

**Multiplexe serologische Assays
zur Analyse der humoralen Immunantwort
auf das Hepatitis C Virus Genotyp 4**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Angela Filomena

aus Reutlingen

Tübingen

2015

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls
Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

17.02.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

Betreuer an der Eberhard Karls Universität Tübingen

Prof. Dr. Stefan Stevanović

und

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

**Betreuer am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut
an der Universität Tübingen**

Dr. Thomas O. Joos

und

Dr. Nicole Schneiderhan-Marra

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>X</i>
1 Einleitung	1
1.1 Hepatitis C	1
1.2 Hepatitis C in Ägypten	3
1.3 Prävention, Diagnostik und Behandlung von Hepatitis C	5
1.4 Mikrosphären-basiertes Array-System	8
2 Zielsetzung	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Materialien	13
3.1.1 Antikörper	13
3.1.2 Plasmide	13
3.1.3 Antigene	14
3.1.4 Proben und Referenzmaterialien	16
3.1.5 Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.7 Puffer und Lösungen	18
3.1.8 Geräte und Software	20
3.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden	22
3.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	22
3.2.2 Herstellung eines <i>E. coli</i> Lysats.....	23
3.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	24
3.2.4 LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	24
3.2.5 Coomassie-Färbung.....	25
3.2.6 Western Blot	25
3.3 Mikrosphären-basierte Methoden	26
3.3.1 Immobilisierung von Proteinen auf MagPlex® Mikrosphären	26
3.3.2 Immobilisierung von Peptiden auf MagPlex® Mikrosphären.....	28

3.3.3	Multiplexe serologische HCV Assays	28
3.3.4	His-Tag und GST Detektion.....	30
3.4	Kommerziell erhältliche HCV Assays.....	30
3.4.1	INNOTEST HCV Ab IV	30
3.4.2	INNO-LIA™ HCV Score	31
3.5	Datenanalyse.....	32
3.5.1	Korrektur der Messwerte.....	32
3.5.2	Ermittlung von Ausreißern	32
3.5.3	Box-Whisker-Plots	32
3.5.4	Shapiro-Wilk-Test.....	33
3.5.5	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.....	33
3.5.6	Random Forest Klassifikationsverfahren.....	33
3.5.7	ROC Kurven	34
3.5.8	Heatmap und hierarchische Clusteranalyse.....	34
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Entwicklung serologischer HCV Assays	35
4.1.1	Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse G	36
4.1.2	Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse M.....	49
4.1.3	Assay interne Kontrollen	56
4.1.4	Ermittlung der Antigen-Stabilität	62
4.1.5	Reproduzierbarkeit der Immobilisierung	65
4.1.6	IgG Konzentration in humanen Proben.....	67
4.2	Diagnostische Relevanz der entwickelten serologischen HCV Assays.....	80
4.3	Entwicklung eines Verfahrens zur Probenklassifizierung	86
4.3.1	Bestimmung eines Cut-Offs.....	86
4.3.2	Reduktion des Antigensatzes	87
4.3.3	Klassifikationsverfahren für das primäre Testresultat	96
4.3.4	Klassifikationsverfahren für das sekundäre Testresultat	99
4.4	Referenzmessung mit kommerziell erhältlichen Diagnostiktests	102
4.4.1	INNOTEST HCV Ab IV	102
4.4.2	INNO-LIA™ HCV Score	103
4.5	Analyse von Immunprofilen verschiedener HCV Patienten	108
4.5.1	Untersuchung von IgG Immunprofilen.....	108
4.5.2	Untersuchung von IgM Immunprofilen.....	127

4.6	Serologischer Multipathogen-Assay	129
4.6.1	Machbarkeit eines serologischen Multipathogen-Assays	129
4.6.2	Untersuchung von Proben mit dem Multipathogen-Assay	131
5	<i>Diskussion</i>	137
5.1	Entwicklung serologischer HCV Assays	137
5.1.1	Optimierung der Pufferbedingungen im anti-HCV-IgG Assay	137
5.1.2	Präzision und Stabilität der Assays	137
5.1.3	Verwendung Assay interner Kontrollen	139
5.2	Bestimmung der diagnostischen Relevanz	141
5.3	Entwicklung eines Verfahrens zur Probenklassifizierung	142
5.4	Referenzmessung mit kommerziell erhältlichen Diagnostiktests	146
5.5	Analyse von Immunprofilen verschiedener HCV Patienten	147
5.5.1	Untersuchung von IgG Immunprofilen	147
5.5.2	Untersuchung von IgM Immunprofilen	151
5.6	Serologischer Multipathogen-Assay	151
6	<i>Zusammenfassung</i>	153
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	155
8	<i>Anhang</i>	163
	<i>Danksagung</i>	179
	<i>Lebenslauf</i>	181

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
ALT	Alanin-Aminotransferase
APD	Avalanche-Photodiode
AU	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
AUC	Fläche unterhalb der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BLA	<i>biologic license application</i>
bp	Basenpaare
BRE	<i>Blocking Reagent for ELISA</i>
BRE-T	BRE + Tween 20
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CBD	<i>Yeast Chitin Binding Domain Tag</i>
CBS	<i>Carboxy Blocking Solution</i>
CBS-T	CBS + Tween 20
CDC	Gesundheitsbehörde der Vereinigten Staaten (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
Da	Dalton
dk	Esel (<i>donkey</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DOA	8-Amino-3,6-dioxa-octansäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>E. coli</i> Lysat
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
gt	Ziege (<i>goat</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HCV	Hepatitis C Virus
HCV g1	HCV Genotyp 1

Abkürzungsverzeichnis

HCV g4	HCV Genotyp 4
hu	human
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IQR	Interquartilabstand (<i>interquartile range</i>)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
^U /L	Internationale Einheit (<i>international unit</i>) pro Liter
^U /ml	Internationale Einheit (<i>international unit</i>) pro Milliliter
kDa	Kilodalton
L	Liter
LCB	<i>LowCross-Buffer</i> [®]
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LIA	Line-Immunoassay
LLOQ	untere Quantifizierungsgrenze (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	Detektionsgrenze (<i>limit of detection</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>median fluorescence intensity</i>)
ms	Maus
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
n	Anzahl
NAT	Nukleinsäure Testung (<i>nucleic acid testing</i>)
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Controls</i>
NPV	negativer Vorhersagewert (<i>negative predictive value</i>)
NTR	nicht-translatierte Region
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAT	parenterale antischistosomale Therapie
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-Phycoerythrin
PPV	positiver Vorhersagewert (<i>positive predictive value</i>)
PSH	probenspezifisches Hintergrundsignal
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVX	PVA + PVP Puffer
PVXC	PVX Puffer + Casein

Abkürzungsverzeichnis

QC	Qualitätskontrolle (<i>quality control</i>)
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
IgM-RF	IgM Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S/CO-Wert	Signal-zu-Cut-Off-Wert
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sulfo-NHS	Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	TBS + Tween 20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
ULN	Obergrenze der Normalwerte (<i>upper limit of normal</i>)
ULOQ	obere Quantifizierungsgrenze (<i>upper limit of quantification</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HCV Prävalenzen im Jahr 2012.	1
Abbildung 2: HCV Genomorganisation (A) und Membrantopologie der viralen Proteine (B).....	2
Abbildung 3: Abhängigkeit der anti-HCV Prävalenz vom Alter und Geschlecht in einer Gemeinde (Aghour El Soughra) im Nildelta.	4
Abbildung 4: Empfohlene Reihenfolge der HCV Testung zur Diagnose einer bestehenden HCV Infektion.	6
Abbildung 5: Veränderung der HCV Behandlung und der Ansprechrate.....	8
Abbildung 6: Die xMAP Technologie der Firma Luminex.	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung der anti-HCV Assays.....	29
Abbildung 8: Pufferoptimierung durch Zugabe von GST.	37
Abbildung 9: Ermittlung der Probenverdünnung.....	39
Abbildung 10: Reaktivitäten der Proben QC positiv 1 – 3.	40
Abbildung 11: Bestimmung der Intra-Assay Präzision des anti-HCV-IgG Assays.	43
Abbildung 12: Bestimmung der Inter-Assay Präzision des anti-HCV-IgG Assays.	44
Abbildung 13: Bestimmung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen im anti-HCV-IgG Assay.....	46
Abbildung 14: Bestimmung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität im anti-HCV-IgG Assay.	48
Abbildung 15: Vergleich von vier Proben mit und ohne Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper.	49
Abbildung 16: Vergleich der IgG und IgM Detektion in einer Probe mit und ohne Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper.	50
Abbildung 17: Reaktivitäten der Proben QC positiv 4 – 7.	51
Abbildung 18: Bestimmung der Intra-Assay Präzision des anti-HCV-IgM Assays.	52
Abbildung 19: Bestimmung der Inter-Assay Präzision des anti-HCV-IgM Assays.	53
Abbildung 20: Bestimmung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen sowie der Kurzzeit- und Temperaturstabilität im anti-HCV-IgM Assay.....	55
Abbildung 21: Box-Whisker-Plots der Signalhöhe von drei internen Kontrollen in Abhängigkeit vom Krankheitszustand.	58
Abbildung 22: Korrelation zwischen internen Kontrollen.	60
Abbildung 23: Veranschaulichung des probenspezifischen Hintergrundsignals.	61
Abbildung 24: Anwendung der PSH-Korrektur.....	61
Abbildung 25: Untersuchung der Antigen-Stabilität mittels anti-His-Tag und anti-GST Kontrollen.	63
Abbildung 26: Untersuchung der Antigen-Stabilität in drei Proben.	64
Abbildung 27: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung.....	66
Abbildung 28: Test verschiedener Puffer für den Q-IgG Assay.	67

Abbildung 29: Ermittlung eines Standardkurvenmodells für den Q-IgG Assay.....	69
Abbildung 30: Langzeitstabilität der QC Proben.	76
Abbildung 31: Verteilung der IgG Konzentration in gesunden Spendern und in Patienten mit HCV Infektion.	77
Abbildung 32: Korrelation der IgG Konzentration und der Reaktivität auf Kontroll-Mikrosphären.	79
Abbildung 33: Box-Whisker-Plots der S/CO-Werte.....	89
Abbildung 34: ROC Kurven der S/CO-Werte.	91
Abbildung 35: Veranschaulichung der Werte aus Tabelle 46.	97
Abbildung 36: Verteilung des Top 6-Summensignals im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion.	101
Abbildung 37: Vergleich der Antigenreaktivitäten im anti-HCV-IgG Assay und im INNO-LIA™ HCV Score.....	107
Abbildung 38: Heatmap der IgG Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten. ...	110
Abbildung 39: Hierarchische Clusteranalyse der IgG Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten.	111
Abbildung 40: Verteilung der Reaktivität gegenüber vier Core Antigenen im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion.....	112
Abbildung 41: Verteilung der Reaktivität gegenüber vier NS3 Antigenen im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion.....	114
Abbildung 42: Verteilung der Reaktivität gegenüber vier NS4 Antigenen im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion.....	115
Abbildung 43: Verteilung der Reaktivität gegenüber drei NS5 Antigenen und dem Antigen HCV Mix im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion.	116
Abbildung 44: Hierarchische Clusteranalyse der IgG Immunprofile von HCV Patienten mit und ohne spontane Eradikation.	117
Abbildung 45: Verteilung der Reaktivität gegenüber zwei NS3 Antigenen im Vergleich von Patienten mit HCV g1 und HCV g4.	118
Abbildung 46: Verteilung der Reaktivität gegenüber zwei NS4 Antigenen im Vergleich von Patienten mit HCV g1 und HCV g4.	119
Abbildung 47: Immunprofile in Zeitreihen von fünf HCV Patienten mit spontaner HCV Eradikation.	120
Abbildung 48: Immunprofile in Zeitreihen von drei HCV Patienten mit chronischer HCV Infektion..	123
Abbildung 49: Verlauf der Reaktivität ausgewählter HCV Antigene von den drei Patienten aus Abbildung 48.	125
Abbildung 50: Hierarchische Clusteranalyse der IgM Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten.	128
Abbildung 51: QC Proben für die IgG Messung im Multipathogen-Assay.	130
Abbildung 52: Heatmap der IgG Messung im Multipathogen-Assay.....	132
Abbildung 53: Heatmap der IgM Messung im Multipathogen-Assay.....	133

Abbildung 54: Heatmap der IgG Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten im Multipathogen-Assay.	135
Abbildung 55: Überprüfung der aufgereinigten HCV g4a Proteine.	164
Abbildung 56: Ergebnisse des INNO-LIA™ HCV Score Referenztests.	171

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper ohne Konjugat.	13
Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit Konjugat.	13
Tabelle 3: Verwendete Plasmide zur Proteinexpression.....	13
Tabelle 4: Exprimierte HCV g4a Proteine mit His-Tag.	14
Tabelle 5: Kommerziell erhältliche HCV Proteine.	14
Tabelle 6: Synthetisierte Peptide.	15
Tabelle 7: Proteine von verschiedenen Pathogenen.	15
Tabelle 8: Verwendete Proben.....	16
Tabelle 9: Verwendete Referenzmaterialien vom NIBSC [65].	16
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	16
Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	18
Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen.....	18
Tabelle 13: Verwendete Geräte.	20
Tabelle 14: Verwendete Software.....	21
Tabelle 15: Automatisierte Immobilisierung von Proteinen an MagPlex® Mikrosphären.....	27
Tabelle 16: Kopplungskonzentration und Nutzung der immobilisierten Proteine.	27
Tabelle 17: Im HCV-Microarray verwendete HCV Antigene.	35
Tabelle 18: Protein-Zusätze im Probenpuffer zur Unterdrückung von falsch positiven Signalen.	36
Tabelle 19: Grenzwerte für die internen Kontrollen humane IgG, α -hu IgG und humane IgM.....	57
Tabelle 20: Untersuchung einer IgM-Kreuzreaktivität im Q-IgG Assay.....	68
Tabelle 21: Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ).	70
Tabelle 22: Bestimmung der oberen Quantifizierungsgrenze (ULOQ).....	71
Tabelle 23: Bestimmung der Intra- und Inter-Assay Präzision des Q-IgG Assays.....	71
Tabelle 24: Verdünnungslinearität humaner IgG.....	72
Tabelle 25: Überprüfung der Verdünnungslinearität in einer humanen Serumprobe.	73
Tabelle 26: Ermittlung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen im Q-IgG Assay.	74
Tabelle 27: Ermittlung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität im Q-IgG Assay.....	75
Tabelle 28: Ergebnisse der IgG Quantifizierung in 420 Proben.....	77
Tabelle 29: Proben mit einem IgG-Gehalt höher als die Normalkonzentration.	78
Tabelle 30: Wahrheitsmatrix für die Messung von 178 Proben jeweils mit dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay nach Random Forest Klassifikationsverfahren.....	81

Tabelle 31: Statistische Gütekriterien des anti-HCV-IgG Assays und des anti-HCV-IgM Assays nach Random Forest Klassifikationsverfahren.....	81
Tabelle 32: Vergleich der Wahrheitsmatrizes nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgG Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion.....	82
Tabelle 33: Vergleich der statistischen Gütekriterien nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgG Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion.....	82
Tabelle 34: Vergleich der Wahrheitsmatrizes nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgM Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion.....	83
Tabelle 35: Vergleich der statistischen Gütekriterien nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgM Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion.....	83
Tabelle 36: Wahrheitsmatrizes für die Messung von 178 Proben nach Random Forest Klassifikationsverfahren unter Verwendung kombinierter Messdaten aus dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay.....	84
Tabelle 37: Statistische Gütekriterien nach Random Forest Klassifikationsverfahren unter Verwendung kombinierter Messdaten aus dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay...	84
Tabelle 38: Wahrheitsmatrix für die Messung von 424 Proben mit dem anti-HCV-IgG Assay nach Random Forest Klassifikationsverfahren.....	85
Tabelle 39: Statistische Gütekriterien für die Messung von 424 Proben mit dem anti-HCV-IgG Assays nach Random Forest Klassifikationsverfahren.	85
Tabelle 40: Cut-Offs der 27 HCV Antigene.	87
Tabelle 41: Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests.	88
Tabelle 42: Ergebnisse der ROC Kurven Analyse.	92
Tabelle 43: Rangliste der HCV Antigene.	94
Tabelle 44: Top 12 HCV Antigene.	95
Tabelle 45: Wahrheitsmatrix von den S/CO-Werten der Top 12 HCV Antigene nach Random Forest Klassifikationsverfahren.	96
Tabelle 46: Anzahl an Antigenen mit einem S/CO > 1.....	97
Tabelle 47: Wahrheitsmatrix des primären Testresultats.....	99
Tabelle 48: Statistische Gütekriterien des primären Testresultats.	99
Tabelle 49: Wahrheitsmatrix des sekundären Testresultats.....	101
Tabelle 50: Vergleich der Klassifizierung von Proben mit dem INNOTEST HCV Ab IV und dem anti-HCV-IgG Assay.	103
Tabelle 51: Statistische Gütekriterien des INNOTEST HCV Ab IV und des anti-HCV-IgG Assay.	103
Tabelle 52: Vergleich der Klassifizierung von Proben mit dem INNO-LIA™ HCV Score und dem anti-HCV-IgG Assay.	104

Tabelle 53: Statistische Gütekriterien des INNO-LIA™ HCV Score und des anti-HCV-IgG Assay.....	104
Tabelle 54: Level für Bewertung der Antigenreaktivitäten im anti-HCV-IgG Assay.	105
Tabelle 55: Numerische Werte für die Bewertung der Antigenreaktivitäten.	106
Tabelle 56: Cluster der HCV IgG Immunprofile aus Abbildung 39.	109
Tabelle 57: Wahrheitsmatrix für die Messung von 96 Proben mit HCV g1 oder HCV g4 Infektion nach Random Forest Klassifikationsverfahren.....	119
Tabelle 58: S/CO-Werte ausgewählter HCV Antigene von fünf HCV Patienten mit spontaner HCV Eradikation.	121
Tabelle 59: Veränderung der Reaktivität bei Vorliegen einer HCV Eradikation.....	122
Tabelle 60: Präzision des Multipathogen-Assays.	130
Tabelle 61: Wahrheitsmatrix für die IgG Messung mit dem Multipathogen-Assay.....	131
Tabelle 62: Wahrheitsmatrix für die IgM Messung mit dem Multipathogen-Assay.....	133
Tabelle 63: Aminosäuresequenzen der HCV g4a Proteine.....	163
Tabelle 64: Ermittelte p-Werte von drei Personengruppen auf drei Kontroll-Mikrosphären.	164
Tabelle 65: Antigen-Stabilität mittels His-Tag Detektion.	165
Tabelle 66: Antigen-Stabilität mittels GST Detektion.....	165
Tabelle 67: Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 1.....	166
Tabelle 68: Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 2.....	167
Tabelle 69: Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 3.....	168
Tabelle 70: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung in der Probe QC positiv 1. .	169
Tabelle 71: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mittels His-Tag Detektion..	170
Tabelle 72: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mittels GST Detektion.	170
Tabelle 73: Vorgehen zur Bewertung des INNO-LIA™ HCV Score Referenztests.....	171
Tabelle 74: Auswertung des INNO-LIA™ HCV Score Referenztests.....	172
Tabelle 75: Auswertung des anti-HCV-IgG Assays für die Proben, die ebenfalls mit dem INNO-LIA™ HCV Score analysiert wurden (vgl. Abbildung 56 und Tabelle 74).....	173
Tabelle 76: Ermittlung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen im Multipathogen-Assay.	174
Tabelle 77: Ermittlung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität bei IgG Messung im Multipathogen-Assay.....	175
Tabelle 78: Ermittlung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität bei IgM Messung im Multipathogen-Assay.....	176
Tabelle 79: Reaktivitäten auf nicht-HCV Antigenen im Multipathogen-Assay von Proben aus Ägypten.	177
Tabelle 80: Reaktivitäten auf nicht-HCV Antigenen im Multipathogen-Assay von Proben aus Frankreich und den USA.....	178

1 Einleitung

1.1 Hepatitis C

Hepatitis C ist eine durch das Hepatitis C Virus (HCV) verursachte und global verbreitete Lebererkrankung, die ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem darstellt. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind derzeit 130 – 150 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert. Jedes Jahr infizieren sich drei bis vier Millionen Menschen mit HCV und über 500 000 Menschen sterben jährlich durch HCV-assoziierte Lebererkrankungen [1]. Die Seroprävalenz gibt die Häufigkeit des Vorkommens von Antikörpern gegen HCV im Blut an und wird weltweit auf 2,8 % geschätzt, dies entspricht mehr als 185 Millionen Infektionen [2].

HCV ist ein kleines, umhülltes, einzelsträngiges (+)-RNA-Virus, das 1989 erstmals als infektiöser Verursacher der humanen Nicht-A-Nicht-B Hepatitis (veraltete Bezeichnung) identifiziert wurde [3]. Das Hepatitis C Virus bildet mit insgesamt sieben Genotypen und zahlreichen Subtypen das Genus Hepacivirus in der Familie der Flaviviridae [4-8]. Die Prävalenzen (Abbildung 1) und die Verbreitung der HCV Genotypen unterscheiden sich geografisch sehr stark. Weltweit ist HCV Genotyp 1 (HCV g1) für 46,2 % aller HCV Infektionen verantwortlich, gefolgt von HCV Genotyp 3 mit 30,1 % aller Infektionen. Die Genotypen 1, 2 und 3 sind in den USA und in Europa verbreitet. HCV Genotyp 4 (HCV g4) ist vor allem in Zentral- und Nordafrika sowie im Nahen Osten zu finden, Genotyp 5 in Südafrika, Genotyp 6 in Südostasien und wenige Fälle von Genotyp 7 in der Demokratischen Republik Kongo [9, 10].

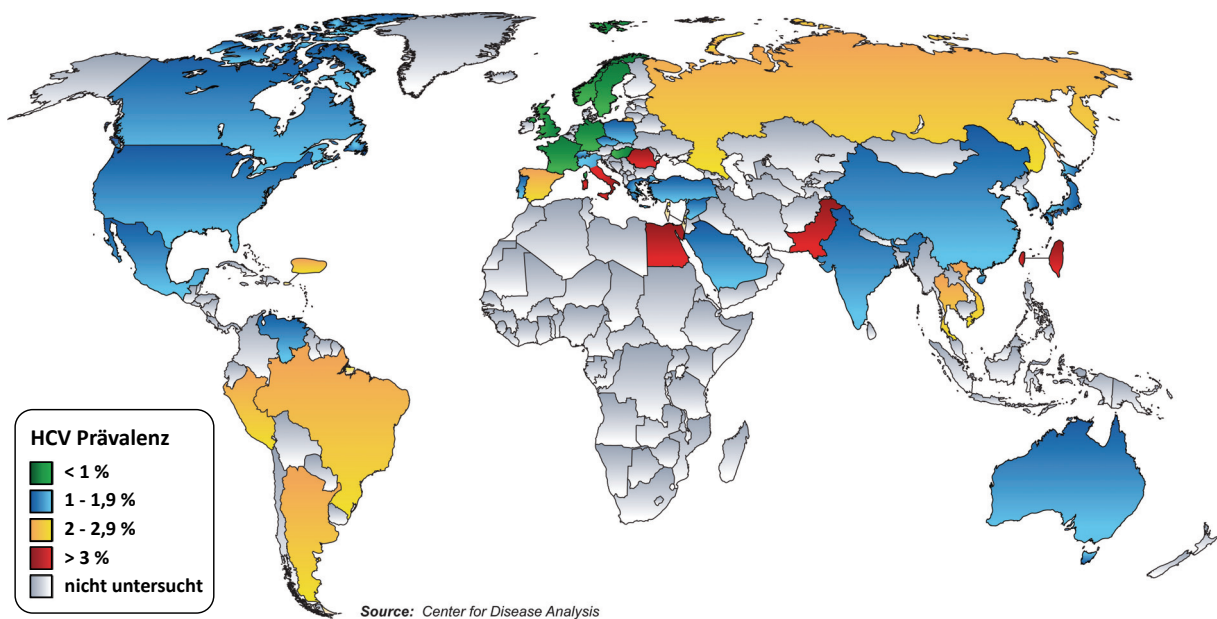


Abbildung 1: HCV Prävalenzen im Jahr 2012. Modifizierte Abbildung nach [11].

Das RNA Genom von HCV beinhaltet einen langen offenen Leserahmen (ORF), der von hochstrukturierten nicht-translatierten Regionen (NTR) flankiert wird (siehe Abbildung 2-A). Die 5' NTR beinhaltet eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), wodurch ein Polyprotein, bestehend aus ungefähr 3000 Aminosäuren, translatiert werden kann. Dieses Polyprotein wird co- und posttranslational in zehn verschiedene Proteine gespalten. Diese Proteine sind ausnahmslos mit intrazellulären Membranen assoziiert (siehe Abbildung 2-B). Die N-terminale Region des Polyproteins stellt die Strukturproteine Core, E1 und E2 zur Verfügung. Während das Core Protein das virale Kapsid bildet, sind die glykosylierten Hüllproteine E1 und E2 in der Virushülle verankert. Wie aus Abbildung 2-B ersichtlich, übernehmen die Nicht-Strukturproteine (NS) p7 sowie NS2 bis NS5 sehr unterschiedliche Aufgaben [12, 13].

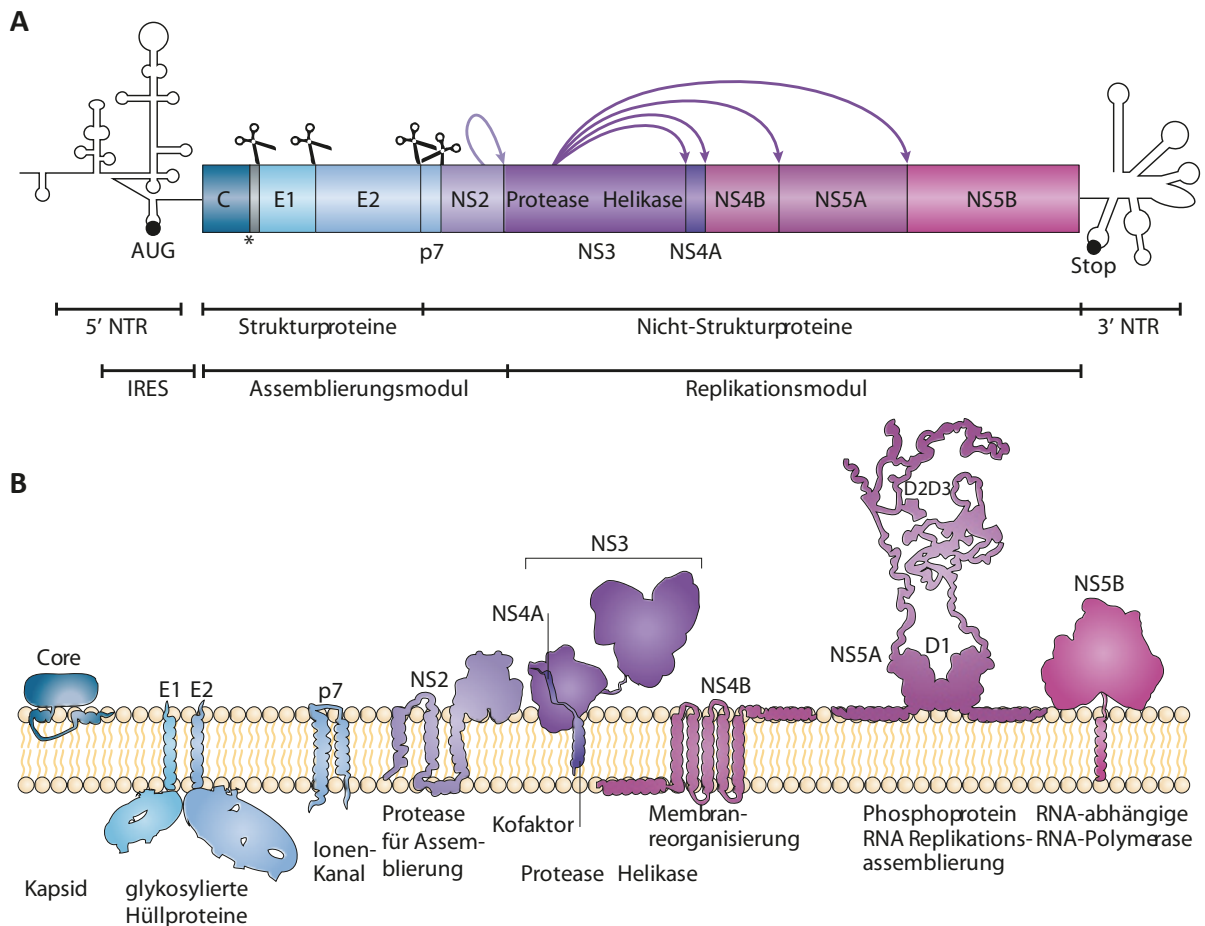


Abbildung 2: HCV Genomorganisation (A) und Membrantopologie der viralen Proteine (B). Der lange HCV ORF codiert für ein Polyprotein, welches in zehn verschiedene Proteine gespalten wird. Diese Proteine sind ausnahmslos mit intrazellulären Membranen assoziiert. Modifizierte Abbildung nach [13].

HCV wird auf parenteralem Weg durch kontaminiertes Blut übertragen, weshalb Bluttransfusionen vor der Einführung des Blutspender-Screenings im Jahr 1990, welches 1999 in vielen Ländern zur Pflicht

wurde, der häufigste Infektionsweg waren [14, 15]. Vor allem in Ländern, in denen keine Testung von Blutspenden erfolgt, kann noch immer die Übertragung von HCV durch Blutprodukte stattfinden. Zu den häufigsten Infektionswegen zählen heute die gemeinsame Benutzung von Spritzen und Kanülen bei intravenösem Drogenmissbrauch, Nadelstichverletzungen im medizinischen Bereich und eine vertikale Übertragung von einer infizierten Mutter auf ihr Kind. Seltener wird HCV durch die gemeinsame Benutzung von Rasierern und Zahnbürsten sowie durch sexuellen Kontakt übertragen [1, 16, 17].

Üblicherweise werden die ersten sechs Monate nach einer HCV Infektion als akute Phase bezeichnet [18, 19]. Die HCV RNA wird 1 – 2 Wochen nach der Infektion im Serum messbar [20, 21] und spezifische anti-HCV Antikörper treten im Mittel 7 – 8 Wochen nach der Infektion auf, wobei die Inkubationszeit, bzw. Serokonversionszeit 2 – 26 Wochen betragen kann [22, 23]. In den meisten Fällen verläuft eine HCV Infektion asymptomatisch, nur 20 – 30 % der Personen zeigen die klinische Symptomatik einer akuten Hepatitis, die im Mittel nach 7 Wochen beginnt [22, 24]. Neben einer Erhöhung der Alanin-Aminotransferase (ALT)-Aktivität im Serum und eines Ikterus können Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Bauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Gelenkschmerzen, dunkelgefärbter Urin und heller Stuhlgang auftreten [17, 25]. Kurz nachdem die HCV RNA ein Maximum von 10^5 bis 10^7 IU/ml zeigt, erreicht die ALT-Aktivität einen Hochpunkt mit Werten größer als eine zehnfache Erhöhung gegenüber der Obergrenze der Normalwerte (ULN) [24]. Die ULN von ALT variiert je nach Labor und Referenzpopulation und liegt zwischen 30 – 50 IU/L [26]. Innerhalb der akuten Phase kann es zu einer spontanen Eradikation des Hepatitis C Virus kommen, allerdings entwickeln 75 – 85 % der Patienten eine chronische Hepatitis C. Diese verläuft meist asymptomatisch, aber oft assoziiert mit zeitweise erhöhten ALT-Aktivitätswerten im Serum, wobei diese meist kleiner als 10x ULN sind [27, 28]. Als Spätfolgen einer chronischen Hepatitis C können nach 20 – 30 Jahren Zirrhosen (5 – 20 %) und Hepatozelluläre Karzinome (1 – 5 %) auftreten, weshalb eine chronische Hepatitis C eine der häufigsten Ursachen für eine Lebertransplantation ist [17, 29-31].

1.2 Hepatitis C in Ägypten

Mit einer HCV Prävalenz von ca. 10 % und einer Seroprävalenz von 15 % hat Ägypten weltweit eine der höchsten Durchseuchungsraten [32]. Außerdem hat Ägypten die höchste Prävalenz von HCV g4, wobei 55 – 78 % aller ägyptischen HCV Isolate vom Subtyp 4a sind [33-35]. Als Ursache für diese HCV Epidemie in Ägypten wird die parenterale antischistosomale Therapie (PAT) angesehen, die v. a. von 1950 bis 1980 zur Behandlung der allgemeinen Bevölkerung durchgeführt wurde [36-38].

Schistosomiasis, auch Billharziose genannt, ist eine parasitäre Wurmerkrankung, die durch den Pärchenegel (*Schistosoma*) verursacht wird. Anfang des 20. Jahrhunderts war Schistosomiasis hochprävalent in Ägypten und lange Zeit der Hauptgrund für Lebererkrankungen. Zur Behandlung der Schistosomiasis wurde Kaliumantimonyltartrat (Brechweinstein) als PAT Medikament eingesetzt, das über Wochen wiederholt intravenös verabreicht wurde [38, 39]. Die verwendeten Utensilien zur Gabe der Injektionen wurden damals nur unzureichend sterilisiert, da die Gefahr, die von der Exposition mit humanem Blut ausgeht, unbeachtet blieb. Durch die Wiederverwendung von nicht ausreichend sterilisierten Spritzen und Kanülen erfolgte eine Verbreitung von HCV in der Bevölkerung. Hierbei handelt es sich vermutlich um die größte iatrogene Transmission einer durch Blut übertragbaren Krankheit [36, 40]. Seit Mitte 1980 wurde der effektive oral verabreichbare Wirkstoff Praziquantel zur Behandlung von Schistosomiasis in Ägypten verfügbar, wodurch die Übertragung von HCV durch die PAT gestoppt wurde [38]. Seit 1990 hat Hepatitis C die Schistosomiasis als Hauptgrund für Lebererkrankungen abgelöst [41].

Trotz einer HCV Gesamtprävalenz von ca. 10 % können in Ägypten dennoch abhängig von der Gegend sehr unterschiedliche Prävalenzen auftreten. Während beispielsweise in Kairo und Alexandria eine geringere Rate (< 8 %) gefunden wird, so können ländliche Gebiete im Nildelta höhere Raten (> 15 %) aufweisen. Obwohl die HCV Prävalenz in Ägypten heute im Gegensatz zu den 1990er Jahren, als noch Werte > 20 % berichtet wurden, geringer ist, stellt v. a. die ältere ägyptische Bevölkerung ein großes Reservoir für HCV dar, da die Prävalenz mit dem Geschlecht und dem Alter steigt. Wie aus Abbildung 3 zu entnehmen, kann die HCV Seroprävalenz in manchen Gebieten bei Personen über 45 Jahre sogar > 60 % sein. Durch das große HCV Reservoir birgt die Exposition gegenüber humanem Blut und Blutprodukten in Ägypten ein höheres Ansteckungsrisiko als z. B. in den USA [38, 42-46].

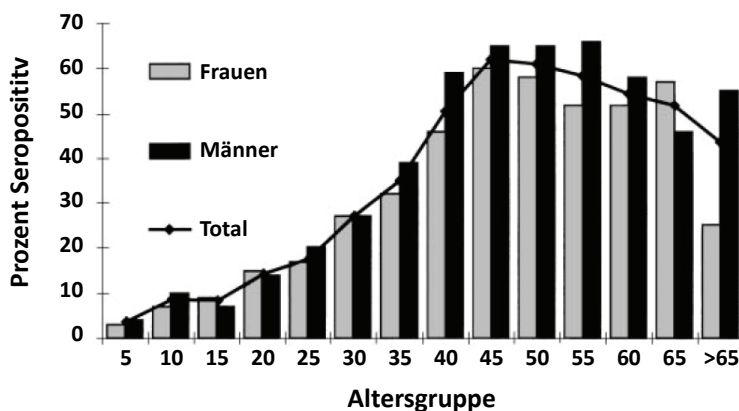


Abbildung 3: Abhängigkeit der anti-HCV Prävalenz vom Alter und Geschlecht in einer Gemeinde (Aghour El Soughra) im Nildelta. Die Seroprävalenz betrug insgesamt 24 % und stieg mit dem Alter, wobei ab einem Alter von 45 Jahren ein Hochpunkt erreicht wurde. Modifizierte Abbildung nach [44].

1.3 Prävention, Diagnostik und Behandlung von Hepatitis C

Da kein Impfstoff für HCV zur Verfügung steht, ist die Prävention stark von der Reduktion des HCV Expositionsrisikos abhängig. Weltweit gesehen finden die meisten HCV Infektionen noch immer im medizinischen Bereich statt, z. B. wenn Vorschriften zur Infektionskontrolle nicht eingehalten werden und Injektionsutensilien wiederverwendet werden. In vielen Ländern ist daher die Aufklärung und die Schulung von Ärzten und Pflegepersonal zunächst einer der wichtigsten Faktoren bei der Prävention von HCV. Zudem kann beispielsweise durch die Einführung von Programmen zum Spritzentausch, bei denen Drogenkonsumenten die Möglichkeit haben alte Spritzen gegen neue, sterile Spritzen zu tauschen, die Übertragung bei Personen mit intravenösem Drogenmissbrauch stark reduziert werden. Auch wenn eine sexuelle Übertragung von HCV selten ist, sollte dennoch die Benutzung von Kondomen empfohlen und die richtige Handhabung erklärt werden. Letztlich sind noch v. a. die Diagnostik und die antivirale Behandlung von HCV Patienten wichtige Faktoren in der Prävention, denn durch Verkleinerung des Reservoirs für HCV in einer Bevölkerung wird auch das Infektionsrisiko verringert [47, 48].

Für die Diagnose und die Überwachung einer HCV Infektion können zwei unterschiedliche Klassen von Labortests eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich einerseits um serologische Assays, die anti-HCV Antikörper detektieren (indirekter Test), andererseits können direkte Tests angewendet werden, die entweder die HCV RNA oder das Core Antigen quantifizieren.

Die WHO empfiehlt, dass Personen, die in einer Population mit hoher Prävalenz leben oder in der Vorgeschichte eine HCV Risikoexposition hatten, ein serologischer HCV Test angeboten wird [47]. In Abbildung 4 ist die empfohlene Strategie zur HCV Testung des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dargestellt [49]. Bei einem reaktiven anti-HCV Antikörper Test sollte zur Sicherung der Diagnose ein Nachweis der HCV RNA erfolgen. Generell sollten hierfür von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Tests verwendet werden. Nur wenn in den vorangegangenen sechs Monaten ein erhöhtes Risiko einer HCV Infektion bestand, sollte trotz eines nicht reaktiven anti-HCV Antikörper Tests ein HCV RNA Test erfolgen. Falls der Untersuchungsbefund eine bestehende HCV Infektion impliziert, sollte der Patient eine antivirale Behandlung erhalten. Ein anti-HCV Antikörper Test kann allerdings auch dann reaktiv sein, wenn die HCV RNA nicht detektierbar ist. Dies ist z. B. bei einer vorangegangenen spontanen Eradikation des HCV oder durch ein falsch positives Testresultat möglich. Um einen solchen Befund ggf. abzuklären, können weitere ergänzende Tests angewendet werden.

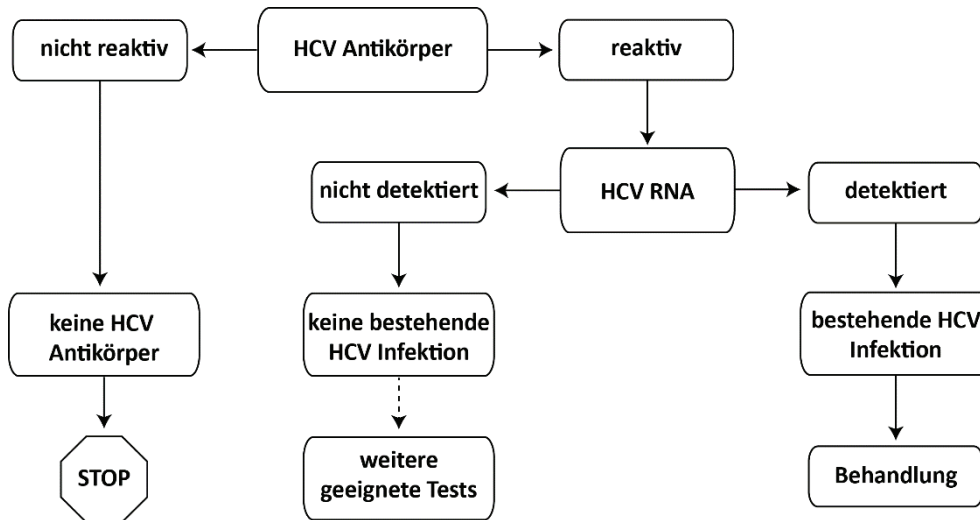


Abbildung 4: Empfohlene Reihenfolge der HCV Testung zur Diagnose einer bestehenden HCV Infektion. Modifizierte Abbildung nach [49].

Als serologische Tests werden hauptsächlich zwei Arten von Assays angewendet: Enzymimmunoassays (EIA) und Immunoblot Assays. In einem EIA liegen Antigene an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert vor und bei der Inkubation mit einer Serum- oder Plasmaprobe können entsprechende Antikörper ihr Antigen binden. Antigen-Antikörper-Komplexe können anschließend durch eine kolorimetrische Enzymreaktion sichtbar gemacht werden. EIAs sind einfach in der Verwendung, teilweise oder vollständig automatisierbar und geeignet um eine große Probenanzahl zu testen. Kommerziell erhältliche und z. T. von der FDA zur Vermarktung zugelassene EIAs mit einer *biologic license application* (BLA) für die Detektion von anti-HCV Antikörpern sind der Abbott PRISM HCV (Abbott Laboratories), der Ortho HCV 3.0 ELISA mit Enhanced SAvE (Ortho Clinical Diagnostics), der INNOTEST HCV Ab IV (Fujirebio Diagnostics) und der MONOLISA Anti-HCV PLUS Assay Version 2 (Bio-Rad Laboratories).

Immunoblot Assays detektieren ebenfalls spezifische Antikörper, allerdings werden hierfür die Antigene auf einem Streifen, z. B. aus Nitrocellulose, immobilisiert. Eine positive Reaktion wird durch das Auftreten von farbigen Banden an spezifischen Positionen des Streifens erkannt. Hierdurch können Reaktivitäten gegenüber verschiedenen Antigenen unterschieden werden. Die Interpretation kann visuell oder automatisiert erfolgen, der Probendurchsatz ist im Gegensatz zu einem EIA jedoch gering. Diese Art der serologischen Tests wurde bis 2013 als Ergänzungstest empfohlen [50]. Der einzige von der FDA zur Vermarktung zugelassene Immunoblot Assay mit einer BLA, der CHIRON RIBA HCV 3.0 SIA (Novartis Vaccines and Diagnostics), ist seit 2013 nicht mehr verfügbar, ein kommerziell erhältlicher Ersatz ist der INNO-LIA™ HCV Score (Fujirebio Diagnostics). Allerdings sind Immunoblot Tests, die früher auch als konfirmatorische Assays eingesetzt wurden, heute in der klinischen Diagnostik obsolet [20], für Forschungszwecke können sie aber durchaus noch von Interesse sein.

Für den direkten Nachweis einer bestehenden HCV Infektion kann einerseits das RNA Genom oder andererseits das Core Antigen detektiert und quantifiziert werden. Bei der Nukleinsäure Testung (NAT) wird die HCV RNA zunächst revers transkribiert zum Erhalt eine komplementäre DNA (cDNA) und anschließend mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Nach Hybridisierung kann z. B. eine kolorimetrische Detektion stattfinden, wodurch letztlich ein qualitativer Nachweis der HCV RNA erfolgt. Von der FDA sind drei NAT Assays mit einer BLA zur Vermarktung zugelassen, wovon allerdings nur der COBAS AmpliScreen HCV Test, v2.0 (Roche Molecular Systems) kommerziell erhältlich ist. Quantitative Tests, welche die Viruslast bestimmen, sind v. a. nützlich bei der Überwachung einer HCV Behandlung. Die Viruslast wird seit der Einführung eines internationalen Standards durch die WHO im Jahr 1999 in der Einheit IU/ml angegeben [51]. Kein quantitativer HCV RNA Test ist von der FDA mit einer BLA zur Vermarktung zugelassen, aber viele Assays sind genehmigt und kommerziell erhältlich, wie z. B. der COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 (Roche Molecular Systems), der Versant™ HCV RNA 3.0 Assay (Bayer Diagnostics) oder der Abbott RealTime HCV (Abbott Molecular).

Neben der HCV RNA kann auch das Vorhandensein des Core Antigens als Marker für eine aktive HCV Infektion angesehen werden. Noch vor der Serokonversion, also bevor anti-HCV Antikörper auftreten, wird das Core Antigen nur 1 – 2 Tage nach der HCV RNA detektierbar [52, 53]. Zwar brachte Ortho Clinical Diagnostics im Jahr 2000 den ersten HCV Core Antigen Assay auf den Markt, dieser ist inzwischen allerdings nicht mehr kommerziell erhältlich. Momentan steht für die ARCHITECT Plattform von Abbott Laboratories ein HCV Core Antigen Assay zur Verfügung.

Obwohl Hepatitis C zu den heilbaren Krankheiten zählt, war die Behandlung einer chronischen HCV Infektion für viele Jahre nur von unzureichendem Erfolg, aber durch die Entwicklung von Medikamenten mit besserer Wirksamkeit konnte die Therapie stark verbessert werden (siehe Abbildung 5) [47].

Vor dem Beginn einer antiviralen Therapie muss zunächst der HCV Genotyp bestimmt werden, da sich die Art und die Länge der Behandlung nach dem Genotyp richten und manche Wirkstoffe nur für Genotyp 1 zugelassen sind. Bis 2011 war die Standardbehandlung eine Kombination von subkutan injiziertem pegyliertem Interferon α (Peginterferon) und oral verabreichtem Ribavirin. Diese Therapie konnte Genotyp-abhängig relativ gute und anhaltende virale Ansprechraten erzielen. Seit Zulassung der ersten direkt agierenden antiviralen Wirkstoffe Telaprevir und Boceprevir, bei denen es sich um Inhibitoren der viralen Protease (Proteaseinhibitoren) handelt, konnte v. a. die Ansprechrate bei HCV Genotyp 1 stark verbessert werden. Die Behandlung mit Peginterferon verursacht häufig starke, den Patienten schwächende Nebenwirkungen, die z. T. sogar lebensbedrohlich sein können. Eine gänzlich

neue Behandlungsmöglichkeit bieten die im Jahr 2014 zugelassenen Hemmstoffe des NS5A Proteins und der NS5B Polymerase. Dadurch wurden sowohl verkürzte als auch Interferon-freie Therapien möglich. Der hochpotente Wirkstoff Sofosbuvir, ein NS5B Inhibitor, wird z. B. in Kombination mit Ribavirin mit oder ohne Peginterferon für die Behandlung der HCV Genotypen 1 – 4 empfohlen [47, 54].

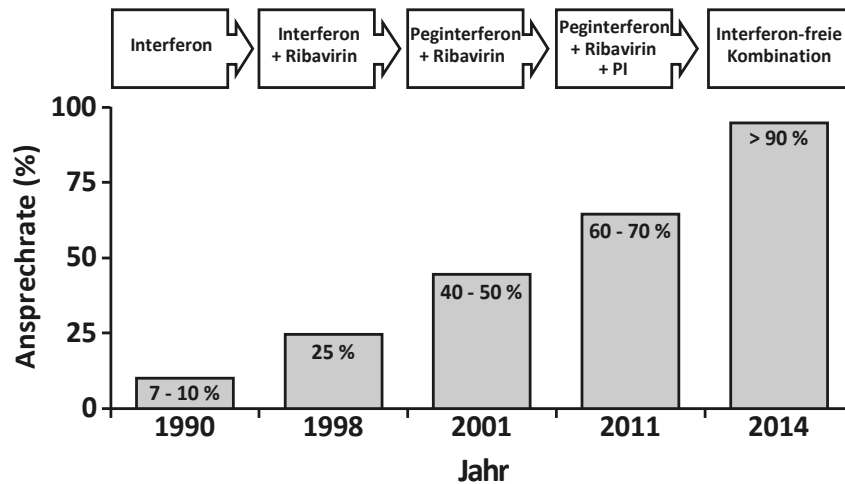


Abbildung 5: Veränderung der HCV Behandlung und der Ansprechrate. PI=Proteaseinhibitor. Modifizierte Abbildung nach [54].

Die Behandlung einer HCV Infektion ist nicht nur für die Reduktion des Übertragungsrisikos wichtig, sondern v. a. auch für die Prävention von Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose und -krebs [47, 55, 56]. Allerdings spielen bei der Entscheidung eine antivirale Behandlung einzuleiten auch Faktoren wie die Notwendigkeit von anspruchsvollen Labortests zur Überwachung und hohe Medikamentenkosten eine wichtige Rolle. Der Preis einer Therapie von 12 Wochen mit Sofosbuvir ist stark vom Land abhängig und reicht von 900 US\$ in Ägypten bis zu 84 000 US\$ in den USA. Bei diesen Kosten bleiben Behandlungen für die meisten HCV Patienten unbezahlbar [47, 57].

1.4 Mikrosphären-basiertes Array-System

In den 1990er Jahren erfolgte der Einzug des Microarrays in die Biowissenschaften, dies wurde v. a. durch Roger Ekins ermöglicht [58]. Protein-Microarrays erlauben die Identifizierung und Quantifizierung einer großen Anzahl von Zielproteinen aus einer kleinen Probemenge innerhalb eines einzigen Experiments. Die Protein-Microarray Technologie ist durch Miniaturisierung, Parallelität und Sensitivität ausgezeichnet und damit ein wichtiges Werkzeug zur Analyse von Interaktionen von Proteinen mit anderen Proteinen, Peptiden, niedermolekularen Verbindungen, Oligosacchariden oder DNA [59, 60].

Multiplexe Protein-Microarrays können mit planaren oder mit Mikrosphären-basierten Systemen durchgeführt werden. Das Mikrosphären-basierte Array-System der Firma Luminex (Austin, USA) basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie, wobei statt Zellen bis zu 500 verschiedene Mikrosphärensorten identifiziert werden können. Die superparamagnetischen Mikrosphärensorten (MagPlex®, siehe Abbildung 6-B) sind aus Polystyrol, haben einen Durchmesser von 6,5 µm und unterscheiden sich durch Anteile an drei Fluoreszenzfarbstoffen (rot, infrarot und orange), die sich im Inneren der Mikrosphären befinden [61]. Das Auslesegerät FLEXMAP 3D (Abbildung 6-A) verfügt über zwei Laser (rot und grün, siehe Abbildung 6-C), vier Avalanche-Photodioden (APD) sowie einen Photomultiplier. Der rote Laser (633 nm) kann die interne Farbcodierung der Mikrosphären anregen, wobei die resultierende Emission der Fluoreszenzfarbstoffe von den APDs in drei Klassifizierungskanälen erfasst wird. In einem Dupletten-Diskriminierungskanal wird mit einer separaten APD die Größe der Mikrosphären durch die Lichtstreuung gemessen. Dieser Kanal dient der Identifizierung von Partikeln, die kleiner oder größer als eine einzelne Mikrosphäre sind, wie z. B. Mikrosphären-Aggregate. Der grüne Laser (532 nm) wiederum dient zur Anregung eines Reportermoleküls (z. B. Phycoerythrin), dessen Emission in einem Reporterkanal von dem Photomultiplier detektiert wird [62].

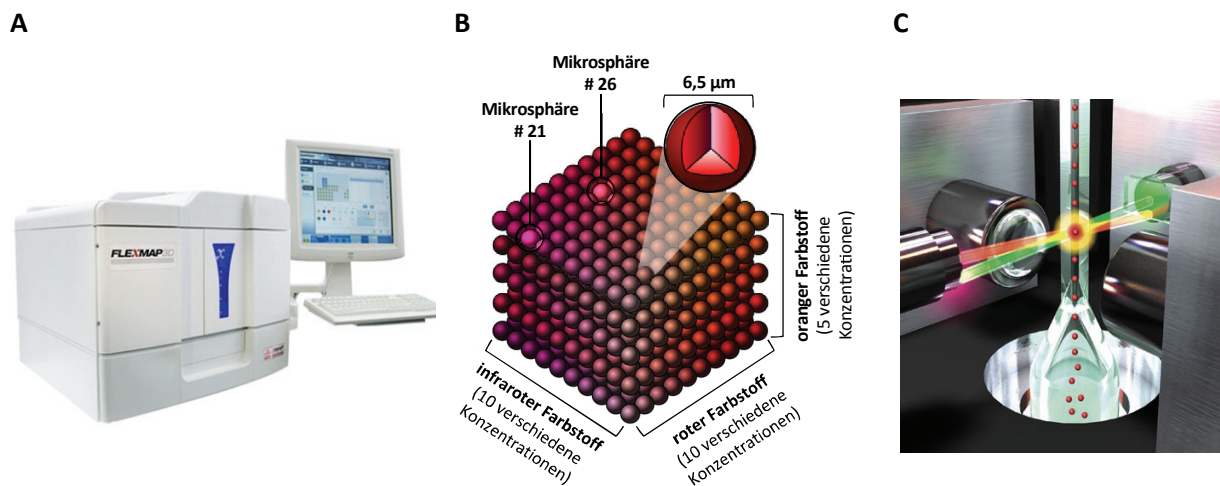


Abbildung 6: Die xMAP Technologie der Firma Luminex. (A) Das FLEXMAP 3D Gerät kann 500 verschiedene Mikrosphären unterscheiden. (B) Jede Mikrosphärensorte wird durch ein spezifisches Konzentrationsverhältnis von drei Fluoreszenzfarbstoffen (rot, infrarot und orange) bestimmt. (C) In der Durchflusszelle wird mithilfe eines roten Lasers die Mikrosphärensorte bestimmt und mit einem grünen Laser kann das Reportersignal erfasst werden. Modifizierte Abbildungen nach [63].

2 Zielsetzung

Das von der EU-Kommission finanzierte Projekt SPHINX („*Spontaneous clearance in Patients acutely infected with HCV – Immune profiling, Novel biomarkers and X-omics approaches*“), das ein Projekt innerhalb des 7. Rahmenprogramms für EU-Forschung war, hatte die Bekämpfung von Hepatitis C in Ägypten und anderen mediterranen Ländern zum Ziel. Hierbei sollten neue Biomarker entdeckt und Einblicke in den Mechanismus der spontanen HCV Eradikation während der frühen Phase einer akuten HCV Infektion gewonnen werden [64]. Ägypten wurde zum Fokus des Projekts, da dort die Prävalenz für eine aktive HCV Infektion 10 % und die Seroprävalenz 15 % beträgt [32]. Außerdem ist Ägypten weltweit das Land mit der höchsten Prävalenz von HCV g4 [33]. Des Weiteren hat sich durch Migration und Reisen der HCV Genotyp 4 bereits v. a. im Mittelmeerraum ausgebreitet [41].

Diese Arbeit war Teil des SPHINX Projekts mit dem Ziel, die humorale Immunantwort von HCV Patienten detaillierter als bisher möglich zu untersuchen. Hierbei sollte der Schwerpunkt vor allem auf der Untersuchung von Patienten mit einer HCV g4 Infektion liegen. Um dies zu ermöglichen, sollten zunächst multiplexe serologische HCV Assays entwickelt werden. Zur Erfassung der frühen und der späteren serologischen Immunantwort bei einer Infektion mit HCV sollten sowohl HCV-spezifische IgM als auch IgG Antikörper detektiert werden. Für den Nachweis einer HCV g4-spezifischen Immunantwort sollten gezielt HCV g4a Antigene eingesetzt werden. Der entwickelte multiplexe serologische HCV Assay zum Nachweis von anti-HCV-IgG Antikörpern sollte anschließend mit kommerziell erhältlichen HCV Diagnostiktests verglichen werden.

Da neben HCV auch andere Hepatitis Viren die klinische Symptomatik einer Hepatitis Infektion (v. a. Erhöhung der Serum ALT-Aktivität und Ikterus) verursachen können, sollte im Hinblick auf eine virale Hepatitis Diagnostik die Machbarkeit eines serologischen Multipathogen-Assays überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper ohne Konjugat.

Name	Spezifität	Spezies	Klonalität	Hersteller
α -His-Tag	Penta-His	ms	monoklonal	Qiagen, Venlo, Niederlande
α -GST	GST	gt	polyklonal	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
α -hu IgG	hu IgG (Fc _v)	gt	polyklonal	Dianova, Hamburg
humane IgG	-	hu	polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
humane IgM	-	hu	polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2: Verwendete Antikörper mit Konjugat.

Name	Spezifität	Spezies	Konjugat	Hersteller
dk- α -gt-PE	gt IgG (H+L)	dk	R-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg
gt- α -ms-PE	ms IgG (H+L)	gt	R-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg
dk- α -ms 680RD	ms IgG (H+L)	dk	IRDye 680RD	LI-COR, Lincoln, NE, USA
gt- α -hu IgG-PE	hu IgG (Fc _v)	gt	R-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg
dk- α -hu IgM-PE	hu IgM (Fc _{5μ})	dk	R-Phycoerythrin	Dianova, Hamburg

3.1.2 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide zur Proteinexpression. Die Aminosäuresequenzen der HCV Proteine sind der Tabelle 63 im Anhang zu entnehmen.

Name	Protein	Aminosäuren	Zustand
pET-28a-Core g4a	HCV Core	1-172	C-terminal verkürzt um 19 AS
pET-28a-NS3 g4a	HCV NS3	1-631	komplette Proteinelänge
pET-28a-NS5A g4a	HCV NS5A	1-445	komplette Proteinelänge
pET-28a-NS5B g4a	HCV NS5B	1-591	C-terminal verkürzt um 16 AS
pGEX-6p1	GST	1 - 218	komplette Proteinelänge

3.1.3 Antigene

Tabelle 4: Exprimierte HCV g4a Proteine mit His-Tag. Die Aminosäuresequenzen der Proteine sind im Anhang in Tabelle 63 dargestellt. Die Überprüfung der Aufreinigungen ist im Anhang in Abbildung 55 gezeigt.

HCV Protein	Bezeichnung	Expressionsstamm	Aufreinigung	Lagerung bei -80°C
Core	Core_1 g4a	HMS174(DE3)	denaturierend	in Lösung
Core	Core_2 g4a	BL21(DE3)	denaturierend	in Lösung
Core	Core_3 g4a	BL21(DE3)	denaturierend	lyophilisiert
NS3	NS3_1 g4a	BL21(DE3)	nativ	in Lösung
NS3	NS3_2 g4a	BL21(DE3)	denaturierend	in Lösung
NS5A	NS5A g4a	BL21(DE3)	denaturierend	in Lösung
NS5B	NS5B_1 g4a	HMS174(DE3)	denaturierend	in Lösung
NS5B	NS5B_2 g4a	HMS174(DE3)	denaturierend	in Lösung
NS5B	NS5B_3 g4a	HMS174(DE3)	denaturierend	in Lösung

Tabelle 5: Kommerziell erhältliche HCV Proteine. k. A. = keine Angabe

HCV Protein (AS Position)	Genotyp	Bezeichnung	Tag	Katalog-Nr.	Hersteller
NS3	g1b	NS3_1 g1b	His	HCV-204	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehovot, Israel
NS4	k. A.	NS4_1	-	HCV-205	
NS5	1	NS5 g1	GST	HCV-219	
HCV	g1b, g1a	HCV Mix	GST	HCV-207	
Core (1 – 100)	g1b	Core g1b	GST	AHCV 111	DSI Srl, Saronno, Italien
NS3 (1192 – 1459)	g1a	NS3 g1a	GST	AHCV 201	
NS3 (1356 – 1459)	g1b	NS3_2 g1b	GST	AHCV 207	
NS3 (1356 – 1459)	g1c	NS3 g1c	GST	AHCV 215	
NS3 (1356 – 1459)	g1b	NS3_3 g1b	GST	AHCV 208	
NS3 (1356 – 1459)	g2c	NS3 g2c	GST	AHCV 210	
NS3 (1356 – 1459)	g4a	NS3_3 g4a	GST	AHCV 212	
NS4 (1691 – 1710, 1712 – 1733, 1921 – 1940)	k. A.	NS4_2	GST	AHCV 300	
NS5 (2061 - 2302)	g1b	NS5 g1b	GST	AHCV 401	

Tabelle 6: Synthetisierte Peptide. Die gezeigten Sequenzen wurden mit einem N-terminalen Cystein sowie mit zwei 8-Amino-3,6-dioxa-octansäure-Einheiten (DOA) synthetisiert.

Peptid	Region (AS Position)	AS Sequenz
c22 g1a	Core (10 – 53)	KTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTS
pNS4A g4a	NS4A (1684 – 1711)	RVVLSGQPAVIPDREVLVYQQFDEMEEabu
5-1-1 g4a	NS4A/B (1694 – 1735)	VIPDREVLVYQQFDEMEEabuSKHLPLVEHGLQLAEQFKQKAVGL
5-1-1 g1a	NS4A/B (1694 – 1735)	IIPDREVLVYQEFDEMEEabuSQHLPYIEQGMMLAEQFKQKALGL
c100 g4a	NS4B (1920 – 1935)	IAFASRGNHVSPTHYV

Tabelle 7: Proteine von verschiedenen Pathogenen.

Protein	Bezeichnung	Pathogen	Tag	Katalog-Nr.	Hersteller
VP1-P2A	VP1-P2A_1	HAV	GST	HAV-228	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehovot, Israel
VP4-VP2	VP4-VP2	HAV	GST	HAV-225	
HbcAg	HBc	HBV	-	HBV-269	
HbsAg adw	HBs_1	HBV	-	HBS-872	
EA	EA	EBV	GST	EBV-272	
EBNA-1	EBNA-1	EBV	GST	EBV-271	
p18	p18	EBV	GST	EBV-273	
p23	p23	EBV	His	EBV-278	
gB	gB	CMV	GST	CMV-211	
Pp150	Pp150	CMV	-	CMV-216	
Pp28	Pp28	CMV	-	CMV-212	
Pp38	Pp38	CMV	GST	CMV-213	
Pp52	Pp52	CMV	GST	CMV-214	
Pp65	Pp65	CMV	GST	CMV-215	
VP1-P2A	VP1-P2A_2	HAV	GST	AHAV 102	DSI Srl, Saronno, Italien
VP3	VP3	HAV	GST	AHAV 103	
VP1	VP1	HAV	GST, His	AHAV 914b	
HDV rek.	HDV	HDV	CBD, His	AHDV 105	
HbsAg ad	HBs_2	HBV	-	30-AH15	Fitzgerald Industries International, Acton, MA, USA
HbeAg	HBe	HBV	His	80-1012	
HEV	HEV	HEV	-	30-AH29	
CMV lysate	CMV Lysat	CMV	-	30-AC70	
<i>T. gondii</i> lysate	<i>T. gondii</i> Lysat	<i>T. gondii</i>	-	30-AT55	
<i>H. pylori</i> 49503	<i>H. pylori</i> Lysat_1	<i>H. pylori</i>	-	30-AH78	
<i>H. pylori</i> ATCC	<i>H. pylori</i> Lysat_2	<i>H. pylori</i>	-	30-AH75	

3.1.4 Proben und Referenzmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Proben. Bis auf die Proben aus den USA wurden alle hier aufgeführten Proben vom Institut Pasteur in Paris im Rahmen des SPHINX Projekts zur Verfügung gestellt.

Probenbeschreibung	Herkunft	Anzahl Proben
gesunde Spender	Frankreich	61
gesunde Spender	Ägypten	26
gesunde Spender	USA	30
Patienten mit akuter HCV Infektion	Ägypten	166
Patienten mit chronischer HCV Infektion	Ägypten	33
Patienten mit chronischer HCV Infektion	Frankreich	108
Zeitreihen von HCV Patienten	Ägypten	133 (33 Patienten)
Patienten mit akuter HAV Infektion	Ägypten	20
Patienten mit akuter HBV Infektion	Ägypten	20

Tabelle 9: Verwendete Referenzmaterialien vom NIBSC [65].

Produkt-Nr.	Name
10/B594	QCRHCVQC1-Anti-Hepatitis C Virus Quality Control Reagent Sample 1
10/150-004	British Working Standard for anti-HCV
95/522	WHO International Standard – First International Standard for anti-Hepatitis B core antigen (anti-HBc)
08/B554	QCRHBeQC1-Anti-Hepatitis B e Antigen Quality Control Reagent Sample 1
95/584	WHO Reference Reagent for Hepatitis E Virus Antibody
01/600	WHO International Standard – Anti-Toxoplasma IgG
10/B599	QCRCMQC1-Anti-CMV Quality Control Reagent Sample 1

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Blocking Reagent for ELISA (BRE)</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA ($\geq 98\%$)	Carl Roth, Karlsruhe
Casein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
complete EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliantblau R-250	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO (wasserfrei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
EDC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Essigsäure (≥ 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (≥ 96 %)	Carl Roth, Karlsruhe
IgG/RF Stripper	The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK
Imidazol Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (> 99 %)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
LowCross-Buffer® (LCB)	Candor Bioscience, Wangen
MES (≥ 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol (≥ 99,9 %)	Merck, Darmstadt
Mono-Ammoniumphosphat (≥ 98,5 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid (≥ 99,9 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (≥ 98 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (1 N)	Carl Roth, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ponceau-S	Carl Roth, Karlsruhe
PVA (MW: 30 – 70 kDa)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PVP (MW: 360 kDa)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure (32 %)	Carl Roth, Karlsruhe
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein-Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sulfo-NHS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TRIS (≥ 99,9 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (100%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20 (100 %)	Merck, Darmstadt

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
15 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
1,5 ml Protein LoBind Tube	Eppendorf, Hamburg
Deep Well 96 Platte für Äkta	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deep Well 96 Platte für KingFisher®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
D-Tube™ Dialyzers Midi 6-8 kDa	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht
Filtropur S 0,45	Sarstedt, Nümbrecht
HisTrap FF	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
HiTrap Desalting	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Luminex MagPlex® Mikrosphären	Luminex Corp., Austin, TX, USA
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mikrotiterplatte, 96-Well, glasklar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatte, 96-Well, PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Protran 0,2 µm Nitrocellulose Membran	Whatman GmbH, Dassel
Whatman Gel-Blotting-Papier	Whatman GmbH, Dassel

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer oder Lösung	Bestandteile	Konzentration
Aktivierungsmix	Aktivierungspuffer	
	EDC	5 mg/ml
	Sulfo-NHS	5 mg/ml
Aktivierungspuffer pH 6,2	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	Triton X-100	0,005 % (v/v)
Assaypuffer	CBS	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
Assay-Waschpuffer pH 7,4	PBS	1x
	Tween 20	0,05 % (v/v)
Bindepuffer pH 8,0 <i>denaturierende Aufreinigung</i>	PBS	2x
	SDS	0,125 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	5 mM
	Imidazol	20 mM

Puffer oder Lösung	Bestandteile	Konzentration
Bindepuffer pH 7,4 <i>native Aufreinigung</i>	NaCl	500 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	20 mM
	Imidazol	20 mM
BRE <i>Angaben laut Hersteller</i>	TRIS	50 mM
	NaCl	150 mM
	gereinigte Gelatine	1 % (w/v)
Carboxy Blocking Solution (CBS)	PBS	1x
	BSA	1 % (w/v)
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliantblau R-250	0,2 % (w/v)
	Methanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Denaturierungspuffer	NaHCO ₃	40 mM
	SDS	1 % (w/v)
	NaCl	300 mM
	β-Mercaptoethanol	20 mM
Detektionspuffer	CBS	50 % (v/v)
	LCB	50 % (v/v)
Elutionspuffer pH 7,5 <i>denaturierende Aufreinigung</i>	PBS	2x
	SDS	0,125 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	5 mM
	Imidazol	500 mM
Elutionspuffer pH 7,4 <i>native Aufreinigung</i>	NaCl	500 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	20 mM
	Imidazol	500 mM
Entfärber I	Ethanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Entfärber II	Ethanol	10 % (v/v)
	Essigsäure	5 % (v/v)
Kopplungspuffer pH 5,0	MES	50 mM
	Triton X-100	0,005 % (v/v)
Kopplungswaschpuffer pH 7,4	PBS	1x
	Triton X-100	0,005 % (v/v)
Lagerungspuffer	CBS	
	Natriumazid	0,1 % (w/v)
LCB	<i>Zusammensetzung nicht verfügbar</i>	
Lysepuffer	PBS	1x
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
	Lysozym	1 mg/ml
	Benzonase	2,5 U/ml
	complete EDTA-free	1 Tablette

Puffer oder Lösung	Bestandteile	Konzentration
PBS pH 7,4 <i>Angaben laut Hersteller</i>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Probenpuffer	CBS	50 % (v/v)
	LCB	50 % (v/v)
	ECL	1 mg/ml
	GST	0,5 mg/ml
PVXC	PBS	1x
	PVP	0,8 % (w/v)
	PVA	0,5 % (w/v)
	Casein	0,1 % (w/v)
TBS pH 7,2	TRIS	50 mM
	NaCl	140 mM
TBST	TBS	
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Transferpuffer für Western Blot	NuPAGE Transfer Buffer	1x
	NuPAGE Antioxidant	0,1 % (v/v)
	Methanol	10 % (v/v)

3.1.8 Geräte und Software

Tabelle 13: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
ÄKTExpress	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
DynaMag™-Spin Magnet	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
FLEXMAP 3D	Luminex Corp., Austin, TX, USA
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH, Offenburg
ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Innova 44 Incubator Shaker	Eppendorf, Hamburg
KingFisher® 96 / KingFisher® Flex	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Odyssey Infrared Imager	Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
pH-Meter 766	Knick, Berlin
Polymax 2040	Heidolph Instruments, Schwabach
Rollenmischer RM 5	Assistent, Sondheim
Rotator für Reagenz- und Probenröhrchen	VWR, Darmstadt
Shaker DRS-12	NeoLab, Heidelberg

Gerät	Hersteller
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Typhoon TRIO Variable Mode Imager	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC-6 Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 14: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
BindIt Software 3.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
ImageQuantTL	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
MasterPlex 2010	MiraiBio Group, San Francisco, CA, USA
MeV Multi Experiment Viewer V 4.9.0	Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
OPTIMA Software V 2.20	BMG LABTECH, Offenburg
RExcel V 3.2.12	Statconn, Krems, Österreich
RStudio V 0.97.551	RStudio Inc., Boston, MA, USA
Typhoon Scanner Control v5.0	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
UNICORN 5.11	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
WEKA 3.6.9	The University of Waikato, Hamilton, New Zealand
XLfit 5.3.1.3	IDBS, Guildford, UK
xPONENT 4.0.846.0 SP1	Luminex Corp., Austin, TX, USA

3.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

In Zusammenarbeit mit dem Pasteur Institut Paris wurden vier Plasmide generiert, die jeweils eine von vier Nukleotidsequenzen für entsprechende HCV g4a Proteine enthielten (Core, NS3, NS5A und NS5B; Aminosäuresequenzen siehe Anhang Tabelle 63). Die Sequenzen wurden zuvor Codon-optimiert für die Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*). Zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurden die Plasmide aus Tabelle 3 zunächst in kompetente *E. coli*-Zellen, BL21(DE3) oder HMS174(DE3), transformiert. Hierzu wurde 1 µl einer 10^{ng}/µl Plasmidlösung zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben und für 30 s auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für exakt 30 s bei 42 °C wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurden 250 µl warmes SOC Medium (ca. 22 °C) zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37 °C mit 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden jeweils einmal 20 µl und einmal 75 µl der transformierten *E. coli*-Zellen auf LB-Agar mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht (ü. N.) bei 37 °C inkubiert. Als Antibiotika wurde bei BL21(DE3) 30 µg/ml Kanamycin und bei HMS174(DE3) 30 µg/ml Kanamycin sowie 100 µg/ml Rifampicin verwendet. Von jeder Transformation wurden zwei Klone gepickt, in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika ü. N. bei 37 °C und 135 rpm im Orbitalschüttler (Innova 44 Incubator Shaker) angezogen und anschließend als Glycerolstock bei -80 °C gelagert.

Um eine Expressionskultur herzustellen wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Hierzu wurden 75 ml LB-Medium + Antibiotika in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer kleinen Menge des entsprechenden Glycerolstocks angeimpft. Anschließend wurde ü. N. bei 37 °C und 175 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Für die HMS174(DE3) Expressionskultur (2x 1 L) wurde zweimal jeweils 20 ml der Vorkultur zu 980 ml LB-Medium + 30 µg/ml Kanamycin + 100 µg/ml Rifampicin im 4 L Erlenmeyerkolben mit Schikane gegeben. Für die BL21(DE3) Expressionskultur (2x 1 L) wurden zweimal jeweils 10 ml der Vorkultur zu 990 ml LB-Medium + 30 µg/ml Kanamycin im 4 L Erlenmeyerkolben mit Schikane gegeben. Anschließend wurde bei 37 °C und 100 rpm im Orbitalschüttler inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 erreicht wurde. Nach Induktion mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) erfolgte die Expression ü. N. bei 30 °C und 100 rpm im Orbitalschüttler. Zur Ernte wurden die Expressionskulturen mit 6000x g bei 4 °C für 5 min (Sorvall RC 6+) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 40 ml PBS resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation mit 8000x g bei 4 °C für 5 min (Zentrifuge 5417R) wurde der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zum Aufschluss wurde das Bakterienpellet in 25 ml Lysepuffer resuspendiert und auf Eis mit Ultraschall (fünfmal 20 Ultraschall-Stöße) behandelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf 50 ml mit

Lysepuffer aufgefüllt und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) im Rotator inkubiert. Nach der Lyse wurde mit 10000x g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand (Extrakt der löslichen Proteine) wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pellet wurde in 50 ml Denaturierungspuffer resuspendiert und für 1 h bei 37 °C im Rotator inkubiert. Nach der Denaturierung wurde mit 10000x g bei 20 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand (Extrakt der unlöslichen Proteine) wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Vor der Aufreinigung wurde das jeweilige Extrakt über einen 0,22 µm Filter (Filtropur S 0,2) oder einen 0,45 µm Filter (Filtropur S 0,45) filtriert. Das filtrierte Extrakt der unlöslichen Proteine wurde 1:4 mit Bindepuffer für die denaturierende Aufreinigung verdünnt. Zur Aufreinigung der HisTag-Proteine wurde das Prinzip der Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie genutzt [66-68]. Hierzu wurde das ÄKTExpress System (GE Healthcare) und eine Ni²⁺-Sephrose-Säule (HisTrap FF) verwendet. Nachdem das Extrakt über die Säule geleitet wurde und HisTag-Proteine binden konnten, wurden ungebundene Proteine mit 15 ml Bindepuffer gewaschen. Zur Elution wurde ein Gradient mit kontinuierlich steigender Konzentration des Elutionspuffers verwendet. Während der Elution bei einer denaturierenden Aufreinigung wurde der Elutionspeak fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereint und anschließend ü. N. bei RT in PBS dialysiert (D-Tube™ Dialyzers Midi 6-8 kDa). Der Elutionspeak einer nativen Aufreinigung wurde im System gesammelt und anschließend zum Pufferaustausch auf zwei Entsalzungssäulen (HiTrap Desalting) gegeben.

3.2.2 Herstellung eines *E. coli* Lysats

Zur Herstellung eines *E. coli* Lysats wurden BL21(DE3) Zellen zunächst in einer Vorkultur mit 75 ml LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Hierzu wurde ü. N. bei 37 °C und 175 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Zwei Hauptkulturen (2x 2 L) im 4 L Erlenmeyerkolben mit Schikane wurden mit jeweils 10 ml der Vorkultur angeimpft. Anschließend wurde bei 37 °C und 150 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Die Ernte und Lyse der Bakterien erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben. Ausschließlich das Extrakt der löslichen Proteine wurde weiter verwendet. Zum Pufferaustausch wurde eine Acetonfällung der Proteine durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10 ml des Extrakts mit 40 ml eiskaltem (-20 °C) Aceton versetzt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 10000x g bei -9 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das restliche Aceton auf den Pellets in den Zentrifugenröhrchen wurde für 1 h bei RT abdampfen gelassen. Die Pellets wurden vereinigt und in 10 ml PBS resuspendiert. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung wurde mit 10000x g bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Proteinkonzentration des *E. coli* Lysats wurde bestimmt.

3.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford [69] durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine photometrische Methode, die auf einer Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 mit aromatischen und primär basischen Seitengruppen von Proteinen in saurem Milieu beruht. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Als Referenz für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Standardkurve mit sieben Messpunkten verwendet. Dazu wurde ausgehend von einer 2 mg/ml BSA-Lösung eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe in PBS erstellt. In einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) wurden 5 µl Probe/Standard gemischt mit 95 µl verdünntem Bradford-Reagenz (1:4 mit H₂O). Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 570 nm im Mikroplattenleser FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Offenburg) gemessen. Die Konzentrationen wurden mit der MARS Daten Analyse (integriert in der OPTIMA Software) bestimmt.

3.2.4 LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen wurden nach dem Prinzip der diskontinuierlichen, denaturierenden Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [70] durchgeführt. Hierzu wurde das NuPAGE System von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) verwendet, wobei es sich um eine Lithium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE) handelt. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an NuPAGE Sample Reducing Agent (10x) und NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) versetzt und auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 70°C denaturiert (Mastercycler gradient). Nach der Entnahme wurden die Gel-Kassetten (NuPAGE Novex 4 – 12 % Bis-Tris-Gel) zunächst mit ddH₂O abgespült und in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. In die innere Kammer wurden 200 ml Laufpuffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer) eingefüllt und 500 µl Antioxidans zugegeben. Nach der Denaturierung wurde von den Proben der gesamte Ansatz auf das Gel aufgetragen. Als Referenz wurde der vorgefärbte Proteinstandard SeeBlue Plus2 verwendet (7,5 µl). Die äußere Kammer wurde mit 800 ml Laufpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V für 45 min durchgeführt.

3.2.5 Coomassie-Färbung

Zum Anfärben der aufgetrennten Proteine nach der Gelelektrophorese wurden die Gele für 1 h in Coomassie-Färbelösung gelegt. Zum Entfärben wurden die Gele zunächst 1 h in Entfärber I und anschließend über Nacht in Entfärber II inkubiert. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mit dem Fujifilm CCD-Kamerasystem ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK).

3.2.6 Western Blot

Zur weiteren Untersuchung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen, wurden diese mittels Western Blot Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert [71]. Hierzu wurde ebenfalls das NuPAGE System von Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet. Der Transfer erfolgt für 75 min bei einer konstanten Stromstärke von 160 mA. Zur Beurteilung der Effizienz des Transfers, wurden die immobilisierten Proteine mit einer Ponceau-S Färbelösung für 5 min auf einem Schüttler (Polymax 2040) reversibel gefärbt. Nachdem überschüssige Färbelösung mit ddH₂O ausgewaschen wurde, erfolgte die Dokumentation mit ImageQuant LAS 4000 mini. Anschließend wurde die Membran in TBST vollständig entfärbt. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran für mindestens 30 min bei RT in einer Wanne auf einem Schüttler in TBST + 3 % BSA inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in dem die Antikörperinkubationen erfolgten. Der α -His-Tag Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 4 ml TBST + 1 % BSA verdünnt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer (Assistent, Sondheim) mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen, die Membran einmal kurz mit 10 ml TBST ab gespült und dann fünfmal für je 5 min mit 10 ml TBST auf einem Rollenmischer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezies-spezifischen Sekundärantikörper (dk- α -ms 680RD), welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert vorlag, erfolgte im Dunkeln in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 4 ml TBST + 1 % BSA für 1 – 3 h bei RT auf einem Rollenmischer. Danach wurde erneut wie beschrieben gewaschen und anschließend wurde die Membran getrocknet. Die Detektion erfolgte im Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

3.3 Mikrosphären-basierte Methoden

Die angewendeten Mikroarrays wurden mit der Mikrosphären-basierten Mikroarray-Technologie der Firma Luminex (Austin, USA) durchgeführt. Hierzu wurde das FLEXMAP 3D Gerät eingesetzt, das bis zu 500 verschiedene Mikrosphärensorten unterscheiden kann.

3.3.1 Immobilisierung von Proteinen auf MagPlex® Mikrosphären

Die Oberfläche der MagPlex® Mikrosphären ist funktionalisiert mit Carboxylgruppen (COOH-Gruppen). Durch Zugabe von EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid) und Sulfo-NHS (sulfo-N-hydroxysuccinimid) werden die Mikrosphären aktiviert, indem die Carboxylgruppen zu einem Aktivester reagieren. Primäre Aminogruppen (NH₂-Gruppen) in Proteinen können anschließend unter Freisetzung eines Harnstoffderivats mit dem Aktivester zu einer Amidbindung weiter reagieren.

Durch eine Automatisierung des Immobilisierungsprozesses können parallel bis zu 96 Proteine auf unterschiedliche Mikrosphären immobilisiert werden. Dadurch erhöht sich der Durchsatz und die Konsistenz der Ergebnisse kann verbessert werden. Für die Automatisierung wurde ein Magnet-Partikel-Prozessor (KingFisher® 96) verwendet. Bei diesem System werden durch einen Magnetkamm paramagnetische Mikroartikel zwischen acht Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Wells) transferiert.

Insgesamt wurden zehn Deep Well 96 Platten, wie in Tabelle 15 aufgeführt, vorbereitet und zwei entsprechende Programme mit der BindIT Software geschrieben. Die Mikrosphären-Stocklösungen wurden gründlich gemischt (Vortex-Genie 2) und für 30 s im Ultraschallbad (Sonorex) mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden jeweils 300 µl der Stocklösungen ($1,25 \times 10^7$ Mikrosphären pro ml) in Platte 1 überführt. Um den Transfer der Mikrosphären im KingFisher® 96 zu ermöglichen wurde 25 µl einer 0,065 % Triton X-100 Lösung in jedes Well der Platte 1 zugegeben. Zum Waschen der Mikrosphären wurden 250 µl Aktivierungspuffer in Platte 2 und Platte 3 vorgelegt. Die Aktivierung der Mikrosphären erfolgte für 20 min bei RT in Platte 4 mit 150 µl Aktivierungsmix. Zum Waschen nach der Aktivierung wurden Platte 5 und Platte 6 jeweils mit 250 µl Kopplungspuffer befüllt. In Platte 7 erfolgte anschließend die Immobilisierung der Proteine für 2 h bei RT, hierfür wurde 125 µl der entsprechenden Proteinlösung vorgelegt (Kopplungskonzentration und Nutzung siehe Tabelle 16). Zum Waschen nach der Immobilisierung wurden Platte 8 und Platte 9 mit 500 µl Kopplungswaschpuffer befüllt. Am Ende des Programms wurden die Mikrosphären in Platte 10 in 300 µl Lagerungspuffer aufgenommen. Die Platte 10 wurde über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden entsprechende Mikrosphären zu einem Protein-Microarray in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml vereinigt.

Tabelle 15: Automatisierte Immobilisierung von Proteinen an MagPlex® Mikrosphären. Die Durchführung erfolgte im KingFisher® 96. Zwischen den Schritten werden die Mikrosphären mithilfe eines Magnetkamms im 96-Well Format in die nächste Platte transferiert.

Platte	Inhalt der Platte	Volumen [µl]	Aktion / Funktion	Dauer
1	Mikrosphären	300	Sammeln der Mikrosphären	5 x 30 s
2	Aktivierungspuffer	250	Waschen	1 min
3	Aktivierungspuffer	250	Waschen	1 min
4	Aktivierungsmix	150	Aktivierung der Mikrosphären	20 min
5	Kopplungspuffer	250	Waschen	1 min
6	Kopplungspuffer	250	Waschen	1 min
7	Proteinlösungen	125	Immobilisierung von Proteinen	2 h
8	Kopplungswaschpuffer	500	Waschen	1 min
9	Kopplungswaschpuffer	500	Waschen	1 min
10	Lagerungspuffer	300	Abgabe der Mikrosphären	30 s

Tabelle 16: Kopplungskonzentration und Nutzung der immobilisierten Proteine.

Protein	Kopplungskonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Nutzung
HCV Proteine	50	Antigen
HAV Proteine	50	Antigen
HBV Proteine	50	Antigen
HDV Protein	50	Antigen
HEV Protein	50	Antigen
EBV Proteine	50	Antigen
CMV Proteine	50	Antigen
CMV Lysat	50	Antigen
<i>T. gondii</i> Lysat	50	Antigen
<i>H. pylori</i> Lysate	50	Antigen
humane IgG	50	interne Kontrolle
humane IgM	50	interne Kontrolle
gt- α -hu IgG	25	interne Kontrolle
BSA	100	interne Kontrolle / Trägerprotein
GST	50	interne Kontrolle
ECL	100	interne Kontrolle

3.3.2 Immobilisierung von Peptiden auf MagPlex® Mikrosphären

Die Immobilisierung von Peptiden auf MagPlex® Mikrosphären erfolgte über eine kovalente Bindung an ein Trägerprotein. Zur Bindung der Peptide an das Trägerprotein wurde Sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrat) verwendet. Sulfo-SMPB reagiert zunächst unter Abspaltung von Sulfo-NHS mit primären Aminogruppen des Trägerproteins zu einer Maleimidophenylbutyrat-Zwischenstufe. Durch Zugabe von Peptiden, die mit einem N-terminalen Cystein synthetisiert wurden, bindet die SH-Gruppe über den Maleimidophenylbutyrat-Linker an das Trägerprotein.

Zunächst wurden, wie in 3.3.1 beschrieben, BSA-Mikrosphären hergestellt. Hierzu wurde BSA als Trägerprotein mit einer Kopplungskonzentration von $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ auf verschiedenen Mikrosphärensorten immobilisiert. Die BSA-Mikrosphären wurden anschließend jeweils in ein Protein LoBind Tube überführt und der Überstand wurde mithilfe eines Magnetseparators (DynaMag™-Spin Magnet) verworfen. Anschließend wurden $200 \mu\text{l}$ einer $0,75 \text{ mg}/\text{ml}$ Sulfo-SMPB Lösung in Kopplungswaschpuffer zu den BSA-Mikrosphären zugegeben und für 1 h bei RT im Dunklen in einem Rotator inkubiert. Währenddessen wurden die Peptide in PBS in 1 mM gelöst und $50 \mu\text{l}$ wurden für 20 min im Rotator äquimolar mit TCEP (Tris[2-carboxyethyl]-phosphin) behandelt, damit mögliche Disulfidbrücken zu freien SH-Gruppen reduziert wurden. Anschließend wurden die reduzierten Peptide mit PBS + 0,0125 % Triton X-100 auf eine 0,2 mM Lösung verdünnt. Nach der Aktivierung der BSA-Mikrosphären wurden diese im Magnetseparator zweimal mit $500 \mu\text{l}$ Kopplungswaschpuffer gewaschen und anschließend jeweils eine Mikrosphärensorte mit einem reduzierten Peptid für 1 h bei RT im Dunkeln in einem Rotator inkubiert. Danach wurde erneut wie beschrieben gewaschen und anschließend wurden die Peptid-Mikrosphären in $300 \mu\text{l}$ Lagerungspuffer aufgenommen. Nach der Lagerung über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln wurden die Mikrosphären zu einem Peptid-Microarray in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml vereinigt.

3.3.3 Multiplexe serologische HCV Assays

Bei den multiplexen serologischen HCV Assays handelt es sich um Mikrotiterplatten Immunoassays zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV in humanem Serum oder Plasma. Hierbei wurde zum einen ein Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse G (anti-HCV-IgG Assay) und zum anderen ein Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse M (anti-HCV-IgM Assay) verwendet. Eine schematische Darstellung der Assays ist in Abbildung 7 gezeigt. Der Protein-Microarray aus 3.3.1 und der Peptid-Microarray aus 3.3.2 wurden zu einem HCV-Microarray vereinigt. Die Durchführung der Assays erfolgte halb-automatisiert in einem Magnet-Partikel-Prozessor.

Von dem HCV-Microarray wurden entsprechend der Probenanzahl 5 µl für 10 Proben (Wells) 1:100 in Assaypuffer verdünnt. Für den anti-HCV-IgG Assay wurden die Proben, falls nicht anders beschrieben, zunächst 1:40 in PVXC verdünnt, gefolgt von einer 1:5 Verdünnung in Probenpuffer und anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Für den anti-HCV-IgM Assay wurden die Proben, falls nicht anders beschrieben, zunächst 1:5 in IgG/RF Stripper verdünnt, für 30 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:20 in Probenpuffer verdünnt.

Für das Programm im Magnet-Partikel-Prozessor wurden acht 96-Well PCR-Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) benötigt. In der ersten Platte wurden 50 µl des verdünnten HCV-Microarrays in jedes Well gegeben. Die Mikrosphären wurden aus der ersten in die zweite Platte transferiert, welche die verdünnten Proben enthielt. Nach 2 h Inkubation bei RT mit regelmäßigem Mischen wurden die Mikrosphären nacheinander in zwei Platten mit jeweils 100 µl Assay-Waschpuffer je Well gewaschen. Zur Visualisierung gebundener humaner Antikörper wurden die Mikrosphären mit 50 µl R-Phycoerythrin (PE)-konjugiertem Detektionsantikörper für 1 h bei RT mit regelmäßigem Mischen inkubiert (5 µg/ml Antikörper in Detektionspuffer). Beim anti-HCV IgG Assay (Abbildung 7-A) wurde der Antikörper gt-α-hu IgG-PE und beim anti-HCV IgM Assay (Abbildung 7-B) der Antikörper dk-α-hu IgM-PE verwendet. Nachdem die Mikrosphären wie zuvor in zwei Platten gewaschen und in 100 µl Assay-Waschpuffer resuspendiert wurden, erfolgte das Auslesen des Assays mit dem FLEXMAP 3D Gerät (Einstellungen: Probenvolumen 80 µl, maximale Messzeit 60 s, minimale Anzahl an Mikrosphären pro Sorte 50 bis 100). Als Messwert wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (*median fluorescence intensity*, MFI) angegeben.

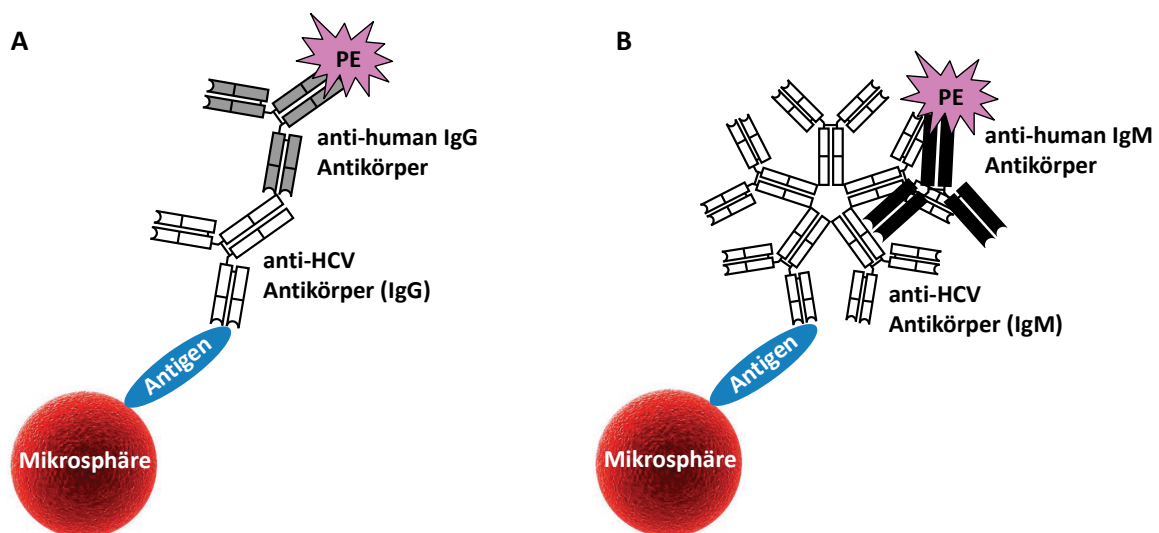


Abbildung 7: Schematische Darstellung der anti-HCV Assays. Verschiedene Antigene wurden auf der Oberfläche von Mikrosphären immobilisiert. Bei der Inkubation mit einer Probe konnten entsprechende Antikörper ihr Antigen binden. Bei einem zweiten Inkubationsschritt wurden PE-konjugierte, spezie-spezifische Antikörper eingesetzt. (A) anti-HCV-IgG Assay. (B) anti-HCV-IgM Assay.

3.3.4 His-Tag und GST Detektion

Die His-Tag und GST Detektion der Antigene des HCV-Microarrays erfolgte mit demselben Verfahren wie die multiplexen serologischen HCV Assays. Hierzu wurden dieselben Volumina und Geräteeinstellungen verwendet. Anstelle einer Probe wurde ein anti-His-Tag Antikörper (ms- α -His-Tag) oder ein anti-GST Antikörper (gt- α -GST) verwendet. Diese wurden jeweils in Assaypuffer verdünnt, sodass bei ms- α -His-Tag eine Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und bei gt- α -GST eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht wurde. Zur Visualisierung wurden PE-konjugierte, spezies-spezifische Detektionsantikörper eingesetzt. Bei der His-Tag Detektion wurde der Antikörper gt- α -ms-PE verwendet und bei der GST Detektion wurde der Antikörper dk- α -gt-PE genutzt. Wie auch bei den multiplexen serologischen HCV Assays wurden die Detektionsantikörper in eine Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Assaypuffer angesetzt.

3.4 Kommerziell erhältliche HCV Assays

3.4.1 INNOTEST HCV Ab IV

Bei dem INNOTEST HCV Ab IV (Fujirebio Diagnostics, Malvern, USA) handelt es sich um einen Mikrotiterplatten Enzymimmunoassay der vierten Generation zum Nachweis von Antikörpern gegen HCV in humanem Serum oder Plasma. In den Wells der Mikrotiterplatte sind rekombinante Proteine und synthetische Peptide von unterschiedlichen immundominanten Regionen des HCV immobilisiert. Bei den Regionen handelt es sich um Core, NS3, NS4A, NS4B und NS5A. Die verwendeten Antigene stammen laut Hersteller von unterschiedlichen HCV Genotypen (1a, 1b, 2, 3a). Das Prinzip des Nachweises von HCV Antikörpern ist das Gleiche wie das für den anti-HCV-IgG Assay auf der Luminex Plattform (siehe Abbildung 7-A), wobei statt der Mikrosphären die Wells der Mikrotiterplatte als Festphase dienen. Allerdings ist eine Unterscheidung der Reaktivität gegenüber verschiedenen Antigenen nicht möglich. Nach der Inkubation mit einer Probe wird als Detektionsantikörper ein Enzymkonjugierter Antikörper verwendet. Das Enzym Meerrettichperoxidase kann ein entsprechendes Substrat zu einem blauen Farbstoff umsetzen, dessen Farbe bei Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt. Die Farbintensität kann photometrisch bei 450 nm ausgelesen werden.

Die Durchführung erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Zuerst wurden 200 μl des Probenverdünners in die entsprechenden Wells vorgelegt, dann 20 μl Probe oder Kontrolle zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zum Waschen wurden die Wells zunächst durch Abschütten entleert und anschließend wurden jeweils 400 μl Waschlösung zugegeben. Nach 30 s Inkubation wurde die Waschlösung erneut verworfen und frische Waschlösung (400 μl) zugegeben. Insgesamt wurden sechs Waschschriffe durchgeführt. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Platte auf einem Haushalts-

papier ausgeklopft, um die restliche Flüssigkeit aus den Wells zu entfernen. Zur Detektion wurden 200 µl Konjugat-Arbeitslösung in jedes Well gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut wie beschrieben gewaschen. Nach der Zugabe von 200 µl Substratlösung wurde für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden 50 µl Stopplösung zugegeben. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen. Auf jeder Platte wurden zwei negative Kontrollen und zwei positive Kontrollen prozessiert. Der mittlere Extinktionswert der positiven Kontrollen wurde durch 2,75 dividiert (Cut-Off-Wert). Eine Probe wurde als „nicht-reaktiv“ (HCV negativ) bewertet, wenn der Extinktionswert kleiner als der Cut-Off-Wert war. Wenn der Extinktionswert größer als der Cut-Off-Wert war, wurde eine Probe als „reaktiv“ (HCV positiv) bezeichnet.

3.4.2 INNO-LIA™ HCV Score

Bei dem INNO-LIA™ HCV Score (Fujirebio Diagnostics, Malvern, USA) handelt es sich um einen Line-Immunoassay der dritten Generation, der z. B. als Bestätigungstest für Proben, die mit einem anti-HCV-Screeningtest als positiv befunden wurden, eingesetzt werden kann. Der Test verwendet sechs HCV Antigene aus den Regionen Core, E2, NS3, NS4A, NS4B und NS5A. Diese Antigene sind als sechs diskrete Banden auf einem Nylonstreifen mit Kunststoffverstärkung immobilisiert. Das Prinzip des Nachweises von HCV Antikörpern ist das Gleiche wie das für den anti-HCV-IgG Assay (siehe Abbildung 7-A), wobei statt der Mikrosphären der Nylonstreifen als Festphase dient. Nach der Inkubation mit einer Probe wird als Detektionsantikörper ein Enzym-konjugierter Antikörper verwendet. Das Enzym alkalische Phosphatase kann das entsprechende Substrat zu einem kastanienbraunen Farbstoff umsetzen. Die Intensität der erhaltenen Bande ist proportional zu der HCV-spezifischen Antikörpermenge in der Probe.

Die Durchführung erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Zuerst wurden 1 ml Probenverdünner in jede Inkubationswanne vorgelegt und dann 10 µl Probe oder Kontrolle zugegeben. Nachdem in jede Inkubationswanne ein Teststreifen gelegt wurde, erfolgte eine Inkubation für 16 h bei RT auf einem Wippschüttler (Shaker DRS-12). Zum Waschen wurde die Flüssigkeit mit einer Pipette, die mit einer Vakuumpumpe verbunden ist, zunächst abgesaugt und anschließend wurde 1 ml verdünnte Waschlösung zugegeben. Nach 5 min Inkubation auf dem Wippschüttler wurde die Waschlösung erneut abgesaugt und frische verdünnte Waschlösung (1 ml) zugegeben. Insgesamt wurden drei Waschschriffe durchgeführt. Zur Detektion wurde 1 ml Konjugatlösung in jede Inkubationswanne gegeben und für 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde erneut wie beschrieben gewaschen. Nach der Zugabe von 1 ml Substratlösung wurde für 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach der Substrat-Inkubation wurde die Flüssigkeit abgesaugt und

1 ml Stopplösung zugegeben. Erneut wurde für 30 min bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Zuletzt wurden die Streifen mit einer Pinzette auf ein Filterpapier gelegt und für 30 min in einem Trockenschrank bei 37 °C getrocknet. Zur Interpretation der Streifen wurde die Farbintensität der reaktiven Banden mit den Kontrolllinien verglichen. Sechs verschiedene Bewertungen sind möglich. Das Ergebnis des INNO-LIA™ HCV Score wird als „negativ“, „positiv“ oder „fraglich“ angegeben.

3.5 Datenanalyse

3.5.1 Korrektur der Messwerte

Zunächst wurde der gemessene MFI-Wert eines Antigens im Blank von dem entsprechenden MFI-Wert des Antigens bei einer Probenmessung subtrahiert. Anschließend erfolgte die Korrektur des Proben-spezifischen Hintergrunds (PSH). Dazu wurde der Mittelwert der Messwerte auf der BSA- und der ECL-Mikrosphäre innerhalb jeder Probe ebenfalls von den bereits Blank-korrigierten Werten abgezogen. Im Falle der Cut-Off Bestimmung wurden die erhaltenen Werte für die Ermittlung von Ausreißern verwendet. Anschließend wurden negative Werte gleich 0 gesetzt. Bei der Untersuchung von Proben wurden negative Werte direkt nach Abzug des PSH gleich 0 gesetzt.

3.5.2 Ermittlung von Ausreißern

Die Ermittlung von Ausreißern wurde mithilfe des Interquartilsabstands (*interquartile range*, IQR) durchgeführt. Im Bereich des IQR liegen die mittleren 50 % der Daten, weshalb sich der IQR aus der Differenz von Quartil 3 (Q3) und Quartil 1 (Q1) berechnen lässt: $IQR = Q3 - Q1$. Messwerte kleiner als „ $Q1 - 1,5 \times IQR$ “ und Messwerte größer als „ $Q3 + 1,5 \times IQR$ “ wurden als Ausreißer betrachtet.

3.5.3 Box-Whisker-Plots

Der Box-Whisker-Plot dient zur grafischen Darstellung von Verteilungen kardinalskaliertter Daten. Mithilfe dieses Diagramms kann schnell ein Eindruck von der Verteilung von Daten gewonnen werden. Ein Box-Whisker-Plot besteht aus einer Box (Rechteck), zwei Whisker (Linien), welche die Box jeweils nach oben und unten verlängern, sowie einem Strich innerhalb der Box. Die verwendeten Kennwerte des Box-Whisker-Plots sind der Median, zwei Quartile sowie das Minimum und das Maximum der Werte. In der Box liegen die mittleren 50 % der Daten und sie wird begrenzt durch das untere Quartil (25 %) und das obere Quartil (75 %). Die Länge der Box entspricht somit dem Interquartilsabstand, der ein Maß für die Streuung der Daten ist. Der Strich innerhalb der Box repräsentiert den Median. Der

Median teilt das Diagramm in zwei Bereiche, in welchen jeweils 50 % der Daten liegen, dadurch kann ein Eindruck von Symmetrie der Verteilung gewonnen werden. Die Whisker können verschiedene Werte angeben, in dieser Arbeit z. B. das 5 % und 95 % Quantil. Dabei werden Ausreißer als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt [72]. Die Box-Whisker-Plots in dieser Arbeit wurden mithilfe der Software RExcel (Statconn, Krems, Österreich) und RStudio (RStudio, Inc., Boston, USA) erstellt.

3.5.4 Shapiro-Wilk-Test

Der Shapiro-Wilk-Test ist ein statistischer Test zur Überprüfung, ob die zugrunde liegende Grundgesamtheit einer Stichprobe normalverteilt ist. Er dient als Vortest für die Bestimmung einer statistischen Signifikanz. Der Test ist für den Umfang von 3 bis 5000 Stichproben einsetzbar. Der Shapiro-Wilk-Test hat auch bei kleinem Stichprobenumfang $n < 50$ eine relativ große Teststärke verglichen mit anderen Tests. Als resultierender Wert der Teststatistik wird ein p-Wert angegeben, dieser wird mit dem Signifikanzniveau α verglichen. Wenn der p-Wert $< \alpha$ ist, liegt keine Normalverteilung der Stichproben vor [73]. Die Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests erfolgte mit der Software RExcel und RStudio.

3.5.5 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ist ein nichtparametrischer Test zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Dabei muss die abhängige Variable nicht normalverteilt sein, sollte aber mindestens ordinalskaliert sein. Der resultierende Wert der Teststatistik ist ein p-Wert, dieser wird mit dem Signifikanzniveau α verglichen. Wenn der p-Wert $< \alpha$ ist, liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verteilungen vor [74, 75]. Zur Durchführung wurde die Software RExcel und RStudio verwendet. Als Signifikanztest wurde in dieser Arbeit ausschließlich der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet, da der Shapiro-Wilk-Test in allen Fällen ergab, dass die zugrunde liegende Grundgesamtheit einer Stichprobe nicht normalverteilt war.

3.5.6 Random Forest Klassifikationsverfahren

Der sogenannte Random Forest ist ein Klassifikationsverfahren, das aus mehreren voneinander unabhängigen Entscheidungsbäumen besteht. Die Entscheidungsbäume in einem Random Forest wachsen während eines Lernprozesses durch eine zufällige Einteilung [76]. Klassifikationen nach dem Verfahren des Random Forest mit 10-facher Kreuzvalidierung wurden mit dem Programm WEKA (The University of Waikato, Hamilton, New Zealand) durchgeführt.

3.5.7 ROC Kurven

Die Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurve ist ein grafisches Diagramm, welches die Leistung eines binären Klassifikators darstellt. Ein Beispiel für einen binären Klassifikator ist ein medizinischer Test, der zur Bestimmung einer Krankheit dient. Zur Erstellung einer ROC Kurve wird die Richtig-Positiv-Rate gegen die Falsch-Positiv-Rate aufgetragen. In der idealen ROC-Kurve steigt zunächst die Richtig-Positiv-Rate senkrecht an und erst danach steigt die Falsch-Positiv-Rate. Bei einem vollständigen Zufallsprozess würde die ROC-Kurve eine diagonale Linie ergeben. Als Beurteilungsmaß einer ROC Kurve dient die Fläche unterhalb der Kurve (*area under curve*, AUC). Dieser Wert kann zwischen 0 und 1 liegen, wobei der schlechteste Wert 0,5 ist (diagonale Linie) [77]. Zur Erstellung von ROC Kurven wurde ebenfalls die Software RExcel und RStudio mit dem Packet ROCR [78] verwendet.

3.5.8 Heatmap und hierarchische Clusteranalyse

Zur Darstellung der Immunprofile von Proben in einer Heatmap sowie zur hierarchischen Clusteranalyse wurde die Software MeV Multi Experiment Viewer (TM4 Microarray Software Suite) verwendet [79]. Die hierarchische Clusteranalyse dient zur Ermittlung von Ähnlichkeiten zwischen Personengruppen. Unter Clusteranalyse wird ein multivariates Verfahren verstanden, mit dem Gruppen von zusammengehörigen Objekten (Cluster) aus einer Grundmenge von numerisch beschriebenen Objekten ermittelt werden können. Die Objekte werden dabei zu Clustern zusammengefasst, sodass innerhalb eines Clusters die Objekte möglichst ähnlich sind, die Objekte zwischen den verschiedenen Clustern dagegen möglichst unähnlich. Die hierarchische Clusteranalyse ist dabei ein distanzbasiertes Verfahren zur Clusteranalyse, bei dem verschiedene Distanz- bzw. Proximitätsmaße verwendet werden können [80]. Als Ähnlichkeitsmaß zur Bestimmung des Abstands zwischen zwei Objekten wurde der Pearson Korrelationskoeffizient verwendet, als Fusionierungsalgorithmus zur Bestimmung des Abstands zwischen zwei Clustern wurde eine durchschnittliche Verknüpfung (*average linkage*) verwendet. Das Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse wurde ebenfalls in einer Heatmap dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung serologischer HCV Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei multiplexe Mikrosphären-basierte serologische HCV Assays entwickelt. Dabei handelte es sich zum einen um einen Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse G (anti-HCV-IgG Assay) und zum anderen um einen Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse M (anti-HCV-IgM Assay). Für beide Assays wurde prinzipiell derselbe Mikrosphären-basierte HCV-Microarray genutzt, bis auf die Antigene NS5B_2 g4a und NS5B_3 g4a, die im anti-HCV-IgM Assay nicht verwendet wurden. Zur Herstellung des HCV-Microarrays wurden selbst produzierte HCV g4a Antigene (siehe Tabelle 4 und Anhang Abbildung 55) sowie kommerziell erhältliche HCV Antigene (siehe Tabelle 5) und Peptid-Antigene (siehe Tabelle 6) eingesetzt. In Tabelle 17 sind die 27 verwendeten HCV Antigene dargestellt. Des Weiteren wurden im HCV-Microarray sechs interne Kontrollen prozessiert. Das Prinzip der beiden HCV-Assays ist in Abbildung 7 in 3.3.3 dargestellt.

Tabelle 17: Im HCV-Microarray verwendete HCV Antigene. k. A. = keine Angabe

Name des Antigens	HCV Protein-Region	Genotyp	Protein/Peptid	Quelle
Core_1 g4a	Core	4a	Protein	
Core_2 g4a	Core	4a	Protein	
Core_3 g4a	Core	4a	Protein	
NS3_1 g4a	NS3	4a	Protein	
NS3_2 g4a	NS3	4a	Protein	NMI
NS5A g4a	NS5A	4a	Protein	
NS5B_1 g4a	NS5B	4a	Protein	
NS5B_2 g4a	NS5B	4a	Protein	
NS5B_3 g4a	NS5B	4a	Protein	
NS3_1 g1b	NS3	1b	Protein	
NS4_1	NS4	k. A.	Protein	
NS5 g1	NS5	1	Protein	
HCV Mix	verschiedene Bereiche	1a / 1b	Protein	
Core g1b	Core	1	Protein	kommerziell
NS3 g1a	NS3	1a	Protein	(siehe Tabelle 5)
NS3_2 g1b	NS3	1b	Protein	
NS3 g1c	NS3	1c	Protein	
NS3_3 g1b	NS3	1b	Protein	
NS3 g2c	NS3	2c	Protein	

Name des Antigens	HCV Protein-Region	Genotyp	Protein/Peptid	Quelle
NS3_3 g4a	NS3	4a	Protein	
NS4_2	NS4	k. A.	Protein	
NS5 g1b	NS5	1b	Protein	
c22 g1a	Core	1a	Peptid	
pNS4A g4a	NS4	4a	Peptid	kunden- spezifische Synthese für NMI
5-1-1 g4a	NS4	4a	Peptid	
5-1-1 g1a	NS4	1a	Peptid	
c100 g4a	NS4	4a	Peptid	

4.1.1 Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse G

4.1.1.1 Optimierung der Pufferbedingungen

Um falsch positive Signale zu unterdrücken bzw. zu reduzieren wurden verschiedene Proteine dem Probenpuffer zugesetzt. In Tabelle 18 sind die drei notwendigen Protein-Zusätze dargestellt.

Tabelle 18: Protein-Zusätze im Probenpuffer zur Unterdrückung von falsch positiven Signalen.

Protein-Zusatz	Grund für Notwendigkeit als Zusatz
Rinderserumalbumin (BSA)	Trägerprotein zur Immobilisierung der Peptide
<i>E. coli</i> Lysat (ECL)	Verunreinigungen in den aufgereinigten, rekombinanten HCV Proteinen
rekombinante Glutathion-S-Transferase (GST)	Fusionspartner von Antigenen (GST-Tag)

Zur Überprüfung der Wirksamkeit wurden die Zusätze jeweils als Assay interne Kontrollen (siehe 4.1.3) auf einer Mikrosphärensorte immobilisiert. Alle Protein-Zusätze im Probenpuffer führten zu einer deutlichen Reduktion der Reaktivität auf der jeweiligen Assay internen Kontrolle. Daher wurde die Wirksamkeit der Protein-Zusätze zur Verhinderung falsch positiver Signale angenommen.

Auf der ECL-Mikrosphäre wurden z. T. sehr hohe Messwerte (bis zu 20000 MFI) erhalten. Durch den ECL-Zusatz konnte zwar nicht in jeder Probe dasselbe MFI Level auf der ECL-Mikrosphäre erreicht werden, dennoch war eine Reduktion der Signale um ca. 96 % möglich. Bei Proben, die auch ohne ECL im Probenpuffer niedrige Signale auf der ECL-Mikrosphäre zeigten, wurde eine mäßige Reduktion der Signale erreicht. Bei einem in *E. coli* exprimierten HCV Antigen, das trotz Aufreinigung einen sehr hohen Anteil an Verunreinigung mit *E. coli* Proteinen aufwies (siehe Anhang Abbildung 55 Antigen

NS5B_1 g4a), konnte eine Reduktion der Signale durch die Zugabe von ECL zum Probenpuffer beobachtet werden. Allerdings waren die Signalmindierungen bei HCV Patienten geringer als bei gesunden Spendern. Der Anteil der Reaktivität gegenüber dem Antigen blieb somit erhalten, während Reaktivitäten gegenüber *E. coli* Proteinen blockiert werden konnten.

Einige Proben zeigten sehr starke Reaktivitäten auf der GST-Mikrosphäre, wenn ein Puffer ohne GST-Zusatz verwendet wurde. Die Interpretation von Signalen bei Antigenen mit einem GST-Tag wurde dadurch stark erschwert. Um diese Antigene interpretierbar zu machen, wurden verschiedene Puffer mit oder ohne Zugabe von GST getestet. In Abbildung 8 sind beispielhaft drei GST-reaktive Proben (HCV positiv 1 – 3) sowie eine nicht GST-reaktive Probe (HCV negativ) gezeigt.

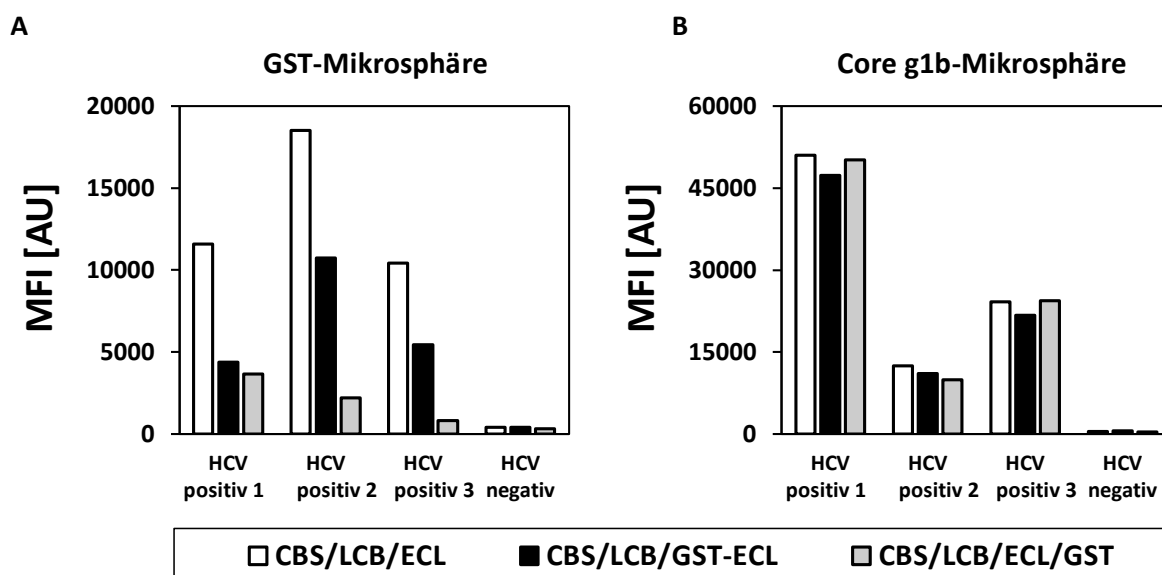


Abbildung 8: Pufferoptimierung durch Zugabe von GST. Dargestellt sind die Reaktivitäten auf der (A) GST-Mikrosphäre und der (B) Core g1b-Mikrosphäre, welche mit vier verschiedenen Proben inkubiert wurden. Zur Verdünnung der Proben wurden jeweils drei verschiedene Puffer mit oder ohne Zusatz von GST verwendet.

Wie in Abbildung 8-A erkennbar, wurden die Reaktivitäten auf der GST-Mikrosphäre durch Zugabe von GST im Probenpuffer stark reduziert. Bei dem Puffer CBS/LCB/GST-ECL wurde zunächst CBS (PBS + 1 % BSA) und LCB (*LowCross-Buffer*[®]) zu gleichen Teilen gemischt. Die Zugabe von GST und ECL erfolgte indem GST in *E. coli* exprimiert wurde und diese GST exprimierenden *E. coli* Bakterien zu einem Lysat (GST-ECL) verarbeitet wurden. Im Gegensatz dazu wurde beim Puffer CBS/LCB/ECL/GST das GST in aufgereinigter Form zugegeben. Wie ebenfalls in Abbildung 8-A zu sehen, konnte mit CBS/LCB/GST-ECL eine Minderung der Signale erreicht werden, allerdings konnte mit dem Puffer CBS/LCB/ECL/GST meist eine stärkere Reduktion erzielt werden. Trotz sehr hoher GST Konzentration im Probenpuffer war eine vollständige Unterdrückung der Signale nicht möglich. In Abbildung 8-B ist ein kommerziell

erstandenes HCV Antigen dargestellt, das mit einem GST-Tag exprimiert wurde. Trotz der Zugabe von GST in den Probenpuffer veränderten sich die Signale der Proben auf der Core g1b-Mikrosphäre nicht. Das Antigen Core g1b wäre in der Probe HCV positiv 2 ohne Zusatz von GST nicht interpretierbar, da das Signal auf der GST-Mikrosphäre höher war als das Signal auf der Core g1b-Mikrosphäre. Durch die Reduktion der Signale auf der GST-Mikrosphäre wurde eine Interpretation der spezifischen Reaktivitäten auf dem HCV Antigen ermöglicht.

Da die Probenverdünnung in zwei Verdünnungsschritten erfolgte, sollten die Proben im ersten Schritt mit einem kostengünstigen Puffer verdünnt werden und nur im zweiten Verdünnungsschritt sollte ein Zusatz von BSA, ECL und GST enthalten sein. Verschiedene Puffervarianten und der Einfluss der Vorverdünnung auf die Wirkung der Protein-Zusätze wurden untersucht (Daten nicht gezeigt). Für das endgültige Assay Setup wurde PVXC als Puffer für die Vorverdünnung der Patientenproben ausgewählt und CBS/LCB/ECL/GST als finaler Probenpuffer.

4.1.1.2 Ermittlung der Probenverdünnung

Um sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse zu minimieren, sollte eine geeignete Probenverdünnung ermittelt werden. In kommerziell erhältlichen HCV Diagnostiktests werden sehr unterschiedliche Probenverdünnungen genutzt. Während z. B. der Ortho HCV 3.0 ELISA mit Enhanced SAve (Ortho Clinical Diagnostics) und der INNOTEST HCV Ab IV (Fujirebio Diagnostics) jeweils eine Probenverdünnung von 1:11 nutzen, wird beim INNO-LIA™ HCV Score (Fujirebio Diagnostics) eine Verdünnung von 1:101 verwendet. Zur Ermittlung der Probenverdünnung im entwickelten multiplexen anti-HCV-IgG Assay wurden sowohl Proben von Patienten mit einer HCV Infektion als auch Proben von gesunden Spendern in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von 1:25 bis 1:3200 vermessen. In Abbildung 9 sind Verdünnungskurven von fünf Patienten mit akuter HCV Infektion (Patient 1 und 2) oder chronischer HCV Infektion (Patient 3 – 5) für vier beispielhafte HCV Antigene dargestellt. Die Proben verhielten sich sehr unterschiedlich in der seriellen Verdünnung. Wenn eine Verdünnungslinearität gegeben ist, sollte eine Gerade mit kontinuierlicher negativer Steigung erhalten werden. Allerdings traf dies nicht für alle Proben bei allen Antigenen über den gesamten Verdünnungsbereich zu. In Abbildung 9-A beispielsweise zeigten die Patienten 3 und 4 über den gesamten Bereich eine Verdünnungslinearität, Patient 1 zeigte erst ab der 1:100 Verdünnung einen linearen Zusammenhang, Patient 2 wiederum wies von der 1:100 bis zur 1:800 Verdünnung eine Linearität auf und bei Patient 5 hingegen konnte ab der 1:50 Verdünnung bis zur 1:400 Verdünnung eine Verdünnungslinearität beobachten werden. Ein völlig anderes Verdünnungsverhalten der Proben ist in Abbildung 9-C

dargestellt. Abgesehen von Patient 3, zeigten hier alle Proben zunächst oder durchgängig einen Anstieg in der Reaktivität. Allgemein konnte beobachtet werden, dass sich eine geringe Probenverdünnung (1:25 oder 1:50) häufig nachteilig auf mögliche Signalhöhen in Patientenproben auswirkte, die erhaltenen Signale in Proben von gesunden Spendern (nicht gezeigt) waren zudem teilweise sehr hoch, so dass eine Gefahr von falsch positiven Resultaten gegeben wurde. Eine sehr hohe Probenverdünnung (1:1600 oder 1:3200) wirkte sich zwar bei manchen Proben und Antigenen als vorteilhaft auf die Signalhöhen aus (vgl. Abbildung 9-C), aber generell wurden die Messwerte erniedrigt, z. T. so stark, dass die Möglichkeit von falsch negativen Ergebnissen stieg.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass eine Probe weder gegenüber allen verwendeten Antigenen die gleiche Reaktivität besaß, noch zeigten alle HCV positive Proben die gleiche Reaktivität gegenüber einem spezifischen HCV Antigen. Letztlich musste bei der Wahl einer allgemeinen Probenverdünnung ein Kompromiss eingegangen werden, weshalb die 1:200 Verdünnung für den Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse G gewählt wurde.

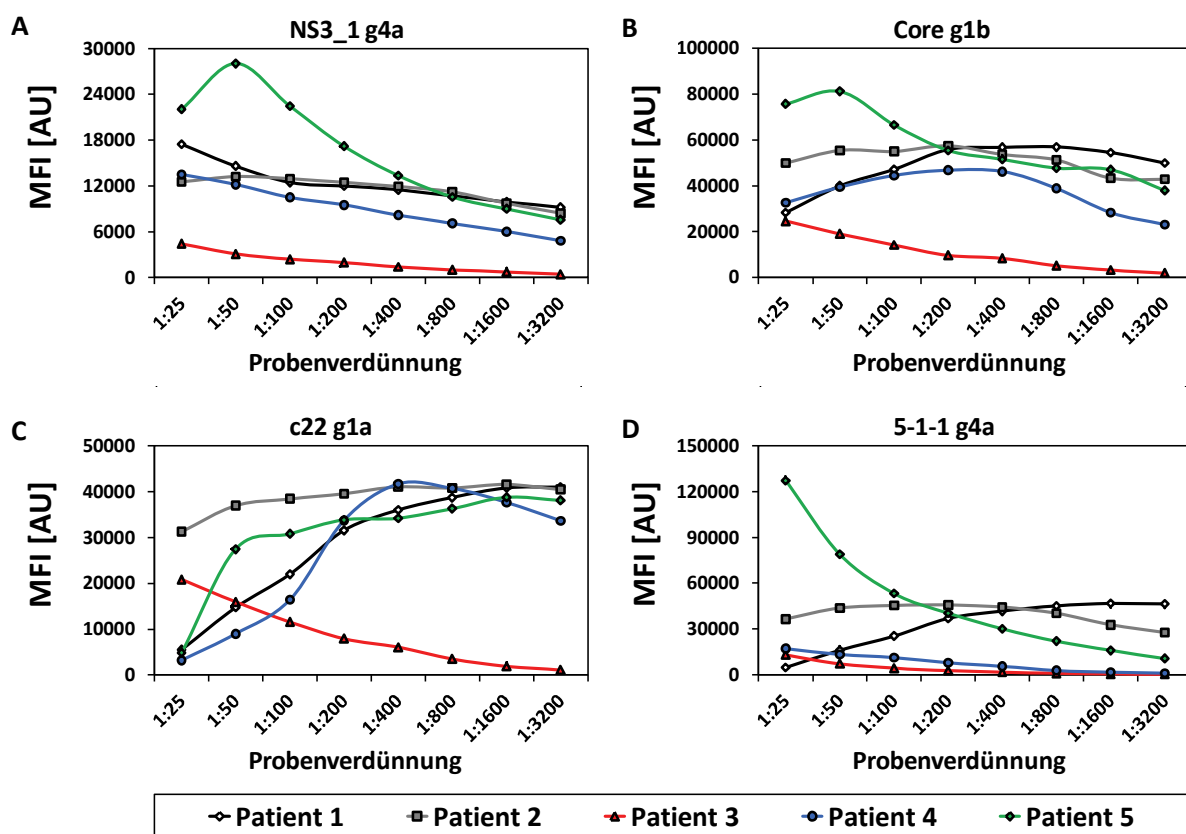


Abbildung 9: Ermittlung der Probenverdünnung. Dargestellt sind Probenverdünnungskurven von fünf Patienten mit akuter HCV Infektion (Patient 1 und 2) oder chronischer HCV Infektion (Patient 3 – 5) für vier ausgewählte HCV Antigene: NS3_1 g4a (A), Core g1b (B), c22 g1a (C) und 5-1-1 g4a (D).

4.1.1.3 Generierung von Qualitätskontrollen

Qualitätskontrollen (QC) werden benötigt, um die technische Validierung eines Assays durchzuführen und um den Verlauf eines Screenings nachzuverfolgen. Neben positiven QC Proben ist auch eine negative QC Probe sowohl für die Validierung als auch die Probenmessung von Vorteil.

a. Positive Qualitätskontrollen

Als mögliche positive Kontrollen wurden zwei Materialien mit CE-Kennzeichnung (10/150-004 und 10/B594) vom *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) bezogen [65]. Beide Materialien wurden in drei verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:20 und 1:200) im anti-HCV-IgG Assay getestet. In der 1:2 Verdünnung zeigten die zwei Materialien jeweils die beste Reaktivität, jedoch wurden bei 10/B594 auch auf den Kontroll-Mikrosphären sehr hohe Signale erhalten, weshalb 10/150-004 in der 1:2 Verdünnung als erste positive Qualitätskontrolle (QC positiv 1) ausgewählt wurde.

Allerdings wurde mit diesem Material nicht auf allen Antigenen hohe Signale erzielt, v. a. nicht auf den HCV g4a Antigenen. Um mindestens eine weitere positive QC Probe zu identifizieren, wurde ein kleiner Probenatz von 15 Patienten mit akuter HCV Infektion untersucht. Letztlich wurden zwei Patientenproben ausgewählt, die deutliche aber teilweise unterschiedliche Reaktivitäten zeigten. In Abbildung 10 sind die Reaktivitäten der drei positiven Qualitätskontrollen (QC positiv 1 – 3) gegenüber den 27 HCV Antigenen dargestellt. Die ausgewählten QC Proben wurden entsprechend verdünnt, in ausreichender Menge aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

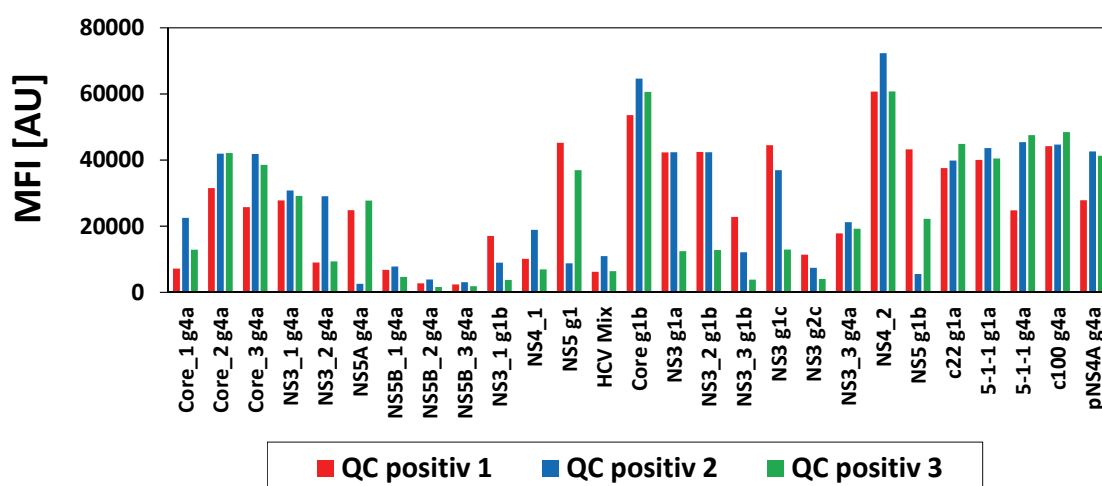


Abbildung 10: Reaktivitäten der Proben QC positiv 1–3. Dargestellt sind die gemessenen MFI-Werte von 27 HCV Antigenen.

b. Negative Qualitätskontrolle

Neben positiven Qualitätskontrollen ist auch eine negative Qualitätskontrolle nützlich, um einerseits sicherzustellen, ob eine Messplatte eines Screenings technisch im Normbereich lag und z. B. nicht kontaminiert wurde, wodurch sonst evtl. falsch positive Signale erzeugt werden könnten. In der Assay Validierung dient eine negative Probe andererseits zur Überprüfung, ob niedrige Signale präzise gemessen werden können. Um eine geeignete negative Qualitätskontrolle auszuwählen, wurden Proben von vier gesunden Spendern im anti-HCV-IgG Assay getestet. In den Proben konnten unterschiedlich hohe Reaktivitäten gemessen werden. Die Probe mit den insgesamt niedrigsten Signalen wurde als negative Qualitätskontrolle (QC negativ) ausgewählt. Diese Probe wurde 1:200 verdünnt, in ausreichender Menge aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.1.1.4 Technische Assay Validierung

Nach der Entwicklung der serologischen HCV Assays wurde eine technische Validierung durchgeführt. Diese erfolgte in Anlehnung an die „Guideline on bioanalytical method validation“ der *European Medicines Agency* (EMA) [81], bzw. die „Draft Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation“ der FDA [82]. Bei einem serologischen Test können nicht alle der beschriebenen Parameter adressiert werden, daher wurde die Validierung beschränkt auf die Intra- und Inter-Assay Präzision, die Kurzzeit- und Temperaturstabilität sowie die Stabilität der Proben gegenüber Gefrierzyklen. Insgesamt wurden für den anti-HCV-IgG Assay fünf interne Kontrollen und 27 HCV Antigene validiert.

a. Assay Präzision

Die Präzision eines Assays gibt die Messabweichung wieder und wird als die Übereinstimmung von Replikatmessungen definiert. Die Präzision wird in Form des prozentualen Variationskoeffizienten (% CV) angegeben. Der Variationskoeffizient errechnet sich folgendermaßen:

$$CV = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}}$$

Während bei der Ermittlung der Intra-Assay Präzision die Varianz von Replikaten im gleichen Experiment bestimmt wird, so reflektiert die Inter-Assay Präzision die Varianz zwischen verschiedenen Experimenten. Die Intra-Assay Präzision sollte einen CV < 15 % aufweisen und bei der Inter-Assay Präzision sollte der CV < 20 % sein.

Intra-Assay Präzision

Für die Bestimmung der Intra-Assay Präzision wurden 20 technische Replikate einer Probe innerhalb eines Experiments auf derselben 96-Well Mikrotiterplatte gemessen. Die Bestimmung wiederum erfolgte für den Blindwert (Blank), in einer negativen Probe (QC negativ) sowie in drei positiven Proben (QC positiv 1 – 3). Aus den gemessenen Replikaten von jeder Probe wurden der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten, die Standardabweichung und aus diesen wiederum der CV für jedes Antigen berechnet. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse für jede Probe in Form von Histogrammen dargestellt. Bis auf ein Antigen (NS5B_2 g4a) in der Probe QC negativ, das einen CV von 16 % aufwies, waren alle CVs < 15 %. Im Mittel über alle Antigene ergab sich ein Intra-Assay CV von 3,7 +/- 2,4 %.

Inter-Assay Präzision

Für die Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden technische Triplikate einer Probe an vier Versuchstagen gemessen. Die Bestimmung erfolgte wie bei der Intra-Assay Präzision im Blank und in den Proben QC negativ sowie QC positiv 1 – 3. Aus den gemessenen Replikaten von jeder Probe wurde der CV für jedes Antigen berechnet. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse für jede Probe in Form von Histogrammen dargestellt. Bis auf ein Antigen (NS5B_1 g4a) in der Probe QC negativ, das einen CV von 22,5 % aufwies, waren alle CVs < 20 %. Im Mittel über alle Antigene ergab sich ein Inter-Assay CV von 4,7 +/- 3,5 %.

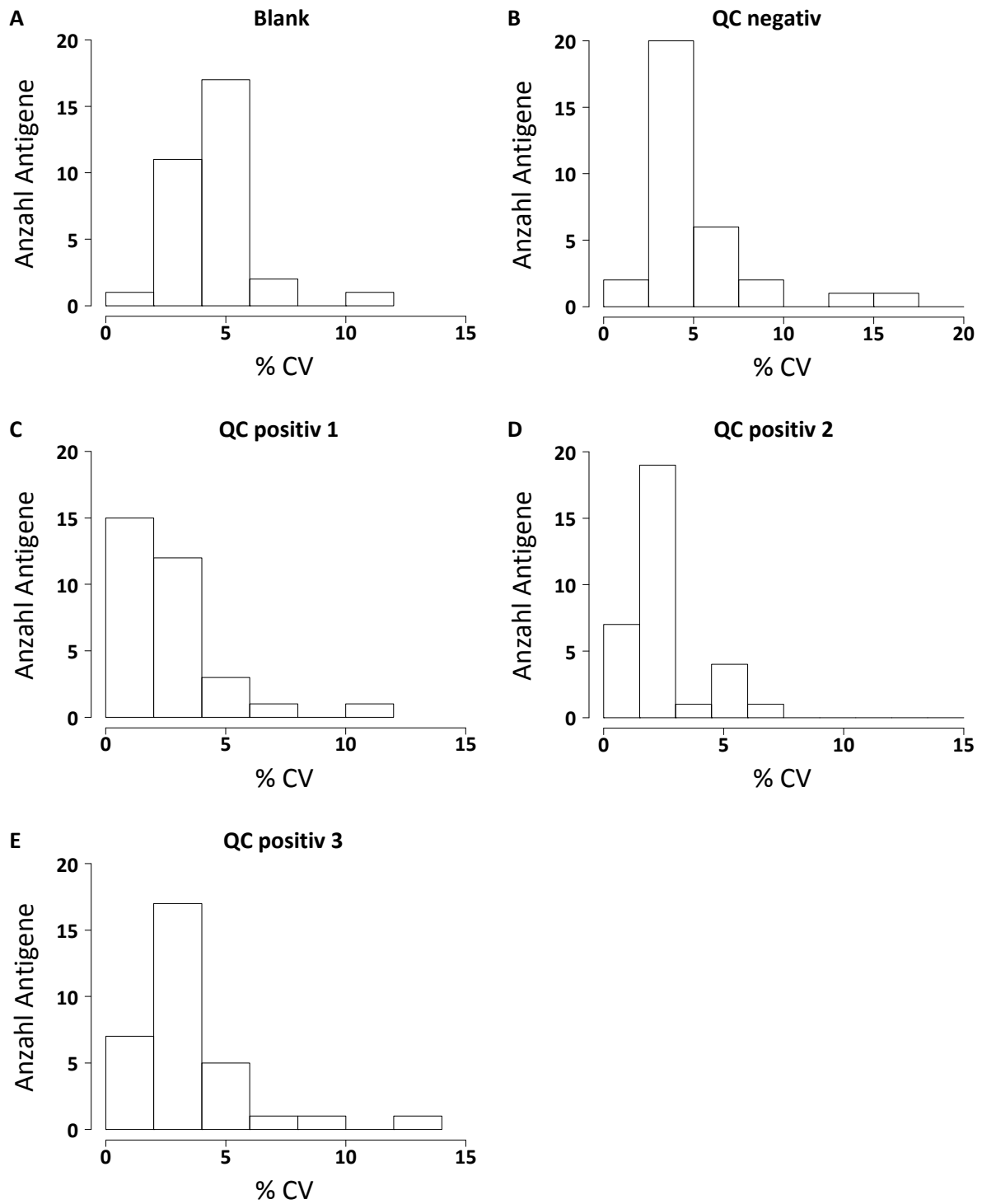


Abbildung 11: Bestimmung der Intra-Assay Präzision des anti-HCV-IgG Assays. Dargestellt sind Histogramme der Intra-Assay Variationskoeffizienten des Blanks (A) und der Proben QC negativ (B), QC positiv 1 (C), QC positiv 2 (D) und QC positiv 3 (E).

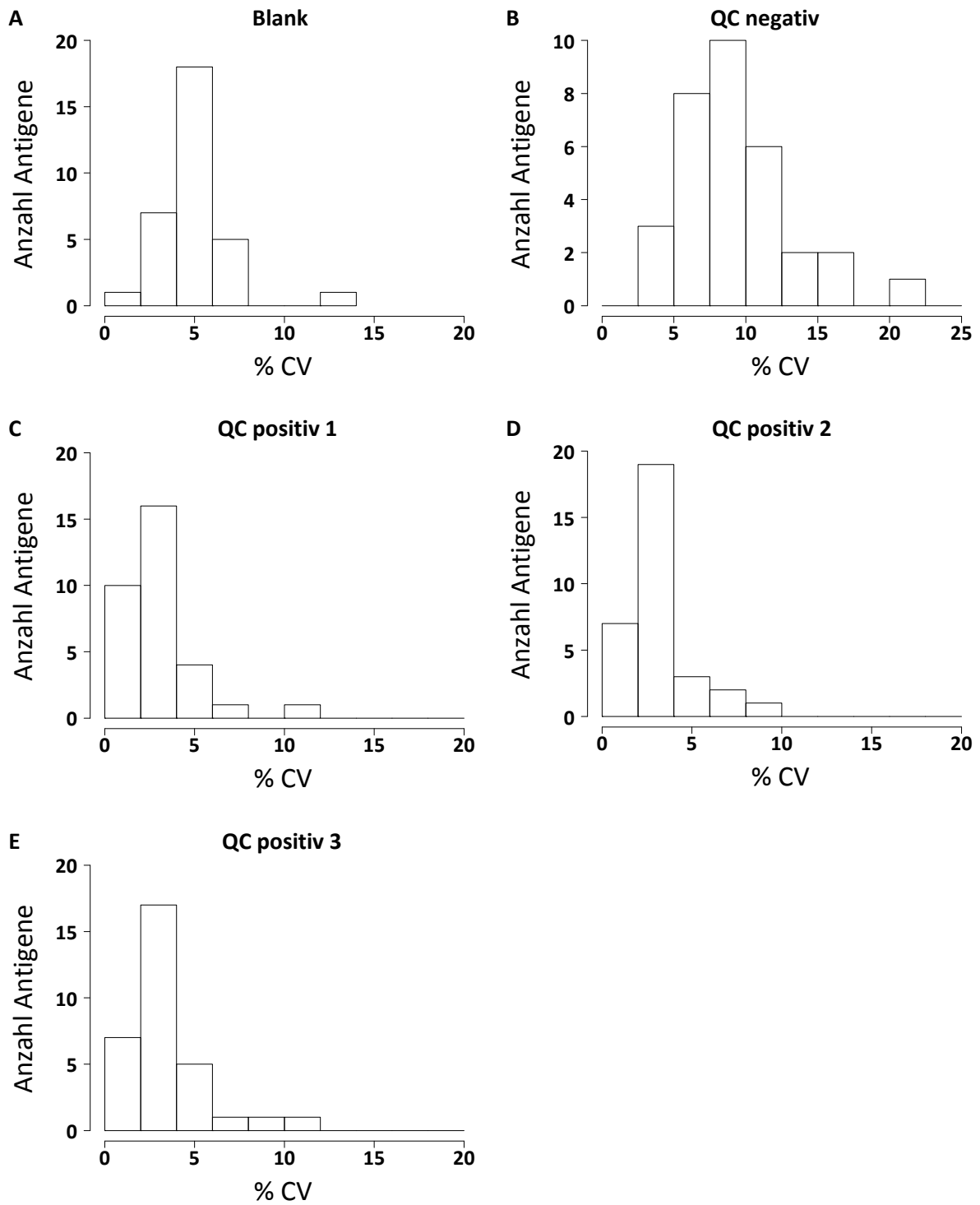


Abbildung 12: Bestimmung der Inter-Assay Präzision des anti-HCV-IgG Assays. Dargestellt sind Histogramme der Inter-Assay Variationskoeffizienten des Blanks (A) und der Proben QC negativ (B), QC positiv 1 (C), QC positiv 2 (D) und QC positiv 3 (E).

b. Stabilität der Proben

Die Stabilität der Proben, bzw. der Antikörper, die mit diesem Assay gemessen werden, ist essentiell für das Messergebnis. Daher muss untersucht werden, welche Auswirkungen mehrfache Gefrierzyklen auf die Proben haben. Zur Ermittlung der richtigen Probenhandhabung wurde außerdem die Kurzzeit- und Temperaturstabilität bestimmt.

Gefrierzyklen

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Gefrierzyklen auf die Messwerte von den fünf internen Kontrollen und den 27 Antigenen wurden ein, zwei, drei und fünf Gefrierzyklen mit den vier verschiedenen QC Proben durchgeführt und anschließend zeitgleich mit einer frisch aufgetauten Probe als Referenzprobe vermessen. Die referenzierten Werte sollten zwischen 80 % und 120 % liegen.

Abbildung 13 zeigt die referenzierten Werte von jeder Probe nach der Durchführung von Gefrierzyklen. In den QC positiv Proben 1 – 3 wurden keine Stabilitätsprobleme festgestellt. Alle referenzierten Messwerte lagen zwischen 92 % und 115 %. In der Probe QC negativ allerdings wurden z. T. Abweichungen > 20 % erhalten. Dies war bei ca. einem Drittel der Messwerte nach dem ersten und zweiten Gefrierzyklus der Fall. Da dies aber im dritten und fünften Gefrierzyklus nicht beobachtet wurde, ist es wahrscheinlicher, dass kein Stabilitätsproblem bestand, sondern bei diesen Messungen der negativen Probe insgesamt etwas höhere Messwerte erhalten wurden. Da in der Probe QC negativ generell niedrige Werte gemessen wurden, hat die Messung von etwas höheren Werten eine größere Auswirkung auf eine prozentuale Abweichung als bei sehr hohen Messwerten.

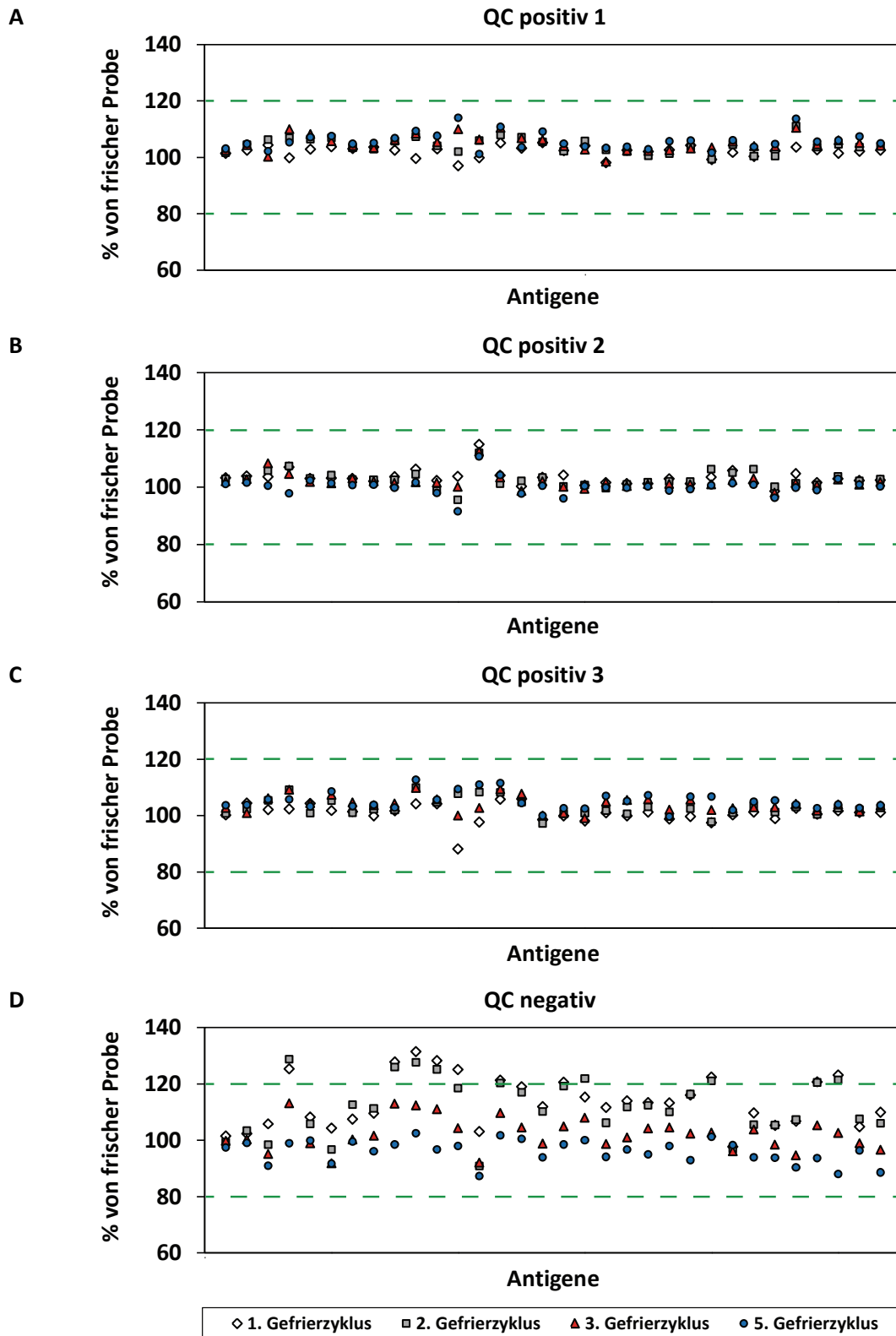


Abbildung 13: Bestimmung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen im anti-HCV-IgG Assay. Dargestellt sind die Auswirkungen von Gefrierzyklen (1x, 2x, 3x und 5x) auf die Messwerte von 5 Kontrollen und 27 Antigenen in vier verschiedenen Proben: QC positiv 1 (A), QC positiv 2 (B), QC positiv 3 (C) und QC negativ (D). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils referenziert auf eine frisch aufgetaute Probe und in % angegeben.

Kurzzeit- und Temperaturstabilität

Zur Bestimmung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität wurden die vier QC Proben für 2 h, 4 h oder 24 h bei RT oder 4 °C gelagert und anschließend mit einer frisch aufgetauten Probe als Referenzprobe vermessen. Solange die referenzierten Werte für die fünf Kontrollen und 27 Antigene jeweils zwischen 80 % und 120 % liegen, ist eine ausreichende Stabilität gegeben.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Kurzzeit- und Temperaturstabilität dargestellt. Bis auf einen Wert (24 h bei RT) in der Probe QC positiv 1 (Abbildung 14-A) und einen Wert (24 h bei RT) in der Probe QC positiv 3 (Abbildung 14-C), lagen alle referenzierten Werte der Proben QC positiv 1 – 3 zwischen 80 % und 118 %. In der Probe QC negativ (Abbildung 14-D) zeigten sich allerdings z. T. höhere prozentuale Abweichungen. Insgesamt lagen elf Werte der 24 h bei RT Messung, drei Werte der 24 h bei 4 °C Messung und ein Wert der 4 h bei 4 °C Messung außerhalb des 80 – 120 % Bereichs. Auch hier sollte wieder beachtet werden, dass die Messwerte in der Probe QC negativ generell niedriger waren und eine leichte Messwertschwankung schon eine große prozentuale Abweichung ergibt. Dennoch wurde für die Probenhandhabung entschieden, dass Proben nach Lagerung für 24 h bei Temperaturen höher als -20 °C nicht verwendet werden sollten. Die Stabilität für 4 h ist jedoch auch bei RT gegeben.

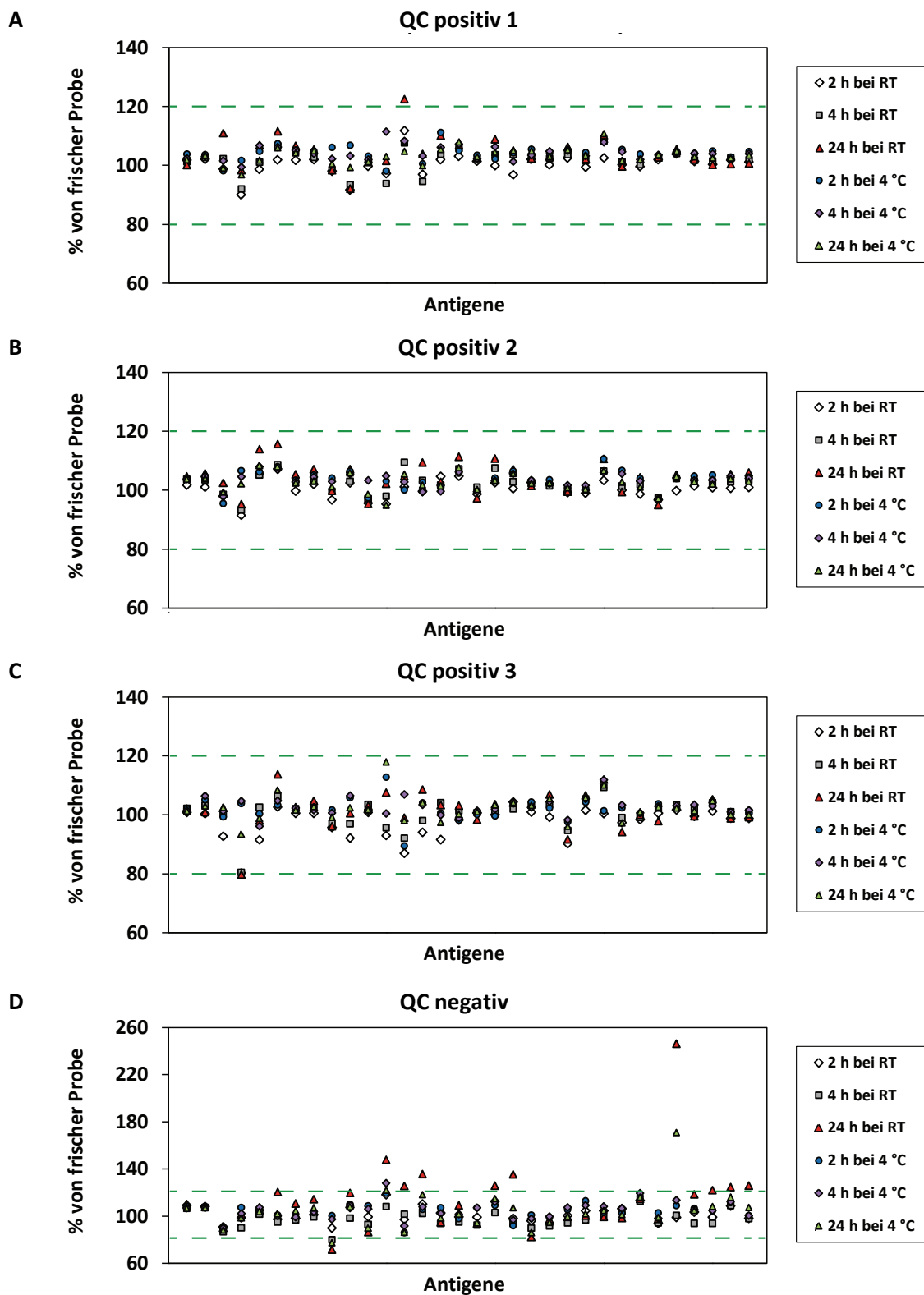


Abbildung 14: Bestimmung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität im anti-HCV-IgG Assay. Dargestellt sind die Auswirkungen der Lagerung einer Probe für 2 h, 4 h und 24 h bei RT oder 4 °C auf die Messwerte von 5 Kontrollen und 27 Antigenen in vier verschiedenen Proben: QC positiv 1 (A), QC positiv 2 (B), QC positiv 3 (C) und QC negativ (D). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden jeweils referenziert auf eine frisch aufgetaute Probe und in % angegeben.

4.1.2 Assay zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse M

4.1.2.1 Vorbehandlung der Proben

Bei ersten Messungen von Proben fiel auf, dass manche Proben z. T. eine sehr hohe Reaktivität auf der Kontroll-Mikrosphäre „humane IgG“ zeigten, obwohl mit einem IgM-spezifischen Detektionsantikörper gearbeitet wurde. Als Ursache hierfür wurde das Vorliegen von Rheumafaktoren (RF) vermutet [83-88]. Wenn sich IgG-bindende RF der Klasse IgM (IgM-RF) in einer Probe befinden, können diese an die humanen IgG auf der Kontroll-Mikrosphäre binden. Dadurch würde eine falsch positive Reaktivität verursacht werden. Generell könnten beim Vorliegen von IgM-RF auch auf anderen Antigenen falsch positive Signale entstehen, da in der Probe Antigen-spezifische IgG vorhanden sein können. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass hohe Level an Antigen-spezifischen IgG niedrige IgM Level maskieren. Um sowohl IgG als auch IgM-RF aus der Probe zu entfernen, wurde ein IgG/RF Stripper eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Antiserum, welches monospezifisch gegen humane Immunglobuline G gerichtet ist und aus Schafserum gewonnen wird. In einer Vorbehandlung werden die Patientenproben 1:5 in IgG/RF Stripper verdünnt. Während einer Inkubationszeit bilden sich Immunkomplexe, die IgG aus der Probe beinhalten. Falls IgM-RF in der Probe vorhanden sind, werden diese auch an die Immunkomplexe binden. Durch anschließendes Abtrennen der Immunkomplexe werden sowohl Antigen-spezifische IgG als auch unspezifische IgM-RF aus der Probe entfernt. In Abbildung 15 ist ein Vergleich der Reaktivitäten auf fünf Kontroll-Mikrosphären von vier beispielhaften Proben mit und ohne Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper dargestellt.

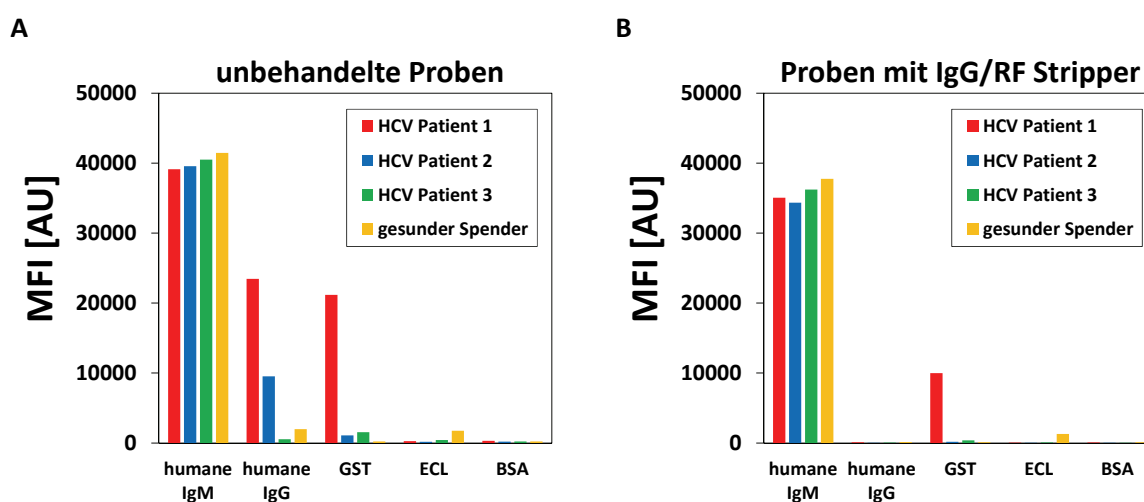


Abbildung 15: Vergleich von vier Proben mit und ohne Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper. Dargestellt sind die gemessenen MFI-Werte auf fünf Kontroll-Mikrosphären in (A) unbehandelten Proben und in (B) Proben nach IgG/RF Stripper Vorbehandlung.

Bei den unbehandelten Proben der HCV Patienten 1 und 2 wurde jeweils ein sehr hoher MFI-Wert auf der humane IgG-Mikrosphäre gemessen (vgl. Abbildung 15-A). Nach der Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper konnte bei keiner der vier gezeigten Proben eine Reaktivität auf der Kontroll-Mikrosphäre mit humanen IgG festgestellt werden (vgl. Abbildung 15-B). Außerdem konnte ein sehr hohes Signal auf der GST-Mikrosphäre (HCV Patient 1) durch die Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper um die Hälfte reduziert werden.

Um sicherzustellen, dass auch bei Proben mit erhöhtem IgG Gehalt das eingesetzte Verhältnis von Probe zu IgG/RF Stripper ausreichend ist, wurde zusätzlich eine höhere Konzentration des IgG/RF Strippers getestet. Zur Kontrolle des Erfolgs wurde eine IgG Detektion durchgeführt. Um jedoch den Einfluss einer höheren IgG/RF Stripper Konzentration auf die Messung von IgM zu überprüfen, erfolgte ebenfalls eine IgM Detektion. In Abbildung 16 sind beispielhaft die Reaktivitäten von 13 HCV Antigenen in einer Probe mit einem erhöhten IgG Gehalt gezeigt. Zum Vergleich ist die Probe auch ohne Vorbehandlung dargestellt. Die Probe wurde in der Vorbehandlung entweder 1:5 oder 1:10 in IgG/RF Stripper verdünnt. In der IgG Detektion (Abbildung 16-A) konnte erkannt werden, dass beide IgG/RF Stripper Konzentrationen den gleichen Erfolg erzielten. In Abbildung 16-B wird deutlich, dass durch den Einsatz des IgG/RF Strippers die Signale auf den HCV Antigenen etwas reduziert wurden. Bei höherer IgG/RF Stripper Konzentration wurden die Signale minimal mehr verringert. Da die höhere Konzentration keine merklichen Vorteile brachte, die vom Hersteller empfohlene Menge 4 Teile IgG/RF Stripper sind und um kostengünstig zu arbeiten wurde standardmäßig zur Vorbehandlung der Proben die geringere Konzentration (4 Teile) eingesetzt.

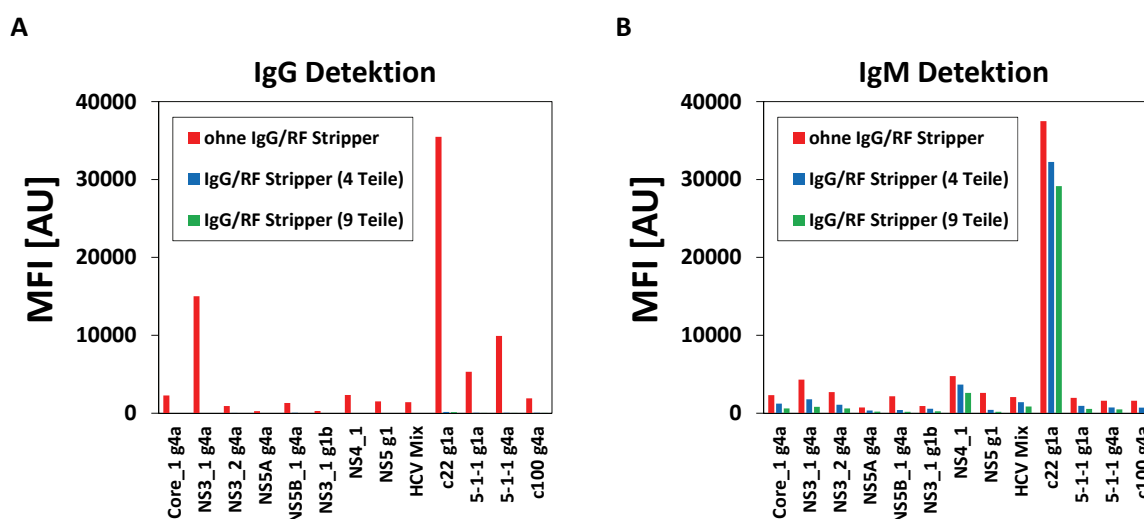


Abbildung 16: Vergleich der IgG und IgM Detektion in einer Probe mit und ohne Vorbehandlung mit IgG/RF Stripper. Dargestellt sind die gemessenen MFI-Werte von 13 HCV Antigenen in einer Probe ohne Vorbehandlung und mit IgG/RF Stripper Vorbehandlung in zwei verschiedenen Konzentrationen. (A) Detektion mit gt- α -hu IgG-PE. (B) Detektion mit dk- α -hu IgM-PE.

4.1.2.2 Generierung von Qualitätskontrollen

Für die technische Validierung des anti-HCV-IgM Assays wurden ebenfalls Qualitätskontrollen benötigt. Kommerziell erhältliche Standards standen hierfür nicht zur Verfügung. Daher wurde ein Probensatz von 47 HCV Patienten, davon 13 mit akuter Infektion und 34 mit chronischer Infektion, im anti-HCV-IgM Assay untersucht. Proben mit Reaktivitäten gegenüber dem Core Antigen konnten häufig identifiziert werden, allerdings zeigten nur sehr wenige Proben auch Signale gegenüber anderen HCV Antigenen. Für die Validierung wurden vier Proben (QC positiv 4 – 7) ausgewählt, welche zusammen genommen auf fast allen HCV Antigenen eine Reaktivität zeigten (Abbildung 17). Im Gegensatz zu den QC Proben des anti-HCV-IgG Assays, konnten beim anti-HCV-IgM Assay die Proben nicht verdünnt aliquotiert werden, da die Assay Durchführung eine Vorbehandlung der unverdünnten Proben mit IgG/RF Stripper vorsah. Für die Validierung wurde daher von den gewählten Proben QC positiv 4 – 7 eine ausreichende Menge Aliquots der unverdünnten Proben hergestellt und bei -80 °C gelagert.

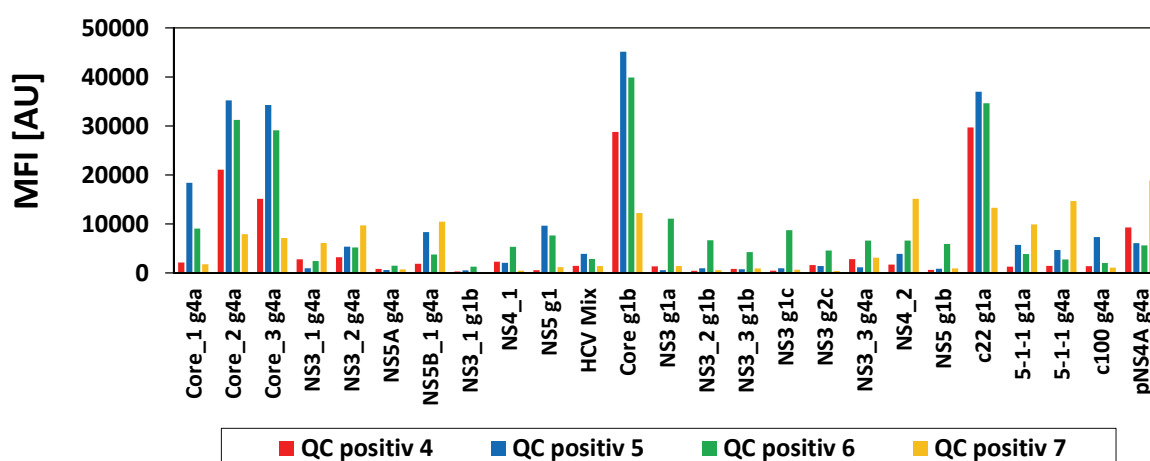


Abbildung 17: Reaktivitäten der Proben QC positiv 4 – 7. Dargestellt sind die gemessenen MFI-Werte von 25 HCV Antigenen.

4.1.2.3 Technische Assay Validierung

Auch für den anti-HCV-IgM Assay wurde eine technische Validierung, wie in 4.1.1.4 beschrieben, durchgeführt. Ebenfalls wurde die Validierung beschränkt auf die Intra- und Inter-Assay Präzision, die Kurzzeit- und Temperaturstabilität sowie die Stabilität der Proben gegenüber Gefrierzyklen. Insgesamt wurden für den anti-HCV-IgM Assay vier interne Kontrollen und 25 HCV Antigene validiert.

a. Assay Präzision

Intra-Assay Präzision

Für die Bestimmung der Intra-Assay Präzision wurden 15 technische Replikate des Blanks und jeweils 20 technische Replikate von drei positiven Proben (QC positiv 4 – 6) innerhalb eines Experiments gemessen. Aus den gemessenen Replikaten von jeder Probe wurden der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten, die Standardabweichung und aus diesen wiederum der CV für jedes Antigen berechnet. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse in Form von Histogrammen dargestellt. Alle erhaltenen CVs waren kleiner als 15 %. Im Mittel über alle Antigene ergab sich ein Intra-Assay CV von 5,2 +/- 1,7 %.

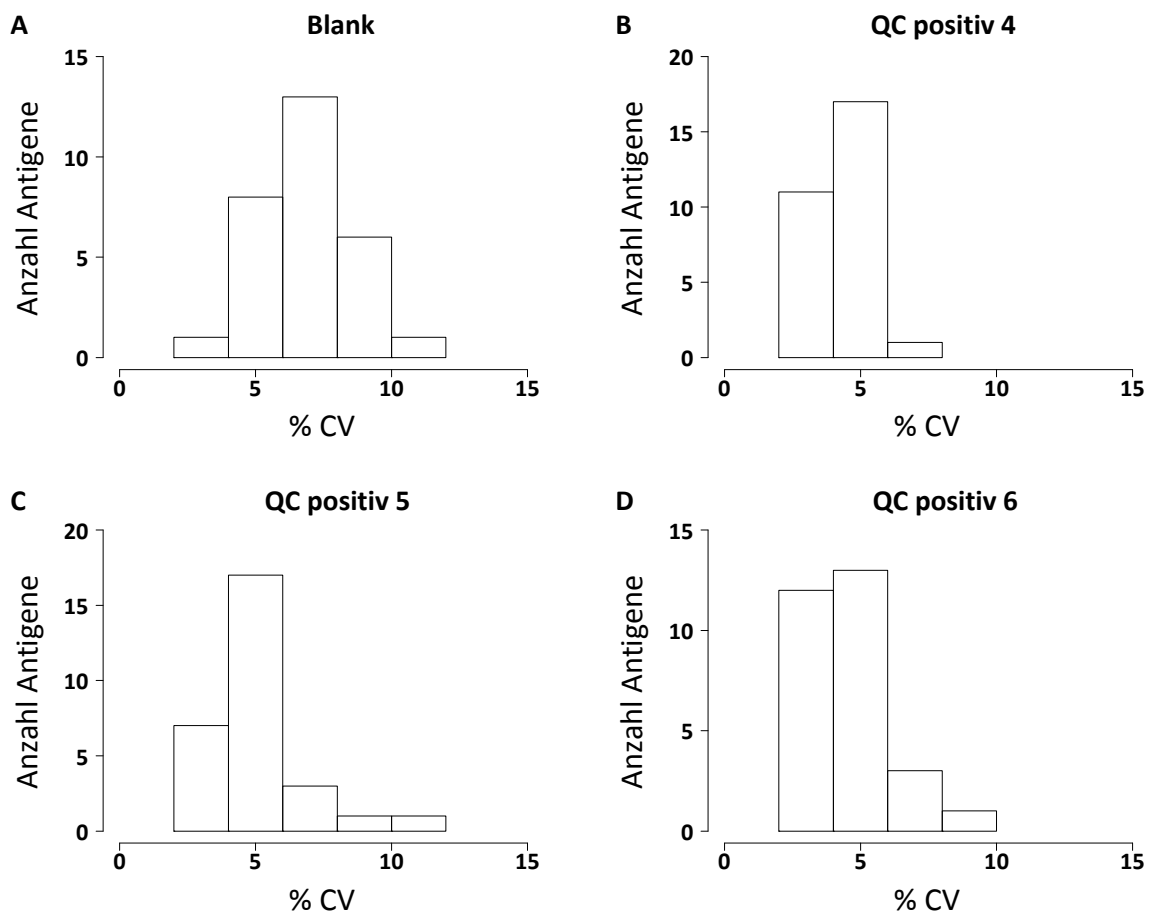


Abbildung 18: Bestimmung der Intra-Assay Präzision des anti-HCV-IgM Assays. Dargestellt sind Histogramme der Intra-Assay Variationskoeffizienten des Blanks (A) und der Proben QC positiv 4 (B), QC positiv 5 (C) und QC positiv 6 (D).

Inter-Assay Präzision

Für die Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden technische Triplikate einer Probe an vier Versuchstagen gemessen. Die Bestimmung erfolgte im Blank, in der Probe QC negativ sowie in den Proben QC positiv 5 – 7. Aus den gemessenen Replikaten von jeder Probe wurde der CV für jedes Antigen berechnet. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse in Form von Histogrammen dargestellt. Bis auf ein Antigen (Core g1b) im Blank (CV = 29,6 %) und eine Kontrolle (GST) in der Probe QC negativ (CV = 21,1 %), waren alle CVs kleiner als 20 %. Im Mittel ergab sich ein Inter-Assay CV von 6,3 +/- 4,0 %.

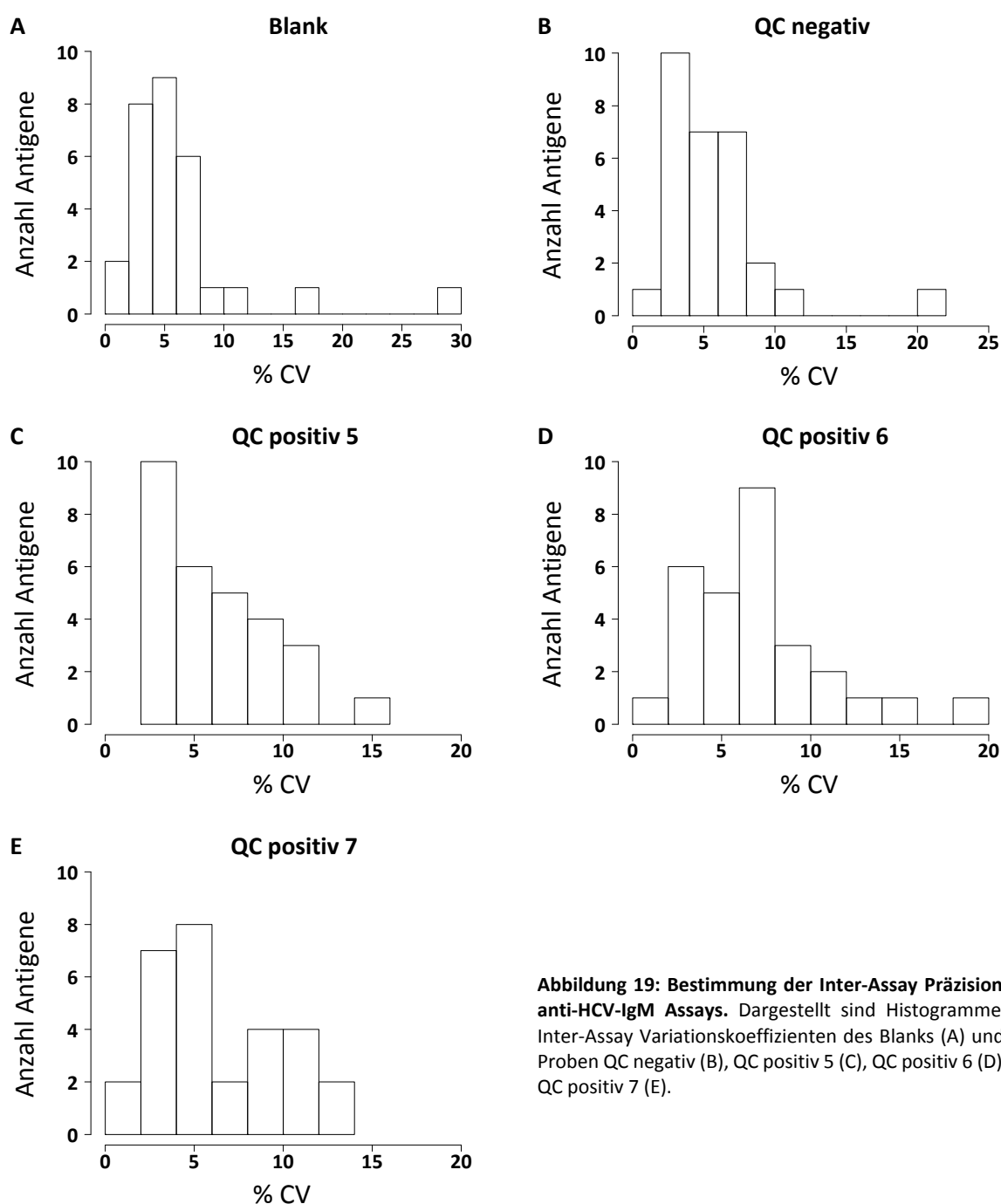


Abbildung 19: Bestimmung der Inter-Assay Präzision des anti-HCV-IgM Assays. Dargestellt sind Histogramme der Inter-Assay Variationskoeffizienten des Blanks (A) und der Proben QC negativ (B), QC positiv 5 (C), QC positiv 6 (D) und QC positiv 7 (E).

b. Stabilität der Proben

Gefrierzyklen

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Gefrierzyklen auf die Messwerte von den vier internen Kontrollen und den 25 Antigenen im anti-HCV-IgM Assay wurden zwei, drei und fünf Gefrierzyklen mit zwei verschiedenen QC Proben durchgeführt und anschließend zeitgleich mit jeweils einer frisch aufgetauten Probe als Referenzprobe vermessen. Die referenzierten Werte sollten zwischen 80 % und 120 % liegen.

Abbildung 20-A und Abbildung 20-B zeigen die referenzierten Werte von den beiden Proben nach der Durchführung von Gefrierzyklen. In der Probe QC positiv 6 wurde nach dem zweiten Gefrierzyklus bei einem Antigen nur 74 % des Referenzwertes gemessen und nach dem dritten Gefrierzyklus bei einem Antigen 121 % des Referenzwertes. Nach dem fünften Gefrierzyklus zeigten jedoch beide Antigene referenzierte Werte zwischen 80 % und 120 %, weshalb von keinem Stabilitätsproblem ausgegangen wird. In der Probe QC positiv 7 wurde nach dem fünften Gefrierzyklus bei einem Antigen 124 % des Referenzwertes erhalten. Allerdings wird auch bei Antikörpern gegen dieses Antigen kein generelles Stabilitätsproblem angenommen.

Kurzzeitstabilität

Zur Bestimmung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität wurden zwei QC Proben für 2 h, 4 h oder 24 h bei RT oder 4 °C gelagert und anschließend mit jeweils einer frisch aufgetauten Probe als Referenzprobe analysiert. Solange die referenzierten Werte für die vier Kontrollen und 25 Antigene jeweils zwischen 80 % und 120 % liegen, ist eine ausreichende Stabilität gegeben.

In Abbildung 20-C und Abbildung 20-D sind die Ergebnisse der Kurzzeit- und Temperaturstabilität dargestellt. In der Probe QC positiv 6 wurde bei zwei Kontrollen und fünf Antigenen für den Zeitpunkt 24 h bei RT und/oder für 4 h bei 4 °C leicht erhöhte Werte erhalten, allerdings maximal 125 %. Zusätzlich zeigten zwei Antigene für den Zeitpunkt 24 h bei 4 °C zum einen 74 % und zum anderen 79 % des Referenzwertes. In der Probe QC positiv 7 wiesen für den Zeitpunkt 4 h bei RT eine Kontrolle und alle Antigene Werte < 80 % auf, zum Zeitpunkt 24 h bei RT jedoch konnten wieder Werte zwischen 92 % und 111 % erreicht werden. Ein Stabilitätsproblem wird daher ausgeschlossen und eine kleine Verdünnungsungenauigkeit vermutet.

Auch wenn die Probe QC positiv 7 eine recht hohe Streuung der Werte zwischen 74 % und 125 % zeigte, wurden insgesamt auch bei Lagerung der Proben für 24 h bei Temperaturen über -20 °C keine schwerwiegenden Stabilitätsprobleme beobachtet.

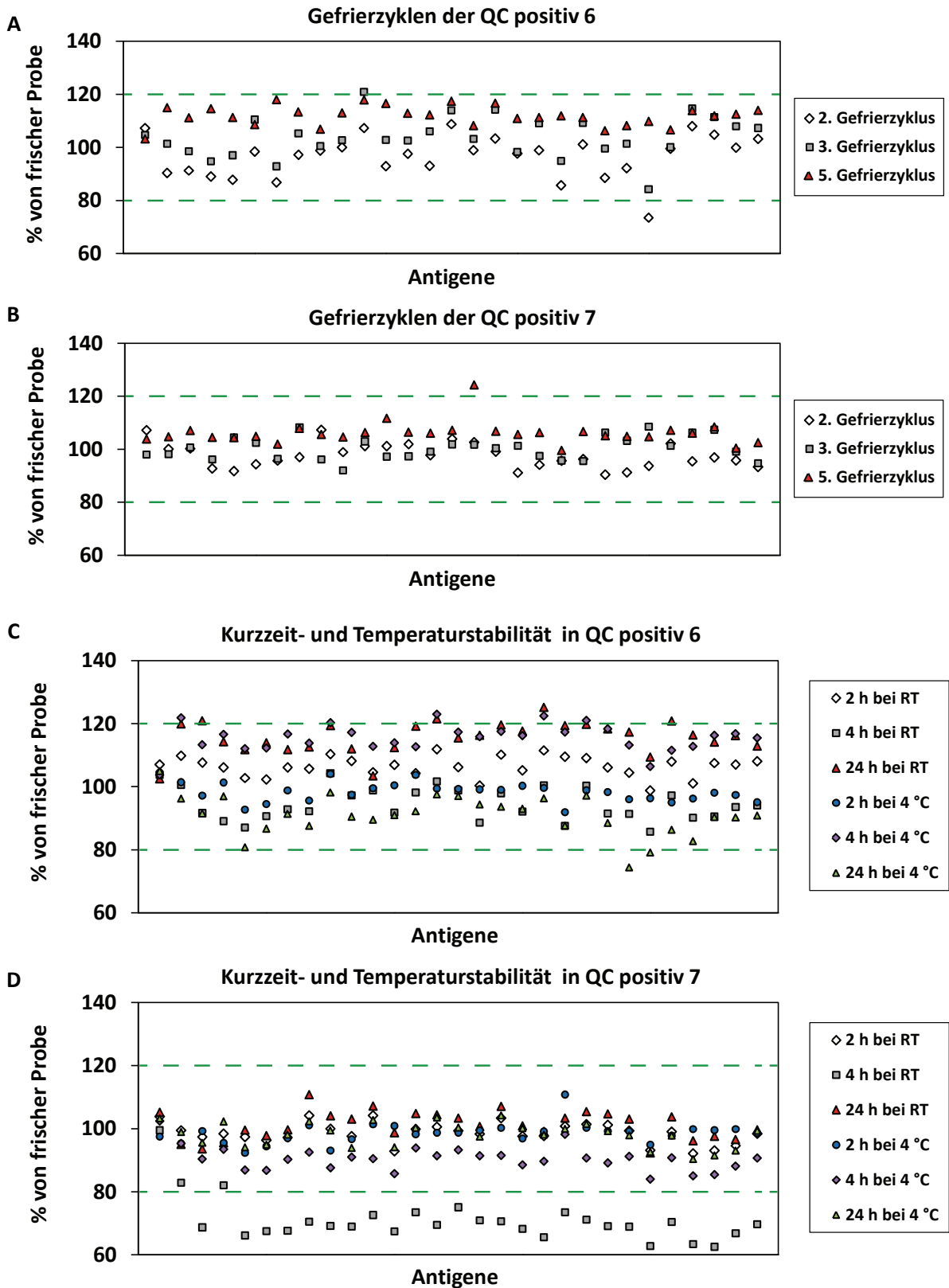


Abbildung 20: Bestimmung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen sowie der Kurzzeit- und Temperaturstabilität im anti-HCV-IgM Assay. Dargestellt sind die Auswirkungen von Gefrierzyklen (2x, 3x und 5x) und von der Lagerung einer Probe für 2 h, 4 h und 24 h bei RT oder 4 °C auf die Messwerte in zwei verschiedenen Proben. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von 4 Kontrollen und 25 HCV Antigenen wurden jeweils referenziert auf eine frisch aufgetaute Probe und in % angegeben. (A) Gefrierzyklen der Probe QC positiv 6, (B) Gefrierzyklen der Probe QC positiv 7, (C) Kurzzeit- und Temperaturstabilität der Probe QC positiv 6 und (D) Kurzzeit- und Temperaturstabilität der Probe QC positiv 7.

4.1.3 Assay interne Kontrollen

Da das Mikrosphären-basierte Array-System der Firma Luminex die Möglichkeit für multiplexe Protein-Microarrays bietet, können nicht nur ausgewählte Antigene untersucht werden, sondern auch andere Proteine als Assay interne Kontrollen verwendet werden. Jede interne Kontrolle wurde jeweils auf einer Mikrosphärensorte immobilisiert.

Insgesamt wurden sechs interne Kontrollen eingesetzt. (1) + (2) Kommerziell erhältliche, aufgereinigte humane Antikörper der Klasse G (humane IgG, Sigma-Aldrich) oder Klasse M (humane IgM, Sigma-Aldrich) wurden eingesetzt, um die Zugabe des Detektionssystems zu überprüfen. (3) Für den anti-HCV-IgG Assay wurde außerdem ein anti-human IgG Antikörper (α -hu IgG, Dianova) als Kontrolle für die Probenzugabe eingesetzt. (4) Wie in 4.1.1.1 erwähnt, diente BSA als Trägerprotein für die immobilisierten Peptide, weshalb BSA als interne Kontrolle verwendet wurde. Signale auf den Peptid-Mikrosphären, die durch das Vorhandensein von Antikörpern gegen das entsprechende Peptid hervorgerufen werden, müssen höher als das Signal auf der BSA-Mikrosphäre sein. (5) Einige der verwendeten Antigene wurden als Fusionsproteine mit GST exprimiert (siehe Tabelle 4). Um sicherzustellen, dass beobachtete Signale auf entsprechenden Antigen-Mikrosphären wahrhaftig als Reaktion auf das Antigen auftreten, wurde aufgereinigtes GST auf einer Mikrosphäre immobilisiert und als interne Kontrolle verwendet. (6) Alle verwendeten HCV Antigene wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. Um eine Antikörper Reaktivität gegenüber *E. coli* Proteinen auszuschließen, wurde ECL als weitere Kontrolle immobilisiert.

Für den anti-HCV-IgG Assay wurden während der technischen Validierung (siehe 4.1.1.4) jeweils Grenzwerte für die internen Kontrollen zur Überprüfung des Detektionssystems (humane IgG-Mikrosphäre) und der Probenzugabe (α -hu IgG-Mikrosphäre) bestimmt (siehe Tabelle 19). Ebenso wurden bei der Validierung des anti-HCV-IgM Assays (siehe 4.1.2.3) Grenzwerte für die humane IgM-Mikrosphäre ermittelt. Im Rahmen dieser Grenzwerte musste sich der entsprechende Messwert bei einer Probenmessung befinden, damit die Probe ohne weitere Prüfung für eine Auswertung verwendet werden durfte. Die Bestimmung der Grenze erfolgte durch Berechnung des Mittelwerts der Messwerte auf der entsprechenden Mikrosphäre von einer HCV negativen Probe und drei HCV positiven Proben, welche in Triplikaten an jeweils vier Versuchstagen vermessen wurden. Für die Probenmessung wurde eine Abweichung um 20 % vom Mittelwert eingeräumt. Bei Unterschreitung der unteren Grenze (Mittelwert - 20 %) wurde festgesetzt, dass die Werte auf den Antigen-Mikrosphären nicht verwendet werden durften, ggf. musste eine Wiederholung der Messung erfolgen. Bei Überschreitung der oberen Grenze (Mittelwert + 20 %) musste ebenfalls eine Wiederholung der Messung erfolgen.

Tabelle 19: Grenzwerte für die internen Kontrollen humane IgG, α -hu IgG und humane IgM. Bei einer Probenmessung mussten die gezeigten Grenzwerte auf der entsprechenden Mikrosphäre eingehalten werden.

	Mikrosphäre		
	humane IgG	α -hu IgG	humane IgM
untere Grenze	29742 MFI	18529 MFI	24392 MFI
obere Grenze	44613 MFI	27793 MFI	36588 MFI

Die internen Kontrollen BSA, GST und ECL wurden hauptsächlich für die Assay Entwicklung benötigt (siehe 4.1.1.1). Allerdings zeigte sich nach der Messung eines größeren Probensatzes im anti-HCV-IgG Assay, dass es einen Zusammenhang zwischen den Signalhöhen auf diesen internen Kontrollen und dem Krankheitszustand zu geben scheint. In Abbildung 21 sind die MFI-Werte der BSA-, der ECL- und der GST-Mikrosphäre jeweils in gesunden Spendern (HCV negativ), in Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut) und in Patienten mit chronischer HCV Infektion (HCV chronisch) in Form von Box-Whisker-Plots dargestellt. Bei Vorliegen einer Infektion mit HCV scheinen höhere Werte auf den internen Kontrollen gemessen zu werden. Zur Beurteilung, ob tatsächlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der Gruppen bei Betrachtung einer der gezeigten Kontroll-Mikrosphären besteht, wurden p-Werte bestimmt. Dazu wurde zunächst ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt und festgestellt, dass keine Normalverteilung vorliegt. Im Anschluss wurde daher ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test vorgenommen, bei welchem für jede Kontroll-Mikrosphäre die drei Personengruppen jeweils paarweise miteinander verglichen wurden. Für alle drei Kontroll-Mikrosphären wurden bei allen Gruppen-Paaren p-Werte kleiner als das Signifikanzniveau $\alpha = 0,001$ erhalten (siehe Anhang Tabelle 64). Trotz der p-Werte $< 0,001$ nahm die Gruppe der Patienten mit akuter HCV Infektion eine Zwischenposition ein. Hier wurde zum ersten Mal ersichtlich, dass diese Patientengruppe hinsichtlich ihrer Reaktivität sehr heterogen zu sein scheint.

Verschiedenste Gründe sind vorstellbar, die zu der Beobachtung führen könnten, dass es auf den Kontroll-Mikrosphären eine Abhängigkeit der Signalhöhe vom Krankheitszustand gibt. Die zwei Hauptüberlegungen hierzu waren einerseits eine mögliche Beteiligung von Rheumafaktoren, bzw. von Kryoglobulinen [89-91] und zum anderen das Vorliegen einer polyklonalen Gammopathie, bzw. einer Hyper- γ -Globulinämie [28, 92-94]. Beiden Überlegungen wurde nachgegangen, wobei die Ergebnisse zur Beteiligung von Rheumafaktoren in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Zur Überprüfung des Vorliegens einer polyklonalen Gammopathie wurde ein Assay zur Quantifizierung humaner Immunglobuline G entwickelt (siehe 4.1.6). Trotz intensiver Recherche konnte keine definitive Erklärung oder Lösung des Problems gefunden werden, dass die Signale auf den Kontroll-Mikrosphären vom Krankheitszustand abhängig sind.

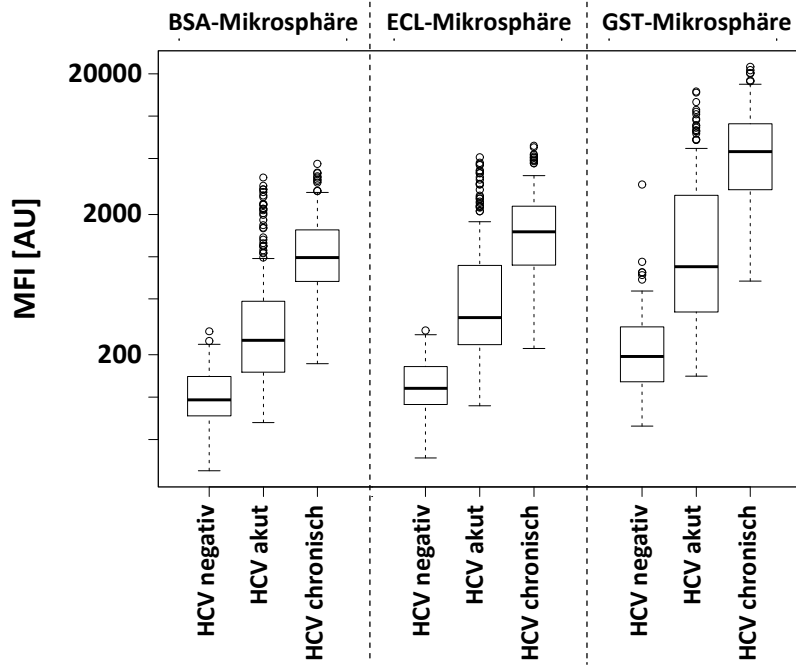


Abbildung 21: Box-Whisker-Plots der Signalthöhe von drei internen Kontrollen in Abhängigkeit vom Krankheitszustand. Dargestellt sind die MFI-Werte der BSA-, der ECL- und der GST-Mikrosphäre jeweils in gesunden Spendern (HCV negativ, n=117), in Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut, n=166) und in Patienten mit chronischer HCV Infektion (HCV chronisch, n=141). Alle ermittelten p-Werte waren kleiner als das Signifikanzniveau $\alpha = 0,001$.

Ein Problem stellt dieser Befund allerdings dahingehend dar, dass die Proben mit höheren Messwerten auf den Kontroll-Mikrosphären meistens Proben von Patienten mit einer HCV Infektion waren, wodurch eine Unterscheidung von gesunden Spendern und HCV Patienten allein durch die Reaktivität auf den Kontroll-Mikrosphären möglich wäre. Bei einem guten Test zum Nachweis von Antikörpern gegen ein bestimmtes Pathogen sollte jedoch die Unterscheidung von „negativ“ oder „positiv“ selbstverständlich aufgrund der Reaktivität gegenüber spezifischen Antigenen stattfinden. Außerdem zeigten die Proben mit höheren Messwerten auf den Kontroll-Mikrosphären auch ebenfalls höhere Messwerte auf Antigen-Mikrosphären, wobei dies nicht nur für HCV Antigene, sondern auch für Antigene aus anderen Pathogenen (z. B. HAV oder HBV) beobachtet wurde. Bei Festlegung einer Trenngrenze (Cut-Off) zur Unterscheidung von Proben gesunder Spender („negativ“) oder infizierter Personen („positiv“), was auf Basis der Messwerte von gesunden Spendern berechnet wird, würden automatisch alle Proben mit hohen Messwerten als „positiv“ eingestuft werden. Wie schon erwähnt, trifft dies hier v. a. auf die HCV Patientenproben zu. Eine Einstufung als „positiv“ wäre im anti-HCV-IgG Assay selbstverständlich korrekt, aber nicht zwangsläufig bei einem anti-HAV-IgG oder anti-HBV-IgG Assay. Damit letztlich nicht ein korrektes Testergebnis auf Basis falscher Voraussetzungen erhalten wird, musste eine Lösung für das Problem gefunden werden. Da jedoch eine Lösung auf Ebene der Assay Durchführung nicht ausfindig zu machen war, bestand noch die Möglichkeit eine Lösung auf

Ebene der Datenverarbeitung zu erzeugen. Dazu wurden die erhaltenen Daten noch einmal genauer untersucht, wobei auffiel, dass sich die Signalhöhen der Kontroll-Mikrosphären zwischen den betrachteten Personengruppen in Abbildung 21 zwar stark unterschieden, die Box-Whisker-Plots der verschiedenen Kontroll-Mikrosphären innerhalb einer Personengruppe jedoch sehr ähnlich aussahen. Da die Box-Whisker-Plots von der BSA- und der ECL-Mikrosphäre einer Personengruppe sogar nahezu identisch waren, wurde zunächst überprüft, ob zwischen den Messwerten dieser Mikrosphären eine lineare Korrelation bestünde. In Abbildung 22-A sind in einer Korrelationsgrafik die gemessenen MFI-Werte der ECL-Mikrosphäre gegen die gemessenen MFI-Werte der BSA-Mikrosphäre aufgetragen, wobei sich eine positive Korrelation mit dem Korrelationskoeffizient $r = 0,987$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9741$ ergab. Da viele Messwerte in einem niedrigeren MFI-Level lagen, wurden zudem die logarithmierten Messwerte (\log_{10} (MFI)-Werte) untersucht (Abbildung 22-B). Abgesehen von zwei Ausreißern ergab sich auch hier eine eindeutige, positive Korrelation ($r = 0,985$ und $R^2 = 0,9745$). Da eine Korrelation der BSA- und der ECL-Mikrosphäre gegeben war, wurde die GST-Mikrosphäre im Folgenden nur mit der ECL-Mikrosphäre verglichen. Wie zuvor, wurden sowohl die MFI als auch die \log_{10} (MFI)-Werte jeweils in einer Korrelationsgrafik in Abbildung 22-C und Abbildung 22-D dargestellt. Bei Betrachtung der MFI-Werte ($r = 0,865$ und $R^2 = 0,7477$) schien eine eindeutige Korrelation nicht zwangsläufig vorzuliegen, bei den \log_{10} (MFI)-Werten ($r = 0,934$ und $R^2 = 0,8718$) hingegen könnte wahrscheinlicher von einer Korrelation ausgegangen werden. Zwar scheint auch bei der GST- und ECL-Mikrosphäre eine positive Korrelation zu bestehen, allerdings war die Streuung der Werte sehr viel größer als bei der Korrelation der BSA- und ECL-Mikrosphäre.

Bei wiederum genauerer Betrachtung der Proben fiel zudem auf, dass die gemessenen Reaktivitäten gegenüber nicht-HCV Antigenen ungefähr den Messwerten auf der BSA- und ECL-Mikrosphäre entsprachen. Dies führte zu der Annahme, dass ein probenspezifisches Hintergrundsignal existiert. In Abbildung 23 sind beispielhaft die gemessenen Signale von zwei HCV Patienten und einem gesunden Spender dargestellt. Drei Kontrollen, elf HCV Antigene, fünf HAV Antigene und zwei HBV Antigene sind als Auswahl gezeigt. Für jede Probe wurde eine Linie eingezeichnet, die das probenspezifische Hintergrundsignal (PSH) veranschaulichen soll. Bei den HCV Patienten wurden auf den HCV Antigenen trotzdem Signale weit über dem PSH gemessen.

Da, wie zuvor gezeigt, eine starke Korrelation der Signale auf der BSA- und ECL-Mikrosphäre besteht, wurden diese beiden Messwerte zur Bestimmung des PSH verwendet und es erfolgte die Definition: $\text{PSH} = \text{Mittelwert aus BSA-Signal und ECL-Signal}$. Für jede Probe erfolgte anschließend eine PSH-Korrektur durch Subtraktion des ermittelten PSH von allen Messwerten innerhalb dieser Probe.

Abbildung 24 zeigt die Anwendung der PSH-Korrektur auf die in Abbildung 23 gezeigten Proben. Hieraus wird deutlich, dass die HCV Patienten keine generelle Reaktivität gegenüber allen HAV und HBV Antigenen aufweisen.

Auf der Ebene der Datenverarbeitung wurde letztlich folgende Lösung gefunden: Subtraktion des ermittelten PSH von allen Messwerten innerhalb einer Probe. Dadurch ließen sich die HCV Patienten durch die Signale auf den Kontroll-Mikrosphären nicht mehr von gesunden Spendern unterscheiden.

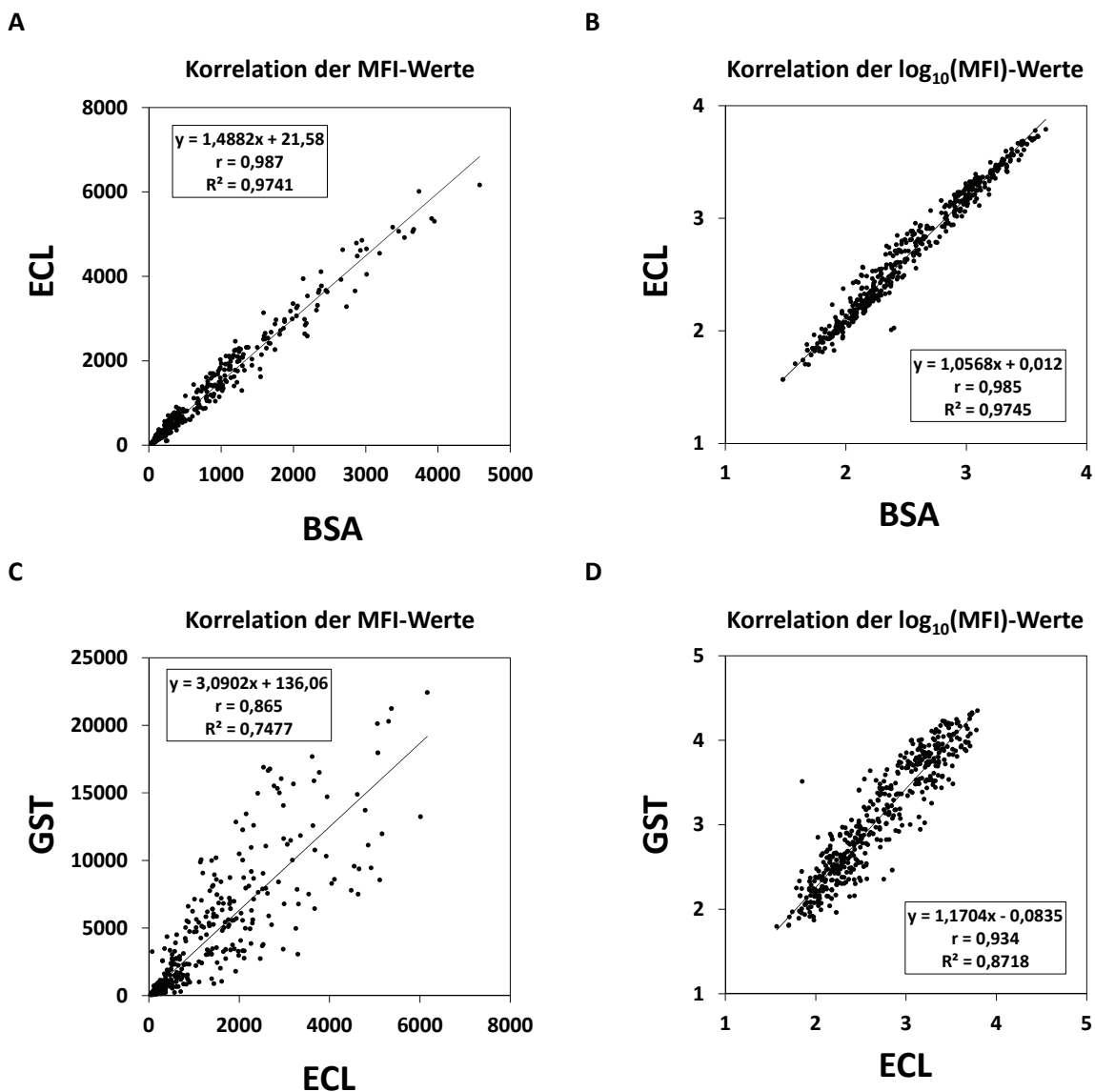


Abbildung 22: Korrelation zwischen internen Kontrollen. (A) Korrelation der gemessenen MFI-Werte auf der ECL- und BSA-Mikrosphäre. (B) Korrelation der $\log_{10}(\text{MFI})$ -Werte auf der ECL- und BSA-Mikrosphäre. (C) Korrelation der gemessenen MFI-Werte auf der GST- und ECL-Mikrosphäre. (D) Korrelation der gemessenen $\log_{10}(\text{MFI})$ -Werte auf der GST- und ECL-Mikrosphäre.

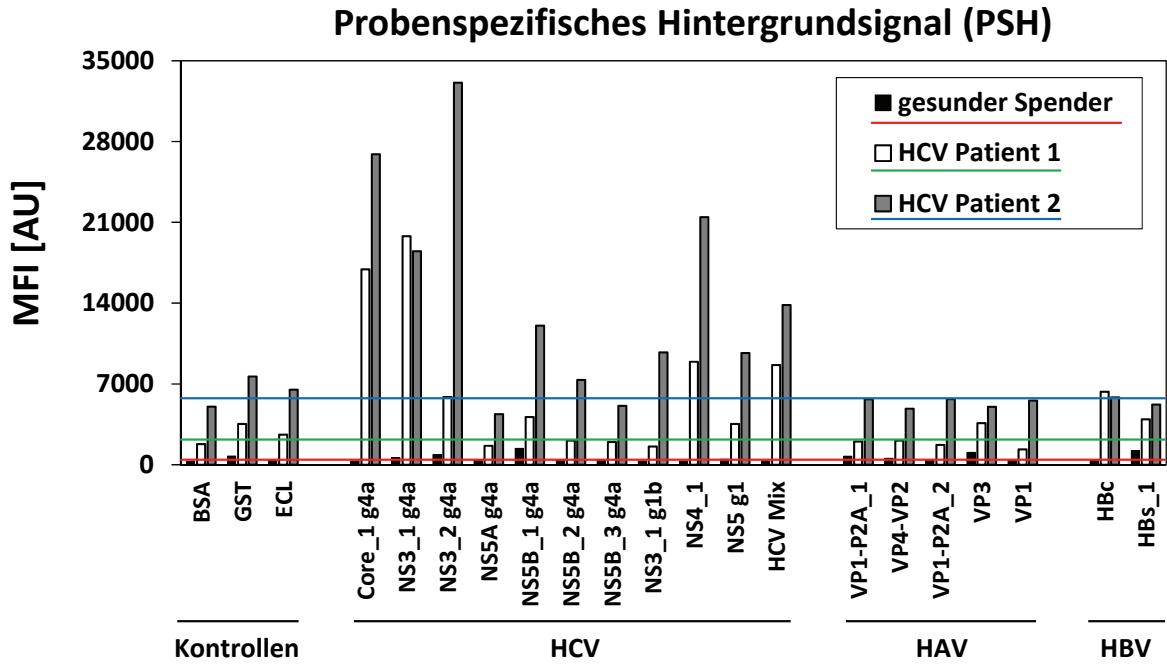


Abbildung 23: Veranschaulichung des probenspezifischen Hintergrundsignals. Dargestellt sind die Signale von zwei HCV Patienten und einem gesunden Spender gegenüber drei Kontrollen, elf HCV Antigenen, fünf HAV Antigenen und zwei HBV Antigenen.

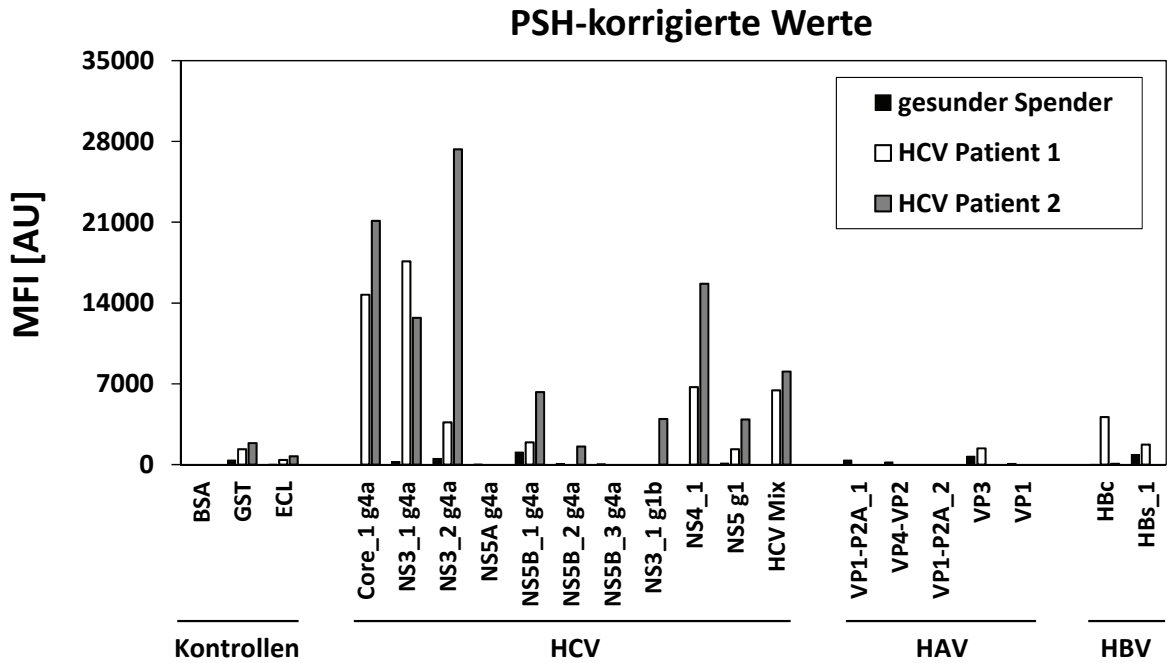


Abbildung 24: Anwendung der PSH-Korrektur. Dargestellt sind die PSH-korrigierten Werte aus Abbildung 23.

4.1.4 Ermittlung der Antigen-Stabilität

Damit auch bei der Messung von einem größeren Probensatz die Ergebnisse vergleichbar bleiben, sollten die verwendeten Antigene über einen gewissen Zeitraum stabil sein. Hierbei sollte sowohl die Immobilisierung selbst stabil sein, als auch die Faltung der Antigene und die Reaktivitäten, welche die Proben gegenüber den Antigenen aufweisen. Zur Ermittlung der Antigen-Stabilität wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Über einen Zeitraum von 20 Wochen wurden in unterschiedlichen Abständen einerseits His-Tag und GST Detektionen durchgeführt und zum anderen wurden die Reaktivitäten von drei Proben nachverfolgt. Die His-Tag und GST Detektionen können zwar Hinweise auf die Stabilität der Immobilisierung geben, allerdings kann kein möglicher Verlust der Funktionalität, bzw. Antigenität ermittelt werden. Hierfür dienten wiederum die drei Proben, in welchen ein Bestehen der Antigenität erfasst werden konnte.

Die Auswertung der His-Tag und GST Detektionen von Antigenen mit einem entsprechenden Fusionspartner ist in Abbildung 25 dargestellt, die Ergebnisse der Proben (jeweils neun beispielhafte Antigene) sind in Abbildung 26 gezeigt. Bei der His-Tag Detektion (Abbildung 25-A) ergab das Antigen NS5B_1 g4a (pink) innerhalb der ersten 25 Tage eine Verringerung des His-Tag Detektionssignals, bis zum Ende des betrachteten Zeitraums blieb das Signal aber relativ stabil. Zwei Antigene, NS3_1 g4a (blauer Kreis) und NS5B_2 g4a (nicht dargestellt), wiesen über den gesamten Zeitraum keine Signale oberhalb des Rauschens auf, obwohl im Western Blot eine His-Tag Detektion möglich war (vgl. Anhang Abbildung 55). Dennoch zeigte sich, dass eine mangelnde His-Tag Detektion nicht zwangsläufig eine fehlende Antigenität bedeuten muss, denn wie in Abbildung 26 zu erkennen, besteht eine Reaktivität von Proben gegenüber NS3_1 g4a (Abbildung 26-A) und NS5B_2 g4a (Abbildung 26-B). Abgesehen von NS5B_1 g4a und NS5B_2 g4a konnte insgesamt eine stabile His-Tag Detektion beobachtet werden mit CVs < 20 % (siehe Anhang Tabelle 65). Ähnlich wie die His-Tag Detektion zeigte auch die GST Detektion (Abbildung 25-B und Anhang Tabelle 66) über 20 Wochen sehr stabile Werte. Auf keinem der HCV Antigene in den Proben QC positiv 1 – 3 wurde eine starke Veränderung der MFI Werte über den Zeitraum von 20 Wochen festgestellt, abgesehen von NS3_1 g4a (Abbildung 26-A), dessen Signale über den Zeitraum abnahmen, und NS5B_1 g4a, das eine Zunahme des Signals innerhalb der ersten 25 Tage zeigte. Die CV-Werte für alle Antigene in den drei Proben sind im Anhang in Tabelle 67 – Tabelle 69 dargestellt. Die Messwerte auf dem Antigen NS3_1 g4a reduzierten sich über den Zeitraum von 20 Wochen ausgehend vom ersten Zeitpunkt auf ein Drittel. Mittel- und hochreaktive Proben würden auch nach 20 Wochen noch eine deutliche Reaktivität aufweisen. Lediglich geringe Signale würden nach einem gewissen Zeitraum ggf. nicht mehr messbar sein.

Wie schon erwähnt, zeigte die His-Tag Detektion von NS5B_1 g4a interessanterweise eine Abnahme innerhalb der ersten 25 Tage nach der Immobilisierung, gleichzeitig jedoch zeigten die Detektionen in den Proben QC positiv 1 – 3 eine Zunahme des Signals. Möglicherweise könnte hier eine Änderung der Faltung des immobilisierten Antigens stattgefunden haben, wodurch eine His-Tag Detektion erschwert, aber die Reaktivität in den Proben erhöht wurde. Generell muss eine schlechte His-Tag oder GST Detektion also nicht in direktem Zusammenhang mit einem Funktionsverlust (Gegenbeispiel: NS5B_1 g4a) oder einer mangelhaften Immobilisierung (Gegenbeispiel: NS3_1 g4a) stehen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass kein Antigen außer NS3_1 g4a über den Zeitraum von 20 Wochen seine Reaktivität in Proben verlor. Die Stabilität der Antigene scheint somit auch für ein größeres Probenscreening geeignet zu sein.

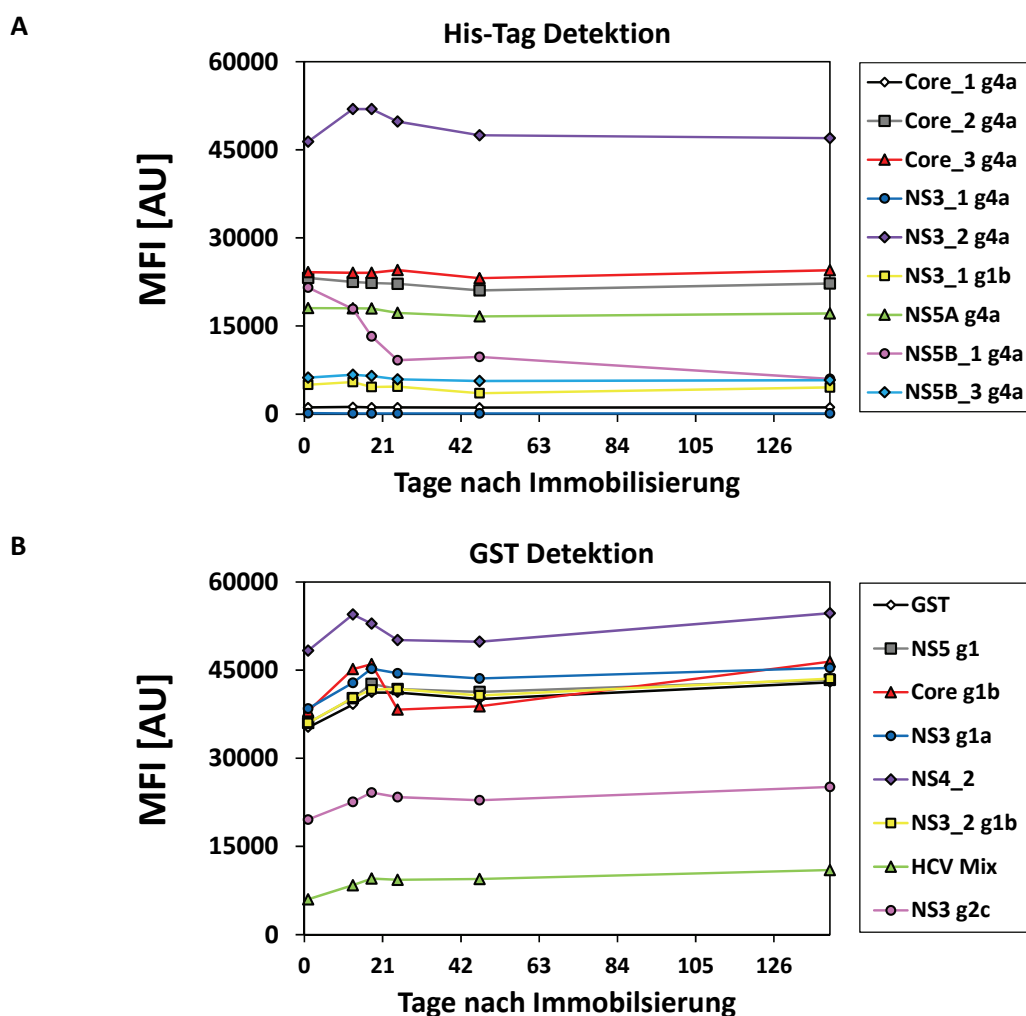


Abbildung 25: Untersuchung der Antigen-Stabilität mittels anti-His-Tag und anti-GST Kontrollen. Die gezeigten Antigene lagen jeweils auf Mikrosphären immobilisiert vor. (A) Detektion des His-Tags von neun HCV Antigenen. (B) GST Detektion von GST und sieben HCV Antigenen.

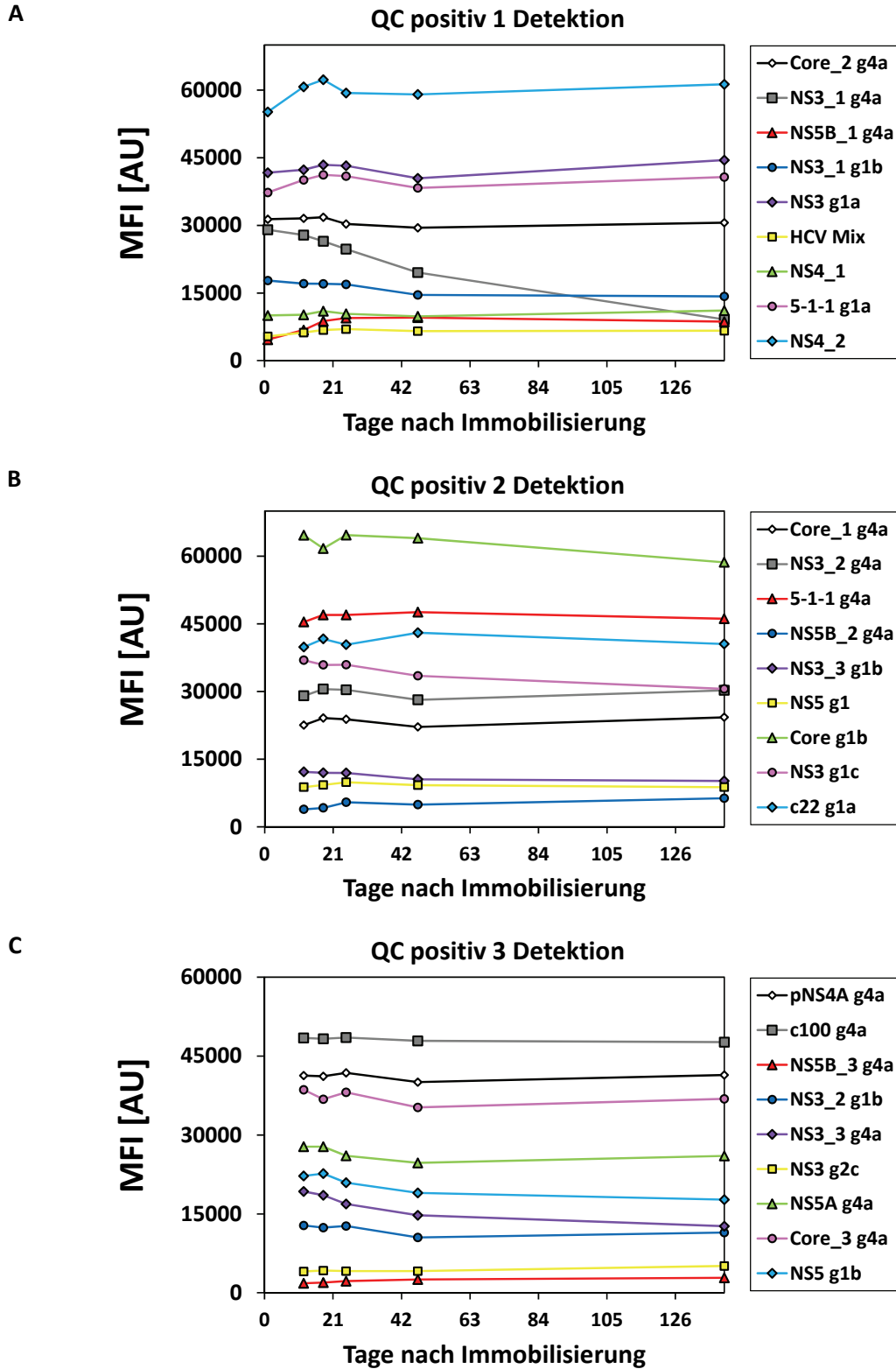


Abbildung 26: Untersuchung der Antigen-Stabilität in drei Proben. (A) Signale von neun HCV Antigenen in der Probe QC positiv 1. (B) Signale von neun HCV Antigenen in der Probe QC positiv 2. (C) Signale von neun HCV Antigenen in der Probe QC positiv 3.

4.1.5 Reproduzierbarkeit der Immobilisierung

Damit ein Forschungs- oder Diagnostiktest erfolgreich implementiert werden kann, sollte der Test nicht nur stabile Messwerte liefern, sondern auch unterschiedliche Herstellungsladungen sollten vergleichbare Ergebnisse erzielen. Zur Überprüfung dessen wurde die Reproduzierbarkeit der Antigenimmobilisierung auf die Mikrosphären untersucht. Insgesamt wurden drei unabhängige Immobilisierungsladungen verglichen. Wie auch bei der Ermittlung der Antigen-Stabilität (siehe 4.1.4), wurde dazu die His-Tag und GST Detektion sowie die Reaktivitäten der Probe QC positiv 1 verwendet. Zwischen der Herstellung der ersten und zweiten Charge lagen fünf Monate und zwischen der zweiten und dritten Charge lagen 15 Monate. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 27 dargestellt, wobei neben den Mittelwerten der gemessenen Fluoreszenzintensitäten aus den drei Immobilisierungsladungen und deren Standardabweichungen auch die CVs bestimmt wurden (siehe Anhang Tabelle 70 – Tabelle 72). In der Probe QC positiv 1 (Abbildung 27-A) zeigten zwar insgesamt fünf HCV Antigene CVs > 20 %, allerdings wurde in diesen Fällen bei zwei der drei Immobilisierungsladungen jeweils ein sehr ähnlicher Messwert erhalten. Die höchsten Abweichungen ergaben sich dabei für NS5B_1 g4a und NS3 g2c. Bei der His-Tag Detektion (Abbildung 27-B) zeigten zwar fast alle Antigene CVs > 20 %, aber auch hier wurde die Abweichung vor allem durch einen der drei Messwerte verursacht. Außerdem wird bei sehr niedrigen Messwerten (Core_1 g4a und NS3_1 g4a) ein CV > 20 % schon bei sehr kleinen Schwankungen erhalten. Bei der GST Detektion (Abbildung 27-C) hingegen wurden nur zwei Antigene (HCV Mix und NS4_2) mit leichten Schwankungen in den Messwerten identifiziert. Letztlich zeigte bis auf NS5B_1 g4a keines der Antigene sowohl in der Probe QC positiv 1 als auch der His-Tag oder GST Detektion einen CV > 20 %. Insgesamt konnte somit eine gute Reproduzierbarkeit der Antigenimmobilisierung festgestellt werden und nur NS5B_1 g4a wurde zunächst als kritisch betrachtet. Das Antigen NS5B_1 g4a wurde daraufhin genauer untersucht indem ein Vergleich der erhaltenen Messwerte von 178 Proben, die mit zwei verschiedenen Immobilisierungsladungen vermessen wurden, in Form einer Korrelationsgrafik stattfand (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Immobilisierungsladungen unterschieden sich bei NS5B_1 g4a stark in ihrer His-Tag Detektion und Reaktivität in der Probe QC positiv 1. Bei der Analyse der Korrelationsgrafik ergaben sich für $r = 0,897$ und $R^2 = 0,8041$. Fünf sehr hohe Messwerte wurden hierfür nicht in die Berechnung mit einbezogen, da dies zu einem zu hohen und somit falschen r bzw. R^2 geführt hätte. Auch wenn die Immobilisierung des NS5B_1 g4a zunächst etwas unstetig schien und die Messwerte in Proben in einem anderen MFI-Niveau liegen konnten, besteht vermutlich kein allzu großes Problem in der Generierung vergleichbarer Ergebnisse.

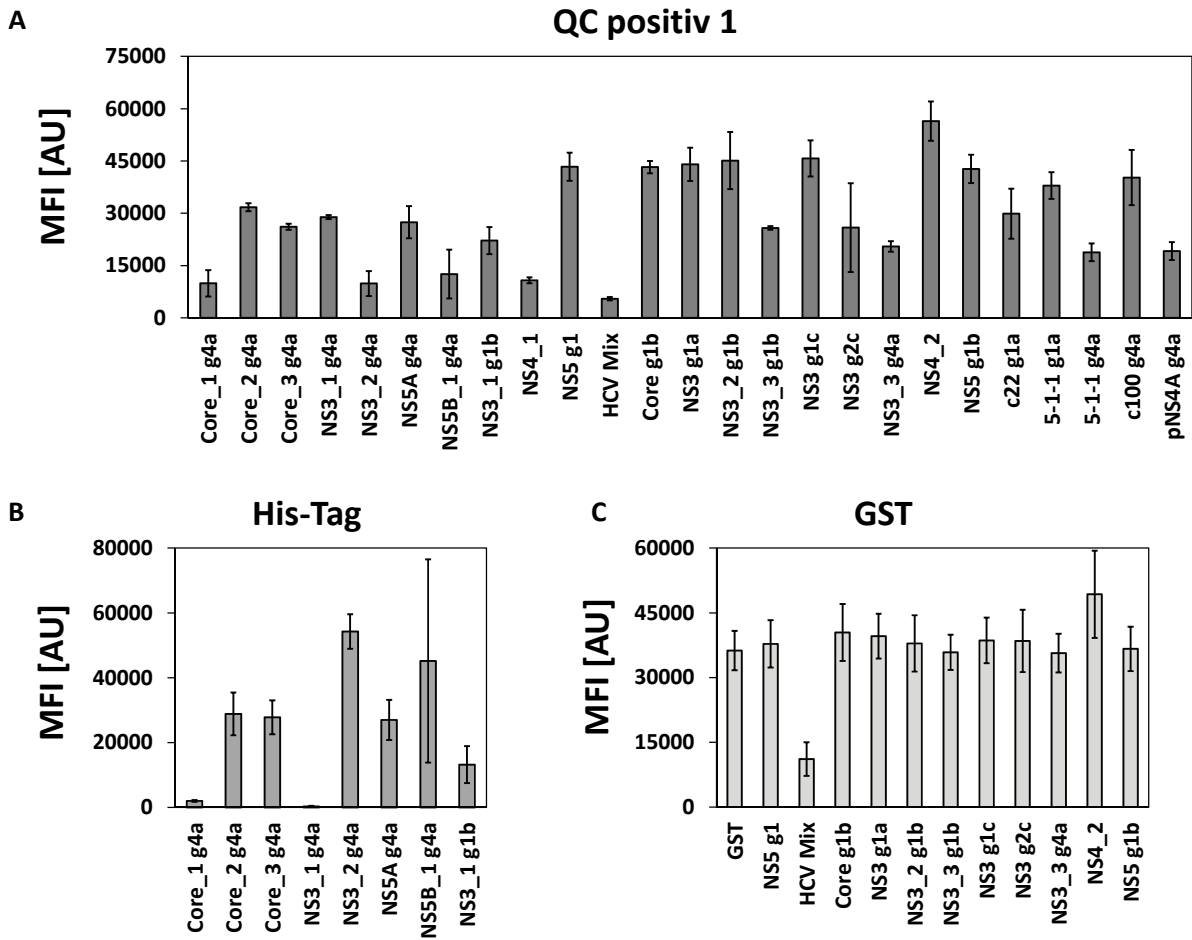


Abbildung 27: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von drei unabhängigen Immobilisierungschargen auf verschiedenen HCV Antigenen in der Probe QC positiv 1 (A), in der His-Tag Detektion (B) und in der GST Detektion (C).

4.1.6 IgG Konzentration in humanen Proben

Zur Untersuchung der Vermutung, dass bei den untersuchten HCV Patienten häufiger eine polyklonale Gammopathie, bzw. eine Hyper- γ -Globulinämie [28, 92-94] vorliegen könnte (siehe 4.1.3), wurde zusätzlich ein Sandwich-Immunoassay zur Quantifizierung humaner Immunglobuline G (Q-IgG Assay) auf der Luminex Plattform entwickelt. Dazu wurde der Antikörper α -hu IgG (siehe Tabelle 1) auf Mikrosphären immobilisiert und als Fängerantikörper eingesetzt. Zur Detektion wurde der Antikörper gt- α -hu IgG-PE (siehe Tabelle 2) verwendet. Als Referenz zur Generierung einer Standardkurve dienten kommerziell erhältliche humane IgG (Sigma-Aldrich).

4.1.6.1 Entwicklung und Validierung eines Assays zur Quantifizierung humaner Immunglobuline G

a. Auswahl eines geeigneten Puffers

Da der verwendete Puffer die Qualität einer Standardkurve verändern kann, wurde der Einfluss des Puffers auf die Standardkurve untersucht. Hierzu wurden Standardreihen in den Puffern CBS-T, LCB, PVXC und BRE-T hergestellt und anschließend im Q-IgG Assay verglichen. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Pufferuntersuchung gezeigt. Um den Kurvenverlauf v. a. im niedrigen MFI-Bereich besser aufzulösen, wurde eine doppelt logarithmische Darstellung gewählt. Insgesamt zeigten alle getesteten Puffer einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf, allerdings konnte mit PVXC im niedrigen Konzentrationsbereich das niedrigste MFI-Niveau erreicht werden. Da dies für eine bessere analytische Sensitivität spricht und da PVXC auch als Puffer für die Vorverdünnung der Proben im anti-HCV-IgG Assay diente, wurde PVXC als Puffer im Q-IgG Assay gewählt.

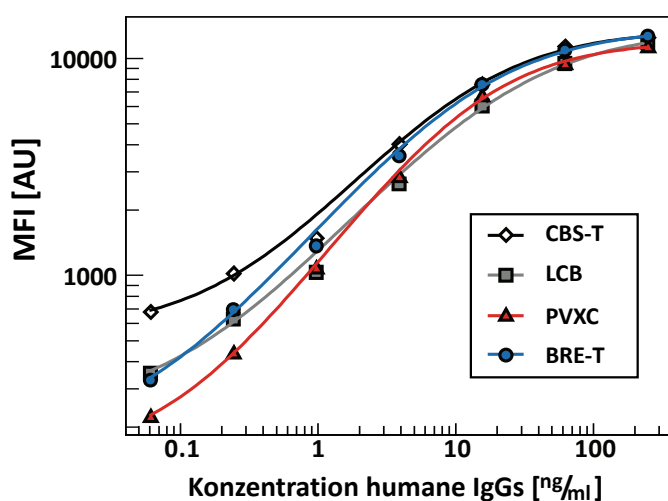


Abbildung 28: Test verschiedener Puffer für den Q-IgG Assay. Dargestellt sind IgG Standardkurven, die mit vier verschiedenen Puffern generiert wurden.

b. Ausschluss einer IgM-Kreuzreaktivität

Obwohl laut Angaben des Herstellers der verwendete Fängerantikörper und der verwendete Detektionsantikörper spezifisch für das Fc-Fragment humaner IgG sein sollen, wurde eine IgM-Kreuzreaktivität überprüft. Hierzu wurden die humanen IgM (Sigma-Aldrich) im Q-IgG-Assay in verschiedenen Konzentrationen getestet. Die kommerziell erhältlichen humanen IgM enthielten einen geringen Anteil an IgG (durch Western Blot identifiziert, Daten nicht gezeigt), weshalb mit einer minimalen Reaktivität gerechnet wurde. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Untersuchung zu einer IgM-Kreuzreaktivität aufgezeigt. Im Mittel ergab sich eine Kreuzreaktivität von 0,69 %. Diese wird auf die erwähnte IgG Verunreinigung zurückgeführt.

Tabelle 20: Untersuchung einer IgM-Kreuzreaktivität im Q-IgG Assay. Verschiedene Konzentrationen an humanen IgM wurden im Q-IgG Assay eingesetzt. Aus der gemessenen Konzentration wurde die Kreuzreaktivität errechnet.

eingesetzte Konzentration [ng/ml]	gemessene Konzentration [ng/ml]	Kreuzreaktivität [%]
10000	62,24	0,62
1000	5,50	0,55
100	0,69	0,69
10	0,09	0,90
1	-	-

c. Generierung von Qualitätskontrollen

Um eine Assay Validierung durchführen zu können und zur Überprüfung der Qualität einer Messplatte im Rahmen eines Screenings, wurden Qualitätskontrollen benötigt. Idealerweise würden hierfür Serumproben mit bekannter Konzentration des Analyten verwendet werden, allerdings standen solche Proben nicht zur Verfügung. Um dennoch humane Serumproben zu verwenden, wurde eine kleine Menge an Proben gesunder und kranker Spender im Q-IgG Assay eingesetzt. Ausgehend von den gemessenen MFI-Werten wurde eine Probe mit einem hohen MFI-Wert (QC hoch) und eine Probe mit einem mittleren MFI-Wert (QC mittel) ausgewählt. Da keine Probe niedrige MFI-Werte zeigte, wurde ebenfalls eine Probe im mittleren MFI-Bereich ausgewählt und stärker verdünnt eingesetzt (QC niedrig). Die ausgewählten Proben wurden entsprechend verdünnt, in ausreichender Menge aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

d. Assay Validierung

Nach der prinzipiellen Entwicklung des Q-IgG Assays wurde der Assay einer Validierung unterzogen, die in Anlehnung an die Richtlinien der EMA und FDA [81, 82] erfolgte. Dabei wurden zuerst das Standardkurvenmodell, die Detektionsgrenze und die Quantifizierungsgrenzen des Assays ermittelt.

Anschließend wurden die Intra- und Inter-Assay Präzision, die Verdünnungslinearität, die Kurzzeit- und Temperaturstabilität, die Stabilität gegenüber Gefrierzyklen und die Langzeitstabilität der QC Proben bestimmt.

(1) Regressionsmodell der Standardkurve

Für die Standardkurve mit sieben Kalibratoren wurde ausgehend vom höchsten Kalibrator eine serielle 1:4 Verdünnungsreihe hergestellt, dabei wurde der Bereich von 500 ng/ml (S1) bis 0,12 ng/ml (S7) abgedeckt. Vier Standardkurven, die jeweils in Duplikaten an vier verschiedenen Versuchstagen generiert wurden, sind in Abbildung 29 dargestellt. Es wurde eine 5-parametrische logistische Kurvenanpassung mit einer Gewichtung von 1/Y gewählt. Ohne 1/Y Gewichtung war das Bestimmtheitsmaß des Regressionsmodells bei jeder Kurve minimal höher, allerdings ergaben sich im Modell mit einer 1/Y Gewichtung v. a. im niedrigen Konzentrationsbereich bessere Wiederfindungsraten für die Kalibratoren. Insgesamt betrug die Wiederfindungsrate 99,6 +/- 5,1 % für die Kalibratoren S2 – S7 bei der 5-parametrische logistische Kurvenanpassung mit einer Gewichtung von 1/Y. Für S1 wurde im Mittel zwar eine Wiederfindungsrate von 95,8 % erreicht, die Standardabweichung ergab jedoch einen Wert von 46,8 %.

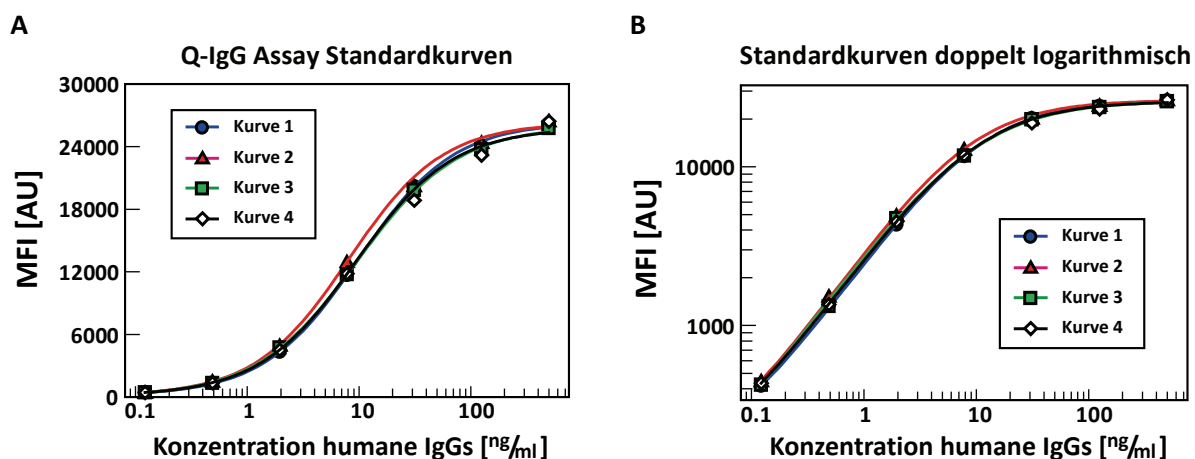


Abbildung 29: Ermittlung eines Standardkurvenmodells für den Q-IgG Assay. (A) Darstellung von vier Standardkurven unter Anwendung eines 5-parametrischen logistischen Regressionsmodells mit einer Gewichtung von 1/Y. (B) Doppelt logarithmische Darstellung der in (A) gezeigten Standardkurven.

(2) Detektionsgrenze

Die Detektionsgrenze (*Limit of detection*, LOD) oder auch analytische Sensitivität eines Assays ist definiert als die minimalste Konzentration eines Analyten, die von einer analytfreien Probe (Blank) unterschieden werden kann. Zur Bestimmung des LOD wurden 20 Replikate des Blanks im Q-IgG Assay

analysiert. Der Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensitäten und die Standardabweichung wurden berechnet. Aus dem Mittelwert und dem niedrigsten Kalibrator (S7) wurde eine lineare Regressionskurve erstellt. Der MFI-Wert des LOD ergab sich aus dem Mittelwert + 3x Standardabweichung. Für diesen MFI-Wert wurde der LOD mit der linearen Regressionskurve berechnet. Für den Q-IgG Assay konnte ein LOD von 31,04 pg/ml bestimmt werden.

(3) Quantifizierungsgrenzen

Zur Bestimmung des dynamischen Bereichs eines Assays müssen die untere und die obere Quantifizierungsgrenze ermittelt werden.

Untere Quantifizierungsgrenze

Die untere Quantifizierungsgrenze (*Lower limit of quantification*, LLOQ) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten, die noch mit ausreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Sie ist definiert als derjenige Punkt, an welchem der CV für die Probe noch < 20 % ist und die Wiederfindungsrate innerhalb des Bereichs von 80 % bis 120 % liegt. Für die Bestimmung des LLOQ wurde ausgehend von Standard S5 eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe mit acht Verdünnungen angefertigt und als Triplikate an drei verschiedenen Versuchstagen im Q-IgG Assay gemessen. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der LLOQ Bestimmung an drei Versuchstagen dargestellt. Letztlich ergab sich ein LLOQ von 122,1 pg/ml (0,12 ng/ml), dies entsprach der Konzentration des niedrigsten Kalibrators (S7).

Tabelle 21: Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ).

Versuch	LLOQ [pg/ml]	% CV	Wiederfindungsrate [%]
1	61,0	10,05	86,99
2	122,1	2,48	103,47
3	122,1	2,56	112,62

Obere Quantifizierungsgrenze

Die obere Quantifizierungsgrenze (*Upper limit of quantification*, ULOQ) ist die maximale Konzentration eines Analyten, die noch mit ausreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Als ULOQ wurde diejenige Konzentration bestimmt, bei welcher die Wiederfindungsrate zwischen 80 % und 120 % lag und der CV < 20 % war. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Bestimmung des ULOQ dargestellt. Die Wiederfindungsrate ist bei allen Kalibratorkonzentrationen im geeigneten Bereich, allerdings zeigten sich für die beiden höchsten Konzentrationen CVs größer als 20 %. Daher wurde der dritte Kalibrator mit 31,25 ng/ml als ULOQ definiert.

Tabelle 22: Bestimmung der oberen Quantifizierungsgrenze (ULOQ).

Kalibrator	Soll-Konzentration [^{ng} /ml]	gemessene Konzentration [^{ng} /ml]	Standardabweichung [^{ng} /ml]	% CV	Wiederfindungsrate [%]
S1	500	543,101	315,84	49,63	108,62
S2	125	116,123	35,51	30,58	92,90
S3	31,25	32,314	4,79	14,81	103,41
S4	7,813	7,991	0,60	7,54	102,28
S5	1,953	1,915	0,10	5,20	98,04
S6	0,488	0,502	0,02	3,99	102,77
S7	0,122	0,120	0,01	9,76	98,36

(4) Intra- und Inter-Assay Präzision

Wie schon in 4.1.1.4a beschrieben, sind die Kenngrößen der Assay Präzision die Intra- und die Inter-Assay Präzision. Der CV sollte dabei für die Intra-Assay Präzision kleiner 15 % sein und für die Inter-Assay Präzision kleiner 20 %. Für die Bestimmung der Intra-Assay Präzision wurden jeweils 20 Replikate der QC niedrig, QC mittel und QC hoch Probe im Q-IgG Assay gemessen. Bei der Ermittlung der Inter-Assay Präzision wurden ebenfalls die QC niedrig, QC mittel und QC hoch Proben verwendet. Diese wurden in Duplikaten an fünf Versuchstagen analysiert. Tabelle 23 zeigt die Mittelwerte der berechneten Konzentrationen sowie die ermittelten CV-Werte für die Bestimmung der Intra- und Inter-Assay Präzision. Alle CV-Werte waren < 10 % und somit im akzeptablen Bereich.

Tabelle 23: Bestimmung der Intra- und Inter-Assay Präzision des Q-IgG Assays. Für die Bestimmung der Intra-Assay Präzision wurden 20 Replikate in einem Experiment gemessen. Für die Inter-Assay Präzision wurden Duplikate an fünf verschiedenen Versuchstagen analysiert.

	Intra-Assay Präzision		Inter-Assay Präzision	
	Mittelwert [^{ng} /ml]	% CV	Mittelwert [^{ng} /ml]	% CV
QC niedrig	1,02	2,97	1,01	8,27
QC mittel	4,65	7,03	4,72	7,24
QC hoch	11,18	9,26	12,49	5,81

(5) Verdünnungslinearität

Die Verdünnungslinearität muss gegeben sein, damit eine Probe mit einer Analytkonzentration oberhalb des ULOQ durch Verdünnen in den dynamischen Bereich des Assays gebracht werden kann ohne dass dabei die Linearität der zurückgerechneten Analytkonzentrationen verloren geht. Zur

Überprüfung der Verdünnungslinearität wurden aufgereinigte humane IgG in einer Konzentration 800-fach über dem ULOQ in Assaypuffer eingesetzt (25000 ng/ml) und nach einer initialen 1:100 Verdünnung seriell 1:2 verdünnt, um die Konzentration in den linearen Assay Bereich zu bringen. Die Verdünnungsreihe wurde anschließend in Triplikaten im Q-IgG Assay gemessen. Bei einer gegebenen Verdünnungslinearität sollte die Wiederfindungsrate im Bereich von 80 % bis 120 % liegen. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Überprüfung der Verdünnungslinearität aufgezeigt. Wie schon erwähnt, befindet sich bei dem Verdünnungsfaktor 800 das in d(3) bestimmte ULOQ. Wie zu erkennen, konnte ab dem Verdünnungsfaktor 400 eine akkurate Konzentration bestimmt werden. Auffällig ist, dass die Wiederfindungsrate ab dieser Verdünnung niemals größer als 100 % wurde, es lag also eine leichte Unterquantifizierung vor. Vermutlich basierte dies auf einer minimalen Ungenauigkeit im initialen Verdünnungsschritt. Insgesamt konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Verdünnungslinearität gegeben ist.

Tabelle 24: Verdünnungslinearität humaner IgG. Ausgehend von 25000 ng/ml wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung vorgenommen, anschließend wurde eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe erstellt.

Verdünnungsfaktor	ermittelte Konzentration [ng/ml]	Konzentration inklusive Verdünnungsfaktor [ng/ml]	Wiederfindungsrate [%]
100	479,69	47,97	191,87
200	68,28	13,66	54,62
400	54,10	21,64	86,56
800	29,17	23,34	93,35
1600	15,58	24,93	99,71
3200	7,49	23,96	95,83
6400	3,67	23,49	93,95
12800	1,81	23,21	92,84
25600	0,90	22,96	91,82

Um die Verdünnungslinearität auch in Serumproben zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Probe eines gesunden Spenders analysiert. Gleichzeitig konnte dabei eine geeignete Probenverdünnung ermittelt werden. Dazu wurde zunächst von einer IgG Normalkonzentration in humanem Serum für Erwachsene 4,07 – 21,7 mg/ml ausgegangen [92, 95-98] und die Probenverdünnung in den linearen Standardkurvenbereich extrapoliert. Um bei einer Probe mit geringem IgG-Gehalt das ULOQ des Q-IgG Assays zu erreichen, muss rechnerisch mindestens eine 1:130 000 Verdünnung vorgenommen werden. Da die Konzentration der IgG in der Serumprobe des gesunden Spenders unbekannt war, wurde ausgehend von der unverdünnten Probe zunächst eine 1:100 Verdünnung vorgenommen, anschließend zwei 1:40

Verdünnungen und schließlich eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Überprüfung der Verdünnungslinearität in einer humanen Serumprobe dargestellt, wobei eine Rückrechnung der Konzentration erst ab einer Verdünnung von 1:160 000 möglich war. Über die komplette 1:2 Verdünnungsreihe zeigten die zurückgerechneten Konzentrationen nur geringe Abweichungen (Mittelwert = 10,75 mg/ml und CV = 7,84 %). Insgesamt konnte aufgezeigt werden, dass eine Verdünnungslinearität in humanen Serumproben über einen großen Verdünnungsbereich gegeben ist.

Tabelle 25: Überprüfung der Verdünnungslinearität in einer humanen Serumprobe. Ausgehend von einer unverdünnten Serumprobe eines gesunden Spenders wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung vorgenommen, anschließend zwei 1:40 Verdünnungen und schließlich gefolgt von einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe.

Verdünnungsfaktor	ermittelte Konzentration [ng/ml]	Konzentration inklusive Verdünnungsfaktor [mg/ml]
160 000	72,41	11,59
320 000	30,91	9,89
640 000	15,70	10,05
1 280 000	8,53	10,92
2 560 000	3,71	9,49
5 120 000	2,15	11,01
10 240 000	1,11	11,33
20 480 000	0,57	11,61
40 960 000	0,29	11,74

Zur Ermittlung einer geeigneten Probenverdünnung wurden mehrere Aspekte gegeneinander abgewogen. Zum einen sollten prinzipiell alle Proben in der gleichen Verdünnung gemessen werden können. Des Weiteren sollten die Messwerte möglichst mittig im dynamischen Bereich des Assays liegen. Und letztlich sollte die nötige Anzahl an Verdünnungsschritten gering sein. Als maximal auftretende IgG Konzentration im Serum bei Vorliegen einer Hyper- γ -Globulinämie wurde 100 mg/ml angenommen, wobei jedoch von Werten bis zu 50 mg/ml ausgegangen wurde [99-102]. Für das Probenscreening wurde letztlich eine generelle Probenverdünnung von 1:2 000 000 gewählt.

(6) Stabilität

Die Stabilität des Analyten, in diesem Assay also humane IgG Antikörper, ist wichtig für einen robusten Assay. Daher wurde untersucht, welche Auswirkungen mehrfache Gefrierzyklen der Proben auf das Quantifizierungsergebnis haben. Zur Ermittlung der richtigen Probenhandhabung wurde außerdem die Kurzzeit- und Temperaturstabilität bestimmt.

Gefrierzyklen

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Gefrierzyklen auf das Quantifizierungsergebnis wurden ein, zwei, drei und fünf Gefrierzyklen mit den drei verschiedenen QC Proben durchgeführt und anschließend mit jeweils einer frisch aufgetauten Probe als Referenzprobe vermessen. Die Wiederfindungsraten sollten zwischen 80 % und 120 % liegen. Wie in Tabelle 26 gezeigt, konnten bis zu fünf Gefrierzyklen problemlos durchgeführt werden. Ausgehend von der frisch aufgetauten Probe wurde dennoch mit jedem weiteren Gefrierzyklus tendenziell eine leichte Reduktion des Quantifizierungsergebnisses beobachtet. Die Proben sollten daher bestenfalls frisch verwendet werden oder maximal fünf Gefrierzyklen erfahren haben.

Tabelle 26: Ermittlung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen im Q-IgG Assay.

Probe	Gefrierzyklus	Konzentration [^{ng}/ml]	Wiederfindungsrate [%]
QC niedrig	0	1,27	100,00
	1	1,25	98,68
	2	1,24	97,89
	3	1,19	93,68
	5	1,16	91,32
QC mittel	0	5,95	100,00
	1	5,32	89,31
	2	5,57	93,56
	3	5,59	93,90
	5	5,43	91,27
QC hoch	0	16,69	100,00
	1	15,16	90,83
	2	16,32	97,82
	3	14,89	89,21
	5	13,57	81,32

Kurzzeit- und Temperaturstabilität

Zur Bestimmung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität wurden die drei QC Proben für 2 h, 4 h oder 24 h bei RT oder 4 °C gelagert und anschließend mit jeweils einer frisch aufgetauten Probe als Referenzprobe vermessen. Solange die Wiederfindungsraten jeweils zwischen 80 % und 120 % liegen, ist die Stabilität gegeben. Wie Tabelle 27 entnommen werden kann, lagen bis auf einen Wert alle Wiederfindungsraten im vorgegebenen Bereich, weshalb von einer Kurzzeit- und Temperaturstabilität ausgegangen werden konnte. Dennoch zeigte die Lagerung für 24 h bei RT in allen Proben den höchsten Messwert. Die Proben sollten daher bestenfalls direkt nach dem Auftauen verwendet werden oder innerhalb von 4 h.

Tabelle 27: Ermittlung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität im Q-IgG Assay.

Probe	Zeit / Temperatur	Konzentration [^{ng}/ml]	Wiederfindungsrate [%]
QC niedrig	0	0,89	100,00
	2 h / RT	0,92	103,37
	4 h / RT	0,98	110,49
	24 h / RT	1,03	116,10
	2 h / 4 °C	0,91	102,62
	4 h / 4 °C	0,93	104,49
	24 h / 4 °C	0,90	101,12
QC mittel	0	4,57	100,00
	2 h / RT	4,90	107,29
	4 h / RT	4,81	105,32
	24 h / RT	5,38	117,72
	2 h / 4 °C	4,99	109,26
	4 h / 4 °C	4,87	106,49
	24 h / 4 °C	4,57	100,00
QC hoch	0	11,34	100,00
	2 h / RT	11,94	105,32
	4 h / RT	12,79	112,76
	24 h / RT	13,75	121,25
	2 h / 4 °C	12,82	113,02
	4 h / 4 °C	13,27	116,99
	24 h / 4 °C	10,45	92,18

Langzeitstabilität der QC Proben

Da es sich bei den QC Proben um stark verdünnte Serumproben handelt und diese auch zur Überprüfung der Qualität einer Messplatte im Rahmen eines größeren Probenscreenings dienen sollten, musste sichergestellt werden, dass sich die IgG-Quantifizierung der QC Proben während der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über einen gewissen Zeitraum nicht verändert. Hierzu wurden die gemessenen MFI-Werte und die berechneten Konzentrationen an Tag 1, 7, 14, 35 und 47 nach der Herstellung der QC Proben verglichen (Abbildung 30). Die MFI-Werte unterschieden sich über den betrachteten Zeitraum nur gering (vgl. Abbildung 30-A), bei den ermittelten Konzentrationen konnte jedoch jeweils ein leichter Trend nach unten erkannt werden, v. a. bei der QC hoch Probe (vgl. Abbildung 30-B). Die ermittelten CVs waren aber dennoch $< 15\%$.

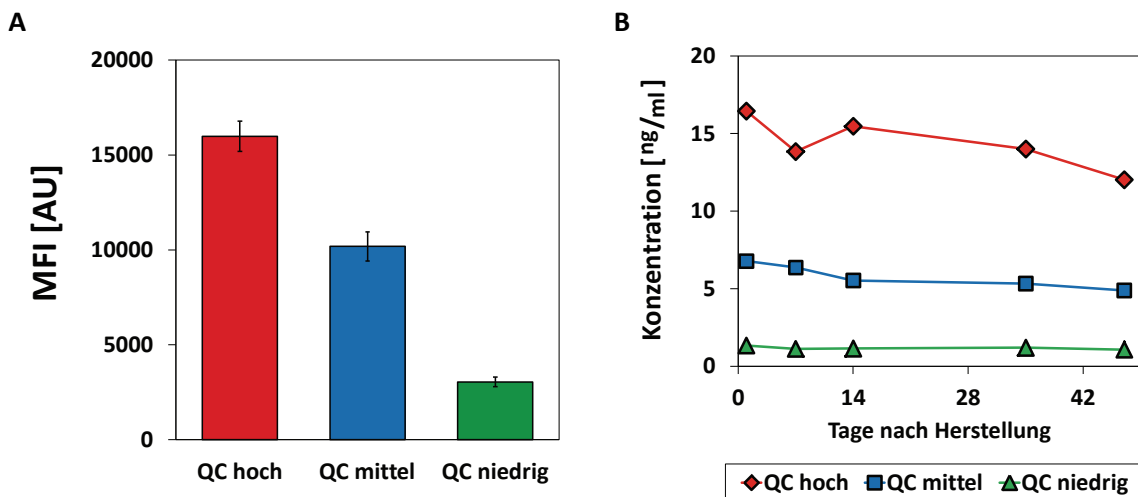


Abbildung 30: Langzeitstabilität der QC Proben. Vergleich der drei QC Proben an Tag 1, 7, 14, 35 und 47 nach der Herstellung. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung für die gemessenen MFI-Werte. (B) Verlauf der berechneten Konzentrationen.

4.1.6.2 Analyse der gemessenen IgG Konzentrationen

Mit dem entwickelten Q-IgG Assay wurde die IgG Konzentration von insgesamt 420 Proben bestimmt. Dabei handelte es sich um 116 Proben von gesunden Spendern, 164 Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion und 140 Proben von Patienten mit chronischer HCV Infektion. Für jede dieser drei Gruppen wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, das Minimum und das Maximum bestimmt (siehe Tabelle 28). Eine Veranschaulichung der Verteilung der IgG Konzentration innerhalb der gesunden Spender (HCV negativ) und der HCV Patienten (HCV positiv) ist in Abbildung 31-A dargestellt. Ein Vergleich der HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion ist in Abbildung 31-B gezeigt. Wie aus Tabelle 28 und Abbildung 31-A zu entnehmen, zeigten die gesunden Spender im Mittel eine um ca. 5 mg/ml niedrigere IgG Konzentration als die Proben von HCV positiven Patienten. Hierbei ergab sich ein p-Wert < 1E10-16. Zwischen den Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion konnte allerdings kein Unterschied in der mittleren IgG Konzentration sowie der Standardabweichung festgestellt werden (p-Wert = 0,864). Auch der Verteilungsbereich (Minimum bis Maximum) dieser beiden Gruppen war sehr ähnlich (vgl. Abbildung 31-B).

Tabelle 28: Ergebnisse der IgG Quantifizierung in 420 Proben. Die Bestimmung der IgG Konzentration wurde in 116 Proben von gesunden Spendern, 164 Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion und 140 Proben von Patienten mit chronischer HCV Infektion durchgeführt.

		IgG Konzentration [mg/ml]			
		Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
HCV Status	negativ	15,19	4,44	7,28	33,50
	akut	20,78	7,18	2,80	52,60
	chronisch	20,75	7,45	5,32	46,92

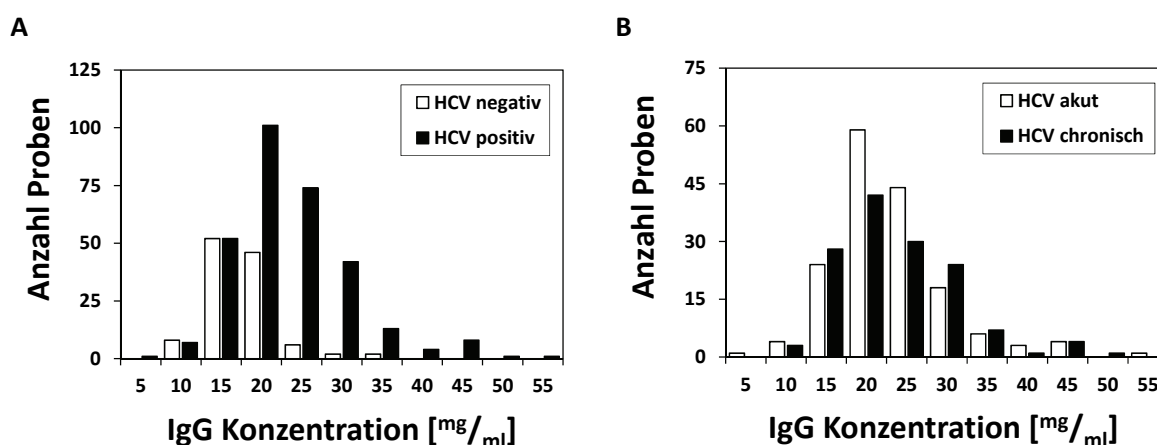


Abbildung 31: Verteilung der IgG Konzentration in gesunden Spendern und in Patienten mit HCV Infektion. (A) Vergleich von 116 Proben gesunder Spender (HCV negativ) und 304 Proben von HCV Patienten (HCV positiv). (B) Vergleich von 164 Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion (HCV akut) und 140 Proben von Patienten mit chronischer HCV Infektion (HCV chronisch).

Wie schon in 4.1.6.1d(5) erwähnt, wurde als Normalkonzentration von IgG im Serum von Erwachsenen 4,07 – 21,7 mg/ml angenommen [92, 95-98]. Im Folgenden wurde untersucht, wie viele Proben eine IgG Konzentration oberhalb von der IgG Normalkonzentration aufwiesen. Hierzu wurde einerseits die Anzahl der Proben mit einer IgG Konzentration zwischen 22 und 30 mg/ml bestimmt. Andererseits wurde die Anzahl der Proben mit einer IgG Konzentration höher als 30 mg/ml ermittelt. Der Grenzwert 30 mg/ml wird oft als Definition bei Vorliegen eines multiplen Myeloms verwendet [103], weshalb dieser Wert auch zur Untersuchung der IgG Konzentration dieser 420 Proben benutzt wurde. In Tabelle 29 ist die Anzahl der Proben mit einer erhöhten IgG Konzentration sowie deren prozentualer Anteil an der Gesamtprobenzahl der jeweiligen Gruppe dargestellt. Insgesamt zeigten nur 5,17 % der gesunden Spender eine IgG Konzentration über dem normalen Level, bei den HCV Patienten konnten jedoch bei 32,93 % bzw. 38,57 % der Proben eine erhöhte IgG Konzentration festgestellt werden.

Tabelle 29: Proben mit einem IgG-Gehalt höher als die Normalkonzentration. Die Bestimmung des IgG-Gehalts wurde in 116 Proben von gesunden Spendern, 164 Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion und 140 Proben von Patienten mit chronischer HCV Infektion durchgeführt.

		Anzahl Proben mit einer IgG Konzentration			
		> 22 mg/ml < 30 mg/ml	Anteil der Proben [%]	> 30 mg/ml	Anteil der Proben [%]
HCV Status	negativ	4	3,45	2	1,72
	akut	40	24,39	14	8,54
	chronisch	41	29,29	13	9,29

Wie in 4.1.3 beschrieben, wurde festgestellt, dass ein probenspezifisches Hintergrundsignal existiert, das sich in der Signalhöhe auf den Kontroll-Mikrosphären widerspiegelt. Als eine mögliche Ursache für dieses Hintergrundsignal wurde eine polyklonale Gammopathie, bzw. eine Hyper- γ -Globulinämie angenommen, weshalb die IgG Konzentration in den Proben bestimmt wurde. Um diesen vorstellbaren Zusammenhang zu überprüfen, wurde untersucht, ob eine lineare Korrelation zwischen der IgG Konzentration und der Reaktivität auf den Kontroll-Mikrosphären vorlag. Hierzu wurde jede Kontroll-Mikrosphäre einzeln betrachtet. In Abbildung 32 sind jeweils die Korrelationsgrafiken der ECL- und der GST-Mikrosphäre dargestellt. Wie in 4.1.3 gezeigt, bestand eine hohe Korrelation der BSA- und ECL-Mikrosphäre, weshalb auf die Darstellung der Korrelationsgrafik von der IgG Konzentration mit der BSA-Mikrosphäre verzichtet wurde. Wie in Abbildung 32 zu erkennen, bestand weder eine lineare Korrelation der IgG Konzentration mit der ECL-Mikrosphäre (Abbildung 32-A) noch mit der GST-Mikrosphäre (Abbildung 32-B).

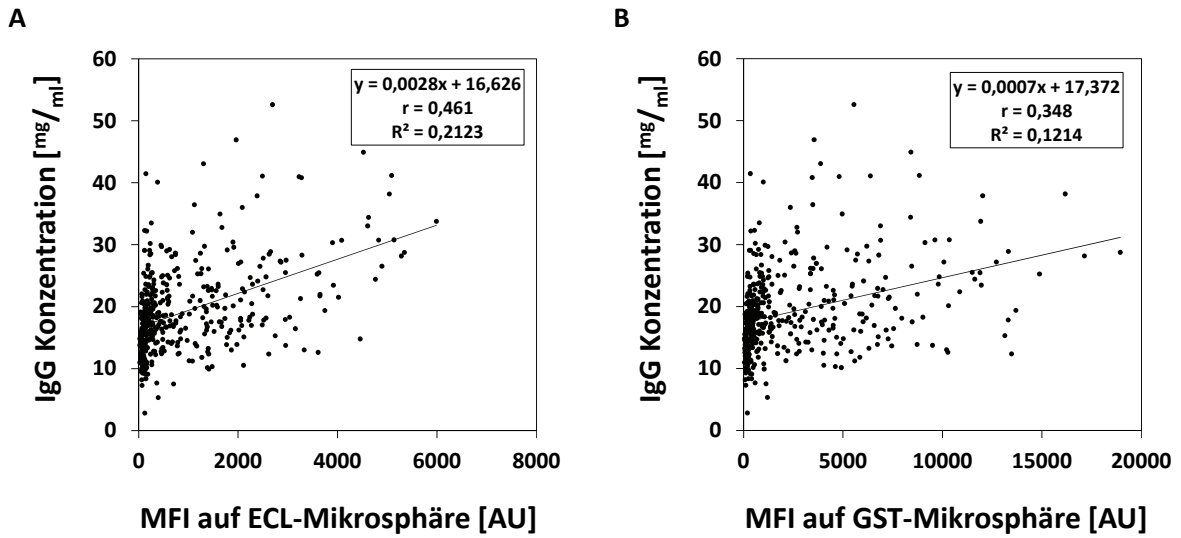


Abbildung 32: Korrelation der IgG Konzentration und der Reaktivität auf Kontroll-Mikrosphären. (A) Korrelation der ermittelten IgG Konzentration und der gemessenen MFI-Werte auf der ECL-Mikrosphäre. (B) Korrelation der ermittelten IgG Konzentration und der gemessenen MFI-Werte auf der GST-Mikrosphäre.

Insgesamt konnte die erhöhte IgG Konzentration in einigen Proben von HCV Patienten nicht das ursprüngliche, in Abbildung 21 dargestellte Problem erklären, dass auf den Kontroll-Mikrosphären eine Abhängigkeit der Signalhöhe vom Krankheitszustand zu bestehen scheint.

4.2 Diagnostische Relevanz der entwickelten serologischen HCV Assays

Häufig ist das Ziel eines serologischen Diagnostiktests die Unterscheidung von Proben in „negativ“ (gesunde Spender) und „positiv“ (kranke Spender). Bezogen auf die in dieser Arbeit entwickelten serologischen HCV Assays sollte der Test gesunde Spender und Patienten mit einer HCV Infektion unterscheiden können. Für die Beurteilung, wie gut ein Test für die Diagnose einer Krankheit geeignet ist, dienen die statistischen Gütekriterien Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert (*positive predictive value*) und negativer Vorhersagewert (*negative predictive value*). Dabei handelt es sich um verschiedene relative Häufigkeiten, die durch Messung einer gewissen Anzahl an Proben gesunder und kranker Spender berechnet werden können. Die Proben werden nach der Messung klassifiziert und anschließend entsprechend ihrer jeweiligen Klassifikation in einer Wahrheitsmatrix eingetragen als „richtig positiv“, „falsch negativ“, „falsch positiv“ und „richtig negativ“. Die Sensitivität gibt den Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Proben wieder, die Spezifität hingegen zeigt den Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Proben auf. Die Sensitivität ist somit die Fähigkeit des Tests tatsächlich Kranke als krank zu erkennen und die Spezifität gibt die Fähigkeit des Tests tatsächlich Gesunde als gesund zu identifizieren an. Der positive Vorhersagewert (PPV) wiederum spiegelt den Anteil der richtig als positiv erkannten Proben an der Gesamtheit der als positiv erkannten Proben wieder, während der negative Vorhersagewert (NPV) entsprechend den Anteil der richtig als negativ erkannten Proben an der Gesamtheit der als negativ erkannten Proben angibt.

Zur Berechnung dieser statistischen Gütekriterien müssen die Proben nach der Messung zunächst entsprechend klassifiziert werden. Diese Einstufung der Proben wurde mit dem Programm WEKA unter Verwendung des Random Forest Klassifikationsverfahrens mit 10-facher Kreuzvalidierung durchgeführt. Zunächst wurde ein initialer Probensatz von insgesamt 178 Proben mit dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay gemessen und anschließend klassifiziert. Bei den Proben handelte es sich um 61 Proben von gesunden Spendern, 84 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 33 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion. In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der Random Forest Klassifizierung mit dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay in einer Wahrheitsmatrix dargestellt. Die auf dieser Basis berechneten statistischen Gütekriterien sind in Tabelle 31 aufgezeigt. Um als mögliche Diagnostiktests zu dienen, wurde für diese Assays festgelegt, dass die Sensitivität einen Mindestwert von 95 % und die Spezifität einen Mindestwert von 90 % erzielen sollten. Die Mindestwerte wurden etwas niedriger angesetzt, da das Ergebnis der Klassifizierung mit dem klinischen HCV Status, der auf Nachweis der HCV RNA basiert, verglichen wurde. Wie aus Tabelle 30 und Tabelle 31 ersichtlich, konnte mit dem anti-HCV-IgG Assay eine bessere Klassifikation der Proben erreicht werden als mit dem anti-HCV-IgM Assay. Außerdem konnte der anti-

HCV-IgM Assay nicht die gesetzten Mindestwerte für die Sensitivität und Spezifität erzielen. Insgesamt konnten mit dem anti-HCV-IgG Assay 93,28 % der Proben korrekt klassifiziert werden, mit dem anti-HCV-IgM Assay jedoch nur 82,58 %.

Tabelle 30: Wahrheitsmatrix für die Messung von 178 Proben jeweils mit dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay nach Random Forest Klassifikationsverfahren. Von den n=178 Proben waren 61 Proben von gesunden Spendern, 84 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 33 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion.

		klassifiziert als			
		anti-HCV-IgG Assay		anti-HCV-IgM Assay	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	55	6	51	10
	<i>positiv</i>	5	112	21	96

Tabelle 31: Statistische Gütekriterien des anti-HCV-IgG Assays und des anti-HCV-IgM Assays nach Random Forest Klassifikationsverfahren. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 30 gezeigten Ergebnissen. PPV = positiver Vorhersagewert, NPV = negativer Vorhersagewert.

	anti-HCV-IgG Assay	anti-HCV-IgM Assay
Sensitivität [%]	95,73	82,05
Spezifität [%]	90,16	83,61
PPV [%]	94,67	90,57
NPV [%]	91,67	70,83

Zum besseren Verständnis, weshalb einige Proben negativer Spender als „positiv“ und einige Proben von HCV Patienten als „negativ“ klassifiziert wurden, erfolgte eine getrennte Betrachtung der HCV Patienten. In folgenden Klassifizierungen wurden zuerst nur die Patienten mit einer chronischen HCV Infektion und anschließend nur die Patienten mit einer akuten HCV Infektion jeweils mit den gesunden Spendern verglichen. In Tabelle 32 ist ein Vergleich der Wahrheitsmatrizes nach Random Forest Klassifizierung mit dem anti-HCV-IgG Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion dargestellt. Die entsprechend berechneten statistischen Gütekriterien sind in Tabelle 33 aufgezeigt. Hieraus wird deutlich, dass der anti-HCV-IgG Assay hervorragend geeignet ist, um gesunde Spender und HCV Patienten mit einer chronischen Infektion zu unterscheiden, denn keine Probe wurde falsch klassifiziert. Die statistischen Gütekriterien zeigen daher alle 100 % an. Bei den HCV Patienten mit einer akuten Infektion war eine perfekte Unterscheidung von den gesunden Spendern allerdings nicht möglich. Wie in 4.1.3 erwähnt, kann durch Festlegung eines Cut-Offs, das auf Basis der Messwerte von gesunden Spendern berechnet wird, eine Unterscheidung von Proben gesunder Spender oder infizierter Personen erfolgen. Durch Anpassung des Cut-Offs, kann

dieses so gewählt werden, dass prinzipiell keine Probe der gesunden Spender noch als „positiv“ klassifiziert wird, d. h. die Spezifität kann auf 100 % erhöht werden. Dies bedeutet jedoch einen Verlust der Sensitivität, in diesem Fall würden dann weniger Proben von HCV Patienten mit einer akuten Infektion als „positiv“ getestet werden. Gleiches gilt auch umgekehrt, d. h. bei Erhöhung der Sensitivität würde die Spezifität verringert werden. In der hier gezeigten Wahrheitsmatrix, die nach dem Random Forest Klassifikationsverfahren erstellt wurde, konnte bei Verwendung der Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion zwar eine Sensitivität von 95,24 % erreicht werden, allerdings erreichte die Spezifität nur 88,52 %. Insgesamt konnten dennoch 92,41 % der Proben richtig klassifiziert werden.

Tabelle 32: Vergleich der Wahrheitsmatrizes nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgG Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion. Insgesamt wurden n=178 Proben gemessen, dabei waren 61 Proben von gesunden Spendern, 84 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 33 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion.

		mit dem anti-HCV-IgG Assay klassifiziert als			
		Proben mit HCV Status chronisch		Proben mit HCV Status akut	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	61	0	54	7
	<i>positiv</i>	0	33	4	80

Tabelle 33: Vergleich der statistischen Gütekriterien nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgG Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 32 gezeigten Ergebnissen. PPV = positiver Vorhersagewert, NPV = negativer Vorhersagewert.

anti-HCV-IgG Assay	Verwendung der Proben mit HCV Status	
	chronisch	akut
Sensitivität [%]	100	95,24
Spezifität [%]	100	88,52
PPV [%]	100	91,95
NPV [%]	100	93,10

Dieselbe Untersuchung der Klassifizierung bei getrennter Betrachtung der HCV Patienten wurde auch für die Probenmessung mit dem anti-HCV-IgM Assay vorgenommen. In Tabelle 34 ist der Vergleich der Wahrheitsmatrizes nach Random Forest Klassifizierung dargestellt. Die entsprechend berechneten statistischen Gütekriterien sind in Tabelle 35 aufgezeigt. Aus Tabelle 34 und Tabelle 35 geht hervor, dass im Gegensatz zum anti-HCV-IgG Assay bei Betrachtung der Messwerte getrennt nach akutem oder chronischem HCV Status im anti-HCV-IgM Assay weder die Proben von den Patienten mit chronischer

HCV Infektion noch die Proben von den Patienten mit akuter HCV Infektion merklich besser klassifiziert werden konnten.

Tabelle 34: Vergleich der Wahrheitsmatrizes nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgM Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion. Insgesamt wurden n=178 Proben gemessen, dabei waren 61 Proben von gesunden Spendern, 84 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 33 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion.

		mit dem anti-HCV-IgM Assay klassifiziert als			
		Proben mit HCV Status chronisch		Proben mit HCV Status akut	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	56	5	49	12
	<i>positiv</i>	9	24	16	68

Tabelle 35: Vergleich der statistischen Gütekriterien nach Random Forest Klassifikationsverfahren mit dem anti-HCV-IgM Assay bei getrennter Betrachtung der Proben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 34 gezeigten Ergebnissen. PPV = positiver Vorhersagewert, NPV = negativer Vorhersagewert.

anti-HCV-IgM Assay	Verwendung der Proben mit HCV Status	
	chronisch	akut
Sensitivität [%]	72,73	80,95
Spezifität [%]	91,80	80,33
PPV [%]	82,76	85,00
NPV [%]	86,15	75,38

Da der anti-HCV-IgM Assay offensichtlich als einzelner Test nicht in der Lage ist ein ausreichend gutes Klassifizierungsergebnis zu liefern, wurde überprüft, ob die Kombination der Messdaten des anti-HCV-IgG Assays und des anti-HCV-IgM Assays eventuell eine Verbesserung bei der Klassifizierung der Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion erbringen kann. Auch hier wurden die Proben der HCV Patienten entsprechend dem HCV Status „akut“ oder „chronisch“ gemeinsam und getrennt betrachtet, jeweils im Vergleich mit den gesunden Spendern. In Tabelle 36 sind die entsprechenden Wahrheitsmatrizes und in Tabelle 37 die zugehörigen statistischen Gütekriterien dargestellt. Im Vergleich mit den Ergebnissen, die unter alleiniger Verwendung der Messdaten des anti-HCV-IgG Assays entstanden sind (vgl. Tabelle 30 – Tabelle 33), konnte zwar im Ergebnis bei gleichzeitiger Betrachtung der HCV Status akut und chronisch eine minimale Verbesserung der insgesamt korrekten klassifizierten Proben von 93,28 % auf 94,94 % festgestellt werden. Werden allerdings nur die Patienten mit chronischer HCV Infektion betrachtet, konnte eine Probe nicht richtig klassifiziert werden. Daher verschlechterte sich der prozentuale Anteil der richtig klassifizierten Proben von 100 % auf 98,94 %. Bei Begutachtung der

Proben mit akuter HCV Infektion wurde zwar eine Probe eines gesunden Spenders weniger als „positiv“ eingestuft, dafür wurde jedoch eine Probe eines HCV Patienten mehr als „negativ“ klassifiziert. Somit wurde die gleiche Anzahl an Proben wie bei alleiniger Verwendung der Messdaten des anti-HCV-IgG Assays richtig klassifiziert (92,41 %). Insgesamt konnte die Kombination der Messdaten des anti-HCV-IgG Assays und des anti-HCV-IgM Assays keine offensichtliche Verbesserung bei der Klassifizierung der Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion erbringen.

Tabelle 36: Wahrheitsmatrizes für die Messung von 178 Proben nach Random Forest Klassifikationsverfahren unter Verwendung kombinierter Messdaten aus dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay. Insgesamt wurden 61 Proben von gesunden Spendern, 84 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 33 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion gemessen.

		klassifiziert als					
		HCV Status akut + chronisch		HCV Status chronisch		HCV Status akut	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	57	4	61	0	55	6
	<i>positiv</i>	5	112	1	32	5	79

Tabelle 37: Statistische Gütekriterien nach Random Forest Klassifikationsverfahren unter Verwendung kombinierter Messdaten aus dem anti-HCV-IgG Assay und dem anti-HCV-IgM Assay. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 36 gezeigten Ergebnissen. Abkürzungen: PPV = positiver Vorhersagewert, NPV = negativer Vorhersagewert.

	Verwendung der Proben mit HCV Status		
	akut + chronisch	chronisch	akut
Sensitivität [%]	95,73	96,97	94,05
Spezifität [%]	93,44	100	90,16
PPV [%]	96,55	100	92,94
NPV [%]	91,94	98,39	91,67

Zusammenfassend konnte die Untersuchung der Messdaten von 178 Proben mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren zeigen, dass der anti-HCV-IgG Assay eine ausreichende diagnostische Sensitivität und Spezifität aufweist. Der anti-HCV-IgM Assay konnte jedoch die gesetzten Mindestwerte für die Sensitivität und Spezifität nicht erzielen, daher wurde auf eine weitere Verwendung des anti-HCV-IgM Assays zur Untersuchung eines größeren Probensatzes verzichtet.

Letztlich wurde ein größerer Probensatz mit dem anti-HCV-IgG Assay vermessen, sodass insgesamt 424 Proben mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren untersucht wurden. Bei den Proben handelte es sich um 117 Proben von gesunden Spendern, 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion

und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion. Die Wahrheitsmatrix dieser Untersuchung ist in Tabelle 38 dargestellt und die entsprechend berechneten statistischen Gütekriterien sind in Tabelle 39 aufgezeigt. Insgesamt wurden 96,93 % der Proben korrekt klassifiziert. Mit einer Sensitivität von 97,07 % und einer Spezifität von 96,58 % konnte die Messung des finalen Probensatzes sogar eine Verbesserung der statistischen Gütekriterien gegenüber dem initialen Probensatz erzielen.

Tabelle 38: Wahrheitsmatrix für die Messung von 424 Proben mit dem anti-HCV-IgG Assay nach Random Forest Klassifikationsverfahren. Insgesamt wurden 117 Proben von gesunden Spendern, 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion gemessen.

		klassifiziert als	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	113	4
	<i>positiv</i>	9	298

Tabelle 39: Statistische Gütekriterien für die Messung von 424 Proben mit dem anti-HCV-IgG Assays nach Random Forest Klassifikationsverfahren. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 38 dargestellten Ergebnissen.

statistisches Gütekriterium	relative Häufigkeit [%]
Sensitivität	97,07
Spezifität	96,58
positiver Vorhersagewert	98,68
negativer Vorhersagewert	92,62

4.3 Entwicklung eines Verfahrens zur Probenklassifizierung

Das Random Forest Klassifikationsverfahren, das mit der Software WEKA durchgeführt werden kann, ist eine gute Möglichkeit um festzustellen, ob ein entwickelter Test prinzipiell in der Lage ist, eine ausreichende diagnostische Sensitivität und Spezifität zu erfüllen. Allerdings kann hierbei nicht nachvollzogen werden, welche Probe wie klassifiziert wurde. Um dies zu ermöglichen, wurde ein Klassifikationsverfahren für den anti-HCV-IgG Assay entwickelt. Dazu wurden unterschiedliche Herangehensweisen und Analysen genutzt. Außerdem sollte nicht nur eine Klassifizierung in „negativ“ und „positiv“ (primäres Testresultat) stattfinden, sondern die als positiv getesteten Proben sollten des Weiteren entsprechend ihrem HCV Status in „akut“ oder „chronisch“ (sekundäres Testresultat) klassifiziert werden.

4.3.1 Bestimmung eines Cut-Offs

Wie schon in 4.1.3 und 4.2 erwähnt, kann auf Basis der Messwerte von gesunden Spendern eine Trenngrenze, auch Cut-Off genannt, festgelegt werden, die dazu dient, Proben gesunder Spender von Proben infizierter Personen zu unterscheiden. Im Falle eines multiplexen Assays ist es nicht unbedingt praktikabel, ein allgemeines Cut-Off für alle Antigene zu wählen. Daher wurde in dieser Bestimmung des Cut-Offs jedes Antigen isoliert betrachtet. Hierzu wurden die MFI-Werte von 117 Proben gesunder Spender untersucht. Basierend auf den korrigierten MFI-Werten, wie in 3.5.1 beschrieben, wurden zunächst Ausreißer mithilfe des Interquartilsabstands bestimmt und aus dem Datensatz entfernt. Verbliebene negative Werte wurden zur Bestimmung des Cut-Offs gleich 0 gesetzt. Anschließend wurden für jedes Antigen der Mittelwert und die Standardabweichung der Messwerte bestimmt. Das Cut-Off berechnete sich aus dem Mittelwert + 3x Standardabweichung. Die Anwendung des Cut-Offs auf den Probensatz erfolgte indem eine Division des Messwerts eines Antigens in einer Probe durch das Cut-Off dieses Antigens durchgeführt wurde. Die resultierenden Werte wurden als Signal-zu-Cut-Off-Werte (S/CO-Werte) bezeichnet. Bei einem S/CO-Wert < 1 besteht keine Reaktivität gegenüber diesem Antigen. In Tabelle 40 sind die ermittelten Cut-Offs für alle 27 HCV Antigene dargestellt. Im Mittel ergab sich für die 27 HCV Antigene ein Cut-Off von 452 +/- 534 MFI, wobei die Spannweite 13 MFI – 1631 MFI betrug. Die Spannweite verdeutlicht, dass ein allgemeines Cut-Off für alle Antigene nicht praktikabel wäre, denn entweder würde dies zu Einbußen in der analytischen Sensitivität mancher Antigene führen oder zu einer erhöhten Falsch-Positiv-Rate.

Tabelle 40: Cut-Offs der 27 HCV Antigene.

Antigen	Cut-Off [MFI]	Antigen	Cut-Off [MFI]	Antigen	Cut-Off [MFI]
Core_1 g4a	13	NS3_1 g1b	14	NS3 g2c	25
Core_2 g4a	20	NS4_1	28	NS3_3 g4a	1405
Core_3 g4a	23	NS5 g1	199	NS4_2	1129
NS3_1 g4a	442	HCV Mix	20	NS5 g1b	140
NS3_2 g4a	656	Core g1b	900	c22 g1a	399
NS5A g4a	52	NS3 g1a	56	5-1-1 g1a	1306
NS5B_1 g4a	1631	NS3_2 g1b	165	5-1-1 g4a	1258
NS5B_2 g4a	86	NS3_3 g1b	64	c100 g4a	751
NS5B_3 g4a	147	NS3 g1c	76	pNS4A g4a	1204

4.3.2 Reduktion des Antigensatzes

Im Hepatitis C Virus sind insgesamt zehn verschiedene Proteine enthalten, wovon sechs für die Entwicklung des anti-HCV-IgG Assays verwendet wurden. Von jedem dieser Proteine wurde eine andere Anzahl an Antigenen eingesetzt, die sich darin unterschieden welche Genotyp-spezifische Sequenz oder welcher Bereich einer Protein-Region genutzt wurde. Bei Betrachtung der S/CO-Werte wurde deutlich, dass nicht alle verwendeten Antigene einer Protein-Region dieselbe Reaktivität in Patientenproben zeigten. Für das Klassifikationsverfahren sollte daher die Anzahl der Antigene pro Protein-Region reduziert werden, wobei die Besten beibehalten werden sollten. Die besten Antigene sind in diesem Fall jene, die eine Unterscheidung von gesunden Spendern und HCV Patienten ermöglichen. Um die Leistung eines jeden HCV Antigens zu beurteilen, wurden verschiedene statistische Analysen durchgeführt.

4.3.2.1 *p*-Werte und Box-Whisker-Plots

Zunächst wurden *p*-Werte bestimmt, um zu überprüfen bei welchen Antigenen ein signifikanter Unterschied zwischen den S/CO-Werten der gesunden Spender und der HCV Patienten besteht. Die Gruppe der gesunden Spender bestand aus 117 Proben und die Gruppe der HCV Patienten aus 307 Proben. Zunächst wurde für jedes Antigen ein Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung einer Normalverteilung der S/CO-Werte innerhalb der beiden Gruppen durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,1$ verwendet. Da festgestellt wurde, dass keines der Antigene in keiner der beiden Gruppen eine Normalverteilung zeigte, wurde im Anschluss ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur Bestimmung von

p-Werten vorgenommen. In Tabelle 41 sind die p-Werte des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests für jedes Antigen dargestellt.

Tabelle 41: Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests. Die Gruppe der gesunden Spender bestand aus 117 Proben und die Gruppe der HCV Patienten aus 307 Proben.

Antigen	Quelle	p-Wert
Core_1 g4a		2,04E-36
Core_2 g4a		1,45E-45
Core_3 g4a		1,98E-46
NS3_1 g4a		1,45E-53
NS3_2 g4a	NMI	5,27E-45
NS5A g4a		2,25E-13
NS5B_1 g4a		5,17E-36
NS5B_2 g4a		2,40E-02
NS5B_3 g4a		1,41E-09
NS3_1 g1b		5,47E-39
NS4_1		3,40E-35
NS5 g1		7,35E-34
HCV Mix		4,08E-45
Core g1b		2,28E-54
NS3 g1a		8,38E-53
NS3_2 g1b	kommerziell	1,24E-46
NS3_3 g1b		9,63E-43
NS3 g1c		3,38E-44
NS3 g2c		1,14E-19
NS3_3 g4a		2,52E-33
NS4_2		2,77E-47
NS5 g1b		1,71E-32
c22 g1a		3,70E-48
5-1-1 g1a		4,92E-47
5-1-1 g4a	kundenspezifische Synthese für NMI	2,80E-48
c100 g4a		2,88E-39
pNS4A g4a		1,32E-34

Für das Signifikanzniveau der p-Werte wurde nach Bonferroni-Korrektur $\alpha = 0,00185$ verwendet. Bis auf den p-Wert von NS5B_2 g4a waren alle erhaltenen p-Werte kleiner als das gesetzte Signifikanzniveau. Dies bedeutet, dass bei diesen Antigenen ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Spendern und den HCV Patienten festgestellt werden konnte. Zur grafischen Veranschaulichung der Verteilung der S/CO-Werte in den beiden Gruppen wurden Box-Whisker-Plots erstellt. In Abbildung 33 sind vier beispielhafte Box-Whisker-Plots dargestellt. Hierbei handelt es sich um die beiden Antigene mit den niedrigsten p-Werten und um zwei Antigene mit sehr hohen p-Werten: Core g1b (Abbildung 33-A), NS3_1 g4a (Abbildung 33-B), NS5A g4a (Abbildung 33-C) und NS5B_2 g4a (Abbildung 33-D).

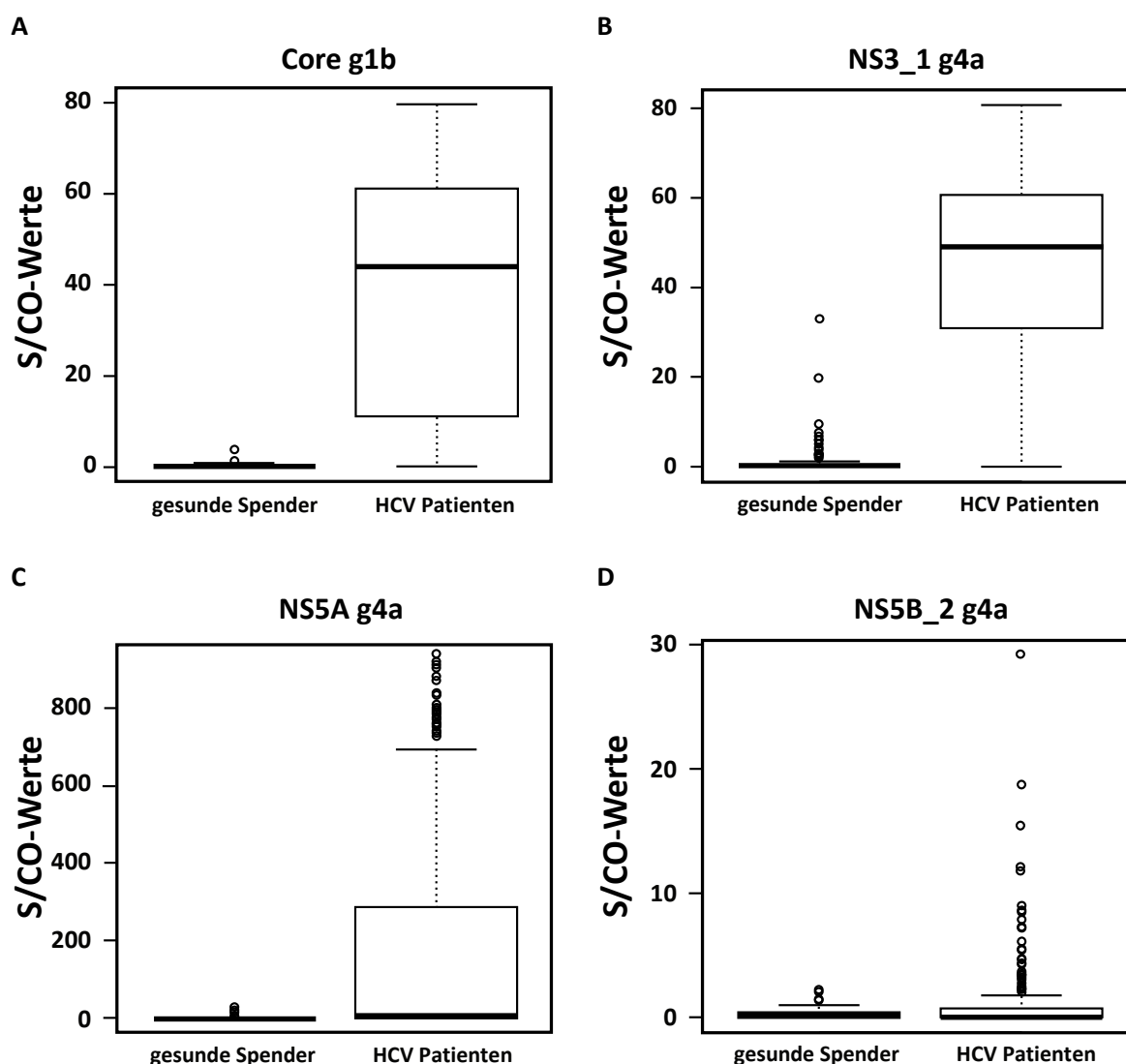


Abbildung 33: Box-Whisker-Plots der S/CO-Werte. Die Gruppe der gesunden Spender bestand aus 117 Proben und die Gruppe der HCV Patienten aus 307 Proben. (A) Antigen Core g1b mit einem p-Wert von $2,28E-54$. (B) Antigen NS3_1 g4a mit einem p-Wert von $1,45E-53$. (C) Antigen NS5A g4a mit einem p-Wert von $2,25E-13$. (D) Antigen NS5B_2 g4a mit einem p-Wert von $2,40E-02$.

Die Diagramme von Core g1b und NS3_1 g4a zeigen deutlich, dass diese Antigene gut geeignet sind, um gesunde Spender von HCV Patienten zu unterscheiden. Aus dem Diagramm von NS5B_2 g4a, das den höchsten p-Wert zeigte, lässt sich hingegen direkt erkennen, weshalb hier kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Spendern und den HCV Patienten festgestellt werden konnte.

4.3.2.2 ROC Kurven

ROC Kurven wurden zur grafischen Darstellung der Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) und der Falsch-Positiv-Rate (1 - Spezifität) für jedes Antigen erstellt. In Abbildung 34 sind vier beispielhafte ROC Kurven dargestellt. Hierbei handelt es sich um die beiden Antigene mit den höchsten AUC-Werten und um zwei Antigene mit sehr niedrigen AUC-Werten: Core g1b (Abbildung 34-A), NS3_1 g4a (Abbildung 34-B), NS5A g4a (Abbildung 34-C) und NS5B_2 g4a (Abbildung 34-D). Ebenso wie die Box-Whisker-Plots zeigen auch die ROC Kurven von Core g1b und NS3_1 g4a, dass diese Antigene gut geeignet sind, um gesunde Spender von HCV Patienten zu unterscheiden. Aus dem Diagramm für NS5B_2 g4a, das insgesamt den zweitniedrigsten AUC-Wert aufwies, lässt sich hingegen direkt erkennen, weshalb dieses Antigen nicht für eine Klassifizierung geeignet ist.

Die ermittelten AUC-Werte von allen Antigenen sind in Tabelle 42 dargestellt. Zusätzlich wurde die Sensitivität bei einer Spezifität von 90 % (SPIN) sowie die Spezifität bei einer Sensitivität von 95 % (SNOOUT) berechnet. Nur vier Antigene konnten sowohl eine Spezifität von mindestens 90 % als auch eine Sensitivität von mindestens 95 % erreichen. Dabei handelte es sich um NS3_1 g4a, Core g1b, NS3 g1a und c22 g1a.

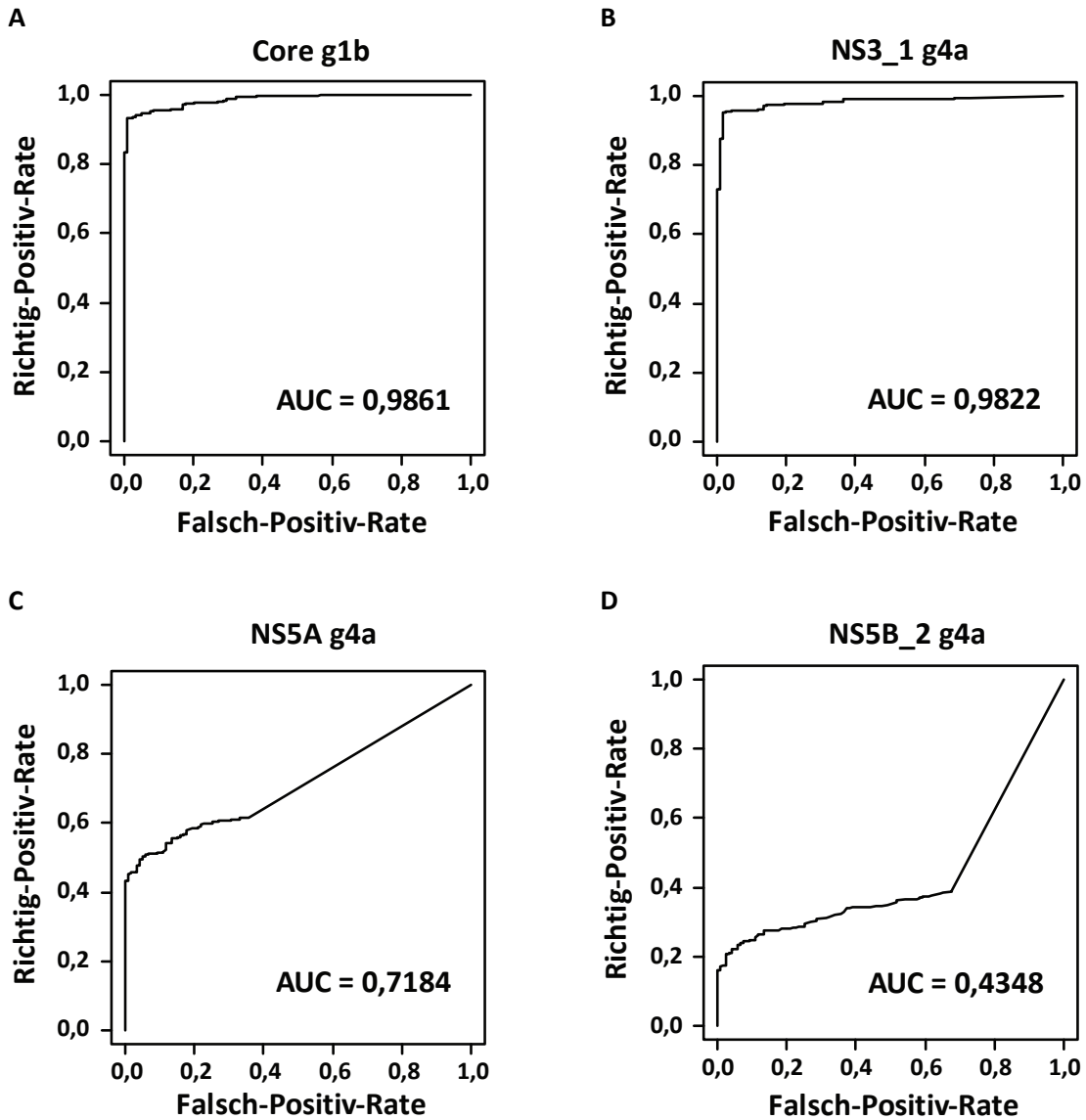


Abbildung 34: ROC Kurven der S/CO-Werte. Für die Erstellung der ROC Kurven wurden die S/CO-Werte von 424 Proben verwendet. Dabei handelte es sich um 117 Proben gesunder Spender und 307 Proben von HCV Patienten. (A) Antigen Core g1b. (B) Antigen NS3_1 g4a. (C) Antigen NS5A g4a. (D) Antigen NS5B_2 g4a.

Tabelle 42: Ergebnisse der ROC Kurven Analyse. AUC = Fläche unter der Kurve, SPIN = Sensitivität bei 90 % Spezifität, SNOOUT = Spezifität bei 95 % Sensitivität.

Antigen	Quelle	AUC	SPIN	SNOOUT
Core_1 g4a		0,882	0,000	0,792
Core_2 g4a		0,936	0,907	0,883
Core_3 g4a		0,939	0,915	0,886
NS3_1 g4a		0,982	0,983	0,958
NS3_2 g4a	NMI	0,941	0,864	0,704
NS5A g4a		0,718	0,000	0,495
NS5B_1 g4a		0,892	0,695	0,485
NS5B_2 g4a		0,435	0,000	0,222
NS5B_3 g4a		0,319	0,000	0,101
NS3_1 g1b		0,897	0,941	0,805
NS4_1		0,882	0,644	0,788
NS5 g1		0,879	0,398	0,570
HCV Mix		0,937	0,856	0,889
Core g1b		0,986	0,992	0,941
NS3 g1a		0,976	0,992	0,945
NS3_2 g1b	kommerziell	0,949	0,932	0,886
NS3_3 g1b		0,927	0,831	0,847
NS3 g1c		0,934	0,873	0,873
NS3 g2c		0,774	0,000	0,648
NS3_3 g4a		0,876	0,551	0,661
NS4_2		0,952	0,831	0,811
NS5 g1b		0,869	0,602	0,485
c22 g1a		0,957	0,975	0,909
5-1-1 g1a		0,951	0,848	0,818
5-1-1 g4a	kundenspezifische Synthese für NMI	0,957	0,898	0,824
c100 g4a		0,910	0,686	0,788
pNS4A g4a		0,884	0,602	0,694

4.3.2.3 Rangliste der HCV Antigene

Zur Übersicht und Auswahl der besten Antigene wurde eine Rangliste erstellt. Hierfür wurden die Daten der p-Werte und der AUC-Werte verwendet. Zusätzlich wurde auch mit dem Programm WEKA ein Ranking durchgeführt (InfoGainAttributeEval). Bei dieser Funktion wurden die Antigene (Attribute) nach ihrer Wertigkeit geordnet, wobei die Wertigkeit durch den Informationsgewinn (InfoGain) bestimmt wurde. Sowohl die Antigenliste der p-Werte als auch die Antigenliste der AUC-Werte wurde aufsteigend bzw. absteigend sortiert. Entsprechend der Position in der jeweils erhaltenen Liste wurde jedem Antigen ein Rang zugewiesen. Insgesamt wurden dadurch drei unterschiedliche Ranglisten erhalten: Rangliste der p-Werte, Rangliste der AUC-Werte und Rangliste der InfoGain-Werte. Diese drei Ranglisten wurden anschließend zu einer gemeinsamen Rangliste kombiniert. In Tabelle 43 ist diese finale Rangliste gemeinsam mit den entsprechenden p-Werten, AUC-Werten, InfoGain-Werten und dem jeweils zugehörigen Rang der Einzellisten dargestellt. Die Antigene auf den Rängen 1, 2 und 3 sind in allen Einzellisten und somit auch in der finalen Rangliste dieselben. Interessanterweise sind auf den Rängen 1 – 4 zwei Antigene der Core-Region und zwei Antigene der NS3-Region. Bei den Antigenen der NS3-Region handelt es sich jeweils um eine Sequenz des HCV Genotyp 4 und eine des HCV Genotyp 1.

Tabelle 43: Rangliste der HCV Antigene. Der Gesamtrang wurde durch Kombination der drei einzelnen Ranglisten ermittelt.

Antigen	finaler Rang	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test		ROC Kurven		WEKA InfoGainAttributeEval	
		p-Wert	Rang	AUC-Wert	Rang	InfoGain-Wert	Rang
Core g1b	1	2,28E-54	1	0,9861	1	0,677 +/- 0,012	1
NS3_1 g4a	2	1,45E-53	2	0,9822	2	0,658 +/- 0,022	2
NS3 g1a	3	8,38E-53	3	0,9759	3	0,65 +/- 0,009	3
c22 g1a	4	3,70E-48	5	0,9565	5	0,567 +/- 0,018	5
5-1-1 g4a	5	2,80E-48	4	0,9571	4	0,515 +/- 0,017	8
NS4_2	6	2,77E-47	6	0,9521	6	0,503 +/- 0,011	10
5-1-1 g1a	7	4,92E-47	7	0,9509	7	0,503 +/- 0,010	11
Core_3 g4a	8	1,98E-46	9	0,9394	10	0,558 +/- 0,013	6
NS3_2 g1b	9	1,24E-46	8	0,9487	8	0,513 +/- 0,016	9
HCV Mix	10	4,08E-45	11	0,9365	11	0,568 +/- 0,007	4
Core_2 g4a	11	1,45E-45	10	0,9357	12	0,554 +/- 0,012	7
NS3_2 g4a	12	5,27E-45	12	0,9407	9	0,467 +/- 0,025	14
NS3 g1c	13	3,38E-44	13	0,9344	13	0,493 +/- 0,012	12
NS3_3 g1b	14	9,63E-43	14	0,9270	14	0,468 +/- 0,013	13
NS3_1 g1b	15	5,47E-39	16	0,8965	16	0,441 +/- 0,007	15
c100 g4a	16	2,88E-39	15	0,9104	15	0,379 +/- 0,012	18
Core_1 g4a	17	2,04E-36	17	0,8824	19	0,441 +/- 0,012	16
NS5B_1 g4a	18	5,17E-36	18	0,8922	17	0,354 +/- 0,016	20
NS4_1	19	3,40E-35	19	0,8824	20	0,422 +/- 0,012	17
pNS4A g4a	20	1,32E-34	20	0,8841	18	0,359 +/- 0,039	21
NS5 g1	21	7,35E-34	21	0,8792	21	0,373 +/- 0,031	19
NS3_3 g4a	22	2,52E-33	22	0,8763	22	0,328 +/- 0,010	22
NS5 g1b	23	1,71E-32	23	0,8692	23	0,298 +/- 0,013	24
NS3 g2c	24	1,14E-19	24	0,7738	24	0,329 +/- 0,016	23
NS5A g4a	25	2,25E-13	25	0,7184	25	0,185 +/- 0,005	26
NS5B_3 g4a	26	1,41E-09	26	0,3194	27	0,254 +/- 0,021	25
NS5B_2 g4a	27	2,40E-02	27	0,4348	26	0,161 +/- 0,019	27

4.3.2.4 Top 12 HCV Antigene

Die insgesamt 27 HCV Antigene sollten auf 12 Antigene reduziert werden, wobei jeweils drei Antigene aus einer der vier Protein-Regionen (Core, NS3, NS4 und NS5) stammen sollten. Zur Auswahl dieser 12 Antigene wurde vor allem die Rangliste der Antigene genutzt, dabei wurden meistens die jeweiligen Antigene mit dem höchsten Rang gewählt. Allerdings wurde ebenso darauf geachtet, dass die HCV Protein-Regionen möglichst vielfältig abgedeckt wurden, d. h. dass sowohl die Sequenz von Genotyp 1 und 4 genutzt werden sollte als auch verschiedene Sequenzbereiche der jeweiligen Region. In Tabelle 44 sind die ausgewählten Top 12 HCV Antigene mit ihrem jeweiligen Rang und sortiert nach der Region dargestellt.

Tabelle 44: Top 12 HCV Antigene.

Region	HCV Antigen	Quelle	Rang
Core	Core g1b	kommerziell	1
	c22 g1a	kundenspezifische Synthese	4
	Core_3 g4a	NMI	8
NS3	NS3_1 g4a	NMI	2
	NS3 g1a	kommerziell	3
	NS3_2 g1b	kommerziell	9
NS4	5-1-1 g4a	kundenspezifische Synthese	5
	NS4_2	kommerziell	6
	c100 g4a	kundenspezifische Synthese	16
NS5	NS5B_1 g4a	NMI	18
	NS5 g1	kommerziell	21
	NS5A g4a	NMI	25

Zur Überprüfung, ob die Reduktion des Antigensatzes einen großen Einfluss auf das mögliche Klassifikationsergebnis hat, wurden erneut Analysen mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren in WEKA durchgeführt. Im Gegensatz zu der finalen Untersuchung in 4.2 wurden hierfür die S/CO-Werte genutzt, dennoch wurden dieselben 424 Proben verwendet. Bei den Proben handelte es sich um 117 Proben von gesunden Spendern, 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion. In Tabelle 45 ist die Wahrheitsmatrix von den S/CO-Werten der Top 12 HCV Antigene nach dem Random Forest Klassifikationsverfahren dargestellt. Bei Verwendung der Top 12 HCV Antigene ergab sich ein geringer Unterschied in der Spezifität, statt nur einer Probe, wie bei Verwendung aller 27 HCV Antigene, wurden nun drei gesunde Spender als positiv eingestuft. Die Sensitivität wurde nicht beeinflusst, in beiden Fällen wurden 12

Proben von HCV Patienten falsch-negativ klassifiziert. Insgesamt wurden bei Verwendung der Top 12 HCV Antigene 96,46 % der Proben korrekt klassifiziert.

Tabelle 45: Wahrheitsmatrix von den S/CO-Werten der Top 12 HCV Antigene nach Random Forest Klassifikationsverfahren. Insgesamt wurden die S/CO-Werte von 117 Proben von gesunden Spendern, 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

		klassifiziert als	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	114	3
	<i>positiv</i>	12	295

4.3.3 Klassifikationsverfahren für das primäre Testresultat

Wie in der Analyse der ROC Kurven festgestellt wurde und aus der Rangliste hervor ging, zeigten die Antigene NS3_1 g4a, Core g1b, NS3 g1a und c22 g1a die beste Leistung. Dies lässt vermuten, dass den Protein-Regionen Core und NS3 die größte Bedeutung in der Klassifizierung zuteilwird. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde erneut der Random Forest zur Klassifizierung verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass kein Unterschied auftrat bei Verwendung der sechs Antigene der Core- und NS3-Region aus den Top 12 HCV Antigenen (Tabelle 44) im Vergleich mit dem Klassifikationsergebnis bei Verwendung aller 12 Antigene (Tabelle 45). Für die Erarbeitung eines Klassifikationsverfahrens wurden daher nur diese sechs Core und NS3 Antigene (Top 6 HCV Antigene) genauer betrachtet. Zunächst wurde überprüft, welche Proben auf wie vielen Antigenen S/CO-Werte größer als 1 zeigten. In Tabelle 46 ist die Anzahl an Antigenen mit einem S/CO-Wert > 1 innerhalb der Gruppen der gesunden Spender (HCV Status negativ), der HCV Patienten mit einer akuten Infektion (HCV Status akut) und der HCV Patienten mit einer chronischen Infektion (HCV Status chronisch) gezeigt. Zur Veranschaulichung sind die Werte aus Tabelle 46 in einem Säulendiagramm in Abbildung 35 dargestellt. Hierbei fiel auf, dass bei allen chronischen HCV Patienten und den meisten akuten HCV Patienten mindestens drei der sechs Antigene einen S/CO-Wert > 1 aufwiesen. Allerdings zeigten 37 Proben der 117 gesunden Spender auf ein oder zwei Antigenen auch S/CO-Werte > 1. In zwei Fällen wurden sogar ebenfalls drei Antigene mit einem S/CO-Wert > 1 erhalten. Insgesamt erwies sich die Gruppe der HCV Patienten mit einer akuten Infektion als heterogen, denn jede Anzahl (von 0 bis 6) an Antigenen mit einem S/CO-Wert > 1 konnte mindestens drei Mal erhalten werden. Aus dieser Betrachtung konnte letztlich geschlossen werden, dass bei Vorliegen von mindestens vier Antigenen mit einem S/CO-Wert > 1 das Ergebnis einer Probenklassifikation „positiv“ lauten muss. Haben zwei oder weniger Antigene einen S/CO-Wert > 1 ist das Klassifikationsergebnis „negativ“. Zeigen allerdings drei Antigene

einen S/CO-Wert > 1 könnte das Ergebnis „positiv“ oder „negativ“ sein. Antigene mit einem S/CO-Wert > 1 werden im Folgenden auch als reaktive Antigene bezeichnet. Zur genaueren Untersuchung der Proben mit genau drei reaktiven Antigenen, wurde ein Übungsprobensatz verwendet. Dieser Übungsprobensatz bestand aus insgesamt 225 Proben, davon 78 Proben gesunder Spender, 84 Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion und 63 Proben von HCV Patienten mit chronischer Infektion. Die Gruppe der gesunden Spender enthielt auch die beiden Proben, die jeweils drei reaktive Antigene zeigten. Anhand dieses Übungsprobensatzes wurden zwei unabhängige Klassifizierungen durchgeführt. Einerseits wurde die Regel, dass für eine positive Klassifikation mindestens vier Antigene einen S/CO-Wert > 1 aufweisen müssen, angewendet. Andererseits fand die Regel, dass für eine negative Klassifikation maximal zwei Antigene einen S/CO-Wert > 1 aufweisen dürfen, Anwendung. Im ersten Fall konnte zwar eine Spezifität von 100 % erreicht werden, allerdings war die Sensitivität von 89,12 % nicht zufriedenstellend. Insgesamt wurden 92,89 % der Proben korrekt klassifiziert. Im zweiten Fall konnte die Sensitivität zwar auf 93,2 % erhöht werden, allerdings verringerte sich auch die Spezifität auf 97,44 %. Insgesamt wurden 94,67 % der Proben korrekt klassifiziert.

Tabelle 46: Anzahl an Antigenen mit einem S/CO > 1. Insgesamt wurden die S/CO-Werte von 117 Proben von gesunden Spendern (HCV Status negativ), 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV Status akut) und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion (HCV Status chronisch) verwendet.

		Anzahl an Antigenen mit einem S/CO-Wert > 1						
		0	1	2	3	4	5	6
HCV Status	negativ	78	25	12	2	0	0	0
	akut	3	4	3	6	8	22	120
	chronisch	0	0	0	1	4	4	132

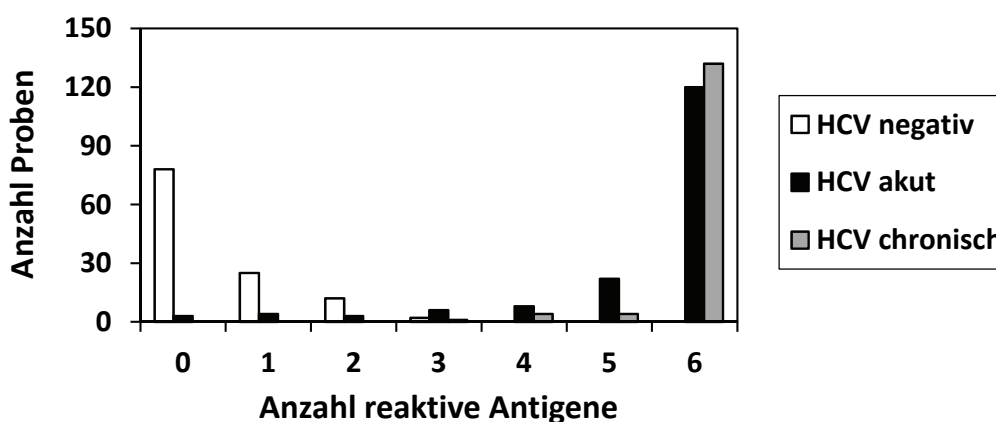


Abbildung 35: Veranschaulichung der Werte aus Tabelle 46.

Wie aus Tabelle 46 und Abbildung 35 zu entnehmen, stellten die HCV Patienten mit einer chronischen Infektion prinzipiell kein Problem bei der Klassifikation dar. Allerdings schwimmt die Grenze zwischen gesunden Spendern und HCV Patienten mit einer akuten Infektion. Um diesen Unterschied zwischen HCV Status negativ und HCV Status positiv genauer herauszuarbeiten, wurden die Proben gesunder Spender, die ein oder mehr reaktive Antigene zeigten, erneut betrachtet. Hierbei fiel auf, dass die NS3 Antigene durchaus häufiger einen S/CO-Wert > 1 aufwiesen als die Core Antigene. Außerdem zeigten interessanterweise einige HCV Patienten mit einer chronischen Infektion z. T. keine oder sehr geringe Reaktivität gegenüber den Core Antigenen, aber hohe Reaktivität auf den NS3 Antigenen. Hieraus wurde gefolgert, dass die genauere Definition der Grenze zwischen gesunden und kranken Personen nur über die NS3 Antigene möglich sei. Um diese NS3-Grenze aus dem Übungsprobensatz zu bestimmen, wurden die Proben der gesunden Spender, die ein oder mehr reaktive Antigene zeigten, herausgesucht und die Summe der S/CO-Werte der reaktiven NS3 Antigene gebildet (NS3-Summensignal). Von diesen 19 identifizierten Proben wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von den NS3-Summensignalen berechnet. Die NS3-Grenze wurde folgendermaßen definiert: Mittelwert + $1x$ Standardabweichung. Dabei ergab sich ein Wert von 12,5 für das NS3-Summensignal. Diese NS3-Grenze sollte wiederum nur bei Proben mit genau drei reaktiven Antigenen angewendet werden. Der Übungsprobensatz wurde erneut mit folgenden Klassifikationsregeln untersucht:

- (1) Bei vier oder mehr reaktiven Top 6 HCV Antigenen ist eine Probe „positiv“.*
- (2) Bei genau drei reaktiven Top 6 HCV Antigenen und einem NS3-Summensignal von mindestens 12,5 ist eine Probe „positiv“.*
- (3) Trifft weder Regel (1) noch Regel (2) zu, ist eine Probe „negativ“.*

Durch die Anwendung dieser Klassifikationsregeln erreichte die Spezifität 100 %, die Sensitivität lag bei 92,52 % und insgesamt konnten 95,11 % der Proben korrekt klassifiziert werden. Mit diesem Klassifikationsverfahren bestehend aus den obenstehenden drei Regeln konnte somit das beste Gesamtergebnis im Übungsprobensatz erzielt werden. Daher wurde dieses Klassifikationsverfahren anschließend auf den vollständigen Probensatz, der aus 424 Proben bestand, angewendet. Daraus ergaben sich das in Tabelle 47 dargestellte Klassifikationsergebnis und die entsprechenden statistischen Gütekriterien in Tabelle 48. Dieses entwickelte Klassifikationsverfahren für das primäre Testresultat konnte sogar ein besseres Ergebnis erzielen als das Random Forest Klassifikationsverfahren (vgl. Tabelle 45). Insgesamt konnten 97,41 % der Proben korrekt klassifiziert werden, die Spezifität betrug 100 % und die Sensitivität 96,42 %.

Tabelle 47: Wahrheitsmatrix des primären Testresultats. Insgesamt wurden die S/CO-Werte der Top 6 HCV Antigene von 117 Proben gesunder Spender, 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

		klassifiziert als	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	117	0
	<i>positiv</i>	11	296

Tabelle 48: Statistische Gütekriterien des primären Testresultats. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 47 dargestellten Ergebnissen.

statistisches Gütekriterium	relative Häufigkeit [%]
Sensitivität	96,42
Spezifität	100
positiver Vorhersagewert	100
negativer Vorhersagewert	91,41

4.3.4 Klassifikationsverfahren für das sekundäre Testresultat

Um einen Überblick zu bekommen, wie gut sich die HCV positiven Patienten in „akut“ und „chronisch“ unterscheiden lassen, wurde zunächst das Random Forest Klassifizierungsverfahren angewendet. Bei Verwendung der HCV Proben des Übungsprobensatzes mit einem positiven primären Testresultat und der Top 12 HCV Antigene konnten 78,68 % der Proben korrekt klassifiziert werden. Zum Vergleich wurde dieselbe Untersuchung mit den Top 6 HCV Antigenen durchgeführt. Hierbei konnte kein Unterschied im Klassifikationsergebnis beobachtet werden. Insgesamt lag die Möglichkeit, die HCV positiven Patienten anhand der Top 6 HCV Antigene in „akut“ und „chronisch“ zu unterscheiden also bei ca. 80 %. Hieran zeigte sich, dass auch der Übergang von HCV Status akut nach HCV Status chronisch nicht eindeutig ersichtlich ist, ähnlich wie bei den HCV negativen Spendern und den HCV Patienten mit akuter Infektion. Um dennoch eine Grenze zwischen „akut“ und „chronisch“ zu definieren (AC-Grenze), wurde ein gleichartiges Verfahren wie bei der NS3-Grenze zwischen „negativ“ und „positiv“ angewendet. Hierzu wurde der Übungsprobensatz verwendet und sowohl von der Gruppe mit dem HCV Status akut als auch von der Gruppe mit dem HCV Status chronisch jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Summensignals aller Top 6 HCV Antigene (Top 6-Summsignal) berechnet. Bei der Gruppe mit HCV Status akut wurde zum Mittelwert die Standardabweichung hinzu addiert (MSa-Wert), bei der Gruppe mit HCV Status chronisch wurde die Standardabweichung vom Mittelwert subtrahiert (MSs-Wert). Diese beiden resultierenden Werte waren sich sehr ähnlich, daher wurde aus

dem MSa-Wert und dem MSs-Wert der Mittelwert gebildet. Daraus ergab sich der Wert 1527, dieser wurde als AC-Grenze gesetzt. Diese Grenze wurde anschließend auf die HCV Proben des Übungsprobensatzes mit einem positiven primären Testresultat angewendet. Hierbei konnten 80,19 % der Proben korrekt klassifiziert werden. Dieser Wert stimmt gut überein mit der Klassifizierung, die mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren erhalten wurde.

Gemeinsam mit anderen klinischen Markern, wie z. B. der ALT-Aktivität, könnte allerdings eine bessere Einstufung des HCV Status möglich sein. Als Definition einer akuten Hepatitis wird oft eine zehnfache Erhöhung der ALT-Aktivität im Serum gegenüber der ULN verwendet. Um zu vergleichen, ob eine Kombination aus der Klassifizierung durch die AC-Grenze und der ALT-Aktivität eine Verbesserung des Klassifikationsergebnisses ermöglicht, wurde zunächst die alleinige Klassifikation mittels ALT-Aktivität untersucht. Für alle HCV Patienten mit akuter Infektion standen ALT-Aktivitätswerte zur Verfügung, bei den HCV Patienten mit chronischer Infektion jedoch nur von 33 Proben. Als ULN wurde hier 50 IU/L verwendet. Insgesamt konnten durch die Grenze „ALT-Aktivität größer als $10 \times \text{ULN}$ “ zwar alle Patienten mit HCV Status chronisch korrekt klassifiziert werden, bei den HCV Patienten mit akuter Infektion konnten allerdings nur 57 der 155 Proben (36,77 %) richtig klassifiziert werden. Zur Untersuchung der Kombination aus der Klassifizierung durch die AC-Grenze und der ALT-Aktivität wurden auf die HCV Proben des Übungsprobensatzes mit dem primären Testresultat „positiv“ folgende Regeln angewendet:

- (1) Bei einem Top 6-Summsignal < 1527 ist eine Probe „akut“.
- (2) Bei einem Top 6-Summsignal > 1527 und ALT-Aktivität $> 500 \text{ IU/L}$ ist eine Probe „akut“.
- (3) Bei einem Top 6-Summsignal > 1527 und ALT-Aktivität $< 500 \text{ IU/L}$ ist eine Probe „chronisch“.

Durch die Anwendung dieser Regeln konnten 89,71 % Proben richtig klassifiziert werden. Die Kombination aus AC-Grenze und ALT-Aktivität zeigt gegenüber beiden einzelnen Klassifikationsverfahren ein besseres Ergebnis. Daher wurde dieses Klassifikationsverfahren anschließend auf alle Proben des vollständigen Probensatzes mit einem positiven primären Testresultat angewendet. In Abbildung 36 ist zur Veranschaulichung die Verteilung des Top 6-Summsignals dargestellt. Insgesamt wurden 296 Proben untersucht, davon waren 155 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit chronischer HCV Infektion. Das Auftreten von Symptomen einer HCV Infektion lag bei den verwendeten Proben im Mittel $1,8 \pm 2,17$ Monate (0,1 – 8,75 Monate) zurück. Für die Patienten mit HCV Status chronisch und ohne Angabe der ALT-Aktivität wurden Werte $< 10 \times \text{ULN}$ angenommen [28]. In Tabelle 49 ist das Klassifikationsergebnis als Wahrheitsmatrix dargestellt. Insgesamt konnten 85,14 % der Proben ihrem HCV Status entsprechend richtig klassifiziert

werden, bzw. 83,87 % der Patienten mit HCV Status akut und 86,52 % der Patienten mit HCV Status chronisch.

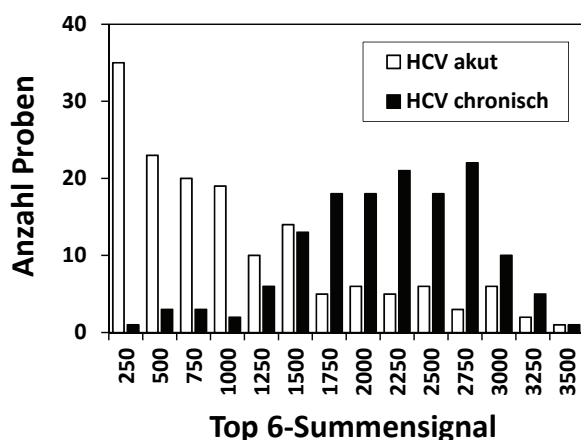


Abbildung 36: Verteilung des Top 6-Summsignals im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion. Für das Histogramm wurden jeweils 155 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut) und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion (HCV chronisch) verwendet.

Tabelle 49: Wahrheitsmatrix des sekundären Testresultats. Insgesamt wurden die Top 6-Summsignale und die ALT-Aktivität von 155 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

		klassifiziert als	
		<i>akut</i>	<i>chronisch</i>
HCV Status	<i>akut</i>	130	25
	<i>chronisch</i>	19	122

Bei der Verwendung einer anderen Herstellungscharge des HCV-Microarrays wurde festgestellt, dass ein anderer Wert für die AC-Grenze erhalten wird. Um als möglicher Diagnostiktest zu dienen, sollte die AC-Grenze einer neuen Herstellungscharge allerdings nicht erst nach der Messung eines großen Probensatzes bestimmt werden können. Zur Lösung dieses Problems wurde eine Methode, die sogenannte Grenzproben benutzt, angewendet. Der Mittelwert des Top 6-Summsignals von 15 Proben, die im Bereich der AC-Grenze +/- 2x Standardabweichung lagen (Grenzproben), wurde als AC-Grenze in der neuen Herstellungscharge des HCV-Microarrays gesetzt. Bei den 15 Proben handelte es sich um sechs Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion, fünf Proben von Patienten mit chronischer HCV g4 Infektion und vier Proben von Patienten mit chronischer HCV g1 Infektion. Die mit dieser Grenzproben-Methode errechnete AC-Grenze zeigte lediglich eine Abweichung um 4,63 % von der ursprünglich ermittelten AC-Grenze. Auch das resultierende Klassifikationsergebnis wich nur minimal von dem vorherigen Ergebnis ab: statt 85,14 % wurden 84,46 % der Proben ihrem HCV Status entsprechend richtig klassifiziert.

4.4 Referenzmessung mit kommerziell erhältlichen Diagnostiktests

Der entwickelte, multiplexe anti-HCV-IgG Assay wurde mit zwei unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen Diagnostiktests verglichen. Als Vergleichstests dienten ein Enzymimmunoassay (INNO-TEST HCV Ab IV) und ein Line-Immunoassay (INNO-LIA™ HCV Score). Beide Tests wurden von der WHO evaluiert [104]. Zum Vergleich wurde das Ergebnis des entwickelten Klassifikationsverfahrens für das primäre Testresultat (siehe 4.3.3) verwendet.

4.4.1 INNOTEST HCV Ab IV

Zum Vergleich des anti-HCV-IgG Assays mit einem kommerziell erhältlichen EIA (INNOTEST HCV Ab IV) wurden 368 humane Serum- oder Plasmaproben mit beiden Assays vermessen (3.3.3 und 3.4.1). Als statistische Gütekriterien des INNOTEST HCV Ab IV wird vom Hersteller für die Spezifität 99,80 % angegeben und für die Sensitivität 100 %. Diese Werte wurden durch einen Vergleich mit einem Referenztest, der ebenfalls auf dem Nachweis von anti-HCV Antikörper basiert, ermittelt.

Bei den 368 Proben handelte es sich um 116 Proben von gesunden Spendern, 118 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 134 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion. Der klinische Status der Proben wurde mittels PCR bestimmt. Für einen Vergleich der Probenklassifizierung wurden die Proben der gesunden Spender als „negativ“ bezeichnet und die Proben der insgesamt 252 HCV Patienten als „positiv“. In Tabelle 50 sind die Klassifizierungsergebnisse des INNOTEST HCV Ab IV und des anti-HCV-IgG Assays dargestellt. Die statistischen Gütekriterien Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert und negativer Vorhersagewert sind in Tabelle 51 aufgezeigt. Mit beiden Tests konnte eine Spezifität von 100 % erzielt werden, d. h. keine HCV negative Probe wurde als positiv klassifiziert. Auch bei der Sensitivität konnten die Tests vergleichbare Ergebnisse erzielen (95,24 % und 96,43 %), allerdings konnten bei beiden Tests nicht alle HCV Patienten als positiv identifiziert werden. Acht HCV Patientenproben wurden mit keinem der beiden Tests als positiv erkannt, vier wurden nur mit dem anti-HCV-IgG Assay erkannt und eine nur mit dem INNOTEST HCV Ab IV. Bei diesen Proben handelte es sich ausschließlich um Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion. Die Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion konnten beide Tests problemlos als positiv identifizieren.

Basierend auf dem Klassifikationsergebnis des INNOTEST HCV Ab IV, würde die Sensitivität des anti-HCV-IgG Assays bei 99,59 % liegen. Wie allerdings der Vergleich mit dem klinischen HCV Status zeigte, konnten mit dem anti-HCV-IgG Assay drei Proben mit HCV Status akut mehr als mit dem INNOTEST HCV Ab IV korrekt klassifiziert werden.

Tabelle 50: Vergleich der Klassifizierung von Proben mit dem INNOTEST HCV Ab IV und dem anti-HCV-IgG Assay. Insgesamt wurden n=367 Proben mit beiden Tests vermessen, davon waren 115 Proben HCV negativ und 252 Proben HCV positiv.

		klassifiziert als			
		INNOTEST HCV Ab IV		anti-HCV-IgG Assay	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
HCV Status	<i>negativ</i>	116	0	116	0
	<i>positiv</i>	12	240	9	243

Tabelle 51: Statistische Gütekriterien des INNOTEST HCV Ab IV und des anti-HCV-IgG Assays. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 50 gezeigten Ergebnissen. PPV = positiver Vorhersagewert, NPV = negativer Vorhersagewert.

	INNOTEST HCV Ab IV	anti-HCV-IgG Assay
Sensitivität [%]	95,24	96,43
Spezifität [%]	100	100
PPV [%]	100	100
NPV [%]	90,63	92,80

4.4.2 INNO-LIA™ HCV Score

Zum Vergleich des anti-HCV-IgG Assays mit einem kommerziell erhältlichen Line-Immunoassay (LIA) wurde der INNO-LIA™ HCV Score verwendet (3.4.2). Als statistische Gütekriterien des Tests wird vom Hersteller für die Sensitivität 100 % und für die Spezifität im Mittel 93,28 % angegeben. Die Sensitivität wurde durch einen Vergleich mit dem nicht mehr erhältlichen Referenztest Chiron RIBA HCV 3.0 SIA ermittelt. Die Spezifität wurde bestimmt, indem das Ergebnis der Messung von Blutspenderproben, klinischen Proben und Proben mit potentiell zu erwartenden Wechselwirkungen verglichen wurde mit dem Ergebnis bei Messung derselben Proben mit dem Ortho HCV 3.0 ELISA mit Enhanced SAve, dem INNOTEST HCV Ab IV und Chiron RIBA HCV 3.0 SIA.

Aufgrund des niedrigen Durchsatzes und der hohen Kosten für den INNO-LIA™ HCV Score wurden insgesamt nur 37 humane Serum- oder Plasmaproben zum Vergleich mit dem anti-HCV-IgG Assay vermessen. Dabei wurden 5 Proben von gesunden Spendern, 22 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 10 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion untersucht (vgl. Anhang Abbildung 56 und Tabelle 74). Der klinische Status der Proben wurde mittels PCR bestimmt. Für einen Vergleich der Probenklassifizierung wurden die Proben der gesunden Spender als „negativ“ bezeichnet und die Proben der insgesamt 32 HCV Patienten als „positiv“. In Tabelle 52 sind die Klassifizierungsergebnisse des INNO-LIA™ HCV Score und des anti-HCV-IgG Assays dargestellt. Die statistischen Gütekriterien Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert und negativer Vorhersagewert sind in

Tabelle 53 aufgezeigt. Allerdings waren die Gruppengrößen bei diesem Vergleich viel zu gering, als dass diese Werte als statistisch korrekt angenommen werden dürften. Dennoch können sie gewisse Tendenzen aufzeigen. Mit beiden Tests konnte eine sehr hohe Spezifität erzielt werden, jeweils 100 %, d. h. keine HCV negative Probe wurde als positiv klassifiziert. Da beim INNO-LIA™ HCV Score Proben allerdings auch als „fraglich“ eingestuft werden können, ist ein direkter Vergleich der Sensitivität nicht möglich. Würden die „fraglichen“ Proben als „negativ“ gewertet werden, dann könnte der INNO-LIA™ HCV Score hier nur eine Sensitivität von 84,38 % erzielen. Würden die „fraglichen“ Proben allerdings als „positiv“ gewertet werden, hätten beide Tests eine Sensitivität von 93,75 %. Zwei HCV Patientenproben wurden mit keinem der beiden Tests als positiv erkannt. Bei diesen Proben handelte es sich um Proben von Patienten mit einer sehr akuten HCV Infektion, die mit dem INNOTEST HCV Ab IV ebenfalls nicht als „positiv“ erkannt werden konnten. Bei den „fraglichen“ Proben im INNO-LIA™ HCV Score handelte es sich um die drei Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion, die ebenfalls mit dem INNOTEST HCV Ab IV nicht als „positiv“ erkannt werden konnten, allerdings mit dem anti-HCV-IgG Assay. Die Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion konnten beide Tests problemlos als positiv identifizieren.

Tabelle 52: Vergleich der Klassifizierung von Proben mit dem INNO-LIA™ HCV Score und dem anti-HCV-IgG Assay. Insgesamt wurden n=37 Proben mit beiden Tests vermessen, davon waren 5 Proben HCV negativ und 32 Proben HCV positiv.

		klassifiziert als			
		INNO-LIA™ HCV Score		anti-HCV-IgG Assay	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
klinischer Status	<i>negativ</i>	5	0	5	0
	<i>positiv</i>	5 / 2	27 / 30	2	30

Tabelle 53: Statistische Gütekriterien des INNO-LIA™ HCV Score und des anti-HCV-IgG Assays. Die Berechnungen beruhen auf den in Tabelle 52 gezeigten Ergebnissen. PPV = positiver Vorhersagewert, NPV = negativer Vorhersagewert.

	INNO-LIA™ HCV Score	anti-HCV-IgG Assay
Sensitivität [%]	84,38 / 93,75	93,75
Spezifität [%]	100	100
PPV [%]	100	100
NPV [%]	50,00 / 71,43	71,43

Da es sich bei dem INNO-LIA™ HCV Score um einen Line-Immunoassay handelt, der die Reaktivitäten gegenüber den HCV Antigenen innerhalb einer Probe getrennt begutachten kann, konnte v. a. auf dieser Ebene ein Vergleich mit anti-HCV-IgG Assay stattfinden. Hierzu musste allerdings für den anti-

HCV-IgG Assay ein ähnliches Auswertungsschema wie für den INNO-LIA™ HCV Score erarbeitet werden. Ausgehend von der Messung des vollständigen Probensatzes, der aus 424 Proben bestand, wurde für jedes Antigen der Top 12 HCV Antigene jeweils der maximale S/CO-Wert bestimmt. Mithilfe von diesem maximalen S/CO-Wert wurden fünf Levels definiert, die ein Maß für die Reaktivität darstellen sollen. Je höher das Level, desto stärker die Reaktivität. Ähnlich wie bei der Cut-Off Bestimmung wären fünf allgemeine Levels für alle Antigene nicht sinnvoll. Die berechneten Level 1 bis Level 4 sind in Tabelle 54 dargestellt. Alle Werte, die größer als Level 4 waren, wurden als Level 5 bezeichnet. In jeder Probe konnte nun die Reaktivität auf den Antigenen in Form eines Levels angegeben werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen wurden die Bezeichnungen für die Bewertungen im INNO-LIA™ HCV Score und im anti-HCV-IgG Assay ersetzt durch numerische Werte (siehe Tabelle 55). Im anti-HCV-IgG Assay wurden für jede Protein-Region die numerischen Werte der Antigenreaktivitäten (siehe Anhang Tabelle 75) zunächst addiert und anschließend durch 3 dividiert.

Tabelle 54: Level für Bewertung der Antigenreaktivitäten im anti-HCV-IgG Assay.

	maximaler S/CO-Wert	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
		<i>1 bis ...</i>	<i>Ende Level 1 bis ...</i>	<i>Ende Level 2 bis ...</i>	<i>Ende Level 3 bis ...</i>
Core_3 g4a	2018	404	807	1211	1614
Core g1b	80	16	32	48	64
c22 g1a	123	25	49	74	98
NS3_1 g4a	79	16	32	48	63
NS3 g1a	934	187	374	560	747
NS3_2 g1b	317	63	127	190	254
NS4_2	82	16	33	49	66
5-1-1 g4a	47	9	19	28	38
c100 g1a	77	15	31	46	61
NS5A g4a	847	169	339	508	678
NS5B_1 g4a	36	7	14	21	29
NS5 g1	274	55	110	165	220

Tabelle 55: Numerische Werte für die Bewertung der Antigenreaktivitäten.

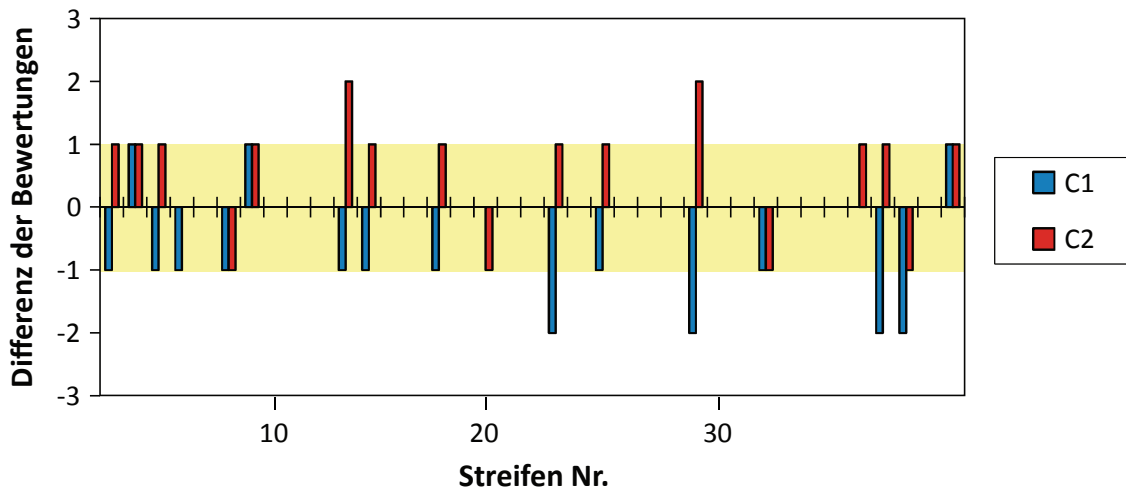
numerischer Wert	Bezeichnung für die Bewertung	
	INNO-LIA™ HCV Score	anti-HCV-IgG
1	-	S/CO-Wert < 1
2	±	Level 1
3	1 +	Level 2
4	2 +	Level 3
5	3 +	Level 4
6	4 +	Level 5

Zum Vergleich des INNO-LIA™ HCV Score und des anti-HCV-IgG Assay wurde die Differenz der beiden Bewertungen für dieselbe Protein-Region gebildet. In Abbildung 37 sind die ermittelten Differenzen dargestellt. Der Wert 0 bedeutet, dass beide Assays dieselbe Bewertung ergaben. Ein Wert kleiner 0 hingegen bedeutet eine um diesen Wert geringere Bewertung im anti-HCV-IgG Assay als im INNO-LIA™ HCV Score. Ein Wert größer 0 bedeutet dementsprechend eine um diesen Wert höhere Bewertung im anti-HCV-IgG Assay als im INNO-LIA™ HCV Score. Da hinter der Bewertung einer Protein-Region im anti-HCV-IgG Assay jedoch drei einzelne Antigene stehen wurde sowohl eine positive als auch eine negative Abweichung von 1 eingeräumt (gelber Korridor).

In Abbildung 37-A ist zunächst der Vergleich der Bewertungen der beiden verschiedenen Antigene der Core-Region des INNO-LIA™ HCV Score (C1 und C2) mit der Core-Region im anti-HCV-IgG Assay aufgezeigt. Nur selten ergab sich eine Differenz größer oder kleiner als 1 bzw. -1. Würden C1 und C2 zu einem gemeinsamen Wert vereinigt werden, so würde sich nur bei der Probe auf Streifen Nr. 38 eine Abweichung größer als 1 (-1,5) ergeben. In Abbildung 37-B zeigt sich, dass bei den Regionen NS3, NS4 und NS5 insgesamt häufiger eine geringere Bewertung im anti-HCV-IgG Assay erhalten wurde. Hierbei sticht vor allem die NS3-Region hervor. Während bei der NS4- und NS5-Region nur in drei, bzw. fünf Fällen eine maximale Abweichung von 2 erhalten wurde, so zeigten bei der NS3-Region insgesamt 12 Proben eine Differenz von -2 oder sogar -3. Die Bewertungen dieser Proben im anti-HCV-IgG Assay war allerdings mindestens 3, d. h. es bestand dennoch eine klare Reaktivität auf der NS3-Region.

Insgesamt konnten neben dem gut vergleichbaren Klassifizierungsergebnis mit dem INNO-LIA™ HCV Score und dem anti-HCV-IgG Assay auch sehr ähnliche Antigenreaktivitäten, abgesehen von der NS3-Region, bestimmt werden.

A



B

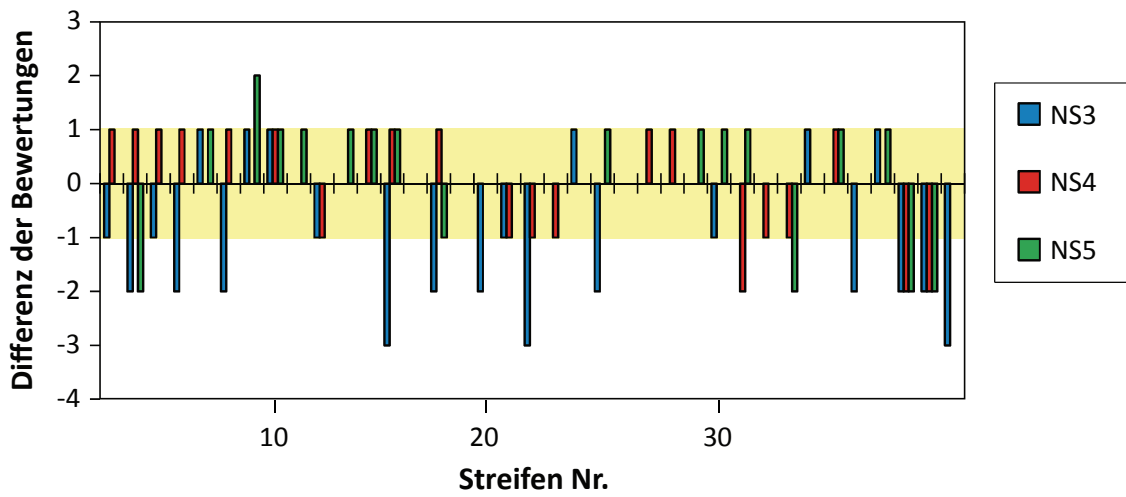


Abbildung 37: Vergleich der Antigenreaktivitäten im anti-HCV-IgG Assay und im INNO-LIA™ HCV Score. Dargestellt sind die Differenzen der Bewertungen auf derselben Protein-Region.

4.5 Analyse von Immunprofilen verschiedener HCV Patienten

Nachdem die Entwicklung und Validierung des serologischen anti-HCV-IgG Assays, die Implementierung eines Klassifikationsverfahrens und der Vergleich mit zwei kommerziell erhältlichen HCV Diagnostiktests erfolgreich abgeschlossen werden konnte, wurden Serum- und Plasmaproben von Patienten untersucht, die sich in verschiedenen Phasen einer HCV Infektion befanden. Hierfür standen sowohl Einzelproben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion zur Verfügung als auch Proben aus Zeitreihen über einen gewissen Zeitraum nach einer erfolgten HCV Infektion von 33 verschiedenen Personen.

Obwohl der anti-HCV-IgM Assay erfolgreich entwickelt und validiert wurde, konnte keine ausreichende diagnostische Relevanz erreicht werden. Die IgM Immunprofile des kleinen initialen Probensatzes wurden dennoch untersucht.

4.5.1 Untersuchung von IgG Immunprofilen

4.5.1.1 *Patienten mit akuter und chronischer HCV Infektion*

Zur Veranschaulichung von den IgG Immunprofilen der Einzelproben von Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion wurde zunächst eine Heatmap gemeinsam mit den Proben der gesunden Spender in Abbildung 38 erstellt. Für diese Darstellung wurden die S/CO-Werte auf den 27 HCV Antigenen von insgesamt 424 Proben verwendet. Hierbei handelte es sich um 117 Proben gesunder Spender (HCV negativ), 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut) und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion (HCV chronisch). Bei den Patienten mit akuter HCV Infektion lagen ausschließlich Infektionen mit dem Genotyp 4 vor. Die Patienten mit chronischem HCV Status hatten entweder eine Infektion mit Genotyp 1 oder mit Genotyp 4. Aus Abbildung 38 wird deutlich, dass z. T. auch in gesunden Spendern leichte Reaktivitäten gegenüber einzelnen HCV Antigenen gemessen werden können. Dennoch lassen sich die HCV negativen Proben optisch deutlich von den HCV positiven Proben unterscheiden. Innerhalb der HCV Patienten lässt sich in dieser Darstellung jedoch kein direkter Unterschied der Immunprofile erkennen.

Zur genaueren Untersuchung der Unterschiede zwischen gesunden Spendern und HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion wurde daher eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. In Abbildung 39 sind die Proben sortiert nach ihrer Ähnlichkeit in einer Heatmap dargestellt. Hierbei ergaben sich fünf optisch voneinander unterscheidbare Cluster. In Tabelle 56 ist eine Übersicht der Cluster gezeigt, wobei die Antikörperreaktivitäten gegenüber den verschiedenen HCV Protein-Regionen und dem Antigen HCV Mix mit einer vereinfachten Skala dargestellt wurden. Das erste

Cluster (blaues Cluster in Abbildung 39) stellt Proben dar, welche hauptsächlich nicht reaktiv waren. In diesem Cluster befanden sich 95,73 % der Proben von Personen mit HCV Status negativ und 16,87 % der Patienten mit HCV Status akut. Die anderen vier Cluster enthielten prinzipiell nur Proben von HCV Patienten. Im zweiten Cluster (rotes Cluster in Abbildung 39) wurden mehr Proben von HCV Patienten mit Status akut (77,05 % der Proben des Clusters) als mit Status chronisch gefunden. In diesem Cluster lagen hauptsächlich Reaktivitäten auf der NS3-Region vor. Im dritten Cluster hingegen (grünes Cluster in Abbildung 39) wurden mehr Proben von Patienten mit HCV Status chronisch (66,67 % der Proben des Clusters) als mit HCV Status akut gefunden. In diesem Cluster lagen starke Reaktivitäten auf allen Protein-Regionen vor. Im vierten Cluster (gelbes Cluster in Abbildung 39), welches hauptsächlich Reaktivitäten auf der Core-Region repräsentiert, wurden wiederum mehr Patienten mit akuter HCV Infektion erhalten (62,50 % der Proben des Clusters). Im fünften Cluster (graues Cluster in Abbildung 39) konnten, wie auch im dritten Cluster, mehr Patienten mit chronischer HCV Infektion (65,38 % der Proben des Clusters) ermittelt werden. Im Gegensatz jedoch zum dritten Cluster wurde weniger Reaktivität auf der NS4-Region und auf dem Antigen HCV Mix erhalten.

In den beiden Clustern, die auf allen Regionen Reaktivität aufwiesen (Cluster 3 und 5), wurden hauptsächlich Proben von Patienten mit chronischer HCV Infektion gefunden (78,01 % der Patienten mit HCV Status chronisch). Bei den Clustern 2 und 4 wurde entweder stärkere Reaktivität auf der NS3-Region oder auf der Core-Region erhalten. Insgesamt befanden sich ca. 50 % der Patienten mit HCV Status akut in diesen beiden Clustern. Allerdings zeigten die Patienten mit akuter HCV Infektion eine relativ ausgeglichene Verteilung über alle Cluster.

Tabelle 56: Cluster der HCV IgG Immunprofile aus Abbildung 39. Zur Darstellung der Antikörperreaktivitäten wurde eine vereinfachte Skala angewendet: starke Reaktivität (++), mittlere Reaktivität (+), geringe/keine Reaktivität (-).

Cluster	Anzahl Proben (%)			Antikörperreaktivität				
	HCV negativ n = 117	HCV akut n = 166	HCV chronisch n = 141	Core	NS3	NS4	NS5	HCV Mix
1 (blau) n = 141	112 (95,7 %)	28 (16,9 %)	1 (0,7 %)	-	-	-	-	-
2 (rot) n = 61	4 (3,6 %)	47 (28,3 %)	10 (7,1 %)	+	++	-	-	-
3 (grün) n = 114	0 (0 %)	38 (22,9 %)	76 (53,9 %)	++	++	++	++	++
4 (gelb) n = 56	1 (0,9 %)	35 (21,1 %)	20 (14,2 %)	++	+	+	-	+
5 (grau) n = 52	0 (0 %)	18 (10,8 %)	34 (24,1 %)	++	++	+	++	+

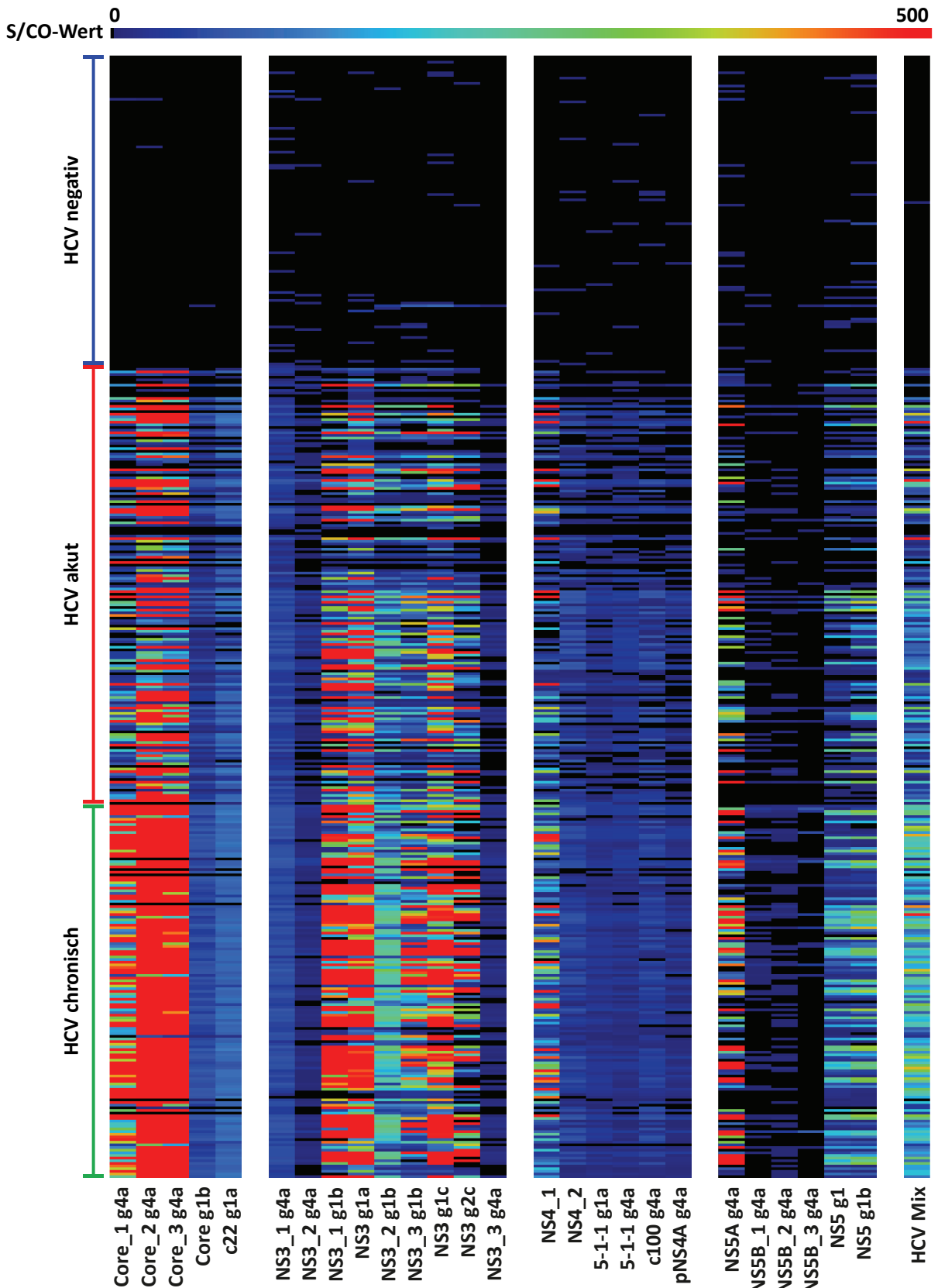


Abbildung 38: Heatmap der IgG Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten. Dargestellt sind die Reaktivitäten gegenüber 27 verschiedenen HCV Antigenen als S/CO-Werte.

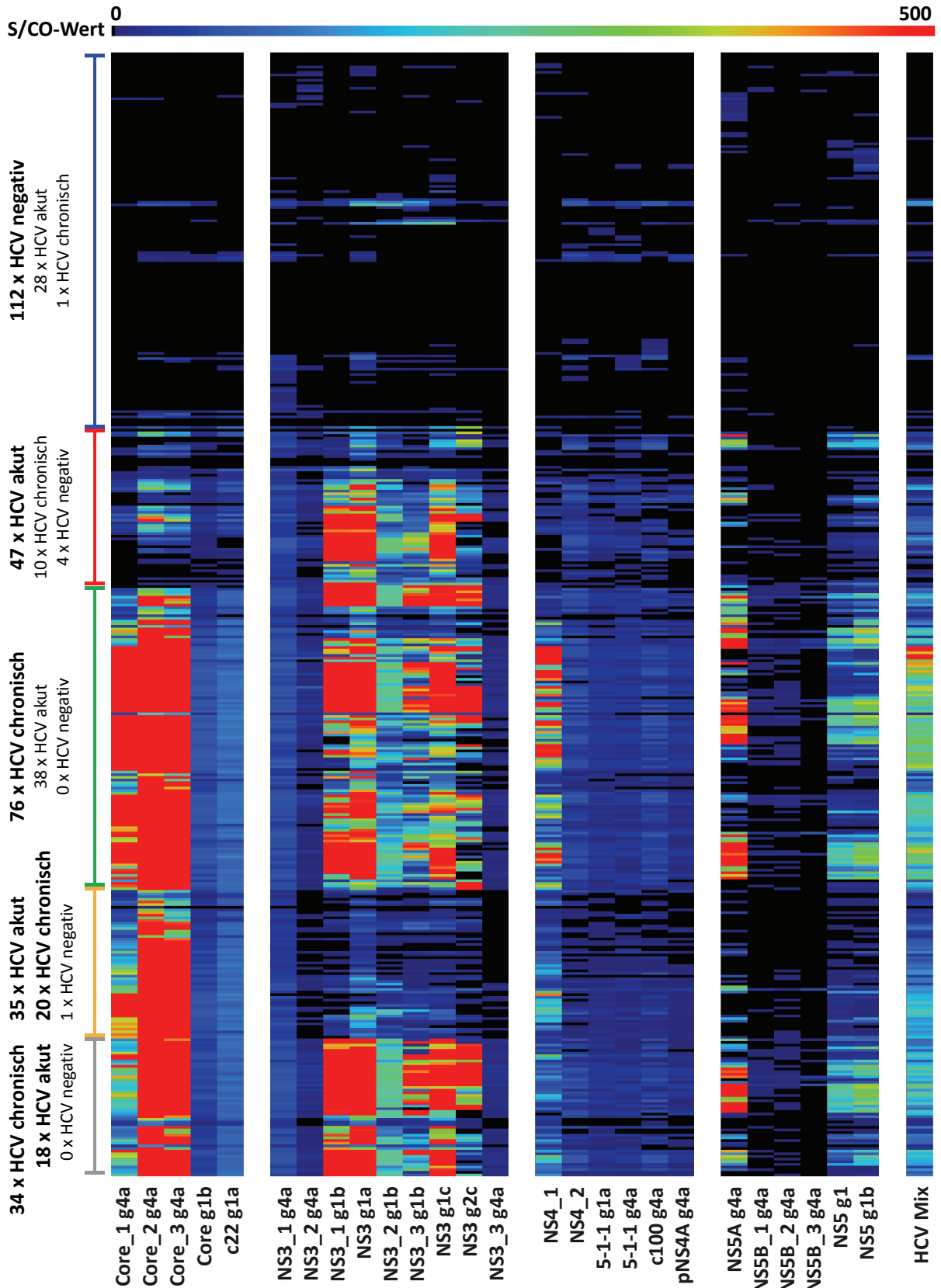


Abbildung 39: Hierarchische Clusteranalyse der IgG Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten. Die Proben aus der Heatmap in Abbildung 38 wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit sortiert. Die Reihenfolge der HCV Antigene wurde nicht verändert.

Des Weiteren wurden die Reaktivitäten gegenüber HCV Antigenen in Proben von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion vergleichend untersucht. Zur Veranschaulichung der Reaktivitätsintensität, welche bis zu einem gewissen Grad die jeweilige Menge eines bestimmten anti-HCV Antikörpers widerspiegelt, wurden Histogramme mit jeweils zehn Wertebereichen von beiden Gruppen erstellt. Hierbei wurde jedes HCV Antigen einzeln betrachtet. Zur Erstellung der Histogramme wurde der gesamte Bereich, in dem S/CO-Werte für ein Antigen auftraten, ab dem S/CO-Wert 1 in neun gleichmäßige Teilbereiche untergeteilt (Wertebereiche 2 bis 10). Den untersten Wertebereich bildeten die S/CO-Werte von 0 bis 1.

In Abbildung 40 sind die Histogramme von vier Core Antigenen dargestellt. Da das Histogramm von Core_2 g4a sehr ähnlich zu der Darstellung von Core_3 g4a war, ist in Abbildung 40 nur Core_2 g4a gezeigt. Zunächst konnte festgestellt werden, dass sich die Reaktivitätsintensitäten auf den Antigenen der Core-Region zwischen Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion z. T. sehr stark unterschieden.

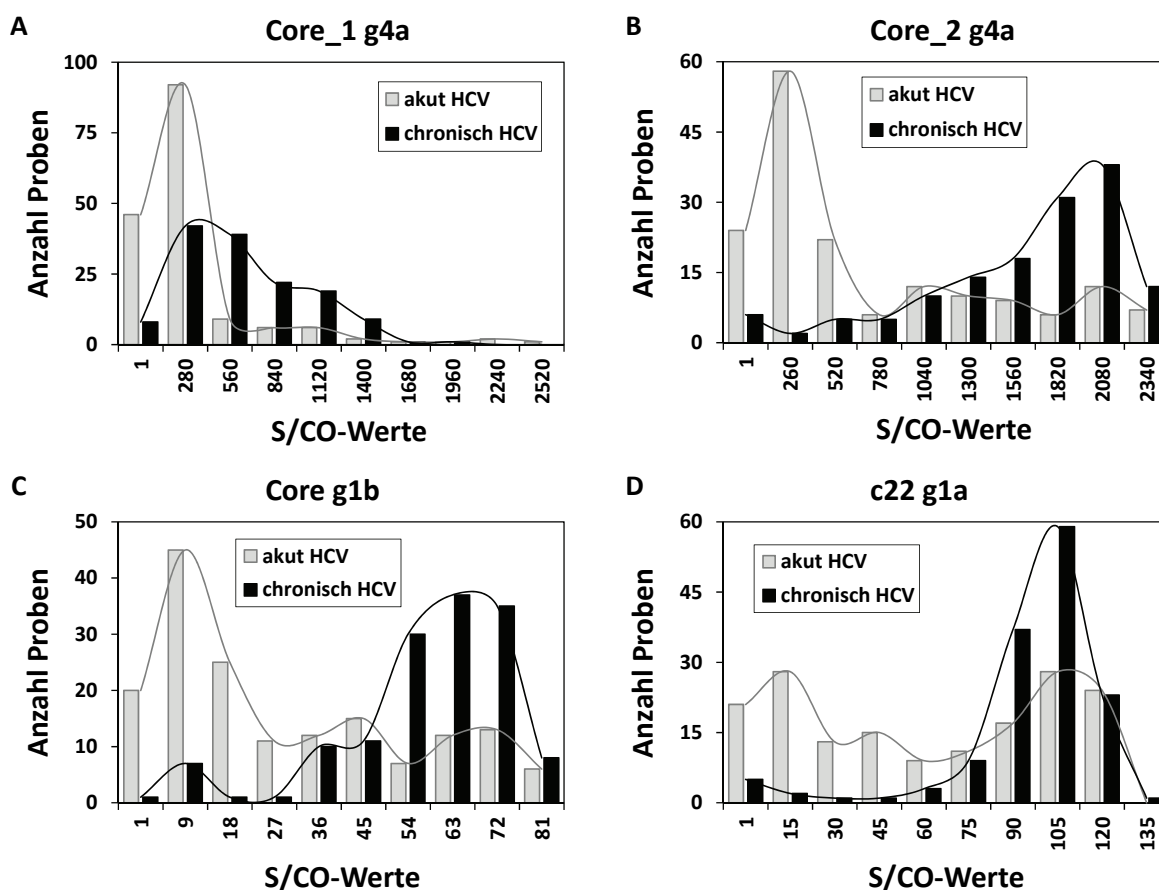


Abbildung 40: Verteilung der Reaktivität gegenüber vier Core Antigenen im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion. Für die Histogramme wurden jeweils 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

Bei den HCV Patienten mit akuter Infektion wurden häufiger Werte im unteren Intensitätsbereich erhalten. Auch S/CO-Werte < 1 , welche eine Nicht-Reaktivität bedeuten, konnten sehr viel seltener bei den HCV Patienten mit chronischer Infektion beobachtet werden. Insgesamt waren 83,73 +/- 6,49 % der HCV Patienten mit akuter Infektion und 96,31 +/- 1,84 % der HCV Patienten mit chronischer Infektion auf der Core-Region reaktiv. Des Weiteren zeigte sich, dass sehr andersartige Histogramme erhalten werden können, wenn zur Herstellung des Antigens unterschiedliche *E. coli* Expressionsstämme verwendet wurden (vgl. Core_1 g4a in Abbildung 40-A und Core_2 g4a in Abbildung 40-B). Außerdem konnte bei Verwendung der Proteinsequenz eines anderen HCV Genotypen (Core g1b in Abbildung 40-C), bzw. eines Teilbereichs der Core-Region (c22 g1a in Abbildung 40-D), eine Verschiebung der Reaktivitäten beider betrachteter Gruppen in den jeweilig höheren Intensitätsbereich beobachtet werden.

Die Reaktivitäten auf den Antigenen der NS3-Region wurden ebenfalls genauer betrachtet. In Abbildung 41 sind vier beispielhafte Histogramme dargestellt. Wie bei den Core Antigenen, wurden im Allgemeinen bei den HCV Patienten mit akuter Infektion häufiger Werte im unteren Intensitätsbereich sowie S/CO-Werte < 1 erhalten. In der Gesamtheit der NS3 Antigene bildeten die beiden gezeigten Antigenversionen des HCV Genotyps 4 (NS3_1 g4a und NS3_2 g4a) jeweils eine Ausnahme. Der Unterschied zwischen diesen zwei Antigenversionen lag darin, dass NS3_1 g4a nativ aufgereinigt wurde und NS3_2 g4a denaturierend. Die Proteinsequenz, der Vektor und der *E. coli* Expressionsstamm waren jedoch jeweils gleich. Insgesamt konnten auf dem Antigen NS3_1 g4a (Abbildung 41-A) höhere Intensitäten bei allen HCV Patienten gemessen werden und nur sieben Patienten mit akuter HCV Infektion zeigten einen S/CO-Wert < 1 . Bei allen anderen NS3 Antigenen wurden mehr Patienten mit einem S/CO-Wert < 1 beobachtet. Hieraus wird ersichtlich, weshalb NS3_1 g4a innerhalb der NS3 Antigene die beste Funktionalität in Bezug auf eine Probenklassifikation erhielt (vgl. 4.3.2.3). Im Gegensatz dazu wurden bei NS3_2 g4a (Abbildung 41-B) generell niedrigere Reaktivitätsintensitäten bei allen HCV Patienten erhalten. Bei Betrachtung der nicht-reaktiven Patienten (S/CO-Wert < 1) wies NS3 g1a ein ähnlich gutes Ergebnis wie NS3_1 g4a auf: neun nicht-reaktive Patienten mit akuter HCV Infektion. Im Vergleich hierzu wurden bei den anderen z. T. nicht dargestellten NS3 Antigenen zwischen 22 und 77 nicht-reaktive Proben von Patienten mit HCV Status akut erhalten. Wie schon erwähnt, zeigten die HCV Patienten mit akuter Infektion häufiger Werte im unteren Intensitätsbereich und die HCV Patienten mit chronischer Infektion hingegen tendenziell mehr Werte im jeweils höheren Intensitätsbereich. Ohne Berücksichtigung der Antigene NS3 g2c und NS3_3 g4a waren insgesamt 87,09 +/- 5,89 % der HCV Patienten mit akuter Infektion und 96,76 +/- 3,11 % der HCV Patienten mit chronischer Infektion auf der NS3-Region reaktiv.

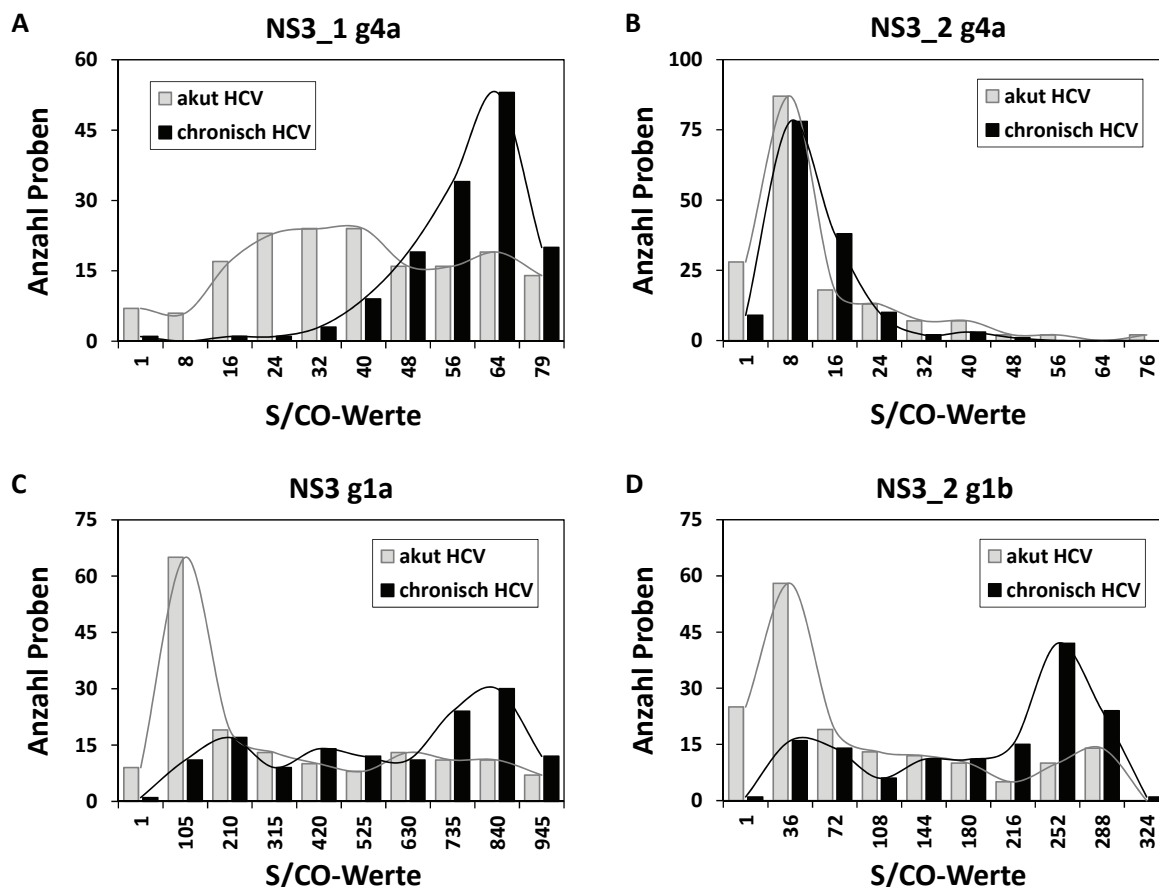


Abbildung 41: Verteilung der Reaktivität gegenüber vier NS3 Antigenen im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion. Für die Histogramme wurden jeweils 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

Zur Betrachtung der Reaktivitäten gegenüber Antigenen der NS4-Region sind in Abbildung 42 die Histogramme von vier NS4 Antigenen dargestellt. Auffällig war zunächst die höhere Häufigkeit, dass HCV Patienten mit akuter Infektion keine Reaktivität gegenüber NS4 Antigenen aufwiesen. Im Mittel handelte es sich hierbei um 41 nicht-reaktive Patienten, wobei in diese Berechnung auch die nicht dargestellten NS4 Antigene einfließen. Wie zuvor auch beobachtet, zeigten mehr HCV Patienten mit akuter Infektion Werte im zweiten Wertebereich. Interessanterweise konnten bei NS4_2 (Abbildung 42-B) außerdem auch mehr Werte im höheren als im mittigen Intensitätsbereich gemessen werden. Von allen NS4 Antigenen wiesen die meisten Patienten mit akuter HCV Infektion gegenüber dem Antigen 5-1-1 g4a (Abbildung 42-C) eine Reaktivität auf. Anders als zuvor beobachtet, zeigten die Patienten mit HCV Status chronisch, abgesehen von NS4_1 (Abbildung 42-A), eine relativ gleichmäßige Verteilung über den jeweiligen Intensitätsbereich. Insgesamt waren 75,40 +/- 8,91 % der HCV Patienten mit akuter Infektion und 96,10 +/- 2,49 % der HCV Patienten mit chronischer Infektion auf der NS4-Region reaktiv.

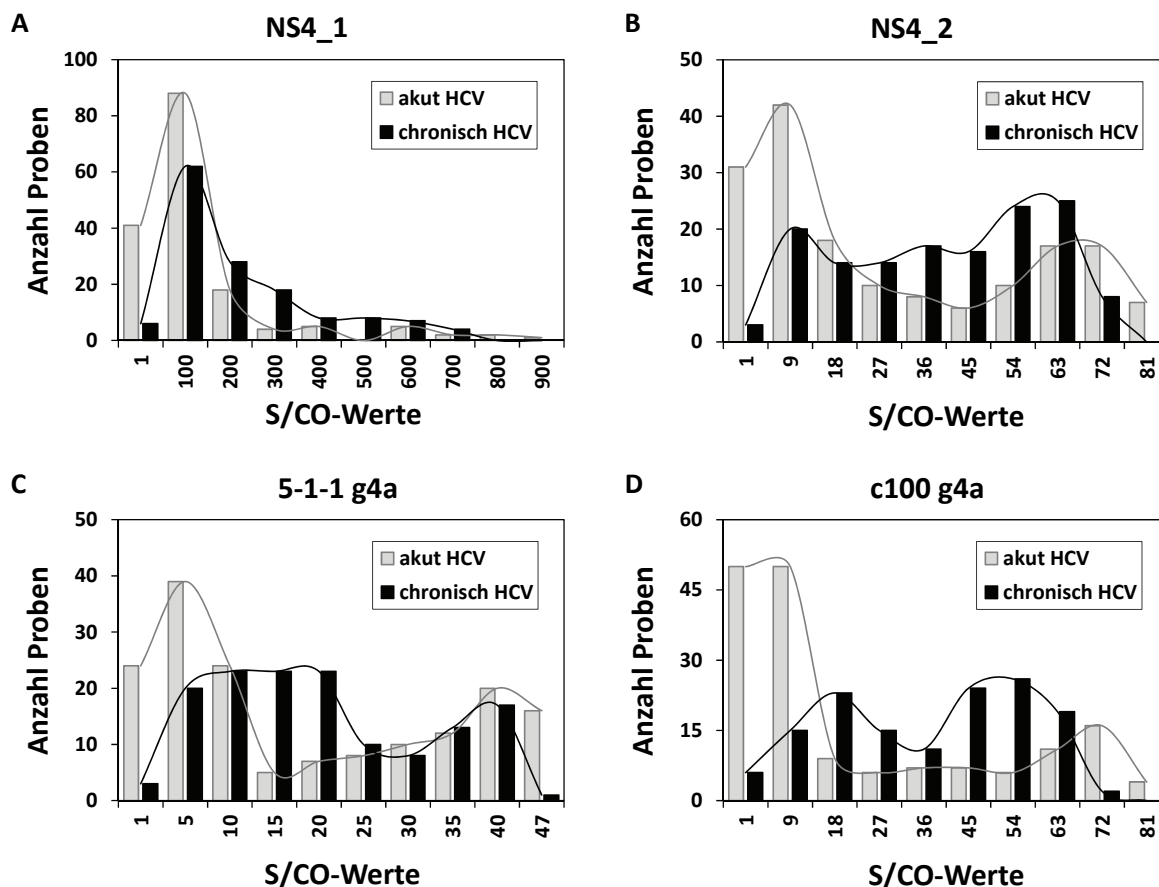


Abbildung 42: Verteilung der Reaktivität gegenüber vier NS4 Antigenen im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion. Für die Histogramme wurden jeweils 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

In Abbildung 43 sind die Histogramme von drei NS5 Antigenen und dem Antigen HCV Mix dargestellt. Im Vergleich zu den zuvor gezeigten Reaktivitätsverteilungen, konnte ein starker Unterschied in der Reaktivitätsintensität bei den NS5 Antigenen festgestellt werden. Gegenüber den Antigenen NS5A g4a (Abbildung 43-A) und NS5B_1 g4a (Abbildung 43-B) zeigten auch viele Patienten mit chronischer HCV Infektion keine Reaktivität (S/CO -Werte < 1). Insgesamt lagen bei einer akuten HCV Infektion die meisten, bzw. bei einer chronischen HCV Infektion mindestens 46,1 % (bis zu 85,1 % bei NS5B_1 g4a) der Messwerte in den beiden unteren Wertebereichen. Vor allem bei den Antigenen NS5B_1 g4a (Abbildung 43-B), NS5B_2 g4a und NS5B_3 g4a (jeweils nicht dargestellt) zeigten sehr wenige Patienten S/CO -Werte größer als der dritte Wertebereich. Ohne Berücksichtigung der Antigene NS5B_2 g4a und NS5B_2 g4a waren insgesamt 61,45 +/- 11,48 % der HCV Patienten mit akuter Infektion und 85,11 +/- 14,34 % der HCV Patienten mit chronischer Infektion auf der NS5-Region reaktiv. Für die Patienten mit einer chronischen HCV Infektion konnte bei dem Antigen HCV Mix (Abbildung 43-D) eine leicht nach links verschobene, aber deutlich erkennbare Normalverteilung der S/CO -Werte über den gesamten Intensitätsbereich erhalten werden. Kein anderes Antigen zeigte eine

Normalverteilung der Reaktivitätsintensitäten. Bei den Patienten mit einer akuten HCV Infektion wurde allerdings die typische Verteilung, mit der meisten Häufigkeit im zweiten Wertebereich, beobachtet.

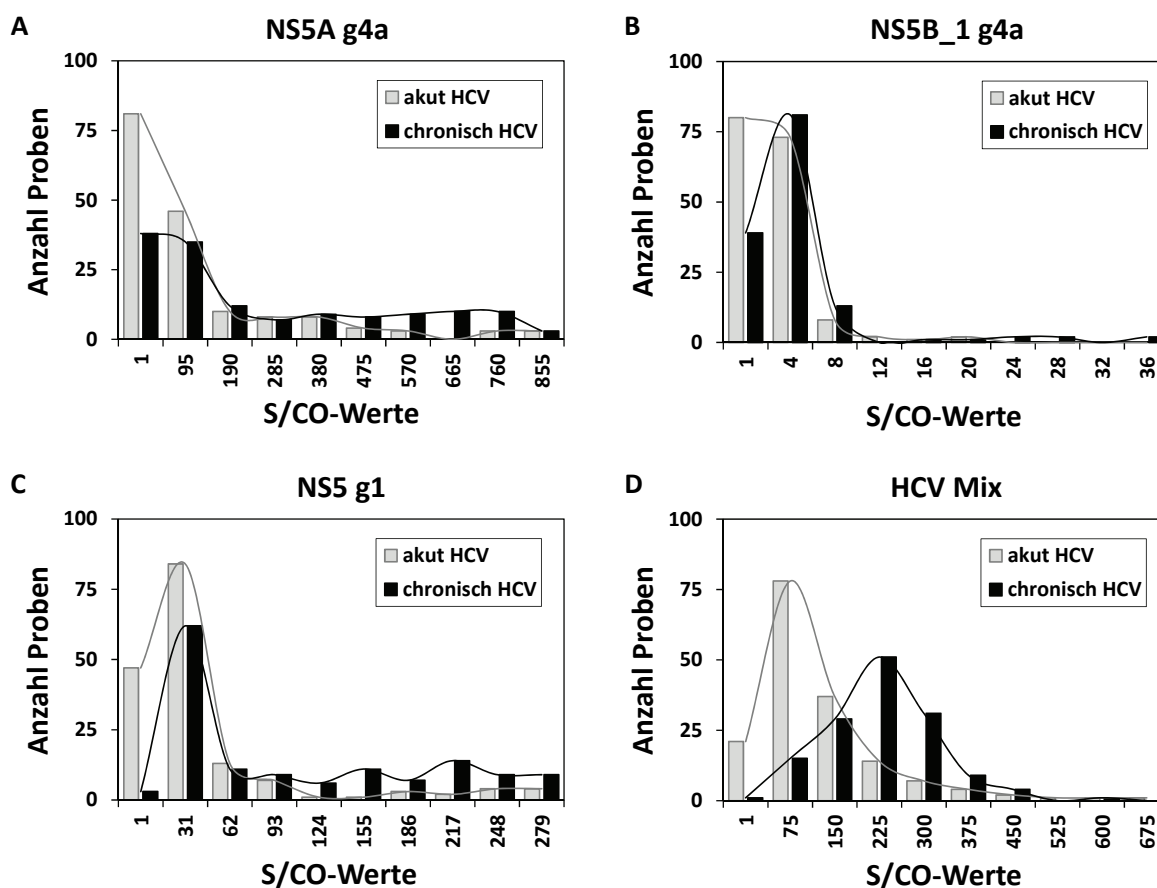


Abbildung 43: Verteilung der Reaktivität gegenüber drei NS5 Antigenen und dem Antigen HCV Mix im Vergleich von HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion. Für die Histogramme wurden jeweils 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion und 141 Proben von Patienten mit einer chronischen HCV Infektion verwendet.

4.5.1.2 Patienten mit und ohne spontane Eradikation des Hepatitis C Virus

Von einigen Patienten mit akuter HCV Infektion war bekannt, dass diese zu einem späteren Zeitpunkt eine spontane Eradikation des Hepatitis C Virus erfahren hatten. Die HCV IgG Immunprofile von diesen Patienten wurden mit einer hierarchischen Clusteranalyse genauer untersucht. Zur Detektion der frühen serologischen Immunantwort wurden ausschließlich Proben, die innerhalb von zwei Monaten nach Auftreten von Symptomen einer HCV Infektion generiert wurden, verwendet. Für diese Analyse standen insgesamt 47 Proben von Patienten mit spontaner Eradikation und 43 Proben von Patienten ohne Eradikation zur Verfügung. In Abbildung 44 sind diese Proben sortiert nach ihrer Ähnlichkeit in einer Heatmap dargestellt. Proben von Patienten, die zu einem späteren Zeitpunkt eine spontane

Eradikation des HCV erfahren hatten, sind mit einem grauen Strich markiert. Aus der hierarchischen Clusteranalyse ergaben sich drei optisch voneinander unterscheidbare Cluster. Im ersten Cluster (rotes Cluster in Abbildung 44) befanden sich Proben, die generell sehr geringe S/CO-Werte auf allen Antigenen hatten. Die Proben im zweiten Cluster (grünes Cluster in Abbildung 44) zeigten v. a. Reaktivitäten auf der Core-Region, wohingegen die Proben im dritten Cluster (blaues Cluster in Abbildung 44) kaum Reaktivität auf der Core-Region aufwiesen. Die Anzahl der Proben mit und ohne spontane HCV Eradikation war in allen drei Clustern allerdings nahezu gleich, d. h. mit dieser Analyse konnte kein HCV IgG Immunprofil identifiziert werden, das im Zusammenhang mit einer spontanen HCV Eradikation steht.

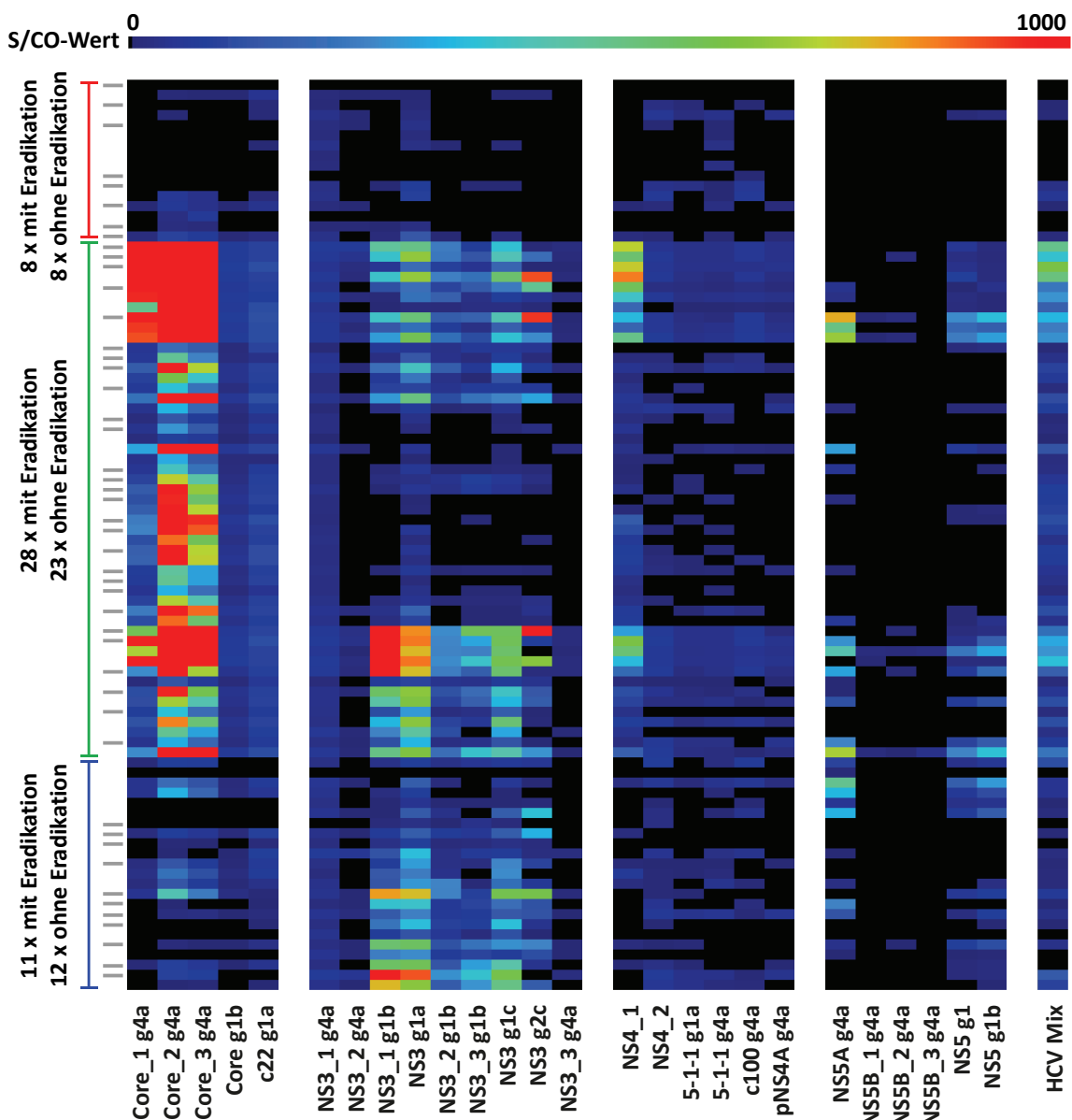


Abbildung 44: Hierarchische Clusteranalyse der IgG Immunprofile von HCV Patienten mit und ohne spontane Eradikation. Die Proben wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit sortiert. Proben mit einem grauen Strich wiesen zu einem späteren Zeitpunkt eine Eradikation des Hepatitis C Virus auf.

4.5.1.3 Patienten mit HCV Genotyp 1 und HCV Genotyp 4

Wie schon zuvor erwähnt, hatten die Patienten mit chronischem HCV Status entweder eine Infektion mit Genotyp 1 (HCV g1) oder mit Genotyp 4 (HCV g4). Insgesamt standen 89 Proben von Patienten mit HCV g1 und 48 Proben von Patienten mit HCV g4 zur Verfügung. Die Reaktivitäten gegenüber verschiedenen HCV Antigenen wurden vergleichend untersucht.

In der Verteilung der Reaktivität gegenüber den Antigenen der Core-Region und der NS5-Region konnten prinzipiell keine Unterschiede zwischen den Patienten mit HCV g1 oder HCV g4 festgestellt werden. Bei zwei Antigenen der NS3-Region konnten allerdings kleinere Unterschiede beobachtet werden. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 45 die Reaktivitätsintensitäten auf den Antigenen NS3 g1a und NS3_1 g4a dargestellt. Bei NS3 g1a (Abbildung 45-A) zeigten die Patienten mit HCV g4 eine relativ gleichmäßige Verteilung über den zweiten bis zehnten Wertebereich. Bei den Patienten mit HCV g1 hingegen waren fast die Hälfte der Proben (46,1 %) im achten und neunten Wertebereich. Auf dem Antigen NS3_1 g4a (Abbildung 45-B) konnten zunächst sehr ähnliche Verteilungen festgestellt werden, allerdings war bei den HCV g4 Patienten der Wert 28 (fünfter Wertebereich) der niedrigste gemessene S/CO-Wert.

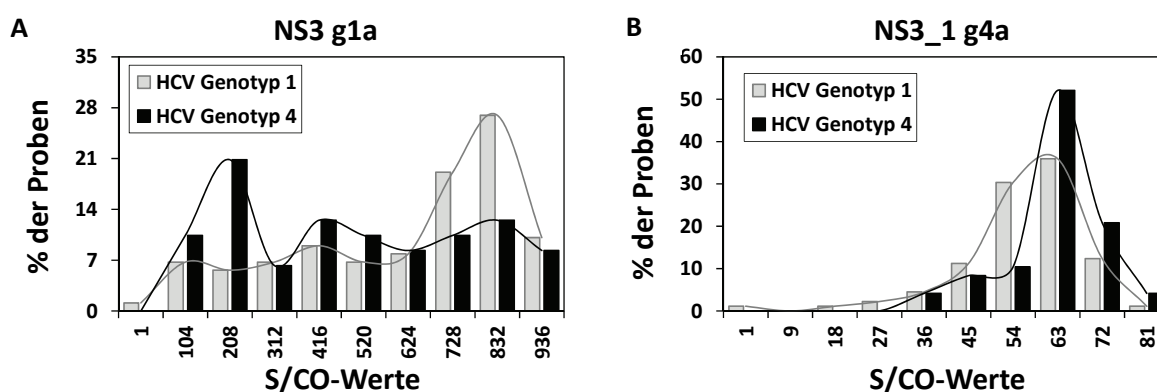


Abbildung 45: Verteilung der Reaktivität gegenüber zwei NS3 Antigenen im Vergleich von Patienten mit HCV g1 und HCV g4. Für die Histogramme wurden jeweils 89 Proben von Patienten mit HCV g1 und 48 Proben von Patienten mit HCV g4 verwendet.

Bei zwei Antigenen der NS4-Region konnten ebenfalls kleinere Unterschiede festgestellt werden. Hierbei handelt es sich um das Peptid 5-1-1, das jeweils entsprechend der Proteinsequenz aus HCV g1a und HCV g4a synthetisiert wurde. Das Peptid besteht aus 42 Aminosäuren und die beiden Genotypspezifischen Sequenzen unterscheiden sich an neun Positionen. Die Verteilung der Reaktivität gegenüber diesen beiden Antigenen ist in Abbildung 46 dargestellt. Auf dem Antigen 5-1-1 g1a (Abbildung 46-A) verteilten sich 64 % der Patienten mit HCV g1 auf den sechsten bis neunten Wertebereich, während sich bei den Patienten mit HCV g4 62,5 % auf den dritten bis sechsten

Wertebereich verteilen. Dennoch zeigten auch 15 Patienten mit HCV g1 (16,9 %) S/CO-Werte im dritten Wertebereich und 9 Patienten mit HCV g4 (18,8 %) S/CO-Werte im neunten Wertebereich. Die Reaktivitäten auf dem Antigen 5-1-1 g4a (Abbildung 46-B) konzentrierten sich bei allen HCV Patienten auf den zweiten bis vierten Wertebereich, allerdings konnten dennoch 47,9 % der HCV g4 Patienten S/CO-Werte im sechsten bis zehnten Wertebereich erreichen. Im Vergleich dazu waren es bei den HCV g1 Patienten nur 27 %. Interessanterweise zeigten jeweils zwei Patienten keine Reaktivität auf dem Antigen, das nicht demselben Genotyp entsprach, d. h. zwei HCV g1 Proben hatten keine Reaktivität auf dem Antigen 5-1-1 g4a und zwei HCV g4 Proben wiesen keine Reaktivität auf dem Antigen 5-1-1- g1a auf.

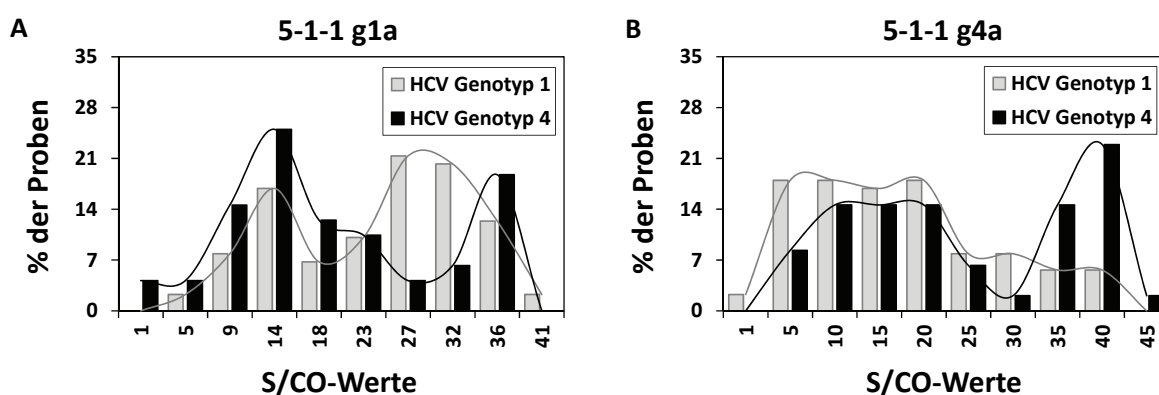


Abbildung 46: Verteilung der Reaktivität gegenüber zwei NS4 Antigenen im Vergleich von Patienten mit HCV g1 und HCV g4. Für die Histogramme wurden jeweils 89 Proben von Patienten mit HCV g1 und 48 Proben von Patienten mit HCV g4 verwendet.

Eine Untersuchung mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren ergab, dass sich die Patienten mit HCV g1 und HCV g4 Infektion durch die Antigene NS3_3 g1b, NS3 g1c, 5-1-1 g4a und 5-1-1 g1a zu 73,96 % entsprechend des HCV Genotyps richtig klassifizieren ließen. Bei Verwendung des Random Forest Klassifikationsverfahren sollte mit möglichst gleicher Probenanzahl in den unterschiedlichen Gruppen gearbeitet werden. Da von den Patienten mit HCV g4 Infektion nur 48 Proben zur Verfügung standen, wurden auch nur 48 Patienten mit HCV g1 Infektion in dieser Analyse verwendet. In Tabelle 57 sind die Ergebnisse in einer Wahrheitsmatrix dargestellt.

Tabelle 57: Wahrheitsmatrix für die Messung von 96 Proben mit HCV g1 oder HCV g4 Infektion nach Random Forest Klassifikationsverfahren. Insgesamt wurden 48 Proben von Patienten mit chronischer HCV g1 Infektion und 48 Proben von Patienten chronischer HCV g4 Infektion verwendet.

		klassifiziert als	
		Genotyp 1	Genotyp 4
HCV	Genotyp 1	36	12
	Genotyp 4	13	35

4.5.1.4 Veränderung von Immunprofilen – Untersuchung der Zeitreihen

Bei den Proben der Zeitreihen von 33 Personen handelte es sich um 13 Zeitreihen von Personen mit spontaner Eradikation des Hepatitis C Virus und um 20 Zeitreihen von Personen, bei denen die HCV Infektion einen chronischen Verlauf nahm. Von jedem Patient standen zwischen drei und sieben Proben verschiedener Zeitpunkte zur Verfügung. Die Zeitpunkte beziehen sich auf das Auftreten von Symptomen einer HCV Infektion, der genaue Infektionszeitpunkt ist allerdings nicht bekannt.

Bei den 13 Patienten mit spontaner Eradikation von HCV konnten unterschiedliche Immunprofile beobachtet werden. In Abbildung 47 sind in einer Heatmap beispielhaft die Reaktivitäten gegenüber den 27 HCV Antigenen von fünf Patienten gezeigt. Diese Patienten konnten alle innerhalb von sieben Monaten nach der Infektion mit HCV g4 eine Eradikation des Virus erreichen.

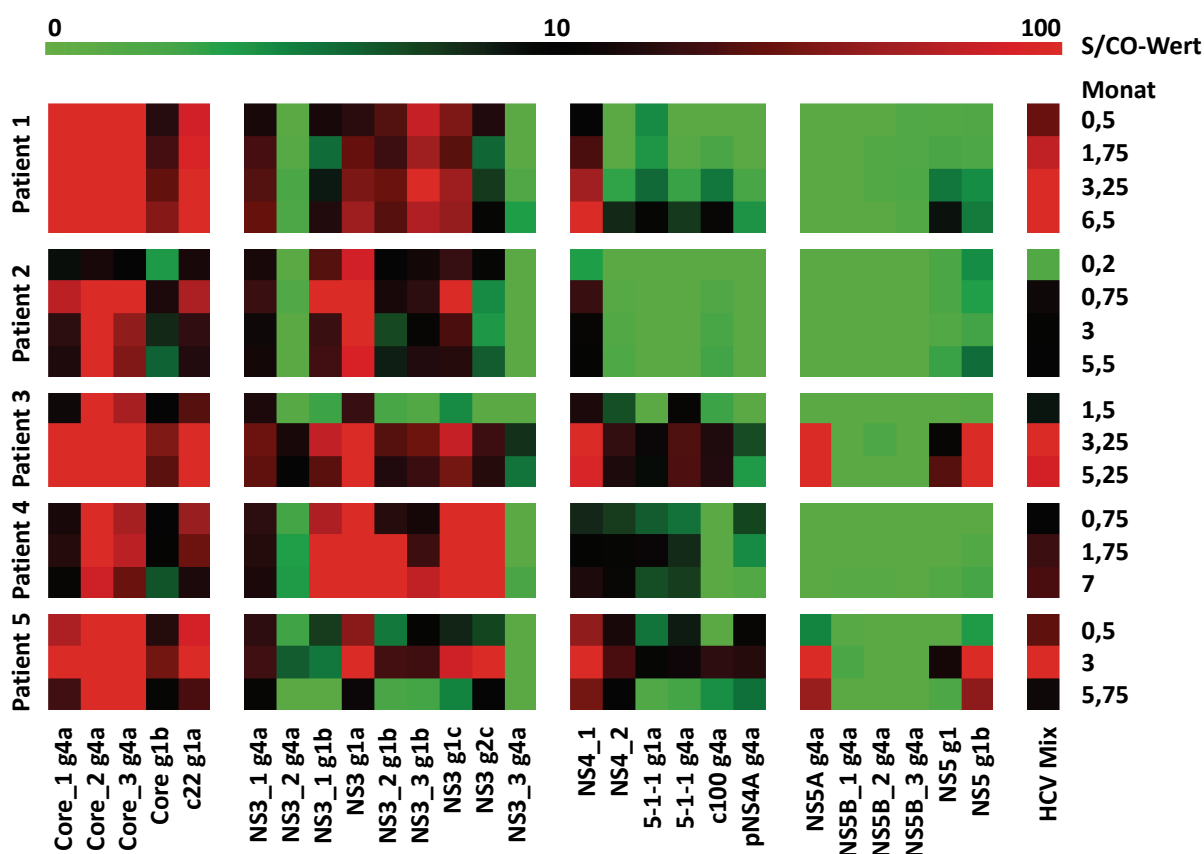


Abbildung 47: Immunprofile in Zeitreihen von fünf HCV Patienten mit spontaner HCV Eradikation. Die Heatmap zeigt die Reaktivitäten gegenüber 27 verschiedenen HCV Antigenen als S/CO-Werte.

Patient 1 zeigte über den Zeitraum von 6,5 Monaten einen prinzipiellen Anstieg der Reaktivität gegenüber den verschiedenen HCV Antigenen. Bei Patient 2 konnte im Gegensatz hierzu ein Hochpunkt der Reaktivität bei 0,75 Monaten beobachtet werden. Patient 3 und 5 wiesen jeweils bei 3,25

bzw. 3 Monaten maximale Reaktivitäten auf. Bei Patient 4 ließ sich die Reaktivität gegenüber den verschiedenen HCV Antigenen nicht verallgemeinern, manche Antigene zeigten die höchsten S/CO-Werte bei 1,75 Monaten und bei anderen Antigenen erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg oder eine kontinuierliche Reduktion der S/CO-Werte bis zum 7. Monat. Keine Probe der dargestellten Patienten zeigte eine starke oder überhaupt messbare Reaktivität auf den NS5B Antigenen.

In Tabelle 58 sind die S/CO-Werte ausgewählter HCV Antigene von den fünf HCV Patienten mit Eradikation aus Abbildung 47 gezeigt. Zusätzlich ist auch die Viruslast angegeben. Die Eradikation war jeweils beim letzten Zeitpunkt gegeben. Bei Patient 2 sogar schon beim vorletzten Zeitpunkt, obwohl dieser Patient die höchste initiale Viruslast aufwies.

Tabelle 58: S/CO-Werte ausgewählter HCV Antigene von fünf HCV Patienten mit spontaner HCV Eradikation. Die Patienten entsprechen den in Abbildung 47 gezeigten Patienten.

	Monat	Viruslast [IU/ml]	S/CO-Werte						
			Core_3 g4a	Core g1b	NS3_1 g4a	NS3 g1a	NS3_2 g1b	NS4_1	NS5 g1b
Patient 1	0,5	288000	465	27	22	29	41	10	2
	1,75	574	688	38	38	48	35	39	2
	3,25	737	962	47	41	56	50	70	4
	6,5	0	1296	59	49	69	42	101	5
Patient 2	0,2	634700	11	4	21	88	10	4	4
	0,75	440	201	24	34	291	22	33	3
	3	0	64	8	19	113	7	14	3
	5,5	0	57	6	20	92	9	13	6
Patient 3	1,5	3852	73	10	24	33	2	23	1
	3,25	21	1134	57	50	207	42	184	131
	5,25	0	680	44	46	128	25	95	232
Patient 4	0,75	342	72	11	30	296	28	8	0
	1,75	28375	80	12	27	576	158	12	1
	7	0	50	7	22	355	113	24	2
Patient 5	0,5	21	302	26	30	61	5	64	4
	3	550	1027	53	36	224	37	341	269
	5,75	0	138	14	13	17	2	53	63

Wie auch bei den dargestellten beispielhaften Patienten zu beobachten, zeigten insgesamt 10 der 13 Patienten (76,92 %) einen Rückgang der Reaktivitäten als eine HCV Eradikation vorlag. Diese Reduktion konnte meist auf allen vier HCV Protein-Regionen (Core, NS3, NS4 und NS5) festgestellt werden. Ein direkter Vergleich von Genotyp-spezifischen Antigenen einer Protein-Region ist in Tabelle 59 dargestellt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Reaktivität der Probe bei Vorliegen einer Eradikation bezogen auf die jeweils vorherige Probe bevor eine Eradikation erreicht wurde. Bei der Core-Region zeigten die HCV g4a Antigene meist eine stärkere prozentuale Abnahme der Reaktivität, wohingegen bei der NS3-Region das NS3_1 g4a Antigen immer die geringste bzw. teilweise auch überhaupt keine Reduktion aufwies. Auf dem Antigen 5-1-1 zeigten die Patienten 2, 3, 10 und 11 keine Unterschiede in der Reaktivität in Abhängigkeit von der Genotyp-spezifischen Sequenz, bei den restlichen Patienten allerdings konnte eine sehr viel stärkere Reduzierung auf dem 5-1-1 g1a Antigen beobachtet werden. Die Beurteilung der NS5-Region ist im Gegensatz zu den anderen Regionen sehr viel schwieriger, da generell weniger Reaktivität auf dieser Region festgestellt werden konnte.

Tabelle 59: Veränderung der Reaktivität bei Vorliegen einer HCV Eradikation. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Reaktivität der Probe bei Vorliegen einer Eradikation bezogen auf die jeweils vorherige Probe bevor eine Eradikation erreicht wurde. Ein Strich bedeutet, dass zuvor keine Reaktivität messbar war.

%	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11
Core_1 g4a	11	37	49	52	62	-	0	68	0	72
Core_3 g4a	13	32	60	62	81	73	53	74	1	79
Core g1b	26	35	78	53	88	58	94	87	8	82
c22 g1a	35	41	93	46	93	74	-	92	40	85
NS3_1 g4a	36	56	91	83	104	88	101	100	24	82
NS3 g1a	8	39	62	62	80	60	100	85	1	52
NS3_2 g1b	6	33	60	71	75	73	100	94	0	50
NS3 g1c	5	24	64	68	73	69	102	95	0	53
NS3 g2c	6	89	79	100	85	79	-	0	0	71
5-1-1 g1a	11	-	55	42	63	48	75	57	98	82
5-1-1 g4a	14	-	99	91	78	98	82	85	102	80
NS5A g4a	15	-	209	-	86	70	-	67	0	47
NS5B_1 g4a	0	-	101	102	54	79	61	70	0	-
NS5 g1b	23	76	176	189	98	70	118	73	0	59

Bei den 20 Patienten mit einem chronischen HCV Infektionsverlauf konnten sehr unterschiedliche Immunprofile beobachtet werden. In Abbildung 48 sind die Zeitreihen von drei beispielhaften Patienten mit chronischer HCV Infektion dargestellt.

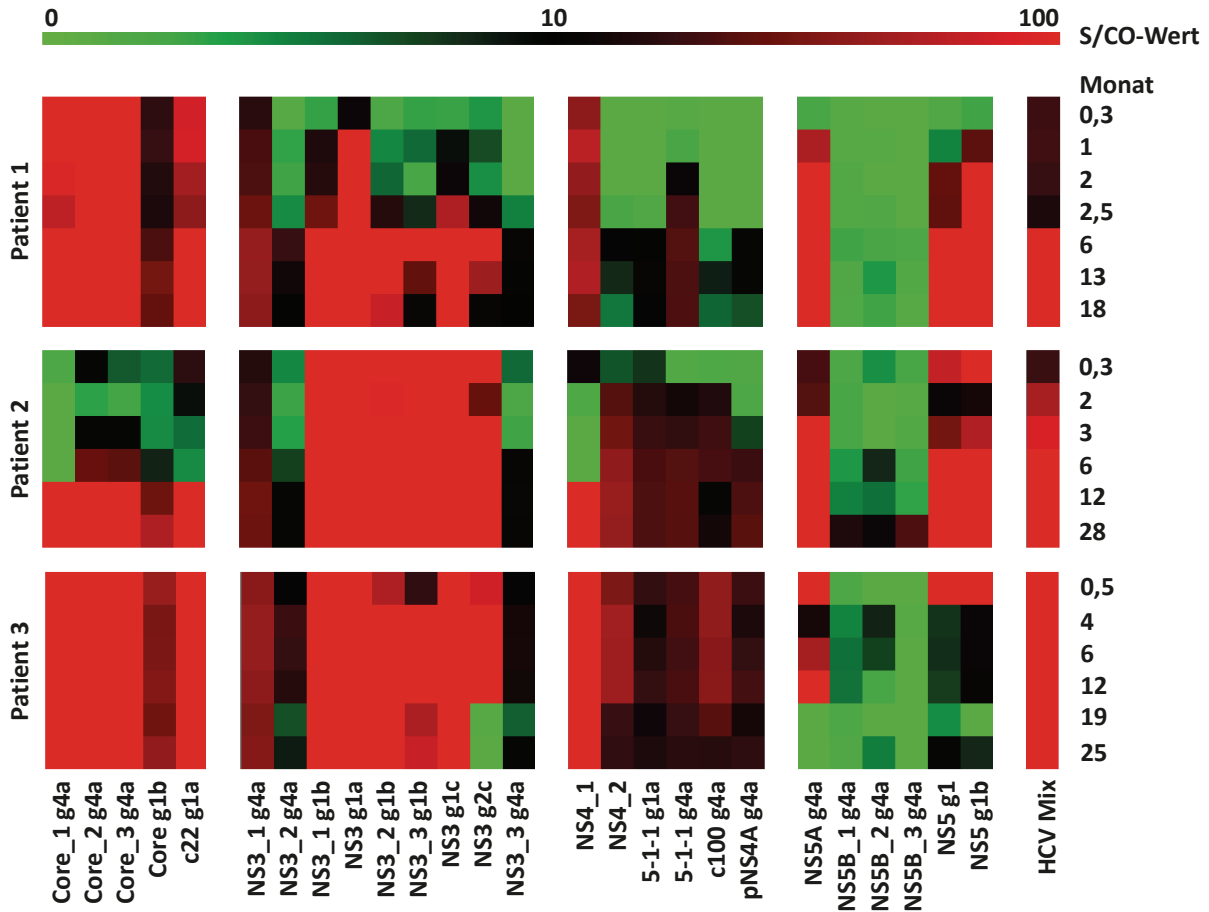


Abbildung 48: Immunprofile in Zeitreihen von drei HCV Patienten mit chronischer HCV Infektion. Die Heatmap zeigt die Reaktivitäten gegenüber 27 verschiedenen HCV Antigenen als S/CO-Werte zu jeweils sieben oder sechs verschiedenen Zeitpunkten.

Bei Patient 1 zeigte sich schon zum ersten Zeitpunkt eine sehr starke Reaktivität auf allen Antigenen der Core-Region. Bei der NS3-Region zeigten initial nur die Antigene NS3_1 g4a und NS3 g1a eine deutliche Reaktivität, ab dem Zeitpunkt von 6 Monaten hatten jedoch alle Antigene der NS3-Region hohe S/CO-Werte. Auf der NS4-Region konnte zu Beginn nur auf dem Antigen NS4_1 eine Reaktivität festgestellt werden. Ab dem 2. Monat konnten auch gegen das Antigen 5-1-1 g4a Antikörper nachgewiesen werden. Bei den anderen Antigenen der NS4-Region konnten jedoch erst in der Probe von Monat 6 deutliche Reaktivitäten gemessen werden. Keines der Antigene der NS5-Region zeigte bei 0,3 Monaten einen deutlichen S/CO-Wert. Die Probe vom Zeitpunkt 1 Monat allerdings wies für NS5A g4a, NS5 g1 und NS5 g1b eindeutige Signale auf. Keines der NS5B Antigene konnte in der gesamten Zeitreihe einen S/CO-Wert > 4 erzeugen. Insgesamt konnte bei den Antigenen der NS3-

Region die Ausbildung der humoralen Immunantwort über den Zeitraum von ca. 2 Monaten (0,3 Monate – 2,5 Monate) gut verfolgt werden. Die Entwicklung und Reifung der anti-HCV Antikörper schien bei diesem Patienten prinzipiell zu einem Zeitpunkt zwischen 2,5 und 6 Monaten abgeschlossen zu sein. Aufgrund fehlender Zwischenproben konnte dieser Zeitpunkt nicht genauer bestimmt werden. Bei genauerer Betrachtung der Zeitpunkte 13 und 18 Monate zeigte sich allerdings, dass bei manchen Antigenen (z. B. NS3_2 g1b und NS4_2) ein Rückgang in den S/CO-Werten vorlag.

Im Vergleich mit Patient 1 zeigte Patient 2 ein sehr unterschiedliches initiales Immunprofil. Auf den Antigenen der Core-Region konnte keine oder kaum Reaktivität gemessen werden. Die S/CO-Werte bei der Messung in den Monaten 2 und 3 waren z. T. sogar noch geringer als bei 0,3 Monaten. Selbst im 6. Monat konnten nicht alle Core Antigene hohe Signale erzielen. Erst zum Zeitpunkt von 12 Monaten wurden starke Reaktivitäten gemessen. Im Gegensatz dazu zeigten sich auf fast allen Antigenen der NS3-Region schon zu Beginn hohe S/CO-Werte. Diese erhöhten sich bis zum 12. Monat. Ebenfalls unterschiedlich zu Patient 1 waren die Ergebnisse auf der NS4-Region. Abgesehen von dem S/CO-Wert von 0,3 Monaten konnte innerhalb von 6 Monaten keine Reaktivität auf dem Antigen NS4_1 festgestellt werden. Alle anderen Antigene der NS4-Region zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der S/CO-Werte. Auf Antigenen der NS5-Region konnten schon initial Reaktivitäten detektiert werden. Während die Signale bei NS5A g4a bis zum 6. Monat anstiegen, gab es bei NS5 g1 und NS5 g1b eine Verringerung bei den Monaten 2 und 3. Zum letzten Zeitpunkt konnten sogar auf den NS5B Antigenen deutliche Signale gemessen werden.

Patient 3 zeigte eine Veränderung des Immunprofils, das sich ebenfalls sehr stark von denen der Patienten 1 und 2 unterschied. Auf nahezu allen Antigenen konnten schon zum ersten Zeitpunkt hohe S/CO-Werte gemessen werden. Obwohl die Antigene NS3_2 g4a, NS3 g2c und NS3_3 g4a im 4. Monat jeweils einen weiteren Anstieg der Reaktivität zeigten und diese bis zum 12. Monat stabil blieb, konnte nach 19 Monaten keine oder kaum Reaktivität festgestellt werden. Auch bei manchen Antigenen der NS4- und NS5-Region konnte ein Rückgang der S/CO-Werte nach 19 Monaten detektiert werden. Besonders überraschend sind auch die Ergebnisse der Antigene NS5 g1 und NS5 g1b. Auf beiden Antigenen konnte initial jeweils ein hoher S/CO-Wert gemessen werden, der sich im 4. Monat massiv reduzierte und nicht mehr deutlich höher wurde.

Zur genaueren Untersuchung der Veränderung spezifischer anti-HCV Antikörper wurde in Abbildung 49 der Verlauf der Reaktivität gegenüber jeweils zehn ausgewählten HCV Antigenen und der Viruslast von den drei Patienten aus Abbildung 48 dargestellt. Für eine bessere Veranschaulichung wurden jeweils fünf Antigene eines Patienten, die S/CO-Werte in einem ähnlichen Bereich aufwiesen, gemeinsam in einer Grafik dargestellt.

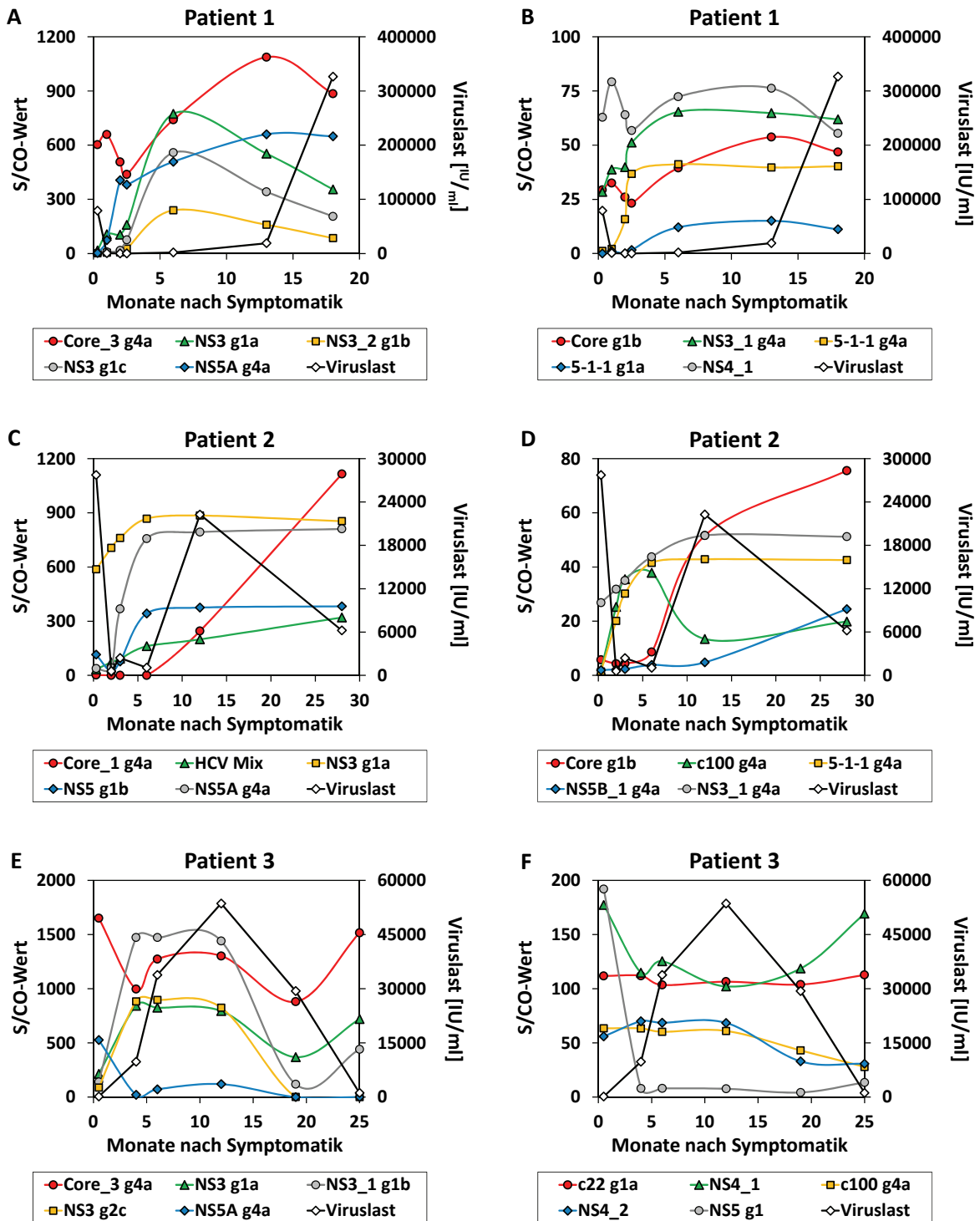


Abbildung 49: Verlauf der Reaktivität ausgewählter HCV Antigene von den drei Patienten aus Abbildung 48. Pro Patient sind die S/CO-Werte von zehn verschiedenen HCV Antigenen dargestellt, jeweils fünf Antigene in einer Grafik gemeinsam mit der Viruslast.

Insgesamt konnten neben kontinuierlich steigenden Verläufen (z. B. HCV Mix in Abbildung 49-C) auch fluktuierende Verläufe (z. B. Core_3 g4a in Abbildung 49-A) der Reaktivitäten beobachtet werden. Ebenfalls wurden steigende Verläufe, die allerdings in einem Plateau enden, beobachtet (z. B.

5-1-1 g4a in Abbildung 49-B). Der Verlauf der Reaktivität gegenüber dem Antigen NS4_1 bei Patient 3 (grüne Linie in Abbildung 49-F) zeigte eine weitere Variante. Hier konnte eine wannenförmige Veränderung festgestellt werden. Die S/CO-Werte auf dem Antigen c100 g4a bei Patient 2 (grüne Linie in Abbildung 49-D) verhielten sich interessanterweise genau gegenläufig zur Viruslast. Obwohl in Abbildung 48 nicht ersichtlich, traten bei Patient 3 bei manchen Antigenen, wie z. B. Core_3 g4a (rote Linie in Abbildung 49-E), Schwankungen der Reaktivität auf. Bei dem ebenfalls aus der Core-Region stammenden Antigen c22 g1a (rote Linie in Abbildung 49-F) konnten jedoch keine oder kaum Schwankungen festgestellt werden (% CV = 3,9). Wie auch schon aus Abbildung 48 ersichtlich, gestaltete sich die Reaktivität gegenüber dem Antigen NS3 g2c bei Patient 3 (gelbe Linie in Abbildung 49-E) sehr andersartig: Diese stieg bis zum zweiten Zeitpunkt stark an, zeigte ein Plateau bis zum 12. Monat und verlor die Reaktivität anschließend völlig. Auf dem Antigen c100 g4a bei Patient 3 (gelbe Linie in Abbildung 49-F) konnte wiederum noch ein anderer Kurvenverlauf beobachtet werden. Hierbei wurde über 12 Monate hinweg ein sehr konstanter S/CO-Wert gemessen (% CV = 2,6), der jedoch bei 19 und 25 Monaten linear abnahm.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass sowohl bei Patienten mit spontaner Eradikation des HCV als auch bei Patienten mit einem chronischen Verlauf der HCV Infektion sehr unterschiedliche IgG Immunprofile auftreten. Diese Immunprofile waren v. a. bei den Patienten mit chronischer HCV Infektion nicht nur anfangs sehr verschieden, sondern die Veränderung der humoralen Immunantwort gestaltete sich ebenfalls uneinheitlich.

4.5.2 Untersuchung von IgM Immunprofilen

Im Allgemeinen treten bei der humoralen Immunantwort IgM Antikörper noch vor IgG Antikörpern auf, weshalb eine Messung von IgM Antikörpern zur Erfassung der frühen serologischen Immunantwort dient. Für die Untersuchung von anti-HCV IgM Immunprofilen wurde zunächst ein entsprechendes Cut-Off für den anti-HCV-IgM Assay berechnet und anschließend S/CO-Werte ermittelt. Zur Veranschaulichung der IgM Immunprofile wurde eine Heatmap von gesunden Spendern (HCV negativ, n = 61), Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut, n = 84) und Patienten mit chronischer HCV Infektion (HCV chronisch, n = 34) erstellt. Bei den HCV Patienten lagen ausschließlich Infektionen mit dem Genotyp 4 vor. Zur genaueren Untersuchung der Unterschiede zwischen gesunden Spendern und HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. In Abbildung 50 sind die Proben sortiert nach ihrer Ähnlichkeit in einer Heatmap dargestellt. Hierbei ergaben sich zwei optisch voneinander unterscheidbare Cluster. Im ersten Cluster (blaues Cluster in Abbildung 50) befanden sich hauptsächlich Proben, die nicht reaktiv waren. In diesem Cluster befanden sich 91,80 % der Proben von Personen mit HCV Status negativ, allerdings auch 36,90 % der Patienten mit HCV Status akut und 20,59 % der Patienten mit HCV Status chronisch. Das andere Cluster (oranges Cluster in Abbildung 50) enthielt im Prinzip nur Proben von HCV Patienten. Es befanden sich somit 63,10 % der Patienten mit HCV Status akut und 79,41 % der Patienten mit HCV Status chronisch in diesem Cluster. Die Reaktivitäten in diesem Cluster waren stark beschränkt auf die Core-Region. Lediglich auf den Antigenen NS4_1 und HCV Mix konnten ebenfalls verhältnismäßig häufig Reaktivitäten beobachtet werden.

Aus dieser hierarchischen Clusteranalyse wird deutlich, weshalb die diagnostische Relevanz des anti-HCV-IgM Assays nicht ausreichend ist. Die gesunden Spender lassen sich zwar relativ gut durch ihre Nicht-Reaktivität von reaktiven Proben unterscheiden, allerdings konnten insgesamt nur 67,80 % der HCV Patienten dem reaktiven Cluster zugeteilt werden. Bei den IgM Immunprofilen der HCV Patienten bestand außerdem kein ersichtlicher Unterschied zwischen akuter oder chronischer Infektion.

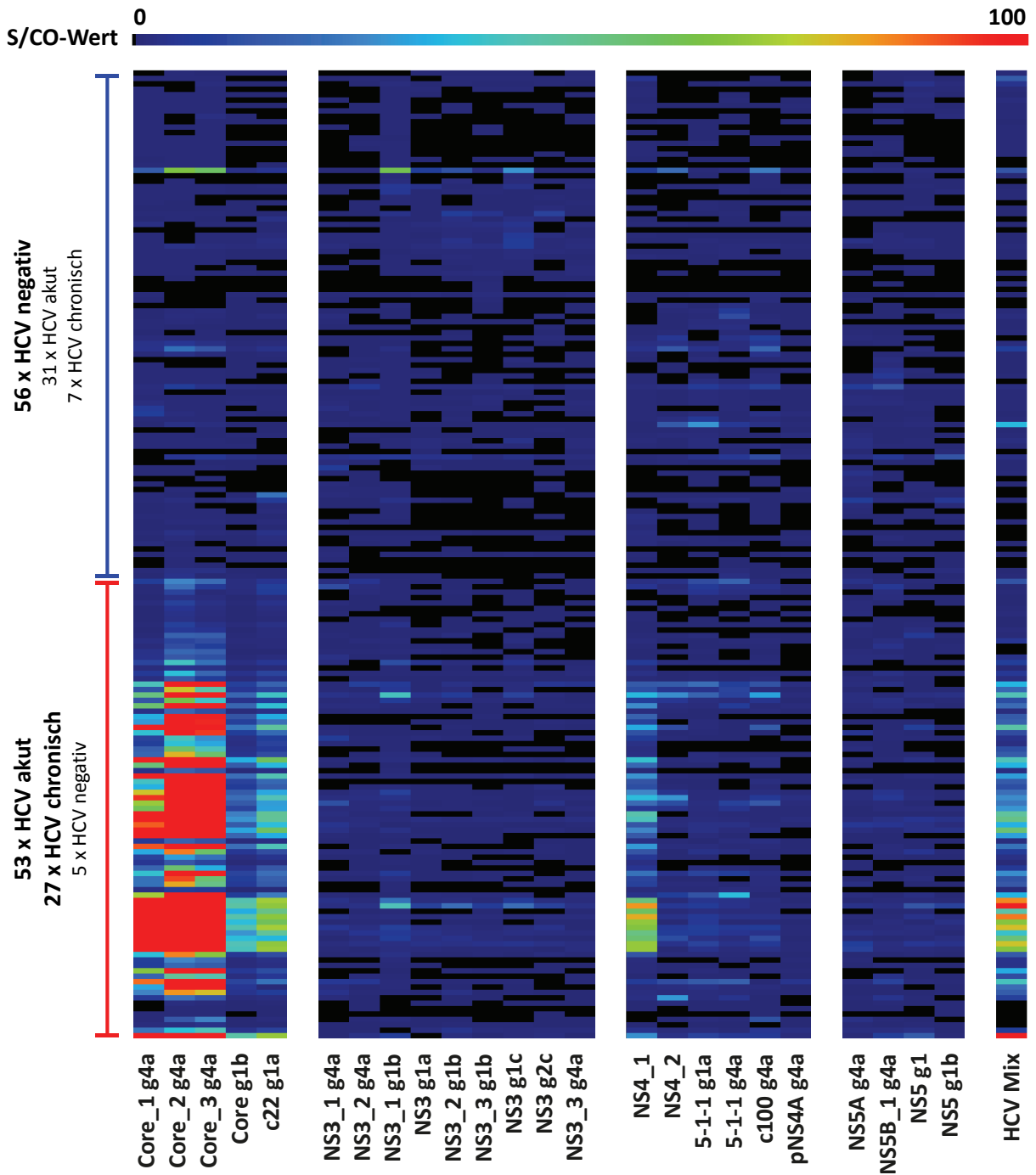


Abbildung 50: Hierarchische Clusteranalyse der IgM Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten. Die Proben wurden entsprechend ihrer Ähnlichkeit sortiert.

4.6 Serologischer Multipathogen-Assay

Ein multiplexer serologischer Assay kann nicht nur Antigene eines einzelnen Pathogens beinhalten, es können auch mehrere Antigene verschiedener Pathogene genutzt werden (Multipathogen-Assay). Ein serologischer Multipathogen-Assay kann für die Diagnostik sinnvoll sein, wenn unterschiedliche Pathogene eine ähnliche klinische Symptomatik verursachen. Statt mehrere verschiedene serologische Diagnostiktests durchzuführen, um das entsprechende Pathogen zu bestimmen, könnte ein einziger Multipathogen-Assay angewendet werden. In Bezug auf Hepatitis C könnte ein serologischer Multipathogen-Assay hilfreich sein, der gleichzeitig eine Infektion mit einem anderen Hepatitis Virus ermöglicht. Außerdem tritt als Symptomatik bei einer HCV Infektion nicht nur ein Ikterus und eine Erhöhung der ALT-Aktivität im Serum auf, sondern auch Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Bauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen sind häufig [17, 25]. Andere Pathogene wie z. B. das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Cytomegalie-Virus (CMV), *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) und *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) können eine ähnliche Symptomatik hervorrufen.

4.6.1 Machbarkeit eines serologischen Multipathogen-Assays

Zur Untersuchung der Machbarkeit eines serologischen Multipathogen-Assays wurde der Mikrosphären-basierte HCV Array um insgesamt 25 Antigene von acht anderen Pathogenen erweitert. Bei den acht Pathogenen handelte es sich um das Hepatitis A Virus (HAV), Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis D Virus (HDV), Hepatitis E Virus (HEV), EBV, CMV, *T. gondii* und *H. pylori*. Die Schwierigkeit bei der Entwicklung eines Multipathogen-Assays ist, dass für jedes Pathogen auch eine klinische Validierung durchgeführt werden muss. Leider stand im Rahmen dieser Arbeit kein entsprechendes Probenmaterial für alle Antigene zur Verfügung. Allerdings konnte mithilfe von Referenzmaterialien von NIBSC eine QC Probe generiert werden, die auch auf 21 von 25 Antigenen anderer Pathogene Reaktivitäten zeigte. Hierbei handelte es sich um die QC positiv 1 Probe, die bereits in 4.1.1.3a beschrieben wurde. Zusammen mit den Proben QC positiv 2, QC positiv 3 und QC negativ wurde eine technische Validierung der IgG Detektion von allen verwendeten nicht-HCV Antigenen durchgeführt, vergleichbar zum anti-HCV-IgG Assay (siehe 4.1.1.4). In Abbildung 51 sind die IgG Reaktivitäten dieser QC Proben im Multipathogen-Assay dargestellt. Von den HCV Antigenen sind die Top 12 Antigene dargestellt (vgl. 4.3.2.4). Abgesehen von der IgG Detektion wurde auch eine IgM Detektion mit dem Multipathogen-Assays technisch validiert. Hierfür standen allerdings keine geeigneten Materialien von NIBSC zur Verfügung, weshalb dieselben Proben wie bei der anti-HCV-IgM Assay Validierung (siehe 4.1.2.3) verwendet wurden.

Wie in Tabelle 60 gezeigt, ergaben sich bei beiden technischen Validierungen sowohl für die Intra-Assay Präzision als auch die Inter-Assay Präzision sehr gute CVs. Bei der Überprüfung der Stabilität (Gefrierzyklen sowie Kurzzeit- und Temperaturstabilität) wurden bei manchen Antigenen v. a. in der QC negativ Probe gelegentlich Schwankungen niedriger Messwerte erhalten, wodurch die referenzierten Werte höher als 120 %, bzw. niedriger als 80 % waren (vgl. Anhang Tabelle 76, Tabelle 77 und Tabelle 78). Die Ergebnisse der Validierungen zeigten, dass ein serologischer Multipathogen-Assay technisch durchaus machbar ist und bei guter Antigenqualität auch die gewünschten Validierungsergebnisse erzielt werden können.

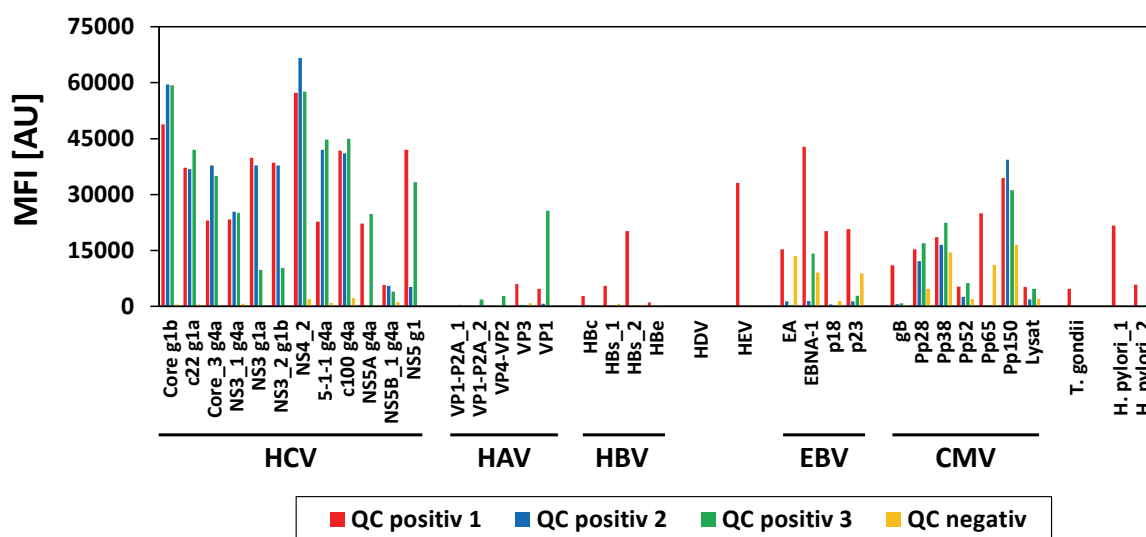


Abbildung 51: QC Proben für die IgG Messung im Multipathogen-Assay. Dargestellt sind die Antikörperreaktivitäten (MFI-Werte) gegenüber zwölf HCV Antigenen, fünf HAV Antigenen, vier HBV Antigenen, vier EBV Antigenen, sieben CMV Antigenen, zwei *H. pylori* Antigenen und jeweils einem HDV, HEV und *T. gondii* Antigenen.

Tabelle 60: Präzision des Multipathogen-Assays. Für die Bestimmung der Intra-Assay Präzision wurden 20 Replikate in einem Experiment gemessen. Für die Inter-Assay Präzision wurden Triplikate an vier verschiedenen Versuchstagen analysiert.

	Intra-Assay Präzision		Inter-Assay Präzision	
	IgG Messung % CV	IgM Messung % CV	IgG Messung % CV	IgM Messung % CV
Mittelwert	3,9	5,5	4,7	6,3
Standardabweichung	1,5	1,9	2,6	3,1
Minimum	1,1	2,2	1,1	1,4
Maximum	9,5	10,9	14,4	23,0

4.6.2 Untersuchung von Proben mit dem Multipathogen-Assay

Auch wenn keine entsprechenden Proben für eine klinische Validierung zur Verfügung standen, konnte dennoch ein kleiner Satz von insgesamt 40 Proben von Patienten mit einer akuten HAV oder HBV Infektion (jeweils 20 Proben) für die Untersuchung im Multipathogen-Assay eingesetzt werden. Diese Proben wurden gemeinsam mit 20 Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion und 26 Proben von gesunden Spendern untersucht. Alle hier verwendeten Proben stammten aus Ägypten. Mit dem Programm WEKA wurde eine Klassifikation der Proben unter Verwendung des Random Forest Klassifikationsverfahrens mit 10-facher Kreuzvalidierung durchgeführt. Hierfür wurden die Messwerte der Top 12 HCV Antigene, der HAV Antigene und der HBV Antigene verwendet. Die Ergebnisse dieser Klassifizierung sind in Tabelle 61 dargestellt. Insgesamt wurden 80,23 % der Proben richtig klassifiziert. Die Proben der Patienten mit akuter HBV Infektion konnten hierbei am schlechtesten eingestuft werden, nur 60,0 % wurden richtig klassifiziert. Am besten wurden die gesunden Spender (92,3 %) und die HAV Patienten (85,0 %) erkannt.

Tabelle 61: Wahrheitsmatrix für die IgG Messung mit dem Multipathogen-Assay. Die Klassifikation erfolgte mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren. Von den Proben waren 26 Proben von gesunden Spendern (HCV negativ), 20 Proben von Patienten mit akuter HAV Infektion (HAV akut), 20 Proben von Patienten mit akuter HBV Infektion (HBV akut) und 20 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut).

		klassifiziert als			
		HAV akut	HBV akut	HCV akut	HCV negativ
klinischer Status	HAV akut	17	2	1	0
	HBV akut	3	12	4	1
	HCV akut	1	3	16	0
	HCV negativ	1	1	0	24

Zur Veranschaulichung und genaueren Untersuchung der Reaktivitäten wurde eine Heatmap der Reaktivitäten dieser Proben erstellt (Abbildung 52). Bei den HAV Patienten wurden v. a. Signale auf den HAV Antigenen VP4-VP2, VP3 und VP1 erhalten. Bei den Proben der Patienten mit akuter HBV Infektion zeigten 18 Patienten Signale auf dem HBV Antigen HBc. Zusätzlich wurden z. T. auch Reaktivitäten auf den anderen HBV Antigenen detektiert. Allerdings wurde in dieser Darstellung auch ersichtlich, weshalb sich die HBV Patienten schlechter klassifizieren ließen. Vier Patienten zeigten u. a. deutliche Signale auf den HCV Antigenen. Wie erwartet, zeigten die HCV Patienten hauptsächlich Signale auf den HCV Antigenen. Es wurden aber ebenfalls Reaktivitäten auf den HAV Antigenen VP3 und VP1 sowie auf dem HBV Antigen HBc erhalten. Die Gruppe der gesunden Spender zeigte nahezu ausschließlich Signale auf den HBV Antigenen HBs_1 und HBs_2.

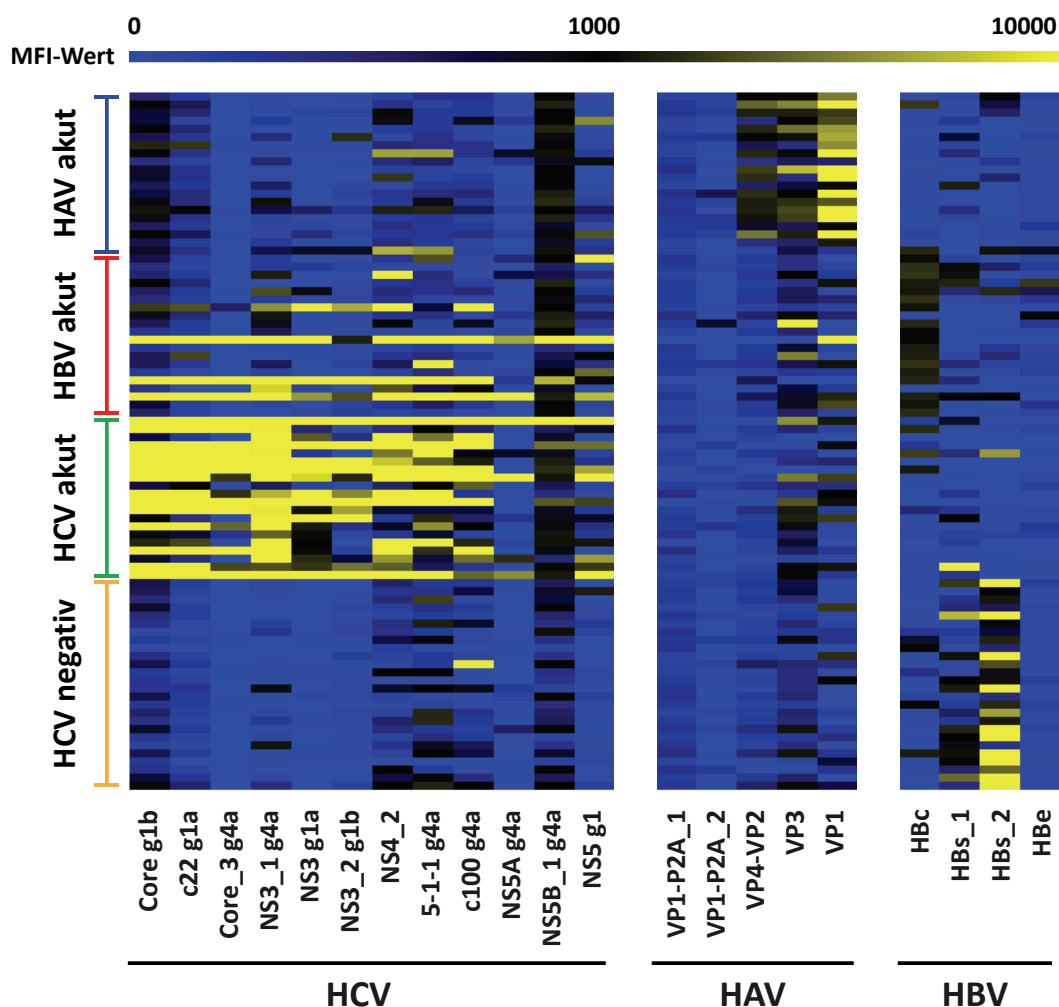


Abbildung 52: Heatmap der IgG Messung im Multipathogen-Assay. Dargestellt sind die Antikörperreaktivitäten (MFI-Werte) gegenüber zwölf HCV Antigenen, fünf HAV Antigenen und vier HBV Antigenen in den Proben aus Tabelle 61.

Da in diesem Probenatz von 60 Hepatitis Patienten ausschließlich akute virale Hepatitis Infektionen vorlagen, wurde ebenfalls eine IgM Messung im Multipathogen-Assay vorgenommen. Zunächst wurde, wie bei der IgG Messung, ein Klassifizierung mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren durchgeführt. Die Wahrheitsmatrix der Klassifizierung ist in Tabelle 62 dargestellt. Insgesamt wurden hierbei 83,3 % der Proben richtig klassifiziert. Die HAV Patienten konnten bei der IgM Messung (95,0 %) sogar besser klassifiziert werden als bei der IgG Messung (85,0 %). Auch die HBV Patienten (85,0 %) wurden in der IgM Messung besser identifiziert, wohingegen die HCV Patienten (70,0 %) schlechter erkannt wurden.

Wie zuvor auch, wurde zur Veranschaulichung und genaueren Untersuchung eine Heatmap der Reaktivitäten dieser Proben erstellt (Abbildung 53). Bei den HAV Patienten wurden, wie bei der IgG Messung auch, Signale auf den HAV Antigenen VP4-VP2, VP3 und VP1 erhalten. Zusätzlich zeigte auch das Antigen VP1-P2A_2 deutliche Reaktivitäten. Eine HAV Probe (unterste HAV Probe in Abbildung 53)

hingegen hatte keine Reaktivitäten auf den HAV Antigenen, sondern auf dem HBV Antigen HBc. Hierbei handelt es sich vermutlich um die eine Probe, die in der Klassifizierung mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren als „HBV akut“ eingeteilt wurde. Insgesamt ließen sich bei den HAV Patienten allerdings auch Signale auf diversen HCV Antigenen und dem HBV Antigen HBc erkennen. Von den HBV Patienten zeigten 17 deutliche Reaktivitäten auf dem HBV Antigen HBc. Insgesamt wurden bei den HBV Patienten aber auch auf diversen HCV und HAV Antigenen Signale erhalten. Die HCV Patienten, die stärkere Reaktivitäten auf HCV Antigenen aufwiesen, zeigten oft auch etwas höhere Signale auf den HAV Antigenen VP4-VP2, VP3 und VP1.

Tabelle 62: Wahrheitsmatrix für die IgM Messung mit dem Multipathogen-Assay. Die Klassifikation erfolgte mit dem Random Forest Klassifikationsverfahren. Von den Proben waren 20 Proben von Patienten mit akuter HAV Infektion (HAV akut), 20 Proben von Patienten mit akuter HBV Infektion (HBV akut) und 20 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion (HCV akut).

		klassifiziert als		
		HAV akut	HBV akut	HCV akut
klinischer Status	HAV akut	19	1	0
	HBV akut	0	17	3
	HCV akut	0	6	14

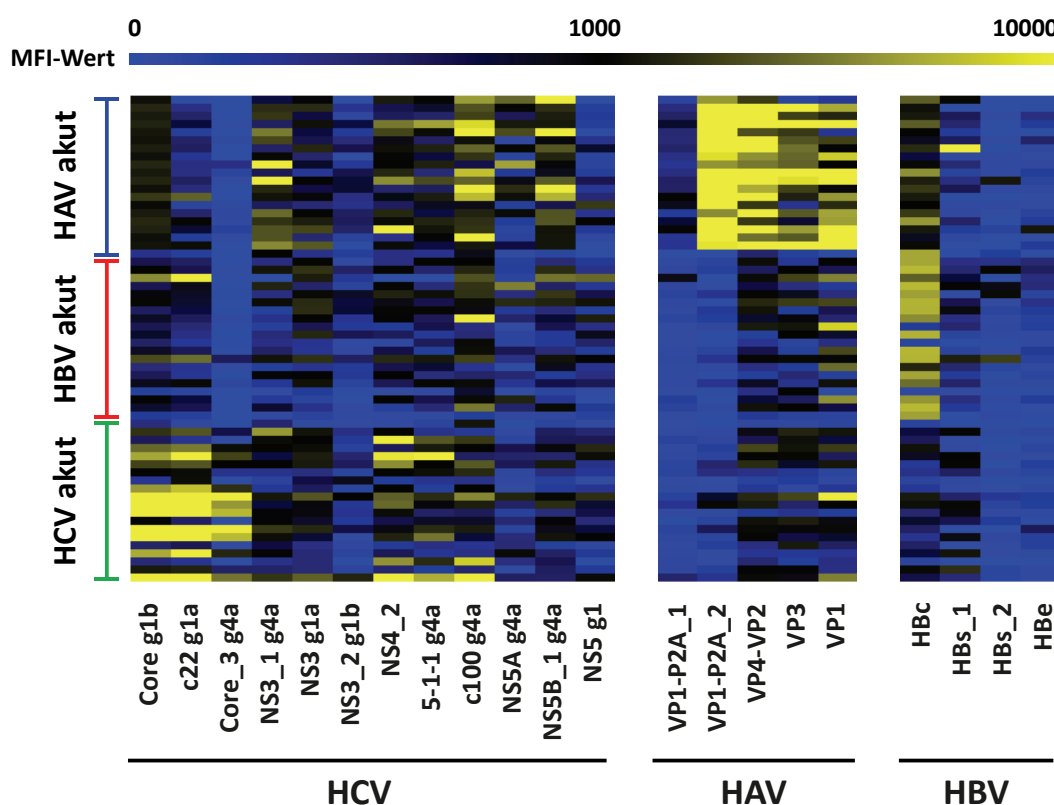


Abbildung 53: Heatmap der IgM Messung im Multipathogen-Assay. Dargestellt sind die Antikörperreaktivitäten (MFI-Werte) gegenüber zwölf HCV Antigenen, fünf HAV Antigenen und vier HBV Antigenen in den Proben aus Tabelle 62.

Obwohl eine IgM Detektion für den HCV Assay nicht unbedingt sinnvoll ist (vgl. 4.5.2), kann eine IgM Messung im Multipathogen-Assay durchaus vorteilhaft sein, denn bei anderen Pathogenen besteht eine diagnostische Relevanz aufgrund der IgM Reaktivitäten gegenüber spezifischen Antigenen. Für eine schnelle Differenzierung einer akuten Hepatitis beispielsweise könnte eine IgM Messung im Multipathogen-Assay durchgeführt werden.

Das vorhandene Probenmaterial zur Analyse mit den serologischen HCV Assays wurde auch mit dem Multipathogen-Assay untersucht. In Abbildung 54 sind die IgG Immunprofile von 117 gesunden Spendern (HCV negativ) und von 307 HCV Patienten (HCV akut und HCV chronisch) im Multipathogen-Assay dargestellt. Die Proben wurden nach ihrer Herkunft (Ägypten, Frankreich und USA) sortiert. Sowohl bei den HCV Patienten als auch bei den gesunden Spendern konnten Reaktivitäten auf Antigenen verschiedener Pathogene gemessen werden. Da allerdings kein Probenmaterial von Personen ohne Vorgeschichte für diese Pathogene verfügbar war, konnte kein Cut-Off berechnet werden. Um dennoch die gemessenen Reaktivitäten besser beurteilen zu können, wurde ein willkürliches Cut-Off von 500 MFI verwendet.

Am auffälligsten in Abbildung 54 sind die Reaktivitäten gegenüber den EBV Antigenen, v. a. EBNA-1 und p23. Bei Anwendung des willkürlichen Cut-Offs zeigten 92,2 % der untersuchten Proben eine Reaktivität gegenüber EBNA-1 und 94,3 % der Proben gegenüber p23. Die Häufigkeit der Reaktivität gegenüber den Antigenen EA und p18 lag allerdings bei 38,7 % und 62,5 %. Auch auf den CMV Antigenen wurden häufig Reaktivitäten erhalten. Dabei zeigten die Antigene Pp150, Pp28, Pp38 und das CMV Lysat in 77,8 % – 81,3 % der Proben Reaktivitäten > 500 MFI. Allerdings zeigten die Proben von HCV negativen Spendern aus Frankreich auf diesen CMV Antigenen seltener Reaktivitäten > 500 MFI, nur 27,9 % – 47,5 % der Proben waren reaktiv.

Sowohl gegenüber Antigenen aus *T. gondii* als auch *H. pylori* konnten ebenfalls in ca. 57 % der Proben Reaktivitäten detektiert werden, wobei Reaktivitäten gegenüber *T. gondii* Lysat häufiger in den Proben aus Frankreich (ca. 70 %) als in den Proben aus Ägypten (ca. 50 %) oder aus den USA (ca. 15 %) auftraten. Auf den *H. pylori* Lysaten hingegen konnte bei den Proben aus Ägypten (ca. 80 %) häufiger Reaktivität gemessen werden, im Vergleich mit den Proben aus Frankreich (ca. 25 %) und den USA (ca. 60 %). Durchaus seltener zeigten sich bei Antigenen anderer Hepatitis Viren hohe Messwerte, wobei die Proben von gesunden Spendern relativ häufig Reaktivität auf den HBs Antigenen zeigten, was eine HBV Impfung vermuten lässt. Reaktivität gegenüber dem HEV Antigen ist in Ägypten (ca. 40 %) häufiger als in Frankreich (ca. 10 %) oder in den USA (0 %). Die Anzahl und Häufigkeit der reaktiven Proben sind im Anhang in Tabelle 79 und Tabelle 80 detailliert für alle nicht-HCV Antigene dargestellt.

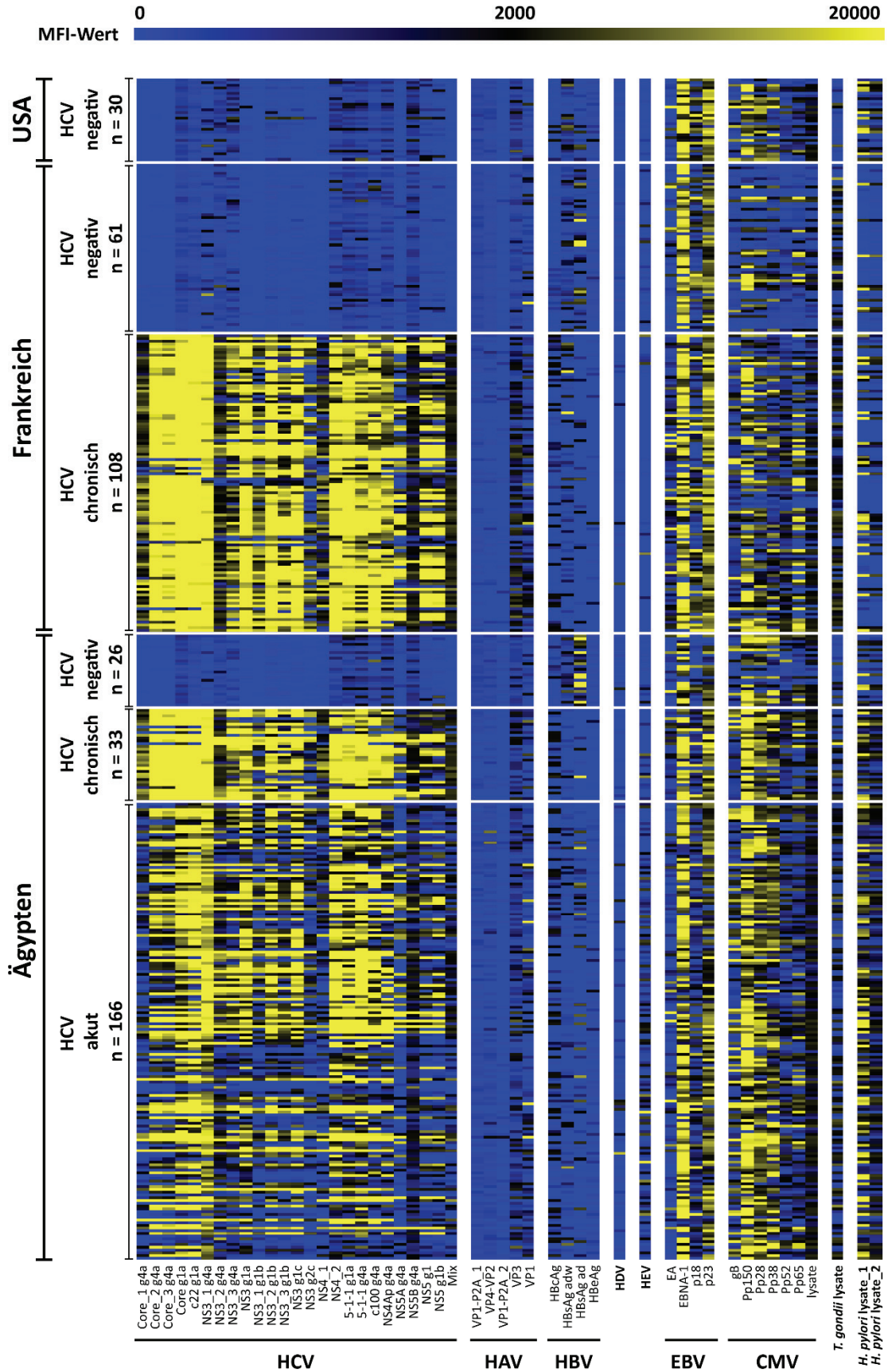


Abbildung 54: Heatmap der IgG Immunprofile von gesunden Spendern und von HCV Patienten im Multipathogen-Assay. Dargestellt sind die Antikörperreaktivitäten (MFI-Werte) gegenüber 50 Antigenen aus insgesamt neun verschiedenen Pathogenen.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung serologischer HCV Assays

Mit den hergestellten HCV g4a Antigenen, synthetisierten HCV Peptiden und weiteren kommerziell erhältlichen HCV Proteinen wurden zwei multiplexe Mikrosphären-basierte serologische HCV Assays entwickelt. Hierbei handelte es sich einerseits um einen Assay zur Detektion von anti-HCV-IgG Antikörpern und andererseits um einen Assay zur Detektion von anti-HCV-IgM Antikörpern. Diese beiden serologischen HCV Assays zeichneten sich durch eine sehr gute analytische Leistungsfähigkeit aus und waren durch den multiplexen Aufbau hervorragend für die Untersuchung der humoralen Immunantwort von HCV Patienten geeignet.

5.1.1 Optimierung der Pufferbedingungen im anti-HCV-IgG Assay

Da zur Immobilisierung der Peptide BSA als Trägerprotein verwendet wurde, musste dem Probenpuffer BSA zugegeben werden, um falsch positive Signale auf den Peptid-Mikrosphären zu verhindern. Des Weiteren besaßen die exprimierten HCV g4a Antigene keine extrem hohe Reinheit, wodurch bei der Immobilisierung ebenfalls die als Verunreinigungen enthaltenen *E. coli* Proteine an die Mikrosphären gebunden wurden. Die Zugabe von ECL im Probenpuffer konnte falsch positive Signale und unspezifische Bindungen auf den Antigen-Mikrosphären stark reduzieren, was u. a. mit der ECL-Mikrosphäre kontrolliert werden konnte. Dieser Effekt wurde auch schon zuvor in anderen Arbeiten beschrieben [105-108]. Ebenfalls waren sehr hohe Signale auf der GST-Mikrosphäre zu beobachten, was die Interpretation von Reaktivitäten gegenüber HCV Antigenen mit einem GST-Tag erschwerte. Ein Zusatz von GST zum Probenpuffer führte zu einer deutlichen Reduktion der Signale auf der GST-Mikrosphäre, sodass die HCV Antigene mit GST-Tag interpretierbar wurden. Auch Waterboer et al. nutzen einen Zusatz von GST im Probenpuffer in Form von einem GST-ECL, um Antikörpersignale gegenüber GST zu blockieren [107]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein GST-ECL ausgetestet, allerdings konnte eine weitaus bessere Blockierung unerwünschter Bindungen mit einem Zusatz von aufgereinigtem GST erzielt werden. Auch andere zuvor beschriebene Pufferkomponenten trugen zur Optimierung des Probenpuffers bei [107-110].

5.1.2 Präzision und Stabilität der Assays

Die Bestimmung der analytischen Leistungsfähigkeit eines Assays ist für eine weitere Verwendung z. B. im Rahmen eines Probenscreenings wichtig [111]. Um diese analytische Leistungsfähigkeit zu bestimmen, wurde eine Validierung der beiden serologischen HCV Assays durchgeführt. Sowohl die

Intra- als auch die Inter-Assay Präzision erzielte in beiden Assays für alle validierten Kontrollen und Antigene sehr gute Ergebnisse. Im anti-HCV-IgG Assay ergab sich ein Intra-Assay CV von 3,7 +/- 2,4 % (1,0 – 16,0 %) und ein Inter-Assay CV von 4,7 +/- 3,5 % (1,0 % – 22,5 %). Bis auf jeweils ein Antigen in der Probe QC negativ waren alle CV Werte beim anti-HCV-IgG Assay kleiner als die gesetzten Akzeptanzkriterien (CV < 15 % bei der Intra-Assay Präzision und CV < 20 % bei der Inter-Assay Präzision). Im anti-HCV-IgM Assay wurde ein Intra-Assay CV von 5,2 +/- 1,7 % (2,7 % – 12,0 %) und ein Inter-Assay CV von 6,3 +/- 4,0 % (1,4 % – 29,6 %) ermittelt. Bei der Intra-Assay Präzision des anti-HCV-IgM Assays lagen alle Antigene in allen Proben im oben genannten Akzeptanzbereich. Bis auf jeweils ein Antigen in der Probe QC negativ und im Blank wurde ebenfalls bei der Inter-Assay Präzision der Akzeptanzbereich eingehalten.

Auch die Stabilität der Antikörper in der Probe schien gegeben zu sein. Nur bei Proben mit sehr niedrigen Messwerten traten gelegentlich größere prozentuale Abweichungen auf. Zudem wurde nicht nur die Stabilität der Antikörper in der Probe betrachtet, sondern auch die Stabilität der immobilisierten Antigene wurde überprüft. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass außer NS3_1 g4a alle Antigene über den Zeitraum von mindestens 20 Wochen eine stabile Reaktivität in Proben aufwiesen. Die Messwerte von NS3_1 g4a reduzierten sich ausgehend vom ersten Zeitpunkt zwar auf ein Drittel, aber mittel- und hochreaktive Proben würden auch nach 20 Wochen noch eine deutliche Reaktivität besitzen. Lediglich geringe Signale würden nach einem gewissen Zeitraum ggf. nicht mehr messbar sein. Die Stabilität der Antigene war insgesamt für ein größeres Probenscreening geeignet.

Interessanterweise zeigte die His-Tag und GST Detektion bei der Stabilität nicht immer eine Übereinstimmung mit den in Proben erhaltenen Daten. Trotz geringer His-Tag oder GST Detektion konnten in Proben gute Reaktivitäten gemessen werden. In Bezug auf den His-Tag könnte die Größe des Tags eine Erklärung liefern. Der sehr kleine His-Tag könnte bei entsprechender Faltung eines Proteins verdeckt werden, weshalb er für einen anti-His-Tag Antikörper nicht mehr zugänglich sein könnte. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass der His-Tag von NS3_1 g4a nach Immobilisierung auf Mikrosphären nicht mehr nachweisbar war. Bei der Analyse im Western Blot, bei dem das Protein denaturiert vorliegt, konnte der His-Tag jedoch detektiert werden, zudem erfolgte die Aufreinigung über den His-Tag. Wenn eine Verringerung des His-Tag Signals oder des GST Signals erst nach einem gewissen Zeitraum eintrat, könnte hierfür eine Veränderung der Faltung des Proteins auf der Mikrosphäre eine Erklärung sein. Möglicherweise könnte z. B. eine Änderung der Faltung des immobilisierten NS5B_1 g4a Antigens stattgefunden haben, wodurch eine His-Tag Detektion erschwert, aber die Reaktivität in den Proben erhöht wurde. Generell muss eine schlechte His-Tag oder GST Detektion also nicht in direktem Zusammenhang mit einer fehlenden Antigenität oder einer

mangelhaften Immobilisierung stehen. Als Qualitätskontrollen in einem Screening sollten daher, neben His-Tag und GST Detektion, immer Proben verwendet werden.

In Bezug auf die Thematik der Stabilität wurden auch unterschiedliche Herstellungsladungen des HCV-Microarrays miteinander verglichen, um festzustellen, ob eine Reproduzierbarkeit der Immobilisierung gegeben ist. Die Reaktivitäten in einer Probe sowie die His-Tag und GST Detektion wiesen z. T. etwas höhere CVs auf. Da allerdings bis auf NS5B_1 g4a kein Antigen sowohl in der Probe als auch in der His-Tag oder GST Detektion einen CV > 20 % zeigte, wurde insgesamt eine gute Reproduzierbarkeit der Immobilisierung angenommen. Trotz CVs größer als 20 % in der His-Tag Detektion und bei der Reaktivität in der Probe, zeigte NS5B_1 g4a eine recht hohe Korrelation der Messwerte eines größeren Probensatzes. Dennoch sollte dieses Antigen in jeder Immobilisierungsladung genau begutachtet werden und ggf. muss eine neue Immobilisierung erfolgen.

Da zudem zwischen der ersten und letzten Immobilisierungsladung des HCV Arrays 20 Monate lagen, kann auch von einer guten Lagerungsstabilität der Antigene bei -80 °C ausgegangen werden. Insgesamt ist die Überprüfung der Immobilisierung ein essentieller Faktor und sollte mit verschiedenen Qualitätskontrollen (Proben sowie His-Tag und GST Detektion) durchgeführt werden.

5.1.3 Verwendung Assay interner Kontrollen

Verschiedene Assay interne Kontrollen wurden u. a. im Rahmen der Pufferoptimierung genutzt. Zudem wurden Kontrollen zur Überprüfung der korrekten Probenzugabe und für die Zugabe des Detektionssystems eingesetzt [87]. Auf den drei Kontroll-Mikrosphären für die Pufferkomponenten konnte im anti-HCV-IgG Assay eine Abhängigkeit der Signalhöhe vom Krankheitszustand beobachtet werden. Als Ursache hierfür wurde u. a. eine mögliche Beteiligung von Rheumafaktoren (RF) vermutet. RF können aus verschiedenen Klassen der Immunglobuline stammen (IgM, IgG, IgA, IgE), aber in diesem Zusammenhang wurden RF der Klasse IgM (IgM-RF) vermutete, da diese durch ihren pentameren Aufbau und ihre Bindungsfähigkeit an den Fc-Teil von IgG als Brücken fungieren können. Durch Anwesenheit von IgM-RF in einer Probe können sonst frei vorliegende Antikörper der Klasse G an den RF gebunden werden und eine geringe, messbare IgG Bindung an den Kontroll-Mikrosphären könnte durch die Bindung von RF verstärkt werden. RF werden bei ungefähr 70 % der Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) gefunden, allerdings auch bei 10 % der Erwachsenen ohne RA [112]. Außerdem können RF-artige Antikörper auch bei diversen anderen Erkrankungen, wie z. B. Pfeiffersches Drüsenfieber oder Hepatitis A [113] auftreten, aber auch z. B. in Form von Kryoglobulinen bei einer Infektion mit HCV, wobei in manchen Untersuchungen sogar 70 % der verwendeten Proben von HCV Patienten RF aufwiesen [89-91, 114-118]. Zudem konnte bei der Entwicklung des anti-HCV-IgM Assays festgestellt werden, dass manche Proben z. T. eine sehr hohe Reaktivität auf der Kontroll-

Mikrosphäre „humane IgG“ zeigten. Auch diese Beobachtung lässt sich durch IgM-RF erklären und eine Fällung von IgG Antikörpern, wodurch IgM-RF ebenfalls abgetrennt werden, konnte die Reaktivitäten auf der humane IgG-Mikrosphäre beseitigen. In Sandwich-Immunoassays werden im Allgemeinen zwei Methoden angewendet, um sich solcher Störfaktoren wie RF zu entledigen: Entfernung der Immunglobuline in der Probe oder Benutzung eines Puffers, der Interferenzen reduziert [119, 120]. Da der anti-HCV-IgG Assay allerdings die Messung von IgG vorsieht, ist eine vollständige Entfernung dieser nicht zielführend. Daher wurde ein weiterer Puffer getestet, der IgM-vermittelte Interferenzen reduzieren soll. Allerdings konnte dadurch das Problem der Abhängigkeit der Signalhöhe vom Krankheitszustand auf den Kontroll-Mikrosphären nicht gelöst werden. Die Ursache für diese Signalhöhe, die in dieser Arbeit als probenspezifisches Hintergrundsignal definiert wurde, könnte neben IgM-RF auch eine polyklonale Gammopathie, bzw. eine Hyper- γ -Globulinämie sein, die ebenfalls bei einer Infektion mit HCV auftreten kann [28, 92-94, 100]. Zur Überprüfung der IgG Konzentration in den Proben wurde ein Assay zur Quantifizierung humaner Immunglobuline G entwickelt (siehe 4.1.6). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die HCV positiven Patienten im Mittel eine um ca. 5 mg/ml höhere IgG Konzentration aufwiesen als die gesunden Spender. Wie auch bei Gonzalez-Quintela et al. [121] und Lotfy et al. [122] ergab sich hierbei ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert $< 0,001$. Der in den HCV Patienten beobachtete Mittelwert von $20,77 \pm 7,32 \text{ mg/ml}$ steht im Einklang mit dem Befund von Fallatah und Akbar [100] sowie Ortariq et al. [123]. Insgesamt zeigten ca. 35 % der HCV Patienten eine erhöhte IgG Konzentration ($> 22 \text{ mg/ml}$), davon hatten ca. 9 % eine sehr starke Erhöhung ($> 30 \text{ mg/ml}$). Obwohl durchaus ein hoher Anteil der HCV Patienten möglicherweise eine polyklonale Gammopathie, bzw. eine Hyper- γ -Globulinämie aufwiesen, konnte kein direkter Zusammenhang der IgG Konzentration und des PSH festgestellt werden.

Die Ursache für den probenspezifischen Hintergrund konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig ermittelt werden, allerdings kann eine Beteiligung von Rheumafaktoren oder eine polyklonale Gammopathie nicht ausgeschlossen werden. Dennoch stellte der PSH ein Problem dar, da sich die HCV Patienten durch die Signale auf den Kontroll-Mikrosphären von gesunden Spendern deutlich unterscheiden ließen und einige HCV Patienten auch auf Antigenen anderer Pathogene positiv getestet wurden. Das Problem konnte letztlich auf der Ebene der Datenverarbeitung durch eine PSH-Korrektur gelöst werden. Diese Form der Datenkorrektur ist v. a. auch als Blank-Korrektur üblich [108, 124-128]. Trotzdem lag das Signal auf der GST-Mikrosphäre häufiger oberhalb des PSH. Würde allerdings dieses Signal wie bei Waterboer et al. [125] oder Michel et al. [108] von den Antigenen, die GST als Fusionspartner haben, subtrahiert werden, entstünden z. T. sehr negative Werte (ca. -13000 MFI). Zwar entstehen auch bei der PSH-Korrektur negative Werte, diese waren aber nur in Ausnahmen

(0,35 %) kleiner als -500 MFI. Prinzipiell dürfte es sich bei der Reaktivität auf der GST-Mikrosphäre um keine spezifische Reaktivität handeln, da durch den Zusatz von ECL und GST im Probenpuffer Antikörper gegen *E. coli* Proteine und gegen GST blockiert werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine spezifische Reaktivität handelt, da möglicherweise die zugegebene Menge an GST nicht ausreichend war. Die Subtraktion des Signals von der GST-Mikrosphäre würde vermutlich spezifische Antigen-Signale unterdrücken, da die immobilisierte Menge an GST auf der GST-Mikrosphäre höchstwahrscheinlich nicht korrespondierend mit der immobilisierten Menge an GST auf einer entsprechenden Antigen-Mikrosphäre ist. Eine Erklärung und Lösung für die GST-Reaktivität konnte bisher nicht gefunden werden. In Bezug auf zukünftige serologische Assays wird daher empfohlen, generell auf GST-Fusionsproteine zu verzichten, damit diese Problematik nicht besteht.

5.2 Bestimmung der diagnostischen Relevanz

Zur Bestimmung der diagnostischen Relevanz der beiden entwickelten serologischen HCV Assays wurde ein initialer Probensatz mit beiden Assays gemessen und anschließend klassifiziert. Das Random Forest Klassifikationsverfahren, das mit der Software WEKA durchgeführt werden kann, ist eine gute Möglichkeit um festzustellen, ob ein entwickelter Test prinzipiell in der Lage ist, eine ausreichende diagnostische Sensitivität und Spezifität zu erfüllen. Um als mögliche Diagnostiktests zu dienen, wurde für diese Assays festgelegt, dass die Sensitivität einen Mindestwert von 95 % und die Spezifität einen Mindestwert von 90 % erzielen sollte. Die Mindestwerte wurden etwas niedriger angesetzt, da das Ergebnis der Klassifizierung mit dem klinischen HCV Status, der auf Nachweis der HCV RNA basiert, verglichen wurde.

Der anti-HCV-IgG Assay wies eine ausreichende diagnostische Sensitivität und Spezifität auf, wobei der Assay hervorragend geeignet ist, um gesunde Spender und HCV Patienten mit einer chronischen Infektion zu unterscheiden. Allerdings war bei den HCV Patienten mit einer akuten Infektion eine vollständige Unterscheidung von den gesunden Spendern nicht möglich. Wie schon erwähnt, wurde der klinischen HCV Status durch Nachweis der HCV RNA ermittelt. Da diese Methode eine HCV Infektion früher detektieren kann, muss bei der Messung von anti-HCV Antikörpern bedacht werden, dass die Antikörper erst 2 bis 26 Wochen nach der Infektion nachweisbar werden [22, 23]. Dieser Zeitraum wird als diagnostisches Fenster oder als diagnostische Lücke bezeichnet. Daher ist eine falsch negative Klassifizierung von manchen Proben der HCV Patienten mit akuter Infektion durchaus zu erwarten.

Der anti-HCV-IgM Assay konnte die gesetzten Mindestwerte für die Sensitivität und Spezifität nicht erzielen. Auch die Kombination der Messdaten des anti-HCV-IgG Assays und des anti-HCV-IgM Assays konnte keine offensichtliche Verbesserung bei der Klassifizierung der Proben von Patienten mit einer akuten HCV Infektion erbringen. Daher wurde auf die Analyse eines größeren Probensatzes mit dem anti-HCV-IgM Assay verzichtet.

5.3 Entwicklung eines Verfahrens zur Probenklassifizierung

Nachdem festgestellt werden konnte, dass die diagnostische Sensitivität und Spezifität des anti-HCV-IgG Assays ausreichend ist, wurde ein Verfahren zur Probenklassifizierung für den anti-HCV-IgG Assay entwickelt, um einen Vergleich mit zwei kommerziell erhältlichen Diagnostiktests durchführen zu können. Außerdem wurde nicht nur eine Klassifizierung in „negativ“ und „positiv“ (primäres Testresultat) angestrebt, sondern die als positiv getesteten Proben sollten des Weiteren entsprechend ihrem HCV Status in „akut“ oder „chronisch“ (sekundäres Testresultat) klassifiziert werden. Kein kommerziell erhältlicher Diagnostiktest ist bisher in der Lage, HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion zu unterscheiden. Der HCV Status kann bei der Entscheidung, eine antivirale Therapie einzuleiten eine Rolle spielen. Einerseits wurde gezeigt, dass Patienten mit akuter HCV Infektion besser auf eine Therapie ansprechen und dass die Behandlung der akuten Hepatitis C das Risiko einer chronischen Infektion stark reduziert [129-132]. Andererseits könnte bei Vorliegen einer akuten HCV Infektion auch zunächst auf eine kostspielige, langwierige und z. T. mit starken Nebenwirkungen behaftete Therapie verzichtet werden, um eine mögliche spontane Eradikation des Virus abzuwarten [133-136].

Im ersten Schritt der Entwicklung eines Klassifikationsverfahrens wurde ein Cut-Off, das auch bei nicht normalverteilten Daten verwendet werden kann, nach der Drei-Sigma-Regel [137-139] für jedes Antigen berechnet. Im Mittel ergab sich für die 27 HCV Antigene ein Cut-Off von 452 +/- 534 MFI, wobei die Spannweite 13 MFI bis 1631 MFI betrug. Die Spannweite verdeutlicht, dass ein allgemeines Cut-Off für alle Antigene nicht praktikabel wäre, denn entweder würde dies zu Einbußen in der analytischen Sensitivität mancher Antigene führen oder zu einer erhöhten Falsch-Positiv-Rate. Das entsprechende Cut-Off wurde im Weiteren auf die gemessenen Signale einer Antigen-Mikrosphäre angewendet.

Bei Betrachtung der S/CO-Werte wurde deutlich, dass nicht alle verwendeten Antigene einer Protein-Region dieselbe Reaktivität in Patientenproben zeigten. Für ein Klassifikationsverfahren sollte daher die Anzahl der Antigene pro Protein-Region verringert werden. Um die Leistung eines jeden HCV Antigens zu beurteilen, wurden verschiedene statistische Analysen durchgeführt. Zunächst wurden p-Werte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur Beurteilung der Signifikanz ermittelt. Bis auf den

p-Wert von NS5B_2 g4a waren alle erhaltenen p-Werte kleiner als das gesetzte Signifikanzniveau. Dies bedeutet, dass bei fast allen Antigenen ein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Spendern und den HCV Patienten festgestellt werden konnte. Die Verteilungen der S/CO-Werte in den Box-Whisker-Plots veranschaulichte allerdings, dass nicht alle Antigene im gleichen Maße für eine Unterscheidung von gesunden Spendern und HCV Patienten geeignet waren. Für eine bessere Beurteilung der Antigene wurden daher ROC Kurven erstellt. Hierbei wurde die Sensitivität bei einer Spezifität von 90 % sowie die Spezifität bei einer Sensitivität von 95 % für jedes Antigen berechnet. Nur vier Antigene konnten sowohl eine Spezifität von mindestens 90 % als auch eine Sensitivität von mindestens 95 % erreichen. Dabei handelte es sich um NS3_1 g4a, NS3 g1a, Core g1b und c22 g1a. Das Peptid c22 g1a wurde zwar entsprechend der Sequenz des HCV Genotyp 1a synthetisiert, allerdings unterscheidet sich diese Sequenz von der des Genotyp 4a nur an einer Position (11 Q→M). Die getesteten Patientenproben stammten hauptsächlich von HCV Patienten, die eine Infektion mit Genotyp 4 aufwiesen, aber es lagen auch Infektionen mit Genotyp 1 vor. Daher ist auch nicht verwunderlich, dass die Antigene der NS3-Region aus HCV g4a und HCV g1a eine bessere Leistung zeigten als das NS3 Antigen aus dem Genotyp 2c. Die Beobachtung, dass keines der NS4 Antigene eine ausreichende Sensitivität und Spezifität als Einzelantigen erzielen konnte, verdeutlicht weshalb anti-HCV Immunoassays der ersten Generation [140-142] nur eine Sensitivität von 87 % und Spezifität von 89 % [143] aufwiesen, denn diese nutzen ausschließlich das c100-3 Protein, das mit der NS4-Region korrespondiert. Noch weniger waren die Antigene der NS5-Region geeignet, um als Einzelantigene eine Unterscheidung von HCV negativen und HCV positiven Proben zu ermöglichen.

Zur Übersicht und Auswahl der besten Antigene wurde eine Rangliste erstellt. Hierfür wurden die Daten der p-Werte, der AUC-Werte und das WEKA Ranking kombiniert. Die vier besten Antigene waren hierbei dieselben wie bei der Analyse der ROC Kurven. Letztlich wurden die 27 HCV Antigene auf 12 Antigene reduziert, wobei jeweils drei Antigene aus einer der vier Protein-Regionen (Core, NS3, NS4 und NS5) stammten. Auch wenn die Antigene der NS4- und NS5-Region weniger nützlich erschienen, wurden diese in der finalen Auswahl beibehalten, damit der Vergleich mit einem kommerziellen Line-Immunoassay gleichartig gestaltet werden konnte. Zur Auswahl dieser 12 Antigene wurde v. a. die Rangliste der Antigene genutzt, dabei wurden meistens die jeweiligen Antigene mit dem höchsten Rang gewählt. Ebenso wurde auch auf eine möglichst vielfältige Abdeckung der Region geachtet, d. h. dass sowohl die Sequenz von Genotyp 1 und Genotyp 4 genutzt wurden als auch verschiedene Sequenzbereiche der jeweiligen Region.

Da gezeigt wurde, dass das Random Forest Klassifikationsverfahren ausschließlich die Antigene der Core- und NS3-Region für eine Klassifizierung benötigte, wurden nur die sechs Core und NS3 Antigene für die Erarbeitung eines Klassifikationsverfahrens für das primäre Testresultat verwendet. Bei der

Überprüfung, welche Proben auf wie vielen Antigenen S/CO-Werte größer als 1 zeigten, konnte festgestellt werden, dass die Gruppe der HCV Patienten mit akuter Infektion sehr heterogen ist und sich somit eine Klassifizierung als schwieriger erwies. Letztlich konnte ein geeignetes Klassifikationsverfahren für das primäre Testresultat entwickelt werden, das bei den untersuchten Proben ein etwas besseres Ergebnis erzielte als das Random Forest Klassifikationsverfahren. Im Vergleich mit dem HCV Status, der mittels HCV RNA Nachweis ermittelt wurde, konnten insgesamt 97,41 % der Proben korrekt klassifiziert werden, die Spezifität betrug 100 % und die Sensitivität 96,42 %.

Auch bei der Entwicklung des Klassifikationsverfahrens für das sekundäre Testresultat wurden die sechs Core und NS3 Antigene verwendet, da das Random Forest Klassifikationsverfahren ebenfalls nur diese Antigene benötigte. Zunächst konnte festgestellt werden, dass der Übergang von HCV Status akut nach HCV Status chronisch nicht eindeutig ersichtlich ist, ähnlich wie bei den gesunden Spendern und den HCV Patienten mit akuter Infektion. Durch Festlegung einer Grenze zwischen HCV akut und HCV chronisch konnten ca. 80 % Proben korrekt klassifiziert werden. Die Anwendbarkeit der AC-Grenze konnte mit einem größeren Probensatz bestätigt werden. Unter Einbeziehung der ALT-Aktivität, welche u. a. als klinischer Marker verwendet wird, konnte eine Verbesserung in der Einstufung des HCV Status ermöglicht werden (89,71 % bzw. 85,14 % korrekt klassifizierte Proben). Das Klassifikationsverfahren ermöglichte auch bei Proben von HCV Patienten in einer späten Phase der akuten Infektion eine korrekte Klassifizierung. Selbst bei Verwendung einer anderen Herstellungscharge des HCV Arrays konnte mit minimalem Aufwand die AC-Grenze korrekt bestimmt werden, indem die Grenzproben-Methode angewendet wurden, bei der 15 Proben im Bereich der AC-Grenze vermessen wurden.

Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit gezeigten Klassifikationsverfahren zur Unterscheidung von HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion, konnten Klimashevskaya et al. [144] mit der Messung der Avidität von anti-HCV IgG Antikörpern eine vollständige Unterscheidung von HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion ermöglichen. Dies gelang allerdings nur, wenn die HCV Infektion maximal zwei Monate zurück lag. Außerdem wurde hierbei nicht gezeigt, ob auch eine Unterscheidung der HCV Patienten mit akuter Infektion von gesunden Spendern möglich war. Zudem wurde keine Validierung des ermittelten Cut-Offs von Klimashevskaya et al. dargestellt und die Gruppengrößen waren nicht ausgeglichen (51 Proben mit HCV Status akut und 365 Proben mit HCV Status chronisch). Im Allgemeinen kann eine Validierung des ermittelten Cut-Offs z. B. durch Anwendung auf einen anderen Probensatz erfolgen.

Araujo et al. [145] wiederum konnten mit einem multiplexen HCV Immunoassay, der ebenfalls die Luminex Technologie nutzte, ein multivariates logistisches Regressionsmodell zur Unterscheidung von HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion erstellen. Dieses Modell verwendete ein Antigen

der Core-Region, vier Antigene der NS3-Region und ein Antigen der NS4-Region. Nach Angaben von Araujo et al. erreichte die Leave-One-Out-Kreuzvalidierung eine Richtigkeit von 90,8 % bei der Gruppe der HCV Patienten mit akuter Infektion und 97,2 % bei der Gruppe der HCV Patienten mit chronischer Infektion. Obwohl Araujo et al. 30 Proben von gesunden Spendern für die Ermittlung eines Cut-Offs nutzten, wurden anscheinend auch Proben von Patienten mit HCV Status akut, die ein S/CO-Wert < 1 zeigten, im Regressionsmodell verwendet. Da die 99 Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion aus Zeitreihen von nur 24 unterschiedlichen Patienten stammten, berechneten Araujo et al. jeweils den Mittelwert der S/CO-Werte eines Patienten über die Zeitreihe und verwendeten diesen im Regressionsmodell. Dieser gemittelte S/CO-Wert eines Patienten kann jedoch das Ergebnis verfälschen, denn bei einem Überschuss an Proben, die niedrige S/CO-Wert aufweisen, würde der gemittelte S/CO-Wert ebenfalls niedriger sein, wodurch die Trennung von HCV Patienten mit chronischer Infektion erleichtert werden würde. Im Gegensatz dazu führt ein Überschuss an Proben mit einem hohen S/CO-Wert zu einer Erhöhung des gemittelten S/CO-Werts, wodurch die Unterscheidung von HCV Patienten mit chronischer Infektion erschwert werden würde. Solange die S/CO-Werte von den Proben eines Patienten nicht ausgeglichen sind, würde sich in jedem Fall ein Fehler in der Klassifizierung ergeben. Auch wenn die 99 Proben von Patienten mit HCV Status akut von nur 24 verschiedenen Patienten stammten, wäre in diesem Zusammenhang eine Betrachtung jeder einzelnen Probe sinnvoller.

Wenn auch mit einigen Mängeln behaftet, konnten Klimashevskaya et al. und Araujo et al. jeweils mit einem Assay, der anti-HCV Antikörper erfasst, ebenfalls eine Möglichkeit aufzeigen, um HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion zu einem gewissen Prozentsatz zur unterscheiden. Im Gegensatz zu Klimashevskaya et al. und Araujo et al. wurden in dieser Arbeit für das Klassifikationsverfahren leicht anwendbare und nachvollziehbare Regeln verwendet. Eine Validierung mit einem größeren Probensatz und die Übertragbarkeit auf eine neue Herstellungscharge des HCV-Microarrays wurden ebenfalls gezeigt.

Auch andere Verfahren wurden beschrieben, um eine akute von einer chronischen HCV Infektion zu unterscheiden, z. B. das Monitoring der Viruslast [146] oder die Messung der Variation des Antikörpertiters [147]. Neben der typischen klinischen Symptomatik kann lediglich bei einem Nachweis der HCV RNA und gleichzeitiger Seronegativität mit hoher Sicherheit von einer akuten HCV Infektion ausgegangen werden [20, 132], weshalb bisher nur diese Methode in der klinischen Diagnostik empfohlen wird [148]. Bezogen auf den hier verwendeten Probensatz würde dies allerdings bedeuten, dass nur bei 11 der 166 Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion (6,6 %) mit hoher Sicherheit eine akute HCV Infektion vorlag. Eine Methode, die auf einer anti-HCV Antikörper Messung

einer Einzelprobe basiert und mit absoluter Richtigkeit eine korrekte Klassifizierung von HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion zulässt, gibt es bisher nicht.

5.4 Referenzmessung mit kommerziell erhältlichen Diagnostiktests

Der entwickelte anti-HCV-IgG Assay wurde mit zwei kommerziell erhältlichen Diagnostiktests verglichen. Als Vergleichstests dienten der Enzymimmunoassay INNO-TEST HCV Ab IV und der Line-Immunoassay INNO-LIA™ HCV Score. Beide Tests wurden von der WHO evaluiert und als aussagekräftig befunden [104].

Basierend auf dem Klassifikationsergebnis des INNOTEST HCV Ab IV, würde die Sensitivität des entwickelten anti-HCV-IgG Assays bei 99,59 % liegen. Der Vergleich mit dem klinischen HCV Status zeigte allerdings, dass bei Verwendung dieser Proben die Sensitivität des anti-HCV-IgG Assays etwas höher war als die Sensitivität des INNOTEST HCV Ab IV. Sowohl der INNOTEST HCV Ab IV als auch der anti-HCV-IgG Assay wies mit den verwendeten Proben eine Spezifität von 100 % auf. Insgesamt wurde festgestellt, dass mit dem entwickelten anti-HCV-IgG Assay Klassifizierungsergebnisse, die mit einem kommerziell erhältlichen EIA vergleichbar sind, erzielt werden konnten.

Da es sich bei dem INNO-LIA™ HCV Score um einen sehr zeitintensiven und kostspieligen Test handelt, wurde nur eine kleine Anzahl von Proben mit dem anti-HCV-IgG Assay verglichen. Die statistischen Gütekriterien wurden bei diesem Vergleich nur als zweitrangig verstanden. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Sensitivität des anti-HCV-IgG Assays vermutlich etwas höher ist, wenn der klinische HCV Status als Referenz genommen wird. Zum Vergleich der Reaktivitäten gegenüber den verschiedenen HCV Antigenen wurde für den anti-HCV-IgG Assay ein ähnliches Auswertungsschema wie für den INNO-LIA™ HCV Score erarbeitet. Eine gewisse Toleranz für die Abweichung der Reaktivitäten wurde eingeräumt. Insgesamt wurden mit dem INNO-LIA™ HCV Score und dem anti-HCV-IgG Assay sehr ähnliche Antigenreaktivitäten erhalten. Lediglich die Reaktivitäten auf der NS3-Region zeigten häufiger und z. T. etwas höhere Abweichungen, wobei im INNO-LIA™ HCV Score die stärkeren Reaktivitäten in den Proben erhalten wurden. Diese Proben hatten im anti-HCV-IgG Assay dennoch eine klare Reaktivität auf der NS3-Region. Die Abstufungen der Antigenreaktivitäten im anti-HCV-IgG Assay könnten daher als genauer angesehen werden, denn die Reaktivitäten im INNO-LIA™ HCV Score waren meistens schon am Maximum angelangt. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Leistung der in dieser Arbeit verwendeten Antigene vergleichbar ist mit der Leistung der Antigene eines kommerziell erhältlichen LIA.

5.5 Analyse von Immunprofilen verschiedener HCV Patienten

5.5.1 Untersuchung von IgG Immunprofilen

Die Immunprofile von HCV Patienten, die sich in verschiedenen Phasen der Infektion befanden, wurden mit dem entwickelten anti-HCV-IgG Assay untersucht. Im Vergleich mit gesunden Spendern ergab sich in der hierarchischen Clusteranalyse, dass bei einigen HCV Patienten mit akuter Infektion noch keine oder nur eine geringe Serokonversion stattgefunden hat. Proben von HCV Patienten mit akuter Infektion ohne ersichtliches HCV Immunprofil konnten daher mit dem entwickelten Klassifikationsverfahren auch nicht als „HCV positiv“ eingestuft werden. Die hierarchische Clusteranalyse zeigte zudem, dass die Immunprofile der HCV Patienten in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden konnten. Eine Gruppe zeigte generell starke Reaktivitäten auf allen HCV Protein-Regionen, wobei sich 53,9 % der untersuchten HCV Patienten mit chronischer Infektion in dieser Gruppe befanden. Die ebenfalls hohe Reaktivität auf dem Antigen HCV-Mix, das immunreaktive Bereiche der Core-, NS3-, NS4- und NS5-Region enthält, spiegelt diese hohe Reaktivität auf allen Protein-Regionen wieder. Eine weitere Gruppe zeigte auf der Core-, NS3- und NS5-Region starke Reaktivitäten, allerdings etwas schwächere Reaktivitäten auf der NS4-Region und dem Antigen HCV Mix. In dieser Gruppe wiederum befanden sich 24,1 % der HCV Patienten mit chronischer Infektion. Die restlichen ca. 22 % der Patienten mit HCV Status chronisch verteilten sich auf die dritte und vierte Gruppe. Die dritte Gruppe zeigte stärkere Reaktivität auf der Core-Region als auf der NS3-Region, während die vierte Gruppe stärkere Reaktivität auf der NS3-Region als auf der Core-Region aufwies. Vor allem in der vierten Gruppe wurden weniger oder keine Antikörper gegen NS4 oder NS5 Antigene detektiert. Die Patienten mit akuter HCV Infektion zeigten eine relativ ausgeglichene Verteilung über diese vier Gruppen der HCV IgG Immunprofile, wobei ca. 60 % der reaktiven Proben in Gruppe 3 und 4 gefunden wurden.

Des Weiteren wurde die Verteilung der Reaktivitätsintensitäten von den HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion verglichen. Bei HCV Patienten mit akuter Infektion wurden bei der Core- und NS3-Region häufiger Werte im unteren Intensitätsbereich erhalten. Bei der NS4- und NS5-Region zeigten die HCV Patienten mit akuter und chronischer Infektion eine ähnliche Verteilung der Reaktivitätsintensitäten.

Aus der hierarchischen Clusteranalyse kann geschlossen werden, dass Antikörper gegen Antigene der NS4- und NS5-Region meist erst in einer späteren Phase der Serokonversion auftreten. Auch Xu et al. [149] kamen zu dem Ergebnis, dass anti-NS5 Antikörper relativ spät auftreten, bei chronischen HCV Patienten sogar z. T. erst Jahre nach der Infektion. Beim Vergleich der Verteilung der Reaktivitätsintensitäten konnte zudem bemerkt werden, dass nur bei der Core- und NS3-Region gewisse

Unterschiede zwischen HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion auftraten. Beide Analysen ergaben, dass zwar bei Vorliegen einer Reaktivität gegenüber NS4 und NS5 Antigenen eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass es sich um eine chronische HCV Infektion handelt (ca. 66 %), allerdings kann eine akute Infektion nicht ausgeschlossen werden. Diese Befunde erklären, weshalb die NS4 und NS5 Antigene im entwickelten Klassifikationsverfahren sowohl für das primäre als auch das sekundäre Testresultat keine Relevanz besaßen.

Abgesehen von Unterschieden zwischen Patienten mit akuter oder chronischer HCV Infektion, konnten auch Unterschiede zwischen Antigenen derselben Protein-Region festgestellt werden. Bei der Funktionalität und Leistung der Antigene spielen offensichtlich Faktoren wie der *E. coli* Expressionsstamm, die Aufreinigungsmethode, die zugrunde liegende Genotyp-spezifische Proteinsequenz und der Bereich einer Protein-Region eine wichtige Rolle. Da die Qualität der Antigene bei einem serologischen Test essentiell ist, sollten bei der Entwicklung eines solchen Assays diese eben beschriebenen Faktoren berücksichtigt werden. Hierfür ist die multiplexe Mikrosphären-basierte Technologie für die parallele und breite Testung zur Auswahl von optimalen Antigenen eine gut geeignete Methode.

Die hierarchische Clusteranalyse der HCV IgG Immunprofile von Patienten mit oder ohne spätere spontane Eradikation des Hepatitis C Virus ergab zwar drei unterscheidbare Cluster, allerdings war die Anzahl der Proben mit und ohne spontane Eradikation in allen Clustern nahezu gleich. Mit dieser Analyse konnte kein HCV IgG Immunprofil identifiziert werden, das im Zusammenhang mit einer spontanen Eradikation steht. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Proben von Patienten, die eine klinische Symptomatik nach der Infektion aufwiesen. Da eine spontane Eradikation von HCV allerdings bei Patienten mit Symptomatik häufiger auftritt [133], könnte ein Vergleich der HCV IgG Immunprofile von Patienten mit und ohne Symptomatik andere Erkenntnisse erbringen. In Bezug auf die Einleitung einer antiviralen Therapie ist es von Vorteil schon frühzeitig eine Abschätzung zur Wahrscheinlichkeit, ob eine spontane Eradikation des Virus eintreten wird, abgeben zu können. Daher wäre die Entdeckung eines HCV IgG Immunprofils, das eine solche Abschätzung ermöglicht, wünschenswert. Bisher wurden nur Antikörper gegen die HCV Glykoproteine E1 und E2 als neutralisierende Antikörper beschrieben, die auch eine gewisse protektive Wirkung in Hinblick auf eine mögliche Vakzinierung besitzen [150-154]. Der in dieser Arbeit entwickelte serologische anti-HCV Assay könnte durch die Verwendung der multiplexen Technologie relativ problemlos um die Antigene E1 und E2 erweitert werden. Aufgrund der wichtigen Glykosylierungen sollten allerdings keine *E. coli* exprimierten Proteine verwendet werden. Eine erfolgreiche Expression in der Hefe *Pichia pastoris* wurde für ein verkürztes E1-E2 Protein beschrieben [155].

Der Vergleich von Patienten mit einer chronischen HCV g1 oder HCV g4 Infektion zeigte, dass insgesamt nur kleinere Unterschiede der Reaktivitätsintensitäten auf den verwendeten Antigenen in Abhängigkeit vom HCV Genotyp festgestellt werden konnten. Auf der NS3-Region zeigten die Histogramme für die Antigene NS3 g1a und NS3_1 g4a kleinere, optisch erfassbare Unterschiede. Ebenfalls konnten kleinere Unterschiede bei dem Peptid 5-1-1, welches jeweils entsprechend der Proteinsequenz aus HCV g1a und HCV g4a synthetisiert wurde, festgestellt werden. Das Peptid besteht aus 42 Aminosäuren und die beiden Genotyp-spezifischen Sequenzen unterscheiden sich an neun Positionen, dies ergibt eine Sequenzübereinstimmung von 78,57 %. Eine Klassifikationsanalyse ergab außerdem, dass sich die Patienten mit HCV g1 und HCV g4 Infektion durch die Antigene NS3_3 g1b, NS3 g1c, 5-1-1 g4a und 5-1-1 g1a zu 73,96 % entsprechend des HCV Genotyps richtig klassifizieren ließen. Auch wenn kleine, HCV Genotyp-abhängige Unterschiede bei der Reaktivität gegenüber Antigenen festgestellt werden konnten, sind diese nicht ausschlaggebend dafür, ob eine Probe in dem Klassifikationsverfahren richtig als „HCV positiv“ erkannt wurde. Jedoch ein Vergleich von Patienten mit akuter HCV g4 Infektion und HCV g1 Infektion (und anderen Genotypen) könnte zeigen, wie stark der Einfluss der Genotyp-spezifischen Sequenz eines Antigens auf die Klassifizierung als „HCV positiv“ bei Proben von Patienten mit akuter HCV Infektion ist.

Dennoch zeigte diese Untersuchung, dass ein Potential zur serologischen Bestimmung des HCV Genotyps besteht. Da verschiedene HCV Genotypen unterschiedlich auf eine Therapie ansprechen und sich daher die Art der Behandlung ebenfalls nach dem Genotyp richtet [47], muss eine Genotypisierung stattfinden. Kommerziell erhältliche Assays zur Genotypisierung nutzen meist teure Sequenzierungs- und Hybridisierungstechniken [20, 156, 157]. Ein serologischer Assay zur Genotypisierung, der auch als Serotypisierung bezeichnet wird, steht kommerziell nicht mehr zur Verfügung. Neben dem Vorteil, dass eine Serotypisierung einfacher durchzuführen ist, lieferte der Test auch bei nicht nachweisbarer HCV RNA zuverlässige Ergebnisse [158, 159]. Da der ehemals verfügbare Test zur Serotypisierung jedoch nur die sechs Hauptgenotypen unterscheiden konnte, wäre eine Methode zur detaillierteren Bestimmung von Subtypen nützlich. Schon des Öfteren wurde die NS4-Region als Möglichkeit für eine Serotypisierung beschrieben [160-162]. In Übereinstimmung mit dem Befund in dieser Arbeit, verwendeten Schröter et al. [162] Peptide mit einer Länge von 55 Aminosäuren und einer Sequenz aus der NS4-Region, welche die 5-1-1 Sequenz beinhaltet. Hierbei konnten die HCV Subtypen 1a, 1b, 2a, 2b, 3a und 4a unterschieden werden. Obwohl eine Spezifität von 100 % erreicht wurde, ist die Sensitivität mit 86 % nicht ganz zufriedenstellend. Der Grund für die etwas niedrige Sensitivität war einerseits ein niedriger anti-HCV Antikörpertiter oder der vollständige Mangel an anti-NS4 Antikörpern. In Kombination mit anderen Protein-Regionen könnte evtl. eine höhere Sensitivität erreicht werden. Zwar eignet sich z. B. die hochreaktive Core-Region nicht als alleinige Region zur Serotypi-

sierung [163], aber ein Assay, der mehrere Regionen abdeckt, hätte durchaus das Potential eine Serotypisierung mit höherer Sensitivität zu ermöglichen. Ein multiplexes Array-System bietet eine gute Möglichkeit, um die hohe Anzahl an benötigten Antigenen für eine Serotypisierung abzudecken.

Bei der Untersuchung der Zeitreihen konnte zunächst festgestellt werden, dass der anti-HCV Antikörpertiter nach spontaner Eradikation des Hepatitis C Virus absinkt. Dies war bereits bei 10 der 13 Patienten (76,92 %) messbar. Die Antikörpertiter verringerten sich meist auf allen vier HCV Protein-Regionen (Core, NS3, NS4 und NS5). Da die Patienten Infektionen mit HCV g4 aufwiesen, wurde die Reduzierung des Antikörpertiters auf den Genotyp-spezifischen Antigenen genauer untersucht. Während bei der Core-Region die Reaktivität gegenüber der HCV g4a Antigene stärker abnahm als bei den Antigenen anderer HCV Genotypen, konnte bei der NS3-Region das Gegenteil festgestellt werden. Wie bei der NS3-Region, wurde auch bei dem 5-1-1 g1a Antigen ein stärkerer Rückgang der Reaktivität beobachtet. Eine mögliche Erklärung für den nicht gegebenen oder geringeren Rückgang der Reaktivität auf einem Antigen wäre ein sehr viel höherer initialer Titer von diesem speziellen Antikörper, wodurch mit der verwendeten Verdünnung in der Nähe der oberen Detektionsgrenze und außerhalb eines linearen Bereichs gemessen wurde. Der Rückgang würde dann vermutlich bei einer stärkeren Probenverdünnung sichtbar werden. Da bei dieser Untersuchung keine Proben der Patienten zur Verfügung standen, die zu späteren Zeitpunkten nach Eradikation generiert wurden, konnte nicht analysiert werden, wie lange anti-HCV Antikörper bei diesen Patienten nachweisbar geblieben wären. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass selbst 10 Jahre nach Eradikation des Hepatitis C Virus mittels Interferon Therapie in zuvor chronischen HCV Patienten stark positive Antikörpertiter gegen das Core Protein festgestellt wurden, während Antikörper gegen NS3, NS4 und NS5 Proteine stark abgesunken waren [164, 165]. Takaki et al. ermittelten, dass in vielen Patienten 18 bis 20 Jahre nach einer spontanen Eradikation keine HCV-spezifischen Antikörper mehr nachgewiesen werden konnten [166].

Die Analyse der Zeitreihen von chronischen HCV g4 Patienten zeigte, dass sehr unterschiedliche IgG Immunprofile auftreten können. Diese Immunprofile verhielten sich zudem nicht statisch, es konnten Veränderungen der humoralen Immunantwort beobachtet werden. Nicht nur die Viruslast konnte einen fluktuierenden Verlauf aufweisen, auch die Reaktivitäten gegenüber bestimmter Antigenen zeigten ein ähnliches Verhalten. Bei dem Titer mancher anti-Core und anti-NS4 Antikörper könnte ein Zusammenhang mit der Viruslast bestehen. Auch wenn bisher keine neutralisierende Wirkung für diese Antikörper beschrieben wurde, scheint dennoch die Viruslast in manchen Fällen den Antikörpertiter zu beeinflussen, denn auf den NS4 Antigenen konnte z. T. ein konträrer Verlauf zur Viruslast beobachtet werden. Des Weiteren konnte der völlige Verlust der Reaktivität gegenüber manchen

Antigenen nach einer gewissen Zeitspanne festgestellt werden. Da es sich hierbei um Antigene mit einer anderen Genotyp-spezifischen Sequenz (nicht HCV g4) handelte, könnte die Reifung der Antikörper des Patienten gegenüber HCV g4 hierfür eine mögliche Erklärung liefern. Durch die Reifung könnte es mit der Zeit zum Verlust der initialen Reaktivität kommen.

5.5.2 Untersuchung von IgM Immunprofilen

Im Allgemeinen treten bei der humoralen Immunantwort IgM Antikörper noch vor IgG Antikörpern auf, weshalb eine Messung von IgM Antikörpern zur Erfassung der frühen serologischen Immunantwort dient. In dieser Arbeit wurde ein kleiner initialer Probensatz mit dem entwickelten anti-HCV-IgM Assay untersucht. Die hierarchische Clusteranalyse verdeutlichte, weshalb die diagnostische Relevanz des anti-HCV-IgM Assays nicht ausreichend ist. Die gesunden Spender ließen sich zwar relativ gut durch ihre Nicht-Reaktivität von reaktiven Proben unterscheiden, allerdings konnten insgesamt nur 67,80 % der HCV Patienten als reaktiv erkannt werden. Patienten, die anti-HCV Antikörper der Klasse M aufwiesen, hatten v. a. Reaktivitäten gegen Antigene der Core-Region. Bei den IgM Immunprofilen der HCV Patienten bestand außerdem kein ersichtlicher Unterschied zwischen akuter oder chronischer Infektion. Diese Beobachtungen befinden sich im Einklang mit den Befunden von anderen Arbeitsgruppen [167-170], wobei die prozentuale Menge der reaktiven Proben z. T. sehr verschieden war. Durch die geringe diagnostische Sensitivität ist ein anti-HCV IgM Assay daher weder für eine frühe Diagnostik einer HCV Infektion noch für die Unterscheidung von HCV Patienten mit akuter oder chronischer Infektion geeignet [171].

5.6 Serologischer Multipathogen-Assay

Wenn unterschiedliche Pathogene eine ähnliche klinische Symptomatik verursachen, könnte ein serologischer Multipathogen-Assay in der klinischen Diagnostik sowohl Kosten als auch Zeit einsparen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Machbarkeit eines serologischen Multipathogen-Assays in Bezug auf die Symptomatik einer akuten Hepatitis überprüft. Nach der Entwicklung und technischen Validierung wurden verschiedene Proben mit diesem Assay untersucht. Anhand eines kleinen Probensatzes wurde die Möglichkeit, verschiedene akute virale Hepatitis Erkrankungen zu unterscheiden, analysiert. Zwar konnte bei dieser Untersuchung kein optimales Ergebnis erzielt werden, dennoch zeigte sich die mögliche Leistungsfähigkeit des Assays, denn insgesamt konnten ca. 80 % der Proben richtig klassifiziert werden. Vier Patienten mit akuter HBV Infektion zeigten außerdem deutliche IgG Reaktivitäten auf HCV Antigenen, weshalb von einer früheren HCV Infektion ausgegangen wird. Daher ist allerdings auch nicht verwunderlich, dass diese Proben vermutlich nicht korrekt klassifiziert werden

konnten. Zudem sollte bedacht werden, dass HCV Patienten relativ häufig Reaktivität gegenüber dem HBc Antigen, das ein HBV Protein ist, aufweisen [172-174]. Dies kann die Klassifizierung prinzipiell erschweren. Um die wirkliche Leistungsfähigkeit dieses Assays zu bestimmen, müsste zunächst ein Cut-Off mithilfe von gesunden Spendern, die keine Vorgeschichte für diese Erkrankungen haben und bestenfalls auch keine Impfungen erhalten hatten, bestimmt werden. Anschließend müsste ein größerer Probensatz vermessen werden. Zur Optimierung könnten selbstverständlich auch andere kommerziell erhältliche Antigene dieser Hepatitis Viren getestet werden.

Obwohl eine IgM Bestimmung für den Nachweis von HCV nicht unbedingt sinnvoll ist, kann eine IgM Messung im Multipathogen-Assay durchaus vorteilhaft sein, denn bei anderen Pathogenen besteht eine diagnostische Relevanz aufgrund der IgM Reaktivitäten gegenüber spezifischen Antigenen. Für eine schnelle Differenzierung einer akuten Hepatitis beispielsweise könnte eine IgM Messung im Multipathogen-Assay durchgeführt werden.

Die Analyse von gesunden Spendern und HCV Patienten im Multipathogen-Assay ergab eine hohe Reaktivität (> 90 %) gegenüber den EBV Antigenen EBNA-1 und p23. Dieser Befund stimmt überein mit der Tatsache, dass über 90 % der Erwachsenen in ihrem Leben eine Infektion mit EBV erfahren haben [175] und dass IgG Antikörper gegen diese beiden Antigene lebenslang erhalten bleiben [176]. Bei Patienten mit einer Reaktivität gegenüber dem Antigen EA und ohne Reaktivität gegenüber EBNA-1 könnte evtl. eine akute EBV Infektion vorgelegen haben. Auch die Häufigkeit der Reaktivität gegenüber CMV Antigenen steht im Einklang mit der vermuteten Durchseuchung der Bevölkerung [177, 178]. In einigen gesunden Spendern konnten außerdem Reaktivitäten auf den beiden HBs Antigenen detektiert werden. Bei alleiniger Reaktivität auf HBs ohne Vorliegen einer Reaktivität gegenüber HBc kann von einer Impfung gegen HBV ausgegangen werden [179]. Zuletzt waren noch die Reaktivitäten gegenüber Antigenen aus *T. gondii* als auch *H. pylori* in ca. 57 % der Proben auffällig. Auch dieser Befund liegt durchaus im Bereich der gängigen Angaben [180, 181]. Die Durchseuchung der Bevölkerung mit manchen Pathogenen scheint von der geografischen Region abhängig zu sein. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten ergeben eine höhere Seroprävalenz für *T. gondii* in Frankreich als in Ägypten oder in den USA, wohingegen die Seroprävalenz von HEV und *H. pylori* in Ägypten höher ist als in Frankreich oder in den USA. Allerdings sollte darauf hingewiesen werden, dass die Anzahl der untersuchten Proben aus den USA relativ gering war und daher nicht repräsentativ.

Mit der Analyse der vorhandenen Proben von gesunden Spendern und HCV Patienten konnte festgestellt werden, dass mit dem Multipathogen-Assay v. a. Antikörper gegen eine zurückliegende Infektion oder Impfung nachgewiesen werden können. Dieser oder ein ähnlicher Assay würde sich daher auch gut für Vakzinierungsstudien oder Studien zur Ermittlung der Durchseuchung einer Bevölkerungsgruppe mit verschiedenen Pathogenen eignen.

6 Zusammenfassung

Hepatitis C ist eine durch das Hepatitis C Virus verursachte Lebererkrankung und zeigt global sehr unterschiedliche Prävalenzen. Die Verbreitung der sieben HCV Genotypen unterscheidet sich ebenfalls geografisch sehr stark. In Ägypten beträgt die Prävalenz für eine aktive HCV Infektion 10 % und die Seroprävalenz 15 % [32]. Außerdem ist Ägypten weltweit das Land mit der höchsten Prävalenz von HCV Genotyp 4 [33]. Zur Vermeidung von Folgeerkrankungen wie Zirrhosen und Hepatozellulären Karzinomen wird eine Eradikation des Virus angestrebt. Falls eine Eradikation während der akuten Infektionsphase nicht spontan erfolgt, kann eine antivirale Therapie eingeleitet werden, die inzwischen in über 90 % der Fälle erfolgreich ist [47]. Der HCV Status (akut oder chronisch) kann daher bei der Entscheidung, eine antivirale Therapie einzuleiten, eine wichtige Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurden zwei multiplexe serologische Assays zum Nachweis von anti-HCV Antikörpern der Klasse G und der Klasse M in humanen Proben entwickelt und validiert. Der multiplexe Mikrosphären-basierte serologische Assay kombiniert hierbei die Vorteile von zwei etablierten HCV Diagnostiktests: Zum einen die Durchführung des Assays im klassischen 96-Well Mikrotiterplatten Format, mit dem eine große Anzahl von Proben parallel und schnell vermessen werden können, zum anderen können mit dem Mikrosphären-basierten Assay – wie beim Line-Immunoassay – mehrere Antigene parallel im Assay verwendet werden, wodurch die Reaktivitäten gegenüber verschiedenen HCV Antigenen differenziell betrachtet werden können. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten serologischen HCV Assays setzten sich aus 27, bzw. 25 verschiedenen HCV Antigenen sowie sechs internen Kontrollen zusammen und benötigten jeweils 5 µl humanes Serum oder Plasma zur Messung der IgG oder IgM Reaktivität.

Mit dem anti-HCV-IgG Assay wurde ein gut charakterisierter klinischer Probensatz untersucht, der 117 Proben von Spendern mit HCV Status negativ, 166 Proben von Patienten mit HCV Status akut und 141 Proben von Patienten mit HCV Status chronisch beinhaltete. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der anti-HCV-IgG Assay im Vergleich mit der klinischen Klassifizierung eine hohe diagnostische Spezifität (100 %) und Sensitivität (96,4 %) aufweist. Der Vergleich mit der EIA Referenzmessung zeigte eine Übereinstimmung der Spezifität und eine etwas bessere diagnostische Sensitivität im multiplexen Mikrosphären-basierten serologischen Assay als im EIA (96,4 % versus 95,2 %). Die Referenzmessung mit dem LIA bestätigte die Anwendbarkeit zur differenziellen Betrachtung von Antikörperreaktivitäten. Das entwickelte Klassifikationsverfahren zur weiteren Unterscheidung von HCV Patienten in „akut“ und „chronisch“ konnte 85,1 % der Proben ihrem HCV Status entsprechend richtig klassifizieren. Diese Art der Klassifizierung bietet die Möglichkeit die klinische HCV Diagnostik zu ergänzen.

Die Ergebnisse des anti-HCV-IgM Assays hingegen ergaben, dass sich dieser Assay nicht für die Klassifizierung von HCV Patientenproben eignete. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Zusammenhang mit anderen viralen Hepatitis Infektionen eine IgM Detektion durchaus sinnvoll erscheint.

Durch die gezielte Verwendung von HCV g4a Antigenen in diesen serologischen HCV Assays, wurde eine detailliertere Untersuchung der humoralen Immunantwort von Patienten mit einer HCV g4 Infektion ermöglicht. Die hierarchische Clusteranalyse der IgG Messung zeigte, dass die Immunprofile der HCV Patienten in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden konnten. Die stärkste Reaktivität lag hier jeweils auf der Core- und NS3-Region, Antikörper gegen Antigene der NS4- und NS5-Region traten meist erst in einer späteren Phase der Serokonversion auf. Die Analyse der Proben von Patienten mit und ohne spontane Eradikation ergab kein spezielles serologisches Immunprofil, das im Zusammenhang mit einer spontanen Eradikation von HCV steht. Bei der Untersuchung von Zeitreihen konnte zunächst festgestellt werden, dass der anti-HCV Antikörpertiter nach spontaner HCV Eradikation absinkt. Die Analyse von Zeitreihen von chronischen HCV g4 Patienten zeigte zudem, dass auch diese Immunprofile nicht statisch sind, denn es konnten auch nach längerer Zeit noch Veränderungen der humoralen Immunantwort beobachtet werden. Nicht nur die Viruslast konnte einen fluktuierenden Verlauf aufweisen, auch die Reaktivitäten gegenüber bestimmten Antigenen zeigten ein ähnliches und z. T. verzögertes Verhalten.

Durch multiplexe serologische Assays ist es möglich in einem einzigen Test die Antikörperreaktivitäten auf hunderten von Antigenen zu ermitteln. Solche Tests können zur Detailcharakterisierung von Reaktivitäten gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen dienen und haben langfristig gesehen das Potential, in der Routinediagnostik eingesetzt zu werden.

7 Literaturverzeichnis

1. WHO. *Hepatitis C - Fact sheet N°164*. July 2015; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
2. Mohd Hanafiah, K., et al., *Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence*. *Hepatology*, 2013. **57**(4): p. 1333-1342.
3. Choo, Q.-L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. *Science*, 1989. **244**: p. 359-362.
4. Simmonds, P., et al., *Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions*. *J Gen Virol*, 1994. **75 (Pt 5)**: p. 1053-1061.
5. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. *Nature*, 2005. **436**(7053): p. 933-938.
6. Simmonds, P., *Reconstructing the origins of human hepatitis viruses*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. **356**(1411): p. 1013-26.
7. Simmonds, P., et al., *A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes*. *Hepatology*, 1994. **19**(5): p. 1321-1324.
8. Smith, D.B., et al., *Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 318-327.
9. Messina, J.P., et al., *Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes*. *Hepatology*, 2015. **61**(1): p. 77-87.
10. Murphy, D.G., et al., *Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa*. *J Clin Microbiol*, 2015. **53**(3): p. 967-972.
11. CDA. *World map of HCV prevalence*. 2012; Available from: <http://www.centerforda.com/hcv.htm>.
12. *Hepatitis C Viruses Genomes and molecular biology*. 2006: Horizon Bioscience.
13. Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin, *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(7): p. 482-496.
14. Zou, S., et al., *Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing*. *Transfusion*, 2010. **50**(7): p. 1495-1504.
15. PEI. *Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Verminderung des Risikos von Hepatitis-C-Virus-Kontaminationen in mittels Plasmapherese hergestelltem gefrorenen Frischplasma (vom 02.September 1999)*. 1999; Available from: <http://www.pei.de/SharedDocs/bekanntmachungen/1999/banz-180-24-09-1999-s16461.html?nn=3250056#Start>.
16. Robert Koch Institut, *Epidemiologisches Bulletin: Virushepatitis B, C und D im Jahr 2011*. 2012.
17. CDC. *Hepatitis C FAQs for the Public*. 2015 31.05.2015; Available from: <http://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/cfaq.htm#cFAQ31>.
18. Seeff, L.B., *Natural history of chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S35-46.
19. Thomas, D.L. and L.B. Seeff, *Natural history of hepatitis C*. *Clin Liver Dis*, 2005. **9**(3): p. 383-398.
20. Pawlotsky, J.M., *Use and interpretation of virological tests for hepatitis C*. *Hepatology*, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S65-S73.
21. Farci, P., et al., *A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(2): p. 98-104.
22. Marcellin, P., *Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease*. *J Hepatol*, 1999. **31 Suppl 1**: p. 9-16.

23. RKI. *Hepatitis C - RKI-Ratgeber für Ärzte*. 2014 03.04.2014; Available from: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisC.html.
24. Hoofnagle, J.H., *Course and outcome of hepatitis C*. *Hepatology*, 2002. **36**: p. S21-S29.
25. Hoofnagle, J.H., *Hepatitis C: the clinical spectrum of disease*. *Hepatology*, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 15S-20S.
26. M'Kada, H., et al., *What are the best reference values for a normal serum alanine transaminase activity (ALT)? Impact on the presumed prevalence of drug induced liver injury (DILI)*. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, 2011. **60**: p. 290-295.
27. Conry-Cantilena, C., et al., *Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(26): p. 1691-1696.
28. Dancygier, H., *Clinical Hepatology - Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*. Vol. 1. 2009: Springer Science & Business Media - Verlag.
29. Liang, T.J., et al., *Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C*. *Ann Intern Med*, 2000. **132**(4): p. 296-305.
30. Alter, H.J. and L.B. Seeff, *Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome*. *Semin Liver Dis*, 2000. **20**(1): p. 17-35.
31. Adam, R., et al., *Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR)*. *J Hepatol*, 2012. **57**(3): p. 675-688.
32. El-Zanaty, F. and A. Way, *Egypt Demographic and Health Survey 2008*. 2009, Ministry of Health: Cairo, Egypt.
33. Kamal, S.M. and I.A. Nasser, *Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know*. *Hepatology*, 2008. **47**(4): p. 1371-83.
34. Ray, S.C., et al., *Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout egypt*. *J Infect Dis*, 2000. **182**(3): p. 698-707.
35. Rapicetta, M., et al., *Molecular heterogeneity and new subtypes of HCV genotype 4*. *Research in virology*, 1998. **149**: p. 293-297.
36. Frank, C., et al., *The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt*. *Lancet*, 2000. **355**(9207): p. 887-891.
37. Tanaka, Y., et al., *Exponential spread of hepatitis C virus genotype 4a in Egypt*. *J Mol Evol*, 2004. **58**(2): p. 191-195.
38. Strickland, G.T., *Liver disease in Egypt: hepatitis C superseded schistosomiasis as a result of iatrogenic and biological factors*. *Hepatology*, 2006. **43**(5): p. 915-922.
39. Gryseels, B. and G.T. Strickland, *Schistosomiasis*, in *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. 2013. p. 867-883.
40. Strickland, G.T., *An epidemic of hepatitis C virus infection while treating endemic infectious diseases in Equatorial Africa more than a half century ago: did it also jump-start the AIDS pandemic?* *Clin Infect Dis*, 2010. **51**(7): p. 785-787.
41. Yahia, M., *Global health: a uniquely Egyptian epidemic*. *Nature*, 2011. **474**(7350): p. S12-S13.
42. Darwish, N.M., et al., *Hepatitis C virus infection in blood donors in Egypt*. *J Egypt Public Health Assoc*, 1992. **67**(3-4): p. 223-236.
43. Saeed, A.A., et al., *Hepatitis C virus infection in Egyptian volunteer blood donors in Riyadh*. *Lancet*, 1991. **338**(8764): p. 459-460.
44. Abdel-Aziz, F., et al., *Hepatitis C virus (HCV) infection in a community in the Nile Delta: population description and HCV prevalence*. *Hepatology*, 2000. **32**(1): p. 111-115.
45. Darwish, M.A., et al., *Risk factors associated with a high seroprevalence of hepatitis C virus infection in Egyptian blood donors*. *Am J Trop Med Hyg*, 1993. **49**(4): p. 440-447.
46. Nafeh, M.A., et al., *Hepatitis C in a community in Upper Egypt: I. Cross-sectional survey*. *Am J Trop Med Hyg*, 2000. **63**(5-6): p. 236-241.
47. WHO, *Guideline for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection*. 2014.

-
48. WHO. *Egypt steps up efforts against hepatitis C*. 2014; Available from: <http://www.who.int/features/2014/egypt-campaign-hepatitisc/en/>.
 49. CDC, *Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013. **62**(18): p. 362-365.
 50. Alter, M.J., W.L. Kuhnert, and L. Finelli, *Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus*. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep, 2003. **52**(RR-3): p. 1-13, 15; quiz CE1-4.
 51. Saldanha, J., N. Lelie, and A. Heath, *Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA*. WHO Collaborative Study Group. Vox Sang, 1999. **76**(3): p. 149-158.
 52. Courouce, A.M., et al., *Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period*. Transfusion, 2000. **40**(10): p. 1198-1202.
 53. Lee, S.R., et al., *Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of 'window-phase' blood donations*. Vox Sang, 2001. **80**(1): p. 19-23.
 54. Webster, D.P., P. Klenerman, and G.M. Dusheiko, *Hepatitis C*. Lancet, 2015. **385**(9973): p. 1124-1235.
 55. Bruno, S., et al., *Sustained virological response to interferon-alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 579-587.
 56. van der Meer, A.J., et al., *Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis*. JAMA, 2012. **308**(24): p. 2584-2593.
 57. *Neue Hepatitis C-Therapie - Das Interferonfreie Zeitalter kommt!*, in *Hepatitis&more*. 2014.
 58. Ekins, R.P., *Ligand assays: From electrophoresis to miniaturized microarrays*. Clin. Chem., 1998. **44**(9): p. 2015-2030.
 59. MacBeath, G., *Protein microarrays and proteomics*. Nat. Genet., 2002. **32**(Suppl.): p. 526-532.
 60. Templin, M.F., et al., *Protein microarrays: promising tools for proteomic research*. Proteomics, 2003. **3**: p. 2155-2166.
 61. Luminex, *Product Information Sheet MagPlex® Microspheres*. 2014.
 62. Luminex, *Luminex® FLEXMAP 3D® Hardware User Manual*. 2009.
 63. Luminex. *The Luminex Corporation Homepage*. 2006-2015; Available from: <http://www.luminexcorp.com/>.
 64. SPHINX. *A Euro-Med scientific cooperation to fight Hepatitis in Egypt*. 2011; Available from: <http://www.sphinx-hcv.eu/>.
 65. NIBSC, *National Institute for Biological Standards and Control* Blanche Lane South Mimms Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG United Kingdom.
 66. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 1975. **258**(5536): p. 598-599.
 67. Hochuli, E., H. Dobeli, and A. Schacher, *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. J Chromatogr, 1987. **411**: p. 177-184.
 68. Hochuli, E., *Large-scale chromatography of recombinant proteins*. J Chromatogr, 1988. **444**: p. 293-302.
 69. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
 70. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
-

-
71. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. **76**(9): p. 4250-4354.
 72. Williamson, D.F., R.A. Parker, and J.S. Kendrick, *The box plot: a simple visual method to interpret data*. Ann Intern Med, 1989. **110**(11): p. 916-921.
 73. Shapiro, S.S. and M.B. Wilk, *An analysis of variance test for normality (for complete samples)*. Biometrika, 1965. **52**(3/4): p. 591-611.
 74. Wilcoxon, F., *Individual Comparisons by Ranking Methods*. Biometrics Bulletin, 1945. **1**: p. 80-83.
 75. Mann, H.B. and D.R. Whitney, *On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other*. Annals of mathematical Statistics, 1947. **18**: p. 50-60.
 76. Breiman, L., *Random Forests*. 2001: Statistics Department, University of California.
 77. Zweig, M.H. and G. Campbell, *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem, 1993. **39**(4): p. 561-577.
 78. Sing, T., et al., *ROCR: visualizing classifier performance in R*. Bioinformatics, 2005. **21**(20): p. 3940-3941.
 79. Saeed, A.I., et al., *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*. Biotechniques, 2003. **34**(2): p. 374-378.
 80. Maimon, O. and L. Rockach, *Data Mining and Knowledge Discovery Handbook*. 2 ed. 2010.
 81. EMA, *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011, Committee for Medicinal Products for Human Use.
 82. FDA, *Draft Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. 2013.
 83. Aho, K. and K. Simons, *Studies of the Antibody Nature of the Rheumatoid Factor. Reaction of the Rheumatoid Factor with Human Specific Precipitates and with Native Human Gamma Globulin*. Arthritis Rheum, 1963. **6**: p. 676-688.
 84. Christian, C.L., *The Rheumatoid Factors*. J Chronic Dis, 1963. **16**: p. 875-888.
 85. Normansell, D.E. and D.R. Stanworth, *Ultracentrifugal studies of the reactions of rheumatoid factor with native human gamma-G-globulin*. Immunology, 1966. **10**(6): p. 527-533.
 86. Stevenson, D.L., et al., *The presence of rheumatoid factor in sera from anti-HCV positive blood donors interferes with the detection of HCV-specific IgM*. Trent HCV Study Group. J Hepatol, 1996. **25**(5): p. 621-626.
 87. Martins, T.B., *Development of Internal Controls for the Luminex Instrument as Part of a Multiplex Seven-Analyte Viral Respiratory Antibody Profile*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002. **9**(1): p. 41-45.
 88. Woods, C.R., *False-Positive Results for Immunoglobulin M Serologic Results: Explanations and Examples*. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, 2013. **2**(1): p. 87-90.
 89. Agnello, V., R.T. Chung, and L.M. Kaplan, *A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia*. N Engl J Med, 1992. **327**(21): p. 1490-1495.
 90. Levey, J.M., et al., *Mixed cryoglobulinemia in chronic hepatitis C infection. A clinicopathologic analysis of 10 cases and review of recent literature*. Medicine (Baltimore), 1994. **73**(1): p. 53-67.
 91. Clifford, B.D., et al., *High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 1995. **21**(3): p. 613-619.
 92. Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, *Biochemie & Pathobiochemie*. Vol. 8. 2006: Springer.
 93. Laudahn, G., *[Dysproteinemia in liver cirrhosis, with extreme, electrophoretically homogenous gamma-hyperglobulinemia]*. Klin Wochenschr, 1955. **33**(35-36): p. 851-856.
 94. Dispenzieri, A., et al., *Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy*. Mayo Clin Proc, 2001. **76**(5): p. 476-487.
 95. Jolliff, C.R., et al., *Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry*. Clin Chem, 1982. **28**(1): p. 126-128.
-

-
96. Gonzalez-Quintela, A., et al., *Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007. **151**: p. 42-50.
 97. Stoop, J.W., et al., *Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults*. *Clin Exp Immunol*, 1969. **4**(1): p. 101-112.
 98. Cassidy, J.T., G.L. Nordby, and H.J. Dodge, *Biologic variation of human serum immunoglobulin concentrations: sex-age specific effects*. *J Chronic Dis*, 1974. **27**(11-12): p. 507-516.
 99. Vladutiu, A.O., B.M. Roach, and S.M. Farahmand, *Polyclonal gammopathy with marked increase in serum viscosity*. *Clin Chem*, 1991. **37**(10 Pt 1): p. 1788-1793.
 100. Fallatah, H.I. and H.O. Akbar, *Elevated serum immunoglobulin G levels in patients with chronic liver disease in comparison to patients with autoimmune hepatitis*. *Libyan J Med*, 2010. **5**(4857).
 101. Feizi, T., *Immunoglobulins in chronic liver disease*. *Gut*, 1968. **9**(2): p. 193-198.
 102. Marshall, W.J., et al., *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. 3 ed. 2014: Elsevier Health Sciences.
 103. Group, I.M.W., *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(5): p. 749-757.
 104. WHO, *Hepatitis C Assays: Operational Characteristics Report 2*. 2001.
 105. Covinsky, M., et al., *An IgM lambda antibody to Escherichia coli produces false-positive results in multiple immunometric assays*. *Clin Chem*, 2000. **46**(8 Pt 1): p. 1157-1161.
 106. Davies, D.H., et al., *Profiling the humoral immune response to infection by using proteome microarrays: high-throughput vaccine and diagnostic antigen discovery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(3): p. 547-552.
 107. Waterboer, T., P. Sehr, and M. Pawlita, *Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays*. *J Immunol Methods*, 2006. **309**(1-2): p. 200-204.
 108. Michel, A., et al., *Helicobacter pylori multiplex serology*. *Helicobacter*, 2009. **14**(6): p. 525-535.
 109. Rimmele, S., *Mycobacterium tuberculosis Antigen Arrays for the in-depth Characterization of the Serological Response of TB Infected Patient Cohorts*. 2012, Eberhard Karls Universität Tübingen: Tübingen.
 110. Yoshida, H., Y. Imafuku, and T. Nagai, *Matrix effects in clinical immunoassays and the effect of preheating and cooling analytical samples*. *Clin Chem Lab Med*, 2004. **42**(1): p. 51-56.
 111. Findlay, J.W., et al., *Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective*. *J Pharm Biomed Anal*, 2000. **21**(6): p. 1249-1273.
 112. Marks, V., *False-positive immunoassay results: a multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes in 10 donors from 66 laboratories in seven countries*. *Clin Chem*, 2002. **48**(11): p. 2008-2016.
 113. Williams, R.C., *Rheumatoid factors in subacute bacterial endocarditis and other infectious diseases*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1988. **75**: p. 300-308.
 114. Antonescu, C., et al., *Hepatitis C virus (HCV) infection: serum rheumatoid factor activity and HCV genotype correlate with cryoglobulin clonality*. *Blood*, 1998. **92**(9): p. 3486-3487.
 115. Wei, G., et al., *Hepatitis C virus (HCV)-induced IgG-IgM rheumatoid factor (RF) complex may be the main causal factor for cold-dependent activation of complement in patients with rheumatic disease*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **107**(1): p. 83-88.
 116. Misiani, R., et al., *Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia*. *Ann Intern Med*, 1992. **117**(7): p. 573-577.
 117. Banks, S.E., T.R. Riley, 3rd, and S.J. Naides, *Musculoskeletal complaints and serum autoantibodies associated with chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease*. *Dig Dis Sci*, 2007. **52**(5): p. 1177-1182.
-

-
118. Stevenson, D.L., et al., *The presence of rheumatoid factor in sera from anti-HCV positive blood donors interferes with the detection of HCV-specific IgM*. Journal of Hepatology, 1996. **25**: p. 621-626.
119. Tate, J. and G. Ward, *Interferences in immunoassay*. Clin Biochem Rev, 2004. **25**(2): p. 105-120.
120. Selby, C., *Interference in immunoassay*. Ann Clin Biochem, 1999. **36** (Pt 6): p. 704-721.
121. Gonzalez-Quintela, A., et al., *Serum immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in chronic hepatitis C. A comparison with non-cirrhotic alcoholic liver disease*. Hepatogastroenterology, 2003. **50**(54): p. 2121-2126.
122. Lotfy, M., et al., *Distinct serum immunoglobulins pattern in Egyptian patients with chronic HCV infection analyzed by nephelometry*. J Immunoassay Immunochem, 2006. **27**(1): p. 103-114.
123. Ortarik, Z., et al., *[Evaluation of serum IgG, IgA and IgM levels as indicators of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C infection]*. Mikrobiyol Bul, 2011. **45**(2): p. 296-305.
124. Lammie, P.J., et al., *Development of a new platform for neglected tropical disease surveillance*. Int J Parasitol, 2012. **42**(9): p. 797-800.
125. Waterboer, T., et al., *Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins*. Clin Chem, 2005. **51**(10): p. 1845-1853.
126. Ramanakumar, A.V., et al., *Use of the normalized absorbance ratio as an internal standardization approach to minimize measurement error in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human papillomavirus infection*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(3): p. 791-796.
127. Persson, K. and J. Boman, *Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections by Chlamydia pneumoniae*. Clin Diagn Lab Immunol, 2000. **7**(5): p. 739-744.
128. Andersson, A.M. and P. Wallgren, *Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of Aleutian mink disease virus infection in mink*. Acta Vet Scand, 2013. **55**(86): p. 1-6.
129. Vogel, W., et al., *High-dose interferon-alpha2b treatment prevents chronicity in acute hepatitis C: a pilot study*. Dig Dis Sci, 1996. **41**(12 Suppl): p. 81S-85S.
130. Jaeckel, E., et al., *Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b*. N Engl J Med, 2001. **345**(20): p. 1452-1457.
131. Licata, A., et al., *When and how to treat acute hepatitis C?* J Hepatol, 2003. **39**(6): p. 1056-1062.
132. Ghany, M.G., et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update*. Hepatology, 2009. **49**(4): p. 1335-1374.
133. Gerlach, J.T., et al., *Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 80-88.
134. Kamal, S.M., et al., *Peginterferon alfa-2b therapy in acute hepatitis C: impact of onset of therapy on sustained virologic response*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 632-638.
135. Deterding, K., et al., *Delayed versus immediate treatment for patients with acute hepatitis C: a randomised controlled non-inferiority trial*. The Lancet infectious diseases, 2013. **3099**: p. 497-506.
136. Samala, N.R. and M.G. Ghany, *Acute hepatitis C: to treat or not to treat*. The Lancet infectious diseases, 2013. **3099**: p. 10-11.
137. Wheeler, D.J. and D.S. Chambers, *Understanding Statistical Process Control*. Vol. 3. 2010.
138. Czitrom, v. and P.D. Spagon, *Statistical Case Studies for Industrial Process Improvement*. ASA-SIAM Series on Statistics and Applied Mathematics. 1997.
139. Pukelsheim, F., *The Three Sigma Rule*. The American Statistician, 1994. **48**: p. 88-91.
140. Kuo, G., et al., *An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis*. Science, 1989. **244**(4902): p. 362-364.
-

-
141. Chaudhary, R.K., S. Frenette, and T. Mo, *Evaluation of hepatitis C virus kits*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(11): p. 2616-2617.
 142. Chaudhary, R.K. and C. MacLean, *Evaluation of first- and second-generation RIBA kits for detection of antibody to hepatitis C virus*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(10): p. 2329-2330.
 143. Barrera, J.M., et al., *Incidence of non-A, non-B hepatitis after screening blood donors for antibodies to hepatitis C virus and surrogate markers*. Ann Intern Med, 1991. **115**(8): p. 596-600.
 144. Klimashevskaya, S., et al., *Distinguishing acute from chronic and resolved hepatitis C virus (HCV) infections by measurement of anti-HCV immunoglobulin G avidity index*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(10): p. 3400-3403.
 145. Araujo, A.C., et al., *Distinguishing acute from chronic hepatitis C virus (HCV) infection based on antibody reactivities to specific HCV structural and nonstructural proteins*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 54-57.
 146. McGovern, B.H., et al., *Improving the diagnosis of acute hepatitis C virus infection with expanded viral load criteria*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(7): p. 1051-1060.
 147. Coppola, N., et al., *Improvement in the aetiological diagnosis of acute hepatitis C: a diagnostic protocol based on the anti-HCV-IgM titre and IgG Avidity Index*. J Clin Virol, 2009. **46**(3): p. 222-229.
 148. Mauss, S., et al., *Short Guide to Hepatitis C*. 2013: Flying Publisher.
 149. Xu, D., et al., *[Dynamic study of anti-NS5 and ALT in post-transfusion hepatitis C]*. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 1997. **11**(4): p. 344-347.
 150. Rosa, D., et al., *A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 1759-1763.
 151. Meuleman, P., et al., *In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 755-762.
 152. Wang, Y., Z.Y. Keck, and S.K. Fong, *Neutralizing antibody response to hepatitis C virus*. Viruses, 2011. **3**(11): p. 2127-2145.
 153. Stamataki, Z., et al., *Hepatitis C virus envelope glycoprotein immunization of rodents elicits cross-reactive neutralizing antibodies*. Vaccine, 2007. **25**(45): p. 7773-7784.
 154. Osburn, W.O., et al., *Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses*. Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2140-2151.
 155. Cai, W., et al., *Expression, purification and immunogenic characterization of hepatitis C virus recombinant E1E2 protein expressed by Pichia pastoris yeast*. Antiviral Res, 2010. **88**(1): p. 80-85.
 156. Nolte, F.S., et al., *Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(4): p. 1558-1564.
 157. Schutzbank, T.E., et al., *Comparative evaluation of three commercially available methodologies for hepatitis C virus genotyping*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3797-3798.
 158. Gault, E., et al., *Evaluation of a new serotyping assay for detection of anti-hepatitis C virus type-specific antibodies in serum samples*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(5): p. 2084-2087.
 159. Bhattacharjee, V., et al., *Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6*. J Gen Virol, 1995. **76** (Pt 7): p. 1737-1748.
 160. Simmonds, P., et al., *Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(6): p. 1493-1503.
 161. Tanaka, T., et al., *Significance of specific antibody assay for genotyping of hepatitis C virus*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1347-1353.
 162. Schroter, M., et al., *Serological determination of hepatitis C virus subtypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, and 4a by a recombinant immunoblot assay*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2576-2580.
-

-
163. Qiu, P., et al., *HCV genotyping using statistical classification approach*. J Biomed Sci, 2009. **16**(62).
 164. Maylin, S., et al., *Sustained virological response is associated with clearance of hepatitis C virus RNA and a decrease in hepatitis C virus antibody*. Liver Int, 2009. **29**(4): p. 511-517.
 165. Toyoda, H., et al., *Changes in hepatitis C virus (HCV) antibody status in patients with chronic hepatitis C after eradication of HCV infection by interferon therapy*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(6): p. e49-e54.
 166. Takaki, A., et al., *Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 578-582.
 167. Papatheodoridis, G.V., et al., *Significance of IgM anti-HCV core level in chronic hepatitis C*. Journal of hepatology, 1997. **27**: p. 36-41.
 168. Zaaijer, H.L., et al., *Variability of IgM response in hepatitis C virus infection*. J Med Virol, 1993. **40**(3): p. 184-187.
 169. Quiroga, J.A., et al., *IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C*. Hepatology, 1991. **14**(1): p. 38-43.
 170. Sato, S., et al., *IgM and IgA antibodies generated against hepatitis C virus core antigen in patients with acute and chronic HCV infection*. Digestive diseases and sciences, 1994. **39**: p. 2022-2031.
 171. Pawlotsky, J.M., *Diagnostic tests for hepatitis C*. J Hepatol, 1999. **31 Suppl 1**: p. 71-79.
 172. Ramezani, A., et al., *Frequency of isolated hepatitis B core antibody in HIV-hepatitis C virus co-infected individuals*. Int J STD AIDS, 2009. **20**(5): p. 336-338.
 173. Richard, D., *The usefulness of surrogate markers anti-HBc and ALT for post-transfusion non-A, non-B hepatitis prevention*. J Virol Methods, 1987. **17**(1-2): p. 105-117.
 174. Richards, C., et al., *Prevalence of antibody to hepatitis C virus in a blood donor population*. Transfusion, 1991. **31**(2): p. 109-113.
 175. CDC. *About Epstein-Barr Virus (EBV)*. 06.01.2014; Available from: <http://www.cdc.gov/epstein-barr/about-ebv.html>.
 176. CDC. *Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis - Laboratory Testing*. 2014 07.01.2014; Available from: <http://www.cdc.gov/epstein-barr/laboratory-testing.html>.
 177. Enders, G., et al., *Zytomegalievirus-(CMV-) Durchseuchung und Häufigkeit von CMV-Primärinfektionen bei schwangeren Frauen in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. Vol. 46. 2003: Springer-Verlag. pp 426-432
 178. CDC. *Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection*. 06.12.2010; Available from: <http://www.cdc.gov/cmV/overview.html>.
 179. RKI. *Schutzimpfung gegen Hepatitis B*. 20.02.2014; Available from: http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/HepatitisB/FAQ-Liste_HepB_Impfen.html.
 180. CDC. *Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors*. 26.03.2015; Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>.
 181. Dunn, B.E., H. Cohen, and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(4): p. 720-741.
-

8 Anhang

Tabelle 63: Aminosäuresequenzen der HCV g4a Proteine. N-terminal befindet sich bei jeder Sequenz folgende His-Tag enthaltende pET-28a Sequenz: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH. Diese ist bei der Berechnung des Molekulargewichts in kDa berücksichtigt.

HCV g4a Protein	HCV g4a Aminosäuresequenz
Core (21 kDa)	1 MSTNPKPQRK TKRNTNRRPM DVKFPGGGQI VGGVYLLPRR GPRLGVRATR KTSERSQPRG 60
	61 RRQPIPKARR SEGRSWAQPQ YWPPLYGNEG CGWAGWLLSP RGSRPSWGPV DFRRRSRNLG 120
	121 KVIDTLTCGF ADLMGYIPLV GAPVGGVARA LAHGVRAVED GINYATGNLP GC 172
NS3 (69 kDa)	1 APITAYAQQT RGLFSTIVTS LTGRDTNENC GEVQVLSTAT QSFLGTAVNG VMWTVYHGAG 60
	61 SKTISGPKGP VNQMYTNVDQ DLVGVWPAPFG VRSLAPCTCG ASDLYLVTRH ADVVPVRRRG 120
	121 DTRGALLSPR PISTLKGSSG GPLLCPMGAH AGIFRAAVCT RGVAKAVDFV PVESLETTMR 180
	181 SPVFTDNSTP PAVPQTYQVA HLHAPTGS GK STKVPAAAYAA QGYKVLVLPN SVAATLGFGA 240
	241 YMSKAYGIDP NIRSGVRTIT TGAPITYSTY GKFLADGGCS GGAYDIIICD ECHSTDSTTI 300
	301 LGIGTVLDQA ETAGVRLVVL ATATPPGSVT TPHSNIEEVA LPTTGEIPFY GKAIPELELIK 360
	361 GGRHLIFCHS KKKCDELAKQ LTLGLNAVA YYRGLDVSVI PTSGDVVVCA TDALMTGFTG 420
	421 DFDSVIDCNT SVIQTVDFSL DPTFSIETTT VPQDAVRSRQ RRGRTGRGRL GIYRYVTPGE 480
	481 RPSGIFDTSV LCECYDAGCA WYELTPAETT TRLRAYFNTP GLPVCQDHL EFWESVFTGLT 540
	541 QIDGHFSLQT KQSGENFPYL VAYQATVCAK ALAPPPSWDT MWKCLIRLKP TLHGPTPLLY 600
	601 RLGSVQNEVT LTHPITKYIM ACMSADLEV T 631
NS5A (50 kDa)	1 AESWLWEVWD WVCTVLSDFK TWLAKALLPL MPGIPFLSCQ RGYKGEWRGD GVMHTTCPCG 60
	61 AELAGHIKNG SMRITGPKTC SNTWHGTFPI NAYTTGPGVP IPAPNYKFAL WRVSAEEYVE 120
	121 VRRVGFHIV TGVTQDNIC PCQVPAPPEFF TEVDGIRLHR HAPKCKPLL DEVSFSVGLN 180
	181 SFVVGSQLPC EPEPDVAULT SMLTDPHSIT AEAARRRLAR GSPPSLASS ASQLSAPSLK 240
	241 ATCTARHDSF GTDLEANLL WGSTATRVET DEKVIILDSF ESCVAEPDDD REVSVAAEIL 300
	301 RPTKKFPPAL PIWARPDYN PLTETWKQDD YKPPTVHGCA LPPSKQTFVP PPRRKRIVQL 360
	361 TESVVSTALA ELAAKTFGQS ELGSDSGADL TTPETETDSG PIVVDDASDD GSYSSMPPLE 420
421 GEPGDPDLTS DSWSTVSGSE DVVCC 445	
NS5B (66 kDa)	1 SMSYSWTGAL VTPCAAEEKS LPISPLNSL LRHHNMVYAT TTRSAVTRQK KVTDFRLQVV 60
	61 DNHYNEVLKE IKARASRVKA RLLTTEEACD LTPPHSARSK FGYGAKDVRS HSRKAINHIN 120
	121 SVWEDLLEDN NTPIPTTIMA KNEVFVNPA KGGRKPARLI VYPDLGVRVC EKRALHDVIK 180
	181 QLPEAVMGAA YGFQYSPAQR VEFLLTAWKS KKTPMGFSYD TRCFDSTVTE KDIRVEEVY 240
	241 QCCDLEPEAR KVITALTERL YVGGPMHNSK GDLCGYRRCR ASGVYTTSTFG NTLTCYLKAT 300
	301 AAIRAAGLRD CTMLVCGDDL VVIAESDGVE EDNRALRAFT EAMTRYSAPP GDAPQPAYDL 360
	361 ELITSCSSNV SVAHDATGKK VYYLTRDPET PLARAAWETV RHTPVNSWLG NIIVYAPTIV 420
	421 VRMILMTHFF SILQSQAEL KALDFDMYGV TYSITPLDLP AIIQRLHGLS AFTLHGYSY 480
	481 ELNRVAGSLR KLGVPPLRAW RHRARAVRAK LIAQGGRAKI CGIYLFNWAV KTKLKLTPLP 540
541 AAAKLDLSGW FTVGAGGGDI YHSMHARPR YLLC 575	

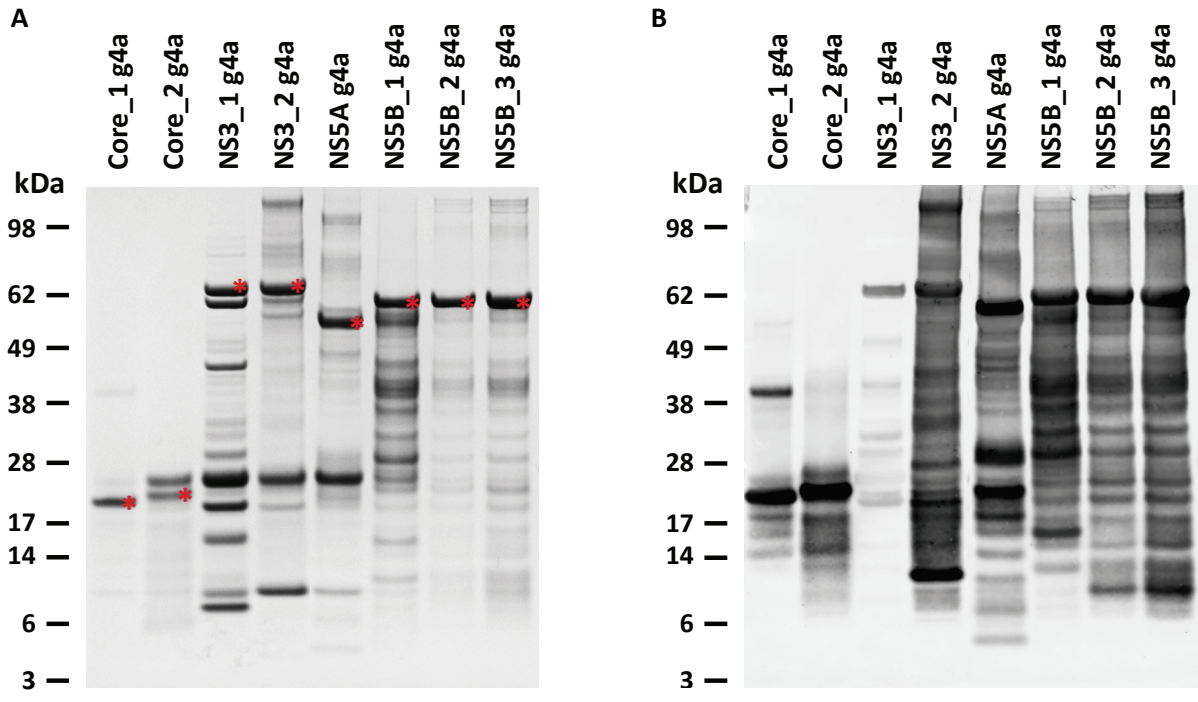


Abbildung 55: Überprüfung der aufgereinigten HCV g4a Proteine. (A) Coomassie-Färbung nach LDS-PAGE. Von jedem HCV Protein wurden jeweils 1 µg aufgeladen. (B) His-Tag Detektion auf einem Western Blot mit 0,1 µg/ml α-His-Tag Antikörper und 0,1 µg/ml dk-α-ms 680RD.

Tabelle 64: Ermittelte p-Werte von drei Personengruppen auf drei Kontroll-Mikrosphären. Zur Ermittlung von p-Werten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet. Gruppe 1: gesunde Spender, Gruppe 2: Patienten mit einer akuten HCV Infektion, Gruppe 3: Patienten mit einer chronischen HCV Infektion.

	Gruppe 1 zu Gruppe 2	Gruppe 1 zu Gruppe 3	Gruppe 2 zu Gruppe 3
BSA-Mikrosphäre	1,72E-30	8,50E-43	8,29E-20
ECL-Mikrosphäre	2,25E-36	2,49E-43	9,89E-18
GST-Mikrosphäre	5,38E-30	6,68E-43	1,24E-24

Tabelle 65: Antigen-Stabilität mittels His-Tag Detektion. Zur Ermittlung der Antigen-Stabilität mittels His-Tag Detektion wurden Messungen an sechs verschiedenen Zeitpunkten über eine Zeitspanne von 141 Tagen durchgeführt (siehe Abbildung 25-A). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für Antigene mit einem His-Tag berechnet.

<i>α-His-Tag</i>	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV
Core_1 g4a	1164	32	2,75
Core_2 g4a	22262	687	3,09
Core_3 g4a	24079	501	2,08
NS3_1 g4a	130	15	11,62
NS3_2 g4a	49102	2491	5,07
NS5A g4a	17515	589	3,37
NS5B_1 g4a	12945	5854	45,22
NS5B_2 g4a	298	110	36,90
NS5B_3 g4a	6127	417	6,80
NS3_1 g1b	4655	633	13,60

Tabelle 66: Antigen-Stabilität mittels GST Detektion. Zur Ermittlung der Antigen-Stabilität mittels GST Detektion wurden Messungen an sechs verschiedenen Zeitpunkten über eine Zeitspanne von 141 Tagen durchgeführt (siehe Abbildung 25-B). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für Antigene mit einem GST-Tag, bzw. für reines GST berechnet.

<i>α-GST</i>	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV
GST	39968	2633	6,59
NS5 g1	40894	2618	6,40
HCV Mix	8944	1673	18,70
Core g1b	42134	4146	9,84
NS3 g1a	43344	2585	5,96
NS3_2 g1b	40683	2549	6,27
NS3_3 g1b	40259	2766	6,87
NS3 g1c	42641	2337	5,48
NS3 g2c	22960	1897	8,26
NS3_3 g4a	40420	2666	6,59
NS4_2	51741	2655	5,13
NS5 g1b	40644	2814	6,92

Tabelle 67: Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 1. Zur Ermittlung der Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 1 wurden Messungen an sechs verschiedenen Zeitpunkten über eine Zeitspanne von 141 Tagen durchgeführt (siehe Abbildung 26-A). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für alle Antigene berechnet. Zum Vergleich sind die entsprechenden CV-Werte der Inter-Assay Präzision dargestellt.

QC positiv 1	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV	Inter-Assay % CV
Core_1 g4a	7476	573	7,67	2,14
Core_2 g4a	30851	889	2,88	1,54
Core_3 g4a	25846	724	2,80	2,27
NS3_1 g4a	22787	7472	32,79	2,01
NS3_2 g4a	9741	888	9,12	4,45
NS5A g4a	24814	745	3,00	1,88
NS5B_1 g4a	7973	1907	23,92	6,51
NS5B_2 g4a	2751	872	31,72	10,04
NS5B_3 g4a	2491	658	26,42	4,48
NS3_1 g1b	16262	1471	9,05	4,47
NS4_1	10405	521	5,01	1,92
NS5 g1	43481	2022	4,65	1,67
HCV Mix	6431	565	8,79	2,50
Core g1b	49568	2964	5,98	2,06
NS3 g1a	42584	1426	3,35	2,02
NS3_2 g1b	40316	2083	5,17	1,92
NS3_3 g1b	21288	3229	15,17	2,10
NS3 g1c	42712	1801	4,22	2,37
NS3 g2c	12181	848	6,97	5,75
NS3_3 g4a	17116	1856	10,85	2,14
NS4_2	59635	2505	4,20	3,09
NS5 g1b	41671	1570	3,77	2,85
c22 g1a	38131	5364	14,07	1,29
5-1-1 g1a	39739	1580	3,97	1,20
5-1-1 g4a	25336	2156	8,51	2,03
c100 g1a	43231	3078	7,12	2,05
pNS4A g4a	28052	3214	11,46	1,80

Tabelle 68: Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 2. Zur Ermittlung der Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 2 wurden Messungen an fünf verschiedenen Zeitpunkten über eine Zeitspanne von 141 Tagen durchgeführt (siehe Abbildung 26-B). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für alle Antigene berechnet. Zum Vergleich sind die entsprechenden CV-Werte der Inter-Assay Präzision dargestellt.

QC positiv 2	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV	Inter-Assay % CV
Core_1 g4a	23370	968	4,14	2,56
Core_2 g4a	42633	644	1,51	2,13
Core_3 g4a	42516	646	1,52	1,86
NS3_1 g4a	24025	8659	36,04	1,91
NS3_2 g4a	29658	1028	3,47	2,17
NS5A g4a	3494	771	22,06	4,28
NS5B_1 g4a	10478	1634	15,60	7,74
NS5B_2 g4a	4938	986	19,97	8,23
NS5B_3 g4a	4125	787	19,08	3,34
NS3_1 g1b	9068	277	3,06	4,19
NS4_1	19479	660	3,39	1,46
NS5 g1	9186	453	4,93	1,76
HCV Mix	11704	607	5,19	2,78
Core g1b	62727	2603	4,15	2,75
NS3 g1a	41470	697	1,68	2,65
NS3_2 g1b	40647	2460	6,05	2,27
NS3_3 g1b	11338	934	8,23	2,28
NS3 g1c	34555	2569	7,43	2,10
NS3 g2c	8600	976	11,35	7,14
NS3_3 g4a	19048	1893	9,94	1,98
NS4_2	70958	2503	3,53	2,08
NS5 g1b	5798	317	5,47	3,69
c22 g1a	41078	1277	3,11	2,07
5-1-1 g1a	45443	1369	3,01	2,17
5-1-1 g4a	46607	852	1,83	2,15
c100 g1a	46465	1480	3,19	2,28
pNS4A g4a	45180	1788	3,96	2,57

Tabelle 69: Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 3. Zur Ermittlung der Antigen-Stabilität in der Probe QC positiv 3 wurden Messungen an fünf verschiedenen Zeitpunkten über eine Zeitspanne von 141 Tagen durchgeführt (siehe Abbildung 26-C). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für alle Antigene berechnet. Zum Vergleich sind die entsprechenden CV-Werte der Inter-Assay Präzision dargestellt.

QC positiv 3	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV	Inter-Assay % CV
Core_1 g4a	12548	541	4,31	3,23
Core_2 g4a	40712	1291	3,17	1,48
Core_3 g4a	37113	1312	3,54	1,43
NS3_1 g4a	22267	8412	37,78	2,40
NS3_2 g4a	10868	977	8,99	3,05
NS5A g4a	26459	1327	5,02	1,77
NS5B_1 g4a	6790	1527	22,49	8,41
NS5B_2 g4a	2423	660	27,25	10,49
NS5B_3 g4a	2282	420	18,42	3,75
NS3_1 g1b	3689	107	2,89	5,03
NS4_1	6996	271	3,87	3,25
NS5 g1	34605	2584	7,47	3,96
HCV Mix	6624	253	3,83	2,35
Core g1b	60228	4012	6,66	2,57
NS3 g1a	11634	1005	8,64	4,29
NS3_2 g1b	11971	970	8,10	4,51
NS3_3 g1b	3892	84	2,15	2,62
NS3 g1c	12428	855	6,88	4,68
NS3 g2c	4327	426	9,85	7,52
NS3_3 g4a	16417	2730	16,63	1,01
NS4_2	59998	1084	1,81	3,34
NS5 g1b	20503	2108	10,28	2,20
c22 g1a	45058	332	0,74	1,17
5-1-1 g1a	41562	773	1,86	2,51
5-1-1 g4a	45624	3759	8,24	2,42
c100 g1a	48157	366	0,76	2,25
pNS4A g4a	41138	658	1,60	3,33

Tabelle 70: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung in der Probe QC positiv 1. Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung in der Probe QC positiv 1 wurden drei Immobilisierungschargen verglichen (siehe Abbildung 27-A). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für alle Antigene berechnet. Zum Vergleich sind die entsprechenden CV-Werte der Inter-Assay Präzision dargestellt.

QC positiv 1	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV	Inter-Assay % CV
Core_1 g4a	9903	3806	38,43	2,14
Core_2 g4a	31700	1152	3,64	1,54
Core_3 g4a	26122	867	3,32	2,27
NS3_1 g4a	28891	568	1,96	2,01
NS3_2 g4a	9836	3589	36,49	4,45
NS5A g4a	27409	4610	16,82	1,88
NS5B_1 g4a	12562	7001	55,73	6,51
NS3_1 g1b	22176	3870	17,45	4,47
NS4_1	10773	879	8,16	1,92
NS5 g1	43352	4017	9,27	1,67
HCV Mix	5473	491	8,97	2,50
Core g1b	43246	1768	4,09	2,06
NS3 g1a	44041	4766	10,82	2,02
NS3_2 g1b	45100	8179	18,14	1,92
NS3_3 g1b	25771	537	2,08	2,10
NS3 g1c	45724	5181	11,33	2,37
NS3 g2c	25897	12736	49,18	5,75
NS3_3 g4a	20480	1493	7,29	2,14
NS4_2	56426	5650	10,01	3,09
NS5 g1b	42716	4062	9,51	2,85
c22 g1a	29879	7195	24,08	1,29
5-1-1 g1a	37955	3844	10,13	1,20
5-1-1 g4a	18805	2549	13,55	2,03
c100 g1a	40246	7919	19,68	2,05
pNS4A g4a	19157	2585	13,49	1,80

Tabelle 71: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mittels His-Tag Detektion. Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mittels His-Tag Detektion wurden drei Immobilisierungschargen verglichen (siehe Abbildung 27-B). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für Antigene mit einem His-Tag berechnet.

<i>α-His-Tag</i>	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV
Core_1 g4a	2013	304	15,08
Core_2 g4a	28841	6589	22,84
Core_3 g4a	27813	5206	18,72
NS3_1 g4a	292	178	61,06
NS3_2 g4a	54262	5327	9,82
NS5A g4a	26992	6202	22,98
NS5B_1 g4a	45167	31347	69,40
NS3_1 g1b	13218	5715	43,24

Tabelle 72: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mittels GST Detektion. Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mittels GST Detektion wurden drei Immobilisierungschargen verglichen (siehe Abbildung 27-C). Die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der MFI-Werte wurden für Antigene mit einem GST-Tag, bzw. für reines GST berechnet.

<i>α-GST</i>	Mittelwert der MFI-Werte	Standardabweichung der MFI-Werte	% CV
GST	36255	4552	12,56
NS5 g1	37810	5491	14,52
HCV Mix	11105	3872	34,86
Core g1b	40427	6598	16,32
NS3 g1a	39597	5202	13,14
NS3_2 g1b	37903	6515	17,19
NS3_3 g1b	35851	4079	11,38
NS3 g1c	38606	5268	13,65
NS3 g2c	38481	7226	18,78
NS3_3 g4a	35663	4486	12,58
NS4_2	49292	10095	20,48
NS5 g1b	36643	5134	14,01

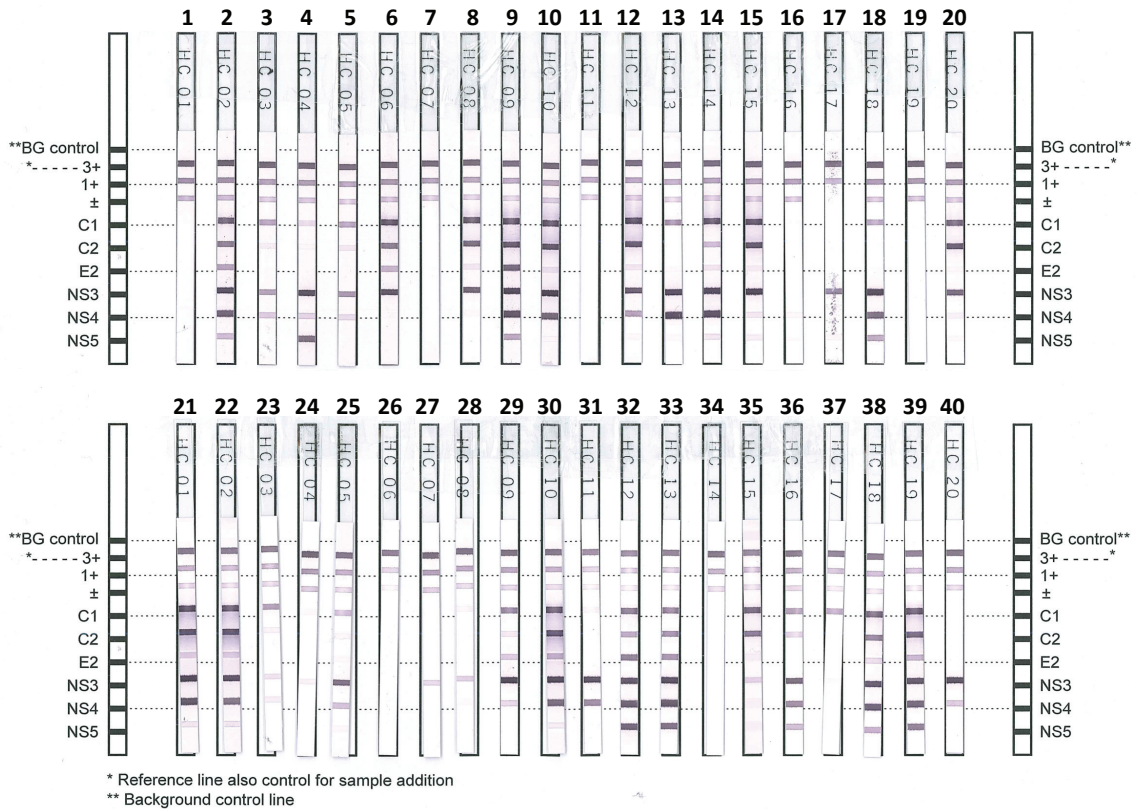


Abbildung 56: Ergebnisse des INNO-LIA™ HCV Score Referenztests. Die insgesamt 40 Streifen wurden mit einer negativ Kontrolle (Streifen 1), einer positiv Kontrolle (Streifen 2) und 38 Proben (Streifen 3 – 40, davon 5 Proben mit HCV Status negativ, 23 mit HCV Status akut und 10 mit HCV Status chronisch) inkubiert. Zur Interpretation der Streifen werden die Intensitäten der Antigenbanden bewertet. Das Vorgehen zur Bewertung ist in Tabelle 73 gezeigt. Die Auswertung der Streifen ist in Tabelle 74 dargestellt.

Tabelle 73: Vorgehen zur Bewertung des INNO-LIA™ HCV Score Referenztests. Die Intensität der Antigenbande wird mit den Intensitäten der Kontrollbanden verglichen und entsprechend bewertet.

Intensität der Antigenbande (IA)		Bewertung
Weniger als ±	$IA < \pm$	-
Gleich wie ±	$IA = \pm$	±
Mehr als ±, aber weniger oder gleich wie 1 +	$\pm < IA \leq 1 +$	1 +
Mehr als 1 +, aber weniger als 3 +	$1 + < IA < 3 +$	2 +
Gleich wie 3 +	$IA = 3 +$	3 +
Mehr als 3 +	$IA > 3 +$	4 +

Tabelle 74: Auswertung des INNO-LIA™ HCV Score Referenztests. Die Streifen Nr. bezieht sich auf die in Abbildung 56 gezeigten Streifen. Streifen Nr. 17 zeigte ein ungültiges Ergebnis und wurde nicht für weitere Auswertungen verwendet.

Streifen Nr.	Probe / HCV Status	C1	C2	E2	NS3	NS4	NS5	Resultat
1	negativ Kontrolle	-	-	-	-	-	-	negativ
2	positiv Kontrolle	3 +	2 +	1 +	3 +	3 +	+/-	positiv
3	akut	1 +	-	-	1 +	+/-	-	positiv
4	akut	-	-	-	3 +	+/-	3 +	positiv
5	akut	1 +	-	-	1 +	+/-	-	positiv
6	chronisch	3 +	2 +	1 +	3 +	-	-	positiv
7	akut	-	-	-	-	-	-	negativ
8	akut	3 +	3 +	-	3 +	-	-	positiv
9	akut	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	1 +	positiv
10	akut	3 +	3 +	-	3 +	2 +	-	positiv
11	negativ	-	-	-	-	-	-	negativ
12	akut	3 +	3 +	-	2 +	1 +	-	positiv
13	akut	2 +	-	-	3 +	3 +	-	positiv
14	akut	3 +	1 +	-	3 +	3 +	-	positiv
15	chronisch	3 +	3 +	-	4 +	-	-	positiv
16	negativ	-	-	-	-	-	-	negativ
17	akut	Streifen ungültig, da +/- Kontrollbande fehlt!						
18	akut	1 +	-	-	4 +	2 +	1 +	positiv
19	negativ	-	-	-	-	-	-	negativ
20	akut	2 +	3 +	-	2 +	-	-	positiv
21	akut	4 +	4 +	+/-	4 +	4 +	+/-	positiv
22	akut	4 +	4 +	+/-	4 +	4 +	+/-	positiv
23	akut	2 +	-	-	+/-	+/-	-	positiv
24	negativ	-	-	-	-	-	-	negativ
25	akut	1 +	-	-	3 +	1 +	-	positiv
26	akut	-	-	-	-	-	-	negativ
27	akut	-	-	-	+/-	-	-	fraglich
28	akut	-	-	-	+/-	-	-	fraglich
29	chronisch	3 +	-	+/-	4 +	+/-	-	positiv
30	chronisch	4 +	4 +	1 +	4 +	3 +	-	positiv
31	chronisch	-	-	-	4 +	3 +	-	positiv
32	chronisch	3 +	3 +	3 +	4 +	4 +	4 +	positiv
33	chronisch	3 +	3 +	3 +	4 +	4 +	4 +	positiv
34	negativ	-	-	-	-	-	-	negativ
35	akut	3 +	3 +	-	+/-	-	-	positiv
36	akut	1 +	+/-	-	3 +	3 +	1 +	positiv
37	akut	2 +	-	-	-	-	-	fraglich
38	chronisch	4 +	3 +	+/-	4 +	4 +	2 +	positiv
39	chronisch	4 +	4 +	1 +	4 +	4 +	3 +	positiv
40	chronisch	-	-	-	4 +	1 +	-	positiv

Tabelle 75: Auswertung des anti-HCV-IgG Assays für die Proben, die ebenfalls mit dem INNO-LIA™ HCV Score analysiert wurden (vgl. Abbildung 56 und Tabelle 74). Die Bewertung der Antigenreaktivitäten erfolgte wie in 4.4.2 beschrieben.

Probe auf Streifen Nr.	Core_3 g4a	Core g1b	c22 g1a	NS3_1 g4a	NS3 g1a	NS3_2 g1b	NS4_2	5-1-1 g4a	c100 g4a	NS5A g4a	NS5B_1 g4a	NS5 g1	Resultat
3	2	2	2	2	2	1	3	5	1	1	1	2	positiv
4	1	2	2	4	2	2	3	2	4	3	2	3	positiv
5	2	2	3	2	2	1	3	5	1	1	1	2	positiv
6	4	4	3	4	2	2	2	2	2	1	1	2	positiv
7	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	1	negativ
8	3	4	5	4	2	2	1	2	2	1	1	2	positiv
9	6	6	6	5	6	6	5	6	4	4	4	6	positiv
10	5	5	6	5	6	6	5	5	5	1	2	2	positiv
11	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	negativ
12	5	5	6	5	2	2	2	2	2	1	1	2	positiv
13	2	3	4	6	5	4	6	6	2	2	2	1	positiv
14	3	4	5	6	5	5	6	5	6	3	2	2	positiv
15	5	5	6	4	2	2	2	3	2	2	1	3	positiv
16	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	negativ
18	2	2	2	5	3	3	4	6	5	3	2	2	positiv
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	negativ
20	3	4	4	3	2	1	1	1	1	1	1	2	positiv
21	6	6	5	5	5	5	5	5	5	1	2	2	positiv
22	6	6	6	4	3	3	5	5	4	1	2	2	positiv
23	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	positiv
24	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	negativ
25	2	2	2	3	4	2	4	2	3	3	1	1	positiv
26	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	negativ
27	1	1	1	2	2	2	3	1	1	1	1	1	positiv
28	1	1	2	2	1	2	2	4	1	1	2	1	positiv
29	2	3	5	5	6	6	2	2	1	1	2	2	positiv
30	6	6	6	5	6	4	5	5	5	2	2	2	positiv
31	1	2	1	6	6	6	4	5	1	2	3	2	positiv
32	3	5	5	6	6	5	5	5	4	6	5	6	positiv
33	4	5	6	6	6	6	6	5	5	5	2	6	positiv
34	2	1	1	3	1	1	2	1	1	2	1	1	negativ
35	4	5	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	positiv
36	2	2	4	5	2	2	5	6	5	4	2	4	positiv
37	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	positiv
38	3	4	6	5	4	4	4	2	5	2	2	2	positiv
39	6	6	6	4	4	3	4	3	4	4	2	4	positiv
40	1	2	2	4	2	4	3	2	3	1	1	2	positiv

Tabelle 76: Ermittlung der Stabilität gegenüber Gefrierzyklen im Multipathogen-Assay. Jeder Messwert (MFI) wurde auf eine frisch aufgetaute Probe referenziert und in % angegeben. Die dargestellten Werte für jede QC Probe wurden über 25 Antigene verschiedener Pathogene berechnet.

Probe	Gefrierzyklus	Referenzierte Werte [%]			
		Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
QC positiv 1 <i>IgG Messung</i>	1	102,4	1,7	98,4	106,6
	2	104,8	3,1	98,1	113,2
	3	105,5	3,7	98,6	114,6
	4	106,5	2,8	99,3	113,1
QC positiv 2 <i>IgG Messung</i>	1	102,9	3,9	95,3	111,1
	2	102,4	3,7	95,6	108,3
	3	101,0	4,1	92,7	110,4
	4	98,2	2,7	90,2	102,1
QC positiv 3 <i>IgG Messung</i>	1	100,7	4,3	86,4	106,4
	2	103,0	5,7	94,5	114,7
	3	104,3	7,2	87,0	117,7
	4	104,5	6,7	88,3	113,1
QC negativ <i>IgG Messung</i>	1	109,5	9,9	86,3	129,6
	2	108,6	9,5	87,7	125,8
	3	101,8	5,9	87,8	114,8
	4	96,9	4,2	86,5	105,2
QC positiv 6 <i>IgM Messung</i>	2	95,3	11,1	68,0	127,5
	3	104,1	10,8	76,3	132,0
	5	111,5	5,9	90,2	119,1
QC positiv 7 <i>IgM Messung</i>	2	97,4	5,3	87,1	106,9
	3	100,8	5,2	94,5	115,2
	5	106,2	3,4	100,9	114,9

Tabelle 77: Ermittlung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität bei IgG Messung im Multipathogen-Assay. Jeder Messwert (MFI) wurde auf eine frisch aufgetaute Probe referenziert und in % angegeben. Die dargestellten Werte für jede QC Probe wurden über 25 Antigene verschiedener Pathogene berechnet.

Probe	Zeit / Temperatur	Referenzierte Werte [%]			
		Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
QC positiv 1	2 h / RT	99,5	3,7	89,4	104,0
	4 h / RT	101,1	5,8	83,2	107,7
	24 h / RT	103,6	4,9	91,1	110,9
	2 h / 4 °C	103,9	3,0	96,7	109,7
	4 h / 4 °C	103,6	3,6	93,6	111,0
	24 h / 4 °C	102,5	4,2	92,8	107,8
QC positiv 2	2 h / RT	99,6	4,5	86,5	106,3
	4 h / RT	99,3	5,6	86,7	118,9
	24 h / RT	103,8	6,8	87,9	121,7
	2 h / 4 °C	102,5	4,2	93,0	110,8
	4 h / 4 °C	102,2	4,0	92,9	109,8
	24 h / 4 °C	101,9	4,5	91,0	113,4
QC positiv 3	2 h / RT	94,6	8,4	69,4	108,8
	4 h / RT	97,2	10,1	68,6	118,3
	24 h / RT	99,3	11,3	62,4	124,9
	2 h / 4 °C	103,1	4,5	93,8	109,4
	4 h / 4 °C	103,1	4,2	95,5	110,1
	24 h / 4 °C	101,5	5,6	90,1	116,3
QC negativ	2 h / RT	90,4	11,4	68,8	104,3
	4 h / RT	87,7	12,6	61,1	107,9
	24 h / RT	91,7	14,7	58,1	117,3
	2 h / 4 °C	91,6	10,1	71,6	110,9
	4 h / 4 °C	91,0	10,5	69,8	110,6
	24 h / 4 °C	89,1	13,2	62,7	113,5

Tabelle 78: Ermittlung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität bei IgM Messung im Multipathogen-Assay. Jeder Messwert (MFI) wurde auf eine frisch aufgetaute Probe referenziert und in % angegeben. Die dargestellten Werte für jede QC Probe wurden über 25 Antigene verschiedener Pathogene berechnet.

Probe	Zeit / Temperatur	Referenzierte Werte [%]			
		Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
QC positiv 6	2 h / RT	106,2	4,7	97,5	118,0
	4 h / RT	93,2	5,0	82,4	106,6
	24 h / RT	114,4	6,2	101,0	124,5
	2 h / 4 °C	97,5	3,1	91,1	103,1
	4 h / 4 °C	114,9	5,6	104,8	127,6
	24 h / 4 °C	89,8	4,2	77,4	98,0
QC positiv 7	2 h / RT	96,4	2,8	91,0	104,3
	4 h / RT	68,8	3,3	62,0	74,7
	24 h / RT	98,5	4,2	89,6	109,5
	2 h / 4 °C	96,5	4,3	84,2	102,5
	4 h / 4 °C	88,5	2,6	83,5	92,0
	24 h / 4 °C	95,4	3,6	84,8	101,5

Tabelle 79: Reaktivitäten auf nicht-HCV Antigenen im Multipathogen-Assay von Proben aus Ägypten. Dargestellt sind die reaktiven Proben, d. h. Proben bei denen der Messwert größer als das willkürliche Cut-Off 500 MFI waren.

Pathogen	Antigen	HCV akut n = 166		HCV chronisch n = 33		HCV negativ n = 26	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
HAV	VP1-P2A_1	1	0,6	0	0,0	0	0,0
	VP1-P2A_2	8	4,8	1	3,0	2	7,7
	VP4-VP2	1	0,6	0	0,0	0	0,0
	VP3	89	53,6	22	66,7	8	30,8
	VP1	63	38,0	15	45,5	5	19,2
HBV	HBc	68	41,0	14	42,4	4	15,4
	HBs_1	20	12,0	2	6,1	13	50,0
	HBs_2	31	18,7	3	9,1	24	92,3
	HBe	9	5,4	1	3,0	0	0,0
HDV	HDV	15	9,0	1	3,0	1	3,8
HEV	HEV	77	46,4	8	24,2	4	15,4
EBV	EA	48	28,9	19	57,6	8	30,8
	EBNA-1	160	96,4	29	87,9	21	80,8
	p18	112	67,5	25	75,8	7	26,9
	p23	155	93,4	32	97,0	20	76,9
CMV	gB	95	57,2	17	51,5	9	34,6
	Pp28	160	96,4	32	97,0	20	76,9
	Pp38	156	94,0	32	97,0	19	73,1
	Pp52	159	95,8	32	97,0	17	65,4
	Pp65	110	66,3	25	75,8	13	50,0
	Pp150	114	68,7	19	57,6	14	53,8
	Lysat	164	98,8	30	90,9	20	76,9
<i>T. gondii</i>	Lysat	87	52,4	16	48,5	7	26,9
<i>H. pylori</i>	Lysat_1	148	89,2	29	87,9	12	46,2
	Lysat_2	141	84,9	27	81,8	12	46,2

Tabelle 80: Reaktivitäten auf nicht-HCV Antigenen im Multipathogen-Assay von Proben aus Frankreich und den USA.
 Dargestellt sind die reaktiven Proben, d. h. Proben bei denen der Messwert größer als das willkürliche Cut-Off 500 MFI waren.

Pathogen	Antigen	Frankreich				USA	
		HCV chronisch n = 108		HCV negativ n = 61		HCV negativ n = 30	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
HAV	VP1-P2A_1	0	0,0	1	1,6	2	6,7
	VP1-P2A_2	4	3,7	0	0,0	0	0,0
	VP4-VP2	3	2,8	0	0,0	0	0,0
	VP3	83	76,9	10	16,4	16	53,3
	VP1	60	55,6	11	18,0	3	10,0
HBV	HBc	38	35,2	5	8,2	4	13,3
	HBs_1	25	23,1	20	32,8	17	56,7
	HBs_2	12	11,1	27	44,3	5	16,7
	HBe	4	3,7	1	1,6	3	10,0
HDV	HDV	4	3,7	0	0,0	0	0,0
HEV	HEV	7	6,5	8	13,1	0	0,0
EBV	EA	74	68,5	11	18,0	4	13,3
	EBNA-1	96	88,9	55	90,2	30	100,0
	p18	66	61,1	33	54,1	22	73,3
	p23	106	98,1	57	93,4	30	100,0
CMV	gB	65	60,2	13	21,3	10	33,3
	Pp28	80	74,1	29	47,5	23	76,7
	Pp38	76	70,4	25	41,0	25	83,3
	Pp52	86	79,6	17	27,9	19	63,3
	Pp65	84	77,8	17	27,9	13	43,3
	Pp150	60	55,6	20	32,8	18	60,0
	Lysat	78	72,2	26	42,6	24	80,0
<i>T. gondii</i>	Lysat	87	80,6	36	59,0	4	13,3
<i>H. pylori</i>	Lysat_1	37	34,3	8	13,1	17	56,7
	Lysat_2	31	28,7	9	14,8	18	60,0

Danksagung

Prof. Dr. Stefan Stevanović danke ich herzlich für die Annahme als Doktorand und bei Prof. Dr. Ulrich Rothbauer bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Besonders danke ich Dr. Thomas O. Joos und Dr. Nicole Schneiderhan-Marra für die Bereitstellung des Themas, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen sowie die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit am NMI. Auch Dr. Jens Göpfert danke ich für die Unterstützung im ersten Jahr meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Dr. Darragh Duffy und Dr. Matthew L. Albert vom Institut Pasteur in Paris für die Bereitstellung der Proben.

Bei Hannes Planatscher, Dr. Nico Weber und Elise Ross bedanke ich mich besonders für die hervorragende Unterstützung im Bereich der Statistik und Bioinformatik. Bei Monika Schrenk und Andrea Dehm bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der kommerziellen Diagnostiktests. Den aktuellen und ehemaligen Kollegen in der Abteilung Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern Jutta und Giovanni Filomena, meinem Bruder Claudio und meiner Oma Margarete Proksch für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Angela Filomena

Geburtsdatum 6. Februar 1987
Geburtsort Reutlingen

Akademische und schulische Ausbildung

- 05/2012 – 12/2015 **Promotion** am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI Reutlingen), Abteilung Biochemie
Thema: Multiplexe serologische Assays für die Analyse der humoralen Immunantwort auf das Hepatitis C Virus Genotyp 4
Betreuer: Prof. Stefan Stevanović, Dr. Thomas Joos, Dr. Nicole Schneiderhan-Marra
- 10/2006 – 01/2012 **Studium der Biochemie** an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Schwerpunktfächer: Pharmazeutische Chemie, Humangenetik
Abschluss: Diplom

Diplomarbeit am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI Reutlingen), Abteilung Biochemie
Thema: Entwicklung eines Immunoassays zur Quantifizierung von ALT1 und ALT2 in humanen Proben
Betreuer: Dr. Thomas Joos, Dr. Nicole Schneiderhan-Marra
- 09/1997 – 07/2006 **Abitur** am Albert-Einstein-Gymnasium in Reutlingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Fachliches Engagement

Junior-Gruppe der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)

- 04/2013 – 10/2013 Sprecherin der Stadtgruppe Tübingen
12/2013 – 05/2014 Organisation und Durchführung des jGBM-Sommersymposiums 2014
04/2014 – 10/2014 Schriftführerin

Veröffentlichungen, Vorträge, Posterpräsentationen und Weiterbildungen:

Veröffentlichungen

- 09/2015 Bead-Based Peptide Arrays for Profiling the Specificity of Modification State-Specific Antibodies
Angela Filomena, Yvonne Beiter, Markus F. Templin, Thomas O. Joos, Nicole Schneiderhan-Marra, Oliver Poetz
Peptide Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 1348, pp 251-265, 2015
- 09/2015 A frequent hypofunctional IRAK2 variant is associated with reduced spontaneous hepatitis C virus clearance
Hui Wang, Souhayla El Maadidi, Janett Fischer, Elena Grabski, Sabine Dickhöfer, Sascha Klimosch, Sinead M. Flannery, **Angela Filomena**, Olaf-Oliver Wolz, Nicole Schneiderhan-Marra, Markus W. Löffler, Manfred Wiese, Tica Pichulik, Beat Müllhaupt, David Semela, Jean-François Dufour, the East-German and Swiss Hepatitis C Virus Study Groups, Pierre-Yves Bochud, Andrew G. Bowie, Ulrich Kalinke, Thomas Berg, Alexander N. R. Weber
Hepatology, Volume 62, Issue 5, November 2015 (online publiziert am 28.09.2015)

Vorträge

- 07/2015 QC sample preparation for assay validation
Jahrestreffen der GBM-Studiengruppe Bioanalytik, Reutlingen

Posterpräsentationen

- 11/2015 A serological study on 9 pathogens in HCV positive and negative samples
Angela Filomena, Darragh Duffy, Matthew L. Albert, Thomas O. Joos, Nicole Schneiderhan-Marra
xMAP Connect, Amsterdam, Niederlande
- 10/2014 Optimal selection of samples for multiplex serological assay validation
Hannes Planatscher, **Angela Filomena**, Oliver Poetz, Thomas O. Joos, Nicole Schneiderhan-Marra
HUPO – 13th Annual World Congress, Madrid, Spanien
- 10/2013 A multiplexed antigen array for the analysis of the human serological response for HCV and 8 other pathogens
Angela Filomena, Jens Göpfert, Stefanie Rimmele, Darragh Duffy, Matthew L. Albert, Thomas O. Joos, Nicole Schneiderhan-Marra
Trends in Diagnostics, Tübingen

09/2013 Analysing the human serological response for HCV and 8 other pathogens with a Multiplexed Antigen Array

Angela Filomena, Jens Göpfert, Stefanie Rimmele, Darragh Duffy, Matthew L. Albert, Thomas O. Joos, Nicole Schneiderhan-Marra
The Viral Hepatitis Congress 2013, Frankfurt am Main

01/2013 Multiplexed antigen arrays for the analysis of the human serological response for HCV genotype 4

Angela Filomena, Jens Göpfert, Darragh Duffy, Matthew L. Albert, Thomas O. Joos, Nicole Schneiderhan-Marra
Dechema – Functional Genomics and Proteomics, Frankfurt am Main

Weiterbildungen

09/2015 GMP-Lehrgang

Technische Universität Berlin

10/2013 Workshop: Trends in Diagnostics

Eberhard Karls Universität Tübingen

06/2012 SPHINX Clinical epidemiology and biomarker discovery workshop

Institut Pasteur de Tunis, Tunesien