

Empfehlungen zur qualitätsgesicherten Durchführung von Nukleinsäure-Amplifikations-Testungen (NAT) von Blutprodukten

Quality assurance in nucleic acid amplification testing (NAT) of blood products

Willi K. Roth*

Institute of Transfusion Medicine and Immunohematology, German Red Cross, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt, Deutschland

Zusammenfassung

Die Nukleinsäure-Amplifikations-Testung (NAT) von Blutprodukten wurde Mitte der 90er Jahre von europäischen Plasma verarbeitenden Firmen und großen deutschen Blutspendediensten entwickelt. Primäres Ziel war eine verbesserte Sicherheit von Blutprodukten, indem das so genannte diagnostische Fenster nach einer Virusinfektion bis zum ersten Nachweis von Antikörpern so weit wie möglich geschlossen werden sollte. Bei einer qualitätsgerechten PCR kommen bereits der Probenentnahme, dem Probentransport sowie der Probenlagerung große Bedeutung zu, da vermieden werden muß, daß es durch ungeeignete Antikoagulanzen oder Entnahmetechniken zu einem Sensitivitätsverlust kommt oder daß Kontaminationen falsch positive Ergebnisse hervorrufen. Wird ein Pooling von Proben durchgeführt, ergibt sich ein Verdünnungsfaktor, weshalb darauf zu achten ist, dass gegebenenfalls nachfolgende Anreicherungs-schritte für Viren, wie z.B. eine Zentrifugation, implementiert werden. Der Gesamtprozeß von Pooling und Virusanreicherung ist ebenso wie die Probenvorbereitung durch geeignete Maßnahmen zu validieren und durch Qualitätssicherungsmaßnahmen zu flankieren. Die in der Extraktion der viralen Nukleinsäuren verwendeten Reagenzien sollten im Laboralltag möglichst einfach zu handhaben sein, keine Gefährdung des Laborpersonals darstellen und die Virus-Nukleinsäure gleichzeitig mit höchster Effizienz freisetzen und in sehr hoher Reinheit für die anschließende Amplifikation bereitstellen. Qualitätssicherungsmaßnahmen sollen hier sowohl die geforderte Effizienz des Prozesses

sichern als auch verhindern, daß es in dieser kritischen Phase zu Kontaminationen kommt. Zur Amplifikation stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei die PCR, insbesondere bei inhouse-Systemen, die weiteste Verbreitung gefunden hat. Der Prozeß der Amplifikation sollte möglichst im geschlossenen System erfolgen, wie dies z.B. in Real-time PCR-Systemen die Regel ist, ohne daß das Reaktionsgefäß während oder nach dem Amplifikationsprozeß geöffnet werden muß. Dies gewährleistet eine hohe Sicherheit vor Kontaminationen durch freigesetzte Amplifikate. Im Blutspendewesen ist es von höchster Bedeutung, daß negative Ergebnisse tatsächlich negative Blutspenden anzeigen. Interne Kontrollen, die eine korrekte Funktionsweise jeder individuellen PCR signalisieren, sollten deshalb in jeder Reaktion mitgeführt werden. Neben internen Kontrollen sind externe Negativ- und Positiv-Kontrollen mitzuführen, um falsch positive Reaktionen nachzuweisen bzw. auch die vor der PCR liegenden Prozesse wie Virusanreicherung und Extraktion zu überwachen. Alle Prozesse sind nach den von den Behörden festgelegten Kriterien durchgängig zu validieren, und es ist routinemäßig an externen Qualitätskontrollmaßnahmen (Ringversuchen) teilzunehmen.

Schlüsselwörter: Blutpräparate; Nukleinsäure-Amplifikations-Testung (NAT); Qualitätssicherung; Validierung.

Abstract

European manufacturers of plasma products and German blood transfusion services were the first to introduce nucleic acid amplification testing (NAT) of blood products in the mid-1990s. Their primary goal was to increase the safety of blood by closing as far as possible the diagnostic window, which exists after the onset of viral infection until the appearance of the first detectable antibodies. Sample preparation, transport and storage are crucial steps in a quality-controlled PCR. Sensitivity and contamination rates highly depend on the sample preparation and storage techniques. Anticoagulants must be selected carefully because some may inhibit the PCR. Dilution of samples by pooling needs to be consid-

*Korrespondenz: Prof. Dr. med. W. K. Roth, Institute of Transfusion Medicine and Immunohematology, German Red Cross, Johann Wolfgang Goethe University, Sandhofstr. 1, 60528 Frankfurt am Main, Deutschland
Tel.: +49 (0)69/6782-251
E-mail: wroth@bsdhessen.de

ered and should be compensated for by subsequent virus enrichment procedures, e.g. centrifugation. The whole process of sample preparation, pooling and virus enrichment must be validated and quality control measures must be implemented. Reagents for the extraction of viral nucleic acids should not pose any risk to the laboratory staff. Nevertheless, the reagents should be highly efficient in liberating viral nucleic acids at high yield and purity for the following amplification reactions. At this critical stage, quality control measures should guarantee an efficient extraction process and contain potential sources of contaminations. Several methods are available for the amplification of nucleic acids. PCR is the most common, especially in in-house assays. The amplification of nucleic acids should be performed as far as possible in a closed system, which may be guaranteed best by real-time PCR approaches. Reaction tubes need never be opened during the amplification because detection can be performed through the closed tube. Amplicons that could contaminate the following PCR reactions will not be released. It is of great importance to blood transfusion services to guarantee that negative results unequivocally indicate virus negative blood donations. Therefore, internal control sequences should be implemented in each individual PCR reaction in order to monitor that the individual PCR has worked correctly. Besides internal control sequences, external negative and positive controls should be implemented in each PCR run to demonstrate false positive reactions as well as to monitor pre-PCR processes like virus enrichment and extraction. The whole process needs to be validated according to the criteria set in national guidelines or by national authorities. External quality assessment programs are highly recommended.

Keywords: blood components; nucleic acid amplification testing (NAT); quality assurance; validation.

Einleitung

Die Nukleinsäure-Amplifikations Testung (NAT) von Blutprodukten wurde zunächst Mitte der 90er Jahre von europäischen Plasma verarbeitenden Firmen als Qualitätskontrollmaßnahme für Plasmaprodukte initiiert. 1996–1997 führten deutsche Blutspendedienste weltweit als erste NAT von zellulären Blutkomponenten wie Erythrozyten und Thrombozyten mit dem Ziel ein, die gleichen Qualitätsanforderungen bezüglich aller bei den Blutspendediensten hergestellten Blutpräparate zu etablieren. Die Tatsache, dass zelluläre Blutkomponenten nach wie vor nicht Virus-inaktiviert werden können, war für die Bemühungen ausschlaggebend.

Erschwert wurde die frühzeitige Einführung in Deutschland dadurch, dass zur damaligen Zeit keine kommerziellen Tests zur Verfügung standen, die den Anforderungen einer Blutspende-NAT auch nur halbwegs entsprochen hätten. Diejenigen Blutspendedienste, wel-

che die Pionierrolle übernommen hatten, mussten entweder mit externen Laboratorien zusammenarbeiten, um die Technologie zu etablieren, oder selbst sehr große Energie dazu verwenden, in ihren eigenen Häusern die Technologie mit so genannten "In-Haus-Testen" einzuführen. Erst aufgrund des Erfolges in der täglichen Routinepraxis passten grosse Firmen wie Roche und Chiron kommerzielle Systeme für die Routine-NAT an die Anforderungen im Blutspendewesen an. Trotzdem ist bis zum heutigen Tage kein kommerzieller Anbieter in der Lage, ein wirklich durchdachtes und speziell auf die Bedürfnisse von Blutspendediensten zugeschnittenes Testsystem anzubieten, das all den oben angeführten Anforderungen genügt. Nach wie vor bieten In-Haus-Systeme gegenüber kommerziellen Systemen deutliche Vorteile. Allerdings müssen sie nicht nur allen Grundanforderungen einer NAT im Blutspenderscreening entsprechen, sondern auch den hohen Qualitätsanforderungen, die an kommerzielle Tests gestellt werden. Kommerzielle Tests, die bezüglich Pooling, Anreicherung und Extraktion angepasst werden müssen, sind nach Auffassung der Aufsichtsbehörde PEI analog zu In-Haus-Systemen zu validieren.

Die Anforderungen an die Technologie der NAT von Blutpräparaten können folgendermaßen zusammengefasst werden:

- höchstmögliche Sensitivität
- höchstmögliche Spezifität
- höchstmöglicher Durchsatz
- höchstmögliche Geschwindigkeit
- bestmögliche Einpassung in die Routineabläufe
- geringster Aufwand
- geringste Kosten.

Die zentrale Anforderung an die NAT im Blutspendewesen ist es, das so genannte diagnostische Fenster so weit wie möglich zu schließen. Es handelt sich hierbei um die Zeitspanne vom Beginn der Virämie nach einer Virusinfektion bis zum ersten positiven Nachweis von Antikörpern gegen das jeweilige Virus. Diese Zeitspanne ist von Virus zu Virus unterschiedlich lang und hat neben der Inzidenz entscheidenden Einfluss auf den Ertrag der jeweiligen Virus-NAT und somit auf deren Kosten-Nutzen-Verhältnis. Neben der Länge des diagnostischen Fensters ist für die Effizienz und den Nutzen der NAT entscheidend, wie schnell ein Virus repliziert, das heißt, wie schnell die Konzentration der Viren im Blut nach Infektion auf messbare Werte ansteigt. Da diese Werte bei den verschiedenen transfusionsrelevanten Viren sehr unterschiedlich sind, spielt die erreichbare Sensitivität der jeweiligen Virus-NAT eine entscheidende Rolle für deren Fähigkeit, das diagnostische Fenster mehr oder weniger weit zu schließen. So ist das Hepatitis C-Virus mit einer hohen Replikationsrate und einem raschen Anstieg der Viruslast im Blut dem NAT-Nachweis leichter zugänglich als zum Beispiel HIV oder HBV mit einer niedrigen Verdoppelungsrate und einem sehr langsamen Anstieg der Viruskonzentration im Blut.

Konsequenterweise wurde deshalb die HCV NAT bereits im April 1999 in Deutschland vom Paul-Ehrlich-Institut angeordnet. Erst im April 2004 ordnete das Institut auch an, alle Blutprodukte mit Hilfe der NAT auf HIV-1 zu testen. Da nach wie vor technische Schwierigkeiten bei der HBV-NAT bestehen und für das weitere signifikante Schliessen des diagnostischen Fensters angesichts sehr sensitiver HBsAg-Screeningtests nur eine geringe Effizienz erwartet wird, erwägt das Paul-Ehrlich-Institut eine Anordnung auf HBV-NAT zunächst nicht.

Unabhängig davon gelten die im Nachfolgenden beschriebenen Anforderungen an Qualitätssicherungsmaßnahmen für alle derzeit von den meisten Blutspendediensten in Deutschland getesteten Viren: HCV, HIV-1, HBV sowie Parvovirus B19 und HAV. Die beiden letztgenannten Viren sind insbesondere für Blutplasmaprodukte relevant, da sie trotz Inaktivierung z.B. Gerinnungspräparate kontaminieren können, die aus diesen Plasmen hergestellt werden.

Pre-NAT

Probenentnahme

Im Rahmen einer qualitätsgesicherten NAT hat die Probenentnahme einen sehr hohen Stellenwert. Bei der Blutspende ist es dringend zu empfehlen, ein separates Röhrchen mit Blut speziell für die NAT in einem geschlossenen System zu entnehmen. Das NAT-Röhrchen kann zwar nach Durchführung der NAT für andere Nachfolgetests herangezogen werden, der umgekehrte Weg ist jedoch obsolet, da häufig z.B. in der Blutgruppenbestimmung oder auch in der serologischen Diagnostik keine Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden und diese, wenn sie verwendet werden, in der Regel nicht gegenüber Aerosolen geschützt sind. Bei der Entnahme ist darauf zu achten, dass nur solche Antikoagulanzen eingesetzt werden, die keine Inhibition der PCR bewirken. Heparin ist ein bekannter Inhibitor der PCR und daher für die Virus-NAT im Blutspendewesen nicht geeignet. Unabhängig davon müssen alle Antikoagulanzen, wie z.B. EDTA oder Zitrat, ebenso validiert werden, wie wenn stattdessen Serum eingesetzt würde. Es gibt Berichte in der Literatur, wonach Serum im Vergleich zu EDTA- oder Zitrat-Plasmen bei manchen Viren zu einem Sensitivitätsverlust der NAT führen kann [1]. Bereits bei der Entnahme, und dies ist im Blutspendewesen Stand der Technik, muss das Röhrchen eindeutig durch einen Barcode gekennzeichnet werden. Diese Kennzeichnung muss jederzeit dem Spender zugeordnet werden können und während des gesamten Prozesses rückverfolgbar sein.

Probentransport und -lagerung

Der Transport der Probe und die Lagerung sind kritische Parameter und müssen exakt überwacht werden. Beim Transport sind die entsprechenden Umgebungsbedin-

gungen, insbesondere die Temperatur, korrekt einzuhalten. Diese Bedingungen in Verbindung mit der Dauer der Lagerung bis zur Trennung von Plasma und den zellulären Bestandteilen müssen ausreichend validiert werden. Nach unseren Erfahrungen sind zumindest HCV- und HIV nach der Entnahme bei 4°C für 24 Stunden stabil. Innerhalb dieser Zeit muss das Plasma von den Zellen getrennt werden, z.B. durch den Pooling-Prozess. Im abgenommenen Plasma sind die Viren bei 4°C eine Woche stabil. Das Einfrieren der Proben zusammen mit den Zellen kann zu Sensitivitätsverlusten führen, da beim Auftauen der Proben austretendes Hämoglobin die PCR inhibieren könnte.

Entstöpseln und Zentrifugation

Das Entstöpseln der Proben kann manuell oder mit entsprechenden Automaten durchgeführt werden, wobei darauf zu achten ist, dass beim Entstöpseln gerade bei Vakuumröhrchen keine Spritzer oder Aerosole entstehen, die Nachbarröhrchen kontaminieren können. Die Zentrifugation der Probenröhrchen, die vor der Entstöpselung erfolgt, dient der Abtrennung der zellulären Bestandteile vom Plasma oder vom Serum und sollte nach den üblichen Bedingungen wiederum möglichst bei 4°C und nicht höher als bei Raumtemperatur erfolgen. Dieser Prozess kann kritisch sein, da hier z.B. bei sehr fetthaltigen Proben durchaus Sensitivitätsverluste durch einen aufschwimmenden Fettpfropf und Schwierigkeiten bei der weiteren Probenprozessierung, z.B. im Pooling, auftreten können. Es empfiehlt sich, solche Proben visuell genau zu verfolgen und gegebenenfalls auszusondern. Das Gleiche gilt für hämolytische Proben oder teilgeronnene Proben.

Pooling

Aufgrund der hohen Anzahl von Spenderproben, die in vielen großen Blutspendediensten mit Hilfe der NAT zu prozessieren sind, haben sich Pooling-Verfahren etabliert, bei denen bis zu maximal 96 Proben zusammengefasst und gemeinsam getestet werden. Dieses Pooling kann zwar bei kleinen Probenzahlen noch in überschaubarer Art und Weise manuell geschehen, bei größeren Probenzahlen und im Sinne der Sicherheit und Rückverfolgbarkeit ist jedoch ein Pipettierautomat vorzuziehen. Der gesamte Pooling-Prozess muss wiederum unter den entsprechenden Umgebungsbedingungen ablaufen (überwachte Raumtemperatur), wobei für diesen und den nachfolgenden Prozess die Etablierung eines QM- und QS-Systems dringend zu empfehlen ist.

Die Pipettierautomaten haben in der Regel Systeme, die Pipettier-Fehler detektieren und entsprechend am Bildschirm anzeigen. Auch werden bei den üblichen Automaten Pipettier-Fehler, sofern vom System registrierbar, in so genannte Log-Dateien eingetragen, die später ausgewertet werden können. Jeder Clot-Fehler birgt das Risiko, dass nicht genügend Volumen der Ein-

zelprobe in den jeweiligen Pool hinein pipettiert wird. Eine strikte Kontrolle ist unbedingt erforderlich. Als einfache Qualitätssicherungsmaßnahme reicht es aus, den Pool in gradierten Röhrchen zu bilden und anhand des Füllstandes visuell zu prüfen, ob ausreichend Material in die Pool-Röhrchen pipettiert worden ist. Insbesondere ist darauf zu achten, ob anstelle von Plasma oder Serum Erythrozyten in den Pool gelangt sind, die zu einer Reduktion des individuellen Probenvolumens führen würden und potentiell Inhibitoren (Hämoglobin) in die Pool-NAT eintragen [2, 3]. Diese Fehler-Möglichkeit kann einfach dadurch überwacht werden, dass z.B. bei der gleichzeitigen Bildung von Rückstell- oder Poolauflösungsplatten neben der visuellen Kontrolle der Pool-Röhrchen auch eine visuelle Kontrolle der Rückstellproben bzw. der Pool-Auflösungsproben durchgeführt wird. Dies ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn die erste Portion in das Pool-Röhrchen und die Restportion auf die jeweilige Rückstell- oder Poolauflösungsplatte pipettiert wird. Das Überprüfen der Füllstände sowohl der Pool-Röhrchen als auch der jeweiligen Rückstell- oder Poolauflösungsplatten hat in unserem Hause bereits mehrfach dazu geführt, dass Pipettier-Fehler eindeutig aufgedeckt werden konnten, obwohl der Automat selbst keine Fehlermeldung anzeigte.

Prinzipiell ist es sinnvoll und empfehlenswert, eine Gewichtskontrolle der gebildeten Pools durchzuführen. Hierzu ist jedoch das unterschiedliche spezifische Gewicht von Serum bzw. Plasma gegenüber Wasser zu berücksichtigen, ebenso wie die Pipettier-Genauigkeit des Systems. Es kann bei geringer Pipettier-Genauigkeit präziser sein, den Füllstand visuell zu kontrollieren als die gebildeten Pools nachzuwiegen. Eine gute Alternative bieten neue Systeme, die die Abgabe in das Pool-Gefäß direkt kontrollieren, entweder durch Druckveränderung in den Pipettenspitzen oder durch online-Verwiegung des gebildeten Pools auf der Pipettiermaschine. Die Ergebnisse können ausgelesen und bei Abweichungen können entsprechende Maßnahmen getroffen werden.

Unabhängig davon sind die Pipettierautomaten im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle in ihrer Pipettier-Leistung und insbesondere, wenn Multi-Pipetting eingesetzt wird, immer mit Hilfe von entsprechenden Plasma- oder Serumproben zu validieren. Auch ist es sehr empfehlenswert, Einträge in die Log-Datei auszuwerten und die betroffenen Proben im Pool zu sperren. Dies geschieht bei uns automatisch durch Auslesen der Log-Dateien der Pipettierautomaten in das selbst entwickelte Pooling- und Pool-Auflösungs EDV-Programm.

Nach dem Pooling kann es nötig sein, einen weiteren Zentrifugationsschritt des Pools anzuschließen, wenn z.B. eine Virus-Anreicherung mit Hochgeschwindigkeitszentrifugation (1 h bei 58.000 g) folgt. In diesem Falle reduziert die Vor-Zentrifugation (10 min. bei 6.000 g) der Pools mit einer höheren Geschwindigkeit als bei der Zentrifugation der Primärprobenröhrchen die Menge der Restzellen und Zelltrümmer, die sonst nach Virus-Anrei-

cherung mit den Viren auf den Boden sedimentieren. Die Ausbeute der Nukleinsäureextraktion wird erhöht.

Bei einer nachfolgenden Virus-Anreicherung durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation müssen in der Regel die Pools umgefüllt werden, wobei auf die Kontinuität der Probenidentifikation zu achten ist. Selbstverständlich sind sowohl die Vor-Zentrifugation der Pools zur Abreicherung von Zellen und Zelltrümmern als auch die Hochgeschwindigkeitszentrifugation zur Anreicherung, d.h. Pelletierung der Viren, nach allen Kriterien zu validieren. Dies gilt für jedes einzelne Virus, da HCV z.B. als schwierig zu pelletierendes Virus gilt, das unter bestimmten Umständen sogar nach Zentrifugation aufschwimmen kann. Unser PCR-System wurde so eingestellt, dass selbst bei einem Verlust von 80% die Sensitivität der PCR ausreicht, um den Anforderungen des Paul-Ehrlich-Institutes mit 5.000 IU/ml Spenderplasma zu genügen.

Bei allen Pipettierprozessen, bei denen mit Probenmaterial gearbeitet wird, muss mit Aerosol-geschützten Einmalpipettenspitzen gearbeitet werden. Bei den Zentrifugationsschritten ist strikt darauf zu achten, dass keine Aerosole entstehen und bei Bruch von Röhrchen während der Zentrifugation müssen entsprechende Vorichtsmaßnahmen beim Öffnen der Zentrifugen und dem Entnehmen der intakten Röhrchen eingehalten werden.

Extraktion

Die Extraktion ist einer der wichtigsten Schritte im gesamten NAT-Prozess und verdient höchste Aufmerksamkeit bezüglich der Einhaltung qualitätssichernder Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamination und Verschleppung, sowohl bei manuellen als auch bei automatisierten Systemen. Wie alle vorausgehenden Schritte muss auch die Extraktion einzeln und im Gesamtsystem validiert werden. Für den Routine-Betrieb besonders geeignet sind Extraktionsverfahren, die mit relativ harmlosen Substanzen, z.B. chaotropen Salzen oder Detergenzien arbeiten und die nach Möglichkeit auf nicht-wässrige Lösungen wie z.B. Phenol und Chloroform verzichten. Organische Lösungen haben den Nachteil der Evaporation und der durch den entstehenden Dampfdruck schwierigen Handhabung beim Pipettieren. Es ist dringend zu empfehlen, bereits während der Lyse oder kurz danach die Extraktionseffizienz durch entsprechende Kontrollen zu überwachen (siehe unten). Bezüglich der Kontaminationsgefahr haben zurzeit keine der vorhandenen Systeme – ob manuell oder automatisiert – besondere Vor- oder Nachteile, solange die Qualitätssicherungsmaßnahmen eingehalten werden.

NAT

Für die Amplifikation der Nukleinsäure stehen verschiedene kommerzielle und In-Haus-Methoden zur Verfügung. Am weitesten verbreitet ist die PCR, die bei

In-Haus-Systemen zu 100% vorherrscht. Andere Systeme, wie z.B. die Transcription Mediated Amplification (TMA), benötigen häufig weniger Aufmerksamkeit bezüglich der Extraktion, da direkt nach der Lyse ohne aufwändige Reinigungsschritte die Amplifikation erfolgen kann. Bei der PCR ist jedoch sorgfältig darauf zu achten, dass die gewählte Extraktionsmethode mit der PCR kompatibel ist und nicht durch die Extraktion selbst (organische Lösungsmittel, Alkohol, etc.) Substanzen in die PCR verschleppt werden, die die Reaktion inhibieren.

Neben den verschiedenen Technologien der NAT können prinzipiell offene und geschlossene Systeme unterschieden werden. Offenes System heißt, dass während oder nach dem Amplifikationsprozess das Reaktionsgefäß z.B. für die Zugabe von weiteren Reagenzien oder zur Entnahme von Amplifikationsprodukten für die nachfolgende Detektion geöffnet werden muss. Durch diesen Prozess des Öffnens können wiederum Verschleppungen auftreten oder, viel bedeutender, aufgrund der Dampfbildung während der Denaturierung der PCR entstandene Aerosole mit Amplikons in die Umgebungsluft entweichen. Diese können sich in allen Vorstufen des Prozesses, in denen mit geöffneten Gefäßen gearbeitet wird, niederschlagen und so zu falsch positiven Reaktionen führen. Da offene Systeme zu Beginn der NAT-Technologie die Regel waren, wurde großer technischer und baulicher Aufwand betrieben, um solche Aerosol-Kontaminationen zu verhindern. Die räumliche Trennung der verschiedenen Bereiche der Probenvorbereitung, des Pooling, des Ansatzes der PCR-Mixe, der Extraktion und der Amplifikation muss strikt eingehalten und ggf. durch Unter-/Überdruckbelüftung abgesichert werden. Es war bisher unumgänglich, bezüglich des Arbeitsflusses eine klare Einbahnstrassen-Regelung einzuhalten; wer also im Extraktionsraum war, durfte nicht mehr zurück in den Raum, in dem die PCR-Reagenzien für die Mixe zusammengestellt wurden, und wer im Amplifikationsraum war, durfte am selben Tag in keinen der anderen Räume mehr zurückkehren.

Die neueren geschlossenen Systeme, die in der Regel auf so genannten Real-time-PCRs mit fluorogenen Sonden basieren, führen zu keinem Freiwerden von Amplikons, da die Detektion durch die geschlossenen Deckel der Gefäße erfolgt, die nie mehr geöffnet werden müssen. Diese Systeme sind, wenn die Abdeckfolien oder Deckel ordnungsgemäß aufgebracht wurden, so dicht, dass selbst nach stundenlanger Exposition von offenen, mit PCR-Reagenzien gefüllten PCR-Platten, die direkt neben den Cyclern stehen, keine Kontaminationen mehr nachzuweisen sind. Das für die offenen oder halboffenen Systeme propagierte Uracyl-N-Glykosylase-System zum enzymatischen Abbau von kontaminierenden Amplifikat-Produkten vor Beginn der PCR ist in diesen Systemen nicht mehr nötig. Prinzipiell können alle Schritte der PCR in einem Raum oder automatisiert in einem Gerät durchgeführt werden, ohne dass signifikante Kontaminationsraten zu befürchten sind.

Kontrollen

Kontrollen sollten so gewählt werden, dass möglichst alle Einzelschritte des Gesamtprozesses überwacht werden können. Mit Hilfe der Kontrollen wird die Validität des Ergebnisses bestimmt. Die wichtigsten Kontrollen sind diejenigen, die die Sensitivität und Spezifität des Systems überwachen. Sie sollten, soweit möglich, am besten in jeder einzelnen PCR-Reaktion mitgeführt werden.

Negativkontrollen

Negativkontrollen dienen in der PCR in erster Linie dazu anzuzeigen, dass keine Kontaminationen oder falsch positiven Reaktionen im individuellen Testmix vorkommen. Sie enthalten alle Reagenzien, jedoch keine Zielsequenzen.

Positivkontrollen

Diese sollen so nah wie möglich an einer tatsächlich positiven Probe sein, wobei sie im Weiteren belegen können, dass die Nachweisgrenze mit dem individuellen Lauf und den individuellen Reagenzien erreicht worden ist. Sie sollten den Gesamtprozess so umfassend wie möglich überwachen. Wir benutzen zu diesem Zweck negative Pools, die mit allen nachzuweisenden Wild-Typ-Viren mit niedriger Konzentration gespickt wurden. Diese positiven Pools laufen doppelt in der Zentrifuge mit, um die Virus-Anreicherung zu überwachen, und werden parallel mit den üblichen Proben extrahiert und in die PCR eingesetzt. Sie müssen den in den Validierungen vorgegebenen Spezifikationen entsprechen. Liegen sie außerhalb der Spezifikation, ist der Lauf zu wiederholen. Zusätzlich können so genannte Kit-Kontrollen mitgeführt werden, die lediglich die Funktionalität der PCR-Reagenzien überprüfen.

Interne Kontrollen

Diese stellen bei der PCR die wichtigste Art der Kontrolle dar und erlauben die Überwachung jeder individuellen Reaktion, eine Möglichkeit, welche serologische Tests nicht bieten. Interne Kontrollen sollten aus der gleichen Nukleinsäure wie das zu amplifizierende Virus bestehen, d.h. aus RNA bei RNA-Viren und aus DNA bei DNA-Viren. Sie sollten möglichst die gleiche Länge und Zusammensetzung wie das Wildtyp-Amplikon haben und nach Möglichkeit kompetitiv sein, d.h. mit den Primern wie das Wildtyp-Virus amplifizierbar sein [4]. Die Real-time-PCR bietet auch hier einen großen Vorteil, denn diese internen Sequenzen können vom Wildtyp-Virus elegant dadurch abgegrenzt werden, dass sie sich vom Wildtyp-Amplikon lediglich durch eine spezielle mutierte Sondensequenz unterscheiden. Sie werden mit einer eigenen Sonde nachgewiesen, die homolog zu dieser mutierten Sequenz ist und einen von der Wildtyp-Sonde unterscheidbaren Fluoreszenz-Farbstoff trägt. Mit dem Ergebnis der PCR

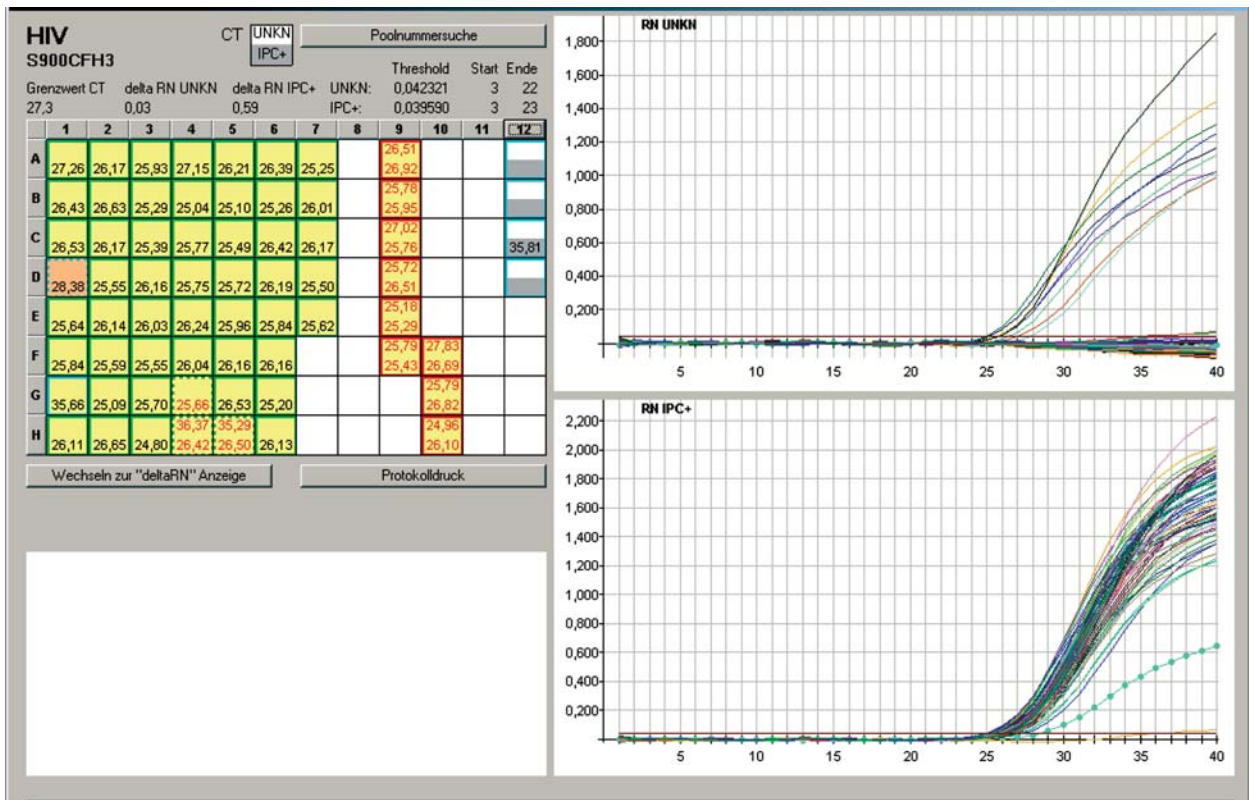


Abbildung 1 Ergebnisse einer HIV Routine-PCR mit neun positiven Proben, darunter sechs Kontrollen (rot eingerahmte Positionen in der Plattendarstellung und sigmoidal ansteigende Kurven im "RN UNKN"-Diagramm oben rechts). Die positiven Proben haben einen ct von 25–27 (Plattendarstellung obere Werte). Alle unbekanntenen Proben haben keinen ct und sind daher grün umrandet. Die Werte liegen unterhalb der Baseline im "RN UNKN"-Diagramm. Die Positionen H4 und H5 haben zwar einen (sehr späten) ct, sind aber grün umrandet, da sie oberhalb des im Programm eingestellten Grenzwertes liegen. Die unterbrochene Linie zeigt an, dass die Vorbewertung des EDV-Programmes durch manuellen Eingriff der MTA oder der berechtigten Person geändert wurde. Im Diagramm "RN IPC+" ist die Amplifikation der internen Kontrollen dargestellt, die alle einen ct und einen deltaRN-Wert haben müssen, der über dem Grenzwert von 0,59 liegt (vgl. Angaben im Kopf der Plattendarstellung), sollen sie richtig negativ sein. Die rot markierte Position D1 zeigt einen nach rechts verschobenen ct der internen Kontrolle von 28,38. Diese Position ist im Diagramm "RN IPC+" gepunktet dargestellt und zeigt auch ein reduziertes Endsignal, das noch innerhalb der Spezifikation liegt. Die Position G1 (hellblau eingerahmt) hat einen ct von 35,66 und ist komplett inhibiert (bzw. invalide), da nicht nur der ct weit nach rechts verschoben ist und außerhalb der Spezifikation liegt, sondern auch der deltaRN-Wert die Basislinie kaum übersteigt. Die Probe musste wiederholt getestet werden.

liegt auch das Ergebnis der internen Kontrolle vor und es muss zur Auswertung lediglich zwischen dem einen und dem anderen Farbstoff umgeschaltet werden. Die interne Kontrolle ist im Blutspendewesen von großer Bedeutung, da hier in der überwiegenden Zahl der Fälle negative Ergebnisse zu erwarten sind und unbedingte Gewissheit bestehen muss, dass diese nicht falsch negativ sind. Die interne Kontrolle sollte so früh wie möglich in den Gesamtprozess eingeführt werden, z.B. mit den Reagenzien zur Viruslyse. Damit können gleichzeitig der Extraktionsprozess, die PCR und der Detektionsprozess überwacht werden. Valide negative Ergebnisse liegen dann vor, wenn die interne Kontrolle ein positives Amplifikationssignal gibt. Wird die interne Kontrolle nicht amplifiziert, liegen entweder Fehler beim PCR-Reagenzienmix (Komponenten können fehlen oder gestört sein) vor, oder es wurden Inhibitoren in die PCR eingebracht, die die Amplifikation unterbinden. Nur bei einer positiven

Probe ist es aufgrund der Konkurrenz (gleiche Primer für die Amplifikation der internen Kontrolle wie für das Virus) erlaubt, dass die interne Kontrolle schwach positiv oder negativ wird. Das Gleiche gilt für die mitgeführten Positivkontrollen, wie oben ausgeführt. Obwohl es sich bei der Real-time PCR im Prinzip um eine quantitative PCR handelt, wird sie im Blutspendewesen meist als qualitative PCR eingesetzt. Sowohl der Threshold Cycle als auch der deltaRN-Wert der internen Kontrollen kann genutzt werden, um die Sensitivität der individuellen PCR-Reaktion oder die Sensitivität der PCR-Methode über einen längeren Zeitraum zu überwachen. Wird die interne Kontrolle so eingestellt, dass deren Konzentration in der Nähe der 95%-Nachweisgrenze des Wildtyp-Virus liegt, kann sehr komfortabel und elegant die Sensitivität jeder individuellen PCR bei jedem Lauf überwacht werden. Werden bestimmte Werte über- oder unterschritten, die außerhalb der aus der ursprünglichen Validation

stammenden Spezifikation liegen, ist die PCR als invalide zu bewerten. Anders als bei serologischen Testen ist ein unbemerktes Abdriften der Sensitivität der PCR über die Zeit mit dieser Kontrollmethode auszuschließen.

Die Abbildungen 1 und 2 geben zwei Beispiele von Real-time PCR-Routineläufen mit internen und externen Kontrollen. Die Abbildungen sind Screenshots aus unserer Pooling- und Real-time PCR- Software NADIS, die drei verschiedene Ergebnisausdrucke der PCR Thermocycler ABI Prism 7000 in ein Bild integriert und auf dem Bildschirm darstellt. NADIS nimmt aufgrund von Voreinstellungen eine Ergebnisbewertung vor, die von einer/einem MTA kontrolliert und einer berechtigten Person befundet und freigegeben werden muß. Notwendige Änderungen der Bewertung durch MTA und berechnete Person sind möglich und werden dokumentiert und sichtbar gemacht. Alle Voreinstellungen und Änderungen werden mit Namen und Zeitpunkt dokumentiert. Abweichungen von den NADIS-Vorgaben müssen im System schriftlich begründet werden. Alle Ergebnisse und Änderungen können jederzeit über 30 Jahre nachvollzogen werden.

Dargestellt sind links die Positionen auf der PCR-Platte für HIV (Abbildung 1) und HBV (Abbildung 2). Alle negativen Positionen sind grün umrandet, alle positiven Positionen sind rot umrandet. No template controls (NTC) sind blau umrandet. Für die jeweiligen Positionen werden die Threshold cycle (ct) für die unbekanntes Proben (nachuweisendes Virus) innerhalb der Rahmen oben dargestellt, für die internen Kontrollen unten. "Ct" bezeichnet den Zyklus der PCR, zu dem erstmalig positive Emissionswerte gemessen werden, die über der Hintergrundfluoreszenz liegen und den Schwellenwert bzw. die Baseline (braune horizontale Linie, parallel zur x-Achse) übersteigen. Durch Umschaltung über "Wechseln zu 'deltaRN' Anzeige" können auch die deltaRN-Werte (Höhe der emittierten Fluoreszenz im letzten Zyklus; hier Nr. 40 bzw. 45) in jeder einzelnen Position angezeigt werden, oben wiederum für das Virus, unten für die interne Kontrolle. Im Kopf der Plattendarstellung sind die Grenzwerte der Voreinstellung und die Daten für die Baseline zu sehen.

Rechts sind im oberen Diagramm "RN UNKN" die Real-time-Ergebnisse der unbekanntes Proben dargestellt (Abbildungen 1 und 2). Die x-Achse zeigt die durchlaufenen PCR-Zyklen an, die y-Achse die emittierten Fluoreszenzintensitäten als deltaRN-Wert. Im unteren Diagramm "RN IPC+" werden analog die Messwerte für die internen Kontrollen präsentiert.

Ergebnis-Interpretation

Ergebnisse sind dann als valide zu bewerten, wenn alle Kontrollen die vorgegebenen Spezifikationen erfüllen, die entweder im Beipackzettel der Hersteller oder in den SOPs (Standard-Operating Procedures) festgelegt sind. Der jeweilige Testlauf ist außerhalb der Spezifikation oder invalide, wenn eine oder mehrere der Kontrollen

außerhalb der Spezifikationen liegen, die in den entsprechenden SOPs festgelegt sein müssen.

Standards Alle Kontrollen sollten an den internationalen Standards der WHO kalibriert sein bzw. internationale kalibrierte Standards sollten direkt eingesetzt werden [5–8]. Die international akzeptierten WHO-Standards oder daran kalibrierte positive Materialien, wie z.B. positive Plasmen, müssen auch für die Validierung der Assays verwendet werden.

Validierung Alle PCR Assays, ob In-Haus oder kommerziell, müssen anhand der Kriterien des Paul-Ehrlich-Instituts nach den vorgegebenen Richtlinien und Standards validiert werden. Dies umfasst die Sensitivität, die Spezifität, die Robustheit und Validität. Sie müssen sich auf das Gesamtsystem und nicht auf die individuelle PCR beziehen. Angaben zur Sensitivität sind unabhängig davon, ob die Proben direkt, in kleinen oder großen Pools, mit oder ohne Anreicherung getestet werden, auf die individuelle Spende zu beziehen und in internationalen Einheiten pro mL anzugeben.

Externe Qualitätskontrolle

Die externe Qualitätskontrolle ist neben der internen Qualitätskontrolle von großer Bedeutung. Leider werden von Instand keine für das Blutspendewesen adaptierten Ringversuche angeboten; es empfiehlt sich jedoch trotzdem, daran mit den entsprechenden Vorbehalten teilzunehmen. Die Instand-Ringversuche sind in erster Linie für die individuelle Probestellung ausgelegt, eine Adaptation an die Pooltestung muss unter eigener Regie erfolgen. Dies berücksichtigend hat das Paul-Ehrlich-Institut für Blutspendedienste, die eine Blutspendertestung mit Hilfe der NAT durchführen, eigene Ringversuche für HCV und HIV organisiert. Diese Ringversuche berücksichtigen das individuelle Pooling und gegebenenfalls Anreicherungsverfahren jedes einzelnen Blutspendedienstes und darüber hinaus auch die Tatsache, dass die genannten Viren in Form verschiedener Genotypen und Geno-Subtypen vorliegen, die sich in der Sequenz deutlich unterscheiden können. Alle Genotypen und Geno-Subtypen, die vom Paul-Ehrlich-Institut vorgegeben sind, müssen mit der gleichen Sensitivität nachgewiesen werden. Darüber hinaus gibt es weitere internationale Ringversuchsanbieter, die ebenfalls die Möglichkeit bieten, die Qualität und insbesondere Sensitivität der PCR zu überprüfen.

Personal

Das Personal sollte gerade bei offenen NAT-Systemen, aber auch bei NAT-Systemen mit manueller Extraktion und Pooling ausreichend geschult werden, um kontaminationsfrei auch mit hochtitrigen Spenderproben umgehen zu können. Testläufe und Schulungen im Rahmen

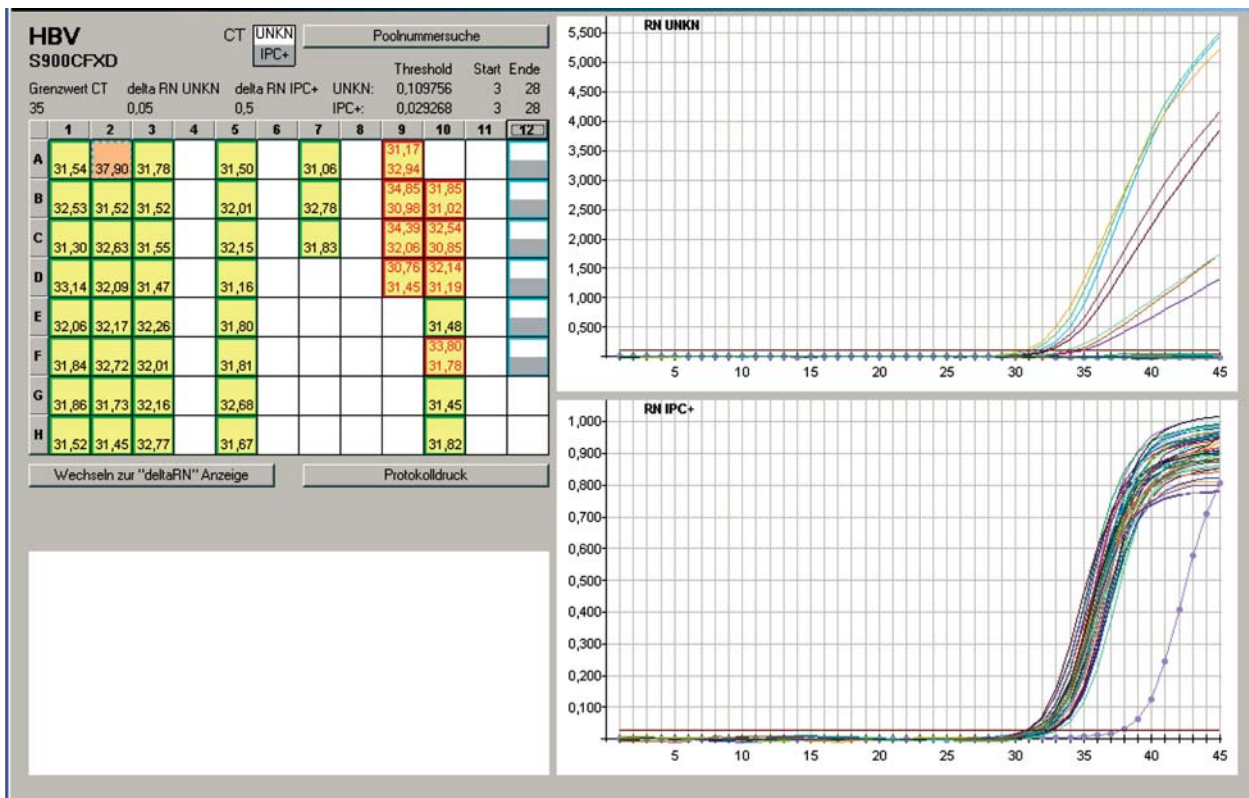


Abbildung 2 Beispiel eines Routinelaufs einer HBV-PCR mit im Prinzip gleichen Darstellungsmerkmalen wie in Abbildung 1. Die der Position A2 (rot unterlegt) entsprechende Kurve der internen Kontrolle mit einem ct von 37,9 liegt ebenfalls außerhalb der Spezifikation, obwohl ein gültiger deltaRN-Wert erreicht wird (vgl. Diagramm "RN IPC+" gepunktete violette Kurve). Die übrigen unbekannteten Proben, die auf HBV getestet wurden, zeigen ein valides negatives Ergebnis.

eines Qualitätsmanagementsystems mit entsprechenden Qualifikationsnachweisen sind zu empfehlen.

Literatur

1. Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, Mulligan G, Witt D, Romano JW, et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997;35:2886–93.
2. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001;39:485–93.
3. Witt DJ, Kemper M. Techniques for the evaluation of nucleic acid amplification technology performance with specimens containing interfering substances: efficacy of boom methodology for extraction of HIV-1 RNA. *J Virol Methods* 1999;79:97–111.
4. Drosten C, Weber M, Seifried E, Roth WK. Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening. *Transfusion* 2000;40:718–24.
5. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaboration Study Group. *Vox Sang* 1999;76:149–58.
6. Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nubling M, Yu M. Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. The Collaborative Study Group. *Vox Sang* 2000;78:217–24.
7. Holmes H, Davis C, Heath A, Hewlett I, Lelie N. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid based techniques. *J Virol Methods* 2001;92:141–50.
8. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2001;80:63–71.