

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie  
Blutspendedienst des DRK Hessen  
Frankfurt am Main

# Etablierung von Hochdurchsatz- PCR-Testsystemen für HIV-1 und HBV zur Blutspendertesting

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin der  
Johann Wolfgang Goethe Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Christian Drosten  
aus Lingen

Hamburg, 2001

8	LEBENS LAUF.....	105
9	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	106
10	LITERATUR.....	107
11	DANKSAGUNG.....	117
12	ANHÄNGE.....	118

## 1 Einleitung

### 1.1 Entwicklung der Blutspenderuntersuchung auf transfusionsrelevante virale Krankheitserreger

#### 1.1.1 Klinische Untersuchung

Jeder potenzielle Blutspender wird eingehend körperlich untersucht. Jegliche Anzeichen einer akuten oder chronischen Infektionskrankheit stellen dabei ein Ausschlusskriterium zur Spende dar. Zur klinischen Untersuchung gehört auch eine eingehende Infektions- und Reiseanamnese sowie Fragen bezüglich eines eventuellen Risikoverhaltens. Blutspender werden bei jedem Hinweis auf ein erhöhtes Übertragungsrisiko viraler Erkrankungen von der Spende ausgeschlossen.

#### 1.1.2 Serologie

Im Jahr 1943 wurde die Posttransfusionshepatitis erstmalig als eine häufige Komplikation der Bluttransfusion beschrieben (14). Die Assoziation von erhöhten Transaminasewerten beim Spender mit dem Auftreten einer Posttransfusionshepatitis beim Empfänger war schon zu Beginn der sechziger Jahre bekannt und führte zur Einführung der Transaminasentestung als erste Spenderscreeninguntersuchung im Blutspendewesen, allerdings nur in Deutschland (31, 32).

Nachdem in den 60er Jahren das Hepatitis B Virus (HBV) entdeckt worden war (16) (41), konnte die Inzidenz der Posttransfusionshepatitis durch die serologische Testung aller Blutspenden auf HBs-Antigen deutlich gesenkt werden (5). In Deutschland wurde die Testung 1975 eingeführt.

In den 70er Jahren wurde die non-A, non-B Hepatitis als davon unabhängige, ebenfalls höchstwahrscheinlich viral bedingte Transfusionskomplikation beschrieben, die weder auf das Hepatitis A Virus (HAV) noch auf HBV zurückzuführen war (35). Erhöhte Serumtransaminasewerte bei Blutspendern waren über lange Zeit der einzige, wenn auch unzureichende Infektionsmarker für die non-A, non-B Hepatitis (1, 6). In den USA wurde aufgrund der Assoziation der non-A, non-B Hepatitis mit dem Vorhandensein von anti-HBc

IgG-Antikörpern zusätzlich noch die anti-HBc Testung eingeführt (90). Nachdem im Jahre 1989 das Hepatitis C Virus als ätiologisches Hauptagens der non-A, non-B Hepatitis entdeckt worden war (26), konnte auch auf dieses Virus serologisch getestet werden (57). Anti-HCV Tests der ersten Generation wurden in Deutschland im Jahr 1990 in das Blutspendewesen eingeführt. Dabei wurde sehr bald das Problem der langen serologischen Latenz der Hepatitis C Infektion deutlich (4, 7), die jedoch mit der Einführung verbesserter EIA-Tests der zweiten Generation etwas verkürzt werden konnte (54).

Die ersten Fälle des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS) wurden im Jahr 1981 beschrieben (8, 9). Bereits vor der Entdeckung des Humanen Immundefizienzvirus (HIV, zuvor LAV (13) oder HTLVIII (42)) als auslösendes Agens von AIDS (13, 42) war dessen Übertragbarkeit durch Blutprodukte vermutet worden (10, 34). Die im Jahr 1985 eingeführten Antikörpertests führten bald zu einem deutlichen Rückgang des Übertragungsrisikos durch Blutprodukte (33, 94).

### 1.1.3 Übertragungen trotz serologischer Tests

#### 1.1.3.1 HCV und HIV-1

In den Jahren 1993 und 1994 wurde in Deutschland Hepatitis C Virus auf Empfängerinnen von Immunglobulinpräparaten übertragen, obwohl die Spender des zu deren Produktion verwendeten Plasmas zuvor mit serologischen Testverfahren hinsichtlich ihres Immunstatus gegen Hepatitis C untersucht worden waren (72, 79).

Für HIV-1 sind Übertragungen durch Blutprodukte von serologisch negativ getesteten Spendern bereits in den achtziger Jahren beschrieben worden (28, 36, 53, 55, 95).

Die serologische Testung von Blutspenden auf HCV und HIV-1 kann also keinen vollständigen Schutz vor Übertragung bieten. Serologische Antikörpertests sind in ihrer Wertigkeit dadurch limitiert, daß das Immunsystem erst mit zeitlicher Verzögerung auf eine eben erfolgte Virusinfektion reagieren kann. Das Zeitintervall zwischen Infektionsereignis und detektierbarer Immunreaktion (Serokonversion) wird als diagnostische Fensterphase oder auch Präserokonversionsphase der Infektion bezeichnet.

Neben der Präserokonversionsphase kann auch ein immunologisch stiller Infektionsverlauf eine Virämie und damit eine potenzielle Infektiosität in Abwesenheit von detektierbaren Antikörpern erklären. Stille Infektionsverläufe sind sowohl für HCV (15, 81, 91, 93) als auch für HIV-1 (50, 51, 67) beschrieben worden.

#### 1.1.3.2 HBV

Auch für das Hepatitis B Virus stellt die serologische Spenderuntersuchung keinen umfassenden Schutz vor Übertragung dar. Die in fast allen Ländern durchgeführten HBsAg Tests haben zwar dadurch, daß die Leber HBs Antigen gegenüber dem Virus im Überschuß sezerniert, eine hohe Sensitivität; HBV-Übertragungen durch Blutprodukte von HBsAg-negativen Spendern sind trotzdem vielfach beschrieben worden (52, 82, 86, 92). Neben einer geringen Dosis an HBV-Partikeln, die zur Etablierung einer Infektion nötig sind und bisweilen in den Tests undetektiert bleiben (5% aller Akutinfektionen, (47)) können diese Übertragungsfälle auch durch Mutationen im s-Antigen Bereich des Virus (sog. a-Mutanten) erklärt werden. Mutationen im Antigenbereich (am häufigsten ein Austausch in der Aminosäure 145 der a-Domäne des s-Antigens) verhindern dabei dessen serologische Detektion (23, 48, 52, 73).

Auch sind chronische Verläufe der Hepatitis B Infektion mit Antikörpern gegen das Core-Antigen des Virus (anti-HBc) als einzigem Infektionsmarker vielfach beschrieben worden (49, 62, 69). Die zusätzliche Testung auf anti-HBc, wie sie in den USA durchgeführt wird, könnte diese Variante der chronischen Verlaufsform detektieren, ist aber wegen der sechswöchigen Latenz bis zur Entwicklung von anti HBc-Antikörpern nicht zur Diagnose einer Akutinfektion geeignet und würde aufgrund seiner häufig falsch positiven Reaktivität zu einem nicht zu vertretenden Ausfall von gesunden Blutspendern führen (12, 18, 24, 30).

### 1.1.3.3 Das residuale Risiko

Nach der serologischen Testung von Blutspendern bleibt auf Grund der geschilderten Verhältnisse ein Restrisiko der Übertragung von Krankheitserregern bestehen. Dieses wird als residuales Risiko der Übertragung bezeichnet und ist abhängig von epidemiologischen und pathogenetischen Eigenschaften des jeweiligen Erregers. Tabelle 1.1 zeigt eine Gegenüberstellung der Einschätzung des residualen Risikos für neun europäische Länder (aus (3)) und USA (aus (88)).

Virus	Residuales Risiko in Übertragungen pro 10 <sup>6</sup> Spenden (Konfidenzintervall)	
	Europa	USA
HCV	1,05 (0,6-1,3)	9,7 (3,47-36,11)
HIV-1	0,6 (0,01-1,3)	2,03 (0,36-4,95)
HBV	6,9 (1,1-41)	15,83 (6,82-31,97)

Tabelle 1.1. Residuales Risiko der Übertragung einiger transfusionsrelevanter viraler Krankheitserreger nach serologischer Blutspendertestung.

### 1.1.4 Verringerung des residualen Risikos durch Direktnachweis von Viren

#### 1.1.4.1 Nicht auf Nukleinsäurenachweis basierende Tests

Da das residuale Risiko für HCV und HIV-1 im wesentlichen aus der diagnostischen Fensterphase der Antikörpertestung herrührt, kann es am effizientesten durch die Testung von Blutspendern auf die Viren (Antigene) selbst gesenkt werden. Ein Antigentest ist für HIV-1 in Form der p24 Antigentestung eingeführt worden. Der Test wird in den USA zusätzlich zur Antikörpertestung durchgeführt und soll in der dort vorherrschenden epidemiologischen Situation 24 bis 55% der in der Fensterphase geleisteten HIV positiven, Antikörper negativen Spenden erfassen (19, 78). Die Testung auf p24 Antigen wurde für die deutsche Situation als nicht zweckmäßig erachtet (25, 37).

Für HBV wird in Form des HBsAg-Tests ohnehin ein Antigentest durchgeführt, aber auch hier kann durch Verbesserung der Sensitivität und breitere Erkennung von Virusvarianten die serologische Latenz verringert werden.

Für HCV stehen vergleichbare Tests nicht zur Verfügung, ein Test auf das core-Antigen des Virus ist erst kürzlich erhältlich geworden und bedarf noch eingehender Validierung.

#### 1.1.4.2 Virusdirektnachweis durch Nukleinsäuretestung

Die serologische Testung auf virale Antigene setzt die Verfügbarkeit von definierten mono- oder polyklonalen Antikörperpräparationen voraus, die gegen das Gesamtvirus oder gegen aufgereinigte bzw. exprimierte Virusbestandteile gerichtet sind. Sowohl die Herstellung einer immunisierenden Viruspräparation als auch die Produktion von Antikörpern (im Tier oder in-vitro) stellen komplexe biologische Systeme dar, die großen Schwankungen hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit unterliegen. Gleichzeitig ist die Spezifität einer Antikörperpräparation für verschiedene Serotypen eines Virus immer erst nach deren Herstellung empirisch zu bestimmen, im Rahmen von Validierungsstudien an großen Serumbanken. Die Auswirkungen von Mutationen im Antigenbereich auf die Antikörperbindung können kaum vorhergesagt werden. Der Grund hierfür ist in der generell schlechten Vorhersagbarkeit von dreidimensionalen Proteinbindungen zu suchen, die zusätzlich noch durch interferierende Glykostrukturen beeinflusst werden. Diese Umstände stellen die Hauptschwierigkeit bei der Etablierung von serologischen

Antigentestsyste men dar und sind gleichzeitig die Hauptursache für ihre gelegentliche Unzulänglichkeit.

Im Vergleich zu Proteinen ist die Bindungsstärke und -spezifität zwischen zwei Nucleinsäuren relativ gut vorherzusagen. Die Einfachheit des genetischen Codes (vier Basen im Gegensatz zu 20 Aminosäuren) erlaubt zwei mögliche Basenpaarungen: Adenosin paart mit Thymin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen, Guanosin bindet Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen. Die Entropie jeder Einzelbindung kann berechnet werden, ebenso die der Summe aller Bindungen in einem Nucleinsäurestrang. Nach der Watson-Crick'schen Basenpaarung ist zusätzlich die Orientierungsrichtung der beiden Bindungspartner antiparallel festgelegt. Wegen der einfachen Bestimmbarkeit der Basenabfolge einer Nucleinsäure (65, 85) steht mittlerweile in DNA-Datenbanken (GenBank, EMBL, DDBJ) eine Fülle von Sequenzinformation über verschiedenste Virusisolate zur Verfügung. Neben einer phylogenetischen Einordnung erlaubt die Analyse der Datenbankinformation auch die Identifizierung von Genomregionen, die bei allen bekannten Isolaten hochgradig konserviert sind. Solche Genomregionen können gezielt für den Nucleinsäurenachweis von Erregern verwendet werden.

Im Gegensatz zu Antikörpern lassen sich Nucleinsäuren hochreproduzierbar allein aus der Sequenzinformation in-vitro synthetisieren. Diese technischen Voraussetzungen führten schon in den siebziger Jahren zur Entwicklung von Systemen, die ihrem Prinzip nach den Erregernachweis aus Patientenmaterial mit Hilfe von Nucleinsäurewechselwirkungen erlaubten (89), in der Literatur der achtziger Jahre finden sich Beispiele für die Anwendung zu diesem Zweck (17, 75). Die 1984 von Kary B. Mullis erdachte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) fügte der Nucleinsäuredetektion eine Sensitivität hinzu, die sie gegenüber immunologischen Erregernachweisen weit überlegen machte (38, 70). Die Nucleinsäurenachweise von HBV und HIV-1 waren unter den ersten publizierten Anwendungen der PCR (59). Mittlerweile existieren einige Alternativverfahren zur PCR, die in etwa die gleiche diagnostische Leistung erbringen (s. Abschnitt 1.2.)

Im Zuge der bereits angesprochenen Übertragungsfälle transfusionsrelevanter Viren trotz serologischer Testung wurde die Einführung der PCR und anderer

Nucleinsäureamplifikationstechniken (NAT) im Bereich der Transfusionsmedizin früh diskutiert (20, 43, 44, 60, 62, 66). Der Diskussion lagen insbesondere epidemiologische Daten über den Zugewinn an Sicherheit durch Verkürzung der diagnostischen Fensterphase zu Grunde. Die Verkürzung wurde dabei aus den Inzidenzwerten der einzelnen Viren und deren Replikationskinetik (Verdopplungszeit der Viruskonzentration im Plasma) in der Phase der Neuinfektion errechnet. Tabelle 1.2. faßt diese Parameter zusammen (aus (3) und (88)).

Virus	Fensterphase (Tage)	Intervall (Tage)	Verdopp-lungszeit (Tage)*	Reduktion der Fensterphase (Tage)	Durch NAT <sup>§</sup> verhinderte Infektionen pro 10 <sup>6</sup> Spenden
HCV	82	54-192	0,3	59	7
HIV-1	22	6-38	1	11	1
HBV	59	37-87	4	25	6,75

Tabelle 1.2. Fensterphasenreduktion und zugrundeliegende epidemiologische Daten für HCV, HIV-1 und HBV. Aus (88) bzw. \* (3).

#### §: Nucleinsäureamplifikationstechniken

Gründe, die zunächst gegen eine Einführung der PCR in die Blutspendertestung sprachen, waren die hohen Kosten der PCR, die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch Kreuzkontamination, die Erfordernis molekularbiologisch ausgebildeter Laborkräfte und die lange Zeitdauer der PCR-Testung, besonders mit Hinsicht auf schnell verfallende zelluläre Blutprodukte (3). Die in den frühen neunziger Jahren erfolgte Übertragung von HCV auf Empfängerinnen von anti-D Globulinen gab jedoch den entscheidenden Anstoß zur Einführung der HCV NAT-Testung von Plasmaproducten mit Wirkung zum 1.7.1999 auf europäischen Behördenersaß (CPMP, committee for proprietary medicinal products). Mit Wirkung zum 1.4.1999, also etwa zeitgleich, führte das Bundesamt für Sera und Impfstoffe (Paul-Ehrlich Institut) die NAT-Testung auf HCV auch für zelluläre Blutprodukte verpflichtend für Deutschland ein. Dieser Entscheidung waren Ergebnisse aus

verschiedenen deutschen Blutspendediensten vorausgegangen, die die PCR-Testung vorab auf freiwilliger Basis eingeführt hatten (22. 83. 87). Die Einführung von verpflichtenden Tests für HIV-1 ist für Mitte 2002 geplant, die für HBV wird zeitnah folgen (27).

## 1.2 Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)

### 1.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ermöglicht die spezifische Vervielfältigung (Amplifikation) einer gewünschten DNA-Sequenz aus einem heterogenen Nukleinsäuregemisch mit exzellenter Sensitivität (38. 70). In Anlehnung an die DNA-Replikation wird durch eine DNA-Polymerase ausgehend von einem DNA-Matrizenstrang (engl. *template*) ein komplementärer DNA-Tochterstrang synthetisiert. Dabei katalysiert das Enzym die Veresterung von Desoxynucleotidtriphosphaten mit der 3'-OH Gruppe des wachsenden DNA-Tochterstrangs unter Abspaltung von Pyrophosphat. Zur Initiation dieser Reaktion sind *in vivo* kurze RNA-Fragmente erforderlich, die zum Template komplementär sind und durch Anlagerung (Hybridisierung) an das Template ein freies 3'-OH Ende liefern. Bei der PCR werden diese durch synthetische einzelsträngige DNA-Oligonukleotide ersetzt. Diese werden hier wie *in vivo* als *Primer* bezeichnet. Zur Anlagerung (*annealing*) der Primer wird der DNA-Doppelstrang thermisch zu Einzelsträngen denaturiert und anschließend wieder abgekühlt. Die Hybridisierung der Primer an den Einzelstrang beim Abkühlen ist auf Grund ihres Konzentrationsüberschusses und der Sterik gegenüber der Rehybridisierung des Doppelstranges thermodynamisch bevorzugt. Die Reaktion wird mit zwei verschiedenen Primern durchgeführt, wobei der eine zum nichtkodogenen oder *antisense*-Strang der Template-DNA komplementär ist (Sense-Primer), der andere zum kodogenen oder *sense*-Strang (Antisense-Primer). Nach Primerhybridisierung und Tochterstrangsynthese (engl. *extension*) ist der Templatestrang numerisch verdoppelt. Führt man die Reaktion in Temperaturzyklen bestehend aus Schmelzen (90-95°C), Primerannealing (40-70°C) und Extension durch, so folgt die Reaktion unter optimalen Bedingungen einer Exponentialfunktion zur Basis 2.

$$P(Z) = S \times (1+E)^Z$$

P= DNA-Kopienzahl nach PCR

S= DNA-Startkopienzahl vor PCR

E= Reaktionseffizienz (0...1)

Z= PCR-Zyklenzahl

Um eine Hitzedenaturierung der DNA-Polymerase während der Reaktion zu verhindern, findet ein aus thermophilen Bakterien kloniertes oder isoliertes Enzym Verwendung. Beispiele für verwendete Organismen sind *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermus flavus* (Tfl) und *Thermotoga maritima* (Tma).

Die in der PCR generierten DNA-Fragmente (Amplikate, PCR-Produkte) sind durch die Spezifität des Primerannealing einheitlich in ihrer Länge definiert. Diese Eigenschaft erlaubt eine einfache Analyse des PCR-Produktes anhand der Molekülmasse etwa durch Gelelektrophorese.

### 1.2.2 5'-Nuklease PCR (TaqMan PCR)

Der Begriff TaqMan bezeichnet das von der Firma Roche Molecular Systems patentierte Prinzip der 5'-Nuklease PCR (46. 63. 64). Die 5'-Nuklease PCR ist eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion, die eine Echtzeit-Detektion des im Verlauf der Reaktion gebildeten PCR-Produkts ermöglicht. Dies bietet den Vorteil einer quantitativen Ergebnisinterpretation über die Reaktionskinetik und einer qualitativen Detektion des Produkts ohne die sonst erforderliche Nachbearbeitung zum Beispiel durch Gelelektrophorese. Durch den Wegfall des Öffnens der Reaktionsgefäße wird dabei die wesentliche Quelle für Kreuzkontaminationen eliminiert.

Zusätzlich zu den Reaktionskomponenten einer konventionellen PCR befindet sich im Reaktionsgemisch eine spezifisch an das PCR-Produkt hybridisierende DNA-Sonde. Diese ist kovalent mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verknüpft, von denen

der eine Reporter- und der andere eine Auslöcher- oder *Quencherfunktion* hat (TaqMan-Sonde) (63). Der Vorgang der Auslöschung (*Quenching*) beruht dabei auf einem intramolekularen Energietransfer, der das aus dem Reaktionsgefäß nach Anregung emittierte Licht zum Langwelligen hin verschiebt (40).

Die bei der TaqMan PCR verwendeten DNA-Polymerasen (*Taq*, *Tth*, *Tfi*) besitzen eine intrinsische 5'-Nuklease Aktivität. Diese bewirkt eine Degradation von Einzelstrang-DNA, wenn sie auf den Templatestrang hybridisiert ist und damit der Polymerase bei der Synthese des Tochterstranges im Weg steht (46). Die Polymerase löst die ersten Basen der hybridisierten DNA vom Templatestrang ab (*strand displacement*) und hydrolysiert dann im Abstand von mehreren Basenpaaren vom 5'-Ende die Phosphodiesterbindungen der hybridisierten DNA. Die Bezeichnung 5'-Nuklease rührt daher, daß ein Nukleaseangriff mitten in der Sequenz, aber sequenzunspezifisch und immer vom 5'-Ende her erfolgt. Diese Aktivität ist weder mit einer typischen Exo- noch mit einer Endonukleaseaktivität vereinbar (64). Hybridisiert eine TaqMan-Sonde während der PCR an den Templatestrang, wird sie durch die Polymerase verdaut und emittiert nun Licht von kürzerer Wellenlänge. Eine Messung dieser Emission ermöglicht eine spezifische Detektion des PCR-Produkts im Verlauf oder unmittelbar nach der Reaktion. Abbildung 1.1 faßt das Detektionsprinzip zusammen. Abbildung 1.2 verdeutlicht die Signalentstehung während der PCR im Vergleich zur Detektion im Agarosegel.

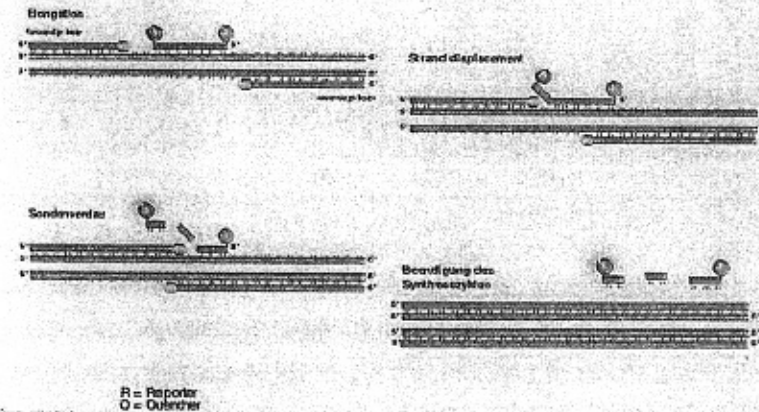


Abbildung 1.1. Reaktionsprinzip der TaqMan 5'-Nuklease PCR. Links oben: Zusätzlich zu den PCR-Primern lagert sich eine doppelt fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde an die Zielsequenz an. Solange beide Fluorophore kovalent an die Sonde gebunden sind, wird die Immissionsenergie vom Reporter auf den Quencherfarbstoff übertragen. Die dabei entstehende langwellige Emission wird nicht detektiert. Rechts oben: Die DNA-Polymerase entfernt das 5'-Ende der Sonde vom Gegenstrang (*strand displacement*), es kommt zur Ausbildung einer Gabelstruktur ("fork-like structure" (64)) als Angriffspunkt des 5'-Nuklease Verdau. Links unten: Verdau der Sonde und Lösen der kovalenten Bindung der Fluorophore. Dadurch wird der Energietransfer revertiert, der Reporterfarbstoff emittiert nun kurzwelliges Licht, das detektiert wird. Rechts unten: Der Ablauf der PCR wird durch den Sondenverdau nicht beeinflusst. (Quelle: Perkin-Elmer, modifiziert)

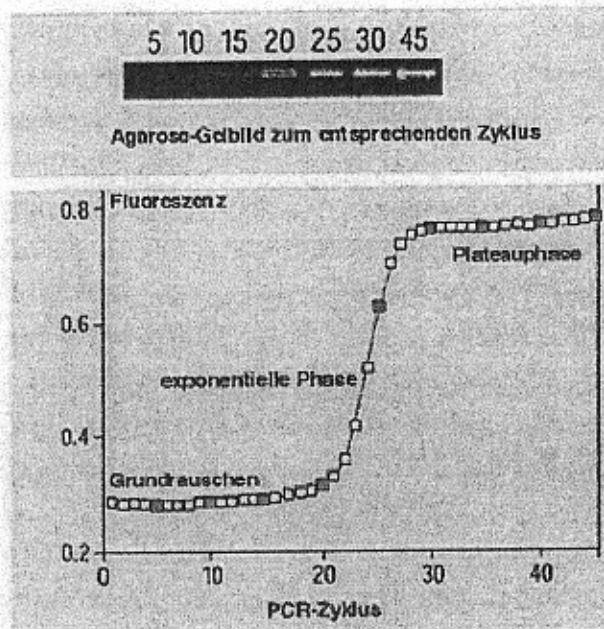


Abbildung 1.2. Fluoreszenzdetektion im Verlauf einer 5'-Nuklease PCR. Vergleiche auch Abb. 1.3. Untere Bildhälfte: In den ersten Zyklen der PCR wird ein konstantes Fluoreszenzsignal detektiert, das dem Grundrauschen des optischen Systems entspricht. Es folgt der exponentielle Anstieg des Signals durch zunehmenden Sondenverdau und die Plateauphase, die durch Reagenzienverbrauch bedingt ist. Obere Bildhälfte: Zu den angegebenen PCR-Zyklen wurden korrespondierende PCR-Reaktionen einer Agarose-Gelanalyse unterzogen. Die Detektionsempfindlichkeiten von Gel und Sonde entsprechen sich. (Quelle: Roche, modifiziert)

Anregung, Messung und Inkubation werden in einem Gerät durchgeführt. Neben der kontaminationsfreien und spezifischen Detektion von PCR-Produkten ohne Öffnen der Reaktionsgefäße bietet die 5'-Nuklease PCR die Möglichkeit zur Quantifizierung der Zielsequenz (21). Hierzu wird während der 5'-Nuklease PCR die emittierte Fluoreszenz gemessen und der Zeitpunkt ermittelt, zu dem sie erstmalig vom Grundrauschen der Reaktion unterscheidbar wird. Der numerische Wert des PCR-Zyklus der erstmaligen

Detektierbarkeit (Schwellenzyklus oder *threshold cycle*) verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Startkopienzahl der eingesetzten DNA-Lösung (s. hierzu die PCR-Gleichung oben). Abbildung 1.3 verdeutlicht diese Abhängigkeit.

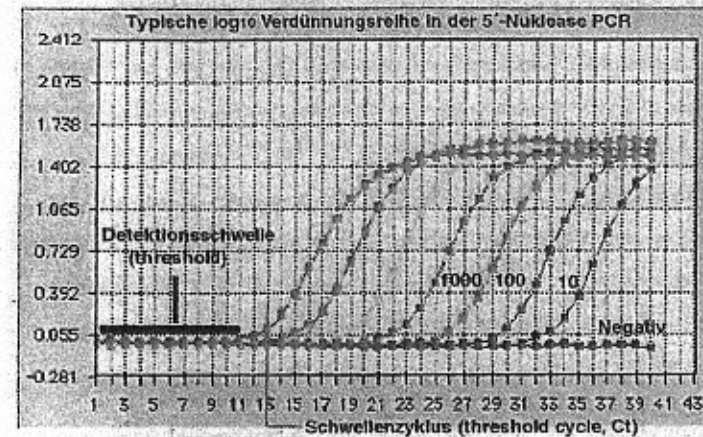


Abbildung 1.3. Amplifikation einer  $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe des Plasmids pB20 mit der HBV TaqMan PCR aus dieser Arbeit. Zu Beginn der Reaktion ist lediglich das Grundrauschen des optischen Systems detektierbar. Anhand der Standardabweichung des Grundrauschens wird eine Detektionsschwelle definiert (schwarz), von der das Lot auf die Zeitachse gefällt wird, sobald sie vom Fluoreszenzsignal überschritten wird (rot). Der ermittelte Zeitpunkt, ausgedrückt in PCR-Zyklen, ist linear abhängig vom Logarithmus der Startkopienzahl an DNA-Molekülen zu Beginn der Reaktion. Eine hieraus erstellte Eichgerade ermöglicht die Quantifizierung einer mitamplifizierten unbekannt Probe.

Typische Anwendungsbereiche der quantitativen 5'-Nuklease PCR sind die Bestimmung von Expressionsmustern oder Infektionsmarkern unter experimentellen oder klinischen Bedingungen (61, 74). Eine hervorragende Übersicht über die quantitative 5'-Nuklease PCR findet sich in (21).



### 1.2.3 TMA

Die von der Firma Gen-Probe patentierte TMA (transcription mediated amplification) stellt ein isothermisches Nukleinsäureamplifikationsverfahren dar, das auf RNA als Template basiert. (2). Aus der RNA wird mit Hilfe eines DNA-Primers und einer reversen Transkriptase cDNA synthetisiert. Gleichzeitig wird über einen 5'-Überhang des Primers ein T7-Promotor eingeführt. Nach RNase H-Verdau synthetisiert die reverse Transkriptase den Zweitstrang der DNA, sodaß nun eine dsDNA mit T7-Promotor vorliegt. Der T7-Promotor dient der zugesetzten T7 Polymerase als Startsequenz für die Synthese von 10 bis 1000 RNA-Molekülen pro dsDNA. Der Vorgang wiederholt sich zyklisch. Die Detektion erfolgt in diesem System mit einer Acridinium-Ester markierten Sonde im Sinne eines Hybridization Protection Assays (HPA, (11)). Abbildung 1.4 verdeutlicht das Funktionsprinzip der TMA. Die TMA wird in kommerziellen Systemen zum Blutspenderscreening eingesetzt, wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

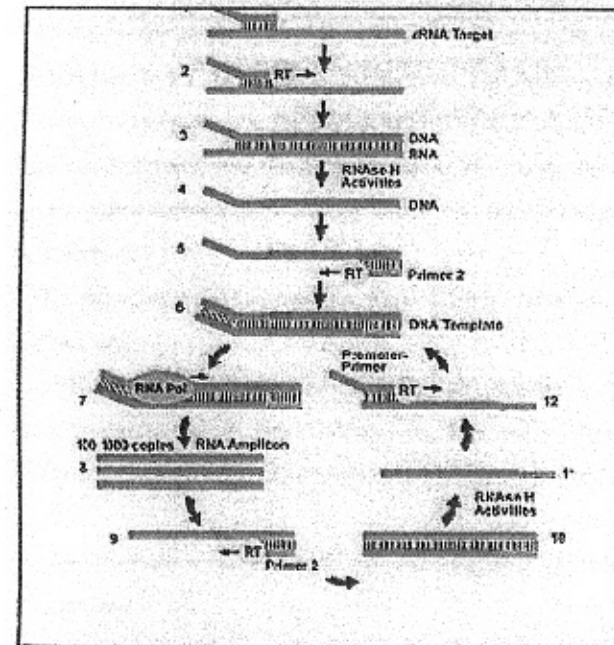


Abbildung 1.4. 1-3: cDNA-Synthese und Einführung eines T7-Promotors durch die reverse Transkriptase (RT). 4: RNase H-Verdau durch die RT. 5-6: Zweitstrangsynthese durch die RT. 7-8: Amplifikation der cDNA in Form von RNA durch die T7-Polymerase. 9-12: Schluß des Zyklus. Die Schritte laufen zu jedem Zeitpunkt der Reaktion parallel und isothermisch ab.

Quelle: Gen-Probe

### 1.3 Aufgabenstellung

Aufgabe dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung von NAT-Testsystemen, die zur Massentestung von Blutspendern auf HIV-1 und HBV geeignet sind.

Die Systeme sollten dabei den FDA-approbierten industriellen Verfahren für HCV entsprechen, insbesondere in Bezug auf die analytische Sensitivität, die Hochdurchsatzfähigkeit und die interne Kontrolle der Validität.

## 2 Material

### 2.1 Reagenzien

10 mM dNTP, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland

10 X TaqMan® Buffer A, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland

25 mM MgCl<sub>2</sub>, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland

37% Formaldehydlösung, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

Agarose Electrophoresis Grade, Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland

Ammoniumacetat Molecular Biology Grade, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

AmpErase Uracil-n-glykosylase, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland

AmpliTaQ® Gold, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland

Aqua ad injectabilia, Fa. Braun, Melsungen, Bundesrepublik Deutschland

Armored RNA® mit HIV-1 Insert, hergestellt in Zusammenarbeit mit Fa. Ambion, Texas, USA

Big Dye Terminator ready reaction mix, Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland

Borsäure, Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

Bromphenolblau, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

Deionisiertes Formamid, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

Dimethylsulfoxid reinst, Fa. Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Fa. Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland

Ethanol p. A., Fa. Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland

GeneClean Gelelutionskit, Dianova, Hamburg, Bundesrepublik Deutschland

Invitrogen TA cloning Kit, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland

Micro PolyA pure Kit, Fa. Ambion, Texas, USA

Natriumacetat Molecular Biology Grade, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

Natriumchlorid, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

Natrium-Dodecylsulfat, Fa. Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland  
 Natriumhydroxid Plätzchen, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland  
 Polyethylenglykol 6000, Fa. Fluka, München, Bundesrepublik Deutschland  
 Precision optimized Polymer 6, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland  
 Proteinase K, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland  
 QIAamp® Viral RNA Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Bundesrepublik Deutschland  
 Riboprobe T7 in-vitro transcription Kit, Fa. Promega, Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland  
 Rindergelatine Tissue Culture Grade 2% flüssig, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland  
 RnaseOut® Ribonuklease Inhibitor, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland  
 Salzsäure > 37%, Fa. Roth, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland  
 Superscript® I MMuV Reverse Transkriptase, Fa. Gibco BRL, Karlsruhe, Bundesrepublik Deutschland  
 Tetramethylammoniumchlorid Molecular Biology Grade, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland  
 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland  
 Tris-Base, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland  
 Xylencyanol, Fa. Sigma, München, Bundesrepublik Deutschland

## 2.2 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland  
 ABI Prism 7700 Sequence Detection System (SDS), Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland  
 GeneAmp® 9600 Thermocycler, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt, Bundesrepublik Deutschland  
 Horizontalelektrophoresekammer, Fa. BRL, Glasgow, England  
 Blöfuge Pico, Fa. Heraeus, Osterode, Bundesrepublik Deutschland  
 Megafuge 1.0 R, Fa. Heraeus, Osterode, Bundesrepublik Deutschland  
 Suprafuge 22, Fa. Heraeus, Osterode, Bundesrepublik Deutschland  
 Polaroid Gelkamera, Fa. Fischer, Frankfurt/M, Bundesrepublik Deutschland  
 UV Transilluminator, Fa. Fischer, Frankfurt/M, Bundesrepublik Deutschland  
 Varifuge 3.0 R, Fa. Heraeus, Osterode, Bundesrepublik Deutschland  
 Vortex Genie Laborschüttler, Fa. Fischer, Frankfurt/M, Bundesrepublik Deutschland

### 2.3 EDV-Software

Excel, Fa. Microsoft

Internet Explorer, Fa. Microsoft

Primer Express, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt

Sequence Navigator, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

Sequencing Analysis, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

Statgraphics 5.0, Fa. Statistical Graphics

Word, Fa. Microsoft

### 2.4 Veröffentlichte Nukleinsäuresequenzen

#### 2.4.1 HBV-Genomsequenzen von klonierten Einzelisolaten

Gesamtgenomsequenzen von 36 repräsentativen HBV Einzelisolaten wurden aus der Nucleotidsequenz-Datenbank GenBank über das Internet bezogen. Die Datenbank wird durch das National Center for Biotechnology Information (NCBI) auf der Internetseite [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) zur Verfügung gestellt.

Die GENBANK Zugriffsnummern der 36 verwendeten Isolate waren: X 69798; D 00329; M54923; J 02203; X 65257; V 01460; X 65258; X 65259; X 59795; X 02496; X 97848; D 23684; D 23682; D 23681; X 51970; X 80925; X 80926; X 80924; D 50522; M 32138; X 75665; X 75656; X 75658; X 75663; X 75657; V 00867; X 59795; S 50225; D 50521; D 50489; D 16667; D 16666; X 97851; X 97850; X 97849; X 98077.

#### 2.4.2 Konsensussequenzen für HIV-1 Subtypen

Vom Los Alamos National Laboratory (LANL) wurde über die Internetseite [www.lanl.gov](http://www.lanl.gov) eine vergleichende Auflistung der Konsensussequenzen aller HIV-1 Subtypen für das gag-Gen des Virus bezogen.

## 2.5 Referenzplasma

### 2.5.1 HBV

Für die Sensitivitätsbestimmung in der HBV TaqMan PCR wurde extern quantifiziertes Ringversuchsplasma vom Deutschen Referenzzentrum für Virushepatitis (Prof. R. Thomssen, Göttingen) bezogen. Folgende zwei Plasmen kamen zur Anwendung:

Referenzplasma	Genotyp	serologischer Subtyp	Viruskonzentration (geq/ml)*
Eurohep 1	A	ad	$3 \times 10^9$
Eurohep 2	D	ay	$3 \times 10^9$

Tabelle 3.1. Verwendete Hepatitis B Referenzplasmen.

\*Die Viruskonzentration wurde jeweils aus den Ergebnissen mehrerer europaweiter Ringversuche zur molekularbiologischen HBV Bestimmung und Quantifizierung ermittelt und ist ausgedrückt als Genomäquivalente (geq) /ml.

### 2.5.2 HIV-1

Die Sensitivität der TaqMan HIV-1 PCR wurde mit Hilfe eines Rückstellplasmas der Firma INSTAND, Düsseldorf bestimmt. Das Material enthielt 40.000 Kopien HIV-1 Subtyp B RNA pro ml. Die Viruskonzentration war in einem Ringversuch zur Quantifizierung von HIV-1 mit molekularbiologischen Methoden ermittelt worden (Prof. K. O. Habermehl, Berlin). Verdünnungen der Referenzplasmen wurden in HBV, HCV und HIV-1 negativ getestetem Poolplasma aus 96 Blutspenderproben durchgeführt.

### 2.5.3 Serokonversionsprobenreihen

Zum Sensitivitätsvergleich der entwickelten PCR-Tests mit etablierten serologischen Testsystemen speziell in der Präserokonversionsphase der Infektion wurden longitudinal gesammelte Plasmaprobenreihen von US-amerikanischen Plasmaspendern herangezogen. Die Spender waren im Verlauf durch einen Neubefund von HBs-Antigen oder anti HIV-1 Antikörpern aufgefallen. Die Alanin-Aminotransferase hatte in allen Fällen

im Normalbereich gelegen, die körperliche Untersuchung hatte keinen Anlaß zum Ausschluß von der Spende gegeben.

### 2.5.3.1 HBV

Patientennummern der getesteten Probenreihen von drei verschiedenen Spendern waren: 61675, 62825 und 62967. Das Material war vorgetestet u. a. mit folgenden in der Routinediagnostik gängigen serologischen Testsystemen: Abbott Prism®, AxSYM® und Auzyne MC® HBsAg Tests (Abbott, Inc, Abbott Park, Illinois, USA).

Bezugsquelle für die Probenreihen war BioClinical Partners, Inc., Franklin, MA, USA.

### 2.5.3.2 HIV-1

Probenreihen von zwei verschiedenen Spendern wurden getestet: Nummer 60722 und 62238. Die Reihen waren vorgetestet mit Abbott Prism® und AxSYM® anti HIV-1/2 Tests.

Bezugsquelle für die Probenreihen war BioClinical Partners, Inc., Franklin, MA, USA.

## 2.6 Oligonukleotide zur Etablierung und Durchführung der HBV PCR

Name des Oligonukleotids	Sequenz	Verwendung	HBV Genomposition*
cdbs (äquimolar)	5'-CAA CCT CTT GTC CTC CAA CTT GT	Sense-Primer für den Routinetest	341-363
	5'-AAC CTC CTG TCC TCC AAC TTG T		342-363
	5'-CAA CCT GTT GTC CTC CAA TTT GT		341-363
cdbas	5'-GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT	Antisense-Primer für den Routinetest	412-432
cdq380	5'-FAM-ATC GCT GGA TGT GTC TGC GGC GTT-TAMRA	HBV Wildtypsonde für den Routinetest	371-394
cdsts	5'-TET-ACG ACG GAC CAC ACT GAC CAG TCA-TAMRA	Sonde für die interne Kontrollsequenz im HBV Routinetest	371-394
HBVAs	5'-ACT CGT GGT GGA CTT CTC TC	Sense-Primer für Amplifikat A in der SOE-PCR+	253-273
HBVAas	5'ACG ACG GAC CAC ACT GAC CAG TCA AAC CAG GAC AAG TTG GAG GAC A	Antisense-Primer für Amplifikat A in der SOE-PCR+	349-394
HBVBs	5'-TGA CTG GTC AGT GTG GTC CGT CGT TTA TCA TCT TCC TCT TCA TCC TG	Sense-Primer für Amplifikat B in der SOE-PCR+	371-417
HBVBas	5'-ACT AGT AAA CTG AGC CAG GAG AAA C	Antisense-Primer für Amplifikat B in der SOE-PCR+	662-686

Tabelle 3.2. Oligonukleotide für HBV

\*HBV Genompositionen nach Gallbert, gezählt von der einzigen EcoR1-Schnittstelle im Genom (41).

+SOE-PCR = *splicing by overlap extension*, Verfahren zur gerichteten Mutagenese durch PCR (45)

## 2.7 Oligonukleotide zur Etablierung und Durchführung der HIV-1 RT-PCR

Name des Oligonukleotids	Sequenz	Verwendung	HIV-1 Genomposition n*
cdis (äquimolar)	5'-ATC AAG CAG CCA TGC AAA TGT T	Sense-Primer für den Routinetest	578-599
	5'-ACC AGG CAG CTA TGC AAA TGT T		578-599
cdia (äquimolar)	5'-TGA AGG GTA CTA GTA GTT CCT GCT ATG TC	Antisense-Primer für den Routinetest	700-729
	5'-CTG AAG GGT ACT AGT AGT TCC TGC TAT ATC		700-730
cdso29	5'-FAM-ACC ATC AAT GAG GAA GCT GCA GAA TGG GA-TAMRA	HIV-1 Wildtypsonde für den Routinetest	607-636
cdsl	5'-TET-ACG TCG AAG GAG TAA CTA CCA GAG AGA TTG C-TAMRA	Sonde für die interne Kontrollsequenz im HIV-1 Routinetest	614-644
(T7)HIVAs	5'-(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA)G CTT TCA GCC CAG AAG TAA TAC CCA TG	Sense-Primer für Amplifikat A in der SOE-PCR+ (T7-Promotor in Klammern)	(462) 485-511
HIVAas	5'CTC TGG TAG TTA CTC CTT CGA CGT CTT ACC CTA TTT TAA CAT TTG CAT GGC TGC TTG ATG	Antisense-Primer für Amplifikat A in der SOE-PCR+	578-604 (637)
HIVBs	5'-(TAG GGT AAG ACG TCG AAG GAG TAA CTA CCA GAG) AGA TTG CAT CCA GTG CAT GCA GG	Sense-Primer für Amplifikat B in der SOE-PCR+	(605) 638-660
HIVBas(dT)	5'-(TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T)GT TCC TGA AGG GTA CTA GTA GTT CCT GCT ATG TC	Antisense-Primer für Amplifikat B in der SOE-PCR+ (polyT-Schwanz in Klammern)	700-775
S400	5'-GCT TTC AGC CCA GAA GTA ATA CCC ATG	Sequenzierprimer	485-511

Tabelle 3.3. Oligonukleotide für HIV-1

\*Nummerierung entsprechend HIV-1 B Konsensussequenz (Los Alamos National Laboratory)

+SOE-PCR = *splicing by overlap extension*, Verfahren zur gerichteten Mutagenese durch PCR (45)

### 3 Methoden

#### 3.1 Nukleinsäurepräparation

Für die Extraktion viraler Nukleinsäuren aus Patientenplasma beziehungsweise virusangereichertem Poolplasma wurde der Viral RNA® Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet.

##### 3.1.1 Standardverfahren zur Extraktion von HIV-1 und HBV aus Einzelspenderplasma

100 µl Plasma wurden mit 400 µl Puffer AVL aus dem Qiagen Viral RNA® Kit versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 500 µl Ethanol abs. zugesetzt und auf einem Schüttler vermischt.

500 µl der Lösung wurden auf eine Qiagen-Säule gegeben und 1 min in bei 8000 U min<sup>-1</sup> (6000 g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Durchfließvolumen wurde verworfen, anschließend mit den verbleibenden 500 µl genauso verfahren.

Auf die Säule wurden zweimal hintereinander 500 µl Qiagen Waschpuffer AW gegeben und wie oben zentrifugiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 13000 U min<sup>-1</sup> (16000 g) und Raumtemperatur für 2 min.

Zur Elution wurden 75 µl nukleasefreies Wasser auf 80°C erhitzt und auf die Säule appliziert, anschließend Zentrifugation bei 8000 g und Raumtemperatur für 1 min.

##### 3.1.2 Modifiziertes Verfahren zur sensitiveren Extraktion von HBV aus Einzelspenderplasma

100 µl Plasma wurden für 10 min bei 56 °C inkubiert mit 500 µg Proteinase K in 50 mM TRIS, 37 mM EDTA, 5 mM NaCl, 0,5 % SDS, pH 7. Dem Reaktionsvolumen von 200 µl wurden nach der Inkubationszeit 400 µl Qiagen Puffer AVL und 500 µl Ethanol abs. zugesetzt. Mit dem so erhaltenen Präzipitat wurde weiter wie oben verfahren.

#### 3.1.3 Verfahren zur Extraktion von HIV-1 und HBV aus virusangereichertem Poolplasma

##### 3.1.3.1 Herstellung von Plasmapools

Blutspendern wurde bei der Spende zusätzlich 7 ml EDTA-Plasma für die PCR-Testung abgenommen. Die Proben wurden in einer Heraeus Varifuge 3.0 R bei 3000 U min<sup>-1</sup> und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, entstopft und anschließend auf eine automatische TECAN Genesis® Pipettierstation überführt. Mit aerosoldichten Pipettenspitzen wurden jeweils 100 µl von 96 einzelnen Spenderplasmen in einem 50 ml Falcon Bluecap® Sterilgefäß zu einem 9,6 ml Plasmapool vereinigt und bei 4°C gelagert.

##### 3.1.3.2 Virusanreicherung und Nukleinsäureextraktion aus Plasmapools

Die Falcon Bluecap® Gefäße wurden bei 6000 U min<sup>-1</sup> und Raumtemperatur für 15 min in einer Heraeus Varifuge 3.0 R vorzentrifugiert, der Überstand in ein 10 ml Nalgene Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Dieses Material wurde in einer Heraeus Suprafuge 22 bei 48.000 g und 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgekippt, die Röhrchen bis zur Nukleinsäurepräparation in eine Abtropfvorrichtung gestellt.

Nach der Pelletierung von Viruspartikeln auf dem Boden eines 10 ml Nalgene Zentrifugenröhrchens wurde das sichtbare Pellet in 350 µl Qiagen Puffer AVL im selben Röhrchen unter Schüttele resuspendiert und lysiert. Nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 350 µl Ethanol abs. zugesetzt und auf einem Vortex-Schüttler vermischt. Die erhaltenen 700 µl Präzipitat wurden in einem Schritt auf eine Qiagen-Säule appliziert und für 1 min bei 6000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die weitere Extraktion wurde analog zum Verfahren für Einzelspenderplasma durchgeführt.