagnosen ermittelt und identifizierte HCV-Infektionen hinsichtlich Infektionsstatus (aktiv oder ausgeheilt), Geno- und Subtypverteilung und unter Berücksichtigung verschiedener demografischer Faktoren charakterisiert werden. Die Ergebnisse dieser Studie sollen als Basis für nachfolgende Studien zur Beurteilung des potentiellen Einflusses der DAA-Therapie auf den Anteil und die Art der HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen in Deutschland dienen.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Gerätename	Modell	Hersteller
Brutschrank	Heraeus B 6030	Heraeus
Extraktor	NucliSens easyMAG	bioMérieux
Geldokumentation	BioDocAnalyze	Biometra GmbH
Gelelektrophorese-Kammer	Mini Elektrophorese System	VWR International
Laminar	Bleymehl-Reinraumtechnik	Inden-Pier
Thermocycler	T 300 Thermocycler	Biometra GmbH
PCR Zyklus	Biometra Trio	Biometra GmbH
Vortexer	Top Mix	Thermo Scientific GmbH
Zentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG
Plate Washer	Infinite F200 Microplate	Tecan
Plate Reader	HydroFlex™ Microplate	Tecan
Real-Time PCR Zyklus	LightCycler 480 II	Roche Molecular Systems

4.1.2 Reagenzien

Reagenziename	Hersteller
100bp DNA Ladder (LS100)	Invitrogen
6x Ladepuffer Bromphenolblau	Thermo Scientific GmbH
1xTAE Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose Standard Rotigarose	Carl Roth GmbH + Co. KG
dNTP Mix	Thermo Scientific GmbH
GelRed	Biotium
NucliSENS easyMAG Magnetic Silica (Beads)	bioMérieux
NucliSENS easyMAG Extraktionspuffer 1	bioMérieux
NucliSENS easyMAG Extraktionspuffer 2	bioMérieux
NucliSENS easyMAG Extraktionspuffer 3	bioMérieux
NucliSENS easyMAG Lysispuffer	bioMérieux

4.1.3 Kits

Kitname	Hersteller
HotstarTaq Master Mix	Qiagen
Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA V2	Bio-Rad Laboratories
recomLine HCV IgG	Mikrogen Diagnostik
RNasin	Promega
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT)	Thermo Scientific GmbH
SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit	Thermo Scientific GmbH

4.1.4 Kontrollen

Kontrolle	
Negativkontrolle	HCV-negatives Plasma
Positivkontrolle	HCV-positives Plasma

4.1.5 Equipment

Materialname	Modell	Hersteller
96-Well-Platte	LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Molecular Systems
Aspirator	FTA-1	Biosan
Becherglas	200ml	Duran
Extraktions-Einwegbehälter	NucliSENSeasyMAGDisposables	bioMérieux
Falkon-Röhrchen	15ml, 50ml	Sarstedt AG&CO
Folie für die qPCR	LightCycler 480 Sealing Foil	Roche Molecular Systems
Handschuhe	NeoTouch	Ansell
Kombitip	Combitips advanced®25ml, 50ml	Eppendorf AG
Messzylinder	400ml, 1000ml	Brand™
Multipette plus	1µl-10ml	Eppendorf AG
Pipetten	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG
Pipetten, ArtTips	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Thermo Scientific GmbH
Pipetten, ClipTip	10µl, 30-300µl	Thermo Scientific GmbH
Pipette, automatisch	e1200	Sartorius
Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen	10, 20, 100, 200, 1000 µl	Thermo Scientific GmbH
Pipettenspitzen, epT.I.P.S.	20-200µl	Eppendorf-AG
Pipettenspitzen, ClipTip	300µl	Thermo Scientific GmbH
Reaktionsgefäße	0,2ml, 1,5ml, 2ml	Sarstedt AG&CO

4.1.6 Gerätesoftware

Software name	Hersteller
BioDocAnalyse	Biometra GmbH
Geneious 11.1.5	Biomatters
Magellan	Tecan
Stata	Stata Corp

4.1.7 Webtools

Webtoolname	Hersteller
Geno2Pheno	Max Planck Institut für Informatik
HCV Phylogenetic Typing Tool 2.4	Genome Detective
NCBI Genotyping	National Center for Biotechnology Information

4.1.8 Primer

Alle Primer wurden bei TIB MolBiol Berlin in Auftrag gegeben.

Primernamen	Richtung	Sequenz	Region
235	Antisense	AGT ACC ACA AGG CCT	5'UTR
238	Sense	GAG GAA CTA CTG TCT TCA CG	5'UTR
239	Antisense	TCG CAA GCA CCC TAT CAG	5'UTR
240	Sense	CGT CTA GCC ATG GCG TTA G	5'UTR
255	Sense	AGY GTT GGG TYG CGA AAG	5'UTR
256	Antisense	CAC TCG CAA GCR CCC T	5'UTR
259	Sense	GCT GYT TTG AYT CAA CNG TCA C	NS5B
257	Sense	GGG TTY TCN TAT GAY ACC MGV TGY TTT GA	NS5B
270	Antisense	TAY CTG GTC ATA GCY TCC GTG AAR G	NS5B
271	Sense	ACC ACA TCM RST CCG TGT GG	NS5B
272	Sense	TCC GTG TGG RAR GAC YTS CTR GA	NS5B
275	Antisense	CTS GTC ATA GCY TCC GTG AA	NS5B
305	Sense	CTC CGT MTG GGA GGA CTT GC	NS5B

Random
Hexamer Primer

4.1.9 Sonden

Sondenname	Richtung	Sequenz	Hersteller
HCV-TM-5	Sense	FAM 5'CCT TGT GGT ACT GCC TGA 3'MGB	Thermo Scientific GmbH

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeitsablauf

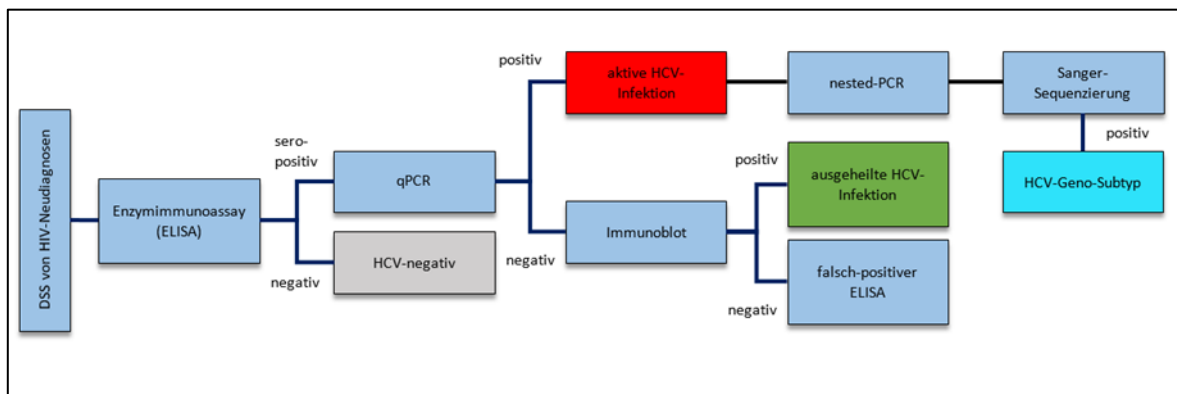


Abbildung 10: Schematischer HCV-Versuchsablauf.

DSS/DPS wurden zunächst serologisch mittels ELISA auf eine HCV-Infektion untersucht. Die weitere Einteilung in aktive und ausgeheilte Infektionen sowie der Ausschluss falsch-positiver ELISA-Reaktionen erfolgte mithilfe einer quantitativen Real-time PCR (qPCR) und einem Immunoblot (Abb. 10). Die qPCR-positiven Proben wurden anschließend mittels nested-PCR und Sanger-Sequenzierung geno- und subtypisiert.

4.2.2 Enzymimmunoassay (ELISA)

Der Enzymimmunoassay (ELISA) ist eine in der Immunologie weit verbreitete Methode zum Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit (Monolisa™ HCV Ag-Ab ULTRA V2) zur Detektion von Anti-HCV-Antikörpern und/oder dem HCV-Kapsidantigen verwendet. Die ELISA-Platten sind mit zwei rekombinanten Proteinen aus der nicht-strukturgebenden Region (NS3 und NS4) und einem Peptid aus der strukturgebenden Region (Kapsid) des Hepatitis-C-Virus sowie einem monoklonalen Antikörper gegen das Hepatitis-C-Kapsid beschichtet. Die Durchführung erfolgt nach den vorgegebenen Herstellerangaben (siehe Manual). Das erste Konjugat (100µl/Well) besteht aus einem biotinylierten monoklonalen Mausantikörper gegen das Hepatitis-C-Kapsid und wird zusammen mit den Kontrollen sowie den zu testenden Eluaten aus den DSS/DPS (50µl/Well) in die Mikrotiterplatte pipettiert. Sind Antikörper gegen HCV in der Probe vorhanden, binden diese an die auf der Platte enthaltenen Antigene. Ist in der Probe das Hepatitis-C-Kapsidantigen vorhanden, wird dieses von den auf der Platte beschichteten monoklonalen Antikörpern und den biotinylierten, monoklonalen Antikörpern gegen das Hepatitis-C-Kapsidantigen gebunden. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37°C erfolgt ein 5-faches Waschen (Programm 5: HCV BIOR) mit mindestens 370µl Waschpuffer. 100µl eines zweiten Konjugats, das einen peroxidasemarkierte Anti-Human-IgG-Antikörper und peroxidasemarkiertes Streptavidin enthält, wird auf die Mikrotiterplatte gegeben. Ist Human-IgG vorhanden, bindet das Anti-Human-IgG-Konjugat an die Humanantikörper. Das Peroxidase/Streptavidin-Konjugat bindet an das Biotin des ersten Konjugats, wenn in der Probe HCV-Kapsidantigen vorhanden ist. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wird das ungebundene Enzymkonjugat durch mehrmaliges Waschen entfernt. Ein Vorhandensein der Antigen-Antikörper-Peroxidase-Komplexe wird durch die Zugabe von 80µl/Well einer Substratslösung (TMB) detektiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nachdem die Reaktion mittels einer Schwefelsäurelösung (100µl/Well)

gestoppt worden ist, wird eine Spektrophotometermessung bei 450/620-700 Nanometer (Tecan Infinite F200 Microplate Reader) durchgeführt. Aus den gemittelten Absorptionswerten der mitgeführten Kontrollen kann ein Grenzwert (cut-off Wert) ermittelt werden, anhand dessen die getesteten Proben als reaktiv oder nicht reaktiv eingestuft werden können. Dabei ist die Intensität abhängig zur Konzentration gebundener HCV-Antikörper bzw. Antigene (vgl. Monolisa HCV Ag Ab Ultra V2 Gebrauchsanweisung; <https://docplayer.org/70138215-Monolisa-hcv-ag-ab-ultra-v2.html>).

4.2.3 Nukleinsäure-Extraktion

Als Ausgangsmaterial für die Extraktion von HCV-RNA dienen die auf Whatman #903 Filterpapier getropften DSS/DPS von HIV-Neudiagnosen. Mit dem bioMérieux Extraktionssystem NucliSens easyMAG[®] werden Nukleinsäuren (RNA und DNA) halbautomatisch mittels magnetischer Beads extrahiert (Abb. 11). In jeder Extraktion werden die entsprechenden Proben sowie eine Positiv- und Negativkontrolle (HCV-positives und HCV-negatives Plasma) mitgeführt. Dazu werden jeweils 2 DSS/DPS (1 DSS/DPS=100µl Serum/Plasma) in ein 2ml Reaktionsgefäß gesteckt und mit 1,5ml Lysispuffer versetzt. Für einige Proben stand nur 1 DSS/DPS zur Verfügung. Anschließend werden die Proben für eine Stunde bei 300rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Danach werden 1,2ml der lysierten Probe abgenommen und in Extraktions-Einwegbehälter mit 50µl vorgelegten Silica Beads überführt. Durch die Lyse der Proben kann die freie virale RNA an die zugegebenen Magnetpartikel binden. Die Proben werden mit einer Automatikpipette gemischt, die Einweggefäße im Extraktor positioniert und der Lauf gestartet (Protokoll: Generic 2.0.1; Menge: 0,2ml; Eluat: 40µl; Probenart: Serum). Im Gerät erfolgen dann mehrere Waschschritte, indem die Magnetpartikel mit der gebundenen Nukleinsäure über einen Magneten immobilisiert werden. Für die Elution wird das Reaktionsgefäß auf 60°C erhitzt, sodass sich die RNA magnetischen Silica Beads lösen. Nach Beendigung des Programms werden aus den 40µl Eluat je 10µl in 0,2ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Benutzung gelagert. Auch wenn bei der Extraktion mit dem NucliSens easyMag[®]-System sowohl RNA als auch DNA extrahiert werden, wird im folgendem, da HCV ein RNA-Virus ist, lediglich von RNA gesprochen.

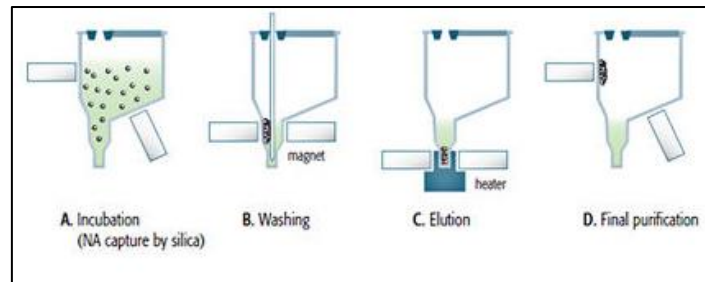


Abbildung 11: Prinzip der Nukleinsäure-Extraktion mittels NucliSens® easyMAG.

Quelle: (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/nuclisensr-easymag>), abgerufen am: 02.11.2018.

4.2.4 Quantitative Real-time PCR

Das Grundprinzip der PCR basiert auf der Vervielfältigung (Amplifikation) eines spezifischen Nukleinsäureabschnitts durch zyklische Wiederholungen der Replikation. Jeder Zyklus besteht aus 3 Schritten: Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Elongation. Bei einer Temperatur von 95°C werden die beiden Stränge einer DNA getrennt (Denaturierung), sodass die Primer an die ihr komplementäre Stelle auf der DNA binden können (Annealing). Dabei hängt die Temperatur der Primerhybridisierung (Tab. 2) von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ab. Im letzten Schritt füllt die Polymerase den Einzelstrang ausgehend von den Primern mit Nukleotiden auf (Elongation), sodass ein neuer Doppelstrang entsteht. Im Falle einer RNA als Ausgangsmaterial muss diese vorher durch reverse Transkription (RT) mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in eine komplementäre DNS (engl.: complementary DNA=cDNA) umgeschrieben werden (siehe 4.2.5.1), da die in einer PCR verwendete Polymerase eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ist. Die Kombination der reversen Transkription mit einer anschließenden PCR wird RT-PCR genannt. Die RT-PCR kann sowohl als one-step als auch two-step RT-PCR durchgeführt werden. Bei der one-step RT-PCR erfolgt die Umschreibung der RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase in einem PCR-Reaktionsansatz. Bei der two-step RT-PCR wird die RNA in einem ersten, unabhängigen Schritt in cDNA umgeschrieben und dann zum PCR-Ansatz hinzugefügt.

Die quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) basiert auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR und dient in der Labordiagnostik unter anderem zum direkten Nachweis von Erreger-RNA (Gibbs, 1990). Anders als bei der herkömmlichen PCR kann bei einer qPCR die Reaktion durch Zugabe einer fluoreszierenden Sonde in Echtzeit beobachtet und das Probenmaterial anschließend zuverlässig quantifiziert werden. Für die Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit bekannter Virusmenge in jeder Messung mitgeführt (10E+06 bis

10E+01). Anhand dieser kann ein Wert für die unbekannte Probe extrapoliert werden. Der resultierende Mean Cp (engl.: Crossing Point) der PCR positiven Proben diene zur späteren Berechnung der Viruslast (IU/ml). Der Cp-Wert (auch Ct-Wert (engl.: threshold cycle)) ist definiert als die Anzahl der Zyklen, die für das Fluoreszenzsignals nötig ist, um erstmals über den Hintergrundwert (ein definierter Schwellenwert) zu steigen. Es ist ein Maß für die Konzentration an Nukleinsäure in der PCR-Reaktion.

Die für die qPCR spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden (hier verwendet: TaqMan-Sonde) tragen an ihrem 5'-Ende einen fluoreszenten Reporter-Farbstoff (FAM) während das 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher-Farbstoff (MGB-NFQ) enthält. Aufgrund des örtlich geringen Abstandes beider Farbstoffe kommt es bei Anregung durch eine Lichtquelle zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) vom Report auf den Quencher. Die Lichtemission des Reporterfarbstoffes wird dabei durch den Quencher-Farbstoff inhibiert, sodass nur dieser das Licht emittieren kann. Dies geschieht so lange bis die *Taq* Polymerase auf die Sonde trifft. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Polymerase wird das 5'-Ende der Sonde abgespalten, wodurch eine räumliche Trennung beider fluoreszenter Farbstoffe erfolgt (Abb. 12). Das dabei emittierte Licht wird gemessen, wobei die Lichtemission des Reporterstoffes proportional zur Menge der amplifizierten RNA ist.

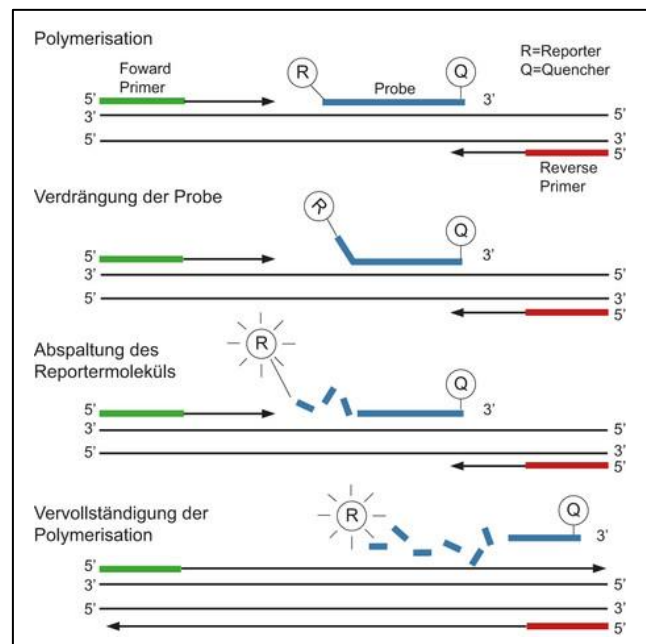


Abbildung 12: Prinzip einer quantitativen PCR (qPCR). Probe=Sonde. Quelle: (Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ), 2017), abgerufen am 27.11.2018.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben mittels einer one-step RT-qPCR amplifiziert. Dazu wurden 4µl der Proben-RNA in eine 96 Multiwell Platte pipettiert und mit den 8µl des vorgelegten Mastermixes gemischt. Für das Ansetzen des Mastermixes wurde mit dem PCR-Kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (ThermoFisher) gearbeitet. Die genaue Zusammensetzung des Mastermixes lautet wie folgt:

Tabelle 1: Zusammensetzung für den RT-qPCR Mastermix

RT-qPCR			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			0,6
2x SSIII/PlatTaq RT-PCR MM			6
Primer HCV-255	10µM	416nM	0,5
Primer HCV-256	10µM	416nM	0,5
Sonde HCV-TM5	10µM	167nM	0,2
Enzym-Mix			0,2
Σ			8
+Template (RNA)			4

Nach kurzem zentrifugieren wurde die Platte in den Lightcycler 480 II von Roche gestellt und die Proben nach folgendem Programm amplifiziert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Zyklusprogramm für die RT-qPCR

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
cDNA Synthese	50°C	15 min	1
Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C (ΔR 3°C/s)	15 sek	45
Annealing und Elongation	58°C (ΔR 1°C/s)	45 sek	45

4.2.5 Geno- und Subtypisierung

4.2.5.1 cDNA-Synthese

Die cDNA ist eine aus RNA, durch das Enzym reverse Transkriptase synthetisiert, komplementäre DNA. Die cDNA-Synthese erfolgt analog der zyklischen Replikation in einer PCR. Als Ausgangspunkt für die Synthese wird ein Primer benötigt, der an die RNA bindet. Dabei können Primer verwendet werden die komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind, random Hexamere oder spezifische Primer, um gezielt ein Transkript zu isolieren. In dieser Arbeit wurden Random Hexamer Primer verwendet, welche eine

Oligonukleotidmischung darstellen, die jeweils aus 6 zufälligen Nukleotiden bestehen und an unterschiedliche Positionen der RNA binden.

Um den Geno- und Subtyp der Proben, die in der vorangegangenen qPCR als aktive Infektion (RNA-positiv) identifiziert wurden, zu bestimmen, wurde die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer nested-PCR amplifiziert. Für die cDNA-Synthese wird die RNA zunächst für 4 Minuten auf 65°C denaturiert, um die räumliche Struktur der RNA aufzulösen (Tabelle 3). Währenddessen wird der Mastermix, wie in Tabelle 4 beschrieben, vorbereitet. Die Zugabe von RNasin (Promega) schützt die RNA vor Degradation durch RNase A, B oder C. Anschließend werden pro PCR-Ansatz 10µl Probe sowie 10µl Mastermix zusammenpipettiert und durch hoch-und runterpipettieren gemischt. Die cDNA-Synthese erfolgt anschließend nach folgendem Protokoll (Tab. 5). Nach der Synthese wurde die cDNA bis zum Gebrauch bei -25°C gelagert.

Tabelle 3: Zyklusprogramm für die Denaturierung der cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit [min]
Denaturierung	65°C	4
	4°C	Pause

Tabelle 4: Zusammensetzung für den cDNA-Synthese Mastermix

cDNA			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
RT-Puffer	5x	1x	4
dNTP	2,5mM	0,5mM	4
AS Primer R6	25µM	0,5µM	0,4
DTT	100mM	5mM	1
RNasin (Promega)	40U/µl	20U	0,5
SII (Invitrogen)	200U/µl	100U	0,4
Σ			10,4

Tabelle 5: Zyklusprogramm für die Synthese der cDNA

Schritte	Temperatur	Zeit [min]
Synthese	42°C	60
Hitzeinaktivierung	93°C	7
	4°C	Pause

4.2.5.2 Nested-PCR zur Geno- und Subtypisierung

Um die Spezifität und Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion zu erhöhen, kann nach einer ersten Amplifikation ein Teil des entstandenen PCR-Produktes entnommen und einer zweiten Amplifikation mit neuen Primern, die innerhalb der ersten beiden Primerpaare liegen, durchgeführt werden (nested-PCR). Die Primer der zweiten PCR binden auf dem Template (erstes PCR-Produkt) weiter innen, sodass alle unspezifischen PCR-Produkte aus der ersten PCR nicht mehr mit amplifiziert werden (Abb. 13)

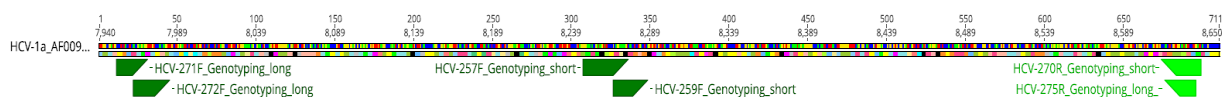


Abbildung 13: Prinzip einer nested-PCR mit den Primern der long und short nested-PCR.

Zur Genotypisierung von HCV können sowohl Sequenzen aus dem 5' UTR-Bereich sowie dem NS5B-Bereich des HCV-Genoms verwendet werden. Da der 5' UTR-Bereich jedoch hochkonserviert ist, lassen sich einzelne Subtypen nur schwer unterscheiden. Vor allem die Subtypen 1a und 1b sind schwer zu differenzieren, da sie sich lediglich in einer einzelnen Base an Position -99 in der 5' UTR unterscheiden (Chen and Weck, 2002). Deswegen findet die Subtypisierung von HCV aufgrund der hinreichend variablen Nukleotidsequenz üblicherweise in der NS5B-Region statt.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurden drei unterschiedliche two-step RT-nested-PCR-Assays verwendet, um von so vielen Proben wie möglich den Geno- und Subtyp bestimmen zu können: die „long“ und die „short“ nested-PCR, die beide im NS5B-Bereich des HCV-Genoms liegen sowie der 5' UTR nested-PCR, die in der 5' UTR liegt (im Folgenden als long nested-PCR, short nested-PCR und 5' UTR nested-PCR bezeichnet).

Begonnen wurde die Genotypisierung der Proben mit der long nested-PCR. Die hier verwendeten Primer decken einen weiten Teil der NS5B Region des HCV-Genoms ab. Die Primer der short nested-PCR spannen im Gegensatz zur long nested-PCR einen kleineren Abschnitt der NS5B Region ein, um eine höhere Wahrscheinlichkeit der Bindung sowie Stabilität der Polymerase zu gewährleisten. Hier wurden alle Proben amplifiziert, die im Gel nach der long nested-PCR negativ waren. Nur Proben, die nach der long nested-PCR sowie nach der short nested-PCR im Gel negativ erschienen sind, wurden mittels 5' UTR nested-PCR amplifiziert. Hintergrund für diese Art der Genotypisierung der Proben ist, dass sich auf den

Filtern degradierte RNA befindet. Der Erhalt eines PCR-Produkts ist demnach wahrscheinlicher, je kleiner das zu amplifizierende Stück ist (674bp long vs. 373bp short vs 215bp 5'UTR). Eine Typisierung der Proben hingegen ist genauer, je größer das PCR-Produkt ist. Alle Proben die nach einer der drei nested-PCRs positiv waren, wurden mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert (Abb. 14).

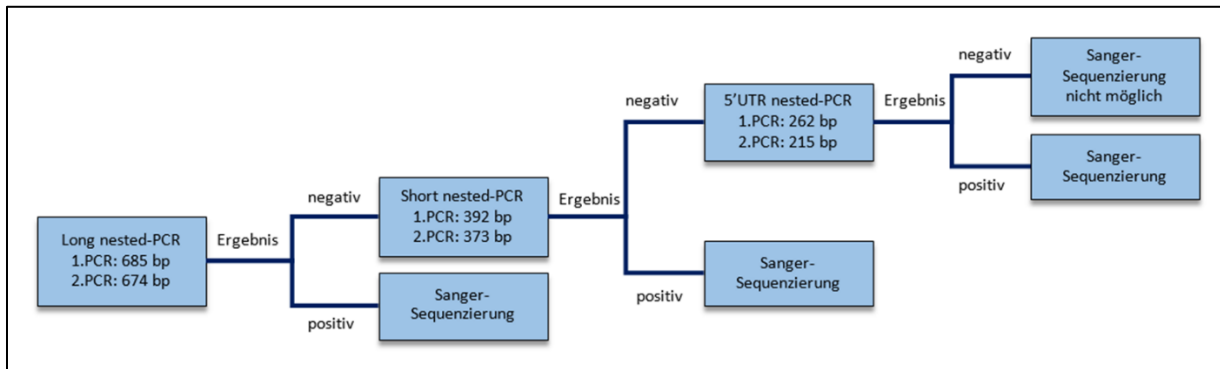


Abbildung 14: Ablauf der HCV-Genotypisierung mittels long nested-PCR, short nested-PCR und 5'UTR nested-PCR.

Bei der long nested-PCR wurde mit den äußeren Primern 271 (sense), 275 (antisense) und 305 (sense) ein 685bp großes PCR-Produkt amplifiziert (Tab. 6), dass in der zweiten PCR mit Hilfe der Primer 272 (sense) und 275 (antisense) insgesamt ein 674bp großes PCR-Produkt als Endergebnis hat.

Dazu wurden 11,5 µl des angefertigten Mastermixes mit 1µl des cDNA Templates vermischt und nach unten stehendem Programm amplifiziert (Tab. 6, 7).

Tabelle 6: Zusammensetzung für den long nested-PCR 1 Mastermix

1. PCR			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			0,875
Q-Solution	5x	1x	2,5
Primer HCV-271	10µM	400nM	0,5
Primer HCV-305	10µM	400nM	0,5
Primer HCV-275	10µM	400nM	0,5
BSA	20µg/µl	0,6µg/µl	0,375
HotStart Mastermix	2x	1x	6,25
Σ			11,5
+Template (cDNA)			1

Tabelle 7: Zyklusprogramm für die long nested-PCR 1

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Erstes Denaturieren	95°C	15min	1
Denaturierung	94°C	10sek	10
Primer Annealing	60°C ($\Delta T -1^\circ\text{C}$, $\Delta R 1^\circ\text{C/s}$)	30sek	10
Elongation	72°C	50sek	10
Denaturierung	94°C	10sek	30
Primer Annealing	52°C ($\Delta R 1^\circ\text{C/s}$)	30sek	30
Elongation	72°C	50sek	30
Elongation	72°C	2min	1
	16°C	Pause	

Dem PCR-Produkt wurde 0,75µl entnommen, mit einem zweiten Mastermix vermengt und erneut amplifiziert (Tab. 8, 9).

Tabelle 8: Zusammensetzung für den long nested-PCR 2 Mastermix

2.PCR			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			5
Primer HCV-272	10µM	200nM	0,25
Primer HCV-275	10µM	200nM	0,25
HotStart Mastermix	2x	1x	6,25
Σ			11,75
+Template (1.PCR)			0,75

Tabelle 9: Zyklusprogramm für die long nested-PCR 2

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Ersten Denaturieren	95°C	15min	1
Denaturierung	94°C	10sek	30
Primer Annealing	52°C ($\Delta R 1^\circ\text{C/s}$)	30sek	30
Elongation	72°C	50sek	30
Elongation	72°C	2min	1
	16°C	Pause	

Für die short nested-PCR wurden die Primer 257 (sense) sowie 270 (antisense) für die erste PCR (PCR-Produkt: 392bp) und die Primer 257 (sense), 259 (sense) und 270 (antisense) für die zweite PCR verwendet (PCR-Produkt: 373bp) (Tab. 10, 12).

Es wurden 11,5µl eines zuvor angefertigten Mastermixes mit 1µl des cDNA Templates vermengt und nach unten stehendem Programm amplifiziert (Tab. 11).

Tabelle 10: Zusammensetzung für den short nested-PCR 1 Mastermix

1.PCR			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			1
Q-Solution	5x	1x	2,5
Primer HCV-257	10µM	400nM	0,5
Primer HCV-270	10µM	400nM	0,5
BSA	20µg/µl	0,6µg/µl	0,75
HotStart Mastermix	2	1x	6,25
Σ			11,5
+Template (cDNA)			1

Tabelle 11: Zyklusprogramm für die short nested-PCR 1

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Erstes Denaturieren	95°C	15min	1
Denaturierung	94°C	10sek	10
Primer Annealing	60°C ($\Delta T -1^\circ C, \Delta R 1^\circ C/s$)	30sek	10
Elongation	72°C	40sek	10
Denaturierung	94°C	10sek	30
Primer Annealing	52°C ($\Delta R 1^\circ C/s$)	30sek	30
Elongation	72°C	40sek	30
Elongation	72°C	2min	1
	16°C	Pause	

Nach Ablauf der ersten PCR wurden 0,75µl des PCR-Produktes entnommen und in 11,75µl eines neuen Mastermixes (Tab. 12) überführt. Anschließend erfolgt eine wiederholte Amplifizierung der Proben (Tab. 13).

Tabelle 12: Zusammensetzung für den short nested-PCR 2 Mastermix

2.PCR			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			5
Primer HCV-257	10µM	200nM	0,25
Primer HCV-259	10µM	200nM	0,25
Primer HCV-270	10µM	200nM	0,25
HotStart Mastermix	2x	1x	6,25
Σ			11,75
+Template (1.PCR)			0,75

Tabelle 13: Zyklusprogramm für die short nested-PCR 2

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Ersten	95°C	15min	1
Denaturieren	94°C	10sek	30
Denaturierung	52°C (ΔR 1°C/s)	30sek	30
Primer Annealing	72°C	30sek	30
Elongation	72°C	2min	1
Elongation	16°C	Pause	

Für die 5' UTR nested-PCR wurden die Primer 238 (sense) und 239 (antisense) für die erste PCR verwendet (PCR-Produkt: 262bp) sowie Primer 235 (antisense) und 240 (sense, Tab. 14, 16) für die zweite PCR (PCR-Produkt: 215bp). Die Primerpaare wurden zusammen mit dem HotStarTaq Master Mix Kit, das die Polymerase enthält, und dem Bovin Serumalbumin (BSA) vermengt (Tab. 14). 11,5µl wurden dem Mix entnommen und mit 1 µl der cDNA aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte wie in Tabelle 15 beschrieben.

Tabelle 14: Zusammensetzung für den 5'UTR nested-PCR 1 Mastermix

1.PCR			Mastermix
Reagenz	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			3,5
Primer HCV-238	10µM	400nM	0,5
Primer HCV-239	10µM	400nM	0,5
BSA	20µl	0,6µg/µl	0,75
HotStart Mastermix	2x	1x	2x
Σ			11,5
+Template (cDNA)			1

Tabelle 15: Zyklusprogramm für die 5'UTR nested-PCR 1

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Erstes Denaturieren	95°C	15min	1
Denaturieren	94°C	10sek	40
Primer Annealing	56°C (ΔR 1°C/s)	30sek	40
Elongation	72°C	30sek	40
Elongation	72°C	2min	1
	16°C	Pause	

0,75µl des ersten PCR-Produktes wurden entnommen und dienen als Template für eine zweite PCR. Zusammen mit 11,75µl eines zweiten Mastermixes wurden die Proben erneut amplifiziert (Tab. 16, 17).

Tabelle 16: Zusammensetzung für den 5'UTR nested-PCR 2 Mastermix

2.PCR			Master Mix
Reagenzien	Konzentration Stocklösung	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser			5
Primer HCV-235	10µM	200nM	0,25
Primer HCV-240	10µM	200nM	0,25
HotStart Mastermix	2x	1x	6,25
Σ			11,75
+Template (1.PCR)			0,75

Tabelle 17: Zyklusprogramm für die 5'UTR nested-PCR 2

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Erstes Denaturieren	95°C	15min	1
Denaturieren	94°C	10sek	35
Primer Annealing	58°C (ΔR 1°C/s)	30sek	35
Elongation	72°C	30sek	35
Elongation	72°C	2min	1
	16°C	Pause	

4.2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg der PCR wurde durch das Auftragen der PCR-Produkte auf einem Agarosegel überprüft. In diesem werden die doppelsträngigen PCR-Produkte anhand ihrer Größe aufgetrennt. Mithilfe eines ebenfalls auf dem Agarosegel aufgetragenen Größenstandards (100 bp DNA Ladder (LS100); Invitrogen) kann die Größe des PCR-Produkts bestimmt und somit das Ergebnis der PCR durch eine sichtbare Bande auf der richtigen Höhe als positiv oder negativ bewertet werden. Unter Verwendung eines interkalierenden Farbstoffs (GelRed; Biotium) kann unter UV Licht (254nm) die jeweilige Bande detektiert werden. Nach der long nested-PCR liegt die zu erwartende Fragmentgröße nach der ersten PCR bei 685 Basenpaaren (bp) und nach der zweiten PCR bei 674 bp. Nach der short nested-PCR ist eine Bande nach der ersten PCR bei 392 bp und nach der zweiten PCR bei 373 bp zu erwarten. Nach der 5' UTR nested-PCR sollten die Banden nach der ersten PCR bei 262 bp und nach der zweiten PCR bei 215 bp zu sehen sein. Die Zusammensetzung des Gels ist der Tabelle 18 zu entnehmen. Zur Herstellung des Gels wurde TAE-Puffer zusammen mit 1,5% Agarosepulver in der Mikrowelle erhitzt und mit 1µl/10ml GelRed versetzt. Die Elektrophoresekammer wurde ebenfalls mit 1xTAE-Puffer befüllt. 2,5µl der Proben/Marker wurden mit 2,5 µl des 6x Ladepuffers vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Das Gel läuft bei 100 Volt für 40 Minuten. Das fertige Gel

wurde mittels der BioDocAnalyse Darkhood sowie gleichnamiger Software (Biometra) abfotografiert, bearbeitet und gespeichert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des 1,5%igen Agarosegels

Komponente	Volumen
Agarose	0,75g
1xTAE Puffer	50ml
GelRed	5 μ l

4.2.5.4 Sequenzierung nach Sanger und Auswertung

Mit Hilfe der Sequenzierung kann die Nukleotidabfolge einer Sequenz bestimmt werden. Seit der erstmaligen Beschreibung 1977 von Frederick Sanger in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* gilt die Sanger-Sequenzierung als eine der klassischen Methoden zu Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Moleküls. Dabei wird ein radioaktiv bzw. heutzutage fluoreszent markierter komplementärer DNA Einzelstrang in vier parallelen Ansätzen *in vitro* synthetisiert. Neben den vier 2-Desoxyribonucleotidtriphosphaten (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) wird dem Ansatz jeweils ein Didesoxytriphosphat (ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP) hinzugefügt. Diese sogenannten Abbruch-Nukleotide besitzen keine OH-Gruppe am 3'-Ende, sodass die Synthese stoppt. Zum Schluss liegt ein Gemisch unterschiedlich langer Fragmente vor, die sich je nach Didesoxytriphosphat am 3'-Ende voneinander unterscheiden (Sanger, Nicklen and Coulson, 1977). Die entstandenen Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Ein sich in der Kapillare befindlicher Laser regt das Farbmolekül am DNA-Fragment an wonach es zu einer Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe kommt. Die entsprechende Farbe wird von einem Detektor erkannt. Ein Elektropherogramm gibt die Reihenfolge der Nukleotide im ursprünglichen DNA-Molekül wieder und ermittelt somit die DNA-Sequenz.

Eine Sequenzierung war nur für Proben möglich, die nach der vorangegangenen long, short oder 5' UTR nested-PCR positiv waren. Für die Sequenzierung nach Sanger wurden 5 μ l der PCR-Produkte zuerst mit Hilfe von 2 μ l ExoSAP-IT (Zyklusprogramm: 15 Minuten bei 37°C, danach 15 Minuten bei 80°C) aufgereinigt und anschließend sequenziert. Für den Sequenzierungsansatz diente das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. In Tabelle 19 ist der vollständige Sequenzierungsansatz aufgelistet. Als Sequenzierungsprimer wurden die jeweiligen inneren Primer der verwendeten nested-PCR benutzt. 9 μ l des Ansatzes wurden mit

1µl der aufgereinigten Proben gemischt. Anschließend erfolgte die Amplifikation mit dem in Tabelle 20 gezeigten Zyklusprogramm. Die Sequenzierung erfolgte im hauseigenen Sequenzierlabor.

Die Qualität der Sequenz ist stark abhängig vom Ausgangsmaterial, der eingesetzten Konzentration sowie dem Vorhandensein inhibitorischer Komponenten. Schlecht oder zu lang gelagertes Probenmaterial oder eine unzureichende Aufreinigung kann zu schlechten bis gar nicht auswertbaren Sequenzen führen. HCV liegt als sogenannte Quasispezies, also eine Population eng verwandter, jedoch unterschiedlicher Viren, vor. Somit kann es zu unterschiedlichen Basen an ein und derselben Position im Genom kommen (Ambiguitäten). Eine manuelle Korrektur der Sequenzen ist daher notwendig. Die erhaltenen Roh-Sequenzen wurden in Geneious geladen und getrimmt. Dazu wurden Primersequenzen am Anfang bzw. Ende der Sequenz sowie qualitativ schlechte Bereiche entfernt. Aus den Sequenzen einer Probe wurde ein Alignment durch Vergleich mit einer Referenzsequenz (HCV-1a_AF009606) erstellt. Ein Sequenzalignment bezeichnet den Vergleich zweier oder mehrerer DNA-/RNA-/Protein-Sequenzen, um die strukturelle, funktionale und evolutionäre Verwandtschaft der Sequenzen untereinander zu untersuchen. Nicht eindeutig zu bestimmende Nukleotide wurden nach dem Standard des UPAC-IUB Schlüssels bestimmt. Nach manueller Korrektur wurden die Sequenzen im FASTA-Format gespeichert. Der Geno-/Subtyp wurde durch Auswertung der FASTA-Konsensussequenz mittels des Webtools Geno2Pheno (G2P) bestimmt (Kalaghatgi, *et al.*, 2016). G2P ermöglicht eine einfache und schnelle Analyse von HCV-Sequenzdaten in Hinblick auf Geno- und Subtypen sowie mögliche Resistenzen gegenüber lizenzierten DAAs. G2P ist nur anwendbar für die Bereiche NS3, NS5A und NS5B. Bei Proben die nach der 5' UTR nested-PCR sequenziert wurden, diente sowohl das HCV-Phylogenetic Typing Tool 2.4 als auch das NCBI Genotyping Tool, die als Webtool verfügbar sind, zur Bestimmung des Subtyps. Wurden für eine Sequenz unterschiedliche Subtypen in beiden Webtools identifiziert, wurde lediglich der Genotyp bestimmt, da eine eindeutige Einteilung des Subtyps nicht möglich war.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Sanger-Sequenzierungsansatzes

Sanger Sequenzierung		Mastermix
Reagenz	Finalkonzentration	µl/Ansatz
Wasser		6
Primer (10µM)		0,5
5x Puffer		2
BigDye 3.1		0,5
Σ		9
+Template		1

Tabelle 20: Zyklusprogramm der Sanger-Sequenzierung

Schritte	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Erstes Denaturieren	96°C	1min	1
Denaturieren	96°C	10sek	25
Primer Annealing	52°C (ΔR 1°C/s)	30sek	25
Elongation	60°C	4min	25
	16°C	Pause	

4.2.6 Immunoblot

Der Immunoblot (auch Western Blot genannt) dient zum Nachweis der in einer Probe enthaltenen Antigene bzw. Antikörper und wird als Bestätigungstest eingesetzt, wenn ein vorheriger Antikörpersuchtest reaktiv war (Burnette, 1981). Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde das kommerziell erhältliche *recomLine* HCV-IgG Kit (Mikrogen) verwendet. Im ersten Schritt werden mit HCV-Antigenen (Core 1, Core 2, Helikase, NS3, NS4, NS5) beschichtete Nitrozellulose-Membran Teststreifen mit den zu testenden, unverdünnten Serumproben (20µl Probe bei 2ml Waschpuffer pro Streifen) sowie den Waschpuffer für 3h inkubiert (Abb. 15). Dabei lagern sich vorhandene HCV-Antikörper aus der Probe an die auf der Membran fixierten Antigene an. Durch 3-maliges Waschen mit Waschpuffer werden nicht gebundene Antikörper entfernt. In einem zweiten Schritt werden die Streifen mit Anti-Human-Immunoglobulin Antikörpern (IgG), die mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, für 45 Minuten inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch 3-maliges waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wird eine 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung (1,5ml/Streifen) für 8 Minuten aufgetragen (Abb. 15). Nach Ablauf der Zeit wird die Reaktion mittels deionisierten Wassers abgestoppt. Falls eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hat, erscheinen auf entsprechender Höhe des Teststreifens dunkelblaue Banden. Die Auswertung der Banden findet am darauffolgendem Tag mittels der

dem Kit beigelegten Testkriterien statt (vgl. Gebrauchsanweisung recomLine HCV IgG; Quelle: <https://www.mikrogen.de/produkte/produktuebersicht/weitereinfo/hcv-igg.html>).

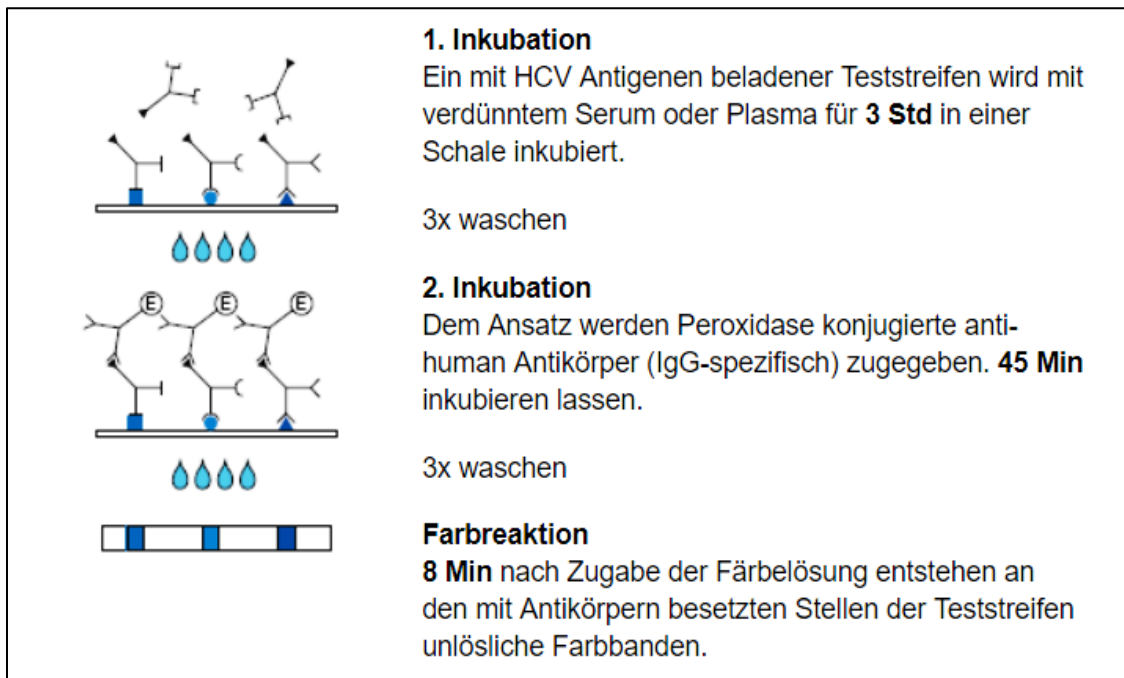


Abbildung 15: Prinzip eines Immunoblots. Quelle: (Mikrogen GmbH, 2018), abgerufen am 02.11.2018.

5. Ergebnisse

5.1 Überblick

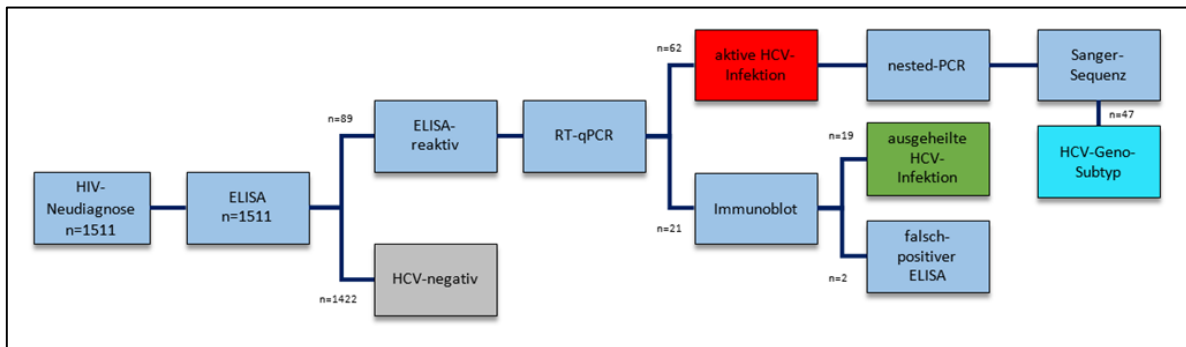


Abbildung 16: Schematischer Versuchsaufbau. Die in der Abbildung gezeigten Werte beziehen sich auf die Anzahl der Proben die im jeweiligen Schritt bearbeitet wurden.

Im Untersuchungszeitraum Oktober 2009 bis Juni 2011 wurden insgesamt DSS/DPS 1511 HIV-Neudiagnosen serologisch auf Hepatitis C untersucht (Abb. 16). Dabei handelt es sich um 311 Proben aus dem Zeitraum Oktober 2009 bis Dezember 2009, um 332 Proben von Januar 2010 bis April 2010 und 868 Proben aus dem Zeitraum Januar 2011 bis Juni 2011. Insgesamt zeigten 89 der 1511 Proben eine positive Reaktion im ELISA (5,9%). Davon konnten 83 Proben mittels RT-qPCR weiter untersucht werden, für 6 Proben stand kein weiteres Material zur Verfügung. 62 von 83 Proben wurden in der RT-qPCR positiv getestet und mittels nested-PCRs zur Geno- und Subtypisierung untersucht. Dabei waren 48 von 62 Proben positiv in der nested-PCR und wurden sequenziert. Für eine Probe war die erhaltene Sequenz aufgrund schlechter Qualität nicht auswertbar. 14 Proben waren in allen drei nested-PCRs zur Geno- und Subtypisierung negativ und konnten nicht weiter untersucht werden.

5.2 Quantitative Real-time PCR

Von 89 ELISA-reaktiven Proben konnten 83 erfolgreich mittels RT-qPCR untersucht werden. Mit jedem Lauf wurde eine HCV-Standardreihe (10E+06 bis 10E+01) sowie Negativkontrollen mitgeführt (Abb. 17). Anhand dieser konnte die HCV-Viruslast für die einzelnen Proben nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Viruslast (IU/ml): } \frac{\text{mittlere Konzentration} \times 10}{5} \quad (\text{für 1 Spot})$$

$$\frac{\text{mittlere Konzentration} \times 5}{5} \quad (\text{für 2 Spots})$$

Von den 83 untersuchten Proben konnte bei 62 eine HCV-Viruslast detektiert werden (74,7%). Bei diesen Proben handelt es sich somit um eine aktive HCV-Infektion. Die ermittelten Viruslasten lagen zwischen 95,2 IU/ml und 1,1+E07 IU/ml (Median: 1,6+E05 IU/ml). Für 21 Proben konnte kein Ct-Wert ermittelt werden. Zur weiteren Charakterisierung in ausgeheilte Infektionen bzw. falsch-positive ELISA-Reaktionen wurden diese Proben mittels Immunoblot untersucht (siehe 5.3).

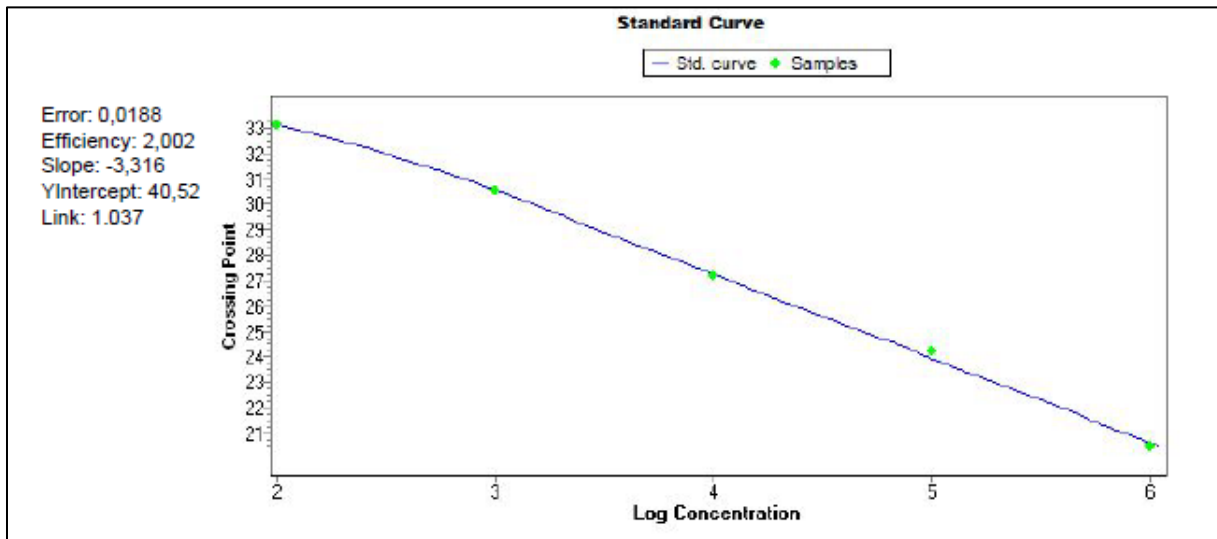


Abbildung 17: Standardkurve qPCR (10E+06 bis 10E+02).

5.3 Immunoblot

21 Proben, die in der RT-qPCR negativ waren, wurden im Immunoblot untersucht. Anhand der Auswertung nach Herstellerangaben wurden dabei zwei Proben als Immunoblot-negativ identifiziert. Durch das zuvor negative RT-qPCR-Ergebnis sind diese zwei Proben als falsch-reaktiver ELISA zu deuten. In der Abbildung 18 sind beispielhaft ein negatives, positives und ein fragliches Immunoblot-Ergebnis zu sehen.

Nr. No.	Probe Sample	recomLine HCV Art.Nr. 4372 Art.No.						Nr. No.	Antigenbanden Antigen bands						Beurteilung Interpretation
		AK-Klassen Kontrolle	igG	Cutoff-Kontrolle	Core 2	NS3	NS5		Core 1	Core 2	Helicase	NS3	NS4	NS5	
17	11-814	LHC 17						17	-	-	++	+/-	++	-	Fraglich
18	11-815	LHC 18						18	++	++	++	+	+/-	-	Positiv
19	Negative Ko.	LHC 19						19	-	-	-	-	-	-	Negativ

Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Western Blot Ergebnisse. Zu sehen ist exemplarisch der Vergleich positiver, negativer und fraglicher Ergebnisse. Zur Beurteilung der einzelnen Proben wurde die im Kit beigelegte Gebrauchsanweisung verwendet.

Die Auswertung erfolgte manuell nach den im Kit beigelegten Kriterien. Bei negativem Immunoblot-Ergebnis ist von einem falsch-positiven Ergebnis des ELISA auszugehen, bei positivem Ergebnis liegt eine ausgeheilte HCV-Infektion vor. Bei einem fraglichen Ergebnis kann nicht eindeutig gesagt werden ob eine ausgeheilte HCV-Infektion vorliegt. Dies war für 2 der 21 Proben der Fall. Da in beiden Fällen ein hoher OD-Wert im ELISA gemessen wurde (OD1=2,0589, OD2=2,72), wurden die Proben in dieser Arbeit als Immunoblot-positiv gewertet.

5.4 Nested-PCR zur Geno-und Subtypisierung

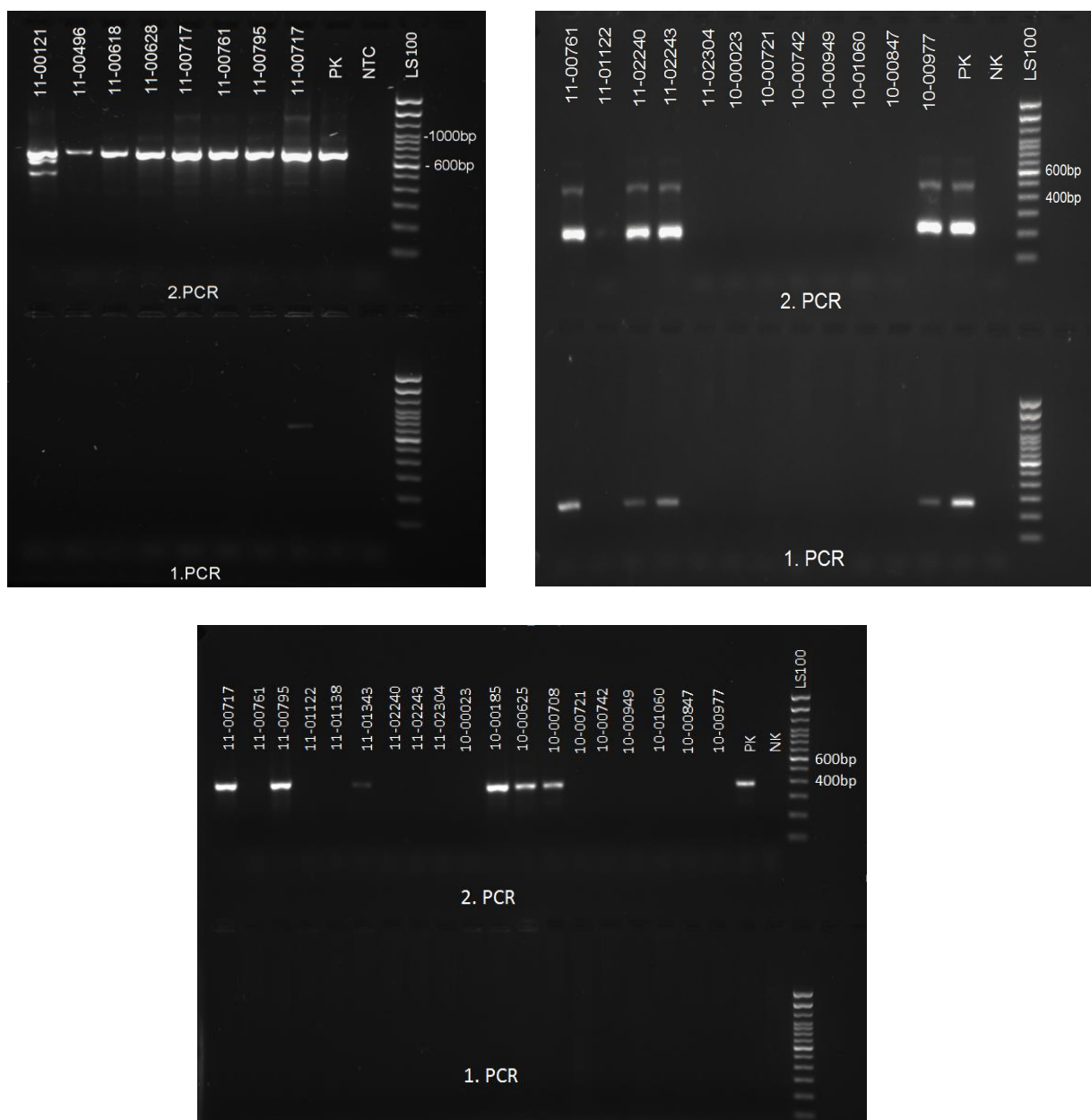


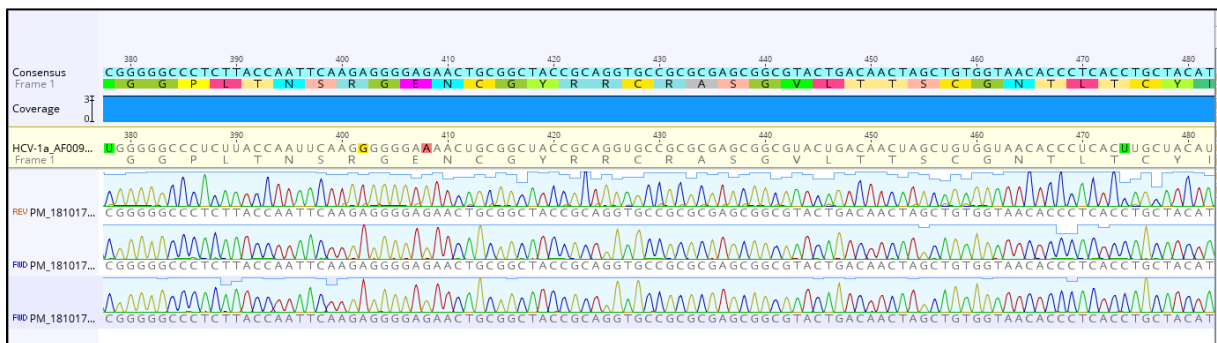
Abbildung 19: Beispiel für ein Agarose-Gelbild mit PCR-Produkten der long nested-PCR (links), 5'UTR nested-PCR (rechts) sowie short nested-PCR (unten). NTC entspricht der Negativkontrolle. Die 1. PCR entspricht der ersten PCR mit den äußeren Primern, die 2. PCR entspricht der PCR mit den inneren Primern.

62 als aktive Infektionen identifizierte Proben sollten geno- bzw. subtypisiert werden. Zunächst wurden alle 62 Proben mit der long nested-PCR untersucht. 24 der 62 Proben zeigten dabei ein negatives Ergebnis im Agarosegel (beispielhaft Abb. 19). Diese 24 Proben wurden im Anschluss mit der short nested-PCR untersucht. 8 von 26 Proben zeigten in der short nested-PCR ein positives Ergebnis im Gel. Die 18 verbliebenen negativen Proben wurden mittels 5' UTR nested-PCR untersucht. Hier waren 4 von 18 Proben positiv. Insgesamt konnten für 48 von 62 aktiven HCV-Infektionen PCR-Produkte generiert werden.

5.5 Sequenzierung

Nach erfolgreicher Amplifikation mittels einer der drei verwendeten nested-PCRs konnten 48 PCR-Produkte sequenziert werden. 47 Proben konnten im Anschluss erfolgreich ausgewertet werden. Für 1 Probe war die Sequenzqualität nicht ausreichend um eine verwertbare Sequenz zu erhalten (Abb. 20).

A



B

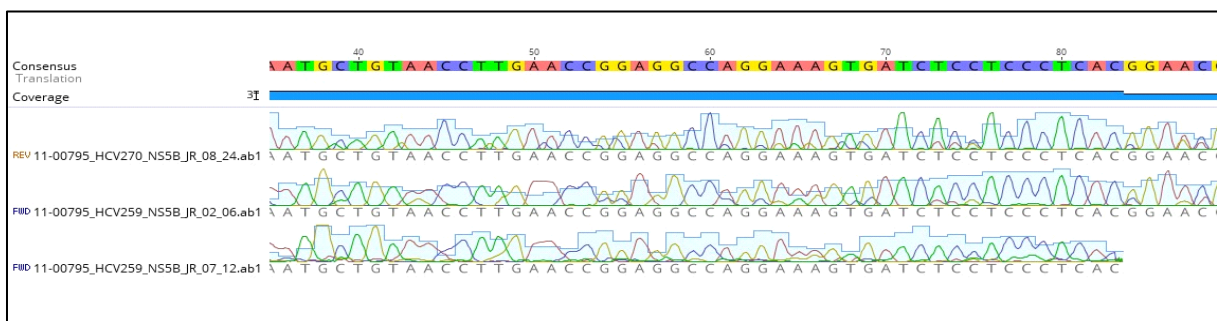


Abbildung 20: Gegenüberstellung von Rohdaten zweier Proben in Geneious. Abbildung A zeigt ein Alignment mit gut auswertbaren Sequenzen wohingegen Abbildung B eine qualitativ schlechte Sequenz darstellt.

5.6 Bestimmung der HCV-Positivrate

Im Zeitraum zwischen Oktober 2009 und Juni 2011 wurde insgesamt ein Anteil von 5,9% (n=89/1511) der Proben HCV-ELISA-reaktiv getestet (Abb. 21). Da 6 Proben anschließend aufgrund fehlenden Materials nicht weiter untersucht werden konnten, wurden sie für die weiteren Analysen ausgeschlossen (n_{weitere Analysen}=1505). 2 der 89 HCV-ELISA-reaktiven Proben wurden nach negativem Ergebnis in der RT-qPCR und dem Immunoblot als falsch-reaktive ELISA-Reaktionen identifiziert. Insgesamt ergibt sich also ein Anteil von 5,4% (n=81/1505) HCV-Seropositiver in HIV-Neudiagnosen im untersuchten Zeitraum bestätigt. Der Anteil virämischer HCV-Infektionen liegt in der untersuchten Kohorte bei 4,1% (Abb. 21). Bezogen auf die HCV-seropositiv getesteten Proben (n=81/1505) wurden 76,5% als aktive und 23,5% als ausgeheilte HCV-Infektionen identifiziert (Abb. 22)

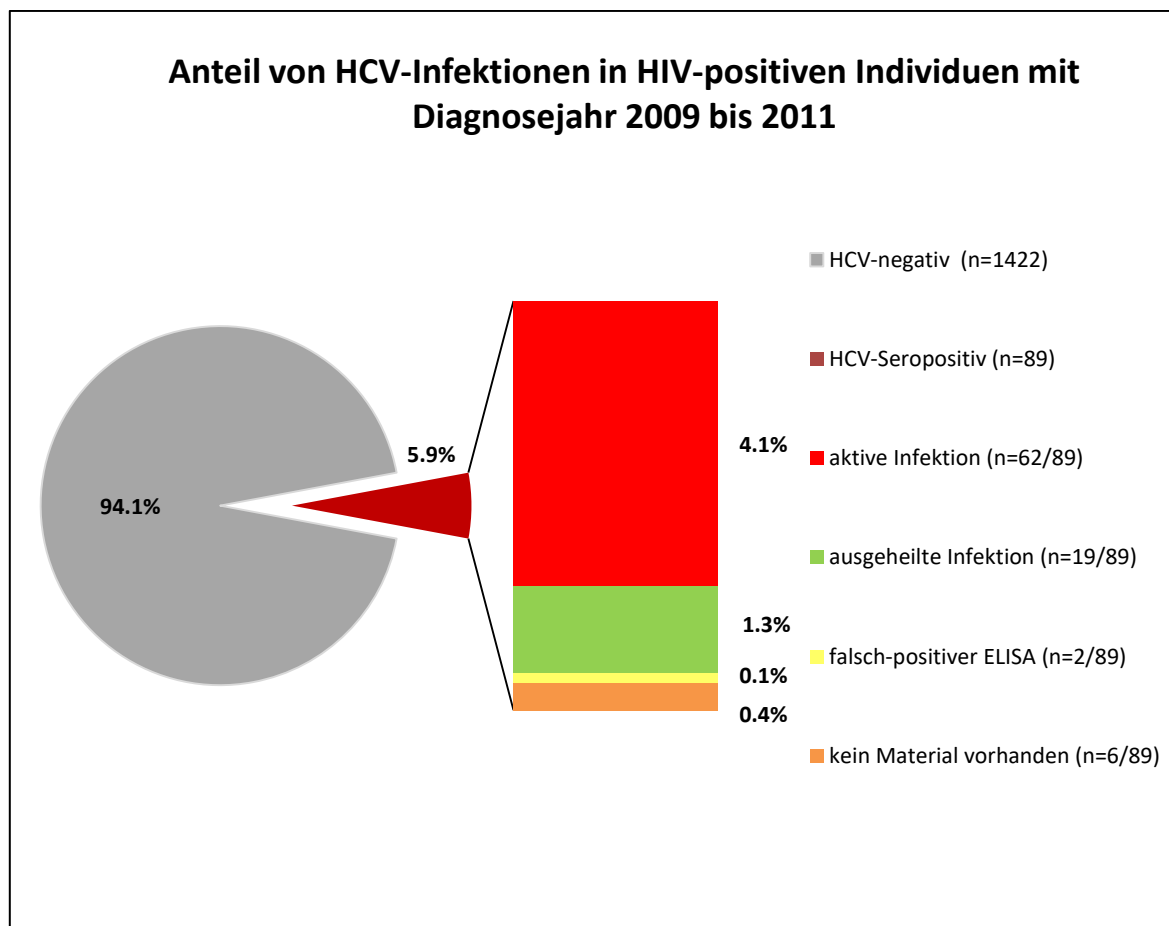


Abbildung 21: Anteil HCV-Koinfizierter in HIV-Neudiagnosen (2009-2011). Von insgesamt 1511 Proben wurden 5,9% ELISA-reaktiv getestet. Durch weitere Untersuchungen mittels qPCR und Immunoblot konnten 4,1% als aktive und 1,3% als ausgeheilte Infektionen identifiziert.

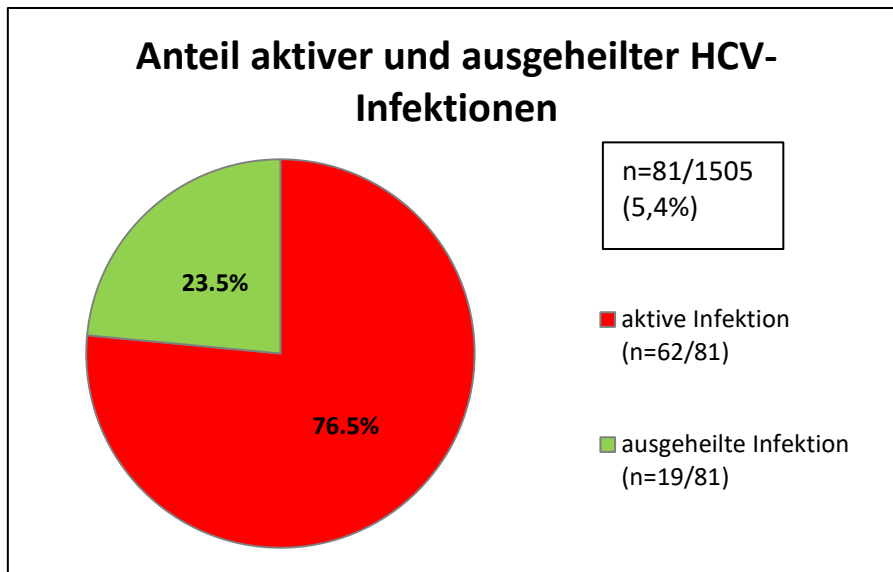


Abbildung 22: Anteil aktiver vs. ausgeheilter HCV-Infektionen im Untersuchungszeitraum 2009 bis 2011.

5.6.1 Auswertung nach soziodemografischen Daten

Die an das Robert Koch-Institut gesendeten anonymisierten Meldebögen zu HIV-Neuinfektionen enthalten unter anderem Angaben zum Geschlecht, dem Alter, der Herkunft sowie der Transmissionsgruppe der mit HIV neuinfizierten Personen. Diese Angaben wurden verwendet um die HCV-Infektionen hinsichtlich ihrer demografischen Daten zu charakterisieren.

5.6.1.1 Geschlecht

In Abbildung 23 ist die Verteilung der Geschlechter im untersuchten Probenpanel dargestellt. Der Anteil an Männern war mit 85,1% (n=1281/1505) deutlich höher als der Anteil an Frauen (14,6%; n=220/1505). Für 4 von 1505 Personen fehlten die Angaben bezüglich des Geschlechts. Insgesamt wurden 4,6% der männlichen (n=59/1281) und 10,0% der weiblichen (n=22/220) Personen HCV-seropositiv getestet. Das Verhältnis von aktiven zu ausgeheilten HCV-Infektionen ist in beiden Gruppen vergleichbar, mit jeweils einem deutlich höheren Anteil aktiver HCV-Infektionen im Vergleich zu ausgeheilten HCV-Infektionen (Abb. 24). Bei den HCV-seropositiven Männern wiesen 76,3% eine aktive (n=45) und 23,7% (n=14) eine ausgeheilte Infektion auf. Bei den Frauen wiesen 77,3% eine aktive Infektion und 22,7% eine ausgeheilte Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus auf (Abb. 24).

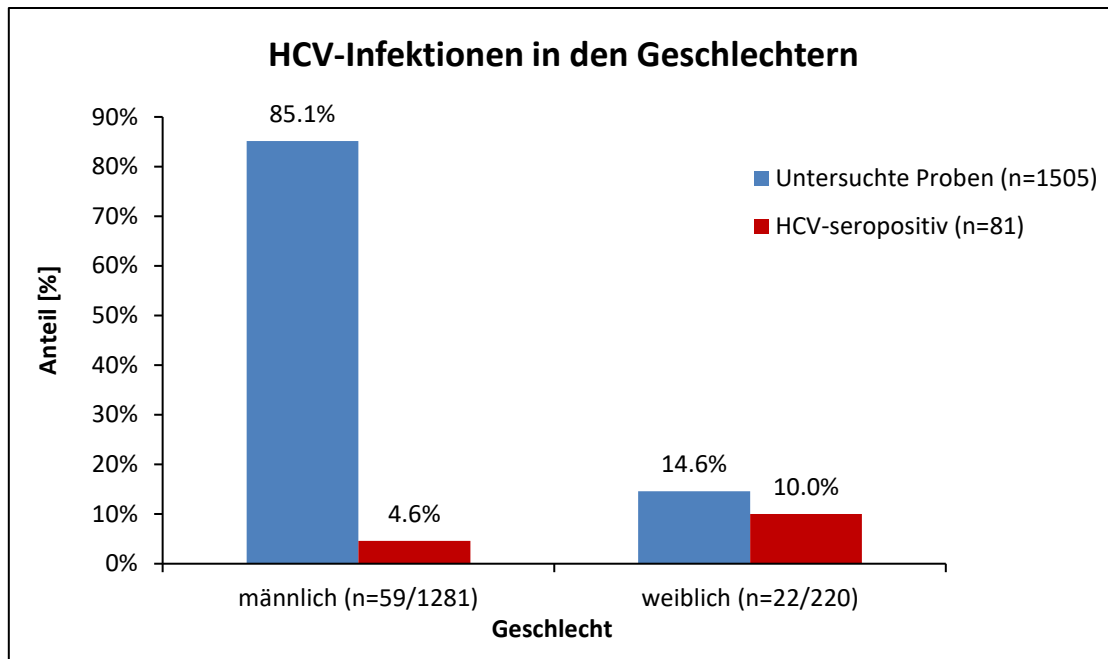


Abbildung 23: Geschlechterverteilung aller untersuchten Proben von 2009 bis 2011 (n=1505). Personen ohne Angabe zum Geschlecht (n=4) werden nicht im Diagramm gezeigt.

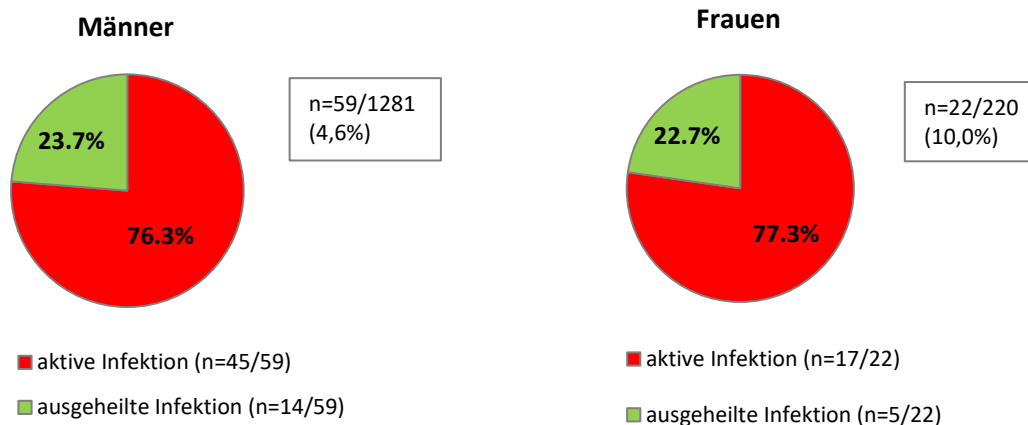


Abbildung 24: Anteil aktiver vs. ausgeheilter HCV-Infektionen bei Männern sowie Frauen.

5.6.1.2 Herkunft

Eine Übersicht über die Herkunft der HIV-Neuinfizierten ist in Abbildung 25 dargestellt. Von den 1505 untersuchten Proben kamen 62,3% (n=938/1505) der Personen aus Deutschland und 23,1% aus dem Ausland (n=348/1505). Bei 14,6% (n=219/1505) fehlte die Angabe zur Herkunft. In Personen nicht-deutscher Herkunft wurde dabei ein höherer Anteil an HCV-Seropositiven als in Personen deutscher Herkunft beobachtet (Abb. 24, 8,0%; n=28/348 vs. 4,4%; n=41/938). Bei den Personen nicht-deutscher Herkunft wurde mit 96,4% (n=27/28) außerdem ein sehr hoher Anteil der HCV-Infektionen als aktive Infektion identifiziert. Lediglich

1/28 (3,6%) der HCV-Infektionen waren ausgeheilte Infektionen (Abb. 26). In Personen aus Deutschland lag der Anteil aktiver Infektionen bei 70,3% (n=29/41) und der Anteil ausgeheilter HCV-Infektionen bei 29,3% (n=12/41).

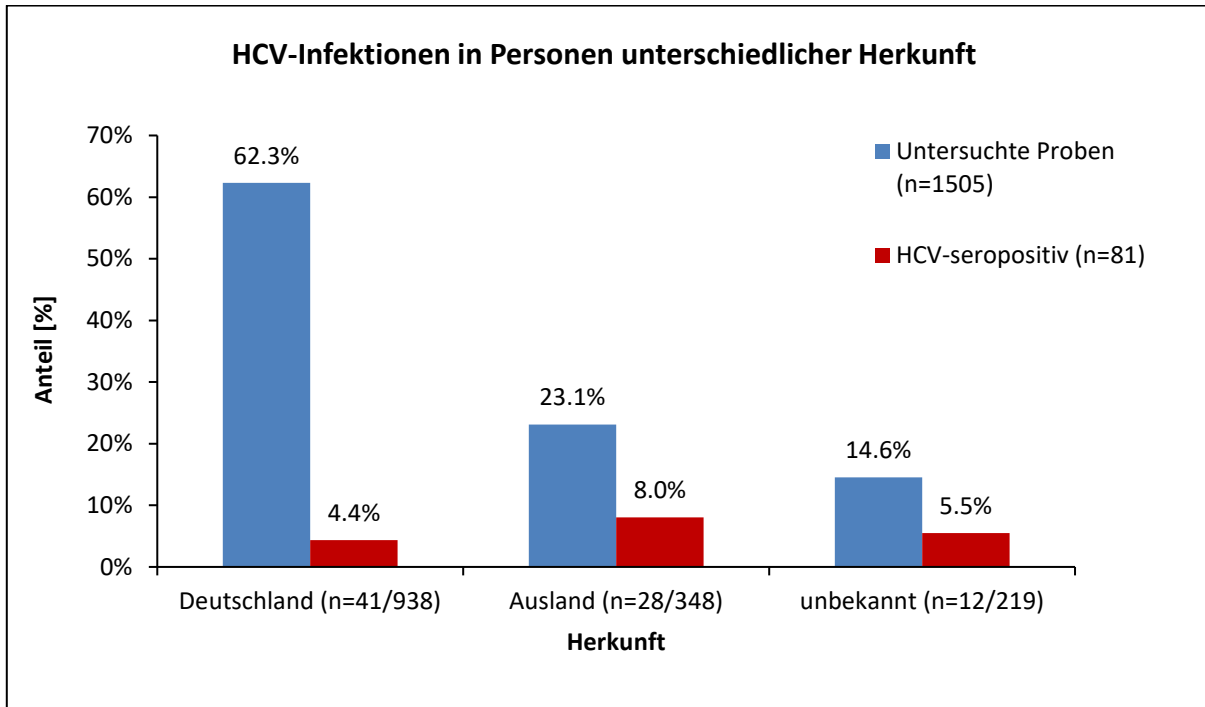


Abbildung 25: Herkunftsverteilung des Probenpanels von 2009 bis 2011 (n=1505).

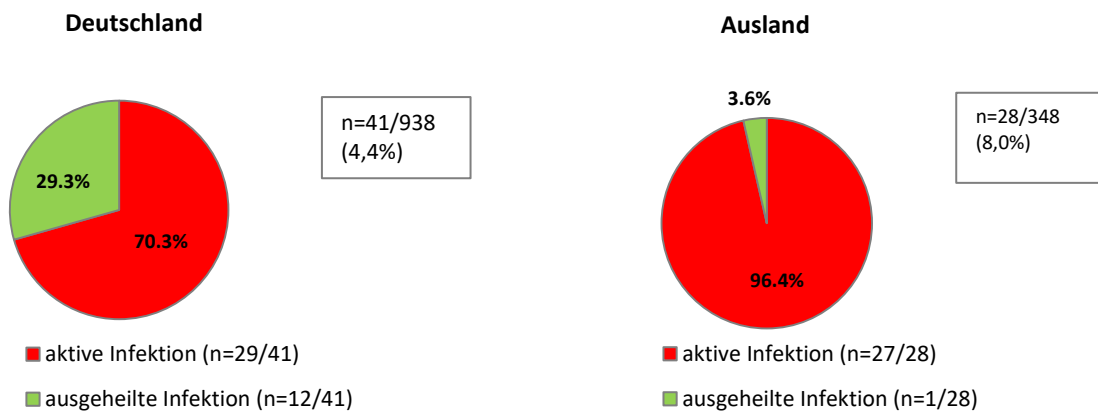


Abbildung 26: Vergleich der Anteile aktiver und ausgeheilter HCV-Infektionen in Personen deutscher und nicht-deutscher Herkunft.

In Abbildung 27 sind die Anteile HCV-seropositiver Personen in den einzelnen Herkunftsregionen aufgeführt. Mit 8,6% (n=129/1505) stellen Personen aus Afrika die größte Gruppe der Personen nicht-deutscher Herkunft in der untersuchten Kohorte dar, gefolgt von Personen aus Zentraleuropa (3,4%; n=51/1505), Osteuropa (2,4%; n=36/1505) und Asien (2,2%; n=33/1505). Obwohl Osteuropäer nur 2,4% der gesamten Kohorte ausmachen, wurden hier 44,4% (n=16/36) der Personen HCV-seropositiv getestet. Zusätzlich handelt es sich dabei um ausschließlich aktive HCV-Infektionen (Abb. 27). Hohe Anteile HCV-seropositiver Personen wurden außerdem in Personen aus Zentraleuropa (9,8%; n=5/51) und Asien (6,1%; n=2/33) gefunden. Insgesamt machen bei den HCV-seropositiven Personen nicht-deutscher Herkunft Osteuropäer mit 59,3% den größten Anteil aus (Abb. 28).

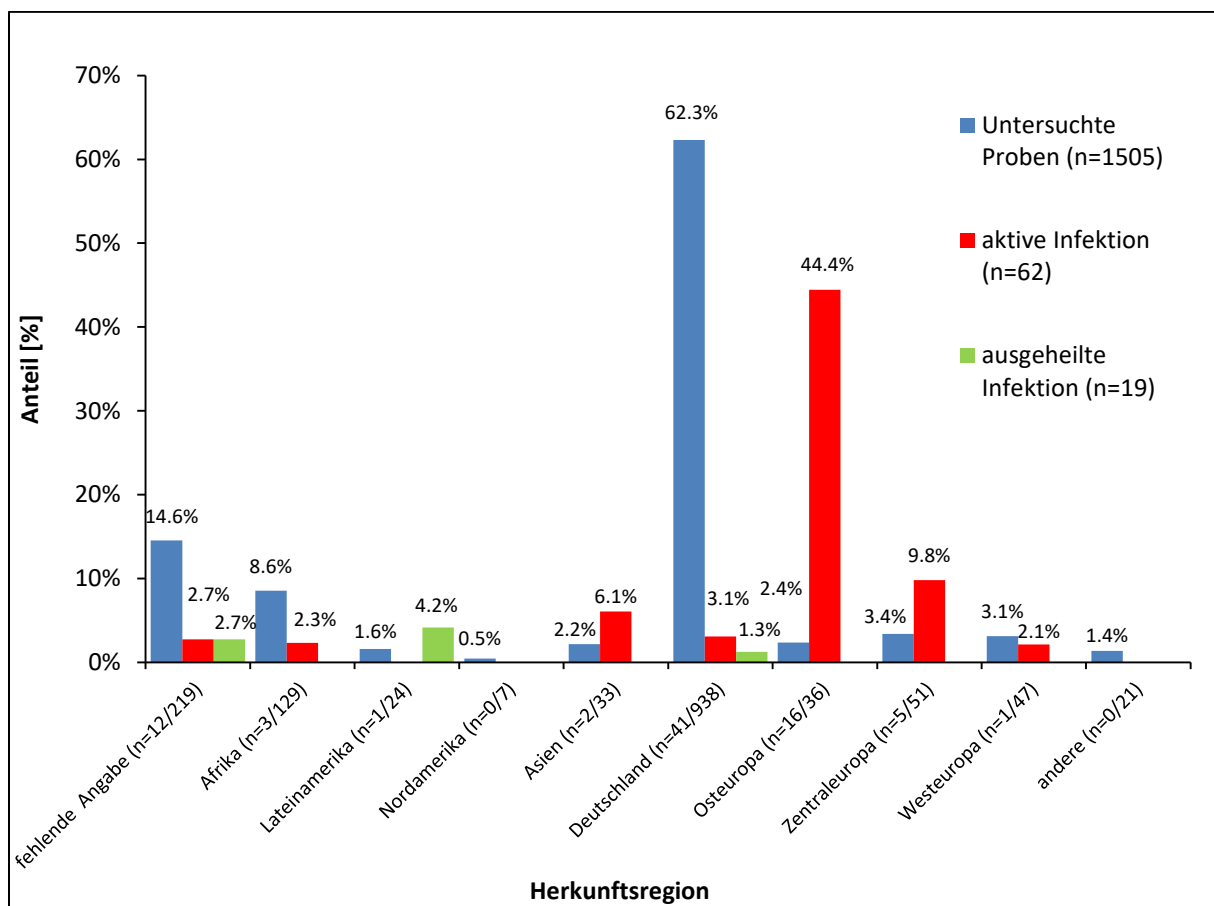


Abbildung 27: Anteil der aktiven und ausgeheilten HCV-Infektionen in Bezug auf die Herkunft.

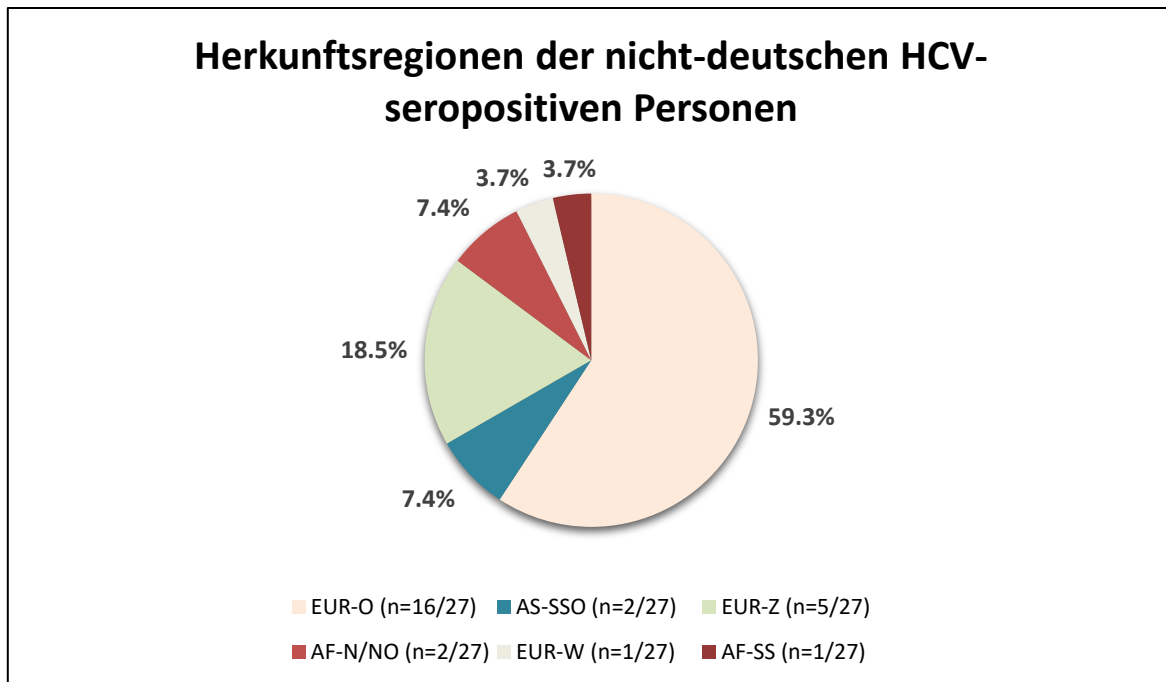


Abbildung 28: Aufschlüsselung der aus dem Ausland stammenden HCV-Infizierten (n=27) nach Region. EUR-O=Osteuropa, AS-SSO=Südostasien, EUR-Z=Zentraleuropa, AF-N/NO=Nordafrika/naher Osten, EUR-W=Westeuropa, AF-SS=Subsahara-Afrika.

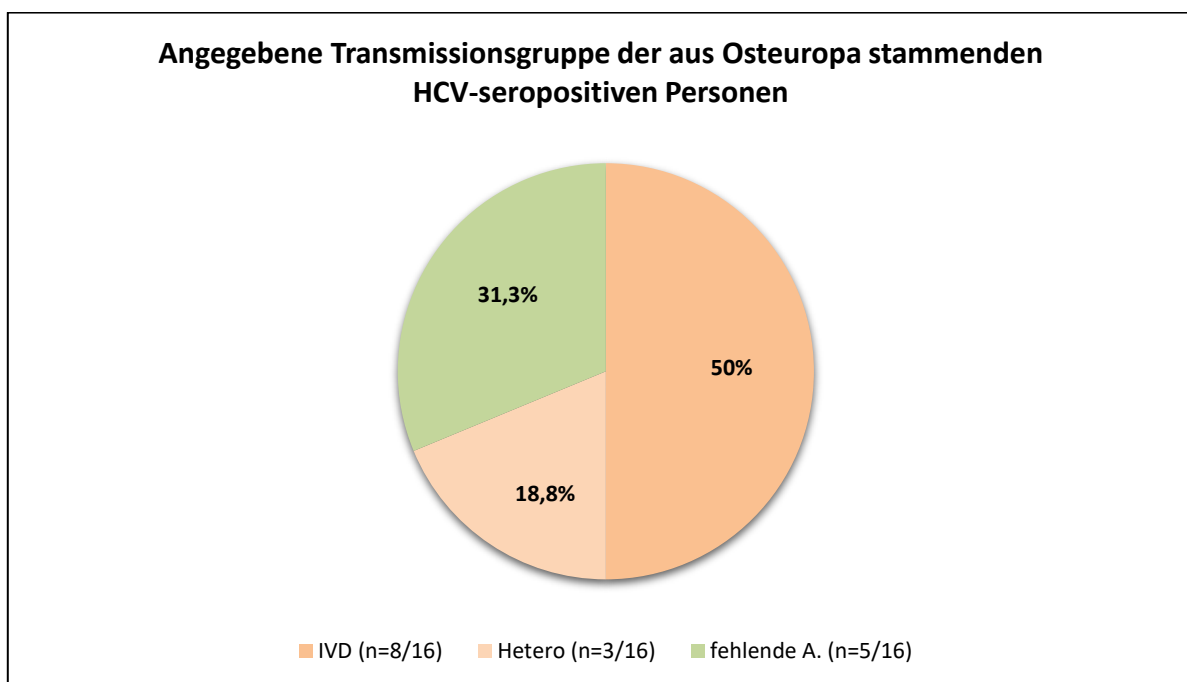


Abbildung 29: Detaillierte Betrachtung der Transmissionsgruppen-Verteilung in Osteuropa.

Bei diesen handelt es sich dabei zur Hälfte (50,0%; n=8/16) um intravenöse Drogengebraucher (IVDs) (Abb. 29). In 31,3% der Fällen (n=5) fehlten jegliche Angaben zur Transmissionsgruppe und 18,8% (n=3) der Personen hatten heterosexuellen Kontakt als mögliche Ursache der Infektionsübertragung angegeben.

5.6.1.3 Alter

In Abbildung 30 ist die Altersverteilung der HIV-Neuinfizierten im untersuchten Probenpanel zu sehen. 30,4% (n=458/1505) aller und damit die Mehrheit der untersuchten Proben gehörten zu Personen zwischen 30 und 39 Jahre, gefolgt von Personen zwischen 40 bis 49 Jahren (27,4%; n=413/1505). Ein nur sehr geringer Teil der Personen in den untersuchten Proben war jünger als 19 oder älter als 69 Jahre. In diesen Altersgruppen wurde keine der Personen HCV-seropositiv getestet.

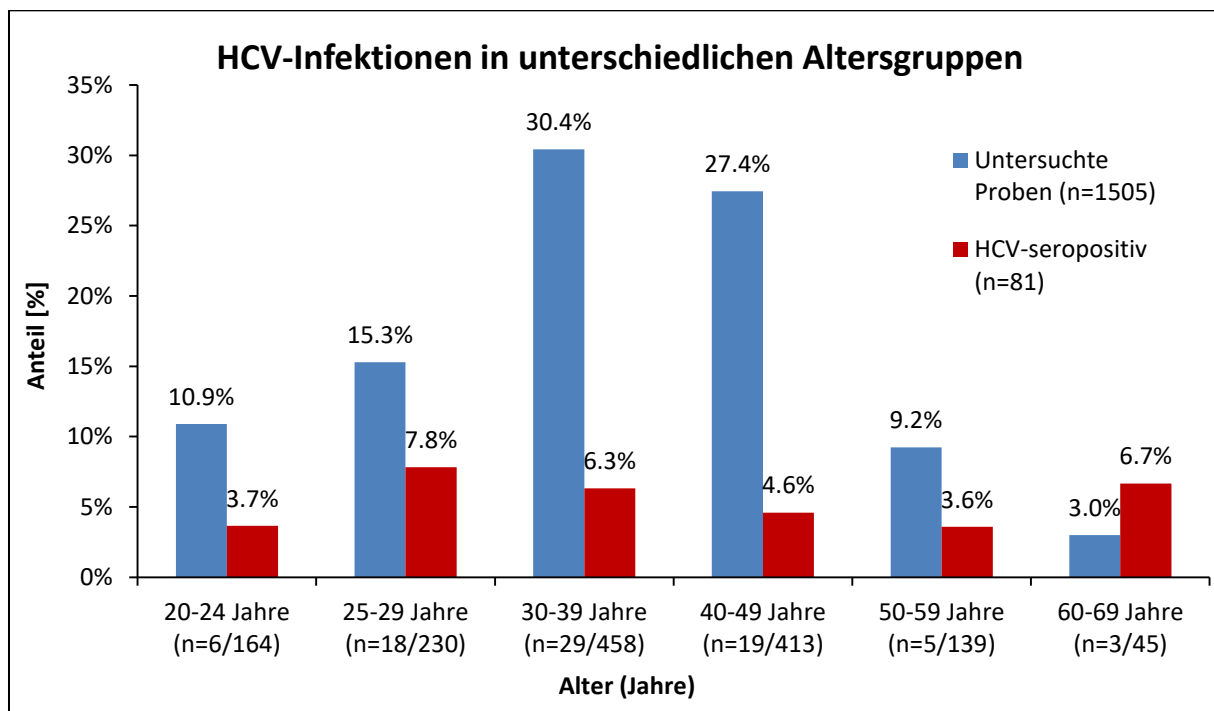
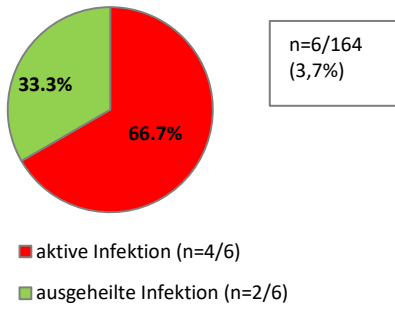


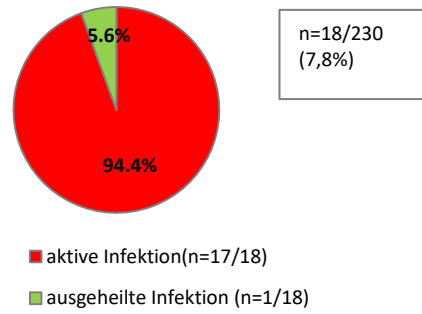
Abbildung 30: Altersverteilung der Personen im Untersuchungszeitraum Oktober 2009 bis Juni 2011 (n=1505). Die Altersgruppen 0-19 Jahre und über 69 Jahre sind nicht im Diagramm gezeigt.

Der größte Anteil HCV-seropositiver Personen wurde in der Altersgruppe 25 bis 29 Jahre beobachtet (7,8%; n=18/230), gefolgt von den 60- bis 69-Jährigen (6,7%; n=3/45) und 30- bis 39-Jährigen (6,3%; n=29/458). Bei den 60- bis 69-Jährigen ist die Anzahl der untersuchten Personen mit n=45 aber klein, sodass dieser Wert vermutlich nicht repräsentativ ist. Personen zwischen dem 25. und 29. Lebensjahr wiesen weiterhin im Vergleich mit anderen Altersgruppen den höchsten Anteil an aktiven Infektionen auf mit 94,4% (n=17/18). In den übrigen Altersgruppen lag der Anteil aktiver HCV-Infektionen zwischen 60,0% (bei den 50- bis 59-Jährigen) und 78,9% (bei den 40- bis 49-Jährigen) (Abb. 31).

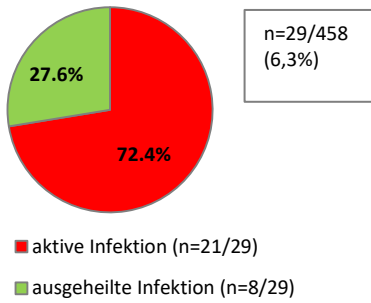
20- bis 24-Jährige



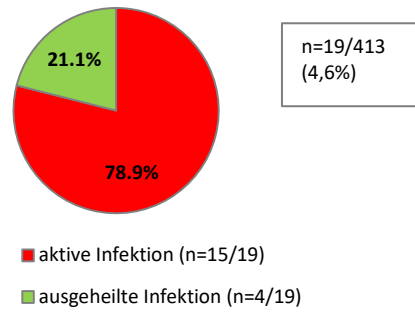
25- bis 29-Jährige



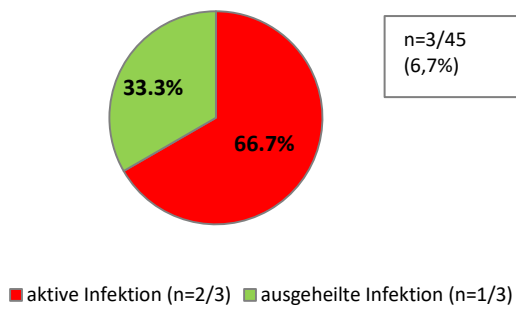
30- bis 39-Jährige



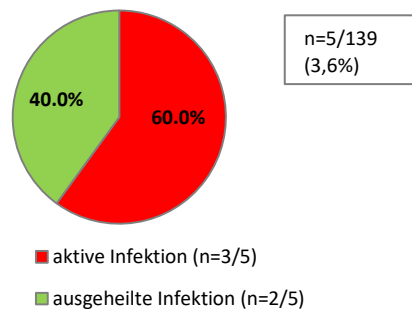
40- bis 49-Jährige



60- bis 69-Jährige



50- bis 59-Jährige



..

Abbildung 31: Vergleich aktiver vs. ausgeheilter HCV-Infektionen in verschiedenen Altersgruppen.

5.6.1.4 Transmissionsgruppe

Im untersuchten Probenpanel gaben 59,4% (n=894/1505) der Personen als Transmissionsgruppe „Männer, die Sex mit Männern haben“ an. Die restliche Verteilung entfällt auf heterosexuelle Kontakte (17,5%; n=264/1505), intravenös injizierende Drogengebraucher (3,3%; n=49/1505) und Mutter zu Kind Übertragungen (Prä/perinatale Infektion=PPI; 0,3%; n=5/1505). Bei 19,5% (n=293/1505) der Personen fehlte jegliche Angabe zum Transmissionsweg (Abb. 32). Obwohl IVD nur einen geringen Teil der untersuchten Kohorte ausmachen (3,3%), wurde in dieser Gruppe mit 75,5% (n=37/49) der höchste Anteil an HCV-Seropositiven detektiert (Abb. 32). Bei dem überwiegenden Anteil (81,0%; n=30/37) handelt es sich dabei um aktive HCV-Infektion (Abb. 33). Nur 18,9% (n=7/37) zeigten eine ausgeheilte HCV-Infektion. Innerhalb der Gruppe MSM wurden 2,0% seropositiv getestet, davon 61,1% (n=11/61) mit einer aktiven und 38,9% (n=7/18) mit einer ausgeheilten Infektion. Innerhalb der heterosexuellen Kontakte wurde ein Anteil HCV-Seropositiver von 3,4% beobachtet, darunter 88,9% (n=8/9) mit aktiver und 11,1% (n=1/9) mit ausgeheilter HCV-Infektion (Abb. 33). Mutter zu Kind Übertragung wurde nicht beobachtet.

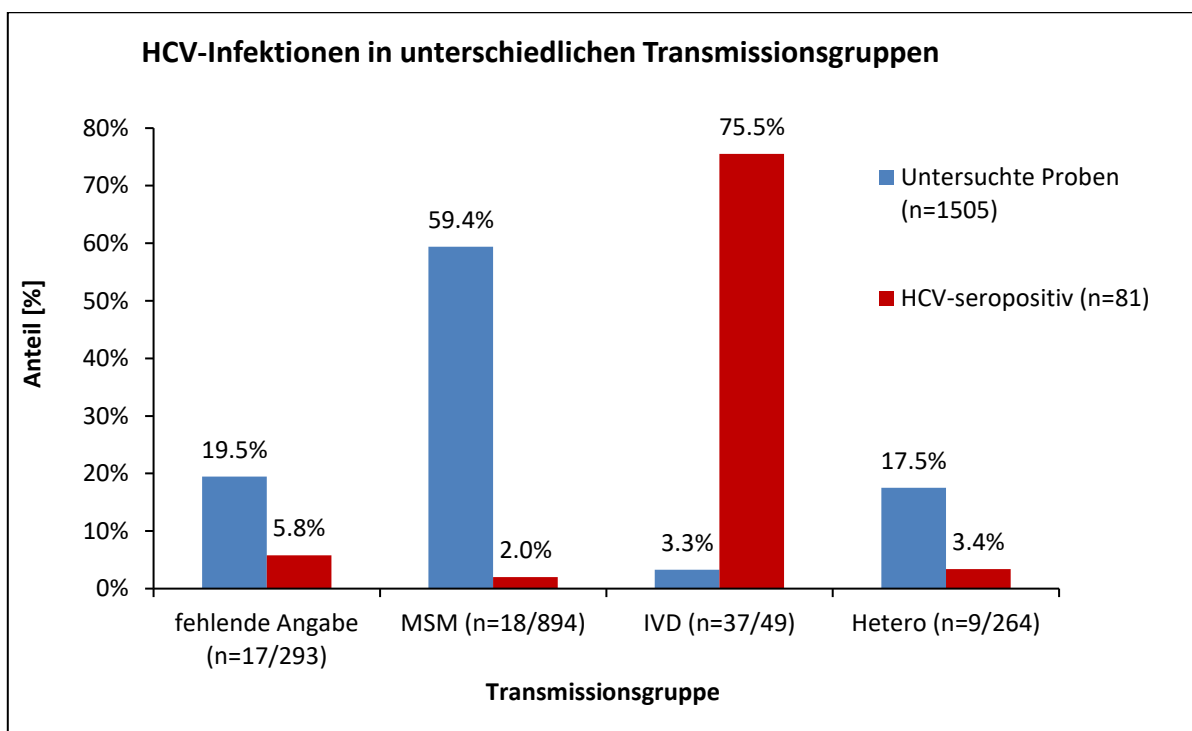


Abbildung 32: Anteil der HIV-Neuinfizierten in den Transmissionsgruppen: Männer, die Sex mit Männer haben (MSM), intravenöse Drogenkonsumenten (IVD), heterosexuelle Kontakte (Hetero). Mutter zu Kind Übertragung (PPI) wird nicht im Diagramm gezeigt (0,3%; n=5/1505).

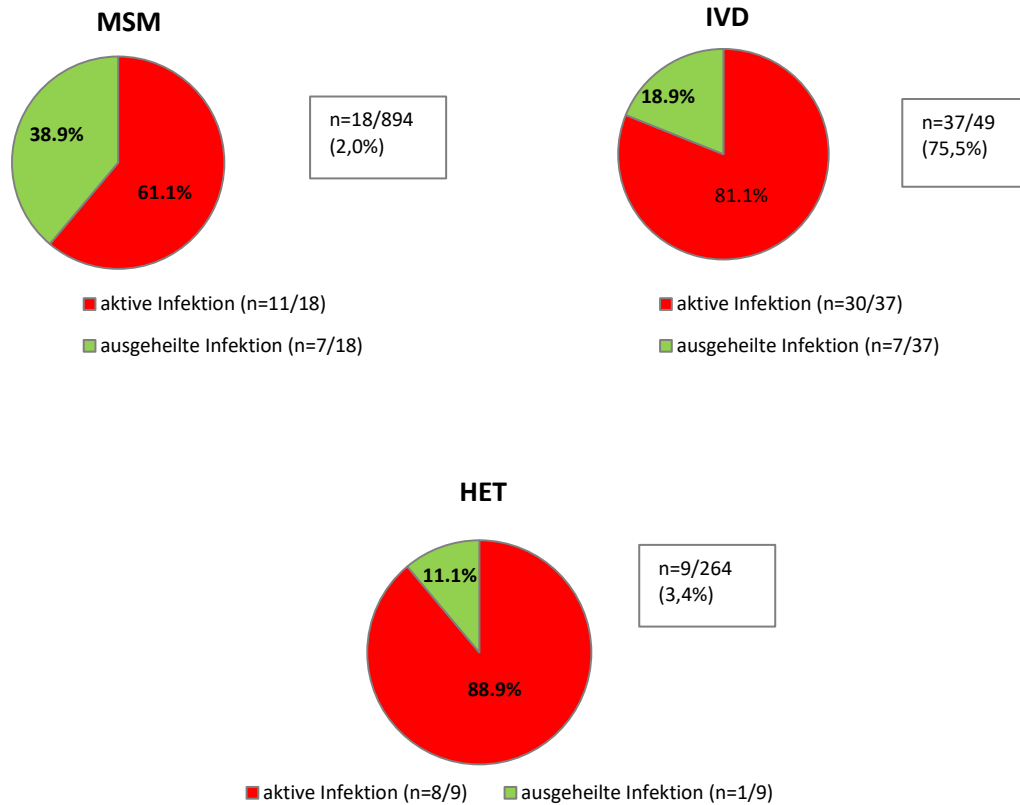


Abbildung 33: Vergleich aktiver vs. ausgeheilter HCV-Infektionen in den einzelnen Transmissionsgruppen: Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), intravenöse Drogengebraucher (IVD) und heterosexuelle Kontakte (HET).

5.7 Geno- und Subtypverteilung

Innerhalb des Studienpanels konnten von den 62 RT-qPCR positiven Proben 47 (75,8%) erfolgreich geno- und subtypisiert werden. Für eine nested-PCR positive Probe war die Sequenzqualität der anschließenden Sanger-Sequenzierung nicht ausreichend, sodass kein Geno- bzw. Subtyp bestimmt werden konnte. Die verbliebenen 14 Proben waren nach allen drei nested-PCRs negativ und konnten nicht weiter charakterisiert werden. Insgesamt konnten also 15 der 62 qPCR-positiven Proben (24,2%) nicht geno- und subtypisiert werden. Die Viruslast der Proben, die erfolgreich geno-/subtypisiert werden konnten, lag zwischen 2130 IU/ml und $1,125 \times 10^7$ IU/ml (Median: $4,2 \times 10^5$ IU/ml). Bei nicht erfolgreich genotypisierten Proben lag die Viruslast zwischen 95,2 IU/ml und $8,68 \times 10^5$ IU/ml (Median: $4,7 \times 10^3$ IU/ml). Innerhalb der erfolgreich geno-/subtypisierten Proben wurde mit 57,5% hauptsächlich der Genotyp 1 gefunden (n=27/47). Dabei handelt es sich mit 38,3% (n=18/47) um Subtyp 1a und zu 17,0% (n=8/47) um Subtyp 1b. Am zweithäufigsten vertreten war der Genotyp 3 mit 29,8% (n=14/47). Dabei handelt es sich ausschließlich um Subtyp 3a (Abb. 35). Andere Genotypen

(GT2, GT4 und GT6 mit Subtyp 2b, 4c, 4d, 6n) wurden in 12,8% der Fälle detektiert. Für 4,2% der Proben konnte lediglich der Genotyp bestimmt werden (Abb. 35).

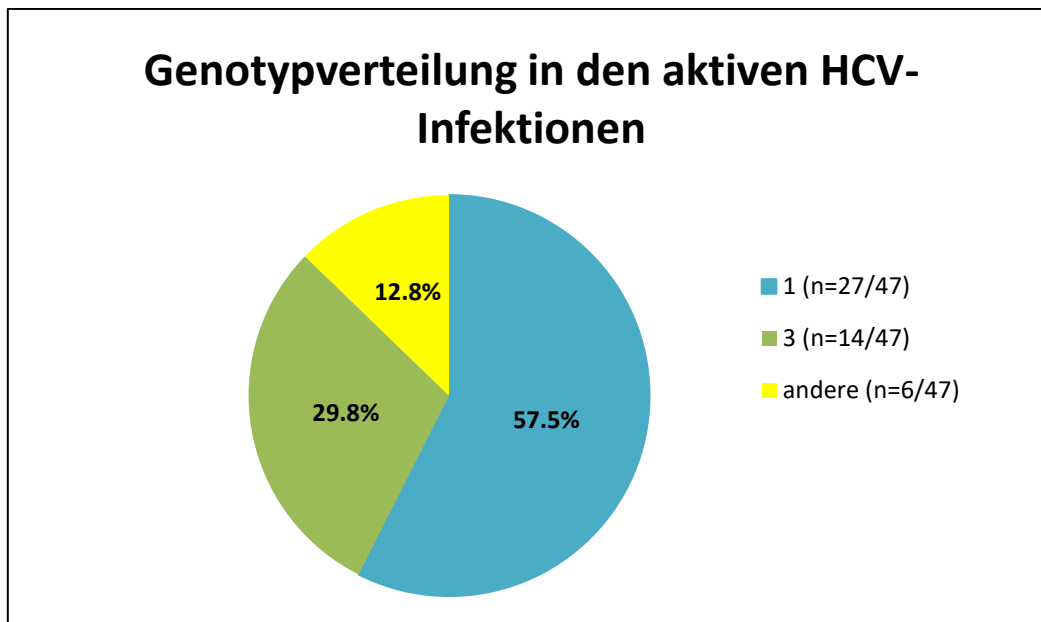


Abbildung 34: Genotypverteilung im untersuchten Probenpanel (n=47).

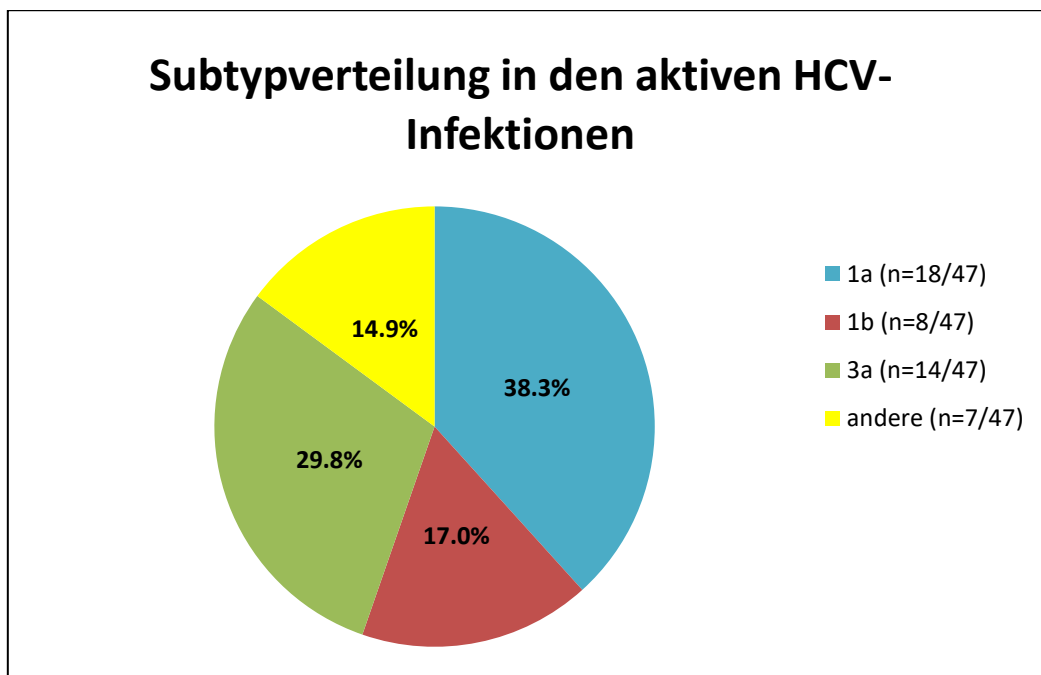


Abbildung 35: Geno- und Subtypverteilung im untersuchten Probenpanel (n=47).

5.7.1 Subtypverteilung in den Geschlechtern

Die identifizierten aktiven HCV-Infektionen zeigen eine unterschiedliche Subtypverteilung bei Männern und Frauen (Abb. 36). Bei Männern wurde mit 42,4% überwiegend der Subtyp 1a ($n=14/33$) gefolgt vom Subtyp 3a mit 21,2% ($n=7/33$) identifiziert. Infektionen mit dem Subtyp 1b wurden bei 18,2% ($n=6/33$) der Männer mit HCV-Infektion gefunden. Bei Frauen hingegen waren Infektionen mit dem Subtyp 3a mit 50,0% ($n=7/14$) dominant. Infektionen mit dem Subtyp 1a und 1b wurden bei 28,6% ($n=4/14$) und 14,3% ($n=2/14$) identifiziert (Abb. 36).

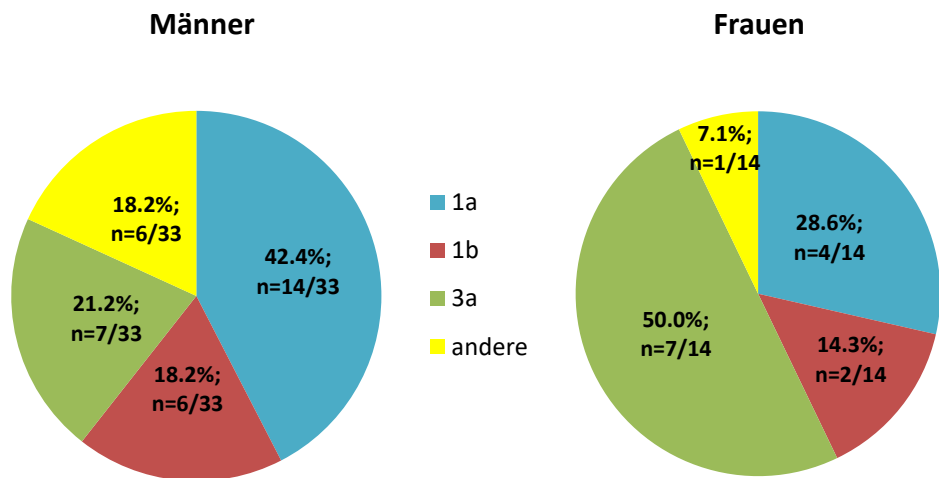


Abbildung 36: Subtypverteilung in den aktiven HCV-Infektionen nach Geschlechtern.

5.7.2 Subtypverteilung in Personen unterschiedlicher Herkunft

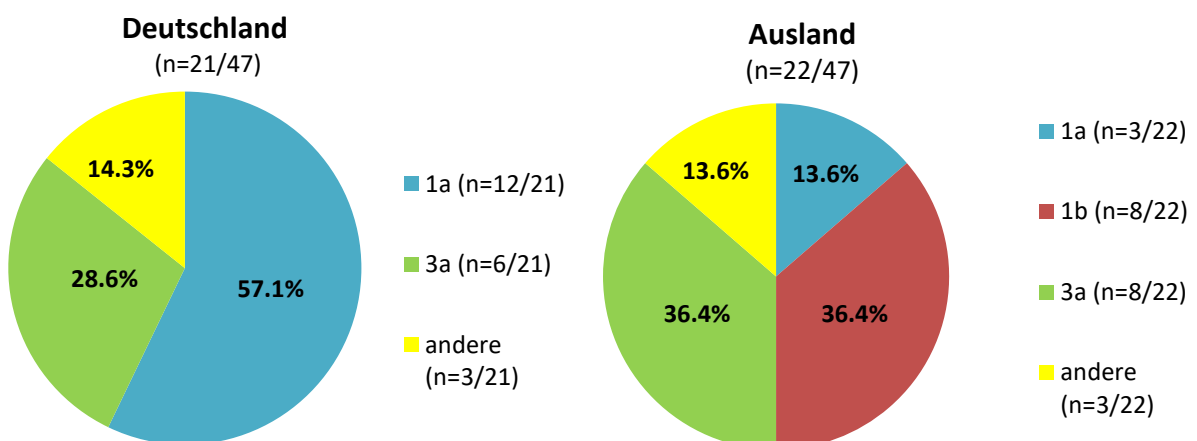


Abbildung 37: Prozentualer Anteil der am häufigsten auftretenden Subtypen in Deutschland und in Personen nicht-deutscher Herkunft ($n=47$). Seltene oder nur vereinzelt auftretende Subtypen wurden zusammengefasst.

Zwischen Personen deutscher und nicht-deutscher Herkunft wurde ein deutlicher Unterschied in der Subtypzusammensetzung beobachtet (Abb. 37). Bei Personen deutscher Herkunft wurde mit 57,1% hauptsächlich Subtyp 1a gefunden (n=12/21), gefolgt vom Subtyp 3a mit 28,6% (n=6/21). Infektionen mit dem Subtyp 1b wurden in Personen deutscher Herkunft nicht beobachtet. In HCV-Infizierten nicht-deutscher Herkunft wurden die Subtypen 1b und 3a zu jeweils 13,6% detektiert (Je n=3/22). HCV-Infektionen mit dem Subtyp 3a traten zu 36,4% (n=8/22) auf (Abb. 37).

5.7.3 Vergleich der Geno- und Subtypverteilung in den einzelnen Risikogruppen

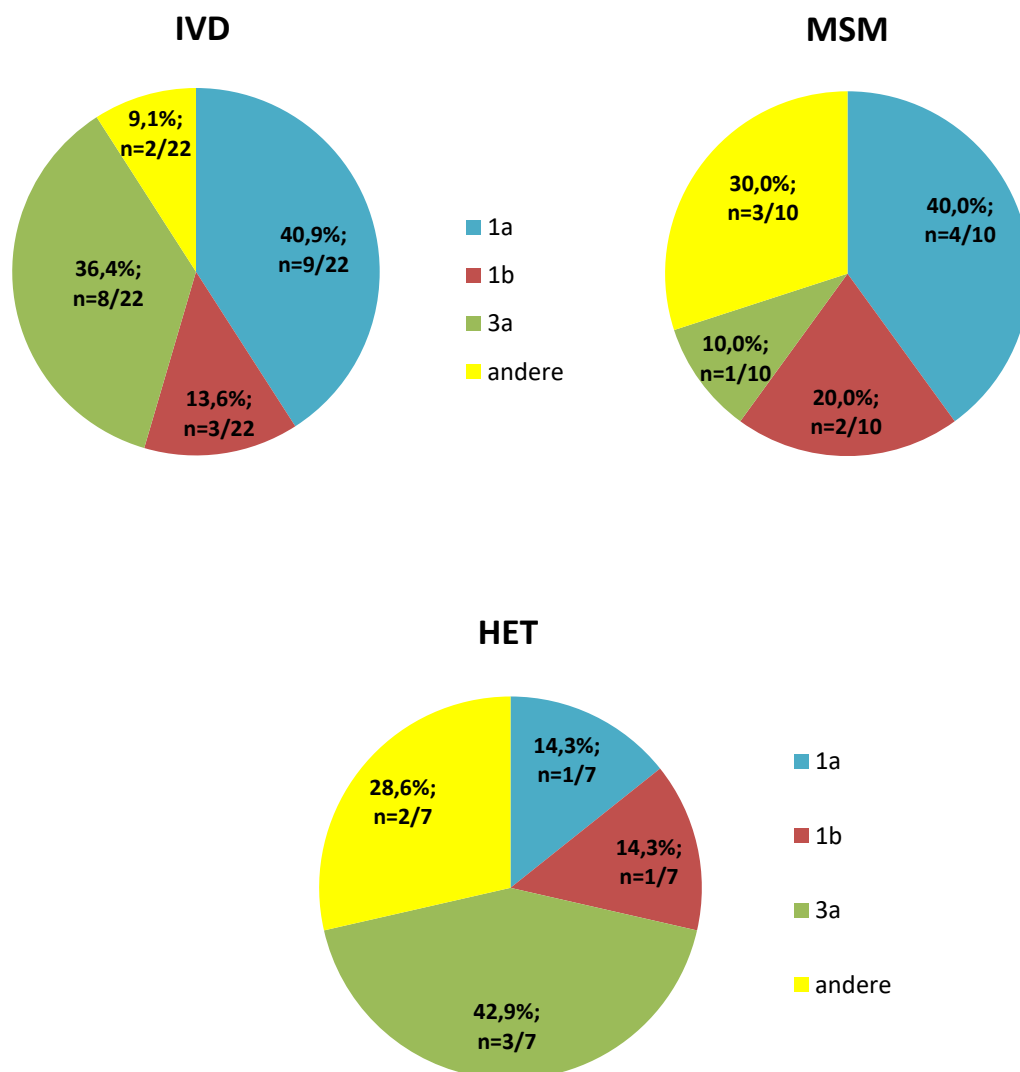


Abbildung 38: Subtypverteilung in den aktiven HCV-Infektionen nach Transmissionsgruppe. Alle Prozentsätze beziehen sich auf die jeweilige Gesamtanzahl der HCV-Infektionen (IVD: n=22, MSM: n=10, HETs: n=7) der einzelnen Risikogruppen.

Ein Vergleich der Geno- und Subtypverteilung innerhalb der einzelnen Transmissionsgruppen ist in der Abbildung 38 zu sehen.

In IVDs wurde mit 40,9% hauptsächlich der Subtyp 1a ($n=9/22$) detektiert, gefolgt von Subtyp 3a mit 36,4% ($n=8/22$) und 1b mit 13,6% ($n=3/22$). In MSM wurde ebenfalls hauptsächlich der Subtyp 1a gefunden (40,0%; $n=4/10$). Andere Subtypen (2b, 4c) wurden mit 30,0% beobachtet, gefolgt von Infektionen mit den Subtypen 1b mit 20,0% ($n=2/10$) und 3a mit 10,0% ($n=1/10$). Innerhalb der Gruppe der heterosexuellen Kontakte wies die Mehrheit hingegen eine 3a Infektion auf (42,9%, $n=3/7$). Eine 1a sowie 1b Infektion hatten jeweils 14,3% der Personen (jeweils $n=1/7$). In MSM sowie heterosexuellen Kontakten wurden nur wenige aktive HCV-Infektionen detektiert ($n=10$ bzw. $n=7$). Die Subtypenverteilung ist für diese Transmissionsgruppe also vermutlich nicht repräsentativ.

5.8 Statistik

Um die statistische Signifikanz der erhaltenen Daten zu bewerten, wurde mittels der Statistik Software Stata der p-Wert sowie das Chancenverhältnis für Geschlecht, Herkunft, Risiko und Alter bestimmt. Der p-Wert misst die Wahrscheinlichkeit, ob ein in der Stichprobe beobachteter Unterschied zwischen zwei Gruppen zufällig entstanden ist (Nullhypothese wird bestätigt) oder nicht (Nullhypothese wird zurückgewiesen) (Biau, Jolles and Porcher, 2010). Dafür wurden 2 unabhängige Stichproben mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Test verglichen, der sich gut für kleine Stichproben eignet. Ein p-Wert $<0,05$ gilt als statistisch signifikant. Die statistische Auswertung zeigt einen signifikanten Unterschied der HCV-Positivrate beim Faktor Geschlecht ($p=0,002$), Herkunft ($p=0,012$) und Transmissionsgruppe ($p=0,000$). Frauen haben im Vergleich zu Männern dabei ein 2,3-fach erhöhtes Risiko an HCV zu erkranken. Personen nicht-deutscher Herkunft weisen im Vergleich zu Personen deutscher Herkunft ein 1,8-fach erhöhtes Risiko einer HCV-Infektion auf. Das höchste Risiko einer HCV-Infektion besteht bei IVDs, die im untersuchten Probenpanel im Vergleich zu den anderen Transmissionsgruppen ein 98,8-fach höheres Risiko einer HCV-Infektion haben. In den verschiedenen Altersgruppen zeigen sich keine statistischen Unterschiede in der HCV-Positivrate. Das Risiko einer HCV-Infektion ist jedoch bei den 25- bis 29-Jährigen um das 1,6-fache höher als in den anderen Altersgruppen.

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es einen Überblick über den Anteil von HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen vor Einführung der Hepatitis-C-DAA-Therapie in Deutschland zu gewinnen. Dazu wurden 1511 Proben serologisch auf HCV untersucht und die detektierten HCV-Infektionen hinsichtlich Status (aktiv/ausgeheilt), Geno- und Subtypverteilung und dem Einfluss demografischer Faktoren weiter charakterisiert.

6.1 HCV-Seropositivrate in HIV-Neudiagnosen 2009-2011

Im untersuchten Probenpanel wurde ein Anteil von 5,4% (n=81/1511) als HCV-seropositiv getestet. Laut WHO waren im Jahr 2015 weltweit 6,2% der HIV-Infizierten zusätzlich mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert (anti-HCV) (World Health Organization, 2017). Der hier detektierte Anteil HCV-seropositiver Personen ist also mit den Angaben der WHO für das Jahr 2015 vergleichbar. Vor Einführung der DAA-Therapie im Jahr 2011 betrug die HCV-Heilungsrate gerade einmal 60%, wohingegen sie heutzutage bei bis zu 95% liegt (Calvaruso and Crax, 2011; World Health Organization, 2017). Die Prävalenz von HIV/HCV-Koinfektionen könnte vor Einführung der DAA-Therapie global somit deutlich höher gewesen sein. Daten zur globalen Prävalenz von HIV/HCV-Koinfektionen im Zeitraum 2009-2011 sind aber kaum vorhanden. Ergebnisse einer US Studie mit 213 ausgewählten HIV-Infizierten (213 Männer und Frauen aus 2 U.S AIDS Studiengruppen mit 1687 Teilnehmern) aus dem Jahr 2002 zeigten, dass im untersuchten Probenpanel 16,1% der HIV-Infizierten HCV-seropositiv waren (Sherman *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine französische Studie im Jahr 2016. Hierbei wurden 34.308 HIV-infizierte Personen zwischen 2000 und 2012 (Dat'AIDS Kohorte) auf das Hepatitis-C-Virus untersucht. Die ermittelte HIV/HCV-Koinfektionsrate in der untersuchten Kohorte lag bei 16,2%, mit 38,4% im Jahr 2000 und 15,1% in 2012 (Cotte *et al.*, 2016; Virlogeux *et al.*, 2017).

Auch in dem hier untersuchten Probenpanel könnte der tatsächliche Anteil HCV-seropositiver Personen höher als der detektierte Anteil von 5,4% sein. Die für die serologische Testung verwendeten Eluate aus dem Jahr 2009 bis 2011 wurden inklusive Filter bei -40°C gelagert und somit knapp 10 Jahre gelagert. Studien mit Dried Blood Spots (DBS) zeigen, dass HCV-Antikörper nach 200 Tagen bei -70°C Lagerung noch zuverlässig nachgewiesen werden können. Studien zur Lagerungsdauer von HCV-Eluaten über 200 Tage sind aber nicht bekannt (McAllister *et al.*, 2015). Außerdem ist die Stabilität der Antikörper in DBS vermutlich größer

als in DSS oder DPS (Brandão *et al.*, 2013; Dokubo *et al.*, 2014). Aufgrund der im Eluat zusätzlich enthaltenen Filter, können Störfaktoren wie Fasern, der zum Teil aufgeweichten DSS/DPS zu falschen Ergebnissen im Immunoassay geführt haben.

Unter den 5,4% HCV-Seropositiven im untersuchten Zeitraum 2009 bis 2011 befanden sich 4,1% (76,5% der HCV-Seropositiven) mit aktiver HCV-Infektion und 1,3% (23,5% der HCV-Seropositiven) mit ausgeheilten HCV-Infektionen. Der Anteil aktiver HCV-Infektionen ist somit mehr als dreimal so hoch wie der Anteil ausgeheilten Infektionen. Dies könnte zum einen auf das Fehlen einer effektiven, nebenwirkungsarmen Therapie in der Zeit vor 2011 zurückgeführt werden. Seit 2001 bestand die Standardbehandlung zwar aus einer Kombination eines Pegyliertem-Alfa-Interferons mit Ribavirin, jedoch war diese Art der Therapie nicht selten mit erheblichen Nebenwirkungen während der Behandlung verbunden (KBV & Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2001). Zudem war die Therapie nicht bei allen HCV-Genotypen gleich effektiv und Personen mit Komorbiditäten waren teilweise nicht behandelbar (Calvaruso and Crax, 2011). Diese Gründe können zu einem frühzeitigen Therapieabbruch und somit zu einer fortbestehenden aktiven HCV-Infektion führen. Zum anderen heilen 40% der HCV-Infektionen innerhalb der ersten 6 Monate spontan aus. Die detektierten 1,3% an ausgeheilten HCV-Infektionen können demnach auch auf spontaner Ausheilung der Infektion beruhen und nicht aufgrund erfolgreicher Therapie.

6.2 Geno- und Subtypverteilung in HCV-Infektionen der HIV-Neudiagnosen zwischen 2009-2011

Für die Geno- und Subtypisierung der Proben wurde Nukleinsäure aus DSS/DPS von HIV-Neudiagnosen gewonnen. Die verwendeten DSS/DPS stammten aus dem Zeitraum Oktober 2009 bis Juni 2011 und wurden bei -20°C aufbewahrt. Somit ergibt sich eine Lagerungsdauer von durchschnittlich 9 Jahren. Die ermittelte HCV-Viruslast lag bei erfolgreich geno- und subtypisierten Proben im Median bei $4,2 \times 10^5$ IU/ml, während sie bei nicht erfolgreich geno- und subtypisierten Proben im Median bei $4,7 \times 10^3$ IU/ml lag.

Die negativen Ergebnisse in den nested-PCRs zur Geno- und Subtypisierung können also vermutlich auf die geringe Viruslast in diesen Proben zurückgeführt werden.

Insbesondere die lange Lagerungsdauer, aber auch mehrfaches Auftauen und Einfrieren der Spots können dabei zur Degradierung der RNA und damit einer Abnahme der Viruslast führen (Baleriola *et al.*, 2011, Lao, *et al.*, 2016).

Eine Studie zur Langzeitlagerung von DPS von HIV-Neuinfizierten unter verschiedenen Temperaturbedingungen zeigt eine bis zu 100%ige PCR-Erfolgsrate, wenn die DPS (HIV-1-Konzentrationsstandard ≥ 10.000 Kopien/ml) bei +4°C oder -20°C über 180 Tagen gelagert wurden. Bei DPS mit geringerer HIV-1-Konzentration (1000 Kopien/ml) war während der ersten 90 Tage kein Unterschied in der PCR-Erfolgsrate zu sehen. Nach 180 Tagen der Lagerung bei -20°C sank die PCR Erfolgsrate hingegen deutlich (um 50% innerhalb der ersten 30 bis 90 Tage und auf 0% zwischen 90 bis 180 Tagen) (Hauser *et al.*, 2018). Eine andere Studie konnte außerdem zeigen, dass die HIV-1-Viruslast in DBS nach 3-monatiger Lagerung bei 37°C höher war als in DSS (Monleau *et al.*, 2010; Greenman *et al.*, 2015). Daten zur HCV-RNA Stabilität in DBS/DSS/DPS mit langen Lagerungszeiten sind nicht bekannt und müssen in Zukunft generiert werden.

Das Verwenden von DSS/DPS anstatt DBS sowie die durch die Langzeitlagerung bedingte Degradierung der RNA kann in dieser Studie bereits in der qPCR zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben, was das Verhältnis der Anteile aktiver zu ausgeheilten HCV-Infektion verändert haben kann.

Anderen Studien zufolge hängen Viruslast und HCV-Genotyp stark voneinander ab. Während der Genotyp 1 mit allgemein einer hohen Viruslast assoziiert ist, wurde bei HCV-Infektionen der Genotypen 2 und 3 eine eher geringe Viruslast beobachtet (Rong *et al.*, 2012). Demnach kann der Ausfall einiger Proben in der nested-PCR auch auf den HCV-Genotyp zurückzuführen sein. Hier gefundene Geno- und Subtypverteilung mit hauptsächlich 1a, gefolgt von 3a Infektionen sind vergleichbar mit Daten aus England und den Niederlanden (Harris *et al.*, 1999; de Vries, te Rijdt and van Nieuwkerk, 2006).

Innerhalb der Gruppe der MSM waren 40,0% mit dem Subtyp 1a infiziert, gefolgt vom Subtyp 1b. Der Genotyp 1 mit Subtyp 1a wurde bereits in anderen Veröffentlichungen als häufigster HCV-Genotyp bzw. Subtyp unter MSM beschrieben (Jansen *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2016). Da die Anzahl der HCV-seropositiven MSM mit aktiver Infektion hier allerdings nur sehr gering war (n=10), sind die ermittelten Daten vermutlich nicht repräsentativ. Langfristig müssen

mehr Proben getestet werden um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Innerhalb der IVDs wurde ein größerer Anteil HCV-seropositiv mit aktiver HCV-Infektion getestet (n=22) und bietet somit eine verlässlichere Datenlage. Subtyp 1a trat in rund 41% der Fälle auf, gefolgt von Subtyp 3a (36,4%). Ergebnisse der DRUCK-Studie bestätigen, dass der Genotyp 1 mit den Subtypen 1a und 1b vorherrschend unter Drogenabhängigen in Deutschland ist (DRUCK-Studie, Robert Koch-Institut, 2016). In anderen Studien wurden ebenfalls die Subtypen 1a und 3a stark mit Drogenkonsumenten assoziiert (Berg *et al.*, 1997).

6.3 Einfluss soziodemografischer Faktoren auf HCV-Infektionen in HIV-Neudiagnosen 2009-2011

Das Studienpanel zwischen Oktober 2009 und Juni 2011 bestand hauptsächlich aus Männern (85,1%), dennoch wurde vergleichsweise ein höherer Anteil an Frauen HCV-seropositiv getestet (4,6% der Männer vs. 10,0% der Frauen). Die HCV-Meldedaten aus dem Jahr 2010 zeigen, dass die HCV-Inzidenz in der männlichen Bevölkerung deutlich höher als in der weiblichen Bevölkerung ist (Epidemiologisches Bulletin, Nr.29, Robert Koch-Institut, 2011). Für die in dieser Bachelorarbeit untersuchten Proben, liegen keine Angaben zur HCV-Inzidenz vor. Es ist nicht bekannt, ob die HCV-Infektion neu erworben oder länger bestehend ist und somit ist kein direkter Vergleich mit den Daten des Robert Koch-Instituts von 2010 möglich. Ein Grund für den höheren Anteil HCV-seropositiver Frauen in den Proben könnte jedoch in einer Stichprobenverzerrung im untersuchten Zeitraum liegen.

Zum Zeitpunkt der HIV-Erstdiagnose war der Großteil der Proben im untersuchten Zeitraum von Personen zwischen 30 und 39 Jahren (30,4%) sowie 40 bis 49 Jahren (27,4%). Innerhalb der verschiedenen Altersgruppen war jedoch der höchste Anteil an HCV-Seropositiven in der Altersgruppe 25 bis 29 Jahre zu beobachten (7,8%), gefolgt von den 30- bis 39-Jährigen (6,3%). Betrachtet man die Daten des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2010 ist zu beobachten, dass die an das RKI übermittelten HCV-Fälle ebenfalls einen Häufigkeitsgipfel in der Altersgruppe der 25- bis 29-Jährigen finden, gefolgt von den 30- bis 39-Jährigen (Epidemiologisches Bulletin, Nr.29, Robert Koch-Institut, 2011). Bei den unter 19-Jährigen sowie über 69-Jährigen wurden keine HCV-Infektionen in dem untersuchten Probenpanel identifiziert, was in Einklang steht mit den übermittelten HCV-Erstdiagnosen aus dem Jahr 2010. Die Inzidenz der Hepatitis-C-Erstdiagnosen im Kindesalter (unter 15 Jahren) war dort mit 0,2 Erkrankten/100.000 Einwohnern entsprechend gering. Allgemein lässt sich im Probenpanel von Oktober 2009 bis

Juni 2011 beobachten, dass der Anteil an aktiven HCV-Infektionen insbesondere bei den 25- bis 29-Jährigen hoch ist (94,4%). Dies kann zum einen daran liegen, dass es sich bei 25- bis 29-Jährigen um eine sexuell aktive Altersgruppe handelt und zum anderen der Gebrauch von Drogen vermehrt auftritt (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011; Prussing, Bornschlegel and Balter, 2015). Dabei handelt es sich in beiden Fällen um Faktoren die eine HCV-Übertragung begünstigen.

23,1% der im Panel untersuchten Proben kamen von Personen, die nicht aus Deutschland stammen. Davon gab die Mehrheit Afrika als Herkunftsregion an (8,6%). Nur ein geringer Teil (2,4%) gab als Herkunftsregion Osteuropa an. Dennoch wurde in dieser Gruppe Personen nicht-deutscher Herkunft der höchste Anteil an HCV-Seropositiven (59,3%) beobachtet, wovon die Hälfte der Personen Drogenkonsum als vermutlichen Transmissionsweg angaben. Osteuropa, besonders Russland, gilt seit Jahren als HIV- sowie HCV-Hochprävalenzregion mit einem Wachstum der HIV-Neudiagnosen seit 2010 um 30% und einer virämischen HCV-Prävalenz von 3,3% (Blach *et al.*, 2017; UNAIDS, 2017). Laut einer Studie aus dem Jahr 2016 tritt eine HIV/HCV-Koinfektion besonders häufig in osteuropäischen Ländern und speziell unter Drogenkonsumenten auf (Nelson *et al.*, 2011; Platt *et al.*, 2016), was die Ergebnisse im untersuchten Probenpanel (2009-2011) bestätigt.

Im untersuchten Studienpanel gab der überwiegende Teil der Personen MSM als vermutlichen Transmissionsweg an (59,4%), gefolgt von HETs mit 17,5% und IVD mit 3,3%. Obwohl mehr als die Hälfte der Personen MSM waren, wurde der höchste Anteil an HCV-Seropositiven in der Gruppe der IVD beobachtet (75,5%). Bei intravenös konsumierenden Drogengebraucher sind Infektionen mit HIV und HCV deutlich stärker als in der Allgemeinbevölkerung verbreitet. Dieser Umstand ist auf das Teilen von benutztem Injektionsbesteck und der damit verbundenen hohen Reinfektionsrate zurückzuführen. Hinzu kommt, dass viele Drogenkonsumenten nichts von ihrer HCV-Infektion wissen und somit auch keiner Therapie unterliegen (DRUCK-Studie, Robert Koch-Institut, 2016). Laut der DRUCK-Studie sind in Deutschland 55,5% der HIV-infizierten IVD gleichzeitig mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert (Robert Koch-Institut, 2016). Seit einigen Jahren wird deshalb vermehrt auf die gezielte Aufklärung sowie die Ausgabe steriler Injektionsbestecke bei Drogenkonsumenten geachtet. sind (GBE-Themenheft: Hepatitis C, Robert Koch-Institut, 2016). MSM stellen im Probenpanel den größten Anteil an HIV-Neudiagnosen dar, aber in nur 2,0% der Fälle konnte auch das

Hepatitis-C-Virus serologisch nachgewiesen werden. HCV kann sexuell übertragen werden, zum Beispiel wenn durch Sexualpraktiken wie Fisting oder ChemSex, anale Schleimhautläsionen entstehen. Das Risiko einer HCV-Infektion ist hierbei zwar deutlich geringer als die Übertragung über Blut, jedoch nicht ganz auszuschließen (Dodge and Terrault, 2014). Vergleicht man die hier gewonnenen Daten mit Ergebnissen anderer Studien, fällt die HCV-Prävalenz innerhalb der Gruppe der MSM im untersuchten Zeitraum eher gering aus. Laut einer Studie aus dem Jahr 2015 (Studienperiode 1996-2012) waren in Deutschland 8,2% der HIV-positiven MSM gleichzeitig mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert (Jansen *et al.*, 2015), davon die meisten mit dem HCV-Genotyp 1 (71,6%). Spinner *et al.* beobachteten im Jahr 2016 sogar eine HCV-Prävalenz in Deutschland von 13% in HIV-positiven MSM (Spinner, *et al.*, 2018). Ein Grund für die niedrige HCV-Prävalenz in MSM könnte in der unregelmäßigen Verteilung der Proben über die Jahre, so auch geschehen zwischen 2009 und 2011, sein. Proben aus den Monaten Mai bis Dezember 2010 fehlten beispielsweise komplett.

7. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit konnte ein Überblick über die HCV-Positivrate in HIV-Neudiagnosen in Deutschland gewonnen werden.

Mit einer HCV-Seropositivrate von 5,4% wurde im untersuchten Studienpanel insgesamt nur ein geringer Anteil an HIV/HCV-Koinfektionen ermittelt. Auffällig ist aber der sehr hohe Anteil HCV-Seropositiver in intravenösen Drogengebern. Das Teilen von benutztem Injektionsbesteck und die Unwissenheit über ihren HIV/HCV-Infektionsstatus führen zu einem hohen Anteil an HIV/HCV-Koinfektionen innerhalb der Drogenkonsumenten. Insbesondere in dieser Hochrisikogruppe ist ein verstärkter Fokus auf Aufklärung, Prävention und regelmäßige Testung notwendig, um die Zahl der HCV-Infektionen effektiv zu senken. Die heutzutage verfügbare DAA-Therapie könnte dabei einen wesentlichen Beitrag liefern und sollte Untersuchungsgegenstand weiterer Studien sein.

8. Literaturverzeichnis

- Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q. L., & Kuo, G. (1989). *Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis*. *The New England Journal of Medicine*.
- Baleriola, C. *et al.* (2011) 'Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.02447-10.
- Berg, T. *et al.* (1997) 'Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: Correlation with clinical and virological parameters', *Journal of Hepatology*. doi: 10.1016/S0168-8278(97)80411-4.
- Biau, D. J., Jolles, B. M. and Porcher, R. (2010) 'P value and the theory of hypothesis testing: An explanation for new researchers', *Clinical Orthopaedics and Related Research*. doi: 10.1007/s11999-009-1164-4.
- Blach, S. *et al.* (2017) 'Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study', *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9.
- Bradley, D. W. *et al.* (1985) 'Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus', *Gastroenterology*. doi: 10.1016/0016-5085(85)90150-7.
- Brandão, C. P. U. *et al.* (2013) 'Simultaneous detection of hepatitis c virus antigen and antibodies in dried blood spots', *Journal of Clinical Virology*. doi: 10.1016/j.jcv.2013.02.014.
- Burnette, W. N. (1981) "'Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A', *Analytical Biochemistry*. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
- Calvaruso, V. and Crax, A. (2011) 'Fibrosis in chronic viral hepatitis', *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. doi: 10.1016/j.bpg.2011.02.012.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011) *Hepatitis C Virus Infection Among Adolescents and Young Adults-Massachusetts, 2002-2009*, *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03659.x.
- Chan, D. P. C. *et al.* (2016) 'Sexually acquired hepatitis C virus infection: A review', *International Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1016/j.ijid.2016.05.030.
- Chen, J. Y., Feeney, E. R. and Chung, R. T. (2014) 'HCV and HIV co-infection: Mechanisms and management', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. doi: 10.1038/nrgastro.2014.17.
- Chen, Z. and Weck, K. E. (2002) 'Hepatitis C virus genotyping: Interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b', *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/JCM.40.9.3127-3134.2002.
- Chevaliez, S. and Pawlotsky, J.-M. (2006) *HCV Genome and Life Cycle, Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*.
- Choo, Q. L. *et al.* (1989) 'Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome', *Science*. doi: 10.1126/science.2523562.

Cotte, L. *et al.* (2016) 'Hepatitis C treatment initiation in HIV-HCV coinfecting patients', *BMC Infectious Diseases*. doi: 10.1186/s12879-016-1681-1.

Cure Hepatitis C. (2016). *Cure Hepatitis C*. Von What Drugs Are Used For Hepatitis C Treatment?: <http://www.cure-hepc.com/what-drugs-are-used-for-hepatitis-c-treatment/> abgerufen

Deutsche AIDS-Hilfe. (April 2011). Hepatitis C: Aktuelles zur Therapie und Prävention. *HIVreport*.

Dodge, J. L. and Terrault, N. A. (2014) 'Sexual transmission of hepatitis C: A rare event among heterosexual couples', *J Coagul Disord*.

Dokubo, E. K. *et al.* (2014) 'Comparison of Hepatitis C Virus RNA and antibody detection in dried blood spots and plasma specimens', *Journal of Clinical Virology*. doi: 10.1016/j.jcv.2014.01.014.

European Medicine Agency. (22. Juli 2011). *European Medicine Agency*. Von Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 18-21 July 2011: <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-18-21-july-2011> abgerufen

Fox, R. K., & Spach, D. H. (12. April 2018). *Hepatitis C Online*. Von Diagnosis of Acute HCV Infection: <https://www.hepatitisc.uw.edu/go/screening-diagnosis/acute-diagnosis/core-concept/all> abgerufen

Gibbs, R. A. (1990) 'DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction', *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac00212a004.

Gower, E. *et al.* (2014) 'Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection', *Journal of Hepatology*. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027.

Grebely, J. *et al.* (2014) 'The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection', *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.26639.

Greenman, J. *et al.* (2015) 'Dried blood spot in the genotyping, quantification and storage of HCV RNA: A systematic literature review', *Journal of Viral Hepatitis*. doi: 10.1111/jvh.12345.

Harris, K. A. *et al.* (1999) 'The most prevalent hepatitis C virus genotypes in England and Wales are 3a and 1a', *Journal of Medical Virology*. doi: 10.1002/(SICI)1096-9071(199906)58:2<127::AID-JMV5>3.0.CO;2-K.

Hauser, A. *et al.* (2018) 'Increasing proportions of HIV-1 non-B subtypes and of NNRTI resistance between 2013 and 2016 in Germany: Results from the national molecular surveillance of new HIV-diagnoses', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0206234 LK - <http://resolver.ebscohost.com/openurl?sid=EMBASE&issn=19326203&id=doi:10.1371%2Fjournal.pone.0206234&atitle=Increasing+proportions+of+HIV-1+non-B+subtypes+and+of+NNRTI+resistance+between+2013+and+2016+in+Germany%3A+Results+from+the+national+molecular+surveillance+of+new+HIV-diagnoses&stitle=PLoS+ONE&title=PLoS+ONE&volume=13&issue=11&spage=&epage=&aulast=Hauser&aufirst=Andrea&aunit=A.&aufull=Hauser+A.&coden=POLNC&isbn=&pages=-&date=2018&aunit1=A&aunitm=>

Hernandez, M. D., & Sherman, K. E. (2011). *HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression*. *Current Opinion in HIV and AIDS*.

Hofstraat, S., Falla, A. M., Duffell, E. F., Hahné, S., Amato-Gauci, A. J., Veldhuijzen, I. K., & Tavoschi, L. (2017). *Current prevalence of chronic hepatitis B and C virus infection in the general population, blood donors and pregnant women in the EU/EEA: a systematic review*. *Epidemiology and Infection*.

- Jansen, K. *et al.* (2015) 'High prevalence and high incidence of coinfection with Hepatitis B, Hepatitis C, and syphilis and low rate of effective vaccination against Hepatitis B in HIVPositive men who have sex with men with known date of HIV seroconversion in Germany', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0142515.
- Kalaghatgi, P., Sikorski, A. M., Knops, E., Rupp, D., Sierra, S., Heger, E., . . . Lengauer, T. (2016). *Geno2pheno[HCV] – A Web-based Interpretation System to Support Hepatitis C Treatment Decisions in the Era of Direct-Acting Antiviral Agents*. PLOS ONE.
- KBV & Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. (2001). *Wirkstoff AKTUELL: Ribavirin (Rebetol®)*. Von KBV: https://www.kvwl.de/arzt/verordnung/arzneimittel/info/wa/ribavirin_rebetol_wa.pdf abgerufen
- Lao, X., Yang, D., Liu, M., Tang, W., Quin, X., & Li, S. (2016). *The impact of storage time on HCV RNA quantitative*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*.
- Lauer, G. M. and Walker, B. D. (2001) 'Hepatitis C virus infection. Epidemiology', *medical progress*.
- McAllister, G. *et al.* (2015) 'Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates', *Journal of Clinical Virology*. doi: 10.1016/j.jcv.2015.07.303.
- Mikrogen GmbH. (2018). *Mikrogen Diagnostik*. Von recomLine HCV IgG: <https://www.mikrogen.de/produkte/produktuebersicht/testsystem/hcv-igg.html> abgerufen
- Monleau, M. *et al.* (2010) 'Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi: 10.1093/jac/dkq205.
- Moriishi, K. and Matsuura, Y. (2012) 'Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2012.00054.
- Morozov, V. A. and Lagaye, S. (2018) 'Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy', *World Journal of Hepatology*. doi: 10.4254/wjh.v10.i2.186.
- Nelson, P. K. *et al.* (2011) 'Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: Results of systematic reviews', *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61097-0.
- Ordeig, L. *et al.* (2018) 'New hepatitis C virus genotype 1 subtype naturally harbouring resistance-associated mutations to NS5A inhibitors', *Journal of General Virology*. doi: 10.1099/jgv.0.000996.
- Pappalardo, B. L. (2003). *Influence of maternal human immunodeficiency virus (HIV) co-infection on vertical transmission of hepatitis C virus (HCV): a meta-analysis*. *International Journal of Epidemiology*.
- Platt, L. *et al.* (2016) 'Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: A global systematic review and meta-analysis', *The Lancet Infectious Diseases*. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00485-5.
- Poethko-Müller, C. *et al.* (2013) 'Die Seroepidemiologie der Hepatitis A, B und C in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. doi: 10.1007/s00103-013-1673-x.
- Prati, D. (2006) 'Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: A global review', *Journal of Hepatology*. doi: 10.1016/j.jhep.2006.07.003.
- Prussing, C., Borschlegel, K. and Balter, S. (2015) 'Hepatitis C Surveillance among Youth and Young

- Adults in New York City, 2009–2013', *Journal of Urban Health*. doi: 10.1007/s11524-014-9920-5.
- Robert Koch-Institut. (25. Juli 2011). Virushepatitis B, C und D im Jahr 2010. (Robert Koch-Institut, Hrsg.) *Epidemiologisches Bulletin*(Nr.29).
- Robert Koch-Institut. (2016). Drogen und chronische Infektionskrankheiten in Deutschland (DRUCK-Studie). (Robert Koch-Institut, Hrsg.) *DRUCK-Studie*.
- Robert Koch-Institut. (2016). *GBE-Themenheft: Hepatitis C*. Berlin.
- Robert Koch-Institut. (27. Juli 2017). Hepatitis C im Jahr 2016. (Robert Koch-Institut, Hrsg.) *Epidemiologische Bulletin*(Nr.30).
- Robert Koch-Institut. (19. Juli 2018). Hepatitis C im Jahr 2017. (Robert Koch-Institut, Hrsg.) *Epidemiologisches Bulletin*(Nr. 29).
- Robert Koch-Institut. (2. August 2018). RKI-Ratgeber Hepatitis C. (Robert Koch-Institut, Hrsg.) *Epidemiologische Bulletin*(Nr. 31).
- Rong, X. *et al.* (2012) 'Correlation of Viral Loads with HCV Genotypes: Higher Levels of Virus Were Revealed among Blood Donors Infected with 6a Strains', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0052467.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Sarrazin, C., Zimmermann, T., Berg, T., Neumann, U. P., Schirmacher, P., Schmidt, H., . . . Zeuzem, S. (2018). *S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der*. © Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart · New York.
- Sherman, K. E. *et al.* (2002) 'Hepatitis C Virus Prevalence among Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus: A Cross-Sectional Analysis of the US Adult AIDS Clinical Trials Group', *Clinical Infectious Diseases*. doi: 10.1086/339042.
- Shi, S. T. and Lai, M. M. C. (2006) *HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication, Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*.
- Smith, D. B. *et al.* (2014) 'Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource', *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.26744.
- Spengler, U. (2018) 'Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection', *Pharmacology and Therapeutics*. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.009.
- Spinner, C. D., Boesecke, C., Jordan, C., Wyen, C., Kümmerle, T., Knecht, G., . . . Noe, S. (2018). *Prevalence of asymptomatic sexually transmitted infections in HIV-positive men who have sex with men in Germany: results of a multicentre cross-sectional study*. *Infection*.
- UNAIDS (2017) *Global AIDS Monitoring 2018, UNAIDS 2017*. doi: 10.1177/2325957416686195.
- Virlogeux, V. *et al.* (2017) 'Modeling HIV-HCV coinfection epidemiology in the direct-acting antiviral era: The road to elimination', *BMC Medicine*. doi: 10.1186/s12916-017-0979-1.
- de Vries, M. J., te Rijdt, B. and van Nieuwkerk, C. M. J. (2006) 'Genotype distribution amongst hepatitis C patients in the Netherlands', *Netherlands Journal of Medicine*.
- Wee, D. W. (March 2017). *National Foundation for Digestive Diseases*. Von Hepatitis C:

<http://nfdd.sg/understanding-the-digestive-systems/common-gi-conditions/hepatitis-c/> abgerufen

Westbrook, R. H. and Dusheiko, G. (2015) 'Natural History of Hepatitis C', *Gastroenterology Clinics of North America*. doi: 10.1016/j.gtc.2015.07.003.

World Health Organization. (Juni 2016). Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis C 2016-2021. (W. H. Organization, Hrsg.)

World Health Organization (2017) *Global Hepatitis Report, 2017*, *World Health Organization*. doi: 10.1016/j.poly.2012.11.010.

World Health Organization. (18. Juli 2018). *WHO*. Von Hepatitis C: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> abgerufen

Yu, X. *et al.* (2007) 'Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles', *Virology*. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.038.

Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ). (19. Januar 2017). *Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ)*. Von Quantitative Real-time PCR (qPCR): <https://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr> abgerufen

Zeuzem, S. (2017). Therapieoptionen bei Hepatitis C: Eine aktuelle Bestandsaufnahme. *Deutsches Ärzteblatt International*, 114: 11–21.

9. Eidesstattliche Erklärung

„Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass ich die von mir eingereichte Bachelorarbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe“.

Berlin, den 27.05.2019

10. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Norbert Bannert für die Möglichkeit meine Bachelorarbeit am Robert Koch-Institut in der Fachgruppe 18 zu schreiben.

Besonders erwähnen möchte ich Dr. Patrycja Machnoswka, die meine Bachelorarbeit intensiv betreut hat. Ich möchte mich hiermit herzlich für die hilfreichen Anregungen und konstruktive Kritik bei der Erstellung meiner Arbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Julian Heinze und Steffen Zander (FG15) sowie der ganzen Arbeitsgruppe des FG18 für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Anhang 2: Kodierung des Geschlechts.

Geschlecht	
-1	fehl. Angaben
1	männlich
2	weiblich

Anhang 3: Kodierung der Herkunft.

Herkunft	
-1	fehl. Angaben
AF-N/NO	Nordafrika/Naher Osten
AF-SS	Subsahara-Afrika
AM-L	Lateinamerika
AM-N	Nordamerika
AS-O	Asien-Ost
AS-SSO	Süd-/Südostasien
AUSL	Ausland
D	Deutschland
EUR-O	Osteuropa
EUR-W	Westeuropa
EUR-Z	Zentraleuropa
KA	Karibik
OZ	Ozeanien
UNB	unbekannt

Anhang 4: Kodierung der Altersgruppe.

Altersgruppe	
-1	fehl. Angaben
1	0-11 Monate
2	1- 4 Jahre
3	5- 9 Jahre
4	10-12 Jahre
5	13-14 Jahre
6	15-19 Jahre
7	20-24 Jahre
8	25-29 Jahre
9	30-39 Jahre
10	40-49 Jahre
11	50-59 Jahre
12	60-69 Jahre
13	> 69 Jahre

Anhang 3: Kodierung der Transmissionsgruppe.

Risiko		
-1	fehl. Angaben	
1	MSM	Männer, die Sex mit Männern haben
2	IVDA	Intravenöse Drogengebraucher
3	Hämo	Hämophilie
4	Trans	Bluttransfusionsierte
5	Beruf.	Berufliche Exposition (Medizinalberufe)
6	Hetero	Heterosexuelle Kontakte
7	HPL	Herkunft Hochprävalenzgebiet
8	PPI	Präperinatale Infektion (Mutter zu Kind Übertragung)
9	k. A.	Keine Angabe