

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner

Das Hepatitis B-Virus in der Transfusionsmedizin

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Ines Puchta

aus Hoyerswerda

Lübeck 2006

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. Hennig

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung und Fragestellung	8
1.1. Historischer Hintergrund.....	8
1.2. Taxonomie	9
1.3. Struktur des HBV.....	9
1.4. Genomorganisation	11
1.5. Mutationen	13
1.6. Übertragungswege	15
1.7. Epidemiologie.....	15
1.8. Pathogenese	16
1.9. Klinischer Verlauf	17
1.10. Diagnostik	18
1.10.1. Serologische Diagnostik der HBV-Infektion	18
1.10.2. Die Polymerasekettenreaktion.....	20
1.11. Problematik in der Transfusionsmedizin.....	24
1.12. Zielsetzung.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Testkits und Reagenzien	27
2.1.2. Geräte und Zubehör	28
2.1.3. Blutproben	28
2.1.4. Standard- und Kontrollproben.....	30
2.1.5. Computerprogramme.....	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. HBV-Serologie	31
2.2.2. Nukleinsäureisolation.....	34
2.2.3. <i>TaqMan</i> -PCR.....	36
<i>Primer</i> - und Sondenauswahl.....	36
PCR-Kontrollen	38
Optimierung der <i>TaqMan</i> -PCR	38
Protokoll der PCR	39
Bestimmung der Nachweisgrenze.....	40
Auswertung der PCR-Ergebnisse	40

3. Ergebnisse	41
3.1. HBV-Serologie	41
3.2. Optimierung der <i>TaqMan</i> -HBV-PCR	42
3.3. Bestimmung der Nachweisgrenze der HBV-PCR.....	46
3.4. PCR-Ergebnisse bei Anti-HBc-positiven Neuspendedern	49
4. Diskussion	52
5. Zusammenfassung	62
6. Danksagungen	63
7. Lebenslauf	64
8. Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Ag	Antigen
Anti-	Antikörper gegen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
C-Gen	<i>Core</i> (Nukleokapsid)-Gen des HBV
C	Cytosin
C _T	Grenzwert-Zyklus
ΔR_n	relative Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHBV	<i>Duck</i> (Enten)-Hepatitis B-Virus
DTP-Impfung	Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Impfung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter immunologischer Test)
FAM	6-Carboxyfluorescein
GSHV	<i>Groundsquirrel</i> (Erdhörnchen)-Hepatitis-Virus
G	Guanin
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HBcAg	Nukleokapsidantigen des HBV
HBeAg	HBe-Antigen des HBV
HBsAg	Oberflächenantigen des HBV
HHBV	<i>Heron</i> (Reiher)-Hepatitis B-Virus

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IgG	Immunglobuline Klasse G
IgM	Immunglobuline Klasse M
MEIA	Mikropartikel-Enzym- <i>Immunoassay</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>Messenger</i> (Boten)-RNA
S-Gen	<i>Surface antigen</i> (Oberflächenantigen)-Gen des HBV
P-Gen	Polymerase-Gen des HBV
PBMC`s	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerasekettenreaktion
PräS-Gen	DNA-Region vor dem Oberflächenantigen-Gen des HBV
PräC-Gen	DNA-Region vor dem Nukleokapsid-Gen des HBV
RNA	Ribonukleinsäure
R _n	Normalisiertes Reportersignal
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
STIKO	Ständige Impfkommision
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TaqMan</i> -PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
T _m	Schmelztemperatur
UNG	Uracil-N-glycosylase
VIC	Fluoreszenzfarbstoff, chemische Struktur nicht veröffentlicht
WHV	<i>Woodchuck</i> (Waldmurmeltier)-Hepatitis-Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gen	die Transkription des HBV regulierendes Gen

verwendete Einheiten:

IU	<i>International Units</i> (Internationale Einheiten)
g	Gramm
geq	Genomäquivalente
°C	Grad Celsius
h	Stunde
kD	Kilodalton
min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
U	<i>Units</i> (Einheiten)

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Historischer Hintergrund

Im Jahre 1943 entdeckte Beeson erstmals den Zusammenhang zwischen der Gabe von Bluttransfusionen und dem Auftreten von Hepatitiden ⁽¹³⁾. In der Bundesrepublik Deutschland dokumentierte Martini 1949 die ersten Fälle ⁽⁹¹⁾. Da die Ursache der Posttransfusionshepatitiden zu diesem Zeitpunkt unbekannt war, versuchte man in den USA ab 1960 die Übertragungsrate durch das Messen erhöhter Leberenzyme bei Blutspendern zu verringern ⁽¹⁰⁾. Die Forschungsgruppe von Blumberg entdeckte 1963 im Serum eines australischen Ureinwohners ein Antigen, daß sich deutlich von anderen Lipoproteinen im Blut häufig transfundierter Patienten unterschied ⁽⁷⁾. Es wurde *Australia*-Antigen genannt und von Blumberg et al. 1965 auch im Serum von Leukämie-Patienten nachgewiesen ⁽¹⁸⁾. Nachdem noch weitere Studien dieses Antigen mit Serum- bzw. Blut-Hepatitiden in Verbindung brachten ^(19,107,126,133), wurde es als Hepatitis-assoziiertes–Antigen (HAA) bezeichnet. Einige Jahre später wurde noch ein zusätzliches, größeres und komplexer aufgebautes Partikel entdeckt ⁽¹²⁾, in welchem Dane das infektiöse Partikel des Hepatitis B-Virus (HBV) erkannte ⁽³³⁾. Das HAA wurde später als Hepatitis B (Blut)-*surface* (Oberflächen)-Antigen (HBsAg) bezeichnet und man führte die Testung der Blutspenden auf dieses Antigen ein. Trotz der eingeführten HBsAg-Testung der Blutspenden ging die Zahl der Posttransfusionshepatitiden nicht so stark zurück wie erwartet. Im Jahre 1975 konnte gezeigt werden, daß die anderen Hepatitiden auch nicht durch das neu beschriebene Hepatitis A-Virus verursacht wurden ⁽⁴³⁾. Man bezeichnete diese Erkrankungen daraufhin als Non-A-Non-B-Hepatitis. Im Wissen um diese anderen Hepatitis-Erreger testete man ab 1980 in vielen Ländern die Blutspender auf die persistierenden Antikörper gegen das HBV-Nukleokapsidantigen (Anti-HBc) ^(6,78)

und erhöhte Leberenzyme als Surrogatmarker für die Erkennung von Spendern mit allgemein höherem Risiko für Virusinfektionen ⁽⁷⁸⁾. Zusätzlich führte man neue Auswahlkriterien ein und erweiterte die Anamnese bei Blutspendern, um Risikospender von der Blutspende auszuschließen. Der große Durchbruch hinsichtlich einer weiteren Reduktion transfusionsbedingter Hepatitiden gelang erst mit der Entdeckung des Hepatitis C-Virus (HCV) durch Choo et al. 1989 ⁽²⁷⁾. Durch Einführung des Anti-HCV-Tests 1990 wurde das Risiko einer Posttransfusionshepatitis zum damaligen Zeitpunkt um 80 % reduziert ⁽⁴⁰⁾.

1.2. Taxonomie

Das Hepatitis B-Virus (HBV) gehört zu den Viren mit teilweise doppelsträngigem Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Genom. Um das Virus von Hepatitis verursachenden Ribonukleinsäure (RNA)-Viren abzugrenzen, wurde für das HBV die Familie der Hepadnaviren (Hepatitis-DNA-Viren) geschaffen. Das HBV stellt den Prototyp dieser Virusfamilie dar. Zusammen mit den bei Primaten, dem Waldmurmeltier (WHV) und dem Erdhörnchen (GSHV) gefundenen Viren bildet es die Gattung der Orthohepadnaviren (Hepadnaviren, die Säugetiere infizieren). Hepadnaviren, die Vögel infizieren, werden als Avihepadnaviren bezeichnet. Als HBV-Modelle wurden aus dieser Gattung häufig das Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) ⁽¹³⁸⁾ und das Reiher-Hepatitis-B-Virus (HHBV) verwendet. Die Hepadnaviren sind hepatotrop, aber nicht zytopathogen. Sie sind speziesspezifisch und zeichnen sich durch eine hohe Replikationsrate aus ^(23,99).

1.3. Struktur des HBV

Der Aufbau des HBV und der nichtinfektiösen HBsAg-Partikel ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

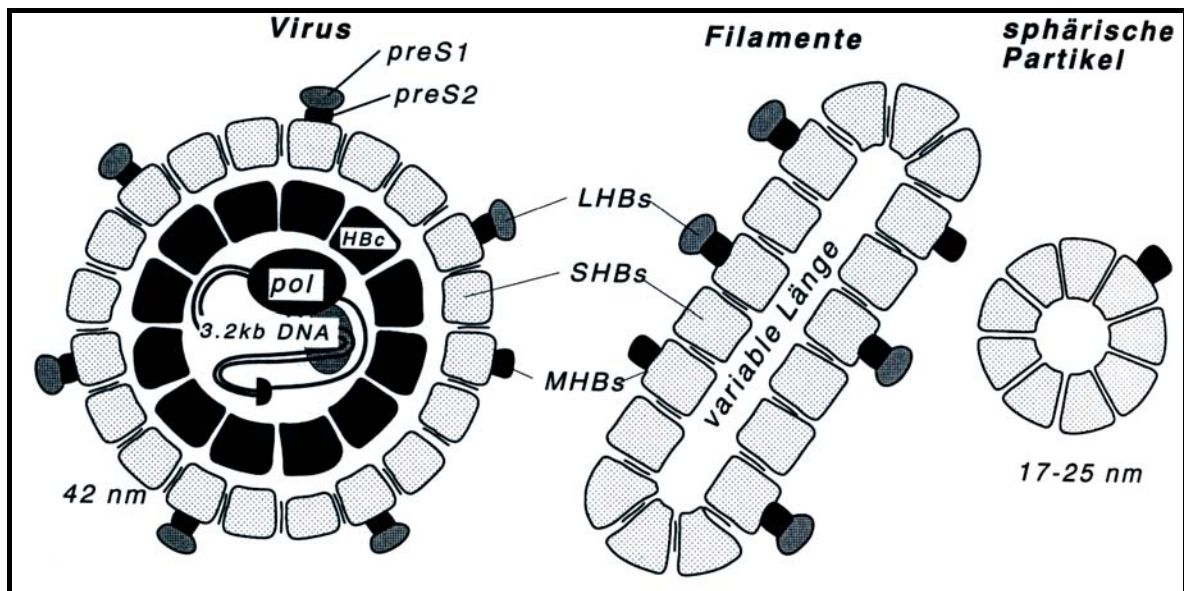


Abb. 1: Struktur des HBV ⁽²³⁾

Das komplette Virus wird nach seinem Erstbeschreiber Dane-Partikel genannt und ist circa 42–45 Nanometer (nm) groß ⁽³³⁾. Die Lipidhülle besteht aus HBsAg und umschließt das 28 nm große Nukleokapsid, welches das Genom enthält. Das HBsAg existiert in drei Modifikationen: (1) Das kleine HBsAg (*small* HBs, SHBs) ist ein teilweise glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 Kilodalton (kD). (2) Das mittlere HBsAg (*medium* HBs, MHBs oder Prä-S2-Protein) mit einem Molekulargewicht von 33-36 kD besitzt weitere 70 Aminosäuren am aminoterminalen Ende und ist ebenfalls teilweise glykosyliert. Es kann sich an Serumalbumin binden. (3) Das große HBsAg (*large* HBs, LHBs oder Prä-S1-Protein) mit einem Molekulargewicht von 40 kD besitzt weitere 150 Aminosäuren am N-terminalen Ende, liegt acetyliert und glykosyliert vor und ist verantwortlich für die Adsorption des HBV an einen Zellrezeptor ^(128,135). Alle Oberflächenantigene und das Nukleokapsid sind Induktoren für die Antikörperbildung. Das wichtigste immunogene Epitop stellt die a-Determinante des kleinen HBsAg dar ⁽⁵⁹⁾. Diese besteht aus zwei Paaren von Subdeterminanten: dy und rw, wobei w in vier weitere Typen eingeteilt werden kann ^(9,135). Ihre

Kombination ergibt die serologischen Hauptsubtypen des HBV, die bestimmten geografischen Gebieten zuzuordnen sind: ayw, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw4 und adr. In Südasien findet man auch seltene Formen wie adwr, adyw oder awr. Derzeit sind 8 Hauptgenotypen des HBV bekannt, welche geografisch wie folgt verteilt sind: A ist pandemisch, B und C sind in Asien, D ist in Südeuropa, E in Afrika, F in den USA und G in den USA und in Frankreich zu finden. Der neue Genotyp H wurde in Zentralamerika identifiziert ⁽⁷⁹⁾. Wie bei allen Hepadnaviren produziert die infizierte Zelle auch beim HBV die Hüllproteine, hier das HBsAg, im Überschuß. Sezerniertes HBsAg organisiert sich in Form sphärischer Partikel von 17-25 nm und Filamente variabler Länge ohne Nukleokapsid. Diese nichtinfektiösen Filamente und sphärischen Partikel stellen das *Australia*-Antigen dar ⁽³³⁾. Das Verhältnis zwischen infektiösen Dane-Partikeln und nichtinfektiösen HBsAg-Partikeln im Plasma beträgt etwa 1:1000. Das Nukleokapsid besteht aus dem phosphorylierten HBcAg und enthält neben dem Genom ein an die HBV-DNA kovalent gebundenes Protein ⁽⁴⁷⁾ sowie eine DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase ^(74,116) mit Proteinkinaseaktivität ⁽¹⁾. Diese dient bei der Replikation selbst als Proteinstartmolekül für die Initiation der DNA-Synthese. Eine ins Plasma sezernierte und verkürzte Form (es fehlen am carboxyterminalen Ende 34-36 Aminosäuren) des HBcAg wird als HBeAg bezeichnet. Das Virus kann durch lipidlösende und organische Lösungsmittel und Detergenzien sowie durch Hitze über 60° inaktiviert werden ⁽⁶⁵⁾.

1.4. Genomorganisation

Das DNA-Genom des HBV ist zirkulär und partiell doppelsträngig organisiert und besteht aus ca. 3.200 Basen bzw. Basenpaaren (Abb. 2) ⁽¹¹⁵⁾.

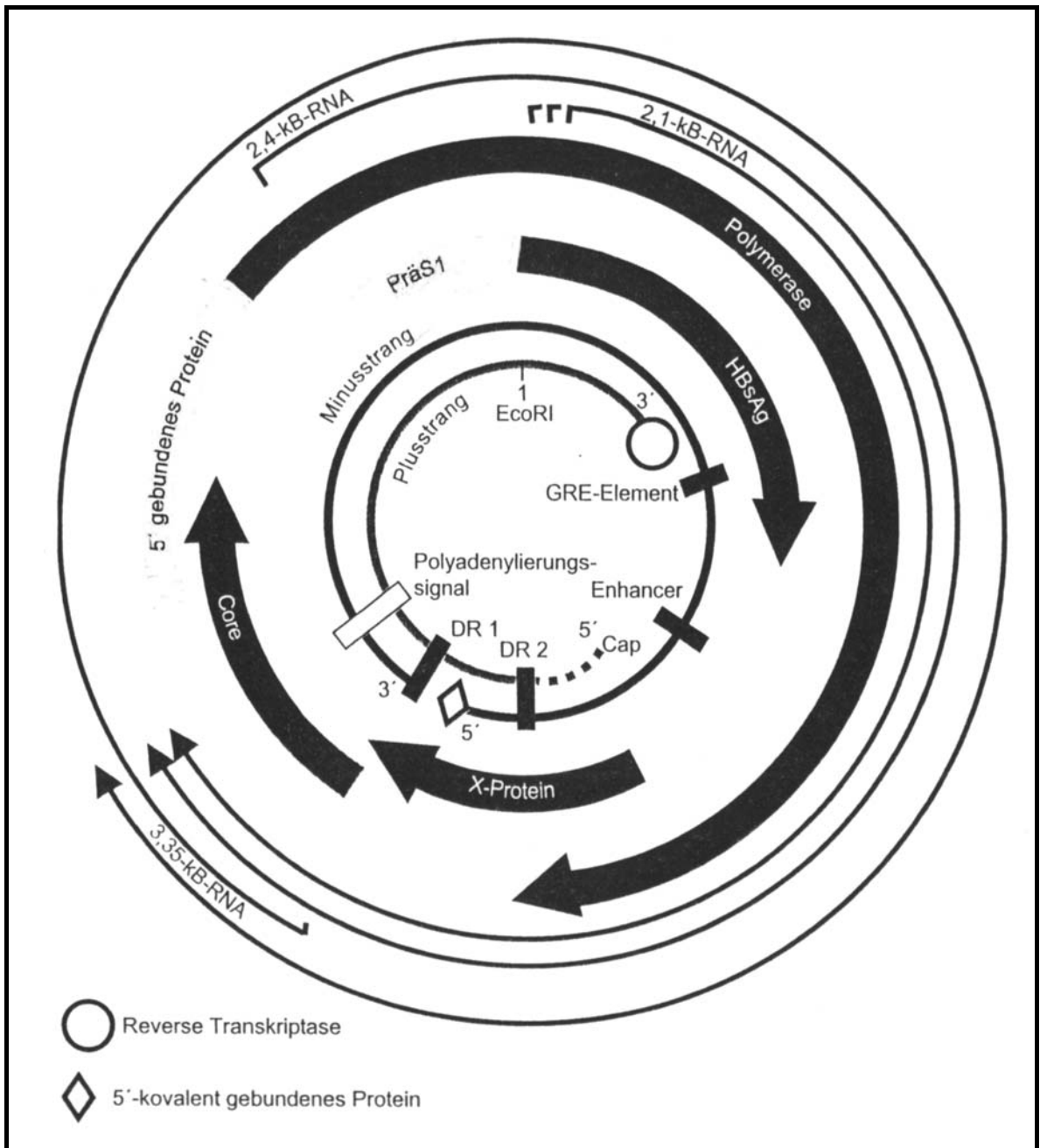


Abb. 2: Aufbau des HBV-Genoms ⁽⁹⁹⁾

Auf dem langen, kompletten Minusstrang befinden sich vier offene, einander überlappende Leseraster ⁽¹³⁵⁾: (1) Das S-Gen mit S-, präS1-, und präS2-Region kodiert für das große, mittlere und kleine HBsAg, (2) das C-Gen mit präC- und C-Region für HBcAg und HBeAg, (3) ein P-Gen, welches die virale DNA-Polymerase kodiert und (4) das X-Gen. Das X-Gen kodiert für ein Protein, welches die Transkription zellulärer Gene aktivieren kann ^(29,127) und für die Entstehung von

Leberzellkarzinomen verantwortlich gemacht wird ⁽⁷⁷⁾. Zusätzlich sind eine Reihe von Wiederholungssequenzen (DR1, DR2), Kontrollsequenzen für die Regulierung der viralen Transkription und drei *messenger* (Boten)-RNA-Klassen (mRNA) auf dem Minus-Strang zu finden. Im PräC-Bereich direkt vor dem X-Gen liegt eine *Enhancer* (Verstärker)-Region für die Transkription des HBV-Genoms. Der vollständige Strang ist nicht geschlossen, sondern hat am 5'-Ende ein virales Protein kovalent gebunden. Am 3'-Ende des unvollständigen Stranges ist die DNA-Polymerase nicht kovalent assoziiert ^(74,116).

Die vor allem in den Leberzellen stattfindende Replikation des viralen DNA Genoms über eine RNA-Zwischenstufe und reverse Transkription ⁽¹³²⁾ könnte auf eine phylogenetische Abstammung von den Retroviren hinweisen ^(98,136). Die Persistenz von HBV-DNA in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC`s) bis 70 Monate nach serologischer Ausheilung einer Hepatitis B wurde von Michalak et al. beschrieben ⁽⁹⁷⁾. In diesen Zellen konnte auch HBV-mRNA nachgewiesen werden ^(96,129).

1.5. Mutationen

Abhängig von der Geschwindigkeit der Replikationszyklen und der Replikationsstrategie entstehen zufällige Ablesefehler, so genannte Mutationen, die zu einem Viruspool führen. Durch positive Selektion der Mutanten oder negative Selektion des Wildtyps erfolgt die Stabilisierung einer Variante innerhalb der Population ⁽⁴⁶⁾. Aufgrund der Replikation des HBV über eine RNA-Zwischenstufe und eine für Hepadnaviren typische hohe Replikationsrate kommt es häufig zu Mutationen. Für alle vier Leserahmen sind die Substitutionsraten bekannt (Tab. 1).

Tab. 1: Variabilität der verschiedenen Hepatitis-B-Virus-Genregionen ⁽⁴⁹⁾

Leserahmen	Anzahl der Codons	Substitutionen pro Nukleotid und Jahr
P	843	$4,57 \times 10^{-5}$
PräS	163	$7,62 \times 10^{-5}$
S	259	$5,75 \times 10^{-5}$
C	212	$5,54 \times 10^{-5}$
X	154	$7,9 \times 10^{-5}$

Die Mutationsfrequenz des HBV ist mit zwei Mutationen pro 10.000 Basen pro Jahr ⁽⁴⁹⁾ geringer als bei RNA-Viren und höher als im menschlichen Erbgut. Durch Austausch einer Base entsteht bei der Punktmutation ein neues Basentriplett, welches für eine andere Aminosäure kodieren kann (*Missense*-Mutation). Bedingt durch die Degeneration des genetischen Codes verschlüsseln mehrere Triplettts eine Aminosäure, so daß eine Punktmutation auch ohne Auswirkung, also „stumm“, ablaufen kann. Durch Entfernung einer Base entsteht eine Leserastermutation mit kompletter Sinnverschiebung. Mutationen im PräS-, und S-Gen des HBV führen zu einem Verlust von B- und T-Zell-Epitopen und können dem Virus durch eine Konformitätsänderung der a-Determinante des HBsAg zu einer „Flucht“ vor dem Immunsystems verhelfen. Diese Mutationen wurden im Zusammenhang mit Impfungen beschrieben ^(25,30,58). Durch Mutationen innerhalb eines Stopcodons im PräC-Gen wird die Bildung von HBeAg trotz Replikation des Virus verhindert. In einer Studie in Deutschland wurden bei mehr als der Hälfte aller HBeAg-negativen, Anti-HBe-positiven HBsAg-Träger solche Mutationen nachgewiesen ⁽⁷⁶⁾. Mutationen im Polymerase-Gen können eine Resistenz des Virus gegenüber einer Therapie mit Nukleosidanaloga bedingen ⁽⁴⁶⁾.

1.6. Übertragungswege

Das Virus wird parenteral (vor allem über Blut), sexuell, oder perinatal übertragen. HBV konnte in allen Körpersekreten (einschließlich Muttermilch) und Exkrementen in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. In Studien ist derzeit nur die Infektiosität von Blut, Vaginal-, Menstruations- und Samenflüssigkeit eindeutig dokumentiert worden. HBV kann direkt durch intravenöse Übertragung von Blut- und Blutprodukten oder indirekt durch den Gebrauch kontaminierter Instrumente wie Nadeln, Nagelscheren oder Rasierapparate übertragen werden ⁽²³⁾. In den Hochendemiegebieten spielen vor allem perinatale Übertragungen eine große Rolle ⁽⁹⁰⁾. In Europa und anderen Industriestaaten steht eher die sexuelle Übertragung im Vordergrund, wie z.B. eine Studie in Schweden 1997 dokumentierte ⁽¹³⁰⁾. Der zweithäufigste Übertragungsweg ist hier der i.v.-Drogenabusus ⁽³²⁾.

1.7. Epidemiologie

Die Hepatitis B stellt ein großes infektiologisches Problem dar. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gibt es heute weltweit mehr als 350 Millionen chronische HBV-Träger ^(79,90). Jährlich versterben etwa zwei Millionen Menschen an den Folgen einer chronischen Hepatitis B ⁽⁹⁵⁾. Der epidemiologische Status eines Landes hängt wesentlich von sozioökonomischen Faktoren, von der Anzahl der Patienten in Risikogruppen, Impfprogrammen und den hygienischen Verhältnissen ab ⁽⁵⁴⁾. Die WHO teilt die Welt entsprechend der Prävalenz chronischer HBsAg-Träger in drei Zonen ein: (1) hohe Prävalenz (>8%), (2) mittlere Prävalenz (2-8%) und (3) niedrige Prävalenz (<2%). Hochendemiegebiete sind Zentralafrika, Südostasien, Zentralasien, der Pazifische Raum (außer Japan, Australien, Neuseeland), das Amazonas-Gebiet, Teile des mittleren Ostens und

einige Länder in Osteuropa. In diesen Ländern sind bis zu 20% der Menschen chronische HBV-Träger. Eine mittlere Prävalenzrate chronischer Virusträger findet man in Nordafrika, im Nahen Osten, in Indien, Südamerika und in weiten Gebieten Osteuropas. Zu den Staaten mit geringer HBV-Prävalenz gehören Nordamerika, West-, Mittel- und Nordeuropa, Australien und Teile Südamerikas. In der Literatur wurde 2001 eine Prävalenz von 0,62% HBsAg-Trägern für die deutsche Population angegeben ⁽⁶⁸⁾. Ein erhöhtes Risiko für eine HBV-Neuinfektion haben Angehörige so genannter Risikogruppen. Entsprechend der „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ ⁽⁸⁾ sind Personen als Blutspender auf Dauer auszuschließen, „die einer Gruppe mit einem gegenüber der Allgemeinbevölkerung deutlich erhöhten Risiko für eine HBV-, HCV- oder HIV-Infektion angehören oder dieser zugeordnet werden müssen“. Dazu zählen „homo- und bisexuelle Männer, Drogenabhängige, männliche und weibliche Prostituierte, Häftlinge und Einwanderer aus Ländern mit einer hohen Rate an Infektionen mit diesen Viren“. Gefährdet sind aber auch Empfänger von Blut- und Blutprodukten, Dialysepatienten, Berufsgruppen im medizinischen Bereich und Rettungsdienst, geistig Behinderte in Heimen, Menschen mit engem Kontakt zu HBsAg-Trägern, Reisende in Endemiegebiete mit engem Kontakt zur Bevölkerung und Neugeborene HBsAg-positiver Mütter.

1.8. Pathogenese

Das Virus gelangt von der Eintrittsstelle über die Blutbahn zur Leber. Das HBV selbst ist nicht zytopathogen, sondern die Leberzellschädigung wird durch die Immunreaktion des Wirtes ausgelöst. CD8-positive Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) führen zur Apoptose der infizierten Hepatozyten bzw. produzieren zellschädigende Zytokine, die zum fibrotischen Leberumbau führen. B-

Lymphozyten induzieren die Bildung der Antikörper Anti-HBc, Anti-HBs und Anti-HBe⁽⁷¹⁾.

1.9. Klinischer Verlauf

Die Inkubationszeit der Hepatitis B beträgt 45-180 Tage. Zwei Drittel der Infektionen bei gesunden Erwachsenen mit geringer Viruslast und früher Immunantwort verlaufen selbstlimitierend und asymptomatisch⁽²³⁾. Bei größerer Viruslast (z.B. i.v.-Übertragung) und späterer Immunantwort entwickelt sich nach einem grippeähnlichen Prodromalstadium eine akute Hepatitis, die bis zu vier Wochen andauern kann. Typische klinische Symptome sind Ikterus, Juckreiz und Exantheme. Durch die Ablagerung von Immunkomplexen können auch Gelenkbeschwerden auftreten. Fulminante oder tödliche Verläufe einer akuten Hepatitis durch Leberversagen sind selten (0,1 -1%). Bessert sich der Zustand des Patienten nach maximal vier Wochen nicht, muß man von einem Übergang in eine chronische Verlaufsform ausgehen. Die chronische Hepatitis B ist definiert durch eine fehlende klinische bzw. serologische Ausheilung innerhalb von sechs Monaten. 5-10% aller Hepatitis B-Infizierten werden chronische HBsAg-Träger, die entweder gesund sind oder eine chronische Hepatitis entwickeln. Säuglinge haben und Kleinkinder haben ein erhöhtes Risiko, da das Virus hier auf einen immunologisch noch nicht ausgereiften Organismus trifft. Chronische Verläufe sind außerdem häufig bei Immunsupprimierten, wie Nierentransplantierten, Hämodialysepatienten und Drogenabhängigen, zu finden. Bis zu 70-90% der chronischen HBsAg-Träger bleiben klinisch „gesund“. Das Risiko, an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken, ist bei diesen Personen erhöht. 10-30% der Infizierten entwickeln eine chronisch persistierende oder aktive Hepatitis mit den Folgen einer Leberzirrhose (<15%) oder eines HCC (0,5%).

Selten treten im Rahmen einer Hepatitis auch Immunkomplexerkrankungen (Periarteritis nodosa, Glomerulonephritis) auf ⁽⁵⁴⁾.

Wenn die Immunantwort des Wirtes ausbleibt oder zu gering ist, zeigt sich trotz hoher Virämie nur eine schwach ausgeprägte Klinik. Im Plasma dieser immuntoleranten Individuen werden bis zu 10^9 - 10^{10} HBV-Genomäquivalente (geq) pro Milliliter (ml) nachgewiesen ⁽²³⁾.

1.10. Diagnostik

1.10.1. Serologische Diagnostik der HBV-Infektion

Im Serum oder Plasma können sechs HBV-Marker bestimmt werden: die HBV-DNA, das HBsAg, das HBeAg sowie die Antikörper Anti-HBc, Anti-HBe und Anti-HBs. Unter serologischer Diagnostik im engeren Sinne versteht man die auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhenden Methoden zum Nachweis von Virusantigenen sowie von Antikörpern gegen Virusantigene. In Abb. 3 sind die serologischen Marker entsprechend ihrer Nachweisbarkeit im zeitlichen Verlauf der akuten HBV-Infektion dargestellt. Der Nachweis von HBsAg gilt als beweisend für das Vorhandensein von HBV in der Leber und für eine bestehende Infektion. Es ist als erstes Antigen bei akuten oder chronischen Infektionen nachweisbar. HBsAg ist bereits mehrere Tage vor Ausbruch der klinischen Symptomatik positiv und erreicht seine höchsten Konzentrationen mit dem Auftreten typischer Symptome. In der Frühphase, bis zu 8 Wochen nach der Infektion, wenn der HBsAg-Titer $<10^6$ Einheiten/ml (U/ml) beträgt oder bei Mutationen im S-Gen sind HBsAg-Tests häufig falsch negativ ⁽⁶⁸⁾. Das HBeAg ist die ins Plasma sezernierte, verkürzte Form des HBcAg und korreliert in hohem Maße mit dem Vorhandensein von infektiösen Viruspartikeln. Der im zeitlichen Verlauf zuerst nachweisbare Antikörper ist das Anti-HBc. Das Anti-HBc-IgG bleibt nach Infektion lebenslang

positiv und zeigt somit in jedem Fall die stattgefundene HBV-Infektion an. Das Anti-HBe tritt nach Verschwinden des HBeAg auf und wird mit Sistieren der Virusreplikation und einer verminderten Krankheitsaktivität interpretiert. Anti-HBs tritt nach Verschwinden des HBsAg auf und wird im Verlauf als letzter Antikörper nachweisbar ⁽²³⁾.

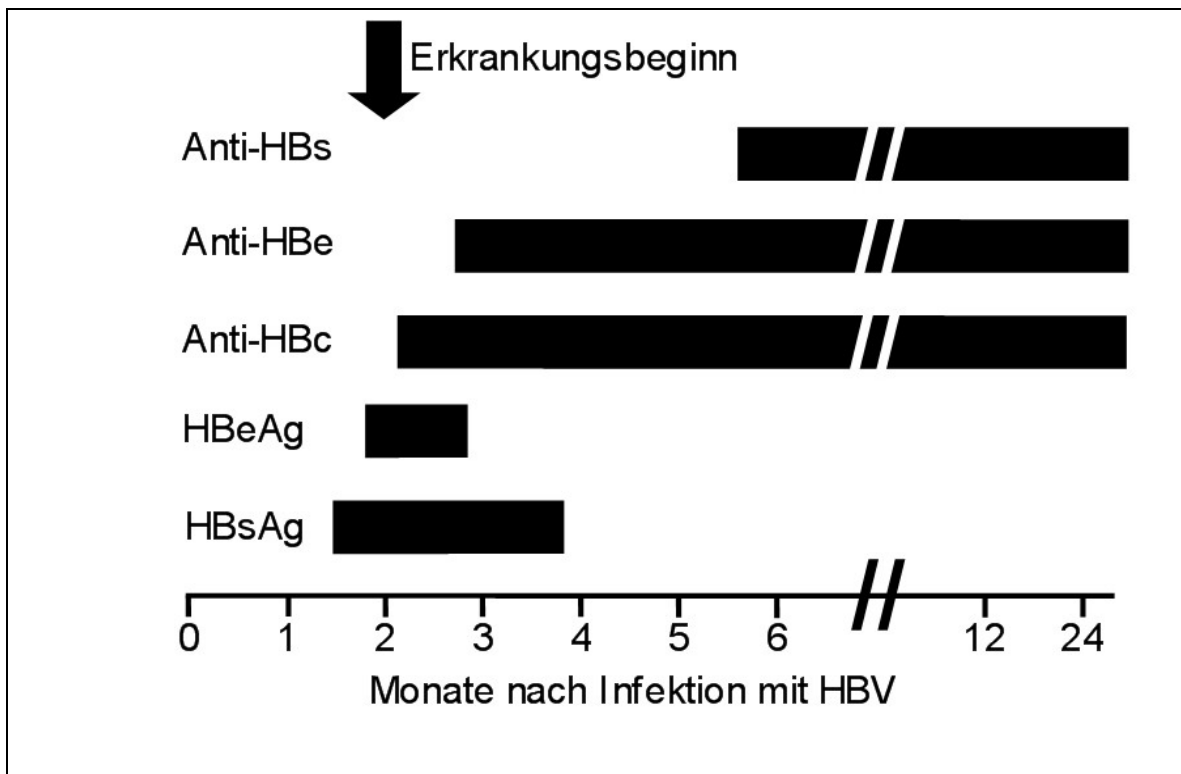


Abb. 3: Serologische Marker im Verlauf der akuten HBV-Infektion

Nach bisheriger Lehrmeinung signalisiert die vollständige Serokonversion eine endgültige Viruselimination, das Ende der Infektiosität sowie neutralisierende Immunität. Anti-HBs dient auch als Impfmarker, da die aktiven Immunisierungen mit rekombinant hergestelltem HBsAg erfolgen. Ein direkter Nachweis der HBV-DNA ist durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) möglich. Die HBV-DNA ist im Infektionsverlauf bereits vor dem Nachweis von HBsAg detektierbar.

1.10.2. Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1985 als schnelle und hochsensitive Methode zum Nachweis von DNA eingeführt ⁽¹²²⁾. Das Grundprinzip besteht in der In-vitro-Vervielfältigung (Amplifikation) einer DNA-Ziel-Sequenz. Durch das Wiederholen der Reaktions-Zyklen steigt die Anzahl der kopierten DNA-Abschnitte (Amplifikate) exponentiell an. Dabei laufen grundsätzlich folgende Teilreaktionen ab: (1.) Durch Temperaturanstieg auf 95 Grad Celsius (°C) wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge „aufgeschmolzen“ (denaturiert). (2.) Bei Absinken der Temperatur konkurrieren im Überschuß eingesetzte Oligonukleotide (*Primer*), die eine gegenläufige und komplementäre Sequenz zur Ziel-DNA haben, mit dem Gegenstrang um die Bindung (Hybridisierung) an die Ziel-DNA. (3.) Ausgehend von den *Primern* werden durch eine Polymerase die Nukleotide mit den Basen Adenin (A), Thymin (T) oder Uracil (U), Cytosin (C) und Guanin (G) in 5'→3'-Richtung komplementär zum Einzelstrang hinzugefügt (Extension). Dabei entsteht eine durch die jeweiligen *Primer* definierte verkürzte Kopie des Matrizenstranges. Ein PCR-Zyklus umfaßt die Schritte Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation. Die Vervielfältigung der Zielsequenz erfolgt exponentiell, weshalb sie auch als „Kettenreaktion“ bezeichnet wird.

Zunächst wurde das so genannte *Klenow-Fragment* der *Escherichia-coli*-DNA-Polymerase-I für den Extensionsschritt eingesetzt. Bei Temperaturerhöhung über 90 °C wurde diese Polymerase inaktiviert und mußte deshalb vor jedem Zyklus erneut zugegeben werden ⁽¹⁰²⁾. Einen Durchbruch brachte die Entdeckung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) ⁽¹²¹⁾. Sie wurde *Taq*-Polymerase genannt und wird heute rekombinant hergestellt. Bei Temperaturen über 90°C wird sie irreversibel aktiviert und hat eine Halbwertszeit von 35 Minuten (min) bei Temperaturen über 95 °C. Die

PCR wurde durch den Einsatz so genannter *Thermocycler*, die verschiedene Temperaturschritte steuern können, automatisiert. Zum Nachweis der Amplifikate waren jedoch noch aufwendige Schritte, wie z.B. Agarose-Gel-Färbungen, nötig. Eine strikte räumliche Trennung von Prä- und Post-PCR-Arbeiten ist einzuhalten, um Kontaminationen zu vermeiden.

Eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR gelang mit der so genannten *TaqMan*-PCR (Abb. 4). Sie ist ein Verfahren, bei dem gleichzeitig mit der Amplifikation der DNA der Nachweis der PCR-Produkte möglich ist. Ein weiteres zur Ziel-DNA komplementäres Oligonukleotid (Sonde) hybridisiert innerhalb der beiden *Primer* an einen der beiden DNA-Stränge. Wenn in der Extensionsphase die Polymerase die *Primer* verlängert, trifft sie an einem Strang auf die hybridisierte Sonde und löst die ersten Nukleotide des 5'-Endes der Sonde mechanisch ab. Durch die nun entstandene Y-Struktur wird die 5'→3'-Exonuklease aktiviert, welche die sich ablösende Sonde hydrolytisch spaltet. Die freien Sonden hingegen werden von der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase nicht hydrolysiert. Zunächst benutzte man radioaktiv (⁵²P) markierte Sonden. Im Anschluß an die PCR wurden mittels einer Dünnschichtchromatographie Sondenfragmente und intakte Sonden voneinander unterschieden ⁽⁶³⁾. Lee et al. entwickelten Sonden, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert wurden, einem *Reporter* am 5'-Ende und einem *Quencher* am 3'-Ende ^(82,83). Durch Licht einer spezifischen Wellenlänge werden die beiden Farbstoffe der Sonde zur Fluoreszenz angeregt. Sie emittieren jedoch Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenzenergie des *Reporters* auf den *Quencher* übertragen, wodurch das Reportersignal unterdrückt wird ⁽⁴⁵⁾. Durch die Spaltung der Sonde während der

Extension wird die Verbindung zwischen *Reporter* und *Quencher* getrennt und somit der Energietransfer unterbrochen.

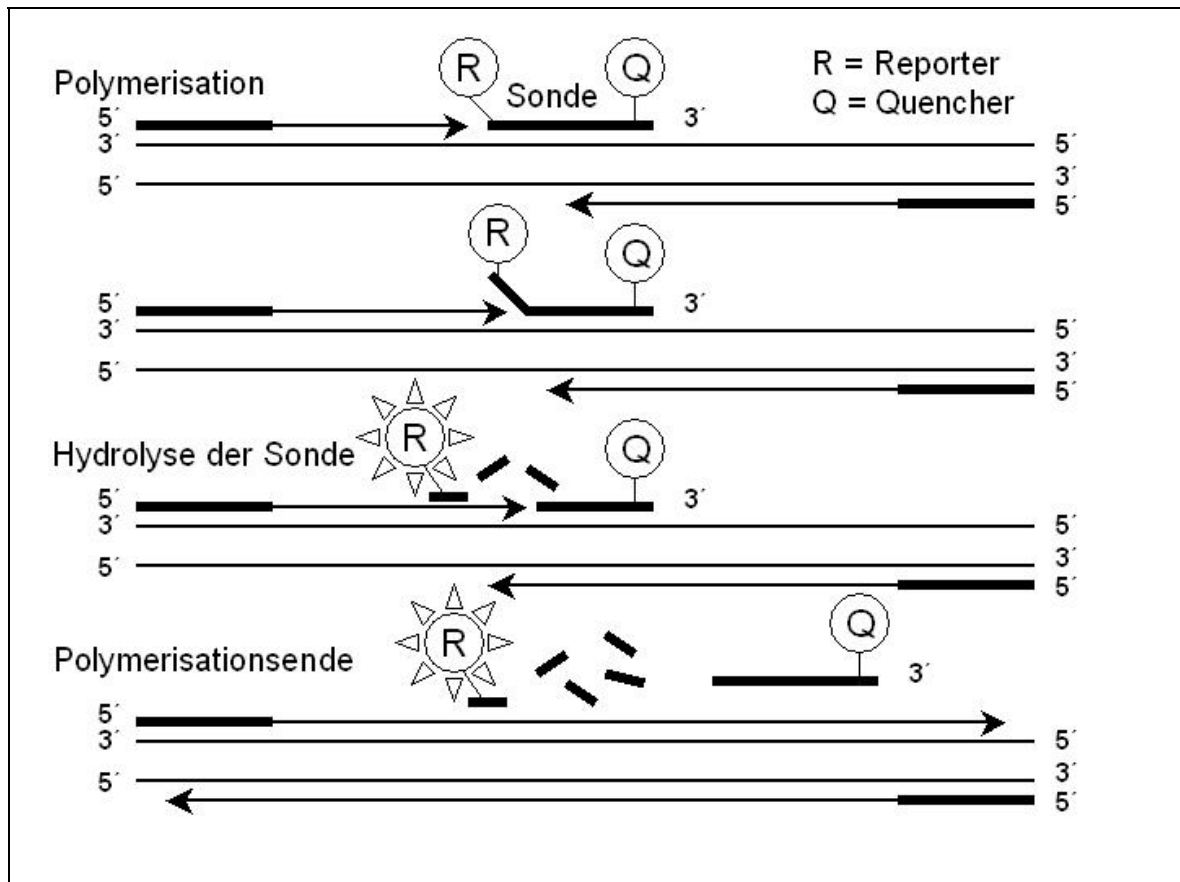


Abb. 4: Prinzip der *TaqMan*-PCR ⁽⁸³⁾

Die Fluoreszenz des *Reporters* steigt im Verlauf der PCR direkt proportional zur Akkumulation von PCR-Produkten an. Das Signal ist sequenzspezifisch, da nur stabil hybridisierte Sonden von der 5'→3'-Exonuklease gespalten werden. In der Extensionsphase eines jeden PCR-Zyklus wird so durch Hydrolyse der fluorogenen Sonde ein sequenzspezifisches Signal generiert, welches durch den Fluoreszenz-Detektor eines entsprechenden Gerätes während der PCR aufgezeichnet wird. Ein Spektrograph trennt *Reporter*- und *Quencher*-Fluoreszenz je nach Wellenlänge. Diese Daten werden dann durch eine Kamera in digitale Signale umgewandelt und aufgezeichnet ⁽⁶⁰⁾. Durch die Entwicklung spezieller optischer Reaktionsgefäße mit strahlendurchlässigem Verschluss,

können die Fluoreszenzdaten im geschlossenen Gefäß analysiert werden. Grundlage des PCR-Ansatzes bildet ein so genannter *Master Mix*, der Nukleotidtriphosphate, eine hitzestabile *DNA Polymerase* und Uracil-N-glycosylase (UNG) enthält. Die UNG kann die Reamplifizierung eines Amplifikates früherer PCR-Reaktionen verhindern, indem sie das anstelle von Thymin verwendete Uracil aus der DNA durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat herauslöst ⁽⁸⁴⁾. Zusätzlich enthält der *Master Mix* einen fluoreszierenden Farbstoff, der nicht an der PCR teilnimmt. Dieser Farbstoff stellt eine interne Referenz dar, über welche dann das Signal des *Reporters* normalisiert werden kann. Dadurch können Fluoreszenzschwankungen ausgeglichen werden, die z.B. durch Pipettierfehler (Volumenabweichungen) entstehen. Diese Normalisierung erfolgt durch Division der Fluoreszenzintensität des *Reporters* durch die Emissionsintensität der internen Referenz, wodurch man das so genannte normalisierte Reportersignal (R_n -Wert) erhält. Mit dem ΔR_n -Wert können Streufaktoren, die nicht unbedingt PCR-abhängig sind, z.B. eine Autofluoreszenz der Sonde, ausgeglichen werden. Der ΔR_n -Wert wird berechnet, indem das während der ersten PCR-Zyklen im jeweiligen Reaktionsgefäß gemessene Hintergrundsignal vom entsprechenden R_n -Wert abgezogen wird. Wenn der ΔR_n -Wert nach einer bestimmten Zyklenzahl die Grenzwertlinie schneidet, wird der so genannte Schwellenzyklus (*threshold cycle*, C_T -Wert) erreicht. Durch die Berechnung der C_T -Werte ist es möglich, mit Hilfe von Standardkurven Nukleinsäuremoleküle in jeder einzelnen Probe zu quantifizieren. Durch die Entsorgung geschlossener Reaktionsgefäße wird die Kontamination des Labors mit PCR-Produkten verhindert. Außerdem entfallen durch die Analyse der Fluoreszenzspektren aufwendige Post-PCR-Schritte zum Nachweis von PCR-Produkten.

1.11. Problematik in der Transfusionsmedizin

Seit Einführung des HBsAg-Testes 1970 konnte das Risiko einer Posttransfusionshepatitis B in den USA auf 1:58.000-149.000 im Jahr 2001 gesenkt werden. Das Risiko ist aber im Vergleich zum HIV- oder HCV-Übertragungsrisiko (<1:1.000.000) noch relativ hoch ⁽⁵¹⁾. Eine Arbeit des Robert-Koch-Institutes errechnete für Deutschland in den Jahren 2000-2002 ein HBV-Übertragungsrisiko durch Bluttransfusionen von 1:230.000-560.000 und für HIV/HCV <1:4.000.000 ⁽¹⁰⁶⁾. In einigen Ländern wird der Anti-HBc-Test als so genannter Surrogat-Marker zur Erkennung von Spendern mit allgemein höherem Risiko für Virusinfektionen verwendet. In Deutschland ist keine allgemeine Anti-HBc-Testung aller Blutspenden vorgeschrieben, so daß hier die HBV-Neuinfektion eines Blutspenders übersehen werden kann, wenn der Zeitraum des Auftretens und möglichen Nachweises von HBsAg zwischen zwei Blutspenden liegt. Eine diagnostische Lücke besteht in der Frühphase der Infektion bevor der Nachweis von HBsAg möglich wird. Bisher bestand ein allgemeiner Konsens darin, daß mit Verschwinden des HBsAg und dem Auftreten von Anti-HBs bzw. aller drei Antikörper Immunität vorliegt. Die Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBe im Verlauf der HBV-Infektion wurde mit Einstellung der Virusreplikation und dem Ende der Infektiosität interpretiert.

In der Zwischenzeit ist eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten erschienen, die diese klassischen Befundinterpretationen der HBV-Serologie widerlegt haben, da bei Patienten und Blutspendern mit den serologischen Zeichen einer bisher als ausgeheilt interpretierten HBV-Infektion (Anti-HBc-, Anti-HBe- und Anti-HBs-positiv) noch HBV-DNA im Blut bzw. in den Hepatozyten nachgewiesen wurde ^(21,50,61,72,85,89,109,142). Blum et al. beschrieben 1988 den Nachweis des vollständigen HBV-Genoms in Leberzellen eines HBsAg-negativen und für alle drei Antikörper

positiven Patienten ⁽¹⁷⁾. Michalak et al. wiesen bei einem Patienten 70 Monate nach kompletter klinischer, biochemischer und serologischer Ausheilung HBV-DNA im Serum und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach ⁽⁹⁷⁾. Auch Rehermann et al. beschrieben den häufigen Nachweis von kleinen Mengen an HBV-DNA viele Jahre nach klinischer Ausheilung der akuten Hepatitis trotz Vorhandenseins von Antikörpern und spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten ⁽¹¹³⁾. Von einer Ausheilung der HBV-Infektion kann spätestens nach der Arbeit von Paschetto et al., die das Überleben von replizierenden HBV-Partikeln nach der T-Zell-induzierten Apoptose von Leberzellen in vitro zeigten, nicht mehr ausgegangen werden ⁽¹⁰⁸⁾. Die Viren scheinen somit der Immunantwort entgehen zu können, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen Virusreplikation und T-Zell-Antwort, jeweils auf niedrigem Niveau, über Jahrzehnte, vielleicht sogar ein Leben lang, einzustellen scheint ⁽¹¹³⁾. Bestätigt werden diese Arbeiten von Studien, in denen bei Patienten und gesunden Individuen nach dem Verschwinden von HBsAg aktive Virusreplikation im Lebergewebe nachgewiesen wurde ^(86,93,94). Besonders interessant ist die beschriebene Reaktivierung der HBV-Infektion bei medikamentös immunsupprimierten Patienten nach Nieren- oder Knochenmarkstransplantation bzw. unter Chemotherapie ^(37,88,92,104). Dabei konnte sogar in einigen Fällen die reverse Serokonversion von Anti-HBs zu HBsAg beobachtet werden ^(37,88). Dai et al. zeigten bei einem Patienten mit schwerer aplastischer Anämie eine signifikante Übereinstimmung zwischen aktiven Phasen der chronischen Hepatitis und der absoluten Lymphozytenzahl ⁽³¹⁾. Es konnte auch gezeigt werden, daß Blutspenden von HBsAg-negativen, Anti-HBs-negativen aber Anti-HBc-positiven Trägern eine Posttransfusionshepatitis auslösen können ^(80,105). Trotzdem werden nach den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ ⁽⁸⁾ noch

immer Personen, die eine Hepatitis B durchgemacht haben, zur Blutspende zugelassen, sofern die Infektion mehr als 5 Jahre zurückliegt und virologische Kriterien (z.B. Nachweis von Anti-HBs mit einem Titer von ≥ 100 E/l und negatives Ergebnis eines Tests auf HBV-Genom mittels einer empfindlichen Nukleinsäure-Amplifikationstechnik) für eine angeblich erloschene Kontagiosität sprechen.

1.12. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Prävalenz von Anti-HBc bei Neuspendedern in Lübeck. Außerdem sollte eine repräsentative Studie zur Häufigkeit von HBV-DNA im Plasma von Anti-HBc-positiven Neuspendedern mittels einer sensitiven PCR durchgeführt werden. Hierfür war es notwendig, eine neue *TaqMan*-PCR zum Nachweis von HBV-DNA zu entwickeln und in Zusammenhang mit einem geeigneten Verfahren zur Nukleinsäureisolation aus relativ großen Plasmavolumina zu optimieren. Nachfolgend war die Frage zu beantworten, wie effizient eine Routine-Anti-HBc-Testung im Vergleich zur aufwendigen und kostenintensiven PCR-Testung aus Einzelspenden das Übertragungsrisiko einer HBV-Infektion durch Blutspenden in Lübeck senken könnte.

Die oben genannten Studien führten auch zu der Frage, ob ein Anti-HBs-Titer >100 U/l und ein negativer HBV-DNA Nachweis zuverlässig eine erloschene Kontagiosität nach abgelaufener HBV-Infektion anzeigen können, bzw. ob Proben mit einem Anti-HBs-Titer >100 U/l in der PCR immer HBV-DNA-negativ sind.

Abschließend ist zu beurteilen, ob die Kriterien zur zeitlichen Zurückstellung von Blutspendedern nach abgelaufener HBV-Infektion in den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“⁽⁸⁾ neu bewertet werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Testkits und Reagenzien

HBV- Serologie:

HBsAg: Ortho *Antibody to HBsAg ELISA* Test System 3 (Ortho Diagnostic Systems GmbH, Neckargemünd, Deutschland);

AxSYM HBsAg (V2) (Abbott GmbH, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland);

AxSYM HBsAg *Confirmatory Assay* (Abbott GmbH)

HBeAg: AxSYM HBeAg (Abbott GmbH)

Anti-HBc: AxSYM *Core* (Abbott GmbH);

AxSYM *Core-M* (Abbott GmbH);

Enzygnost Anti-HBc *monoclonal* (Dade Behring GmbH, Liederbach, Deutschland)

Anti-HBe: AxSYM Anti-HBe (Abbott GmbH)

Anti-HBs: AxSYM AUSAB (Abbott GmbH)

Nukleinsäureisolation:

NucliSens Automated Isolation Reagents (BioMérieux Deutschland GmbH,

Nürtingen, Deutschland)

TaqMan-HBV-PCR:

TaqMan[®] *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Primer (Tab. 2) synthetisiert von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland)

TaqMan Sonde (Tab. 2) synthetisiert von Applied Biosystems

TaqMan β -actin Control Reagents (PE Biosystems, Foster City, California, USA)

2.1.2. Geräte und Zubehör

Sterile Werkbank Lamin Air (Heraeus, Hamburg, Deutschland)

AxSYM-System (Abbott GmbH)

NucliSens Extractor (BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland)

ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

Gefrierschrank UF 85-3005 (Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland)

Zentrifuge Rotanta (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Zentrifuge Rotixa (Hettich)

Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Wasserbad Julabo SW 20 C (Julabo, Seebach, Deutschland)

Thermomixer Comfort 5436 (Eppendorf)

Alublock (Hassa Laborbedarf, Lübeck, Deutschland)

Tischzentrifuge Biofuge A (Heraeus)

Vortexer Reax 2000 (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)

MicroAmp *Optical Tubes/Caps* (PE Biosystems)

NucliSens Extractor *Cartridges* (BioMérieux Deutschland GmbH)

Pipetten 10 µl, 100 µl (BIOzym Diagnostic GmbH, Oldendorf, Deutschland)

Pipetten 1000µl (*Molecular BioProducts*, San Diego, California, USA)

2.1.3. Blutproben

Die Blutspender waren zwischen 18 und 67 Jahren alt und erfüllten die Spenderauswahlkriterien der „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“⁽⁸⁾.

Unter Neuspendern verstehen wir Erstspendewillige, die sich einer Aufnahmeuntersuchung unterziehen, aber noch nicht regulär Blut spenden.

Dauerspender dagegen sind Blutspender, die mehr oder weniger regelmäßig am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums

Schleswig-Holstein, Campus Lübeck Blut spenden, und deren Laboruntersuchungen anlässlich der letzten Blutspende bzw. der Neuspender-Aufnahmeuntersuchung unauffällig für folgende Parameter waren: Anti-HIV, HBsAg, Anti-HCV, HCV-RNA, Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Treponema pallidum.

Im 5-Jahres-Zeitraum von 1997 bis 2001 wurden insgesamt 14.251 Neuspender der Blutspendezentrale des oben genannten Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin auf Anti-HBc getestet. Hierfür wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Vollblut (Monovette 5,5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet, welches nach Probenentnahme für 4 min bei 3291g zentrifugiert wurde. Die Plasmaproben wurden innerhalb von 24 Stunden (h) nach Blutentnahme separiert und bei 4-8 °C aufbewahrt. Wenn die weitere Verwendung erst später als 72 h nach Probenentnahme erfolgte, wurden sie bei -30°C eingefroren. Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Neuspender ist in Abb.5 dargestellt.

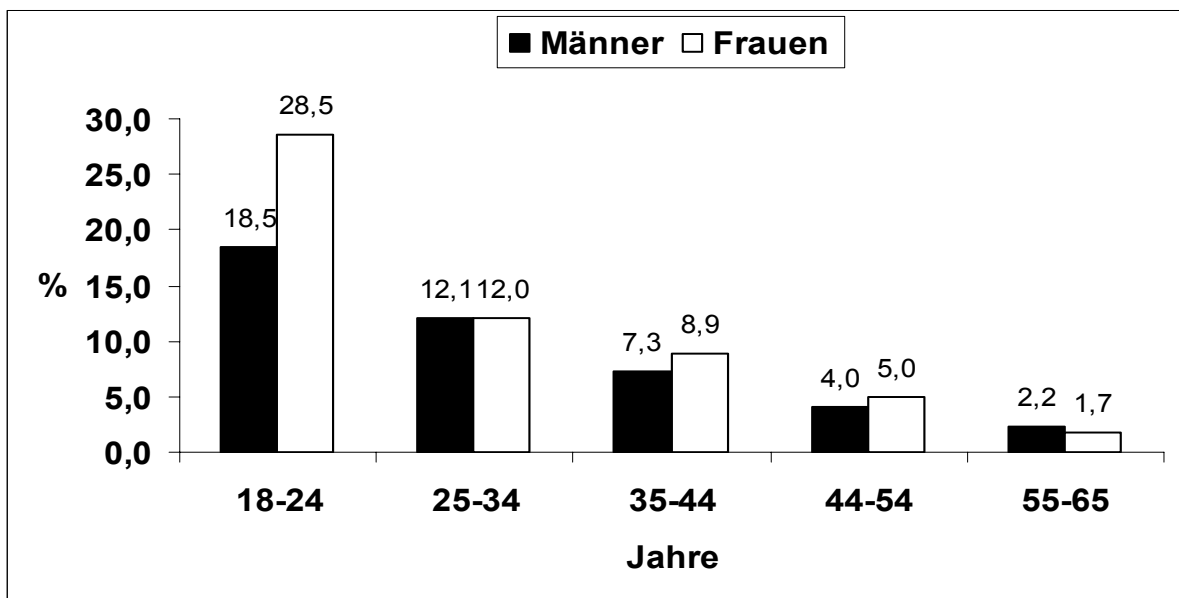


Abb. 5: Alters- und Geschlechtsverteilung der Neuspenderpopulation

2.1.4. Standard- und Kontrollproben

Für die Entwicklung und Optimierung der *TaqMan*-HBV-PCR wurden lyophilisierte Plasmaproben aus Ringversuchen (INSTAND e.V., Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Methode und zur Quantifizierung positiver Proben in Internationalen Einheiten HBV-DNA pro Milliliter (IU/ml) Plasma verwendeten wir den ersten WHO-Standard für HBV-DNA-Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (Code 97/746) von Dr. John Saldanha (NIBSC, Herts, Großbritannien) ⁽¹²³⁾.

2.1.5. Computerprogramme

OMIGA 2.0 (Oxford Molecular, Oxford, Großbritannien)

Primer Express (Applied Biosystems)

SPSS 9.0 für Windows (SPSS GmbH, München, Deutschland)

2.2. Methoden

2.2.1. HBV-Serologie

Vorgehensweise:

Zunächst wurden alle Proben mittels des *Ortho Antibody to HBsAg Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Test System 3* auf HBsAg und mit dem Mikropartikel-*ELISA AxSYM Core* auf das Vorhandensein von Anti-HBc getestet. Positive Proben wurden im gleichen Testsystem im Doppelansatz erneut getestet. Wiederholt positive Proben wurden dem zweiten HBsAg- bzw. Anti-HBc-Test mit anderem Testprinzip sowie einer vollständigen Hepatitis B-Serologie unterzogen. Positive Befunde für HBsAg wurden immer mit dem Neutralisationstest bestätigt.

Ortho Antibody to HBsAg ELISA Test System 3:

Der Test wird zweizeitig in Anti-HBs-beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach Zugabe des Antikörperkonjugats und der Probe bindet das eventuell vorhandene HBsAg an das Anti-HBs auf der Platte. Gleichzeitig bindet sich das Antikörperkonjugat an das HBsAg. Dabei entstehen immobilisierte Antikörper-HBsAg-Konjugatkomplexe. Die ungebundenen Proben- und Konjugatanteile werden ausgewaschen. Im zweiten Schritt wird ein Substrat dazugegeben. Bei Vorhandensein der Komplexe kommt es zu einer Farbreaktion, welche mit dem Photometer gemessen wird und in direktem Zusammenhang mit der Menge des gebundenen HBsAg steht. Die Sensitivität der Methode liegt bei 100 %, die Spezifität bei 99,94 %.

AxSYM HBsAg (V2); AxSYM HBe; AxSYM Core; AxSYM Core-M; AxSYM Anti-HBe; AxSYM AUSAB (Abbott GmbH):

Diese Tests funktionieren nach dem Prinzip eines Mikropartikel-Enzym-Immunoassays (MEIA). Die für den jeweiligen Test benötigte Probe und alle Reagenzien, wie Probenverdünnungsmittel und mit dem jeweiligen Hepatitis B-Antigen bzw. Antikörper beschichtete Mikropartikel, werden vom Laborautomaten in verschiedene Vertiefungen eines Reaktionseinsatzes pipettiert und vermischt. Ist der gesuchte Antikörper bzw. das gesuchte Antigen in der Probe vorhanden, bindet sich dieser an die mit den korrespondierenden Antigenen bzw. Antikörpern beschichteten Mikropartikel und bildet Antigen-Antikörper-Komplexe. Ein Teil des Reaktionsgemisches wird dann auf die Matrixzelle überführt. Dort werden die Mikropartikel irreversibel an eine Glasfibrermatrix gebunden. Nun wird ein Konjugat aus Antikörpern und alkalischer Phosphatase auf die Matrixzelle pipettiert, welches die noch freien Bindungsstellen des darauf befindlichen Antigens bzw. Antikörpers besetzt. Nach einem Waschschrift, der ungebundenes Material entfernt, wird das Substrat 4-Methylbelliferylphosphat dazugegeben. Die alkalische Phosphatase des Konjugates katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes vom Substrat, wodurch das fluoreszierende Produkt 4-Methylbelliferon entsteht, welches optisch messbar wird. Die Testauswertung erfolgt durch Vergleich der Fluoreszenz des Produktes mit einem Grenzwert, welcher an Hand von Kalibratoren bestimmt wird. Die Spezifität und Sensitivität der Tests liegen bei 99,9-100 %.

AxSYM HBsAg *Confirmatory Assay* (Neutralisationstest) :

Der Neutralisationstest dient der Bestätigung positiver Resultate im HBsAg-Test und beruht auf der Technologie des MEIA. Im Unterschied zum AxSYM-HBsAg-Test wird die Probe vor der Durchführung mit dem Antikörper gegen HBsAg (Reagenz A) oder rekalkifiziertem Plasma (Reagenz B) behandelt. Dabei wird die Probe unverdünnt und 1:500 verdünnt eingesetzt. Enthält die Probe HBsAg, wird dieses durch den Antikörper in Reagenz A neutralisiert. Im nächsten Schritt werden mit Anti-HBs beschichtete Mikropartikel und eine Lösung mit Biotin-markierten Anti-HBs hinzugegeben. Nicht neutralisiertes HBsAg der Probe bindet an die beschichteten Mikropartikel und an das mit Biotin markierte Anti-HBs und bildet Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe. Ein Teil des Gemisches wird auf die Matrixzelle überführt, wo die Mikropartikel irreversibel an eine Glasfibrermatrix gebunden werden. Ein Konjugat aus Alkalischer Phosphatase wird auf die Matrixzelle pipettiert und bindet an die Mikropartikel gebundenen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach einem Waschschrift wird das Substrat 4-Methylbelliferylphosphat dazugegeben. Das mit alkalischer Phosphatase markierte Konjugat katalysiert die Abspaltung einer Phosphatgruppe vom Substrat, wobei ein fluoreszierendes Produkt entsteht, welches optisch gemessen wird. Nachweis von nicht neutralisiertem HBsAg in der Probe erfolgt durch den Vergleich der Bildungsrate an fluoreszierendem Produkt mit einem kalibrierten Grenzwert. Wenn der Wert des fluoreszierenden Produktes in der nicht neutralisierten Probe größer oder gleich dem Grenzwert ist und sich der Wert der neutralisierten Probe um mindestens 50% verringert hat, handelt es sich um eine für HBsAg tatsächlich positive Probe.

Enzygnost Anti-HBc *monoclonal*, Dade Behring:

Der ELISA dient dem Nachweis von Anti-HBc. An der Oberfläche einer Mikrotiterplatte wurde HBcAg fixiert. Das Anti-HBc der Probe konkurriert mit dem Herstellerkonjugat um die Bindungsstelle. Die Vertiefungen werden ausgewaschen und die Enzymaktivität der Peroxidase bestimmt. Aufgrund des kompetitiven Prinzips ist die Anti-HBc-Konzentration der Probe der Intensität der Farbe umgekehrt proportional. Die Nachweisgrenze dieses verwendeten Anti-HBc-Tests liegt bei 0,2-1,2 IU/ml. Die Sensitivität beträgt 96,9-100 %, die Spezifität 99,13-99,58 %.

2.2.2. Nukleinsäureisolation

Die Isolation der Gesamt-Nukleinsäuren aus 1-2ml EDTA-Plasma erfolgte nach Boom mit dem NucliSens Extractor ^(14,20,70). Die Methode nutzt das chaotrope Agens Guanidinthiozyanat zur Lyse der Zellen bzw. Viruspartikel. Die freigesetzten Nukleinsäuren werden danach an eine feste Phase in Form von Silica-Partikeln gebunden. Um die Ausbeute an Nukleinsäuren zu erhöhen, fügten wir einen zusätzlichen Inkubationsschritt ein. Das EDTA-Plasma wurde mit dem Lysepuffer bei 60°C unter horizontalem Schütteln (110 min^{-1}) für 30 min inkubiert. Die weitere Isolation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers für Proben von 200-2.000 µl im Gerät. Die Nukleinsäuren aus 1-2 ml Plasma wurden in 50 µl Elutionspuffer gelöst, wovon 20µl des Eluates im PCR-Ansatz eingesetzt wurden, um HBV-DNA nachzuweisen. Als Kontrolle sowohl für die Nukleinsäureisolation als auch für die *TaqMan*-PCR führten wir in einer separaten Reaktion aus 3µl Eluat eine *TaqMan*-PCR zum Nachweis des humanen β -Aktin-Gens durch.

Protokoll:

1. Lysepuffer im Wasserbad 10 min bei 110 min^{-1} und 60°C auftauen
2. Proben bereitstellen
3. Lysepuffer bei $1.500 \times g$ 2 min zentrifugieren
4. Proben zum Lysepuffer dazugeben (1-2 ml), Positivkontrollen extra stellen!
5. 30 min Inkubation im Wasserbad bei 60°C und 110 min^{-1}
6. 2 min Zentrifugation bei $1.500 \times g$
7. Silica vortexen, $50 \mu\text{l}$ zum Lysepuffer dazugeben und 10 min inkubieren
8. in Kartuschen umfüllen und den Extractor starten

HBV-DNA-Positivkontrolle:

Ringversuchsplasma (INSTAND e.V., HBV-PCR/NAT-Ringversuch Gruppe 361, November 1999, lyophilisiert, Probe 11013) wurde in $500 \mu\text{l}$ sterilem, Nuklease-freiem Wasser aufgelöst, gut vermischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert (Stocklösung). $500 \mu\text{l}$ Stocklösung wurden mit $19,5 \text{ ml}$ HBV-negativem Spenderplasma 1:40 auf ca. 25.000 geq/ml verdünnt (Gebrauchslösung). Als Positivkontrolle wurden 2 ml Gebrauchslösung eingesetzt.

HBV-DNA-Standard:

Der WHO-Standard für HBV-DNA-Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (Code 97/746) von Dr. John Saldanha (NIBSC, Herts, Großbritannien) ($1,0 \times 10^6 \text{ IU/ml}$, lyophilisiert, Genotyp A, HBsAg Subtyp adw) wurde in $500 \mu\text{l}$ sterilem, Nuklease-freiem Wasser aufgelöst, gut vermischt und als Stocklösung aufbewahrt. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wurde er mit HBV-negativem Spenderplasma halblogarithmisch auf $10^{2,5}$, 10^2 , $10^{1,5}$, $10^{1,0}$ und $10^{0,5} \text{ IU/ml}$ verdünnt.

2.2.3. TaqMan-PCR

Primer- und Sondenauswahl

Für die Auswahl der *Primer* und der Sonde führten wir eine vergleichende Analyse von 65 Sequenzen der C-Region des HBV-Genoms, die über das Internet in der Datenbank *GenBank* am *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, USA) verfügbar waren, mittels *OMIGA 2.0 Software* durch. An Hand der Konsensus-Sequenz wurden dann unter Anwendung der *Primer Express-Software* mögliche *Primer*-Sonden-Kombinationen ermittelt.

Auswahlkriterien für die HBV-Sonde:

1. Das 5'-Ende der Sonde befindet sich in relativer Nähe zum 3'-Ende des korrespondierenden *Primers*. Damit wird gewährleistet, daß möglichst schon das erste an der Extension des *Primers* beteiligte Enzymmolekül die hybridisierte Sonde hydrolysieren kann.
2. Die Sonde hat mit 30 Basenpaaren eine optimale Länge (ideal sind 20-30 Basenpaare) und einen GC-Gehalt von 60 % (optimal 40-60%).
3. Der *Reporter* (VIC- Fluoreszenzfarbstoff, chemische Struktur nicht veröffentlicht) ist am 5'-Ende und der *Quencher* (TAMRA- 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) am 3'-Ende der Sonde positioniert, um eine gute Hybridisierungseffizienz der Sonde zu gewährleisten und die Hydrolyse der Sonde zwischen *Reporter* und *Quencher* zu ermöglichen ⁽⁸³⁾.
4. Guanin wurde als Startbase vermieden, da es das Signal des *Reporters* unterdrücken könnte.
5. Eine Komplementarität zwischen Sonden und *Primern* wurde ausgeschlossen, um die Bildung von Dimeren zu verhindern.

6. Um unspezifische Bindungen und Produkte zu vermeiden, wurden keine dreifachen Basenwiederholungen, insbesondere Poly-G's, zugelassen.
7. Da das Sonden-*Template*-Hybrid im Gegensatz zum *Primer-Template*-Hybrid nicht zusätzlich durch die Extension stabilisiert wird, ist die um mehr als 10°C höhere Schmelztemperatur der Sonde für eine feste Bindung besonders wichtig.

Auswahlkriterien für die *Primer* :

1. Beide *Primer* haben mit 22 bzw. 25 Basenpaaren eine optimale Länge (ideal sind 18-26) und einen GC-Gehalt von 48 bzw. 40% (optimal 40-60%).
2. Um unspezifische Bindungen und Produkte zu verhindern, wurden dreifache Wiederholungen von Basen vermieden.
3. Die Schmelztemperaturen wurden mit der *Primer Express-Software* nach der *Nearest-Neighbour*-Methode bestimmt ⁽¹²⁰⁾.

Die ausgewählten Oligonukleotide verglichen wir mit den Sequenz-Datenbanken im Internet unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Wir fanden für den *Primer* (1) 809, für die *TaqMan*-Sonde 779 und für den *Primer* (2) 818 verschiedene HBV-Sequenzen. Die ausgewählten *Primer* stimmten am 3'-Ende in den letzten 10 Nukleotiden mit 797 (98,52%) und 811 (99,14%) Sequenzen der Datenbank überein. Mit 774 (99,36 %) Übereinstimmungen zu den gefundenen HBV-Sequenzen zeigte die Sonde eine fast 100 %-ige Homologie. Es konnte nur eine Punktmutation entdeckt werden. Bei der Internetsuche fanden wir insgesamt 128 Nicht-HBV-Sequenzen, die jeweils zu nur einem der ausgewählten HBV-Oligonukleotide homolog waren. Die von uns ausgewählte Kombination der *Primer*- und SONDENSEQUENZEN ist somit spezifisch für den Nachweis von HBV-

DNA. Wir ließen die Sonde von Applied Biosystems synthetisieren und mit VIC als *Reporter* und TAMRA als *Quencher* markieren. Die *Primer* wurden von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) hergestellt. Tab. 2 zeigt die Eigenschaften der ausgewählten Oligonukleotide.

Tab. 2: Eigenschaften der ausgewählten Oligonukleotide

Oligonukleotide	Position ^a	Sequenzen in 5'→3' Richtung	Schmelztemperatur
<i>Primer 1</i>	1816-	GCA ACT TTT TCA CCT CTG CCT	57°C
	1837	A	
<i>TaqMan</i> Sonde	1863-	VIC-TTC AAG CCT CCA AGC TGT	78°C
	1892	GCC TTG GGT GGC-TAMRA	
<i>Primer 2</i>	1923-	AGT AAC TCC ACA GTA GCT CCA	56°C
	1947	AAT T	

^a Die Nummerierung beginnt an der EcoRI-Schnittstelle an Position 3221/0 ⁶²

PCR-Kontrollen

Um falsch negative Ergebnisse durch fehlerhafte DNA-Isolation oder Hemmung der PCR auszuschließen, setzten wir für jede Probe einen Nachweis des humanen β -Aktin-Gens als separate PCR-Kontrolle ein.

Optimierung der *TaqMan*-PCR

Zunächst wurde empirisch die beste Temperatur für den kombinierten Anlagerungs- und Extensionsschritt in 1°C-Schritten von 60-63°C bestimmt. Danach wurden die optimalen Konzentrationen von Magnesiumchlorid (MgCl₂), der *TaqMan*-Sonde und der beiden *Primer* schachbrettartig austitriert. Der Einfluss der eingesetzten *Primer*-Konzentration auf die PCR-Amplifikation wurde für den Bereich von 100-600 Nanomolar (nM) ausgetestet. Die *TaqMan*-Sonde wurden im Bereich von 100-400 nM und die Magnesiumkonzentration von 1-6 Millimolar (mM) titriert. Dabei galt immer der kleinere C_T-Wert, möglichst in Verbindung mit

dem höheren ΔR_n -Wert, als die bessere Testeinstellung. Die Ergebnisse sind unter 3.2. dargestellt.

Protokoll der PCR

Tab. 3: Reagenzien-Mix der HBV-PCR

HBV-Ansatz	Gebrauchskonzentration	für 1 Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
<i>TaqMan Universal Master Mix</i>		40,0 μ l	enthält 5 mM $MgCl_2$
$MgCl_2$	25 mM	1,6 μ l	0,5 mM
HBV-Primer 1	10 μ M	4,4 μ l	550 nM
HBV-Sonde	10 μ M	2,4 μ l	300 nM
HBV-Primer 2	10 μ M	4,4 μ l	550 nM
Aqua dest.		7,2 μ l	
DNA		20,0 μ l	
Gesamt		80,0 μl	

Tab. 4: Reagenzien-Mix der β -Aktin-PCR

β -Aktin Ansatz	Gebrauchskonzentration	für 1 Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
<i>TaqMan Universal Master Mix</i>		40,0 μ l	enthält 5 mM $MgCl_2$
$MgCl_2$	25 mM	1,6 μ l	0,5 mM
β -Aktin-Primer 1	15 μ M	1,6 μ l	300 nM
β -Aktin-Sonde	10 μ M	1,6 μ l	200 nM
β -Aktin-Primer 2	15 μ M	1,6 μ l	300 nM
Aqua dest.		30,6 μ l	
DNA		3,0 μ l	
Gesamt		80,0 μl	

Um Kontaminationen des Labors mit PCR-Produkten zu vermeiden, wurden die PCR-Ansätze in einem separaten Raum pipettiert und die geschlossenen Gefäße

nach der PCR sofort entsorgt. Zusätzlich wurde die *AmpErase* (UNG)³⁵ eingesetzt. Wir verwendeten folgende *Thermocycler*-Einstellungen: Zwei Minuten bei 50 °C, 10 Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 61°C.

Bestimmung der Nachweisgrenze

Um die 95%-Nachweisgrenze der *TaqMan*-HBV-PCR zu bestimmen, wurde eine halblogarithmische Verdünnungsreihe des oben beschriebenen WHO-Standards hergestellt. Das Standardplasma mit 1×10^6 IU/ml HBV-DNA, Genotyp-A, HBsAg-Subtyp adw wurde mit HBV-DNA-negativem Plasma auf $10^{2,5}$, 10^2 , $10^{1,5}$, $10^{1,0}$ und $10^{0,5}$ IU/ml verdünnt. Von jeder Konzentration wurden 24 Proben à 1 ml der Nukleinsäureisolation unterzogen und in fünf unabhängigen PCR-Läufen getestet. Mittels Probit-Analyse wurde daraus die 95%-Nachweisgrenze der Methode für 1 ml-Plasmaproben berechnet. Die Quantifizierung der HBV-DNA-positiven Proben erfolgte anhand einer Standardkurve aus diesen Validierungsexperimenten.

Auswertung der PCR-Ergebnisse

Der Grenzwert wurde als 10fache Standardabweichung des Hintergrundfluoreszenzsignals, welches während der Zyklen 3-30 gemessen wurde, definiert. Stark positive Proben (C_T -Wert <30) mussten getrennt berechnet werden, indem nur das Hintergrundsignal bis zu dem Zyklus vor dem sichtbaren exponentiellen Anstieg der ersten PCR-Kinetik für die Berechnung der Standardabweichung verwendet wurde. C_T -Werte kleiner als 40 wurden als positiv und C_T -Werte gleich 40 als negativ bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. HBV-Serologie

Von 14.251 getesteten Neuspendern waren 57 (0,4 %) wiederholt positiv im ersten, jedoch negativ im zweiten Anti-HBc-Test sowie in allen weiteren serologischen Testen und wurden deshalb als falsch positiv bewertet. Insgesamt waren 216 (1,52%) Spender in beiden Anti-HBc-Testen positiv. Unter diesen Proben fanden sich 16 HBsAg-Träger. HBsAg-negativ waren dagegen 200 der 216 Anti-HBc-positiven Neuspender. Keine der Proben war positiv für HBeAg oder Anti-HBc-IgM. Tab. 5 zeigt die serologischen Ergebnisse im Überblick.

Tab. 5: Serologische Ergebnisse der 216 Anti-HBc-positiv getesteten Neuspender

HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBe	Anti-HBs	Anzahl	% von allen Neuspendern	% der Anti-HBc-positiven Neuspender
+	+	+	-	16	(0,11%)	[7,41%]
-	+	-	-	12	(0,08%)	[5,56%]
-	+	+	-	8	(0,06%)	[3,70%]
-	+	-	+	36	(0,25%)	[16,67%]
-	+	+	+	144	(1,01%)	[66,67%]

(62)

Die meisten Anti-HBc-positiven Proben waren auch positiv für Anti-HBe und Anti-HBs (66,7%). Es wurden nur 12 (5,56%) isoliert Anti-HBc-positiv Spender gefunden. 180 (83,34%) der 216 Anti-HBc-positiven Spender waren auch positiv für Anti-HBs. Die Verteilung der Anti-HBs-Titer ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Anti-HBs-Titer der Anti-HBc-positiven Neuspender (n=180)

Anti-HBs-Titer	10-99 IU/l	100-999 IU/l	> 1000 IU/l
Anzahl (Prozent)	34 (18,9%)	62 (34,4%)	84 (46,7%)

In Abb. 6 ist die Alters- und Geschlechtsverteilung der Anti-HBc-positiven Spender dargestellt. Auffällig ist eine Häufung bei Männern (6,3%) und Frauen (4,1%) in der Altersgruppe der 55-65jährigen. Sehr niedrige Prävalenzen (< 1%) findet man bei beiden Geschlechtern bei den jungen Spendern von 18-24 Jahren.

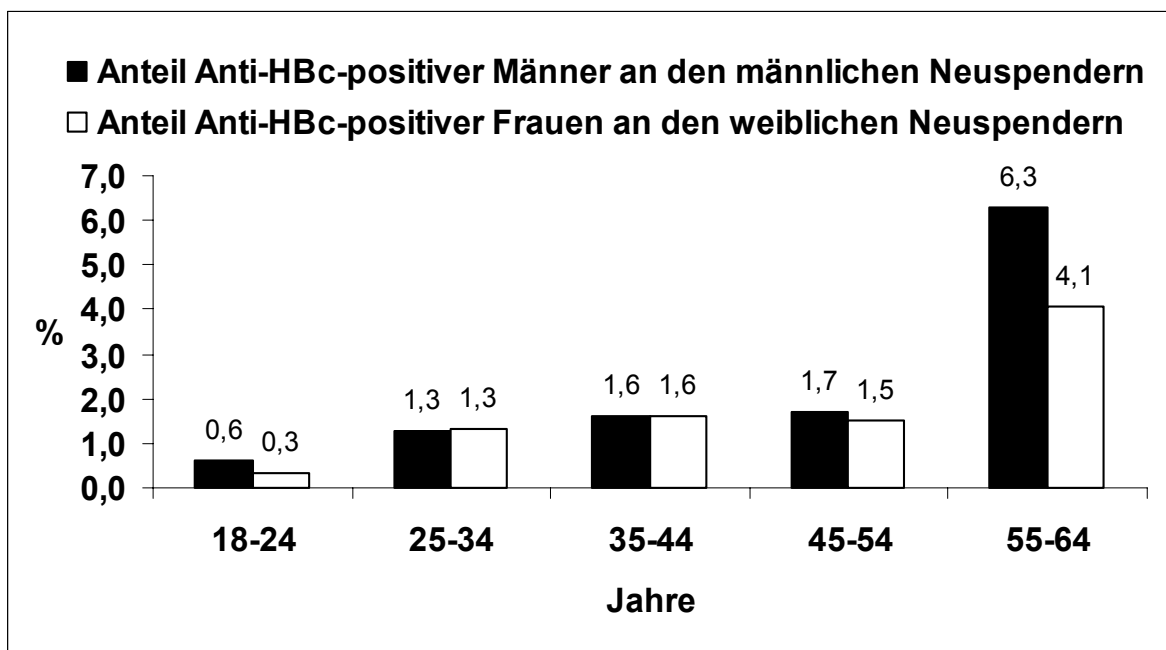


Abb.6: Alters- und Geschlechtsverteilung der Anti-HBc-positiven Spender

3.2. Optimierung der *TaqMan*-HBV-PCR

Die Austestung der optimalen Temperatur für den kombinierten Anlagerungs- und Extensionsschritt der PCR erfolgte in 1°C-Abständen. Die maximale Amplifikationseffizienz zeigte sich bei 61°C (Abb. 7).

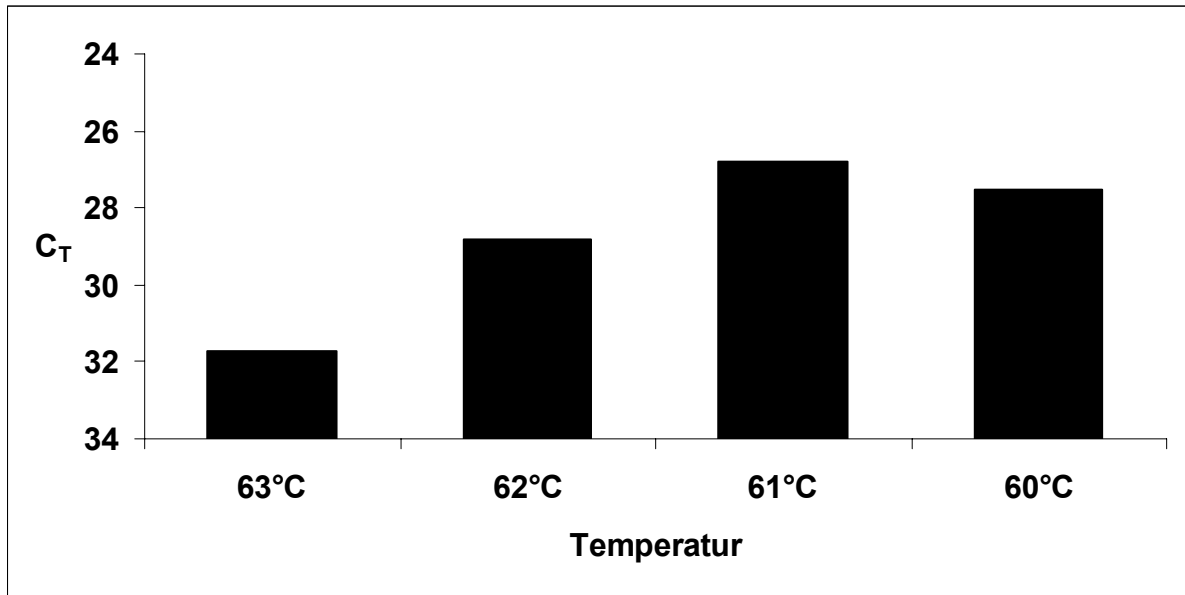


Abb. 7: Temperaturoptimierung für den Anlagerungs- und Extensionsschritt der *TaqMan*-HBV-PCR.

Im nächsten Schritt wurden die Magnesiumkonzentrationen im Bereich von 1-6 mM und die Sondenkonzentrationen im Bereich von 100-400 nM optimiert. Abb. 8 zeigt einen Auszug der Ergebnisse.

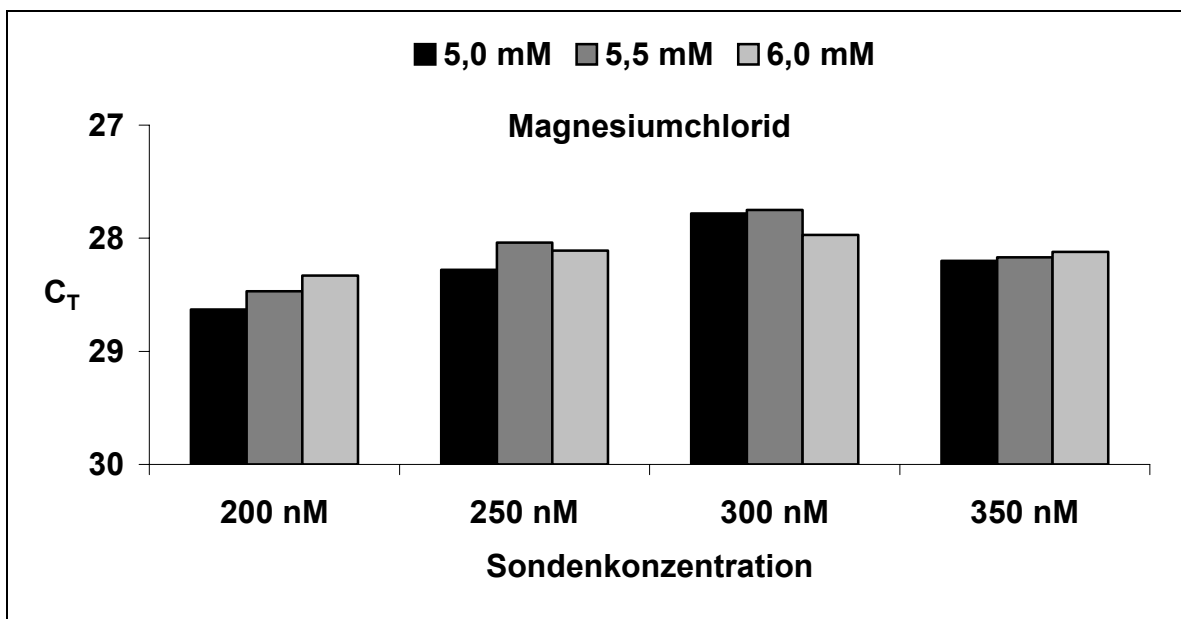


Abb. 8: Optimierung der Konzentrationen von HBV-Sonde und MgCl₂

Den niedrigsten C_T -Wert erreichten wir mit einer Sondenkonzentration von 300 nM und einer Magnesiumkonzentration von 5,5 mM.

Die optimalen Konzentrationen der beiden HBV-*Primer* ermittelten wir ebenfalls über eine Schachbrett-Titration von 100-600 nM. Die beste Amplifikationseffizienz wurde mit einer Konzentration von 550 nM für *Primer 1* und 500 oder 550 nM für *Primer 2* erreicht (Abb. 9).

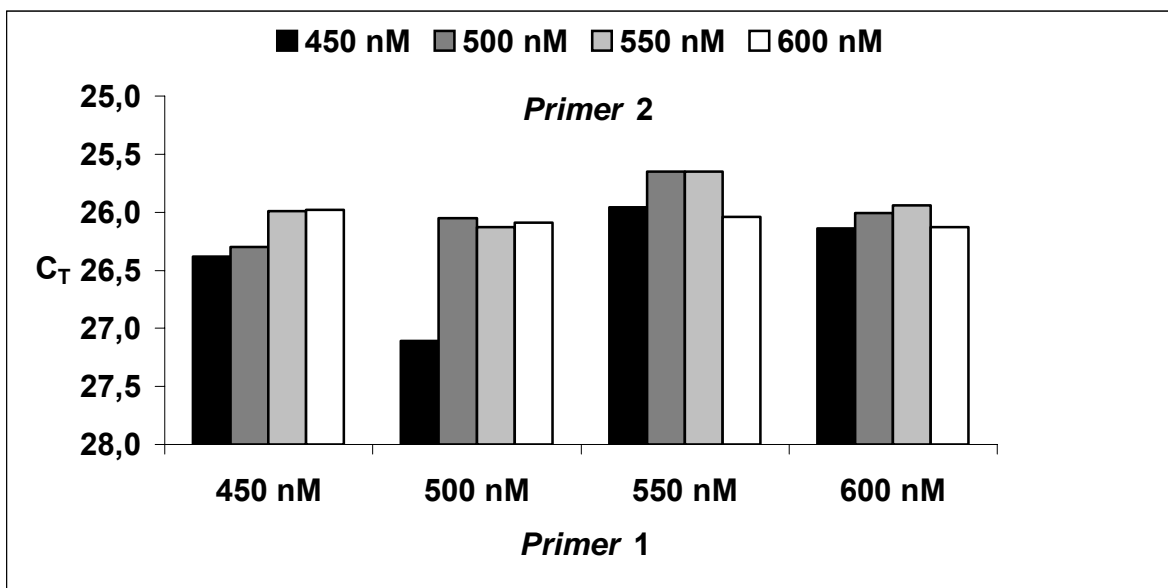


Abb. 9: Optimierung der HBV-*Primer*-Konzentrationen.

Im Kontrollansatz zum Nachweis von β -Aktin-DNA wurde die mit FAM (6-Carboxyfluorescein) und TAMRA markierte Sonde in einer vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 200 nM eingesetzt.

Eine optimale Amplifikation erreichten wir mit einer *Primer*-Konzentration von je 300 nM (Abb. 10).

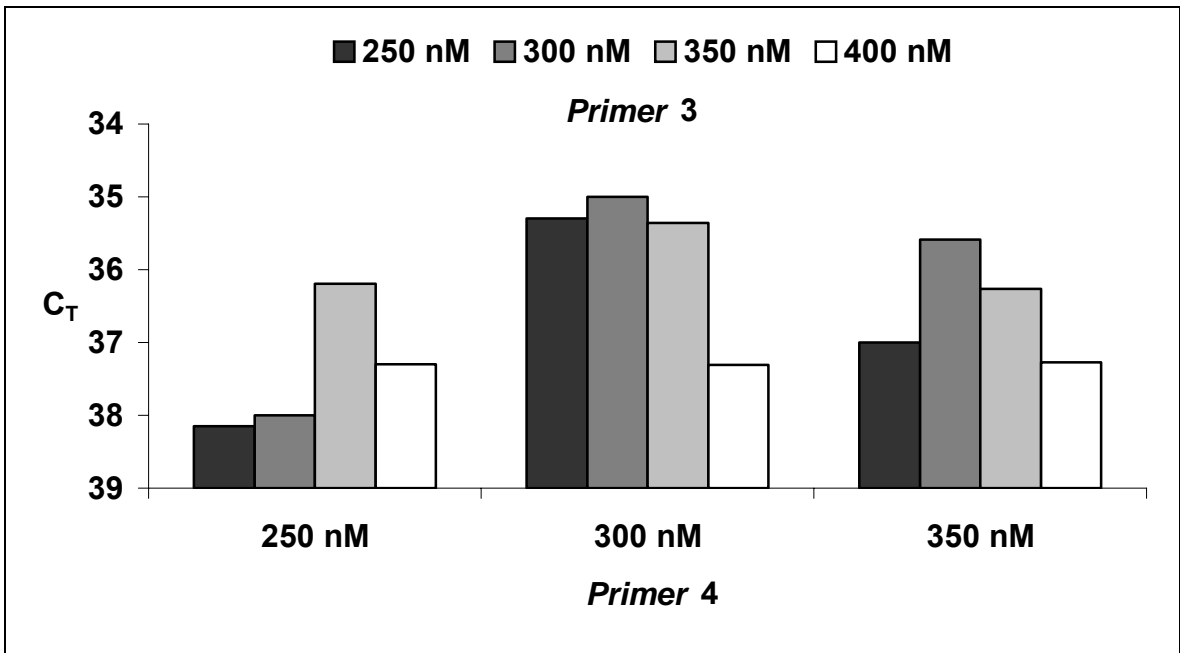


Abb. 10: Optimierung der β -Aktin-Primer-Konzentrationen.

Die Verwendung der Oligonukleotide für die HBV- und die β -Aktin-PCR in einem Ansatz führte zum Sensitivitätsverlust der β -Aktin-PCR (Abb. 11).

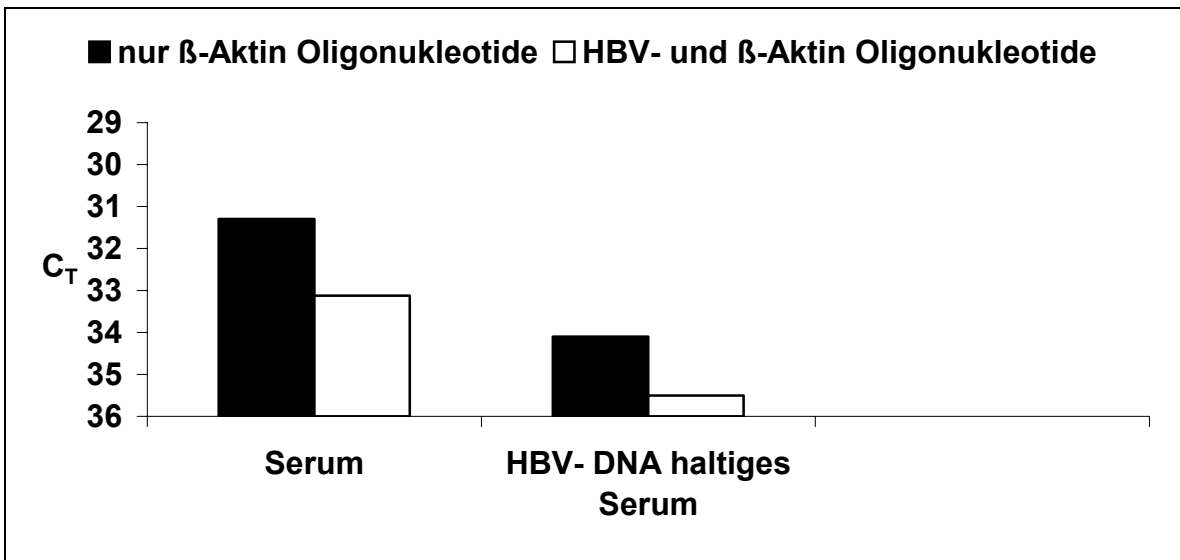


Abb. 11: C_T -Wert für β -Aktin nach Hinzufügen der HBV-Oligonukleotide.

Die Untersuchung von 10 weiteren Spenderplasmen bestätigte die Veränderung der β -Aktin-PCR durch Hinzufügen der HBV-Oligonukleotide (Abb. 12).

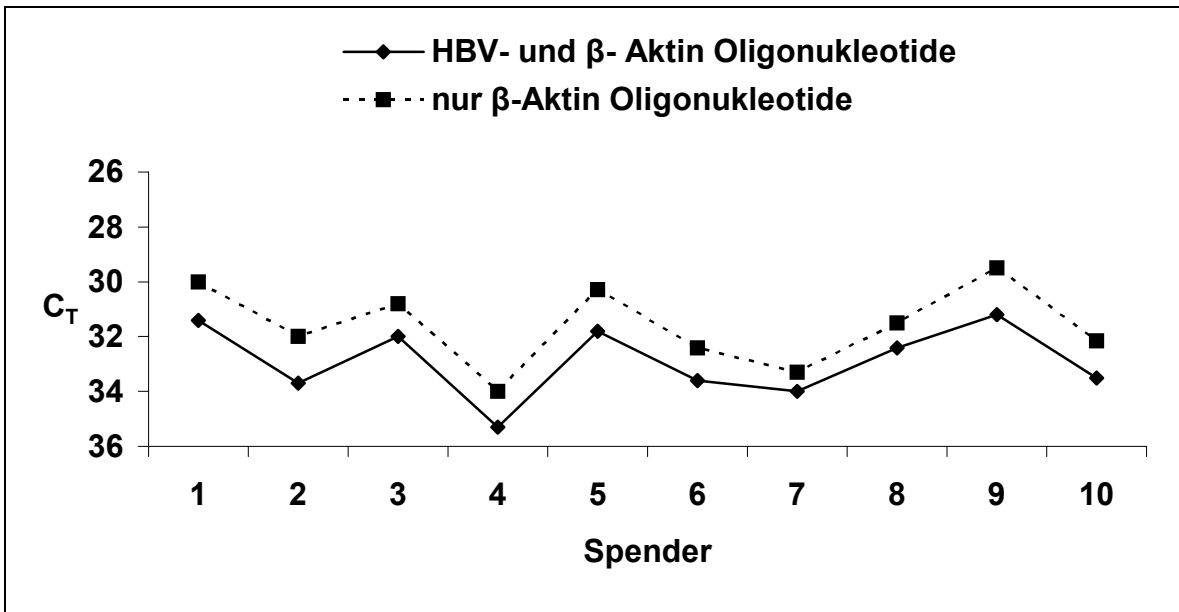


Abb. 12: C_T-Werte der β -Aktin-PCR bei 10 verschiedenen Spendern.

In weiteren Experimenten zeigte sich, daß trotz korrekter Nukleinsäureisolation einige β -Aktin-Kontrollen nach Zugabe aller Oligonukleotide einen C_T-Wert von 40 erreichen und damit negativ ausfielen. Deshalb wurde die β -Aktin-PCR in einem separaten Reaktionsgefäß durchgeführt.

3.3. Bestimmung der Nachweisgrenze der HBV-PCR

Wie unter 2.2.5. beschrieben, wurde der WHO-Standard für HBV-DNA halblogarithmisch verdünnt. Von jeder Konzentration wurden 24 Proben in fünf unabhängigen PCR Läufen getestet. Die Ergebnisse sind in den Tab. 7 und 8 zusammengestellt.

Die mittels Probit Analyse berechnete 95%-Nachweisgrenze der optimierten *TaqMan*-HBV-PCR aus 1 ml Plasma beträgt 27,79 IU/ml Plasma, bezogen auf den WHO-Standard für HBV-DNA (Tab. 8). Da die Nachweisgrenze für 1 ml Plasma berechnet wurde, könnte man für 2ml-Plasmaproben theoretisch von einer 95%-Nachweisgrenze von ca. 14 IU/ ml ausgehen.

Tab. 7: HBV-PCR-Ergebnisse der halblogarithmischen Verdünnungsreihe des WHO-Standards für HBV-DNA

Standard (IU/ml)	Anzahl der Proben	positive Ergebnisse	Probit
316	24	24	1,000
100	24	24	1,000
31,6	23 ^a	22	0,967
10	24	20	0,780
3,16	24	15	0,668

^a: eine Probe musste wegen negativer β -Aktin-PCR ausgeschlossen werden ⁽⁶²⁾

Tab. 8: Nachweisgrenzen und 95%-Konfidenzintervalle der *TaqMan*-HBV-PCR

	Nachweisgrenze	95%-Konfidenzintervall	
	IU/ml	Untergrenze	Obergrenze
90%	20,39	12,77	62,05
95%	<u>27,79</u>	18,03	95,02
99%	41,65	26,57	158,21

⁽⁶²⁾

Die Abb. 13 zeigt die Verteilung der Standardproben in den Verdünnungen von $10^{2,5}$ bis $10^{0,5}$ IU/ml, getestet in 5 Validierungsläufen zur Bestimmung der Nachweisgrenze.

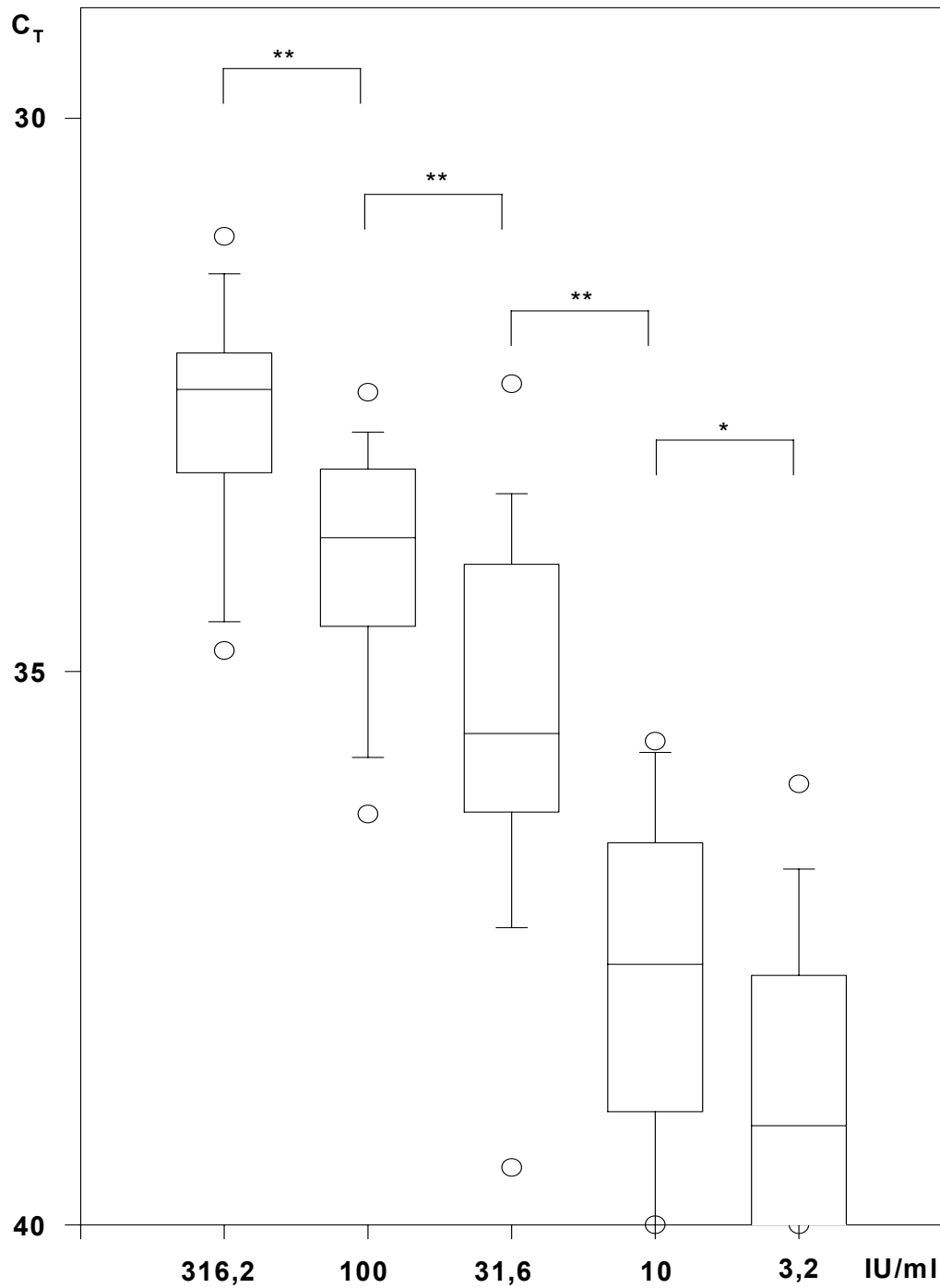


Abb. 13: *TaqMan*-HBV-PCR mit Konzentrationen des WHO-Standardplasmas von $10^{2,5}$, $10^{2,0}$, $10^{1,5}$, $10^{1,0}$, $10^{0,5}$ IU/ml; ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$. Die Darstellung in Box-Plots zeigt jeweils den Median, die 25. und 75. Perzentile, sowie die 10. und 90. Perzentile. Die Kreise stellen die 5. und die 95. Perzentile dar ⁽⁶²⁾.

3.4. PCR-Ergebnisse bei Anti-HBc-positiven Neuspendern

Insgesamt wurden 205 der 216 Anti-HBc-positiven Neuspender (16 HBsAg-positive und 189 HBsAg-negative) auf HBV-DNA getestet. In 62 Fällen waren 2ml Spenderplasma verfügbar, die übrigen 127 Proben wurden aus 1ml Plasma getestet. 14 (87,5%) der 16 HBsAg-positiven Blutspender waren positiv für HBV-DNA und bei drei (1,59%) der 189 HBsAg-negativen Neuspender konnte ebenfalls wiederholt HBV-DNA nachgewiesen werden. Diese drei HBV-DNA-positiven, HBsAg-negativen Spender wiesen außerdem Anti-HBe und Anti-HBs (> 100 IU/l) auf. In Tab. 9 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tab. 9: Nachweis von HBV-DNA bei Anti-HBc-positiven Neuspendern (n=205)

Anti-HBc +	HBV-DNA +	HBV-DNA -
HBsAg +	14 (6,83%)	2 (0,98%)
HBsAg -	3 (1,46%)	186 (90,73%)

Die Abb. 14 vergleicht die HBsAg-positiven und HBsAg-negativen Spender bezüglich ihrer HBV-DNA-Konzentrationen. Sechs der 14 HBsAg-positiven Proben wiesen HBV-DNA unter 100 IU/ml auf. Eine erwartete negative Korrelation von HBV-DNA-Menge zum Anti-HBs-Titer bei den drei HBsAg-negativen Proben konnte nicht gezeigt werden ($r = 0,03$; $p = 0,998$).

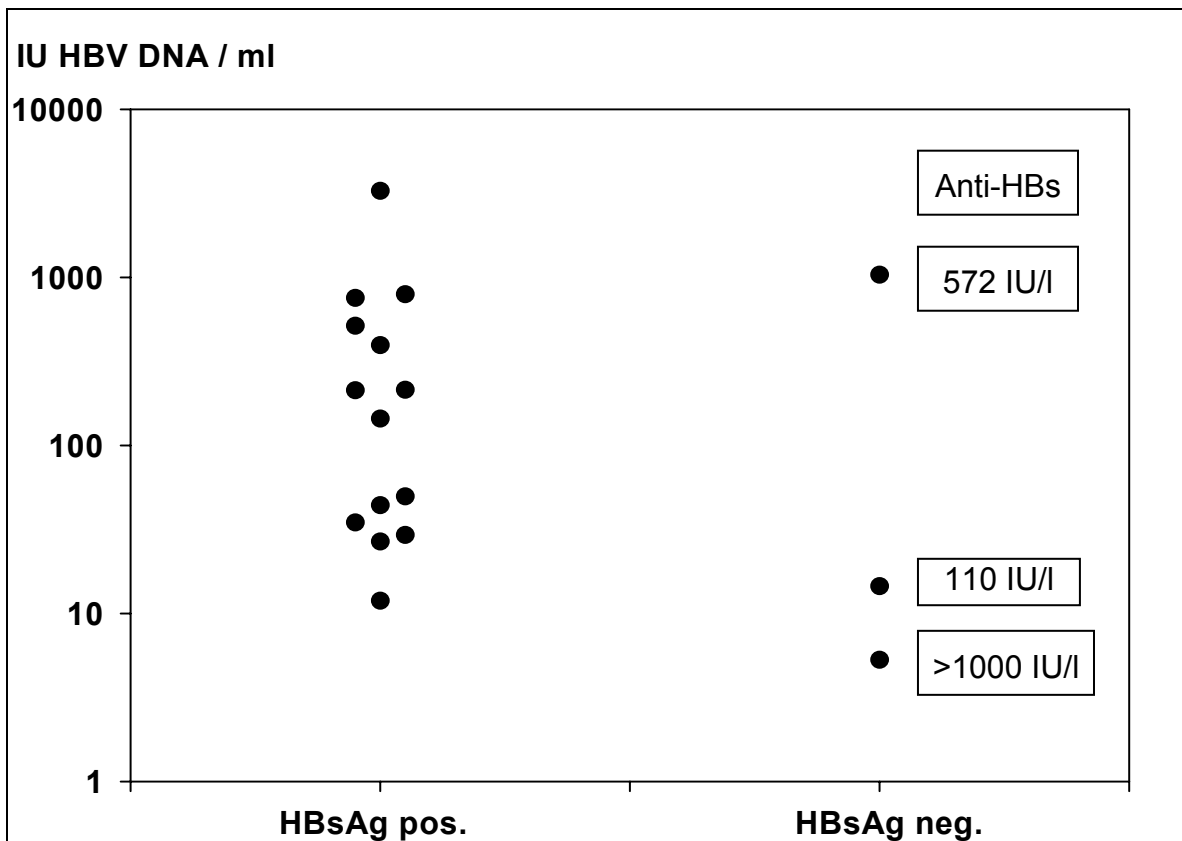


Abb. 14: Quantifizierung der HBV-DNA-positiven Proben an Hand einer Standardkurve aus den Experimenten, die in Abb. 13 dargestellt sind. Für die drei HBsAg-negativen Proben sind die Anti-HBs-Titer angegeben ⁽⁶²⁾.

Die Abb. 15 stellt eine graphische Zusammenstellung aus den Originalexperimenten dar. Sie zeigt die PCR-Kinetik der Stufen 10 und 100 IU/ml der Verdünnungsreihen des WHO-Standards im Doppelansatz und im Vergleich dazu die drei HBsAg-negativen, HBV-DNA-positiven Proben. Die Verläufe der relativen Fluoreszenz (ΔR_n) des HBV-Reporterfarbstoffs sind über die Zyklen 20-40 dargestellt.

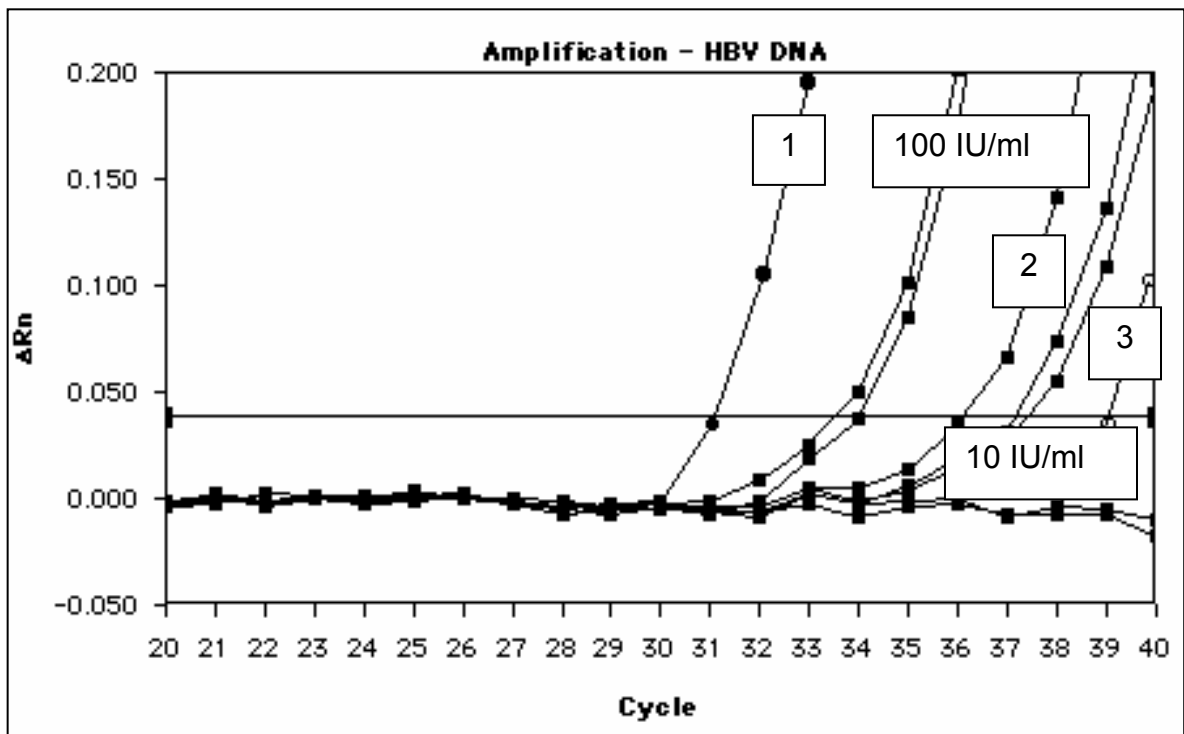


Abb. 15: Amplifikation der 3 HBsAg-negativen und HBV-DNA-positiven Proben (1-3) im Vergleich zum WHO-Standard in den Verdünnungen von 10 und 100 IU/ml.

4. Diskussion

Das HBV-Übertragungsrisiko betrug im Jahr 2001 in den USA 1:58.000-149.000⁽⁵¹⁾ und in Deutschland im Jahr 2002 1:230.000-560.000 Bluttransfusionen⁽¹⁰⁶⁾. Verglichen mit dem Risiko für HIV und HCV, ist es noch immer relativ hoch, da hier das Risiko durch die Testung von Pools mittels PCR auf kleiner als 1:4.000.000 reduziert werden konnte. Bis zu zwei Drittel aller HBV-Infektionen verlaufen klinisch symptomlos, bis zu 10 % können aber in ein chronisches Stadium übergehen. Diese chronischen Träger stellen weltweit einen enormen Viruspool und eine große Infektionsquelle dar. Sie sind, bedingt durch das Auftreten chronischer Lebererkrankungen und des hepatozellulären Karzinoms, eine Population mit hoher Morbidität und Mortalität⁽⁵⁷⁾. Die therapeutischen Möglichkeiten bei dieser Patientengruppe sind stark eingeschränkt. Maternofetale Übertragungen sind auch unter Lamivudin-Therapie und Gabe von Immunglobulinen nachgewiesen worden⁽⁷⁵⁾.

Das Ergebnis des Versuchs der Eliminierung des HBV durch die Einführung der Impfung für alle Kinder im 4., 5. und 12. Lebensmonat durch die Ständige Impfkommision (STIKO) 1998 kann erst in einigen Jahren abgeschätzt werden. Im Jahr 1984 wurde in Taiwan die Hepatitis B-Impfung mit sehr guten Ergebnissen eingeführt⁽⁷³⁾. Die HBV-Übertragungsrate auf Neugeborene konnte von 86-96% 1984 auf 12-14% 2001 gesenkt werden. Für 2010 rechnet man in Taiwan mit einer Übertragungsrate bei Neugeborenen von 1%. Die Effizienz des Schutzes vor einer HBV-Infektion wird mit 84% angegeben. Somit wird zum ersten Mal durch eine Impfung ein Schutz vor dem HCC möglich. Der Erfolg des Taiwan-Programms ist vor allem auf die gute Organisation der Institutionen und eine gute Kontrolle der Durchführung der Impfungen zurückzuführen. Auch in anderen Ländern wie Alaska, Italien, Gambia, China, Saudiarabien und Thailand laufen Impfprogramme

mit guten Erfolgen. In Singapur konnte die HCC-Rate von 27,8 / 100.000 pro Jahr 1978-1982 auf 19 / 100.000 pro Jahr 1988-1992 gesenkt werden. Obwohl die WHO die Impfung seit 1997 empfiehlt, wurde sie bisher nur in wenigen Mitgliedsstaaten eingeführt. Größte Hürde sind für die Entwicklungsländer vor allem die Kosten der Impfung ⁽⁷³⁾. Aufgrund der guten Impferfolge stellt sich die Frage, ob Blutspender und Empfänger von Blutprodukten grundsätzlich eine HBV-Impfung erhalten sollten. Da aber mindestens drei Impfungen bis zum Erreichen eines Grundschutzes notwendig sind, ist die Impfung in der Routine sehr aufwändig. Anschließend sind regelmäßige Impftiter-Kontrollen notwendig, um auch Individuen mit schlechtem Impfansprechen zu erkennen. Ein weiterer Nachteil ist die die Rolle der Impfung in Bezug auf die Entstehung von sogenannten *Escape*- oder Fluchtmutanten ^(11,28,30,58).

Für den Nachweis der HBV-Infektion in ihrer frühen Phase vor dem möglichen Nachweis von HBsAg wurde die HBV-DNA-Testung in Minipools aus bis zu 25 Spenden als Testmöglichkeit für Blutspenden beschrieben ⁽¹¹⁹⁾. Zusätzlich können so auch HBsAg-Mutanten, die im HBsAg-Test nicht nachweisbar sind, erkannt werden ⁽¹²⁵⁾. Für falsch negative Ergebnisse neuester HBsAg-Tests werden drei wesentliche Gründe diskutiert ⁽¹²⁵⁾: (1) Der HBsAg-Titer ist bei den chronisch HBV-Infizierten sehr gering und liegt häufig unter der Nachweisgrenze, ein positiver Anti-HBc-Nachweis kann dann der einzige Marker sein. (2) Bei fulminanter Hepatitis und bei Neugeborenen können die HBsAg-Titer ebenfalls sehr niedrig sein. (3) Mutationen im Bereich des HBV-S-Gens, welche durch den Selektionsdruck aktiver Immunisierung auftreten, führen zu HBsAg-negativen Tests ⁽²⁵⁾. Erst kürzlich wurde eine neue HBsAg-Mutation entdeckt, die auch mit den HBsAg-Tests der neuesten Generation nicht nachgewiesen werden konnte ⁽²⁾. In einer Studie des Robert-Koch-Institutes an Blutspendern aus den Jahren 2000-

2002 wurde dagegen gezeigt, daß die Standard-Mini-Pool-Testung im Vergleich zu sehr sensiblen HBsAg Testen keine deutlichen Vorteile hat ⁽¹⁰⁶⁾. Ein oft diskutierter Nachteil der Minipool-PCR sind die Kosten. Eine Studie von Jackson et al. untersuchte den Kosten-Nutzen-Effekt der Methode. Um 9-37 HBV-Infektionen pro Jahr zu verhindern, wären demnach 39-130 Millionen US-Dollar pro Jahr nötig ⁽⁶⁷⁾.

In einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe zum Nachweis von HBV-DNA in der späteren Phase der HBV-Infektion konnte gezeigt werden, daß sowohl bei HBsAg-positiven als auch bei HBsAg-negativen Individuen die Konzentration der HBV-Partikel im Plasma in dieser Infektionsphase so gering sein kann, daß der HBV-DNA-Nachweis mittels herkömmlicher PCR erst nach Anreicherung der HBV-Partikel durch eine Ultrazentrifugation gelang ⁽⁶¹⁾. Die Ergebnisse der HBV-DNA-Quantifizierung der hier vorgelegten Studie bestätigen die niedrige Virämie sowohl bei den HBsAg-negativen als auch in HBsAg-positiven Proben. Auch Roth et al. zeigten die geringe Viruslast in dieser Infektionsphase ⁽¹¹⁸⁾. Von 3,6 Millionen HBsAg-negativ getesteten Spenden konnten mittels PCR zusätzlich noch sechs HBV-DNA-positive Spender identifiziert werden. Bei der Untersuchung von 729 Anti-HBc-positiven, HBsAg-negativen und in der Minipool-PCR negativen Blutproben konnten mittels einer Einzel-PCR-Testung, angereichert aus 9,6 ml Plasma, noch sieben weitere HBV-DNA-positive Spender mit einer geschätzten Viruslast von <10 geq/ml entdeckt werden. Die geschätzte Nachweisgrenze für diese Einzel-PCR nach Anreicherung lag bei 30 geq/ml ⁽¹¹⁸⁾. Die Sensitivität der in der vorliegenden Studie neu entwickelten *TaqMan*-PCR, nach Anreicherung der Nukleinsäuren aus 1ml Plasma mit dem NucliSens™ Extraktor, war mit 27,79 IU/ml WHO Standard vergleichbar mit der Arbeit von Roth et al. ⁽¹¹⁸⁾. Trotzdem hätten wir bei der Untersuchung größerer Plasmamengen wahrscheinlich noch

mehr HBV-DNA-positive Proben gefunden. Die genannten Arbeiten bestätigen die These, daß die Viruslast während dieser Postserokonversionsphase so gering sein kann, daß HBV-DNA nicht im Pool nachgewiesen werden kann, sondern nur eine Einzeltestung mit einer sehr sensitiven PCR aus großen Plasamengen erfolgreich ist. Busch et al. ⁽²⁴⁾ untersuchten 2004 Kosten und Nutzen der PCR in der Blutspende und kamen zu dem Ergebnis, daß eine Pool-PCR auf HIV und HCV sinnvoll erscheint, eine HBV-DNA-Einzel-Testung dagegen den Kosten-Nutzen-Quotienten zu stark erhöht. Deshalb liegt die Schlussfolgerung nahe, daß die Einführung einer Routine-Testung aller Blutspenden auf Anti-HBc, wie von Mosley vorgeschlagen ⁽¹⁰¹⁾, besser zur weiteren Senkung des HBV-Übertragungsrisikos geeignet ist, als eine kostenintensive PCR-Einzeltestung.

In Studien in Griechenland, Japan und England wurden HBsAg-negative, Anti-HBc-positive Spender auf HBV-DNA untersucht ^(3,143,144). Diese Studien sind mit unseren Ergebnissen nicht vergleichbar, da in Ihnen nicht alle Anti-HBc-positiven Proben untersucht wurden. In der griechischen Arbeit wurden von 1995 bis 1996 insgesamt 6.696 Spender auf HBsAg, Anti-HBs, Anti-HBe und Anti-HBc untersucht. 282 (4,2%) der untersuchten Spender waren Anti-HBc-positiv. Darunter fanden sich 55 (0,82%) isoliert Anti-HBc-positiv und 74 (1,1%) Anti-HBc und Anti-HBe-positiv. 42 (0,63%) hatten zusätzlich einen Anti-HBs-Titer von <20 ml/IU und bei 111 (1,65%) Spendern konnten alle Antikörper nachgewiesen werden. Proben mit einem Anti-HBs-Titer > 20 ml/IU wurden nicht untersucht. Bei keiner untersuchten Spende konnte mittels PCR HBV-DNA nachgewiesen werden ⁽¹⁴⁴⁾. Die Studie aus Japan untersuchte von August 1997 bis März 1998 109.085 Neuspender. 1.208 (1,1%) davon waren Anti-HBc-positiv und HBsAg-negativ. Nur 50 Proben wurden einer HBV-PCR unterzogen. Bei 19 (38%) konnte DNA nachgewiesen werden ⁽¹⁴³⁾. In der 11-monatigen Studie aus England an 4.359

Neuspendern waren 389 (8,9%) Anti-HBc-positiv. Von 155 (40,9%) isoliert Anti-HBc-positiven wurden 151 auf HBV-DNA getestet. Der einzige HBV-DNA-positive, isoliert Anti-HBc-positive Spender war auch in der HIV-PCR positiv ⁽³⁾. Von 216 Anti-HBc-positiven Neuspendern fanden wir nach Anti-HBc-Testung mittels zweier unabhängiger ELISA-Teste nur 12 (5,5%) Spender mit dem Befund isoliert Anti-HBc-positiv. Bei keiner dieser Proben konnten wir HBV-DNA nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden wir HBV-DNA bei drei Spendern, bei denen alle drei Antikörper nachweisbar waren. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen beschriebenen HBV-DNA-Nachweisen bei Individuen nach kompletter Serokonversion ^(16,21,50,61,85,89,97,109,113,142). Diese serologische Konstellation war allerdings mit 66,67% auch die häufigste bei unseren Anti-HBc-positiven Spendern. In einer vergleichbaren Studie von Allain et al. 1999 ⁽⁵⁾ konnten sogar bei 88% der Anti-HBc-positiven Spender alle drei Antikörper nachgewiesen werden. Auch hier wurde bei isoliert Anti-HBc-positiven Spendern keine HBV-DNA gefunden.

Je nach HBV-Prävalenz eines Landes müssen die Risiken der HBV-Infektion gegen die Kosten abgewogen werden, welche durch die Einführung neuer Tests entstehen. Die Sicherheit der Blutkonserven muß weiterhin bezahlbar bleiben ¹⁰³. Des weiteren muß gewährleistet sein, daß nicht zu viele Blutspender durch zusätzliche Tests ausgeschlossen werden. Die Prävalenz von Anti-HBc unter unseren Neuspendern war mit 1,52% viel niedriger, als sie 2001 in einer Arbeit von Jilg et al. ⁽⁶⁹⁾ mit 8,71% für eine deutsche Population angegeben wurde. Eine mögliche Ursache dafür ist die Spenderauswahl durch Anamnese und körperliche Untersuchung, wodurch Angehörige von Risikogruppen und Menschen mit bestimmter Krankheitsvorgeschichte bereits vor der Laboruntersuchung als Blutspender ausgeschlossen werden. Die Studie von Jilg et al. berücksichtigte

dagegen bis auf Schwangere alle Erwachsenen zwischen 18 und 70 Jahren. Blutspender, insbesondere Neuspender, haben ein niedrigeres Durchschnittsalter. Ein weiterer Grund können die hier angewandten Kriterien für die Anti-HBc-Testung sein. Die Sensitivität des in der vorliegenden Studie verwendeten Anti-HBc-Tests von Dade-Behring beträgt 96,9-100 %, die Spezifität 99,13-99,58 %. Als Ursache von falsch positiven Ergebnissen kommen kreuzreagierende IgG-Antikörper in Frage ^(26,114). Die Anti-HBc-Testung dieser Studie erfolgte deshalb in zwei unterschiedlichen Testformaten und nur in beiden Tests positiv reagierende Plasmen wurden als tatsächlich Anti-HBc-positiv bewertet ⁽²⁶⁾. Eventuell sind auch regionale Unterschiede zwischen Nord- und Süddeutschland für die unterschiedlichen Prävalenzen verantwortlich. Die Neuspender der vorliegenden Studie stammen hauptsächlich aus Lübeck und Umgebung. Die Patienten der Arbeit von Jilg et al. stammen im Gegensatz dazu aus Bayern, Bremen, Nordrhein-Westfalen, Saarland und Sachsen. Tabelle 10 zeigt, daß die in der vorliegenden Studie beschriebene Prävalenz von 1,52% mit den Ergebnissen anderer Studien zur Anti-HBc-Prävalenz an Blutspendern in Frankreich und England vereinbar ist. Gerlich et al. schätzten 1999 die Rate Anti-HBc-Positiver in Deutschland mit 4% ebenfalls niedriger ein ⁽⁴⁸⁾. Allerdings wurden hier Blutspender und keine Neuspender untersucht. Auch die beiden Studien aus Frankreich und England zeigen eine geringere Prävalenz (Tab. 10).

Tab. 10: Prävalenzraten für Anti-HBc-positive Blutspender

Land	Jahr	Anti-HBc-positiv	Anzahl der Anti-HBc-Tests	Testpersonen
Frankreich ⁵³	1995	3,12%	1	Blutspender
England ⁵	1999	0,56%	2	Blutspender

Die Altersverteilung der Neuspender zeigt, daß der Großteil der Neuspender (47%) der Gruppe der 18-24jährigen angehört (Abb. 5). Die höchste Anti-HBc-Prävalenz (10,4 %) ist jedoch in der Altersgruppe der 55-65jährigen zu finden (Abb. 6). In der Gruppe der 18-24jährigen dagegen, die häufig als Risikogruppe für die Übertragung von Krankheitserregern angesehen wird ⁽³²⁾, liegt die Prävalenz nur bei 0,9%. Diese mit dem Alter ansteigende Prävalenz von Anti-HBc wurde auch von Jilg et al. beschrieben ⁽⁶⁹⁾. Die vergleichsweise niedrige Prävalenz in Lübeck bedeutet darüber hinaus, daß eine Routine-Anti-HBc-Testung zum Ausschluß von weniger Blutspenden führen würde, als bisher erwartet (8% nach Jilg ⁽⁶⁹⁾). Die Versorgung mit Blutkonserven würde demnach hier durch den dauerhaften Ausschluß solcher Spender nicht gefährdet werden. Da durch die Routine-Anti-HBc-Testung aller Blutspenden wahrscheinlich HBV-Übertragungen verhindert werden können, stellt die Einführung eines Anti-HBc-Testes eine gute Alternative zur PCR dar. Eine PCR im Pool, wie sie in der Frühphase der HBV-Infektion effektiv eingesetzt werden kann, ist dagegen für die Postserokonversionsphase aufgrund der geringen Viruslast nur aus Einzelspenden erfolgreich und deshalb zu aufwendig und kostenintensiv für die Routinetestung der Blutspenden. Durch eine allgemeine Reduktion von Transfusionen z.B. durch strengere Indikationsstellung bzw. durch die Verwendung von Medikamenten zur Blutstillung oder durch Forschung an künstlichen Sauerstoffträgern könnte das Risiko von Virusübertragungen allgemein verringert werden. Weiterhin könnten vermehrt Verfahren zur Pathogeninaktivierung in Blutprodukten eingeführt werden.

Gegen die Einführung des Anti-HBc-Testes sprechen Studien, die posttransfusionelle HBV Übertragungen von Spendern ohne serologische HBV-Marker dokumentieren ^(42,101,112,134). In der Arbeit von Roth et al. wird bei einem

Blutspender eine Serokonversion zunächst zu Anti-HBs und erst danach zu Anti-HBc beschrieben ⁽¹¹⁸⁾. In diesem Einzelfall wäre eine Anti-HBc-Testung unter Umständen nicht erfolgreich gewesen. Als Ursachen für die serologische Konstellation Anti-HBc-negativer Proben wird z.B. die Möglichkeit einer Anti-HBc-negativen Immunantwort ⁽⁸¹⁾, bedingt durch die T-Zelltoleranz gegenüber HBcAg und HBeAg bei immunsupprimierten Personen ⁽¹⁰⁰⁾ oder bei Säuglingen HBeAg-positiver Mütter diskutiert ^(66,141). Möglich wären auch Mutationen im C-Gen, die zur Anti-HBc-negativen Immunantwort führen könnten ^(15,44,52,145). Mit der Routine-Anti-HBc-Testung können deshalb die meisten, aber nicht alle infektiösen Blutspender identifiziert werden ⁽⁴⁾. In Ländern mit hoher HBV-Prävalenz würden durch den Ausschluß Anti-HBc-positiver Individuen zu viele Spenden verloren gehen ^(124,144).

Es bleibt die Frage nach der Infektiosität und der entsprechenden infektiösen Dosis HBsAg-negativer, HBV-DNA-positiver Blutspenden. Bisher galten insbesondere isoliert Anti-HBc-positiv Blutproben als potentiell infektiös, da hier HBV-DNA-Nachweise in 10-20% der Fälle beschrieben wurden ⁽⁵⁵⁾. Bei dieser serologischen Konstellation wurden häufig auch Übertragungen auf fetomaternalen ⁽³⁶⁾ oder dem Blutweg ^(64,80,101,105,140) dokumentiert. Mittels neu entwickelter PCR-Techniken ⁽¹³¹⁾ konnte später in diesen isoliert Anti-HBc-positiven Proben ^(3,56) HBV-DNA nachgewiesen werden. Die Übertragung von HBV über Lebertransplantate bei vollständiger Serokonversion des Spenders wurde schon sehr häufig dokumentiert ^(34,38,39,41,87,117,137,139). Interessant ist die Idee, in Ländern mit sehr hoher Anti-HBc-Prävalenz diese positiven Spenderlebern Anti-HBc-positiven Empfängern zuzuführen, und damit dem Verlust von Spenderorganen entgegenzuwirken ⁽¹¹⁰⁾. Die Inokulation kleiner Mengen von Serum und Lymphozyten von drei Patienten, die HBsAg-negativ, Anti-HBc-positiv,

Anti-HBs-positiv und HBV-DNA-positiv waren, in drei Schimpansen führte bei keinem der Tiere zu einer Infektion. Die Autoren dieser Arbeit räumten jedoch ein, daß möglicherweise die Mengen an Serum oder Lymphozyten geringer waren, als die für eine Übertragung erforderliche infektiöse Dosis ⁽¹¹¹⁾.

Retrospektive Studien an Blutspendern und den entsprechenden Empfängern der dazugehörigen Blutprodukte wären notwendig, um die Übertragungsrate durch HBsAg-negative, Anti-HBc-positive Blutprodukte zu ermitteln. In einer Arbeit von Roth et al. konnte mittels HBV-PCR-Einzeltestung bei einem Anti-HBc-positiven, HBsAg-negativen Blutspender in einer Probe von 1996 HBV-DNA nachgewiesen und sequenziert werden. Bei einem Empfänger einer späteren Blutkonserve dieses Spenders konnte dieselbe HBV-Sequenz identifiziert werden. Die archivierte Blutprobe des Spenders zum Spendezeitpunkt war im Gegensatz zur Probe von 1996 HBV-DNA-negativ. Deshalb konnte keine Sequenzierung zum endgültigen Nachweis einer Transmission durchgeführt werden ⁽¹¹⁸⁾. Die geschätzte Viruslast des klinisch symptomlosen Spenders lag bei 300 geq/ml in der Probe von 1996. Im Jahr 2004 wurde eine Nachuntersuchung von Empfängern der Blutprodukte einer Anti-HBc- und Anti-HBs-positiven Blutspenderin mit einer intermittierenden Virämie von 8-260 IU/ml durchgeführt. Es konnte hier keine HBV-Übertragung nachgewiesen werden. Dem Paul-Ehrlich-Institut sind zwischen 1995 und 2003 insgesamt 36 wahrscheinliche oder gesicherte HBV Übertragungen durch Blutprodukte oder Frischplasma gemeldet worden. In 18 Fällen konnte mittels Genomvergleich ein Zusammenhang zwischen Spender und Empfänger eindeutig nachgewiesen werden. Durch eine Anti-HBc-Testung hätten mindestens 7 dieser Fälle verhindert werden können ⁽²²⁾.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Blutproben mit einem Anti-HBs-Titer > 100 U/l nicht immer HBV-DNA negativ sind, da alle drei HBV-DNA-positiven Neuspender

einen Anti-HBs-Titer > 100 U/l hatten. Wir konnten zudem bei den drei HBV-DNA- und Anti-HBs-positiven Proben keinen Zusammenhang zwischen der Höhe des Anti-HBs-Titers und der HBV-DNA-Konzentration finden. Dieser wäre zu erwarten gewesen, wenn man annimmt, daß der DNA-Nachweis mit intakten Viruspartikeln korrespondiert, die durch Anti-HBs neutralisiert werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden von Roth et al. bestätigt. Hier wurde ebenfalls bei drei Anti-HBc-positiven Blutspendern mit Anti-HBs-Titern > 100 U/l in der PCR nach Anreicherung HBV-DNA nachgewiesen ⁽¹¹⁸⁾. Der Anti-HBs-Titer ist somit nicht geeignet, um eine erloschene Kontagiosität nach abgelaufener HBV-Infektion anzuzeigen. Da von einer sterilen Ausheilung der HBV-Infektion nicht ausgegangen werden kann, bergen Blutspender nach abgelaufener HBV-Infektion ein bisher nicht angenommenes Übertragungsrisiko.

Aufgrund des bestehenden Übertragungsrisikos sollten die Kriterien zur dauerhaften Zurückstellung von Blutspendern nach abgelaufener HBV-Infektion in den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ ⁽⁸⁾ dahingehend geändert werden, daß Blutspender nach abgelaufener HBV-Infektion sicherheitshalber dauerhaft von der Spende ausgeschlossen werden. Des weiteren sollte, wie auch vom Arbeitskreis Blut vorgeschlagen eine Routine-Anti-HBc-Testung der Blutspenden durchgeführt werden ⁽²²⁾.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Ziel dieser Studie war die Ermittlung der Häufigkeit des möglichen Nachweises von HBV-DNA im Plasma von Anti-HBc-positiven Blutspendern. Nachfolgend sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Routine-Anti-HBc-Testung im Vergleich zur relativ aufwendigen PCR-Testung das derzeitige Übertragungsrisiko einer HBV-Infektion durch Bluttransfusionen in Deutschland senken kann.

Material und Methoden: 14.251 Neuspender wurden mittels eines Mikropartikel-Enzymimmunoassays auf Anti-HBc getestet. Positive Ergebnisse wurden mit einem zweiten Test bestätigt. Zum HBV-Genomnachweis aus Plasma entwickelten wir einen neuen hochsensitiven Echtzeit-PCR-Test. Die 95%-Nachweisgrenze der Methode aus 1ml Plasma lag bei 27,8 IU/ml, bezogen auf den WHO-Standard für HBV-DNA.

Ergebnisse: 216 Blutspender (1,53%) wurden in beiden Testen Anti-HBc-positiv getestet. 205 davon (16 HBsAg-positiv und 189 HBsAg-negativ Spender) wurden auf HBV-DNA getestet. Bei 14 (87,5%) der HBsAg-positiven und bei drei (1,59%) der HBsAg-negativen Spender konnte HBV-DNA wiederholt nachgewiesen werden. Die drei HBV-DNA-positiven, HBsAg-negativen Proben waren auch positiv für Anti-HBe und Anti-HBs (>100 IU/l). Sowohl bei HBsAg-negativen als auch bei HBsAg-positiven Blutspendern waren die nachgewiesenen HBV-DNA-Konzentrationen sehr gering.

Diskussion: Diese Arbeit hat gezeigt, daß bei HBsAg-negativen, Anti-HBs- und Anti-HBc-positiven Blutspendern in seltenen Fällen HBV-DNA nachgewiesen werden kann. Durch die Routine-Anti-HBc-Testung aller Blutspenden können deshalb wahrscheinlich einzelne HBV-Übertragungen verhindert werden. Zur Bestimmung der Häufigkeit durch Blutprodukte solcher Spenden verursachter Infektionsübertragungen sind retrospektive Studien an Blutspendern und Empfängern der entsprechenden Blutprodukte notwendig. Da die Prävalenz von Anti-HBc mit 1,53% relativ niedrig ist, erscheint der aus einer Anti-HBc-Testung resultierende Verlust an Blutspenden in Deutschland vertretbar. Die Richtlinien zur Blutspende sollten dahingehend geändert werden, daß Anti-HBc-positiv Individuen dauerhaft von der Blutspende auszuschließen sind.

6. Danksagungen

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hennig, für die langjährige Betreuung meiner Arbeit. Er stand mir jederzeit mit unendlich viel Geduld, konstruktiven Hinweisen, Ratschlägen und Engagement zur Seite.

Ich danke dem Leiter des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin, Herrn Prof. Dr. med. Holger Kirchner, für die großzügige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit, für die Anregung zu diesem Thema und die wertvollen Diskussionen sowie für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des Materials.

Bei dem gesamten Team des Blutspenderlabors möchte ich mich für die fachlich qualifizierte Unterstützung bei meiner Labortätigkeit und die aufmunternden Gespräche bedanken.

Meiner Familie und meinem Lebensgefährten danke ich für die aufgebrachte Geduld, das Verständnis und die entgegengebrachte Hilfe in der Zeit der Ausarbeitung meiner Arbeit.

In schwierigen Phasen haben meine Freunde mich motiviert und somit zur Fertigstellung meiner Arbeit beigetragen.

7. Lebenslauf

Name	Puchta	
Vorname	Ines	
Geburtsdatum	25.01.1978	
Geburtsort	Hoyerswerda	
Vater	Mathias Puchta	Projektingenieur Automatisierungstechnik
Mutter	Regine Puchta	Berufsausbilder für Hotel- und Gaststättenwesen
Geschwister	Henri Puchta	Informatikstudent
Schulbildung	1984-1988	Grundschule, Hoyerswerda
	1988-1993	Realschule, Hoyerswerda
	1993-1996	Gymnasium, Hoyerswerda
	1996	Abitur
Leistungsfächer	Mathematik und Englisch	
Beruf	1996	Sanitätsoffizier der Bundeswehr
Hochschulbildung	1997-1999	Medizinstudium in Magdeburg
	1999	Physikum
	1999-2003	Universität zu Lübeck
	1999-2002	experimenteller Teil der Doktorarbeit
	2000	1. Staatsexamen
	2002	2. Staatsexamen
	2003	3. Staatsexamen
	2003-2005	Dermatologie, BWZK Koblenz
besondere Kenntnisse	Englisch, Französisch, Spanisch, Russisch	
Unterschrift		

8. Literaturverzeichnis

1. Albin C und Robinson WS. *Protein Kinase activity in Hepatitis B virus*. J Virol. 34: 297- 302. 1980.
2. Alexopoulou A, Baltayiannis G, Jammeh S, Waters J, Dourakis SP und Karayiannis P. *Hepatitis B Surface Antigen Variant with Multiple Mutations in the a Determinant in an Agammaglobulinemic Patient*. J Clin Microbiol. 42: 2861- 2865. 2004.
3. Alhababi F, Sallam TA und Tong WT. *The significance of "anti-HBc only" in the clinical virology laboratory*. J Clin Virol. 27: 162- 169. 2003.
4. Allain JP. *Occult hepatitis B virus infection*. Transfus Clin Biol. 11: 18- 25. 2004.
5. Allain JP, Hewitt PE, Tedder RS und Williamson LM. *Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion*. Brit J Haematol. 107: 186- 195. 1999.
6. Almeida JD, Rubenstein D und Scott EJ. *New Antigen-Antibody System in Australia-Antigen-Positive Hepatitis*. Lancet. 1225- 1227. 1971.
7. Alter HJ und Blumberg BS. *Further Studies on a "New" Human Isoprecipitin System (Australia Antigen)*. Blood. 27: 297- 309. 1966.
8. Aufgestellt gemäß Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Gesamtnovelle 2005. Kapitel 2: Ausschluß von der Blutspende. S. 17. Deutscher Ärzteverlag. 2005.
9. Bancroft WH, Mundo FK und Russel PK. *Detection Of Additional Antigenic Determinants Of Hepatitis B Antigen*. J Immunol. 109: 842- 848. 1972.
10. Bang NU, Ruegsegger P, Ley AB und LaDue JS. *Detection of Hepatitis Carriers by Serum Glutamic Oxalacetic Transaminase Activity*. JAMA. 171: 2303- 2306. 1959.
11. Basuni AA, Butterworth L, Cooksley G, Locarnini S und Carman WF. *Prevalence of HBsAg mutants and impact of hepatitis B infant immunisation in four Pacific Island countries*. Vaccine. 22: 2791- 2799. 2004.
12. Bayer ME, Blumberg BS und Werner B. *Particles associated with Australia Antigen in the Sera of Patients with Leukemia, Down`s syndrome and Hepatitis*. Nature. 218: 1057- 1059. 1968.
13. Beeson BP. *Jaundice Occuring One To Four Months After Transfusion Of Blood Or Plasma*. JAMA. 1332- 1334. 1943.

14. Beld M, Habibub MR, Rebers SP, Boom R und Resenink HW. *Evaluation of automated RNA-extraction technology and a qualitative HCV assay for sensitivity and detection of HCV RNA in pool screening systems.* Transfusion. 40: 575- 579. 2000.
15. Bhat RA, Ulrich P, Vyas PPU und Vyas GN. *Molecular Characterization of a New Variant of Hepatitis B Virus in a Persistently Infected Homosexual Man.* Hepatol. 11: 271- 276. 1990.
16. Blum HE, Liang TJ, Galun E, und Wands JR. *Persistence of Hepatitis B Viral DNA After Serological recovery from Hepatitis Virus Infection.* Hepatol. 14: 56- 63. 1990.
17. Blum HE, Offensperger WB, Offensperger S und Gerok W. *Latent hepatitis B virus infection with full-length viral genome in a patient serologically immune to hepatitis B virus infection.* Liver. 8: 307- 316. 1988.
18. Blumberg BS, Alter HJ und Visnich S. *A "New" Antigen in Leukemia Sera.* JAMA. 191: 541- 546. 1965.
19. Blumberg BS, Gerstley BJS, Hungerford DA, London WT und Sutnick AL. *A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrom Leukemia and Hepatitis.* Ann Intern Med. 66: 924- 931. 1967.
20. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME und van der Noordaa J. *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids.* J Clin Microbiol. 28: 495- 503. 1990.
21. Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, Bismuth H, Trepo C, Benhamou JP, Wands J, Isselbacher K, Tiollais P und Berthelot P. *Hepatitis B Virus DNA In Patients With Chronic Liver Disease And Negative Tests For Hepatitis B Surface Antigen.* N Engl J Med. 312: 270- 276. 1985.
22. Burger R, Offergeld R. *Erhöhung der Sicherheit von zellulären Blutkomponenten und quarantänegelagertem Frischplasma durch Untersuchungen der Blut- und Plasmaspenden auf Antikörper gegen Hepatitis-B-Core-Antigen (Anti-HBc).* Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz. 48: 698-699. 2005.
23. Burger R, Gerlich W, Gürtler L, Heiden M, Hitzler W, Jansen B, Kretschmer V, Lefevre H, Löwer H, Ludwig WD, Montag-Lessing T, Neumann R, Paessens A, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Werner E und Willkommen H. *Hepatitis-B-Virus (HBV) Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministerium für Gesundheit.* Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 3. 43: 240- 248. 2000.
24. Busch MP. *Should HBV NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors.* Transfus Clin Biol. 26- 32. 2004.

25. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckermann AJ und Thomas HC. *Vaccine- induced escape mutant of hepatitis B virus*. Lancet. 336: 325- 329. 1990.
26. Caspari G, Beyer HJ, Elbert G, Koerner K, Muss P, Schunter FW, Uy A, Gerlich W, Thomssen R und Schmitt H. *Unsatisfactory Specificities and Sensitivities of Six Enzyme Immunoassays for Antibodies to Hepatitis B Core Antigen*. J Clin Microbiol. 27: 2067- 2972. 1989.
27. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW und Houghton M. *Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood Born Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome*. Science. 244: 359- 362. 1989.
28. Coleman PF, Chen YCK und Mushawar IK. *Immunoassay Detection of Hepatitis B Surface Antigen Mutants*. J Med Virol. 59: 19- 24. 1999.
29. Colgrove R, Simon G und Ganem D. *Transcriptional Activation of Homologous and Heterologous Genes by the Hepatitis B Virus X Gene Product in Cells Permissive for Viral Replication*. J Virol. 63: 4019- 4026. 1989.
30. Coorman MP, Leroux-Roels G und Paulij WP. *Vaccine- and hepatitis B immunoglobulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen*. J Biomed Sci. 8: 237- 247. 2001.
31. Dai MS, Kao WY, Shyu RY und Chao TY. *Restoration of immunity and reactivation of hepatitis B virus after immunosuppressive therapy in a patient with aplastic anaemia*. J Viral Hepatitis. 11: 283- 285. 2004.
32. Damesyn MA, Glynn SA, Schreiber GB, Ownby HE, Bethel J, Fridey J, McMullen Q, Garraty G und Busch MP. *Behavior and infectious disease risks in young blood donors: implications for recruitment*. Transfusion. 43: 1596- 1603. 2003.
33. Dane DS, Cameron CH und Briggs M. *Virus-Like Particles In Serum Of Patients With Australia-Antigen-Associated Hepatitis*. Lancet. 695- 698. 1970.
34. De Feo TM, Poli F, Mozzi F, Moretti MP, Scalamogna M und Collaborative Kidney, Liver and Heart North Italy Transplant Program Study Groups. *Risk of transmission of hepatitis B virus from anti-HBc positive cadaveric organ donors: a collaborative study*. Transplant Proc. 37: 1238- 1239. 2005.
35. Delort AM, Duplaa AM, Molko D und Teoule R. *Excision of uracil residues in DNA: mechanism of action of Escherichia coli and Micrococcous luteus uracil- DNA glycosylase*. Nucleic Acids Res. 13: 319- 335. 1985.
36. Descos B, Scotto J, Fayol V, Huet JY, Pichoud C, Hermier M, Ville G, Charvet F, Dargent D, Thoulon JM und Trepo C. *Anti-HBc Screening for the Prevention of Perinatal Transmission of Hepatitis B Virus in France*. Infection. 15: 434- 439. 1992.

37. Dhedin N, Douvin C, Kuentz M, Saint Marc MF, Reman O, Rieux C, Bernaudin F, Norol F, Cordonnier C, Bobin D, Metreau JM und Vernant JP. *Reverse Seroconversion Of Hepatitis B After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. A Retrospective Study Of 37 Patients With Pretransplant Anti-HBs and Anti-HBc.* Transplantation. 66: 616-619. 1998.
38. Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, Zettermann RK, Pruett TL, Ishitani MB, Hoofnagel JH und The National Institut Of Diabetes, Digestive And Kidney Disease Liver Transplantation Database. *Transmission of Hepatitis B by Transplantation of Livers From Donors Positive for Antibody to Hepatitis B Core Antigen.* Gastroenterology. 113: 1668- 1674. 1997.
39. Dodson SF, Issa S, Araya V, Gayowski T, Pinna A, Eghtesad B, Iwatsuki S, Montalvo E, Rakela J und Fung JJ. *Infectivity Of Hepatic Allografts With Antibodies To Hepatitis B Virus.* Transplantation. 64: 1582-1584. 1997.
40. Donahue JG, Munoz DVMA, Ness PM, Donald E MD, Brown DE, David H, McAllister HA, Reitz BA, Nelson KE. *THE DECLINING RISK OF POST-TRANSFUSION HEPATITIS C VIRUS INFECTION.* N Engl J Med. 327: 369- 373. 1992.
41. Douglas DD, Rakela J, Wright TL, Krom RA und Wiesner RH. *The Clinical Course of Transplantation-Associated De Novo Hepatitis B Infection in the Liver Transplant Recipient.* Liver Transpl Surg. 3: 105- 111. 1997.
42. Elghouzzi MH, Courouce AM, Magnius LO, Lunel F und Lapierre V. *Transmission of hepatitis B virus by HBV negative blood transfusion.* Lancet. 346: 964- 964. 1995.
43. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ und Holland PV. *Transfusion-Associated Hepatitis Not Due To Viral Hepatitis Type A Or B.* N Engl J Med. 292: 767- 770. 1975.
44. Fiordalisi G, Primi D, Tanzi E, Magni E, Incarbone C, Zanetti AR und Cariani E. *Hepatitis B Virus C Gene Heterogeneity in a Familial Cluster of Anti- HBc Negative Chronic Carriers.* J Med Virol. 42: 109-114. 1994.
45. Förster VT. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.* Annals of Physics (Leipzig). 2: 55- 75. 1948.
46. Gerken G, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH. *Virushepatitis und B-Virusmutanten- Eine neue diagnostische und klinische Herausforderung.* Deutsches Ärzteblatt. 47: 2413- 2480. 1994.
47. Gerlich W und Robinson WS. *Hepatitis B Virus Contains Protein Attached to the 5' Terminus of Its Complete DNA Strand.* Cell. 21: 801- 809. 1980.

48. Gerlich WH und Caspari G. *Hepatitis virus and the safety of blood donations*. J Viral Hepatitis. 6: 6- 15. 1999.
49. Girones R und Miller RH. *Mutation Rate of the Hepadnavirus Genome*. Virology. 170: 595- 597. 1989.
50. Gomes SA, Yoshida CF und Niel C. *Detection Of Hepatitis B Virus DNA In Hepatitis B Surface Antigen-Negative Serum By Polymerase Chain Reaction: Evaluation Of Different Primer Pairs And Conditions*. Acta Virology. 40: 133- 138. 1996.
51. Goodnough TL, Shander A und Brecher ME. *Transfusion medicine: looking to the future*. Lancet. 361: 161- 169. 2003.
52. Gotoh K, Mima S, Uchida T, Shikata T, Yoshizawa K, Irie M und Mizui M. *Nucleotide Sequence of Hepatitis B Virus Isolated From Subjects Without Serum Anti- Hepatitis B Core Antibody*. J Med Virol. 46: 201- 206. 1995.
53. Goudeau A und Dubois F. *Incidence and prevalence of hepatitis B in France*. Vaccine. 13: S22- S25. 1995.
54. Grob P. *Introduction to epidemiology and risk of hepatitis B*. Vaccine. 13: S14- S15. 1995.
55. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, Hess G, Hüdig H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A und Mushawar I. *Serological Pattern " Anti-HBc Alone": Report on a workshop*. J Med Virol. 62: 450- 455. 2000.
56. Gross A, Joller-Jemelka HI, Wicki AN und Grob PJ. *Der Hepatitis-serologische Befund "Anti-HBc allein", zirkulierende virale DNA und Befund-Interpretation*. Schweiz Med Wochenschr. 123: 1193- 1202. 1993.
57. Hall AJ, Winter PD und Wright R. *Mortality Of Hepatitis B Virus Positive Blood Donors In England And Wales*. Lancet. 1: 91- 93. 1985.
58. He C, Nomura F, Itoga S, Isobe K und Nakai T. *Prevalence of vaccine-induced escape mutants of hepatitis B virus in the adult population in China: a prospective study in 176 restaurant employees*. J Gastroenterol Hepatol. 16: 1373- 1377. 2001.
59. Heermann KH, Goldman U, Schwartz W, Seyfarth T, Baumgarten H und Gerlich WH. *Large Surface Proteins of Hepatitis B Virus Containing the Pre-S Sequence*. J Virol. 52: 396- 402. 1984.
60. Heid CA, Stevens J, Livak KJ und Williams PM. *Real Time Quantitative PCR*. Genom Res. 6: 986- 994. 1996.
61. Hennig H, Dennin RH, Haase D und Kirchner H. *HBV-DNA positive findings in HBsAg negative blood donors and patients*. Beitr Infusionsther Transfusionsmedizin. 34: 26- 30. 1997.

62. Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S und Kirchner H. *Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen*. Blood. 100: 2637-2641. 2003.
63. Holland PM, Abramson RD, Watson R und Gelfand DH. *Detection and specific polymrase chain reaction product utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci. 88: 7276- 7280. 1991.
64. Hoofnagel JH, Seef LB, Bales ZB, Zimmermann HJ und The Veterans Administration Hepatitis Cooperative Study Group. *Type B Hepatitis After Transfusion With Blood Containing Antibody To Hepatitis B Core Antigen*. N Engl J Med. 298: 1379- 1383. 1978.
65. Horowitz B, Bonomo R und Prince AM. *Solvent/Detergent-Treated Plasma: A Virus-Inactivated Substitute for Fresh Frozen Plasma*. Blood. 79: 826- 831. 1992.
66. Hsu HJ, Chang MH, Hsieh KH, Lee CY, Lin HN, Hwang LH, Chen PJ und Chen DS. *Cellular Immune Response to HBcAg in Mother-to-Infant Transmission of Hepatitis B Virus*. Hepatology. 15: 770- 776. 1992.
67. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL und Aubouchon JP. *The cost-effectivness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole blood donations*. Transfusion. 43: 721- 729. 2003.
68. Jilg W. *Hepatitis B - Bedeutung für die Transfusionsmedizin*. Infusionsther Transfusionsm. 21: 20- 26. 1994.
69. Jilg W, Hottenträger B, Weinberger K, Schlottmann K, Frick E, Holstege A, Schölmerich J und Palitzsch KD. *Prevalence of Markers of Hepatitis B in the Adult German Population*. J Med Virol. 63: 96- 102. 2001.
70. Jongerius JM, Bovenhorst M, van der Poel CL, van Hilton JA, Kroes ACM, van der Does JA, van Leeuwen EF und Schuurman R. *Evaluation of automated nucleic acid extraction devices for application in HCV NAT*. Transfusion. 40: 871- 874. 2000.
71. Jung M CH und Pape GR. *Virushepatitiden*. Deutsches Ärzteblatt 91. 40: 1986- 1992. 1994.
72. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoofnagel JH und Purcell RH. *Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum by Polymerase Chain Reaction. Application for clinical diagnosis*. Gastroenterolgy. 99: 799- 804. 1990.
73. Kao JH und Ding CS. *Global control of hepatitis B virus infection*. Lancet Infectious Diseases. 2: 395- 403. 2002.
74. Kaplan PM, Greenman RL Gerin JL, Purcell HR und Robinson WS. *DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen*. J Virol. 12: 995- 1005. 1973.

75. Kazim SN, Wakil SM, Khan LA, Hasnain SE und Sarin SK. *Vertical transmission of hepatitis B despite materna lamivudine therapy*. Lancet. 359: 1488- 1489. 2002.
76. Knoll A, Rohrhofer A, Kochanowski B, Wurm EM und Jilg W. Prevalence of precore mutants in anti-HBe-positive hepatitis B virus carriers in Germany. J Med Virol. 59: 14- 18. 2004.
77. Koike K, Shirakata Y, Yaginama K, Aii M, Takada S, Nakamura I, Hayashi Y, Kawada M und Kobayashi M. *Oncogenetic Potential of Hepatitis B Virus*. Mol Biol Med. 6: 151- 160. 1989.
78. Koziol DE, Holland PV, Alling DW, Melpolder JC, Solomon RE, Purcell RH, Hudson LM, Shoup FJ, Krakauer H und Alter HJ. *Antibody to Hepatitis B Core Antigen as a Paradoxical Marker for non-A, non-B Hepatitis Agents on Donated Blood*. Ann Intern Med. 104: 488- 495. 1986.
79. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF und Poynard T. *Viral hepatitis B*. Lancet. 362: 2089- 2094. 2003.
80. Larsen J, Hetland G und Skaug K. *Posttransfusion hepatitis B transmitted by blood from a hepatitis B surface antigen-negative hepatitis B virus carrier*. Transfusion. 30: 431- 432. 1990.
81. Lee JH, Paglieroni TG, Holland PV und Zeldis JB. *Chronic Hepatitis B Virus Infection in an Anti-HBc nonreactive Blood Donor: Variant Virus or Defective Immune Response*. Hepatology. 16: 24- 30. 1992.
82. Lee LG, Connell CR und Bloch W. *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. Nucleic Acids Res. 21: 3761- 3766. 1993.
83. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W und Deetz K. *Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Products and Nucleid Acid Hybridization*. PCR Methods Applic. 4: 357- 362. 1995.
84. Longo MC, Berniger MS und Hartly JL. *Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction*. Gene. 93: 125- 128. 1990.
85. Lorient MA, Marcellin P, Bismuth E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Degott C, Erlinger S und Benhamou JP. *Demonstration of Hepatitis B Virus DNA by Polymerase Chain Reaction in the Serum and the Liver After Spontaneous or Therapeutically Induced HBeAg to Anti-HBe or HBsAg to Anti-HBs Seroconversion in Patients with Chronic Hepatitis B*. Hepatology. 15: 32- 36. 1992.
86. Lorient MA, Marcellin P, Walker F, Boyer N, Degott C, Randrianatoavina I, Benhamou JP und Erlinger S. *Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg*. J Hepatol. 27: 251- 258. 1997.

87. Lowell JA, Howard TK, White HM, Shenoy S, Huettner PC, Brennan DC, Peters MG. *Serological evidence of past hepatitis B infection in liver donor and hepatitis B infection in liver allograft*. Lancet. 345: 1084-1085. 1995.
88. Marcellin P, Giostra E, Martinot-Peignoux M, Lorient MA, Jaegle ML, Wolf P, Degott C, Degos F und Benhamou JP. *Redevelopment of Hepatitis B Surface Antigen After Renal Transplantation*. Gastroenterology. 100: 1432- 1434. 1991.
89. Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Lorient MA, Giostra E, Boyer N, Thiers V und Benhamou JP. *Persistence of Hepatitis B Virus DNA Demonstrated by Polymerase Chain Reaction in Serum and Liver after Loss of HBsAg Induced by Antiviral Therapy*. Ann Intern Med. 112: 227- 228. 1990.
90. Margolis HS, Alter MJ und Hadler SC. *Hepatitis B: Evolving Epidemiology and Implications for Control*. Semin Liver Dis. 11: 84- 92. 1991.
91. Martini GA. Die homologe Serum-Hepatitis. Dtsch med Wschr. 74: 568-572. 1949.
92. Marusawa H, Imoto S, Ueda Y und Chiba T. *Reactivation of latently infected hepatitis B virus in a leukemia patient with antibodies to hepatitis B core antigen*. J Gastroenterol. 36: 633- 636. 2001.
93. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y, Tanaka K, Shimotohno K und Chiba T. *Latent Hepatitis B Virus Infection in healthy Individuals With Antibodies to Hepatitis B Core Antigen*. Hepatology. 31: 488- 495. 2000.
94. Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M und Perillo RP. *Molecular Basis for Persistence Hepatitis B Virus Infection In The Liver After Clearance of Serum Hepatitis B Surface Antigen*. Hepatology. 27: 1736- 1742. 1998.
95. Maynard JE. *Hepatitis B: global importance and need for control*. Vaccine. 8: S18- S20. 1990.
96. Mei SD, Yatsunami H, Parquet M, Hamada R, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M und Yano M. *Detection of HBV RNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with and without HBsAg by reverse transcription polymerase chain reaction*. Hepatol Res. 18: 19- 28. 2000.
97. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S und Chisari FV. *Hepatitis B Virus Persistence after Recovery from Acute Viral Hepatitis*. J Clin Invest. 94: 230- 239. 1994.
98. Miller RH und Robinson WS. *Common evolutionary origin of hepatitis B and retroviruses*. Proc Natl Acad Sci. 83: 2531- 2535. 1986.

99. Modrow S, Falke D und Truyen U. *Molekulare Virologie*. 2. Auflage. Kapitel 19.1. Hepadnaviren. 449-469. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin. 2003.
100. Möller B, Hopf U, Stemerowicz R, Henze G und Gelderblom H. *HBcAg Expressed on the Surface of Circulating Dane Particles in Patients with Hepatitis B Virus Infection without Evidence of Anti-HBc Formation*. *Hepatology*. 10: 179- 185. 1989.
101. Mosley JW, Stevens CE, Aach RD, Hollinger FB, Mimms LT, Solomon LR, Barbosa LH und Nemo GJ. *Donor screening for antibody for hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients*. *Transfusion*. 35: 5- 12. 1995.
102. Mullis KB. *The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction*. *Sci Am*. 262: 36- 43. 1990.
103. Ness PM. *The broken reimbursement system: putting the brakes on the blood safety train*. *Transfusion*. 43: 1S- 2S. 2003.
104. Nordbo SA, Skaug K, Holter E, Waage A und Brinch L. *Reactivation of hepatitis B virus infection in an anti-HBc and anti-HBs positive patient after allogeneic bone marrow transplantation*. *Eur J Haematol*. 65: 86- 87. 2000.
105. Norder H, Hammas B, Larsen J, Skaug K und Magnius LO. *Detection of HBV DNA by PCR in serum from an HBsAg negative blood donor implicated in cases of post-transfusion hepatitis B*. *Arch Virol Suppl*. 4: 116- 118. 1992.
106. Offergeld R, Faensen D, Ritter S und Hamouda O. *Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002, the risk of virus transmission and the impact of NAT testing*. *Eurosurveillance*. 10: 13- 14. 2005.
107. Okochi K und Murakami S. *Observations on Australia Antigen in Japanes*. *Vox Sang*. 15: 374- 385. 1968.
108. Pasquetto V, Wieland S und Chisari FV. *Intracellular Hepatitis B Virus Nucleocapsids Survive Cytotoxic T-Lymphocyte-Induced Apoptosis*. *J Virol*. 74: 9792- 9796. 2000.
109. Paterlini P, Driss F, Nalpas B, Pisi E, Franco D, Berthelot P und Brechot C. *Persistence of Hepatitis B and Hepatitis C Viral Genomes in Primary Liver Cancers from HBsAg-Negative Patients: A Study of a Low-endemic Area*. *Hepatology*. 17: 20- 29. 1993.
110. Prieto M, Gomez M, Berenguer M, Cordoba J, Rayon JM, Pastor M, Garcia-Herola A, Nicolas D, Carasco D, Orbis JF, Mir J und Berenguer J. *De Novo Hepatitis B After Liver Transplantation From Hepatitis B Core Antibody-Positive Donors in an Area With High Prevalence of Anti-HBc Positivity in the Donor Population*. *Liver Transplantation*. 7: 51- 58. 2001.

111. Prince AM, Lee DH und Brotman B. *Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti HBs positive cases of resolved hepatitis B infection*. Transfusion. 41: 329- 332. 2001.
112. Rasenack JW, Schlayer HJ, Hettler F, Peters T, Preisler-Adams S und Gerok W. *Hepatitis B virus infection without Immunological markers after open-heart surgery*. Lancet. 245: 355- 357. 1995.
113. Rehermann B, Ferrari C, Paquinelli C und Chisari FV. *The hepatitis B virus persists for decades after patients` recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T- lymphocyte response*. Nat Med. 2: 1104- 1108. 1996.
114. Robertson EF, Wear JA, Randell R, Holland PV, Madsen G und Decker RH. *Characterization of a Reduction-Sensitive Factor from Human Plasma Responsible for Apparent False Activity in Competitive Assays for Antibody to Hepatitis B Core Antigen*. J Clin Microbiol. 29: 605- 610. 1991.
115. Robinson W, Clayton DA und Greenman RL. *DNA of a Human Hepatitis B Virus Candidate*. J Virol. 14: 384- 391. 1974.
116. Robinson WS und Greenman RL. *DNA Polymerase in the Core of the Human Hepatitis B Virus Candidate*. J Virol. 13: 1231- 1236. 1974.
117. Roche B, Samuel D, Gigou M, Feray C, Viroit V, Schmets L, David MF, Aralnaden JL, Bismuth A, Reynes M und Bismuth H. *De novo and apparent de novo hepatitis B virus infection after liver transplantation*. J Hepatol. 26: 517- 526. 1997.
118. Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, Weichert W, Hedges D und Seifried E. *NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety*. Transfusion. 42: 869- 875. 2002.
119. Roth WK, Weber M und Seifried E. *Feasability and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a bloodbank sitting*. Lancet. 353: 359- 363. 1999.
120. Rychlick W, Spencer WJ und Rhoads RC. *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Res. 18: 6409- 6412. 1990.
121. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA. *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with Thermostable DNA Polymerase*. Science. 239: 487- 491. 1988.
122. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N. *Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*. Science. 230: 1350- 1354. 1985.

123. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A und The WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleid acid amplification techniques. *Vox Sang.* 80: 63- 71. 2001.
124. Saraswat S, Banerjee K, Chaudhury N, Mahant T, Khandekar P, Gupta RK und Naik S. *Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood.* *J Hepatol.* 25: 639- 643. 1996.
125. Sato S, Ohhashi W, Ihara H, Sakaya S, Kato T und Ikeda H. *Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay.* *Transfusion.* 41: 1107- 1113. 2001.
126. Shikata T. *Australia Antigen in Liver Tissue.* *Japan J Exper Med.* 43: 231- 245. 1973.
127. Spandau F und Lee CH. *trans-Activation of Viral Enhancers by the Hepatitis B Virus X protein.* *J Virol.* 62: 427- 434. 1988.
128. Stibbe W und Gerlich WH. *Structural Relationships Between Minor and Major Proteins of Hepatitis B Surface Antigen.* *J Virol.* 46: 626- 628. 1983.
129. Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F und Gerlich W. *Transcription of Hepatitis B Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Persistently Infected Patients.* *J Virol.* 71: 5399- 5407. 1997.
130. Struve J, Giesecke J, Lindh G und Weiland O. *Utility of an anonymous questionnaire for the identification of a primary transmission route and possible secondary transmission in adults with acute hepatitis B infection.* *Eur J Epidem.* 12: 319- 322. 1996.
131. Sumazaki R, Motz M, Wolf H, Heinig J, Jilg W und Deinhardt F. *Detection of Hepatitis B Virus in Serum Using Amplification of Viral DNA by Means of the Polymerase Chain reaction.* *J Med Virol.* 27: 304- 308. 1989.
132. Summers J und Mason WS. *Replication of the Genome of a Hepatitis B-Like Virus by Reverse Transcription of an RNA Intermediate.* *Cell.* 29: 403- 415. 1982.
133. Sutnick AI, London WT, Gerstley BJ, Baruch S und Blumberg BS. *Anicteric Hepatitis Associated With Australia Antigen. Occurence in Patients with Down`s Syndrom.* *JAMA.* 205: 670- 674. 1968.
134. Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, Mack D, Schellekens H, Driss F, Goudeau A, Wands J, Sninsky J und Tiollais P. *Transmission Of Hepatitis B From Hepatitis-B-Seronegative Subjects.* *Lancet.* 1273- 1276. 1988.

135. Tiollais P, Pourcel C und Dejean A. *The hepatitis B virus*. Nature. 317: 489-495. 1985.
136. Toh H, Hayashida H und Miyata T. *Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerase of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus*. Nature. 305: 827- 829. 1983.
137. Uemoto S, Inomata YI, Sannomiya A, Koshiha T, Kurokawa T, Takatsuki M, Hino H, Yokoi A und Tanaka K. *Posttransplant Hepatitis B Infection in Liver Transplantation With Hepatitis B Core Antibody-Positive Donors*. Transplant Proc. 30: 134- 135. 1998.
138. Urban S, Breiner KM, Fehler F, Klingmüller U und Schaller H. *Avian Hepatitis B Virus Infection Is Initiated by the Interaction of a Distinct Pre-S-Subdomain with the cellular receptor gp180*. J Virol. 72: 8089-8097. 1998.
139. Wachs ME, Amed WJ, Ascher NL, Bretan PN, Emond J, Lake JR, Melzer JS, Roberts JP, Tomklanovich SJ, Vincenti F und Stock P. *The Risk Of Transmission Of Hepatitis B From HBsAg(-), HBcAg(+), HBIgM(-) Organ Donors*. Transplantation. 59: 230- 234. 1995.
140. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A und Rabenau H. *Hepatitis B Virus Markers in Anti-HBc Only Positive Individuals*. J Med Virol. 64: 312- 319. 2001.
141. Wong VC, Ip HM, Reesink HW, Lelie PN, Reerink- Brongers EE, Yeung CY und Ma HK. *Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis-B vaccine and hepatitis-B immunoglobulin*. Lancet. April: 921- 926. 1984.
142. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Lino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S und Koike K. *Persistent Viremia After Recovery From Self-Limited Acute Hepatitis B*. Hepatology. 27: 1377- 1382. 1998.
143. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino HS, Himoda K, Hino K, Kimura S, Lino S und Koike K. *Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors*. Transfusion. 41: 1093- 1099. 2001.
144. Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS und Tsianos EV. *Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: result of a 3-year prospective study in Northwestern Greece*. Transfusion. 41: 652- 658. 2001.
145. Zoulim F, Zhang X, Pichoud C und Trepo C. *Heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) core gene in a patient with HBV-associated cirrhosis and serum negativity for anti HBc*. J Hepatol. 24: 155- 160. 1996.