Bedeutung der Einführung der PCR im Blutspendewesen

L.

Gürtler

München

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine hochsensitive Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren, DNA bzw. RNA nach Umschreiben in DNA. Die PCR kann unter Routinebedingungen etwa 10 DNA-Moleküle oder Teile davon erkennen. Wenn sie zusätzlich zu den serologischen Tests verwendet wird, kann damit eine erhöhte Infektionssicherheit erreicht werden. Voraussetzung ist, daß das Probenvolumen für die PCR nach Möglichkeit aus einer Einzelspende, nicht aus einem größeren Pool stammt.

Serologische Tests und Sensitivität der PCR

HBV – Hepatitis-B-Virus

HBV-Antigen: Beim HBV ist davon auszugehen, daß die unter deutschen Blutspenden zirkulierende HBV-Population relativ homogen ist und daß beschriebene HBV-Varianten nur selten vorkommen [1]. Schon mit serologischen Tests können HBV-Varianten, bestimmt als HBsAg, falsch-negative Ergebnisse ergeben [1]. Die Kreuzreaktion der Primer in der PCR ist geringer als die von monoklonalen Antikörpern gegen ihre Epitope, und so ist auch beim HBV je nach Selektion der Primerbindungsstellen theoretisch mit falsch-negativen Ergebnissen zu rechnen. Bei ausreichender Immunität wird die HBV-Infektion überwunden und HBsAg ist nicht mehr nachweisbar; kurze Zeit danach können solche Spender immer noch infektiös sein, und mit der PCR kann Nukleinsäure nachgewiesen werden [2].

HBV-Antikörper: Im Gegensatz zum HBsAg sind menschliche Antikörper immer polyklonal und lassen eine breite Antigen-erkennung gegenüber den im Test angebotenen Antigenen zu. Die erhaltenen Titer sind testmäßig nur kritisch während der beginnenden Serokonversion. Aus diesem Grund ist die Bestimmung des HBV als Protein und/oder Nukleinsäure unverzichtbar, um die beginnende Infektion zu erfassen.

HCV – Hepatitis-C-Virus

HCV-Antigen: Ein serologischer Test zur Bestimmung des Antigens ist nicht vorhanden. So ist die Einführung der PCR bei HCV zweifellos ein Zugewinn, der noch relevanter wird, da das diagnostische Fenster bei HCV häufig 3 Monate dauern kann.

HCV besteht nach heutigem Wissen aus 6 Genotypen, die untereinander je nach Gen zwischen 10 und 40% in der Nukleinsäuresequenz divergent sein können [3, 4]. Die Primer der kommerziellen Tests sind auf den Typ 1 adaptiert, und so werden, abhängig von der HCV-Nukleinsäuren-Konzentration, auch bei der HCV-PCR falsch-negative Resultate vorkommen. Der Zugewinn durch PCR-Testung ist also abhängig von der Prävalenz des Typs von HCV [5]. Beim Betreuen von HCV-infizierten Patienten fällt auf, daß auch mit der PCR wochenweise die RNA nachweisbar ist und periodenweise nicht, was mit der schwankenden Freisetzung des Virus plausibel erklärt werden kann. Während der Perioden der Nichtnachweisbarkeit ist das Blut des

Trägers weiter infektiös, jedoch auch mit der PCR nicht als kontaminiert zu erfassen. HCV-Antikörper: Bei Vergleich zum HBV sind die Titer meist geringer. Bei der Antigenkonfiguration der Tests besteht zur Zeit wenig Unterschied zwischen den einzelnen Firmen [6]; die diagnostische Sicherheit kann verbessert werden.

HIV – Humanes Immunschwächevirus

HIV-Antigen: Für die Erfassung des Virus steht der p24-Antigentest zur Verfügung, der ab 50000 HIV-1-Partikeln positiv wird [7]. Im ELISA konkurrieren die Anti-p24 des Patienten mit den Antikörpern des Tests um das Antigen. Nachdem mit der PCR der Nachweis von 1-2 Partikeln erreicht werden kann, ist auch die Einführung der PCR beim Erkennen der frühen HIV-Infektion theoretisch ein Zugewinn [8, 9]. Die bis-her erhältlichen PCR-Tests erkennen nur HIV-1 und darunter optimal HIV-1B, während bei den Subtypen 1E und 1D, je nach verwendeten Primern, zu geringe Amplifikatmengen auftreten können. HIV-1 Subtyp O und HIV-2 werden von keinem PCR-Test erkannt [8]. Der Zugewinn der PCR-Testung in Blutspenden für das Verengen des diagnostischen Fensters wird also im wesentlichen bei HIV-1B liegen. Das Dilemma liegt in der Variabilität des HIV, da die Varianten, die serologisch aufgrund der geringen Kreuzreaktion der Antikörper Probleme machen, auch teilweise in der PCR nicht regelrecht erfaßt werden.

HIV-Antikörper: Nach Einfügen des HIV-IO-Antigens in die Tests sind nur noch wenige HIV-1-Varianten bekannt, die mit den HIV-Antigenen der Tests nicht kreuzreagieren.

KARGEIL

© 1996 S. Karger GmbH, Freiburg Fax (07 61) 4 52 07 14

Prof. Dr. L. Gürtler

Max von Pettenkofer-Institut

für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Ludwig-Maximilians-Universität München

Pettenkoferstraße 9a

D-80336 München (Deutschland)

Die serologische Lücke im Erfassen dieser Varianten ist gleichbedeutend mit der Lücke in der Nukleinsäure-Diagnostik. HIV-1-Antikörper werden zirka 40 Tage nach Infektion nachweisbar. Wenn davon ausgegangen wird, daß die PCR etwa nach 12-14 Tagen positiv wird, so ist bei guten Tests das diagnostische Fenster bis auf eine Woche zu schließen. Im Gegensatz zu HBV und HCV bedeutet der Nachweis von HIV-Antikörpern immer Infektiosität in der Blutspende.

Quantitative Aspekte

HBV

Während der frühen Serokonversion können bei fulminanter Produktion des HBV im Blut Titer bis zu 109 pro ml vorhanden sein. Nicht alle Partikel enthalten auch ein DNA-Genom. Wenn angenommen wird, daß bis zu 105 Partikel – mit Ausnahme der obenerwähnten Varianten – über den HBs-Antigentest sicher erfaßt werden, dann müßte der PCR zur Verbesserung der Sensitivität fähig sein, wenigstens 104 Partikel zu erkennen, um Nutzen zu bringen. Bei 2 Genomen pro HBV und einem Einsatz von etwa 25 µl Plasmaextrakt pro Test wären folglich 500 Genome vorhanden. Da 10 Genome sicher nachgewiesen werden können, kann die Ausgangsprobe mit 50 anderen HBV-negativen Proben verdünnt werden und in einem Pool immer noch positiv erkannt werden. Liegen aber bei früher Serokonversion nur 103 HBV pro ml

oder weniger vor, dann kann die kontaminierte Probe nur in 5 weiteren Plasmen oder überhaupt nicht verdünnt werden, um die benötigte Sensitivität zu erhalten.

Werden 100 μl von 500 Spendern vereint, dann ergibt das ein Volumen von 50 ml. Werden diese durch Ultrazentrifugation konzentriert, dann wird über die Kopräzipitation von anderen Blutkomponenten ein Präzipitat von etwa 500 μl erhalten. Aus mechanischen Gründen können hiervon wieder nur 25 μl für den PCR-Test eingesetzt werden. Sind in einem der Plasmen 104 HBV pro ml vorhanden, wie oben kalkuliert, dann wären in den 25 μl des Präzipitates 100 Genome vorhanden, also theoretisch nachweisbar. Da aber noch eine Verdünnung durch das Aufschließen des Präzipitates erfolgt, die mit etwa vierfach anzusetzen ist, wird sich der Nachweis auf 25 Genome beschränken. Bei angenommener Virämie von 10³ genomhaltigen HBV-Partikeln pro ml oder darunter könnte ein falsch-negatives Ergebnis erhalten werden; ebenso wenn, wie oben diskutiert, die Primerbindung durch Änderung der Nukleinsäuresequenz nicht optimal ist [1].

HCV

Die Problematik der Virämie beim HCV ist, daß selten mehr als 10⁵ HCV-Partikel pro ml erreicht werden [10] und zumindeste gegenüber anderen Nukleinsäuretests mit der PCR die beste Empfindlichkeit erreicht wird [11]. Wenn während der frühen Serokonversion geringere HCV-Mengen vorhanden sind, auch bei angeheurer Antikörperproduktion im 2. Monat nach Infektion, dann sieht die Rechnung so aus wie beim HBV beschrieben, mit der Änderung, daß nur ein RNA-Genom pro Viruspartikel vorhanden ist [11]. Ein Poolen wird also nur bei 1 in 50 vertretbar sein, sicherer ist die PCR-Analyse aus der Einzelspende. Da HCV sich in der Lipoproteinfraktion des Plasmas befindet, kann es teilweise durch Ultrazentrifugation nicht konzentriert werden.

Die angenommene, testmäßig nicht erfaßte HCV-Prävalenz unter deutschen Blutspenden beträgt mit Tests der dritten Herstellergeneration 1 in 30000, und so hat die HCV-PCR bei 5 oder 50 gepoolten Blutspenden durchaus noch Bedeutung, die aber – abhängig von der Virämie des kontaminierten Spenders – bei 500 gepoolten Spenden vernachlässigbar wird. Auf die HCV-Genom-Divergenz aufgrund der verschiedenen Typen und die dadurch bedingte mögliche Sensitivitätsminderung der PCR sei an dieser Stelle hingewiesen, so daß die kleinere Poolgröße immer zu bevorzugen ist.

HIV

Während der Serokonversion schwankt die Virämie zwischen 10² und 10⁶ Partikeln pro ml. Je höher die Virämie, um so ausgeprägter sind auch die klinischen Symptome, und so ist für die Sicherheit der Blutspenden die geringe Virämie die bedeutende Bezugsgröße. Nachdem im HIV-Partikel zwischen 2 und 8 RNA-Moleküle zu finden sind [7], kann die für HBV aufgestellte Rechnung übernommen werden; d.h., ein Poolen über 5 bzw. 50 Spenden bringt die PCR sehr schnell an die Grenze der Sensitivität. Wie beschrieben, sind die Variabilität im Genom und die Vielfalt der Subtypen bei HIV-1 sowie das HIV-2 ein weiteres ungelöstes Problem der PCR.

Generelle Probleme der PCR

Die PCR ist keine «allmächtige», kontaminationsfreie Methode und auch anfällig gegen Störungen. Die Grenzen der Primerbindung und die Variabilität der Genome wurden beschrieben. Die Kontaminationsgefahr der PCR kann durch enzymatische Spaltung der Amplifikate vermindert, aber nicht beseitigt werden. Kontaminationen gehen auch von den Positivkontrollen aus, die bei jedem Ansatz mitbenutzt werden [12]. Laborirrtümer sind bei diesen Größenordnungen die häufigsten Fehler [13]. Bisher wurde nur die Sensitivität der PCR diskutiert. Auch bei der PCR ist die Spezifität ein Problem: Wenn die Temperatur für das

Anbinden der Primer nicht optimal gewählt wird, besteht bei den drei erwähnten Virusarten die Gefahr, daß menschliche DNA-Abschnitte mitamplifiziert werden und das Ergebnis falsch-positiv wird. Ein weiterer Störfaktor bei der PCR ist die zusammen mit der Virus-RNA/DNA in der Probe vorhandene menschliche DNA. Je höher der Gehalt menschlicher DNA bezogen auf die virale ist, um so weniger sensitiv wird die PCR. Auch diese Störgröße beeinflusst die Menge an Plasmen, die gepoolt werden können. Letztlich ist eine sichere Erkennung von viraler DNA in einem

Editorial

InfusionstherTransfusionsmed 1996;23:4-6

5

Pool nur möglich, wenn geeignete Belastungskontrollen (Speziken einer Probe des Pools) mitanalysiert werden. Mit Hilfe käuflicher Tests kann Kontroll-DNA von viraler DNA bisher nur in Ausnahmefällen unterschieden werden.

Kosten-Nutzen-Relation

Wenn mit der Einführung der PCR ein erhöhter Sicherheits-beitrag für (besser gegen) die Infektiosität der Spenden geleistet werden soll, dann ist zu berücksichtigen, daß die PCR bisher sehr personalintensiv und materialkostenträchtig ist. Wenn die Durchführung einer PCR mit 500,- DM bei ge-poolten Proben angesetzt wird, dann kommen auf die Blut-spendedienste und Plasmapheresezentren bei Pools von 1 in 50 und angenommenen 5 Millionen Spenden 105×500 DM an Kosten zu, bei drei Virusarten dreifach zu rechnen. Für 150 Millionen DM können dann bei HBV theoretisch bis zu 50 Infektionen verhindert werden, bei HCV bis zu 200 und bei HIV 1 bis 2. Nachdem aber 90% der Transfusionsempfänger mehr als eine Spende erhalten, fünftelt sich der angegebene Wert [14]. Die Hälfte der Transfusionsempfänger erliegt innerhalb eines Jahres ihrem Grundleiden [15], so daß die wirklich verhinderten Infektionen für HBV mit 4, für HCV mit 17 und für HIV mit null anzusetzen sind. Die Berechnung fußt auf einer 100% - Erfassung aller kontaminierten Spenden, die allerdings wieder nur gegeben ist, wenn die PCR in der Einzel-spende und nicht im Pool durchgeführt wird, dann stimmen aber die berechneten Kosten nicht.

Bleibt man beim erwähnten Beispiel und legt die 150 Millionen DM auf 5 Millionen Spenden um, dann würde sich der Preis einer Einheit um 30,- DM erhöhen, und es sollte nochmals angezweifelt werden, ob eine zuverlässige PCR für diesen Preis durchzuführen ist. Wie beim p24-Antigentest zur Verhinderung einer HIV-Infektion im Blutspendewesen diskutiert, sollte auch beim Beispiel der PCR hinterfragt werden, ob das dafür notwendige Geld nicht besser für eine sichere Spender-selektion oder für eine Impfung der Bevölkerung gegen HBV verwendet werden kann. Bei 80 Millionen Einwohnern und einer Impfdosis von 30,- DM wären das Ausgaben von 240 Millionen DM pro Impfzyklus, die allerdings nach der dritten Impfung, d. h. nach einem Jahr, beendet wären.

Nebenaspekte der Einführung der PCR

Die Kosten für die PCR werden in den kommenden Jahren fallen, und die Reaktivität der Primer zur Erfassung aller Nukleinsäuren von HBV-, HCV- und HIV-Varianten wird gesteigert werden. Unter diesem Aspekt ist zu bedenken, ob die Einführung der PCR Anfang 1996 nicht zu früh ist, d. h. mit großen Kosten zu wenig Zugewinn an Sicherheit erzielt wird. Dauerhaft ist vom Sicherheitsstandpunkt aus zu fordern, daß die PCR, wie die serologischen Tests auch, in jeder Einzel-spende durchgeführt werden – es sollen Infektionen über die PCR sicher verhindert werden!

Schließlich gilt wie bei anderen viralen Tests auch, daß die Ankündigung hochempfindlicher Tests im Blutspendebereich die Gefahr mit sich bringt, daß Menschen nach Risiko zum Erwerb einer Infektion und mit dem Wunsch zur schnellen Abklärung angezogen werden, weil sie auf dem Weg über die Blutspende schneller Sicherheit erlangen. Solange nicht außerhalb des Blutspendebereiches Tests mit gleicher Empfindlichkeit und zu einem annehmbaren Preis angeboten werden, kann das Streben nach erhöhter Sicherheit zum Gegenteil führen.

Literatur

Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R: Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet* 1995;345:1406-1407.

Kaneko S, Miller RH, DiBisceglie A, Feinstone SM: Hepatitis B virus detection and comparison with hepatitis B surface antigen. *Gastroenterology* 1990; 25:57-61.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH: At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8234-8238.

McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett FAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkari-nen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi GA, Heijns M, Kiyokawa H, Fukada K, Cuypers T, Saced AA, Al-Rasheed AM, Lin M, Simmonds P: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994;32:884-892.

Lau JYN, Simmonds P, Urdea MS: Implications of variations of 'conserved' regions of hepatitis C virus genome. *Lancet* 1995;346:425-426.

Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C: Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994;66:122-129.

Bourinbaier AS, Nagorny R, Tan X: Heaviness of HIV particles in quantum relation to viral infectiousness and responsiveness to interferon; in Anderson JM (ed): *Viral Quantitation in HIV Infection*. Libbey Eurotext, Paris, 1991;pp 41-52.

Gürtler LG: Bestimmung der Virusmenge von HIV im Blut und ihre Wertigkeit zur Messung der Effektivität von antiretroviraler Therapie. *AIDS-Forschung* 1995;10:655-659.

Ercoli L, Sarmati L, Suwaf GE, Cochi S, Lanti T, Indicone P, Guglielmetti M, Giannini G, Galuzzo C, Tomino C, Andreoni M, Vella S: Plasma viremia titration and RNA quantitation in ICD-p24 negative HIV type-1-infected patients. *AIDS Res Hum Retro-viruses* 1995;10:1203-1207.

Lau JYN, Mizokami M, Ohno T, Diamond DA, Kniffen J, Davis GL: Discrepancy between biochemical and virological responses to interferon- α in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993;342:1208-1209.

Poel CLVD, Cuypers HT, Reesink HW: Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994;344:1475-1479.

Kwok S, Higuchi R: Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-238.

Lackritz EM, Satten GA, Grasse JA, Dodd RY, Rajmundi VP, Janssen RS, Lewis F, Notari EP, Petersen LR: Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in United States. *N Engl J Med* 1995;333:1721-1725.

Vamvakas EC, Taswell HF: Long-term survival after blood transfusion. *Transfusion* 1994;34:471-477.

Cumming PD, Wallace EL, Schorr JB, Dodd RY: Exposure of patients to human immunodeficiency virus through the transfusion of blood components that test antibody-negative. N Engl J Med 1989; 321:941-946.

InfusionstherTransfusionsmed 1996;23:4-6

Gürtler

$\frac{3}{4}1\frac{7}{8}SiS\ddot{a}\frac{3}{4}S\frac{3}{8}i\frac{3}{8}\frac{3}{8}SSBiSc$

...ist der Marken-Begriff

für Festphasen-Immunassays und hat seine Reputation durch seine Qualität weitweit millionenfach bewiesen: hoch

empfindlich

■ blit«-H

ee^

Oa%

und extrem

-Set

dv

.\OφV

dN

^e*

\\i

er $\frac{7}{8}^o$

und ganz; l, sehr

NoW

/, 0e\s«‘4pS „,tifcö < p·

wλío-

ZüV

,teΓf»

tÜ $\frac{3}{8}$

und gut

Testen

f

: $\frac{1}{8}$

üΓ»C

> /\n $\frac{3}{8}$ -e^o •,p $\frac{7}{8}\frac{1}{8}$

b°iS’ u\ »t U

, $\frac{3}{8}\frac{1}{8}$ oΓ^-

eΠ ace $\frac{1}{8}$ ’

Sie die Vorteile des Capture-Systems. Rufen Sie an.

ro

■ - $\frac{1}{8}$ - $\frac{5}{8}$.. ? ■ ■ ■ ”

⋮ > • ■ •

1 ■ “W

1 ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■