

Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit

Bei der 24. Sitzung des Arbeitskreises Blut am 3. September 1997 wurde folgendes Votum (V 18) verabschiedet:

Nukleinsäure-Nachweistechniken in der Transfusionsmedizin: Voraussetzungen

1 Prinzip der Methode

Nukleinsäure-Nachweistechniken (NNT) können RNA und DNA von Infektionserregern, aber auch von menschlichen Genen nachweisen. Zur Zeit sind fünf kommerziell erhältliche Methoden auf dem Markt: PCR, LCR, NASBA, TMA und b-DNA-assay. Neue Verfahren, die auch das Risiko von Kontaminationen minimieren, sind in Entwicklung.

2 Infektionserreger und ihre Nachweisbarkeit

Nach Eintritt in den Körper erfolgt bei einem dem Immunsystem unbekanntem Erreger zunächst eine Phase der Vermehrung, die gewöhnlich zu einer Immunantwort führt. Je nach Infektionserreger ist normalerweise die Immunantwort über Entzündungszeichen und schließlich über spezifische Antikörper meist innerhalb von zwei Wochen, bei manchen Erregern erst nach zwölf bis 16 Wochen, nachweisbar.

Häufig verursachen Infektionserreger in der Anfangsphase der Infektion klinische Zeichen, die einen Ausschluß von der Blutspende ermöglichen. Für die NNT besonders relevant sind Infektionserreger wie HBV und HCV, die eine langanhaltende virämische Phase bei geringer klinischer Symptomatik haben können und bei denen der serologische Nachweis verzögert ist. Bei der HCV-Infektion kann im Einzelfall mit den derzeitigen Antikörpertests der serologische Nachweis der Infektion nicht gelingen. In der diagnostischen Fensterperiode ist also der Erreger über die serologischen Tests nicht nachweisbar, obwohl Infektiosität bestehen kann. NNT können in dieser Periode positiv ausfallen.

Neben transfusionsrelevanten Viren können auch andere Infektionserreger, wie Bakterien oder Protozoen, über NNT nachgewiesen werden.

3 Ausgangsmaterial

Im Blutspendedienst können routinemäßig Vollblut, Plasma, Serum und bei Bedarf Zellen für die Diagnostik der Infektionserreger als Ausgangsmaterial herangezogen werden. Zur Zeit sind in Deutschland vor allem folgende Viren transfusionsrelevant: HBV, HCV und HIV. Das Risiko ihrer Übertragung kann durch Einführen der NNT vermindert werden. Wegen geringer Virusmengen und wegen verschiedener Genotypen bzw. Varianten läßt sich eine 100%ige Sicherheit zur Vermeidung

transfusionsassoziierter Infektionen auch nach Einführen der NNT nicht erreichen.

HBV – Hepatitis B Virus

In der Frühphase der HBV-Infektion können Virusmengen von über 10^6 Genomequivalenten/ml vorkommen. Der HBS-Antigentest kann ab 10^4 Partikel/ml positiv werden. HBS-Antigen von HBV-Mutanten kann eine geringere Nachweissensitivität verursachen. Mit einsetzender Anti-HBs Produktion fällt die Virusmenge ab. Der Nachweis der HBV-DNA über NNT erfolgt in Plasma oder Serum.

HCV – Hepatitis C Virus

In der Frühphase der HCV-Infektion können Virusmengen von bis zu 10^8 Genomequivalenten/ml vorkommen. Abhängig von der Replikationsrate in der Leber und von der individuellen Immunantwort schwankt die Virusmenge erheblich über die Zeit. Der Nachweis der viralen RNA über NNT ist bei vielen Infizierten auch nach erfolgter Antikörperproduktion in Plasma bzw. Serum möglich. Typisch für die HCV-Infektion ist eine undulierende Virusmenge.

HIV – Humanes Immunschwächevirus

In der Frühphase der HIV-Infektion können Virusmengen von bis zu 10^8 Genomequivalenten/ml vorkommen. Der Virusnachweis über die NNT ist während der Zeit der Antikörperbildung möglich. Die Virusmenge in Serum bzw. Plasma unterliegt Schwankungen. Der HIV-Nachweis ist auch über provirale DNA in T-Lymphozyten möglich. HIV-2 und HIV-1 Subtyp O werden über die NNT derzeit mit kommerziell erhältlichen Tests nicht erfaßt.

4 Analytische Sensitivität

HCV und HIV sind RNA-haltige Viren, HBV ist ein DNA-haltiges Virus. Bei der Extraktion von Nukleinsäuren und dem Umschreiben von RNA in DNA können je nach Verfahren, Primer-Auswahl und Heterogenität der Primer-Bindungsstellen erhebliche Verluste (über 80 %) auftreten und somit die Sensitivität beeinflussen. Im Virus eingehüllte DNA/RNA ist bei 4 °C für Tage, bei -20 °C für Wochen und bei tieferen Temperaturen für Monate bis Jahre haltbar. Nach Zerstören der Virushülle wird freie RNA von HCV und HIV im Plasma/Serum schnell, d. h. innerhalb von wenigen Minuten, abgebaut. Freigelegte virale DNA von HBV kann für einige Stunden stabil sein. Je länger Vollblut gelagert ist, um so weniger ist es als Ausgangsmaterial für die Durchführung der NNT geeignet.

Die humane infektiöse Dosis ist als absolute Zahl der Viruspartikel schwer bestimmbar. Offenbar können bei HCV und HBV etwa zehn bis 100 Partikel und bei HIV etwa 100 Vi-

ruspartikel zur Infektion führen. Ob eine Infektion durch Eindringen der Viren direkt in die Blutbahn mit geringerer Virusdosis möglich ist, wie z. B. beim Sexualverkehr, ist ungewiß. Zur Vermeidung einer Infektionsübertragung sollten möglichst wenige Genomequivalente oder Kopien von viralem Erbmaterial im Ausgangsmaterial als untere Nachweisgrenze für die NNT angestrebt werden.

5 Vereinen von Ausgangsmaterial von mehreren Spenden

Wie bei jedem Test und Testverfahren, welches zu einer hohen Sicherheit führen soll, ist bei NNT grundsätzlich eine Testdurchführung in der Einzelspende anzustreben. Das Testen in der Einzelspende hat sich bei den serologischen Nachweismethoden über Jahre bewährt. Aus technischen und finanziellen Gründen sind die Voraussetzungen für das Durchführen der NNT in der Einzelspende derzeit im Blutspendedienst nicht gegeben. Vereinen von Aliquots von verschiedenen Spenden für die Durchführung der NNT im Blutspendewesen ist nur als eine Übergangsregelung zu sehen. Während der Zeit des Übergangs ist ein Vermischen von Einzelvolumina (Pool-Herstellung) und nachfolgende Konzentration der Partikel oder Nukleinsäuren möglich. Verfahren sind z. B.: Ultrazentrifugation, oder Freisetzen der Nukleinsäure, z. B. über chaotrope Substanzen wie Guanidinisothiocyanat, und nachfolgende Adsorption an eine Säulenmatrix und Elution, oder Freisetzen der Nukleinsäure und ihre nachfolgende Präzipitation. Möglich ist auch die aufeinanderfolgende Nukleinsäureadsorption von verschiedenen Spenden an einer Matrix, ohne daß es vorher zu einem Vermischen der Spenden gekommen ist.

Wird ein Zentrifugationsverfahren verwendet, muß gewährleistet sein, daß von den Viren ein ausreichender Anteil wiedergefunden wird. Die Möglichkeit des Abschwimmens der Viren in andere Schichten oder der Adsorption an Röhrchenmaterial muß im Verfahren berücksichtigt werden. Die viralen Nukleinsäuren müssen möglichst quantitativ aus dem Ausgangsmaterial extrahiert werden.

Das notwendige Aliquotvolumen der Einzelspende wird von der Effizienz der Anreicherung der Nukleinsäure und der Sensitivität des NNT bestimmt. Werden Proben vermischt, so ist jeweils ein Pool aus einer möglichst niedrigen Anzahl von Einzelspenden anzustreben.

6 Nukleinsäurefreisetzung und -anreicherung

Das Freisetzen und die Extraktion von Nukleinsäuren ist mit verschiedenen Techniken möglich. Es muß ein technisches Verfahren verwendet werden, welches gewährleistet, daß die freie Nukleinsäure nicht von DNasen oder RNasen abgebaut wird, bzw. nicht an die um-

gebende Matrix adsorbiert wird. Die Effizienz des Freisetzungs- und Extraktionsvorgangs ist durch geeignete Kontrollen, wie Zugabe von Kontrollvirus und Mitführen standardisierter Nukleinsäure-Präparationen, regelmäßig zu überprüfen. Das verwendete Präparationsverfahren muß gewährleisten, daß die erhaltene Nukleinsäure in einem umschreibbaren, hybridisierbaren und/oder amplifizierbaren Zustand ist.

Wird von Zellmaterial ausgegangen, dann ist zu gewährleisten, daß die virale Nukleinsäure auch noch in einem sehr großen Überschuß von humaner Nukleinsäure nachgewiesen wird. Eine Inhibition der Nukleinsäurehybridisierung bzw. -amplifikation soll durch geeignete Kontrollen erkannt werden.

7 Validierung des NNT-Verfahrens

Die Validierung des Verfahrens ist besonders sorgfältig und regelmäßig zu überprüfen, auch wenn kommerziell verfügbare NNT verwendet werden: validiert müssen sein z. B. die Anreicherung von HBV, HCV und HIV über physikalische und chemische Verfahren, die Freisetzung, Extraktion und Stabilität der Nukleinsäuren. Verwendete Primer, Sonden und Enzyme müssen auf ihre Bindungsspezifität und Aktivität im jeweiligen Verfahren evaluiert sein.

Liegt der Verdacht auf Koamplifikation von nicht-viruspezifischem genetischen Material vor, dann muß die erhaltene Nukleinsäure über Sequenzierung auf ihre Authentizität untersucht werden. Die Möglichkeit einer Kontamination ist durch die Ergebnisse der Kontrollen und im Bedarfsfall Wiederholung des Tests zu überprüfen.

Die Validierung muß die Heterogenität der untersuchten Viren berücksichtigen, z. B. die verschiedenen Genotypen von HBV und HCV, und die verschiedenen Subtypen von HIV sowie deren Prävalenz. Richtlinien zur Validierung der NNT sind zu entwickeln.

8 Kontrollen

Wie bei jedem Testverfahren ist das Mitführen von Negativ- und Positivkontrollen obligatorisch, zusätzlich sind Inhibitionskontrollen erforderlich. Jeder Verfahrensschritt muß zusätzlich über geeignete Kontrollen periodisch überprüft werden. Die Menge der Nukleinsäure in der Positivkontrolle sollte im unteren Nachweisbereich liegen.

Neben der internen Qualitätskontrolle ist die externe Qualitätskontrolle durch Teilnahme an Ringversuchen unbedingt erforderlich. Stehen für die speziellen Anforderungen im

Blutspendewesen geeignete externe Kontrollen nicht zur Verfügung, ist wenigstens jährlich ein Ringversuch mit Hilfe von Experten durchzuführen. Die Proben der Ringversuche müssen Genome der getesteten Viren in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten und dem Routineverfahren des Blutspendedienstes unterworfen werden. Die Ringversuchsproben sollten dem jeweiligen Genotypen-/Subtypen-Spektrum der Erreger epidemiologisch angepaßt sein, auch wenn anzustreben ist, daß alle bekannten Genotypen/Subtypen über die NNT erfaßt werden.

9 Räumliche Voraussetzungen

Voraussetzungen für die Anforderungen zur Durchführung der PCR sind in DIN 58967-60 und 58967-61 niedergelegt und gelten für andere NNT entsprechend. Werden Verfahren verwendet, die einen vollständigen Abbau der Amplifikate vor den Neuansatz eines weiteren Tests garantieren, dann können die DIN-Forderungen für die räumlichen Voraussetzungen eingeschränkt werden.

Bei den Hilfsmaterialien, wie Pipetten, Spitzen, Puffervolumina und deren Lagerung, Schutzkleidung etc. sind die in DIN beschriebenen besonderen Voraussetzungen zu erfüllen. Die Belüftung und Entlüftung der Räume soll Kontaminationen durch Amplifikate und Nukleinsäuren vermeiden. Nachdem bei den NNT nur Genomfragmente von Viren vervielfältigt und nachgewiesen werden und somit kein infektiöses Material entsteht, unterliegen die Verfahren der NNT nicht § 19 f des Bundesseuchengesetzes.

Es ist damit zu rechnen, daß in wenigen Jahren Vollautomaten zum Durchführen der NNT erhältlich sind und die derzeit zu fordernden speziellen räumlichen Vorgaben an die NNT teilweise überflüssig machen. Für den Aufwand an Räumlichkeiten sind die unter Punkt 11 aufgeführten Voraussetzungen zur Aufbewahrung von Proben für die eventuelle Nachtestung ebenfalls zu berücksichtigen.

10 Kosten-Nutzen-Aspekte

Eine Kosten-Nutzen-Analyse als ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Abwägung einer Einführung der NNT in der Transfusionsmedizin wird derzeit erstellt und wird in Kürze als separate Stellungnahme des Arbeitskreises Blut veröffentlicht.

11 Proben für die Nachtestung

Von jeder Spende müssen geeignete Volumina, die eine Nachtestung über NNT und Antikörper ermöglichen, aufbewahrt werden. Plasma/

Serum sollte innerhalb von 24 Stunden von den zellulären Bestandteilen abgetrennt sein. Es wird ein Volumen von 1 bis 2 ml Serum/Plasma empfohlen. Es sollen Vorkehrungen getroffen werden, die eine Kontamination und ein unnötiges Auftauen der NNT-Proben vermeiden, z. B. durch Aliquotierung.

Die Asservierung von Plasma/Serum über das Eintrocknen an Filterpapieren (Guthrie cards) stellt zukünftig möglicherweise eine Alternative zum Einfrieren dar.

Die angereicherte Nukleinsäure ist solange bei -30°C aufzubewahren, bis ein eindeutig negatives oder positives Ergebnis des NNT vorliegt. Bei fraglichen und positiven Ergebnissen in einer Probe bzw. Spende ist eine Wiederholung des NNT zügig aus dem Nukleinsäureextrakt und zusätzlich aus dem Ausgangsmaterial ohne Vermischen mit einer anderen Probe durchzuführen.

Für das Aufbewahren der Nachuntersuchungsproben sind Geräte, Räumlichkeiten und Kontrollbedingungen zu verwenden, die die GMP-Bedingungen erfüllen.

12 Testprotokoll und Freigabe der Spenden

Über jeden NNT muß ein ausreichendes Protokoll vorhanden sein, aus dem hervorgeht, wieviele Proben in einem Testlauf analysiert worden sind und wieviele vermischte Proben mit welchen Verfahren und Chargen von Reagenzien analysiert wurden. Ferner muß ersichtlich sein, wie das Ergebnis der Kontrollen ausfiel und wer an der Testdurchführung beteiligt war. Dieses Protokoll ist zehn Jahre aufzubewahren. Eine sichere EDV-kompatible Aufbewahrung der Protokolle ist statthaft, wenn der Zugriff auf die Daten in angemessener Zeit sichergestellt wird.

Nur bei einwandfreiem Ergebnis der Kontrollen und bei Überprüfen der Analyse durch eine an der Analyse nicht beteiligte Person können Spenden mit negativem NNT-Ergebnis vom Kontrolleur freigegeben werden. Proben, deren Ergebnis im fraglichen oder im positiven Bereich lagen, müssen weiteren NNT-Untersuchungen zugeführt werden. Durch zusätzliche serologische Tests muß das NNT-Ergebnis soweit möglich auf Plausibilität überprüft und durch Analyse von Nachbarproben das Risiko einer Kontamination ermittelt werden.

Für den Arbeitskreis Blut:

Prof. Dr. R. Burger, Vorsitzender
Prof. Dr. R. Kroczeck, Geschäftsführer