

Reaktionsbedingungen übernommen und die beiden Reaktionsvolumina von reverser Transkription und PCR vereinigt. Die zu amplifizierende RNA wurde zugegeben und die Inkubationstemperatur für die reverse Transkription direkt dem PCR-Temperatuprofil vorangestellt. Nach reverser Transkription im Thermocycler wurde unmittelbar zur Denaturierungstemperatur der PCR erhitzt. Eine Optimierung der Konzentration von Primer #cds/#cdia ergab ein Sensitivitätsoptimum bei äquimolarer Primerkonzentration von 400 nM.

4.2.3.6 Optimierung der 1-Step RT-PCR für HIV-1

Zur Erlangung einer größtmöglichen Sensitivität und Spezifität für die Routinetestung war eine nochmalige Optimierung der Reaktionsbedingungen erforderlich. Es erwies sich als zweckmäßig, in jeder Reaktion ca. 400 Kopien an interner Kontroll-RNA mitzuführen, um die Amplifikation von interner Kontrolle und Wildtyp aufeinander abgestimmt optimieren zu können. Um während der Optimierungsexperimente den Einfluß des Nukleinsäureextrakts auf die Reaktion mitzuerfassen, wurde allen Ansätzen das später in der Routinetestung pro Reaktion eingesetzte Volumen an Nukleinsäureextrakt zugegeben.

Eine gleichzeitige Titration folgender Parameter in den angegebenen Grenzen erbrachte jeweils ein verbessertes Endsignal oder einen früheren Ct.
 -MgCl₂ [1..8 mM] gegen dNTP [100..600 μM jeweils]; optimal 3 mM und 200 μM jeweils
 -Sonde cdso29 gegen Sonde cdsti jeweils [10..800 nM]; höchste Sensitivität für HIV-1 Wildtyp bei gleichzeitig ausreichender Detektion der internen Kontrollsequenz mit cdso29 = 300 nM und cdsti = 100 nM.

Anhand der parallelen Amplifikation von Verdünnungsreihen konnte ein relativer Sensitivitätsgewinn mit diesen Konzentrationen bestätigt werden.

Zur weiteren Verbesserung der Sensitivität wurden folgende Additive in angegebener Konzentration der PCR zugesetzt:

Rindergelatine, [1..0.001% (w/v)]

Tween™ 20 [5..0.008% (v/v)]

Nonidet™ P 40 [1..0.001% (v/v)]

Polyethylenglykol 6000 [5..0.008% (v/v)]

Dimethylsulfoxid [5..0.008% (v/v)]

Betain [100 mM..100 nM]

Tetramethylammoniumchlorid [100 mM..100 nM]

Insbesondere die in Abbildung 4.12. gezeigte Verwendung von 0,2% Rindergelatine und 0,2% Polyethylenglykol 6000 erbrachte einen Signalgewinn.

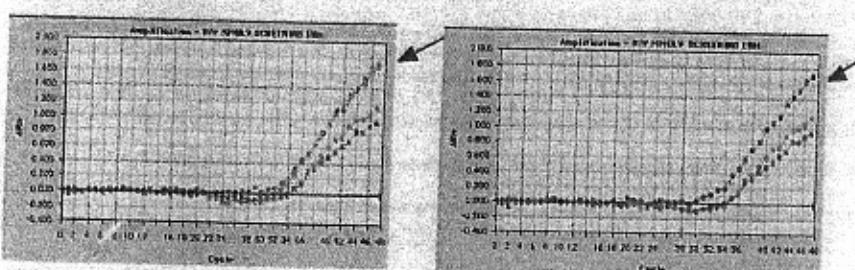


Abbildung 4.12. Verwendung von 0,2% Rindergelatine (links) oder 0,2% Polyethylenglykol 6000 (rechts) in der HIV-1 1-Step RT-PCR. Die Pfeile zeigen die jeweils doppelt angesetzten Reaktionen mit Zusatz, unmarkiert jeweils zwei Vergleichsansätze ohne Additiv.

Beide Additive steigerten die direkt gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM. Das Polyethylenglykol erbrachte außerdem durch einen geringfügigen linearen Abbau der ROX-Emission über die Zeit eine Steigerung des errechneten Fluoreszenzwerts Rn. (Abbildung 4.13.) Dies führte zu einer zusätzlichen Verstärkung des Endsignals bei jedoch erhöhtem Hintergrundrauschen.

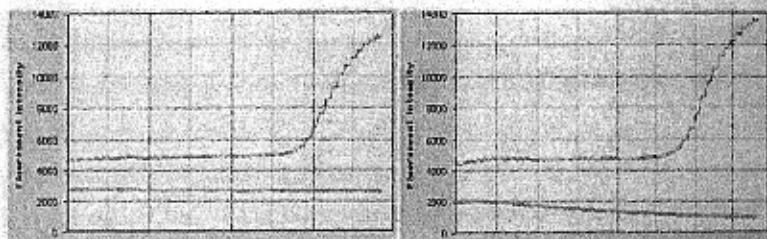


Abbildung 4.13. Vergleich der Fluoreszenz des Farbstoffes ROX (rot) im Multicomponentenformat mit und ohne 0,2% Polyethyenglykol 6000 (PEG). Das Multicomponentenformat zeigt die direkt gemessene, noch nicht durch Division durch ROX normalisierte Fluoreszenz. Rechts: Lineare Abnahme der ROX-Emission über die Zeit (x-Achse) in Anwesenheit von PEG. Links: Vergleichsansatz ohne PEG. Blau: Gleichzeitig gemessene FAM-Fluoreszenz.

Durch Modifikation des Temperaturprofils im 7700 SDS Thermocycler konnte das Signal-Hintergrundsverhältnis wieder verbessert werden. Die Modifikationen umfassen im einzelnen:

- Schrittweise Aktivierung der AmpliTaq™ Gold DNA-Polymerase zu Beginn der Reaktion. Die Aktivierungszeit des Enzyms zu Beginn der Reaktion wurde auf 7 min verkürzt. In den darauffolgenden 10 Zyklen wurde für jeweils 35 s bei 95°C denaturiert, um schrittweise weitere Enzymportionen zu aktivieren und damit die volle Enzymaktivität erst bei größerer Substratkonzentration freizusetzen.
 - Schrittweise Absenken der Anneal-Extendtemperatur von 62°C auf 58°C in den ersten 10 Zyklen, um eine unspezifische Hybridisierung von Primern wegen deren hoher Konzentration zu Beginn der PCR zu verhindern.
 - Schrittweise Anheben der Anneal-Extendtemperatur von 58°C auf 66°C in den letzten 40 Zyklen der Reaktion, um eine unspezifische Hybridisierung der Detektionssonden mit dem nun anwachsenden PCR-Produkt zu verhindern.
- Die Verwendung des in Tabelle 3.6 angegebenen Temperaturprofils erbrachte eine deutliche Verbesserung der Spezifität der Reaktion (Abbildung 4.14.)

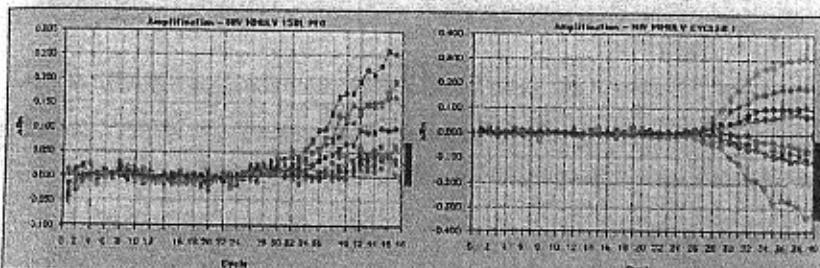


Abbildung 4.14. Verbesserung des Signal/Hintergrund Verhältnisses durch Anwendung eines modifizierten Temperaturprofils. Gezeigt sind jeweils fünf Reaktionen mit Amplifikation von 1000 Kopien HIV-1b und fünf Negativkontrollen (durch schwarze Balken markiert). Links: Ausgangsbedingungen, Rechts: Modifiziertes Temperaturprofil.

4.3 Interne Kontrollen

Das Vorgehen zur Herstellung von Konstruktsequenzen als kompetitive interne Inhibitionskontrollen richtete sich nach Higuchi (45) bzw. Rüster (84). Abbildung 4.15 zeigt das Prinzip der kompetitiven internen Inhibitionskontrolle. Zur Konstruktion der Inhibitionskontrollsequenz (synonym: Standard) wurde jeweils über gerichtete PCR-Mutagenese (*SOE, splicing by overlap extension*) eine alternative Sondenbindungsstelle in ein zuvor kloniertes Wildtypamplifikat des Virus eingeführt. Abbildung 4.16 zeigt das Prinzip der verwendeten Mutagenesestrategie. Die erhaltene Plasmidsequenz mußte für HIV-1 anschließend noch in RNA transkribiert werden, um auch die reverse Transkription zu kontrollieren.

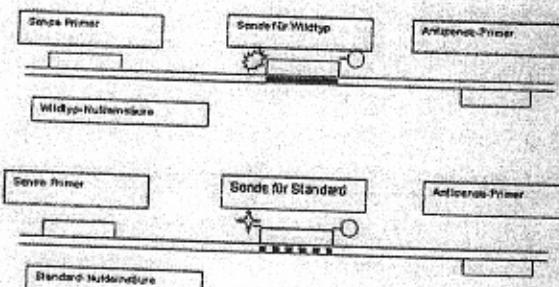


Abbildung 4.15. Oben: Ausschnitt aus der Virusnukleinsäure des Wildtyps. Unten: Entsprechender Ausschnitt aus der Konstruktsequenz für die Interne Kontrolle (Inhibitionskontrollsequenz, Standard). Beide Nukleinsäuren unterscheiden sich ausschließlich in der Sondenbindungsstelle (s. Schraffur), Primerbindungsstellen und Restsequenz sind gleich. Die Sonden tragen unterschiedliche Farbstoffe zur getrennten Detektion.

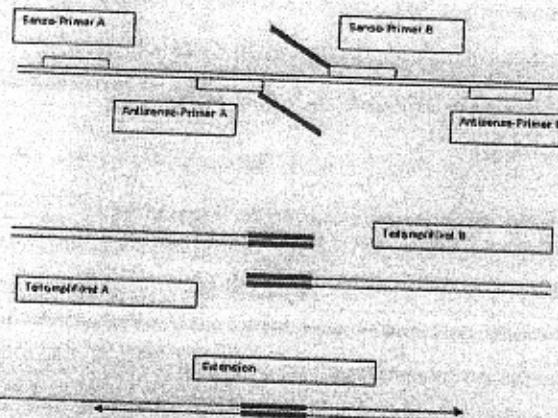


Abbildung 4.16. Entfernung der Sondenbindungsstelle aus der Wildtypnukleinsäure und Ersetzen durch eine neue in drei Schritten: Oben: Amplifikation einer Wildtypnukleinsäure in zwei Teilen (Teilamplifikat A und B, Mitte). Über 5'-Überhänge der inneren Primer wird den Teilamplifikaten die Sondenbindungsstelle für die Inhibitionskontrollsequenz angehängt. Unten: Extension der Teilamplifikate nach Rehybridisierung der gegenseitig komplementären Überhangsequenzen.

4.3.1 Ermittlung von alternativen Sondenbindungsstellen für die Inhibitionskontrollsequenz und Auswahl von hierfür geeigneten Detektionssonden.

Die in 4.1.1 ermittelte modifizierte Konsensussequenz wurde in ein leeres Dokument des Programms Primer Express kopiert. Die zur Amplifikation des Wildtyps experimentell als geeignet ermittelte Oligonukleotidkombination wurde in der Sequenz aufgesucht und markiert. Beide Primer wurden mit Hilfe des Untermenüs "annotation tools" festgelegt, die Sondenbindungsstelle aufgesucht und ausgeschnitten. An der Stelle der ausgeschnittenen Sondenbindungsstelle des Wildtyps wurde die alternative Sondenbindungsstelle der noch zu konstruierenden Inhibitionskontrollsequenz eingefügt.

4.3.1.1 Festlegung einer alternativen Sondenbindungsstelle für HBV

Genomregion 371-394, gezählt von der EcoR1-Schnittstelle des HBV-Genoms, wurde zufällig neu kombiniert. Dabei wurde die anteilige Basenzusammensetzung in dieser

Region beibehalten.

4.3.1.2 Festlegung einer alternativen Sondenbindungsstelle für HIV-1

Genomposition 605-637, numeriert in Übereinstimmung mit der HIV-1 B Konsensussequenz, wurde invertiert.

4.3.2 Ermittlung von geeigneten Detektionssonden für die alternative Sondenbindungsstelle mit dem Programm "Primer Express"

Mit dem Befehl "find primers and probes now" wurde an der die alternative Sondenbindungsstelle beinhaltenden Sequenz ein erneuter Suchlauf durchgeführt. Bei Mißerfolg wurde die alternative Sondenbindungsstelle solange unter Belbehaltung der anteiligen Basenzusammensetzung des Wildtyps modifiziert, bis eine geeignete Sonde zu ermitteln war. Kriterien für eine geeignete Sonde waren die Selben wie für die Wildtypsonde.

4.3.3 Enzymatische Synthese der internen Kontrollsequenzen

Das Vorgehen zur Synthese der internen Kontrollsequenzen war weitgehend identisch für HBV und HIV-1.

4.3.3.1 Generierung eines Wildtyp-Amplifikates für HBV

Nach Amplifikation von Nukleinsäureextrakt aus verschiedenen HBV-positiven Plasmen nach Protokoll 3.2. mit Primern HBVA_s und HBVB_s ergab die Agarosegelektrophorese das in Abbildung 5.17. gezeigte Bild.

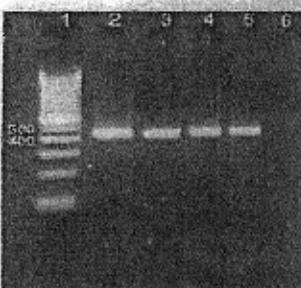


Abb. 5.17. HBV positives Plasma wurde extrahiert und mit den Primern HBVA_s und HBVB_s amplifiziert. Spur 1: 100 bp Molekulargewichtsmarker, Spur 2-5: PCR-Produkte von verschiedenen Plasmen, Spur 6: Negativplasma

Das relative Molekulargewicht der generierten PCR-Produkte entsprach der erwarteten Amplifikatlänge von 433 Basenpaaren (bp).

4.3.3.2 Generierung der Teilmplifikate A und B

Die Teilmplifikate A und B für HBV sind nach der Genomsequenz 141 und 315 bp lang. Hinzu kommen pro Amplifikat für die Überlappungsregion 23 bp. Das Amplifikat in Spur 4 wurde für die Generierung der beiden Teilmplifikate als Template verwendet. Dabei wurde das Thermocyclerprofil aus 3.2. beibehalten, jedoch die Annealingtemperatur um 5°C auf 50°C abgesenkt. Nach Amplifikation mit den Primern HBVA_s/HBVA_as bzw. HBVB_s/HBVB_as und Gelanalyse ergaben sich die in Abbildung 5.18. gezeigten

Verhältnisse.

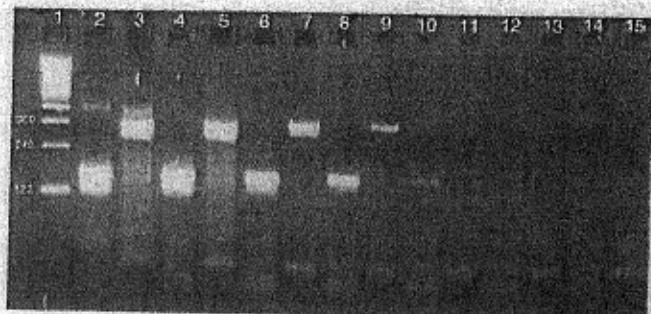


Abbildung 5.18. Gelelektrophorese der Teilamplifikate A und B. Spur 1: 123 bp Molekulargewichtsmarker, Spur 2-6: Amplifikat A bei Vorverdünnung des Wildtypamplifikates auf $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ und 10^{-5} , Spur 3,5,7,9,11,13: Amplifikat B bei Vorverdünnung des Wildtypamplifikates auf $10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ und 10^{-5} . Spur 14, 15 Wasserkontrolle für Amplifikat A, Amplifikat B.

Die generierten Amplifikate entsprachen der erwarteten Länge von 164 bzw. 338 bp.

4.3.3.3 Hybridisierung und Extension der Teilamplifikate

Die PCR-Produkte in Spur 10 und 11, Abbildung 5.18 wurden nach dem GeneClean Verfahren aus dem Gel aufgereinigt, die Eluate vereinigt, hieraus eine Verdünnungsreihe hergestellt und diese amplifiziert. Zur Vermeidung von unspezifischen Hybridisierungsprodukten hat sich dabei eine Hybridisierungstemperatur von 65°C und ein verlängerter Annealingschritt von 80 s als geeignet erwiesen. Die Konzentration von Primer HBVAs und HBVBAs wurde aus dem gleichen Grund auf 50 nM reduziert. Ansonsten wurde zur Amplifikation nach dem Protokoll 3.2 vorgegangen.

Abbildung 5.19. zeigt die generierte Konstruktsequenz nach Gelelektrophorese.

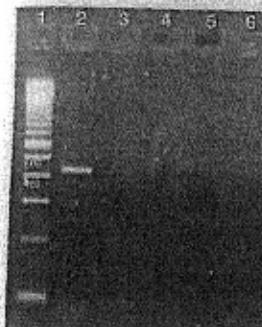


Abbildung 5.19. Extensionsprodukt aus den Teilamplifikaten A und B für HBV. 1: 100 bp DNA Molekulargewichtsmarker, Spur 2-6: Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-4} der Eluatverdünnungsreihe (s. Text). Entsprechend der Erwartung ist die erhaltene Sequenz wieder so lang wie der Wildtyp (vgl. Abb. 5.17).

4.3.3.4 Synthese der Konstruktsequenz für HIV-1

Die Synthese der Konstruktsequenz für HIV-1 wurde unter den selben Bedingungen wie für HBV durchgeführt. Abbildung 5.20. zeigt die Teilamplifikate A und B

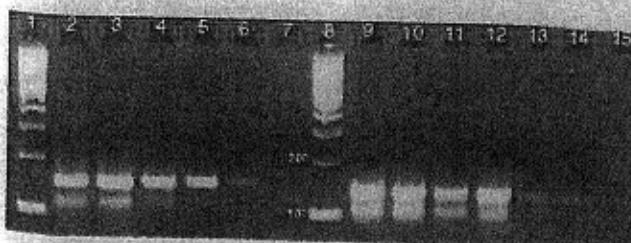


Abbildung 5.20. Teilamplifikate A und B für HIV-1. Spur 1/8: 100 bp Molekulargewichtsmarker, Spuren 2-6: HIV-1 Wildtyp RT-PCR Produkt verdünnt auf 10^1 bis 10^{-5} , amplifiziert mit Primer HIVAs und HIVBs. Spuren 9-14: HIV-1 Wildtyp RT-PCR Produkt verdünnt auf 10^1 bis 10^{-5} , amplifiziert mit Primer HIVBs und HIVBas.

Abbildung 5.21 zeigt das Produkt aus der Extension der Teilamplifikate A und B. Um die später hieraus synthetisierte RNA über eine oligo-dT Zellulose Säule aufreinigen zu können, wurde dem Extensionsfragment durch Reamplifikation mit dem Antisense Primer HIVBasdT noch ein 25 bp langer PolyA-Schwanz angehängt. Das Reamplifikat ist zum

7 Summary

Serological testing of blood donors for viral diseases relevant to blood transfusion leaves a diagnostic window period between the infection and the time of seroconversion. By implementation of nucleic acid amplification techniques (NAT) into blood donor screening, the transmission of these diseases during the diagnostic window period can be prevented. In this work, the establishment and validation of pooling PCR/RT-PCR assays for high-throughput screening of blood donors for HBV/HIV-1 are described. New strategies concerning the design of oligonucleotides and the experimental optimization of reaction conditions have been worked out in order to implement a novel PCR detection chemistry (5'-nuclease PCR). By development of competitive internal controls, the sensitivity of the assays can be monitored in each individual reaction. It is demonstrated that the application of the assays reduces the diagnostic window period by 17, 10, and 11 days (HBV, analytical sensitivity limit: 1000 genome equivalents/ml), or 9 and 12 days (HIV-1, analytical sensitivity limit: 1195 RNA copies/ml). These results are concordant with theoretical calculations projecting the reduction of the window period by NAT. Both assays have been approved by the Paul-Ehrlich Institute for blood donor screening and have been implemented as routine procedures in the Hessian and Bavarian Red Cross Blood Transfusion Services in Frankfurt and Wiesentheid. With a high amount of blood samples additionally tested at both sites for German and international Blood Transfusion Services, the system is now the most commonly used for screening of blood donations for HBV and HIV-1 by NAT in central Europe (1.2 million donations screened per year). Until now, six HBV positive and two HIV-1 positive donations have been identified that would have been missed if tested by serology only.

8 Lebenslauf

12.06.1972	Geboren als Sohn von Agnes Drost, geborene Kues, und Heinrich Drost in Lingen (Ems)
1978-1982	Besuch der Grundschule in Geeste
1982-1991	Gymnasium Marianum, Meppen
1991	Abitur
1991-1992	Zivildienst
1992-1994	Studium der Chemietechnik und der Biologie an den Universitäten Dortmund und Münster
April 1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Frankfurt/M.
September 1995	Ärztliche Vorprüfung
September 1996	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 1996- April 1999	Promotionsstudium am Institut für Immunhämatologie und Transfusionsmedizin, Blutspendedienst des DRK Hessen, Frankfurt/M., Prof. Dr. med W.K. Roth
April 1999	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 1999 bis April 2000 Universität, Frankfurt/M.	Praktisches Jahr, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe
April 2000	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Juni 2000	AIP im Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin Hamburg, Abt. Virologie, Prof. Dr. med H. Schmitz

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Etablierung von Hochdurchsatz PCR-Testsystemen für HIV-1 und HBV zur Blutspendertestung“

am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie im Blutspendedienst des DRK Hessen, Frankfurt/M. unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. K. Roth ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation verwendet.

Hamburg, im April 2003

Christian Drosten

10 Literatur

1. Aach, R., W. Szmuness, J. Mosley, F. Hollinger, R. Kahn, C. Stevens, V. Edwards, and J. Werch. 1981. Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients. The transfusion transmitted viruses study. *N Engl J Med* **304**:989-994.
2. Abe, C., M. Hirano, W. Wada, et al. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis Direct Test*. *J Clin Microbiol* **31**:3270-3274.
3. Allain, J. 2000. Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings. *Clin Lab Haem* **22**:1-10.
4. Alter, H. 1995. To C or not to C: These are the questions. *Blood* **85**:1681-1695.
5. Alter, H., P. Holland, R. Purcell, J. Lander, S. Feinstone, A. Morrow, and P. Schmidt. 1972. Post-transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B antigen-positive donors. *Ann Int Med* **77**:691-699.
6. Alter, H., R. Purcell, P. Holland, D. Alling, and D. Kozlak. 1981. Donor transaminase and recipient hepatitis. Impact on blood transfusion services. *JAMA* **246**:630-634.
7. Alter, H., R. Purcell, and J. Shih. 1989. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* **321**:1494-14500.
8. Anonymous. 1981. Morbidity and Mortality Weekly Report. *MMWR* **31**:305.
9. Anonymous. 1981. Morbidity and Mortality Weekly Report. *MMWR* **30**:250.
10. Anonymous. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR* **31**:644-651.
11. Arnold, L., P. Hammond, W. Wiese, and N. Nelson. 1989. Assay formats involving Acridinium-ester labeled DNA probes. *ClinChem* **35**:1588-1594.

12. Barbara, J., R. Tedder, and M. Briggs. 1984. Anti-HBc alone is not a reliable blood donor screen. *Lancet*, no. I:346.
13. Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Gaube, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* **224**:500+504.
14. Beeson, P.B. 1943. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. *JAMA* **121**:1332-1334.
15. Blajchmann, M.A., S.B. Bull, and S.V. Feinman. 1995. Post-transfusion hepatitis: impact of non-A, non-B hepatitis surrogate tests. *Lancet* **345**:21-25.
16. Blumberg, B.S., H.J. Alter, and S. Visnich. 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* **191**:541-546.
17. Brechot, C., F. Degos, C. Lugassy, et al. 1985. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease an negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* **312**:270-276.
18. Busch, M.P. 1994. Applications of seroconversion data to policy decisions. *Vox Sang* **Suppl**:13-18.
19. Busch, M.P., L.L.J. Lee, G.A. Satten, and e. al. 1995. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implication for screening of blood and tissue donors. *Transfusion* **35**:91-97.
20. Bush, M.P. 1996. Residual risks of viral transmission by transfusions and projected yields of additional screening tests. *Transactions of clinical biology* **3**:7-11.
21. Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**:169-193.

22. Cardoso, M., K. Koerner, and B. Kubanek. 1998. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. *Transfusion* **38**:905-907.
23. Carman, W.F., A.R. Zanetti, P. Karayannis, et al. 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* **336**, no. II:325-329.
24. Caspari, G., Gerlich, W.H., and W. Jilg. 1995. Bluttransfusion und Hepatitis B: ein altes Problem in neuem Gewand. *Dtsch Ärzteblatt* **92**:2126-2128.
25. Caspari, G., W.H. Gerlich. 1994. HIV p24 Antigentest im Bluspendedewesen: ja oder nein? *Med Klinik* **89**:25-31.
26. Choo, Q.-L., G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**:359-362.
27. Chudy, M. Pers. Gespräch2001.
28. Cohen, N.D., A. Munoz, and B.A. Reitz. 1989. Transmission of retroviruses by transfusion of screened blood in patients undergoing cardiac surgery. *N Engl J Med* **320**:1172-1176.
29. Cone, R.W., A.C. Hobson, M.L. Huang, et al. 1992. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**:3185-3189.
30. Courouce, A.M., J. Drouet, N. LeMarrec, et al. 1985. Blood donors positive for HBsAg and negative for anti-HBc antibody. *Vox Sang* **49**:26-33.
31. Creutzfeld, W., H. Matthes, H. Schmitt, and K. Beck. 1964. Zur Häufigkeit und Verhütung der Transfusionshepatitis. *Beiträge zur Inneren Medizin*, ed. v.K. W. Schattauer, Stuttgart.
32. Creutzfeld, W., H.J. Sewerdt, H. Schmitt, E. Gallasch, H.J. Erndt, H. Brachmann, G. Schmidt, and U. Tschaepke. 1966. Untersuchungen über Häufigkeit und Verlauf der

- ikterischen und anikterischen Transfusionshepatitis. *Dtsch Med Wochenschr* 91:1813-1820.
33. Cumming, P.D., E.L. Wallace, J.B. Schorr, and R.Y. Dodd. 1989. Exposure of transfused patients to human immunodeficiency virus through the transfusion of blood components that test antibody-negative. *N Engl J Med* 321:941-946.
 34. Curran, J.W., N.L. Dale, H. Jaffe, J.E. Kaplan, L.D. Zyla, M. Chamberland, R. Weinstein, L. Kung-Jong, L.B. Schonberger, T.J. Spira, W.J. Alexander, D. Mildvan, R. Stoneburner, J.M. Jason, H.W. Havercos, and B.L. Evans. 1984. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. *N Eng J Med* 310:69-75.
 35. Dienstag, J.L., H.R. Purcell, H.J. Alter, S.M. Feinstone, D.C. Wong, and P.V. Holland. 1977. Non A, non B posttransfusion hepatitis. *Lancet*:560-562.
 36. Donahue, J.G., K.E. Nelson, and A. Munoz. 1990. Transmission of HIV by transfusion of screened blood. *N Engl J Med* 323:1709.
 37. Eggers, H.J. 1994. Der Stellenwert des p24 Antigentests im Blutspendewesen. *Med Klinik* 89:41.
 38. Ehrlich, H.A., D.H. Gelfand, and R.S. Saiki. 1987. Specific DNA amplification. *Nature* 331:461-462.
 39. Flanagan, P., and T. Snape. 1998. Nucleic acid technology testing and transfusion service: a rationale for the implementation of minipool testing. *Transfusion Medicine* 8:9-13.
 40. von Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys Leipzig* 2:55-57.
 41. Galibert, F., E. Mandart, F. Fitoussi, et al. 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype adw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281:646-650.

42. Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and P.D. Markham. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLVIII) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-502.
43. Glück, D., B. Kubanek, C. Maurer, and N. Petersen. 1998. Seroconversion of HIV, HCV and HBV in blood donors in 1986. Risk of virus transmission by blood products in Germany. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 25:82-85.
44. Hewlett, I.K., and J.S. Epstein. 1997. Food and Drug Administration conference of the feasibility of genetic technology to close the HIV window in donor screening. *Transfusion* 37:346-351.
45. Higuchi, R. 1989. Using PCR to engineer DNA, p. 63-69. In E. H.A, editor, *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press, New York.
46. Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88:7276-7280.
47. Hollinger, F.B. 1990. Hepatitis B virus. 2nd Edition ed. *Virology*, ed. F. B. Raven Press, New York.
48. Howard, C.R., and L.M.C. Allison. 1995. Hepatitis B surface antigen variation and protective immunity. *Intervirol* 38:35-40.
49. Izuka, H., K. Ohmura, A. Ishijima, et al. 1992. Correlation between anti-HBc titres and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang* 63:107-111.
50. Imagawa, D.T., M.H. Lee, S.M. Wolinsky, et al. 1989. Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *N Engl J Med* 320:1458-1462.
51. Imagawa, D.T., and R. Detels. 1991. HIV-1 in seronegative homosexual men. *N Engl J Med* 325:1250-1251.

52. Jongerius, J.M., M. Wester, H.T.M. Cuypers, and e. al. 1998. New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion* 38:56-59.
53. Julien, A.M., A.M. Courouce, D. Tichard, M. Favre, J.J. Lefrere, and B. Habibi. 1988. Transmission of HIV by blood from seronegative donors. 1988:1249-1249.
54. Kleinman, S., H. Alter, M. Busch, et al. 1992. Increased detection of hepatitis C Virus infected blood donors by a multiple antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 32:806-813.
55. Kleinman, S., and K. Secord. 1988. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV negative blood: Estimates using the lookback methodology. *Transfusion* 28:499-501.
56. Kox, L.F., R. D., A.M. Miranda, et al. 1994. A more reliable PCR for detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *J Clin Microbiol* 32:672-678.
57. Kuo, G., Q.L. Choo, H.J. Alter, and e. al. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of non-A, non-B hepatitis. *Science* 244:362-364.
58. Kwok, S., and R. Higuchi. 1989. Avoiding false-positives with PCR. *Nature* 339:237-238.
59. Kwok, S., D.H. Mack, K.B. Mullis, and e. al. 1987. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 61:1690-1694.
60. Lelie, P.N., H.T.M. Cuypers, A.A.J. van Drimmelen, et al. 1997. Standardisation of viral nucleic acid amplification methodology in blood safety testing. A risk-benefit analysis. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 24:220.
61. Leyssen, P., A. van Lommel, C. Drosten, et al. 2001. A novel model for the study of the therapy of flavivirus infections using the Modoc virus. *Virology* 279:27-37.

62. Liang, T.J., H.C. Bodenheimer, and R. Yankee. 1994. Presence of hepatitis B and C viral genomes in US blood donors as detected by polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 42:151-157.
63. Livak, K.J., S.J. Flood, J. Marmaro, et al. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 4:357-362.
64. Lyamichev, V., M.A. Brow, and J.E. Dahlberg. 1993. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 360:778-783.
65. Maxam, A.M., and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing. *PNAS* 74:560-564.
66. McOmisch, F., P.L. Yap, A. Jordan, et al. 1993. Detection of parvovirus B 19 in donated blood. A model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:323-328.
67. Montagnier, L., C. Brenner, S. Chamaret, et al. 1996. Human immunodeficiency virus infection and AIDS in a person with negative serology. *Journal of Infectious Diseases* 175:955-959.
68. Mortimer, C. 1997. Intersecting pools and their potential application in testing donated blood for viral genomes. *VoxSang* 73:93-96.
69. Mosley, J.W., C.E. Stevens, R.D. Aach, et al. 1995. Donor screening for antibody to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion* 35:5-12.
70. Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.

71. Murthy, K.K., D.R. Henrard, J.W. Eichberg, et al. 1999. Redefining the HIV infectious window period in the chimpanzee model: evidence to suggest that viral nucleic acid testing can prevent blood-borne transmission. *Transfusion* 39:688-696.
72. Nübling, C.M., H. Willkommen, and J. Löwer 1995. Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345: 1174.
73. Okamoto, H., K. Yano, Y. Nozaki, et al. 1992. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immunoglobulin and vaccine. *Pediatr Res* 32:264-268.
74. Overbergh, L., D. Valckx, M. Waer, and C. Mathieu. 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11, no. 4:305-312.
75. Pao, C., W.L. Yang, S.Y. Wu, et al. 1987. Presence of hepatitis B virus DNA in serum of surface-antigen negative immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 25, no. 2:449-451.
76. Pasloke, B.L., C.R. Walkerpeach, R.D. Obermoeller, et al. 1998. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J Clin Microbiol* 36:3590-3594.
77. Persing, D.R., T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White. 1993. Diagnostic Molecular Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC.
78. Petersen, L.R., E.M. Lackritz, R.Y. Dodd, et al. 1995. Comparing surrogate lifestyle tests and p24 antigen testing with regard to transfusion safety. NIH Consensus Conference on Infectious Disease Testing for Blood Transfusion, abstr., Bethesda, Maryland.
79. Power, J.P., E. Lawlor, F. Davidson, et al. 1994. Hepatitis C viremia in recipients of Irish intravenous anti-D immunoglobulins. *Lancet* 334:116-117.

80. Prince, A.M., W. Stephan, and B. Brotmann. 1983. Beta-propiolactone/ultraviolet irradiation: a review of its effectiveness for inactivation of viruses in blood derivatives. *Reviews of infectious diseases* 5:92-107.
81. Rapicetta, M., S. Dettori, and L.A. Kondili. 1999. Persistence of HCV RNA in a blood donor with negative antibody assay. *Vox Sanguinis* 76:192-193.
82. Rasemack, J.W., H.J. Schlayer, F. Hettler, et al. 1995. Hepatitis B virus infection without immunological markers after open-heart surgery. *Lancet* 1995, no. 345:355-357.
83. Roth, W.K., M. Weber, and E. Seifried. 1999. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood bank setting. *Lancet* 353:359-363.
84. Rüster, B., S. Zeuzem, and W.K. Roth. 1995. Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcript. *Anal Biochem* 224:597-600.
85. Sanger, F., S. Nicklen, and P. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463-5467.
86. Seraswat, S., K. Banerjee, N. Chaudhury, et al. 1996. Posttransfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood. *J Hepatol* 25:639-643.
87. Schottstedt, V., W. Tuma, G. Bunger, and H. Lefevre. 1998. PCR for HBV, HCV and HIV-1 experiences and first results from a routine screening programme in a large blood transfusion service. *Biologics* 26, no. 2:101-104.
88. Schreiber, G.B., M.P. Busch, S.H. Kleinman, J.J. Korelitz, and f.t.R.E.S. Group. 1996. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med*, no. 334:1685-1690.
89. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J Mol Biol* 98:503-517.

90. Stevens, C.E., R.D. Aach, F.B. Hollinger, J.W. Mosley, W. Szmuness, R. Kahn, J. Werch, and V. Edwards. 1984. Hepatitis B virus antibody in blood donors and the occurrence of non-A, non-B hepatitis in transfusion recipients. An analysis of the Transfusion-transmitted Viruses study. *Ann Intern Med* **101**:733-738.
91. Sugitani, M., G. Inchuaspé, M. Shindo, and A.M. Prince. 1992. Sensitivity of serological assays to identify blood donors with hepatitis C viremia. *Lancet* **339**:1018-1019.
92. Thiers, V., E. Nakajima, D. Kremsdorf, et al. 1988. Transmission of hepatitis B virus from hepatitis B seronegative subjects. *Lancet* **1988/2**, no. 8623:1273-1276.
93. Vrielink, H., C.L. van der Poel, and H.W. Reesink. 1995. Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV negative blood transfusion. *Vox Sanguinis* **68**:55-56.
94. Ward, J.W., A.J. Grindon, P.M. Feorine, C. Schable, M. Parvin, and J. Allen. 1986. Laboratory and Epidemiologic Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Antibodies to HTLVIII. *JAMA* **256**, no. 3:357-361.
95. Ward, J.W., S.D. Holmberg, J.R. Allen, D.L. Cohn, S.E. Critchley, S.H. Kleinman, B.A. Lenes, O. Ravenholt, J.R. Davis, M.G. Quinn, and H.W. Jaffe. 1988. Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusions screened as negative for HIVantibody. *New Engl J Med* **318**:473-478.

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Seifried danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. K. Roth, für die Überlassung des Themas und seine zuverlässig kompetente, zugleich freundschaftliche Hilfestellung in jeder Entstehungsphase meiner Arbeit und darüberhinaus.

Frau Dr. rer. nat. M. Weber, Blutspendedienst des BRK, Wiesentheid möchte ich danken für ihre geduldige Hilfestellung bei den ersten oft ungeliebenen Schritten eines Medizinstudenten im molekularbiologischen Labor.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. B. Rüster, medizinische Klinik II der Universität Frankfurt, Herrn Dr. rer. nat. E. K. Petershofen, Blutspendedienst des DRK Niedersachsen, Oldenburg, und Frau Dipl. Biol. S. Buhr, Blutspendedienst des DRK Hessen, Frankfurt/M. für die vielen hilfreichen und heiteren Diskussionen über jegliche Art von Problemen des Labor- und Wissenschaftsalltags.

Allen technischen Assistentinnen der Abteilung Molekulare Virusdiagnostik im Blutspendedienst Frankfurt/M. sei gedankt für ihre bereitwillige Unterstützung meiner Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe Molekulare Diagnostik im Georg-Speyer Haus Frankfurt und der Arbeitsgruppe Zeuzem in der II. Medizinischen Klinik der Universität Frankfurt, die mich gastfreundlich in ihre Labore aufgenommen haben.

12 Anhänge

- 1: Auszug aus dem HBV Sequenzalignment einschließlich des für den Inhibitionskontrollstandard verwendeten Plasmidinserts
 - 2: HIV-1 gag Sequenzalignment einschließlich des für den Inhibitionskontrollstandard verwendeten Plasmidinserts
 - 3: Gesamtes Insert des für den Inhibitionskontrollstandard verwendeten Plasmids pB20. Die gegenüber dem Wildtyp ausgetauschte Sondenbindungsstelle ist kursiv gedruckt.
 - 4: Gesamtes Insert des für den Inhibitionskontrollstandard verwendeten Plasmids pHIVSTD. Die gegenüber dem Wildtyp ausgetauschte Sondenbindungsstelle ist kursiv gedruckt.

Anhang 2

	Zn-motif	p1	cds	→	
CONSENSUS-A	/ P ⁺ /<=Zn-motif ->/	<-Zn-motif ->/ p7	✓	'P'	8
CONSENSUS-B	222222222222AGGCCCCATTAAGCTTATAGTqCAGaAAGGAGCAAGatGatCAGGccCTTAT	g	CCT	g	436
CONSENSUS-C	-----	g	CTC	g	440
CONSENSUS-D	-----	g	CCT	g	442
CONSENSUS-F	-----	g	CCT	g	444
CONSENSUS-G	-----	A-G	CTT-G-a	G-	447
CONSENSUS-H	-----	C	CCT	g	452
CONSENSUS-O	-----	A-T	C-?	C-T-a	495
CONSENSUS-CPZ	7-TG	A-C	T-G	A-C	590
		7-TG	7-TG	7-TG	594
	P6'	VPR binding	(minor)	VPR binding	P6 terminus
CONSENSUS-A	/ P6' /<->/	/ minor	/<->/	/ (BD)	
CONSENSUS-B	GACCLAGGGCTTAAAGGATGCGATGGTgAAGtGtaAGatAAGGTTTcAGGAGtGATAATACCCAT	A	A	g	505
CONSENSUS-C	-----	A	A	g	510
CONSENSUS-D	-----	A	A	g	502
CONSENSUS-F	-----	A	A	g	510
CONSENSUS-G	-----	A	A	g	511
CONSENSUS-H	-----	A	A	g	497
CONSENSUS-O	-----	C-D	A	G	471
CONSENSUS-CPZ	7-A-C	A	A-G-C-G	7-J-C-T-A-T-A	463
	7-TG	7-TG	7-TG	7-TG	457
		7-TG	7-TG	7-TG	593
CONSENSUS-A	GTtCcCaGcStTaTCAGAgGGaCCAAccCaAagAtTAAatgcAAGcTaAAAatAGggggGGacAC	T	Ac	C	376
CONSENSUS-B	-----	A	Ac	C	376
CONSENSUS-C	-----	A	Ac	C	580
CONSENSUS-D	-----	A	Ac	C	372
CONSENSUS-F	-----	A	Ac	C	500
CONSENSUS-G	-----	A	Ac	C	369
CONSENSUS-H	-----	A	Ac	C	540
CONSENSUS-O	-----	A-TG	?	GCG	529
CONSENSUS-CPZ	7-T-T-TG	?	2-TG	7-T-T	514
	7-T-T-TG	?	2-TG	7-T-T	347
CONSENSUS-A	CAAGRCAGCTATGCCATATGCTAAAGtttttCCTATGggGAAAGTCGCAatGtgGAGcGgtTACACCCAG	T	At-g	T	645
CONSENSUS-B	-----	A	At-g	T	650
CONSENSUS-C	-----	A	At-g	T	642
CONSENSUS-D	-----	A	At-g	T	650
CONSENSUS-F	-----	A	At-g	T	637
CONSENSUS-G	-----	A	At-g	T	610
CONSENSUS-H	-----	A-C	?	G	595
CONSENSUS-O	-----	A-G7-T-A-G-?	G-AAGA	A-7-T-T	578
CONSENSUS-CPZ	A-G	TG-C	T-AAGT	T-T	108
		7-TG	7-TG	7-TG	
SENSENSUS-A	TaCatGCAGatGGGCTatCttaCcGagGcChgAtGAGAGAACCCAAGGGGAGGAGCATAGCAGacactTACTAG	T	T	T	715
SENSENSUS-B	-----	T	T	T	720
SENSENSUS-C	-----	T	T	T	716
SENSENSUS-D	-----	T	T	T	720
SENSENSUS-F	-----	T	T	T	707
SENSENSUS-G	-----	A-T	T	T	678
SENSENSUS-H	-----	A-T	T	T	664
SENSENSUS-O	C-TCTTTT	G-T	A-G	CA	642
SENSENSUS-CPZ	CT	7-T-T-TG	A-G	CA	162
		7-T-T-TG	7-T-T	7-T	
SENSENSUS-A	KAccCTtGtttGAAcAAttttagttttagGtAAGcgtc	T	ATG	CCG	776
SENSENSUS-B	-----	T	T	T	781
SENSENSUS-C	-----	T	T	T	771
SENSENSUS-E	-----	T	T	T	780
SENSENSUS-F	-----	T	T	T	768
SENSENSUS-H	-----	T	T	T	739
SENSENSUS-O	C-T-T-G	G-T	T-T	T-T	694
SENSENSUS-CPZ	C-T-T-G	G-T	T-T	T-T	502

Anhang 3

253 | actcg tggtg gactt ctctc aattt tctag gggga acacc
293 | cgtgt gtctt ggcca aaatt cgca g tcccc aaccc ccaat
333 | cactc accaa cctct tgtec tccaa cttgt cctgg tttga
373 | ctggg cagtg tggtc cgtcg ttat catct tcetc ttcat
413 | cctgc tgcta tgcct catct tcttg ttggg tcttc tggac
453 | tatca aggtt tggta cccgt ttgtc ctata attcc aggtt
493 | catca accac cagoa cggga ccatg caaga cctgc acgac
533 | tcctg ctcaa ggaac ctcta tggta ccctc ctgtt gctgt
573 | aaaaa acctt cggac ggaaa ctgca cctgt attcc catcc
613 | catca tcctg ggctt tcgsa aaatt cctat gggag tgggc
653 | ctcag tccgt ttctc ctggc tcagt ttact agt

485 | gcttt cagcc cagaa gtaat accca tgttt tcagc agtat
525 | cagaa ggagc caccc cacaa gattt taaca ccatg ctaaa
565 | cccag taggg ggaca tcaag cagcc atgca aatgt taaaa
605 | taggg taaga cgtcg aagga gtaac tacca gagag attgc
645 | atcca gtgca tgca ggcct attgc accag gccag ataag
685 | agaac caagg ggaac tgaca tagca ggaac tacta gtacc
725 | cttca ggaac aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa