

Prävalenzbestimmung von Hepatitis G Virus in Plasmapools und Plasmapoolpräparaten

Prevalence of Hepatitis G Virus in Plasma Pools and Products

H. F. Rabenau¹, H. Kawara¹, H. W. Doerr¹, B. Weber^{1,2}

Zusammenfassung: Trotz der Spenderauswahl, des serologischen Screenings der Blutspenden auf anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HCV und HBsAg, Inaktivierungs- und Eliminierungsverfahren bleibt ein Restrisiko für hämatogen übertragbare Viren bei Plasmapools und den daraus hergestellten Präparaten. Als zusätzliche Screeningmethode zur Erhöhung der Virussicherheit wird inzwischen die Testung der Einzelspende bzw. von Minipools auf HCV-RNA verlangt. In der vorliegenden Arbeit wurden 142 HBsAg, anti-HCV- und anti-HIV-1/-2 negative Plasmapools, sowie Plasmapräparate (Immunglobulinpräparat und F IX Präparat), welche zum Teil aus für HGV-RNA PCR-positiven Ausgangspools hergestellt worden waren, mittels PCR auf das Vorhandensein von HGV-Nukleinsäure untersucht. Alle untersuchten Pools bzw. Plasmapräparate stammten von Spenden zwischen 1994 und 1996, also vor der Einführung der genannten Pflichttestung auf HCV-RNA. HGV-RNA wurde in 117 der 142 Plasmapools (82,4%) amplifiziert. Allerdings war HGV-RNA nur in einer (6,3%) von 16 IgG-Chargen aus für HGV-Nukleinsäure positiven Kryouberständen nachweisbar. In 2 (6,5%) von 31 unselektierten Immunglobulinpräparaten war eine HGV-Kontamination vorhanden. Eine routinemäßige Anwendung der PCR ist zur Zeit aus technischen sowie Kosten-Nutzen-Überlegungen für HGV nicht zu empfehlen, solange die klinische Relevanz nicht gesichert ist. Die Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der im Herstellungsprozeß integrierten Viruseliminierungsverfahren, denn bei der vorliegenden Studie konnte nur in einem geringen Anteil der Endproduktchargen HGV-Nukleinsäure nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Virussicherheit, Plasmapräparate, Plasmapools, Hepatitis G-Virus, Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Summary: Despite donor selection, screening of donated blood for anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HCV and HBsAg, inactivation and elimination processes, there is still a residual risk of haematogenic transmission of viruses by plasma pools and products. Individually donated units and mini pools are now required to be tested for HCV-RNA as an additional screening method to reduce the risk of viral contamination. In the present study, 142 HBsAg, anti-HCV and anti-HIV-1/-2 negative plasma pools and derived products (immunoglobulin preparation and F IX preparation) were tested by PCR for the presence of HGV RNA. A certain proportion of the starting pools were contaminated with HGV. All pools and plasma preparations tested were derived from blood donated between 1994 and 1996, before mandatory testing for HCV-RNA was introduced. HGV RNA was detected in 117 (82.4%) of 142 plasma pools. However, HGV-RNA could be detected in only one (6.3%) of 16 IgG batches from cryosupernatants yielding HGV. Two (6.5%) of 31 unselected immunoglobulin preparations were contaminated with HGV RNA. At present, the routine use of PCR is not recommended out of both technical and cost/benefit considerations. PCR screening is not justifiable for HGV since its clinical relevance has not been established. The results underline the importance of the virus elimination methods integrated in the production process, since HGV could be detected only in a limited proportion of end product batches in the present study.

Keywords: viral contamination, plasma pools and products, Hepatitis G virus, polymerase chain reaction (PCR).

Humanplasma ist ein weitverbreitetes Ausgangsmaterial für die Herstellung biologischer aktiver Pharmazeutika, wie z.B. Albumine, Immunglobuline, Gerinnungsfaktoren (Faktor VIII; Faktor IX) und PPSB (Prothrombin + Prokonvertin + Stuart-Prower-Faktor + antihämolytisches Globulin).

Zur Gewinnung einzelner Plasmapräparate als Therapie werden bis zu mehreren 10.000 Plasmaeinzelspenden gepoolt und aus diesem Pool mittels geeig-

¹Institut für Medizinische Virologie der J.W.Goethe-Universität Frankfurt/Main

²Laboratoire Réunis Kutter-Lieners-Hastert, Junglinster, Luxemburg

Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. med. Holger F. Rabenau, Institut für Medizinische Virologie, Universitätskliniken Frankfurt, Paul-Ehrlich-Str. 40, D-60596 Frankfurt, Tel.: 069 6301 5312, Fax: 069 6301 83061

Eingegangen: 30. Dezember 1999/Angenommen: 31. Januar 2000

neter Reinigungs- und Konzentrierungsmethoden die gewünschten Proteine isoliert. Durch sorgfältige Spenderauswahl und Testung jeder einzelnen Blutspende auf Antikörper gegen das Humane Immundefizienz Virus (HIV)-1, HIV-2, das Hepatitis C Virus (HCV) und Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBV) (HBsAg), konnte das Risiko einer Virusübertragung durch Plasmapräparate erheblich gesenkt, jedoch nicht eliminiert werden. Auch für Bluttransfusionen konnte das Restrisiko reduziert werden. Es wird in Deutschland für HBV mit 1:20.000 - 1:232.000 [1, 2], für HIV mit 1:300.000 - 1:1.889.000 angegeben [1-4] und für HCV mit etwa 1:5.000 - 1:113.000 [1]. Neuere Zahlen schätzen das transfusionsassoziierte Restrisiko für HCV in Deutschland auf 1:120.000 je Blutspende.

Neben den drei in der Transfusionsmedizin besonders relevanten Viren können jedoch auch eine Reihe weiterer virämisch auftretender Viren ein Risikopotential darstellen. Hierzu zählen das Hepatitis A-Virus (HAV), Hepatitis D-Virus (HDV), Hepatitis G-Virus (HGV), Parvovirus B19, das Cytomegalievirus (CMV), Epstein Barr-Virus (EBV), die Humanen Herpesvirus-Typen 6 (HHV 6), 7 und 8 (HHV 7 / HHV 8), die humanen T-Zell-Leukämie-Viren I und II (HTLV I/II), das TT Virus (TTV) [5] und das erst kürzlich entdeckte SEN-Virus [6].

Außer der Spenderauswahl und dem Screening der Blutspenden auf Virusmarker spielen Inaktivierungs- bzw. Eliminierungsverfahren eine wichtige Rolle in der Produktion von virussicheren Präparaten. Die am häufigsten eingesetzten Verfahren sind Solvent/Detergent-(S/D)-Behandlung, thermische Inaktivierung (Pasteurisierung, Trockenerhitzung und Dampfbehandlung), Kaltsterilisation mit β -Propiolacton und gleichzeitiger UV-Bestrahlung. Die Einführung solcher Verfahren hat gezeigt, daß sie zur Prävention von Posttransfusions-Infektionen sehr effektiv sind. Studien aus den USA und Großbritannien belegen, daß 12,5 bis 25% der nicht virusinaktivierten Faktor-VIII-Präparate, die aus der Zeit vor der Einführung der anti-HIV Screeningtest stammen, mit HIV kontaminiert waren [7-9]. Analoge Untersuchungen an nicht virusinaktivierten Faktor-VIII-Konzentraten auf HCV zeigten, daß diese Konzentrate zu 82-100% HCV-RNA aufwiesen [10-12]. Als Resultat der Einführung des Spender-screenings und der Virusinaktivierungsmethoden ist keiner der nach 1987 geborenen Hämophilen in Deutschland mit HIV infiziert worden [13].

Problematisch bei diesen Verfahren ist die Balance zwischen maximaler Virusinaktivierung bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität der Gerinnungsfaktoren. Der Ansatz, die Gerinnungsfaktoren mit Stabilisatoren zu schützen, ist schwierig, da die Stabilisatoren auch auf die Viren schützend wirken können [14].

Eine Reihe von Studien beschäftigte sich in den letzten Jahren mit der Prävalenz und Relevanz von HIV, HCV und HBV in der Transfusionsmedizin. In der vorliegenden Studie werden ähnliche Betrachtungen für das Hepatitis G-Virus durchgeführt. Als Erreger der

PTH wurde auch das Hepatitis G-Virus (HGV/GBVC) beschrieben [15, 16]. Dabei handelt es sich um ein RNA-Virus, das zur Familie der Flaviviridae zählt und dessen Genom aus ca. 9.392 Nukleotiden besteht. Die Übertragungswege vom HGV sind nicht vollständig geklärt. Die Transmission durch Blut und Blutprodukte wurde vielfach beschrieben [11, 17]. Ob eine Infektion mit diesem Virus tatsächlich zu einer Erkrankung führt, ist gegenwärtig noch umstritten. Das Virus konnte zwar bei einigen Fällen einer akuten Hepatitis nachgewiesen werden [15, 18], doch ist nicht gesichert, ob es auch die Ursache war [19]. Berichte aus Japan über eine Assoziation des Virus mit fulminanter Hepatitis [20] konnten von anderen Autoren nicht bestätigt werden. Die einzige derzeit zuverlässige Nachweismöglichkeit ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit ihr ist es gelungen, das Virus in 1-2% der gesunden Blutspender nachzuweisen [15, 19, 21]. Ein routinemäßiger Einsatz der HGV-PCR im Blutspendewesen ist bislang nicht vorgesehen und wäre nur dann sinnvoll, wenn das HGV in der Tat eine Hepatitiserkrankung verursachen kann, doch ist die klinische Relevanz der HGV-Infektion noch immer fraglich [22].

Zur Erfassung der Prävalenz und um das Restrisiko abzuschätzen, wurden 142 Plasmapools (Spendezeitraum: April 1994 - September 1996) mit der PCR auf Hepatitis G Virus (HGV)-Nukleinsäure untersucht. Diese Pools waren aus HBsAg-, anti-HCV- und anti-HIV negativen Spenden hergestellt worden. Es wurden zusätzlich die Kryoverstände, in deren Ausgangs-plasmapools HGV-Nukleinsäure nachzuweisen war, erneut mittels PCR auf HGV untersucht. Dadurch sollte geprüft werden, inwieweit der bei der Herstellung von Kryoverständen angewandte Präzipitationsschritt zu einer Viruseliminierung beiträgt. In einem dritten Schritt wurden dann die Produkte (Immunglobulinpräparate bzw. F IX-Präparate), die aus virusnukleinsäurehaltigen Kryoverständen gewonnen worden waren, auf HGV-RNA getestet. Durch diese Vorgehensweise sollte eine Aussage über die dazwischengeschalteten Viruseliminierungsverfahren ermöglicht werden. Abschließend wurde zur Abschätzung der viralen Nukleinsäurebelastung von Immunglobulin-Präparaten eine randomisierte HGV-RNA-Prävalenzbestimmung mittels PCR durchgeführt.

Material und Methoden

Plasmapools, Faktor IX-Präparate und Immunglobuline

Die untersuchten Plasmaproducte sind kommerziell erhältlich und wurden uns freundlicherweise vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Ferner wurden uns das dazugehörige Ausgangsmaterial (Plasmapools) und die Produktionszwischenstufen (Kryoverstände) überlassen.

Die getesteten Plasmapools setzen sich aus 3.600 bis zu 12.000 Einzelplasmaspenden zusammen. Die Einzelspenden werden vor ihrer Verarbeitung auf anti-

HCV, HBsAg und anti-HIV getestet, innerhalb von 24 Stunden nach Gewinnung bei $\leq -30^\circ\text{C}$ eingefroren und dann bei einer Temperatur von $\leq -20^\circ\text{C}$ gelagert. Das Pooling der Einzelspenden wird unmittelbar vor der Weiterverarbeitung zum Endprodukt durchgeführt. Bei dem Hersteller werden Pools verschiedener Herkunftsländer verarbeitet. Dabei ist sichergestellt, daß jeder Pool nur Spenden aus einem Land beinhaltet.

Die F IX-Präparate werden aus dem Kryoverstand, der bei der Präzipitation eines Plasmapools entsteht, hergestellt. Das untersuchte Präparat „F IX 250“ setzt sich zusammen aus: 10 ml Lösungsmittel zur i.v.-Injektion, 280-500 mg Trockensubstanz: mit F IX (Aktivität von 250 I.E.) angereicherte Humanplasmafraction (Gesamtprotein Gehalt 10 mg) und 25 I.E. Heparin als Stabilisator. Die Präparation erfolgt aus Pools, die sich aus maximal 2.800 l Plasma zusammensetzen (bis zu 12.000 Einzelspenden).

Zur Gewinnung virussicherer F IX-Präparate beinhaltet das Herstellungsverfahren virusinaktivierende bzw. viruseliminierende Verfahren. In diesem Falle wurde das Solvent-Detergent (S/D)-Verfahren verwendet. Dabei handelt es sich um eine Virusinaktivierungsmethode, die nur gegen umhüllte Viren gerichtet ist, indem deren Hülle geschädigt wird. Anfällig sind also auch HBV, HCV und HIV.

Die i.v.-Immunglobulinpräparate werden ebenfalls aus dem Kryoverstand gewonnen. 1 ml Lösung des untersuchten Immunglobulinpräparates enthält: 50 mg Protein, davon mindestens 95% IgG, $\leq 100\ \mu\text{g}$ IgA und $\leq 100\ \mu\text{g}$ IgM. Die Präparation erfolgt aus Pools, die sich aus über 3.600 Einzelspenden zusammensetzen. Laut Herstellerangaben sind die IgG-Moleküle weder chemisch noch enzymatisch modifiziert. Das Präparat beinhaltet einen polymeren Anteil von $\leq 3\%$ Immunglobulinmolekülen, sowie einen Anteil von Monomeren und Dimeren von $\geq 90\%$. Zur Virusinaktivierung beziehungsweise Viruseliminierung tragen im Herstellungsprozeß folgende Schritte bei: Cohn-Fraktionierung, Solvent-Detergent-Behandlung und Inkubation bei niedrigem pH-Wert und definierter Temperatur.

HGV-RNA RT-PCR

Die Extraktion des HGV erfolgte aus 140 μl Probenvolumen unter Verwendung des QIAamp HCV-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach der Lyse mit

dem Lysepuffer (Guanidiniumisothiocyanat) wird die RNA an eine Silikagel-Säulenmatrix gebunden, gewaschen und dann mit 50 μl Wasser eluiert. Die anschließende reverse Transkription und Amplifizierung der HGV-RNA wurde mit Hilfe des HGV PCR Testkits (Roche Diagnostics, Penzberg) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und interpretiert: Hierzu werden 10 μl der extrahierten RNA in einem 20 μl -Ansatz [2,0 μl 10 x PCR Puffer II (ohne MgCl_2 , Perkin Elmer), 1,0 μl Random Hexamers (50 μM , Perkin Elmer), 1,0 μl dNTP-Mix (20 mM), 1,0 μl H_2O , 4,0 μl MgCl_2 (25 mM), 0,5 μl RNasin (20 U/ μl , Perkin Elmer), 0,5 μl Rev. Trans. (MuLV, 50 U/ μl Perkin Elmer)] zur reversen Transkription (15 min bei 42°C) eingesetzt. Anschließend werden die Proben während 5 min auf 99°C erhitzt und nachfolgend bei 4°C abgekühlt. 20 μl der cDNA werden in einen PCR-Ansatz [(18,6 μl H_2O , 5,0 μl 10x PCR-Puffer (Roche Diagnostics), 5,0 μl HGV-Primer (Roche Diagnostics), 0,4 μl Taq-Polymerase, 1,0 μl Dig UTP (Roche Diagnostics)] zur Amplifikation eingesetzt. Der Nachweis von HGV-RNA erfolgt unter Verwendung von zwei Primerpaaren, die an zwei unterschiedlichen Genregionen binden (5'-NCR und NS5a) (siehe Tabelle 1).

Die PCR erfolgt nach folgendem Temperaturprofil: 5 min 95°C , 30 sec 94°C (Denaturierung), 30 sec 50°C (Annealing) für 35 Zyklen, 45 sec 72°C (DNA-Polymerase), 72°C 5 min und abschließende Abkühlung bei 4°C . Die Detektion des Amplifikationsproduktes erfolgte in einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte, in der die Hybridisierung des Biotin-markierten Amplifikates mit einer spezifischen Sonde stattfindet. Die Nachweisgrenze des Tests liegt bei ca. 1.000 Genomkopien/ml.

Ergebnisse

Untersuchungen der Pools mittels PCR auf HGV

Es wurden 142 Plasmapools, die aus HBsAg-, anti-HCV- und anti-HIV-1/2 negativen Plasmaspenden hergestellt wurden, mittels PCR auf HGV-Nukleinsäure untersucht. Hierbei zeigte sich, daß 82,4% (117/142) der Plasmapools mit HGV-RNA kontaminiert waren, in 3 Pools (2,1%) konnte ein anfänglich

Tabelle 1 Verwendete Primer bei der Amplifikation und Detektion von HGV (Linnen et al., 1996)

Bezeichnung	Sequenz	Position
NS5a-Primer 1	5'-CTCTTTGTGGTAGTAGCCGAGAGAT-3'	77-101
NS5a-Primer-2	5'-CGAATGAGTCAGAGGACGGGGTAT-3'	188-211
NS5a Capture Probe	5'-Biotin GTTACTGAGAGCTCAGAT-3'	152-172
5'-NCR-Primer 1	5'-CCGCCAAAAGGTGGTGGATG-3'	101-120
5'-NCR-Primer 2	5'-CGACGAGCCTGACGTCCGGG-3'	285-267
5'-NCR Capture Probe	5'-BiotinGGTAGCCACTATAGTGGG-3'	161-179

positives PCR-Resultat in der Nachtestung nicht bestätigt werden (Tabelle 2).

Tabelle 3 zeigt die unterschiedliche Prävalenz von HGV-RNA-Kontaminationen, geordnet nach der Herkunft der Plasmapools. Für 110 der 142 untersuchten Pools (77,5%) waren die Herkunftsländer wie folgt aufgeteilt: 57 Pools aus Europa und 53 Pools aus den USA. Die HGV-Prävalenz in den aus den USA stammenden Pools war deutlich höher als in den europäischen Pools (84,9% versus 63,2%).

Untersuchung des Kryoüberstandes mittels PCR auf HGV

Hier wurden Kryoüberstände mittels PCR auf HGV-spezifische Nukleinsäure untersucht. Kryoüberstände entstehen nach einem Präzipitationsschritt der Plasmapools bei der Herstellung von Plasmapräparaten. Die jeweiligen Plasmapools der untersuchten Kryoüberstände zeigten mittels PCR eine HGV-RNA-Positivität. Tabelle 4 zeigt, daß jedoch nicht in allen Kryoüberständen eine HGV-Kontamination nachweisbar ist (97 / 117 [82,9%]).

Tabelle 2 HGV-RNA-Prävalenz in 142 Plasmapools aus verschiedenen Herkunftsländern (* = positives Resultat, das in der Nachtestung nicht bestätigt wurde)

PCR	positiv (%)	grenzwertig* (%)	negativ (%)
HGV-RNA	117 (82,4)	3 (2,1)	22 (15,5)

Tabelle 3 Häufigkeit HGV-spezifischer Nukleinsäure-Kontaminationen in Plasmapools geordnet nach der geographischen Herkunft

Herkunft der Pools	HGV-PCR positiv (%)
Europa (n = 57)	36 (63,2)
USA (n = 53)	45 (84,9)
Gesamt (n = 110)	81 (73,6)

Tabelle 4 Untersuchung der aus HGV-RNA positiv getesteten Pools stammenden Kryoüberstände mittels PCR auf HGV-Nukleinsäure (* Anzahl der positiv getesteten Pools und damit der untersuchten Kryoüberstände)

Resultat der PCR-Untersuchung der Kryoüberstände	Anzahl (%) n = 117*
positiv	97 (82,9)
negativ	20 (17,1)

Untersuchung auf HGV-Nukleinsäure mittels PCR in verschiedenen Immunglobulin- und F IX-Präparaten
 HGV RNA war nur in einer (6,3%) von 16 Immunglobulin-Chargen, die aus HGV-Nukleinsäure positiven Kryoüberständen hergestellt wurden, nachweisbar. Lediglich vier F IX Präparate, die aus HGV-positivem Ausgangsmaterial hergestellt worden waren, konnten auf HGV-RNA getestet werden. Dabei konnte in keiner Probe Virusnukleinsäure nachgewiesen werden.

Prävalenzbestimmung von HGV-RNA in unselektierten Immunglobulinpräparaten

Es wurden 31 Immunglobulinpräparate mittels PCR auf die Präsenz von HGV-Nukleinsäure untersucht. Hierbei war nicht bekannt, inwieweit der jeweils als Ausgangsmaterial dienende Plasmapool mit Virusgenom kontaminiert war. Dabei konnte lediglich in 2 (6,5%) der untersuchten Proben HGV-RNA nachgewiesen werden.

Beurteilung der grenzwertigen Ergebnisse

Jeder positive PCR-Befund wurde erneut getestet. In der vorliegenden Arbeit war in 3 Fällen (2,1% der Proben) die Nachtestung negativ bei zunächst positivem Ergebnis. Ursächlich hierfür könnten sehr geringe Mengen an Virusnukleinsäure in den betroffenen Plasmapools sein, so daß aus statistischen Gründen nicht jede Probe virale Nukleinsäure enthält. Solche Proben wurden in der vorliegenden Arbeit als „grenzwertig“ bewertet.

Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Plasmapools, die aus bis zu 12.000 anti-HIV, anti-HCV und HBsAg negativ getesteten Einzelspenden zusammengestellt wurden, auf die Anwesenheit von HGV-Nukleinsäure untersucht. Ferner wurden die Plasmaprodukte untersucht, deren Ausgangsplasmapools als Virusnukleinsäure-positiv in der PCR ermittelt wurden.

HGV-Genom konnte in 117 der 142 untersuchten Pools (82,4%) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, berücksichtigt man die Prävalenz des HGV von ca. 2% unter den Blutspendern und die Größe bzw. die Zusammensetzung der Pools.

Wie schon in früheren Arbeiten zum Ausmaß der viralen Kontamination von HCV in Abhängigkeit von der Herkunft der Plasmapools [23], konnte auch in unserer Studie ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einer Kontamination und der Herkunft der Pools ermittelt werden. 57 der von uns getesteten Pools kamen aus Europa, 53 Pools aus den USA. Dabei erwiesen sich Pools aus den USA zu einem deutlich höheren Anteil als HGV-RNA positiv. Während 63,2% der europäischen Pools HGV-RNA enthielten, konnte in 84,9% der US amerikanischen HGV-RNA detektiert

werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Fischer-Test, $p = 0,016$, Tabelle 3). Ursächlich hierfür ist zum einen die höhere HGV-Prävalenz in der amerikanischen Spenderpopulation [24]. Zum anderen scheint die „Spendermotivation“ von besonderer Bedeutung. So wurde in einer Studie von Dawson et al. [25] beispielsweise eine höhere HCV-Seroprevalenzrate unter bezahlten amerikanischen Plasmaspendern (10,1%) dokumentiert im Vergleich mit freiwilligen, unbezahlten Spendern (0,4%).

Die Auswertung verschiedener epidemiologischer Studien, die in Deutschland mittels Nukleinsäureamplifikationsverfahren an Blutspenden durchgeführt wurden, erbrachte bei einer Gesamtzahl von 2.995.376, anti-HCV, anti-HIV, HBsAg negativen Spenden in 73 Fällen ein HCV-RNA positives Resultat (1:41.032). Dies entspricht dem kalkulierten Restrisiko von 1:5.000-113.000 [26]. Bei einem Spendenaufkommen in Deutschland von etwa 4 Millionen/Jahr resultiert hieraus, daß rechnerisch von ca. 33 seronegativen Spenden auszugehen ist, die HCV-RNA enthalten könnten [23]. Konsequenterweise verlangt das Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), daß mit Wirkung ab 1.7.1999 alle Plasmapräparate nur dann frei zu geben sind, wenn sie aus Plasmapools hergestellt wurden, die auf HCV-RNA getestet und als negativ befundet wurden [27]. Auch das Paul-Ehrlich-Institut [28, 29] verlangt mit Wirkung zum 1.4.1999, daß nur noch Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate in den Verkehr gebracht werden dürfen, die ausschließlich unter Verwendung HCV-RNA negativer Blutspenden hergestellt werden. Dabei ist die einzusetzende Nukleinsäure-Amplifikations-Methode so auszuwählen, daß eine HCV-Konzentration von 5.000 IU/ml (entspricht ca. 25.000 Genomäquivalenten/ml) - bezogen auf die Einzelspende - nachzuweisen ist.

Bei Testung von aus HGV-RNA-PCR-positiven Pools hergestellten Kryoverständen, erwiesen sich diese im hohen Prozentsatz (82,9%) ebenfalls als PCR-positiv. Daß nicht alle Kryoverstände PCR positiv waren, läßt eine Verteilung von Viren während des Präzipitationsschrittes vermuten. Bereits 1992 untersuchten Yei et al. [30] Zwischenprodukte bei der Herstellung von Immunglobulinen. Hier konnten hohe Mengen an HCV-RNA nachgewiesen werden. Nach dem Präzipitationsschritt des Plasmapools (belastet mit $1,4 \times 10^7$ HCV-Kopien/ml) wurden im Kryoverstand noch eine Konzentration von 6×10^6 HCV-Kopien/ml nachgewiesen.

In den von uns getesteten 16 Immunglobulin-Chargen, deren Pool und Kryoverstand HGV-RNA beinhaltet hatten, ließ sich nur in einem Fall (6,3%) ein positives PCR-Signal nachweisen. Auch in den 31 unselektierten Immunglobulin-Chargen wurden nur in 2 (6,5%) Fällen HGV-RNA amplifiziert. Jarvis et al. [11] wiesen bei nicht virusinaktivierten Präparate in 64% der untersuchten Plasmapräparate eine HGV-Kontamination nach. Auch Berger et al. [31] untersuchten vier nicht virusinaktivierte Gammagardchargen (durch sie war es zu HCV-Übertragungen gekom-

men) auf HGV-RNA. Allen Proben waren mit HGV kontaminiert. Trotz der relativ hohen HGV-Prävalenz in den nicht virusinaktivierten Präparaten sind nur etwa 0-12,5% der mit den genannten Präparaten behandelten Patienten HGV-infiziert [11, 31, 32]. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Prävalenz unter diesen Patienten ist, daß die Immunglobulinpräparate HGV-neutralisierende Antikörper (anti-E2) enthalten [32]. Sowohl Tacke et al. [33] als auch Dille et al. [34] beschrieben, daß der Nachweis von solcher Antikörpern mit dem Verlust an HGV-RNA korreliert und für eine abgelaufene Infektion spricht.

Daß Immunglobuline ein potentielles Virusübertragungsrisiko beinhalten können, verdeutlichen Beispiele aus der Vergangenheit. Hier kam es in mehreren Episoden zur Übertragung von HCV [31, 35-38].

Ergänzend wurden in der vorliegenden Studie vier virusinaktivierte F IX-Präparate auf HGV-RNA untersucht, deren zugehörige Plasmapools und Kryoverstände HGV-RNA aufwiesen. Alle F IX Konzentrate waren negativ für HGV-RNA. Die Anzahl der von uns untersuchten Präparate ist zu gering, um eine signifikante Aussage treffen zu können. Sowohl Jarvis et al. [11], als auch Garcia-Trevijano et al. [39] konnten demgegenüber in 13% bzw. 14% der von ihnen untersuchten virusinaktivierten Gerinnungskonzentraten HGV-RNA nachweisen. Im Vergleich dazu waren fast alle von Jarvis et al. [11] untersuchten nicht virusinaktivierten Gerinnungspräparate HGV-RNA positiv.

Trotz der relativ hohen HGV-Prävalenz in den nicht virusinaktivierten Gerinnungspräparaten konnte in mehreren Studien nur eine relativ niedrige HGV-Prävalenz, nämlich 12-24%, unter den Hämophilen, die solche Präparate erhalten haben, nachgewiesen werden [11, 15, 40, 41]. Das gleiche Patientenkollektiv war hingegen nahezu vollständig HCV-positiv [11, 41-44]. Es ist auch bekannt, daß die Hämophilen, die mit nicht-virusinaktivierten Gerinnungsfaktoren behandelt wurden, fast zu 100% mit HBV infiziert wurden. Die erstaunlich niedrige HGV-Prävalenz in diesem Patientenkollektiv wird darauf zurückgeführt, daß möglicherweise alle Plasmapools anti-HGV enthalten, welche, wie bereits erwähnt, das HGV neutralisieren und dadurch die Infektiosität verringern [32]. Zweitens wird nach einer langen HGV-Virämiephase [45] das Virus langfristig vom menschlichen Körper eliminiert. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß die Prävalenz von HGV-spezifischen Antikörpern höher als die HGV-RNA in der Allgemeinbevölkerung ist. So konnte Tacke et al. [33] in 9% der Blutspenden HGV-spezifische Antikörper nachweisen.

Zusammenfassend zeigen die Daten unserer Studie, daß Groß-Plasmapools von Einzelspenden, die ausschließlich auf die Anwesenheit von virus-spezifischen Antikörpern bzw. HBsAg getestet wurden, Restrisiken einer viralen Belastung beinhalten. Erwartungsgemäß konnte in einem relativ hohen Anteil der getesteten Pools HGV-RNA nachgewiesen werden. Während die Zweckmäßigkeit der Anordnung des Paul-Ehrlich-Instituts Einzelspenden (bzw. daraus zusam-

mengestellte Minipools) auf HCV-spezifische Nukleinsäure mittels Nukleinsäure-Amplifikationstechniken zu testen unzweifelhaft einen deutlichen Sicherheitsgewinn bringt, ist eine solche Untersuchung für das Hepatitis G-Virus und andere Viren (HAV, ggf. Parvovirus B19, CMV, SEN) erst unter Einbeziehung weiterer Erfahrungen und der jeweiligen klinischen Relevanz zu treffen. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, daß die routinemäßige PCR-Untersuchung der Endprodukte, deren Herstellungsprozeß Virusinaktivierungs- und Viruseliminierungsschritte beinhaltet, wenig zweckmäßig ist.

Danksagung

Für hervorragende technische Hilfe danken wir Frau *Marhild Kortenbusch-Brauner*.

Literatur

- Glück D, Kubanek B, Maurer C and Petersen N. Seroconversion of HIV, HCV and HBV in blood donors 1996-risk of virus transmission by blood products in Germany. *Infusionsther Transfusionsmed* 1998; 25: 82-84.
- Sibrowski W, Penner M, Kühn P. Transfusionsbedingte Virusinfektionen: wie groß ist das Restrisiko? *Infusionsther Transfusionsmed* 1993; 20 (suppl): 4-9.
- Kubanek B, Cardoso M, Glück D, Koerner K. Das Risiko einer Infektionsübertragung durch Blutkomponenten. *Infusionsther Transfusionsmed* 1993; 20: 54-59.
- Schwarz DWM, Simon G, Baumgarten K, Fabritz H, Riggert J, Neumeyer H, Mayr WR, Köhler M. Risk of HIV-transmission by anti-HIV negative blood components in Germany and Austria. *Ann Hematol* 1995; 70: 209-213.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97.
- Ohne Autor: American Standards Diastorin entdeckt neues Virus im Zusammenhang mit Lebererkrankungen. Pressemitteilung 1999.
- Heredia A, Guo ZP, Yu MV, Mason BL, Epstein JS, Hewelt IK. Detection of HIV-1 by RNA PCR in Factor VIII Concentrates. *Vox Sang* 1994; 67: 402-403.
- Semple MG, Loveday C, Preston E, Tedder RS. Detection of HIV-1 RNA in factor VIII concentrate. *AIDS* 1991; 5: 597-598.
- Zhang LQ, Eimmonds P, Ludlam CA, Brown JI. Detection, quantification and sequencing of HIV-1 from the plasma of seropositive individuals and from factor VIII concentrates. *AIDS* 1991; 5: 675-681.
- Guo ZP, Yu MW. Hepatitis C virus RNA in Factor VIII concentrates. *Transfusion* 1995; 35: 112-116.
- Jarvis LM, Dawidson F, Hanley JP, Yap PL, Ludlam CA, Simmonds P. Infection with Hepatitis G Virus among recipients of Plasma Products. *Lancet* 1996; 348: 1352-55.
- Markis M. Use of the polymerase chain reaction to detect viral contamination of clotting factor concentrates. 24 Hämophilie-Symposium Hamburg 1993. Herausgeber I Scharrer, W Schramm; S. 60-67. Springer Verlag Berlin 1994.
- Schramm W, Schulte-Hillen J. Todesursachen und Aids-Erkrankungen Hämophiler in BR Deutschland. 27. Hämophilie-Symposium Hamburg. Herausgeber I Scharrer, W Schramm; 7-20. Springer Verlag Berlin 1996.
- Rabenau H. Virussicherheit von Blutprodukten: Aspekte der behördlichen Anforderung. *Lab Med* 1995; 19: 523-533.
- Linnen J, Wages Jr, Zhang-Keck Z-Y, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW-K, Piatek Jr M, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou J-C, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SKH, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-508.
- Schlauder GG, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Simon JN, Gutierrez RA, Heynen CA, Knigge MF, Kurpiewski GS, Leary TP, Buijk SL, Mauerhoff AS, Deai SM, Mushahwar IK. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agent. *J Med Virol* 1995; 46: 81-90.
- Schmidt B, Korn K, Fleckenstein B. Molecular evidence for transmission of HGV by blood transfusion. *Lancet* 1996; 347: 909.
- Fiordalisi G, Zanella I, Mantero G, Bettinardi A, Stellini R, Parainfio G, Cadeo G, Primi D. High prevalence of GB virus C infection in a Group of Italian patients with hepatitis of unknown etiology. *J Infect Dis* 1996; 174: 181-183.
- Brede HD, Roth WK. Hepatitis G Virus / GBV-C: Ein neues Virus mit vielen Unbekannten. Aufruf zur epidemiologischen Überwachung einer neuen Virus-„Erkrankung“ durch das chemotherapeutische Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt. *Hessisches Ärzteblatt* 1996, 215.
- Yoshida M, Okamoto H, and Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown etiology. *Lancet* 1995; 346: 1131-1132.
- Stark K, Bienzle U, Hess G, Engel AM, Hegenscheid B, Schlüter V. Detection of the hepatitis G Genome among Injecting Drug Users, Homosexual and Bisexual Men, and Blood donors. *J Infect Dis* 1996; 174: 1320-1323.
- Alter HJ. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C N. *Engl J Med* 1996; 334: 1536-1537.
- Paul-Ehrlich-Institut. Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts vom 05. 06.1998: Abwehr von Arzneimittelrisiken Verminderung des Risikos von Hepatitis C Virus-Kontaminationen in Thrombozytenkonzentraten. *Bundesanzeiger* Nr.114 vom 25.06.1998.
- Saldanaha S, Minor P. Incidence of Hepatitis C Virus RNA in Anti-HCV-Negative Plasma Pools and Blood Products. *Vox Sang* 1996; 70: 232-234.
- Dawson GJ, Lesniewski RR, Stewart JL, Bordway KM, Gutierrez RA, Pandy L, Johnson RG, Alcalde X, Rote KV, Devare SG, Robey WG, Peterson DA. Detection of antibodies to hepatitis C virus in U.S. blood donors. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 551-556.
- Gerlich WH, Caspari G. Editorial. *Infusionsther Transfusionsmed* 1998; 25: 71-73.
- CPMP - Committee for Proprietary Medicinal Products. The introduction of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of Hepatitis C virus RNA in plasma pools. CPMP / BWP/ 390/97.1999.
- Paul-Ehrlich-Institut. Bekanntmachung über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Verminderung des Risikos von Hepatitis B, Hepatitis C und HIV-Infektionen bei Empfängern von Erythrozytenkonzentraten von 18.03.1997: Anhörung zur Auflage einer Testung auf HIV-1-, HBV- und HCV-Genome mit Nukleinsäure mit Amplifikationstechniken bei Erythrozytenkonzentraten. *Bundesanzeiger* 63. 4. April 1997.
- Paul-Ehrlich-Institut. Bekanntmachung über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Verminderung des Risikos von Hepatitis B, Hepatitis C und HIV-Infektionen bei Empfängern von Erythrozytenkonzentraten von 25.02.1998: *Bundesanzeiger* 53. 18. März 1998.
- Yei S, Yu MW, Tankersley DL. Partitioning of hepatitis C virus during Cohn-Oncley fractionation of plasma. *Transfusion* 1992; 32: 824-828.
- Berger A, Scharrer I, Doerr HW, Hess G and Weber B. Infection with hepatitis G virus in immunoglobulin recipients. *Lancet* 1997; 349: 207.
- Lefevre JJ, Ravera N, Corbi C, Mariotti Mand Loiscou P. Infection with HGV in immunoglobulin recipients. *Lancet* 1997;349:206.
- Tacke M, Kiyosawa K, Stark K, Schlüter V, Ofenloch-Haehle B, Hess G, Engel AM. Detection of antibodies to a putative HGV envelope protein. *Lancet* 1997; 349: 318-20.
- Dille BJ, Surowy TK, Robin A, Gutierrez, Coleman PF, Knigge MF, Carrick RJ, Aach RD, Hollinger FB, Stevens CE, Barbosa LH, Nemo GJ, Mosley JW, Dawson GJ, Mushahwar IK. An ELISA for detection of antibodies to the E2 of GB Virus C. *J Infect Dis* 1997; 175: 458-62.
- Bjoro K, Froland SS, Yan Z. Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinaemia after treatment with contaminated immunoglobulin. *N Engl J Med* 1994; 331: 1607-11.
- Lane RS. Non-A, non-B hepatitis from intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1983; ii: 974-5.

37. Ochs HD, Fischer SF, Virant FS. Non-A, non-B hepatitis after intravenous immunoglobuline. *Lancet* 1986; i: 976-977.
38. Suomela H. Inactivation of viruses of blood and plasma products. *Trans Med Rew* 1993; 7: 42-57.
39. Garcia-Trevijano, Lopez-Alcoroch, Quintana M, Hernadez F, Carreno V. HGV in coagulation-factor concentrates. *Lancet* 1996; 348: 1032.
40. Nishiyama Y, Nakashimo H, Hino K. Infection with hepatitis GB-virus among Japanese haemophiliacs. *Transfusion* 1996; 36: 669.
41. Kinoshita T, Miyake K, Nakao H, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa, Mayumi M. Molecular investigation of GB Virus C infection in haemophiliacs in Japan. *J Infect Dis* 1997; 175: 454-457.
42. Esteban JJ, Viladomiu L, Gonzalez A, Roget M, Genesca J, Esteban R, Lopez-Tavalra JC, Hernandez JM, Vargas V, Buti M, Guardia J, Houghton M, Choo Q-L, Kuo G. Hepatitis C antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 334: 294.
43. Brettler DB, Alter HJ, Dienstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of haemophilia patients. *Blood* 1990; 76: 254.
44. Watson HG, Ludlam CA, Rebus S, Qi Zhang L, Peutherer JF, Simonds P. Use of several second generation serological assays to determine the true prevalence of hepatitis C virus infection in haemophiliacs treated with non-virus inactivated factor VIII and IX concentrates. *British Journal of Haematology* 1992; 80: 514-518.
45. Feucht H-H, Zöllner B, Polywka S, Knödler B, Schröter M, Nolte H, Laufs R. Distribution of Hepatitis G viremia and antibody response to recombinant proteins with special regard to risk factors in 709 patients. *Hepatology* 1997; 26: 491.