

Johannes Hoos

Dr. med.

Optimization and evaluation of a rapid test for respiratory syncytial virus infection in children based on reverse transcription isothermal loop-amplification

Fach/Einrichtung: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Paul Schnitzler

Das respiratorische Synzytial-Virus (RSV) ist eine der weltweit häufigsten Ursachen für Infektionen insbesondere der unteren Atemwege im pädiatrischen Patientenkollektiv. Neugeborene und Kleinkinder sind besonders gefährdet schwere Symptome zu entwickeln, die eine Krankenhausbehandlung notwendig machen. Aufgrund der hohen Kontagiosität stellen nosokomiale Infektionen durch RSV ein hohes Risiko für andere stationäre Patienten dar und müssen daher durch konsequente Hygienemaßnahmen und verlässliche Screening-Tests verhindert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluation eines neuen Schnelltestverfahrens für RSV Infektionen im Kindesalter basierend auf der Methode der reversen Transkription und isothermalen Loop-Amplifikation (RT-LAMP) von viraler RNA. Patientenabstriche sollten nach Möglichkeit direkt getestet werden können ohne einen vorherigen Schritt der RNA-Isolation. Am Ende der Testentwicklung sollte ein leicht zu bedienender und günstiger Schnelltest basierend auf isothermaler Loop-Amplifikation stehen. Um den Anforderungen an einen Schnelltest zu genügen, sollte die Zeit von der Probengewinnung bis zum Erhalt des Testergebnisses maximal 30 Minuten betragen und der Test im Vergleich zu konventionellen antigenbasierten Screeningtests eine mindestens vergleichbare Sensitivität aufweisen.

Die verwendeten Testreagenzien und Primer für RSV A und B wurden bereits in der Literatur beschrieben. Verschiedene experimentelle Schritte der Probenvorbereitung und Bearbeitung wurden systematisch evaluiert. Letztlich konnten optimale Proben-, Test- und Amplifikationsbedingungen definiert werden, die zu einer hohen Testsensitivität führen. Der Gebrauch von nasopharyngealen Abstrichen als Testmaterial für den neuen Test war Rachenspülwasser überlegen. Das Protokoll zur Probenvorbereitung sieht vor, dass das Abstrichmaterial im Verhältnis 1:20 in Lysepuffer verdünnt und für 2 Minuten auf 99°C erhitzt wird. Im Anschluss erfolgt die bei 63°C durchgeführte isothermale Amplifikationsreaktion für insgesamt 30 Minuten. Es wurden ferner verschiedene reverse Transkriptasen verglichen und das optimale Enzym im Test bzw. dem Testprotokoll verankert.

Der entwickelte Schnelltest wurde im Anschluss an prospektiv gesammelten Patientenproben (n=235) evaluiert. Diese wurde an Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Heidelberg, Deutschland vom 11. November 2014 bis zum 9. April 2015 gesammelt. In dieser Patientenkohorte war RSV verantwortlich für 60% aller Atemwegsinfektionen und wurde insgesamt bei 111 Kindern detektiert. Der vorherrschende

Virussubtyp war RSV B mit 55% aller RSV positiven Patienten. Der neu entwickelte Schnelltest basierend auf isothermaler Loop-Amplifikation hatte in der Kohorte eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 73% im Vergleich zur Polymerase-Kettenreaktion als Referenzmethode. Die Sensitivität bei RSV A positiven Proben war signifikant höher im Vergleich zu RSV B Proben (90% vs. 59%, $p < 0,01$). Die durchschnittliche Amplifikationszeit aller RSV positiven Proben lag bei etwas unter 16 Minuten.

Die Güte und Zuverlässigkeit des neuen Loop-Amplifikations-Schnelltests ist mindestens dem weit verbreiteten antigenbasierten Schnelltest gegenüber vergleichbar und diesem in einigen Punkten, wie z.B. in Bezug auf die Testsensitivität, leicht überlegen. Jedoch wurde bei zwei Untergruppen der Studienkohorte, bei Proben der Subgruppe RSV Typ B sowie bei Proben mit generell niedriger Viruslast, eine reduzierte Testsensitivität beobachtet. Hier könnten eine inkorrekte Probenentnahme, die Auswahl der Primer für RSV B sowie Faktoren in der Patientenprobe, die die Amplifikationsreaktion hemmen, eine Rolle spielen.

Schlussfolgernd stellt der neue Schnelltest basierend auf der reversen Transkription und isothermalen Loop-Amplifikation eine geeignete Screeningmethode für RSV-Infektionen dar. Er ist eine gute Alternative zu konventionellen antigenbasierten Schnelltests für ein RSV-Screening in Notaufnahmen von Krankenhäusern mit höchster Spezifität und guter Sensitivität. Die Vorteile der isothermalen Loop-Amplifikation sind eine kurze Testzeit für die Amplifikationsreaktion und die Möglichkeit, Proben zu testen, ohne vorher zwingend RNA zu isolieren und aufzureinigen. Die Patientenproben können leicht gewonnen werden und die Testsensitivität übertrifft die der antigenbasierten Tests bei vergleichbarer Spezifität. Da die Kosten für den Test im Vergleich zu den aktuellen Alternativen niedrig ausfallen, stellt die neue Loop-Amplifikationstechnologie eine geeignete Methode zum RSV-Screening in Entwicklungs- und Schwellenländern dar, wo die meisten Todesfälle bei Kindern bedingt durch akute untere Atemwegsinfektionen durch RSV vorkommen.