

Nukleinsäureextraktion für den hochsensitiven Virusnachweis

Der molekularbiologische Nachweis transfusionsassoziiierter Viren wie Hepatitis B und C sowie HIV beim Screening von Blutspenden erfordert hocheffiziente Technologien zur Nukleinsäureextraktion. Das chemagic Magnetic Separation Module I erlaubt erstmalig die gleichzeitige Separation von DNA und RNA aus großen Probenvolumina bis zu zehn Millilitern.

DR. RER. NAT. KNU
T GUBBE, STEFFI GROSCH



Das chemagic Magnetic Separation Module I eignet sich für Proben von 10 ml bis 10 µl.

Die Virussicherheit von Blut und Blutprodukten hat in Deutschland mit der Einführung von molekularbiologischen Nachweismethoden einen Stand erreicht, der das Restrisiko einer Infektion mit transfusionsassoziierten Erregern wie

K. Gubbe, S. Grosch, DRK-Blutspendedienst Sachsen gGmbH, Institut für Transfusionsmedizin Plauen, 08529 Plauen

Tabelle 1: Ergebnisse der Untersuchungen zur HCV- und HIV-Sensitivität

Virustiter in 9,6ml (IU)	Positive Teste/ Gesamtzahl Teste HCV	Positive Teste/ Gesamtzahl Teste HIV
1000	6/6	6/6
500	6/6	6/6
250	6/6	6/6
125	6/6	3/6
63	6/6	5/6
31	5/6	3/6
16	4/6	0/6
8	3/6	1/6
95% cut off	48,4 IU im Pool	317,6 IU im Pool
CI	16,6 IU–140,9 IU	109,7 IU–919,6 IU
Analytische Sensitivität	5 IU/ml	33 IU/ml
Analytische Sensitivität Routine-NAT	9,9 IU/ml	29,7 IU/ml

z.B. HCV oder HIV nur noch theoretisch erscheinen lässt. Mehrere Jahre, bevor die Testung aller Blutspenden auf das Hepatitis-C-Virus und das Humane Immundefizienz-Virus-1 mittels Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) durch das Paul Ehrlich-Institut in Deutschland verbindlich festgelegt wurde (1999 und 2004), haben verschiedene Blutspendedienste nach dem Vorbild der plasmaverarbeitenden Industrie ihrer Verantwortung für das Wohl der Empfänger von Blutprodukten Rechnung getragen und selbst entwickelte, nichtkommerzielle NAT-Teste zum Nachweis von HCV, HIV und auch HBV zum Einsatz gebracht.

Einzelprobenentestung

Lange Zeit ist es nicht gelungen, kommerzielle NAT-Teste, die den Anforderungen an das Screening in einem Blutspendedienst entsprechen und zur Bearbeitung mehrerer hundert oder tausend Blutproben am Tag verwendet werden können, zu etablieren. Deshalb haben „in-house“-NAT-Testsysteme in Deutschland weite Verbreitung gefunden und werden heute zum Screening eines Großteils der Blutspenden in Deutschland eingesetzt. Die NAT-Testung von Blutspenden zum Virusnachweis kann, aufgrund der im Vergleich zu anderen Labormethoden geringen Automatisierung, nicht an der Einzelprobe erfolgen. Es wurden spezielle Strategien zur Testung von Blutproben in einem Pool von bis zu 96 Einzelproben etabliert. Diese Pooltestung von Probenaliquots verringert den Aufwand beträchtlich, hat aber

den Nachteil, dass die Menge des eingesetzten Probenmaterials begrenzt ist. Üblich sind Volumina von 100 µl pro Blutprobe. Da mit dem Volumen auch die in den Pooltest eingebrachte Virusmenge im Vergleich zu einer Einzeltestung geringer ist, werden hohe Anforderungen an die Sensitivität molekularer Virusnachweismethoden im Blutspendenscreening gestellt.

Testqualität

Die theoretische Sensitivität von Nukleinsäureamplifikationstechniken, wie die der PCR, liegt bei einem bis fünf DNA-Molekülen und beträgt bei der RT-PCR etwa zehn RNA-Moleküle pro Ansatz.

Die PCR- bzw. RT-PCR-Assays sind heute derart optimiert, dass im Bereich der theoretischen Nachweisgrenze detektiert werden kann. Eine Steigerung der Sensitivität von NAT-Testen ist deshalb hauptsächlich durch die Verbesserung der Effizienz und Qualität der Extraktion der Nukleinsäuren zu erreichen. Neben einer maximalen Ausbeute ist die Beseitigung aller NAT-inhibierenden Substanzen von großer Bedeutung. Die Extraktionsausbeute der Nukleinsäuren kann durch den Einsatz großer Probenvolumina, wie des gesamten Poolvolumens von 96 mal 100 µl in die Extraktion oder durch die Nutzung Viruskonzentrierender Schritte wie der Ultrazentrifugation oder der Magnetic-Bead-Technologie verbessert werden.

Automatische Extraktion

Um die Leistungsfähigkeit des automatischen Nukleinsäure-Extraktionsmoduls

und dessen Kompatibilität zu der im DRK Blutspendedienst Sachsen gGmbH eingesetzten Virus-NAT zu überprüfen, wurden anhand von Verdünnungsreihen der WHO-Virusstandardpräparationen für HCV (96/790), HIV (97/656) und HBV (97/746) insgesamt mehr als 100 Tests durchgeführt.

Tabelle 1 und 2 zeigen die Resultate der Untersuchungen. Die Zahl positiver Tests je durchgeführter Teste und Virusparameter sind dargestellt. Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die erreichte analytische Sensitivität der NAT-Tests bei Verwendung des chemagic Magnetic Separation Module I zur Extraktion von Virusnukleinsäuren aus 9,6 ml Plasma, vergleichbar ist mit der in der Routinetestung etablierten Methode, die auf Virusanreicherung mittels Ultrazentrifugation beruht. Die durch Probitanalyse errechneten 95% cut offs für HCV (48,4 IU/Pool bzw. 484 IU/ml der Einzelspende) und HIV (317,6 IU/Pool bzw. 3176 IU/ml der Einzelspende) liegen deutlich unter den vom Paul-Ehrlich-Institut festgelegten Mindestsensitivitäten für das NAT-Screening von Blutspenden, die 10 000 IU für HIV bzw. 5 000 IU für HCV pro Milliliter der Einzelspende betragen.

Insbesondere die hohe Sensitivität der HBV-NAT bei Extraktion mit dem neuen System muss hervorgehoben werden. Da in der frühen Phase einer HBV-Infektion die Virustiter sehr niedrig sind, ist ein hochsensitiver Test von großem diagnostischen Nutzen. Auch niedrig-virämische Blutspenden können so mit größerer Sicherheit nachgewiesen werden. Die An-

Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchungen zur HBV-Sensitivität

Virustiter in 9,6 ml (IU)	Positive Tests/Gesamtzahl Tests HBV
100	6/6
50	6/6
25	6/6
12	6/6
6	6/6
3	7/10
1,5	6/10
0,75	3/10
95% cut off	6,6 IU im Pool
CI	2,6 IU-16,2 IU
Analytische Sensitivität	0,69 IU/ml
Analytische Sensitivität Routine-NAT	1,1 IU/ml

zahl der durchgeführten Messungen wurde auf sechs bis zehn Wiederholungen pro Verdünnungsstufe beschränkt und ist im Vergleich zu einer vollständigen Validierung eines NAT-Testes mit mindestens 24 Wiederholungen pro Verdünnungsstufe deutlich kleiner. Deshalb können die ermittelten Werte zur Sensitivität nur Näherungen darstellen.

Zusammenfassung

Die Bedienung des Gerätes ist unkompliziert. Der Wartungsaufwand ist gering, da keine Pipettierschritte durch den Automaten selbst durchgeführt werden. Die Be-

arbeitung von zwölf Proben bis maximal 10 ml erfolgt in ca. 1,2 Stunden bei Anwendung des Virusprotokolls. Durch geringe Änderungen am Gerät können alternativ 96 Proben im Mikrotiterplattenmaßstab bearbeitet werden. Bei entsprechenden Untersuchungen konnten keine Kreuzkontaminationen festgestellt werden.

Das chemagic Magnetic Separation Module I der Firma chemagen stellt eine sehr gute Alternative zu bestehenden Nukleinsäureextraktionsmethoden dar. Darüber hinaus steht damit ein automatisiertes System zur Verfügung, das die Bearbeitung von bis zu zehn Milliliter Plasma ermöglicht. Die hohe Effizienz dieser neuen Extraktionsmethode macht die Virusanreicherung mittels Zentrifugation als probenintern begrenzt kontrollierbaren Arbeitsschritt überflüssig und erhöht damit die Sicherheit beim Nachweis von transfusionsassoziierten Viren. LP

Weitere Informationen:

www.laborpraxis.de

152270

- Der Kontakt zum Blutspendedienst Sachsen
- Weitere Informationen zum chemagic Magnetic Separation Module I
- Paul-Ehrlich-Institut über die Sicherheit von Blutprodukten

Fax: + 49 (0 24 01) 8 05 - 5 19