

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Charakterisierung und Validierung von infektionsserologischen Laborparametern
für den Nachweis des Humanen Immundefizienz-Virus, des Hepatitis-B-Virus und
des Hepatitis-C-Virus aus postmortalem Blut“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Ina Wilkemeyer
aus Ankum, Deutschland

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Pruß

2. Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. R. Hetzer

3. Prof. Dr. med. K. Püschel

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Deckblatt	1-2
2. Inhaltsverzeichnis	3
3. Abstract	4-5
4. Einleitung und Zielstellung	6
5. Studie 1: Vergleich infektionsserologischer Testergebnisse prä- und postmortaler Blutproben von Gewebespendern	7-8
6. Studie 2: Validierung des Siemens-BEP III-Automatensystems für die infektionsserologische Testung von Anti-HIV 1/2, Anti-HCV, HBsAg und Anti-HBc aus postmortalem Blut	9-10
7. Studie 3: Untersuchung serologischer Parameter im postmortalen Blut von Verstorbenen mit einer Infektion des Humanen Immundefizienz-Virus, Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus bis zu 48 Stunden	11-12
8. Diskussion	13
9. Referenzen	14
10. Anteilserklärung	15
11. Druckexemplar der Publikation: "Vergleich infektionsserologischer Testergebnisse prä- und postmortaler Blutproben von Gewebespendern"	16-21
12. Druckexemplar der Publikation: "Validierung des Siemens-BEP III-Automatensystems für die infektionsserologische Testung von Anti-HIV 1/2, AntiHCV, HBsAg und Anti-HBc aus postmortalem Blut"	22-29
13. Druckexemplar der Publikation: "Untersuchung serologischer Parameter im postmortalen Blut von Verstorbenen mit einer Infektion des Humanen Immundefizienz-Virus, Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus bis zu 48 Stunden"	30-36
14. Lebenslauf	37
15. Komplette Publikationsliste	38
16. Selbständigkeitserklärung	39
17. Danksagung	40

Abstract

Einleitung

Die Gefahr der Virusübertragung durch allogene Gewebetransplantationen stellt auch weiterhin eine der Hauptgefahren bei der Anwendung von Gewebezubereitungen in der klinischen Medizin dar und zwar insbesondere dann, wenn die Gewebe keinem Inaktivierungsverfahren unterzogen werden (z.B. Cornea, Herzklappen, Gefäße, Menisci). Serologische und molekulargenetische Untersuchungen auf klinisch relevante Viren (HIV, HBV, HCV) im Rahmen der Eignungsprüfung von Gewebespendern werden bevorzugt mittels prämortaler Blutproben durchgeführt. Diese stehen jedoch häufig nicht, bzw. nicht in ausreichender Menge, zur Verfügung. Die derzeitige Gesetzeslage (EU-Richtlinie 2006/17/EG, Transplantationsgesetz-Gewebeverordnung TPG-GewV) legt das postmortale Blutentnahmeintervall bei Gewebespendern auf maximal 24 Stunden fest, sodass viele potentielle Spender ausgeschlossen werden müssen. Des Weiteren unterliegt die Testung postmortaler Blutproben besonderen Anforderungen. So sollten die verwendeten infektionsserologischen bzw. NAT-Teste auch für postmortale Proben validiert sein, was derzeit jedoch für kaum ein eingesetztes Testsystem realisiert ist. Ebenso ist wenig über die Stabilität von Antigenen und Antikörpern für HIV, HBV und HCV im postmortalen Verlauf bekannt.

Methodik

Studie 1: Retrospektiver Vergleich von prä- und postmortalen infektionsserologischen Testergebnissen für Anti-HIV 1/2, Anti-HCV, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HBs und TPLA von 487 Hornhautspendern aus den Jahren 2004-2009.

Studie 2: Spiking von 20 postmortalen Blutproben von Augenhornhautspendern in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (low/high) mit definierten PEI/WHO-Standards für Anti-HIV 1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV sowie einer Negativkontrolle mit anschließender serologischer Diagnostik bzw. Ergänzungstestung am BEP-III-Laborautomaten und Vergleich der Ergebnisse.

Studie 3: Prospektive Untersuchung des Verlaufs serologischer Parameter für HIV-, HBV- und HCV-Infektionen bei 30 Verstorbenen mit diesen Infektionskrankheiten bis zu 48 Stunden postmortem.

Ergebnisse

Studie 1: Bei 487 Hornhautspendern kam es in insgesamt 21 Fällen zu Diskrepanzen (4,3%), die sich auf alle getesteten Parameter verteilten. 17 (3,5%) postmortale Proben wurden falsch positiv getestet und 4 (0,8%) falsch negativ. In nur einem Fall konnte ein Bestätigungstest einen falsch negativen Befund (Anti-HCV) erhärten.

Studie 2: Für alle Parameter konnten alle ungespikten Proben als richtig negativ und alle gespikten Proben sowohl in der niedrigen als auch der hohen Konzentration als richtig positiv bewertet werden.

Studie 3: Für alle untersuchten Parameter konnte eine Antigen- bzw. Antikörperstabilität bis zu 48 Stunden postmortem nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

Die primär durchgeführte Studie zeigt, dass es eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen infektionsserologischer Parameter aus postmortalem Blut und aus einer prämortalen Laborrückstellprobe desselben Gewebespenders gibt. Während falsch positive infektionsserologische Ergebnisse aufgrund präanalytischer Probleme (Lagerung, Zentrifugationszeitpunkt, Zellzerfall) häufiger sind, stellen falsch negative Ergebnisse eine Ausnahme dar. Zusammenhänge zwischen falsch positiven/negativen postmortalen Ergebnissen und Spenderalter, Spendergeschlecht und postmortaler Abnahmezeit konnten nicht festgestellt werden. Umso wichtiger ist daher die Validierung von infektionsserologischen Testsystemen für die Bestimmung von Parametern für HIV, HBV und HCV aus postmortalem Blut. Die Eignung eines etablierten Testsystems für die infektionsserologische Routinediagnostik von Lebendblutproben (BEP-III, Siemens, Eschborn, Deutschland) konnte anhand eines neu

definierten Validierungsschemas für die Untersuchung postmortalen Blutproben in Studie 2 nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Frage nach der Stabilität von Virusparametern im postmortalen Blut konnte in Studie 3 bei mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus, dem Hepatitis-B-Virus bzw. dem Hepatitis-C-Virus infizierten Verstorbenen gezeigt werden, dass die jeweiligen infektionsserologischen Parameter zuverlässig und fehlerfrei bis zu 48 Stunden nach Herz-Kreislauf-Stillstand im postmortalen Blut nachgewiesen werden können. Damit ist von einer Antigen- bzw. Antikörperstabilität für mindestens 2 Tage im postmortalen Blut auszugehen und daher eine Erhöhung des Blutentnahmeintervalls von 24 Stunden postmortem denkbar.

Einleitung

Gewebe von verstorbenen Spendern wird in mehreren klinischen Fachgebieten transplantiert. Das Spektrum reicht von muskuloskelettalen Geweben (Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Faszien) über Augenhornhaut (Cornea) bis hin zu kardiovaskulären Allografts (Aorten- und Pulmonalklappe, Perikard, Venen, Arterien). Die Gefahr der Virusübertragung durch eine Gewebetransplantation stellt eine nicht zu vernachlässigende Problematik dar, auch, wenn es sich dabei um Einzelfälle handelt (Pruß 2010). Serologische und molekulargenetische Untersuchungen zum Nachweis von HIV, HBV bzw. HCV bei Gewebespendern werden bevorzugt aus prämortalen Blutproben (Laborrückstellproben, nicht älter als 7 Tage) durchgeführt. Diese stehen jedoch häufig nicht zur Verfügung, insbesondere dann, wenn es sich nicht um Multiorganspender handelt (z.B. Spender aus Rechtsmedizinischen Instituten) bzw. Blutproben vom stationären Aufenthalt nicht mehr vorliegen bzw. zu alt sind. Die derzeit in Europa gültige Regelung in der EU-Richtlinie 2006/17/EG sowie in der resultierenden Transplantationsgesetz-Gewebeverordnung (TPG-GewV) legt ein postmortales Blutentnahmeintervall auf maximal 24 Stunden fest. Durch diese gesetzlichen Festlegungen müssen leider zahlreiche potentielle Gewebespenders, insbesondere in Rechtsmedizinischen Instituten, ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen von Challine et al. (2006) unterstützen die Festlegung eines geringen Zeitintervalls für postmortale Blutproben. Bereits 12 Stunden postmortal beobachteten die Autoren eine ansteigende Rate an falsch positiven Resultaten bei makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Serumproben. Derzeit sind nur wenige Arbeiten bezüglich der Charakterisierung und Validierung von infektionsserologischen Labortests aus postmortalem Blut veröffentlicht, die teilweise deutlich widersprüchliche Ergebnisse ergeben. Insofern sind die Themen der Vergleichbarkeit prä- und postmortaler Probenentstehung, der Entwicklung von Testschemata für Validierungsuntersuchungen an postmortalem Blut sowie der Frage nach der Stabilität von Antigenen und Antikörpern für HIV, HBV und HCV von hohem wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

Zielstellung

Vor dem Hintergrund der Festlegung des 24-Stundenintervalls für die postmortale Blutprobengewinnung sollen retrospektiv die infektionsserologischen Untersuchungsergebnisse von post- und prämortalen Blutproben desselben Spenders verglichen und bei Diskrepanzen beeinflussende Faktoren identifiziert werden. Anschließend soll die Validierung eines an der Charité-Universitätsmedizin Berlin etablierten infektionsserologischen Testsystems (BEP-III, Siemens, Eschborn, Deutschland) für postmortale Blutproben an einem neu zu entwickelnden Validierungsschema erfolgen. Schließlich soll anhand der Untersuchung von Verstorbenen mit bekannten HIV-, HCV- bzw. HBV-Infektionen die Frage beantwortet werden, ob der Nachweis der jeweiligen Antigene bzw. Antikörper bis zu 48 Stunden postmortal zuverlässig gelingt.

Studie 1: Vergleich infektionsserologischer Testergebnisse prä- und postmortaler Blutproben von Gewebespendern

Methodik

In einer retrospektiven Analyse wurden die Blutbefunde aller Hornhautspender der Universitätsgewebebank der Charité - Universitätsmedizin Berlin mit gleichzeitiger infektionsserologischer Diagnostik einer post- und einer prämortalen Blutprobe im Zeitraum vom 01.01.2004 bis zum 17.06.2009 erfasst und unter Berücksichtigung des Alters, des Geschlechts und der postmortalen Abnahmezeit jedes einzelnen Spenders ausgewertet.

Die prämortalen Blutproben der Hornhautspender (Serum bzw. Plasma) stammten aus dem Labor des jeweiligen Spenderklinikums und waren nicht älter als sieben Tage. Die postmortalen Blutproben wurden vor der Hornhautentnahme am Verstorbenen über die Vena subclavia entnommen. Mindestens 6 Milliliter Vollblut wurden in BD Vacutainer SST II Advance Serum-Röhrchen aus PET, 8,5 ml Fassungsvermögen, mit Trenngel, der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) überführt, nach Eintreffen in der Gewebebank mittels einer Hettich-Tischzentrifuge (Universal, Tuttlingen, Deutschland) 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und nicht länger als 48 Stunden bei +2 bis +8°C zwischengelagert.

Die Messungen der Blutproben erfolgten im infektionsserologischen Labor der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, Campus Charité Mitte mithilfe des BEP-III-Systems der Firma Siemens (Eschborn, Deutschland) mittels den zugehörigen CE-zertifizierten ELISA-Testen. Im Zentrallabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Zentralinstitut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, erfolgten die Messungen der postmortalen Proben mittels des Cobas6000-System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Für die TPLA-Untersuchungen wurden hier photometrische Messungen mit dem c502 Immunoassay System (ecl elecsis) eingesetzt. Anti-HBc und Anti-HBs wurden mittels der kompetitiven Methode des e601 Immunoassay Systems (ecl elecsis) untersucht, für die anderen Parameter (HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV1/2) wurde die Sandwich Methode des e601 Immunoassay Systems eingesetzt. Die serologischen Untersuchungen der Blutproben erfolgten unmittelbar nach der Hornhautentnahme als Bestandteil der Kontraindikationsprüfung für die Freigabe der Spenderhornhäute zur Transplantation.

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse galt die prämortale Blutprobe immer als Referenzmaterial. Das bedeutet, dass alle postmortal negativen Ergebnisse als falsch negativ beurteilt wurden, wenn die prämortale Vergleichsprobe positiv getestet wurde. Alle positiven postmortalen Testergebnisse wurden als falsch positiv beurteilt, insofern die prämortale Vergleichsprobe negativ getestet wurde. In jedem Fall eines falsch positiven oder falsch negativen postmortalen Testergebnisses, wurden virologische Untersuchungen mittels NAT/PCR als Bestätigungstests veranlasst, sofern noch Material verfügbar war.

Ergebnisse

Bei 487 Hornhautspendern kam es in insgesamt 21 Fällen (4,3%) zu Diskrepanzen bei den verschiedenen getesteten Parametern. Das Alter der Spender mit nachgewiesenen Unstimmigkeiten reichte von 45 bis 75 Jahren. 7 der Spender waren weiblichen Geschlechts und 14 männlichen Geschlechts.

262 getestete postmortale Blutproben (Gruppe 1) wurden in einem Zeitrahmen von 24-66 Stunden postmortem entnommen. 225 postmortale Blutproben (Gruppe 2) waren nicht älter als 24 Stunden (3-24 Stunden). Es ergaben sich 17 (13 falsch positive, 4 falsch negative) Diskrepanzen in Gruppe 1, und 4 in Gruppe 2 (4 falsch positive, 0 falsch negative).

Es wurden übereinstimmend richtig positive Ergebnisse in 32 jeweils prä- und postmortal getesteten Blutproben gefunden (3 HBsAg, 15 Anti-HBs, 11 Anti-HBc, 2 Anti-HCV, 1 TPLA).

HBsAg:

Bei 7 Spendern (1,4 %) wurden abweichende Ergebnisse festgestellt. Davon wurde bei 3 Spendern die prämortale Blutprobe positiv und die postmortale Probe negativ getestet. Bei keinem dieser diskrepanten Fälle konnte eine anschließende HBV-PCR durchgeführt werden, da

kein postmortales Blut mehr vorhanden war. Bei 4 Spendern wurde die prämortale Probe negativ und die postmortale positiv getestet. In 2 Fällen konnte eine negative HBV-PCR einen falsch positiven postmortalen Befund untermauern.

Anti-HBs:

Bei 3 Spendern (0,6 %) wurden Diskrepanzen festgestellt. Bei allen Spendern wurde die prämortale Blutprobe positiv und die postmortale Probe negativ getestet. Alle drei Spender wurden prä- und postmortal für HBsAg und Anti-HBcIgG+IgM negativ getestet. In keinem Fall wurde eine HBV-PCR veranlasst.

Anti-HBcIgG+IgM:

Bei einem Spender (0,2 %) wurde ein diskrepantes Ergebnis festgestellt. Dieser Spender wurde prä mortal negativ und postmortal positiv getestet. Die Blutproben dieses Spenders wurden prä- und postmortal für Anti-HBs und HBsAg negativ getestet. Eine HBV-PCR wurde nicht veranlasst.

Anti-HCV:

Bei einem Spender (0,2 %) wurde ein abweichendes Ergebnis festgestellt. Bei diesem Spender wurde die prä mortale Blutprobe Anti-HCV positiv und die postmortale Anti-HCV negativ getestet. Eine anschließend durchgeführte HCV-PCR der prä mortalen Blutprobe bestätigte ein positives Ergebnis. Für die postmortale Blutprobe wurde keine HCV-PCR durchgeführt, da kein Material mehr verfügbar war.

Anti-HIV1/2:

Bei 4 Spendern (0,8 %) wurden Diskrepanzen festgestellt. Alle 4 Spender wurden prä mortal Anti-HIV 1/2 negativ und postmortal Anti-HIV 1/2 positiv getestet. Eine HIV-PCR wurde in einem der Fälle veranlasst, die Probenmenge musste dabei 1:5 verdünnt werden und es konnte keine HIV1-RNA nachgewiesen werden.

TPLA:

Bei 5 Spendern (1,0 %) wurden abweichende Ergebnisse festgestellt. Bei allen Spendern wurde die prä mortale Blutprobe negativ und die postmortale Probe positiv getestet. Alle 5 reaktiv getesteten TPLA-Ergebnisse wurden in einem zweiten Ansatz auf VDRL (Veneral Disease Research Laboratory Test) bzw. FTA-ABS IgG+IgM (Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Absorptionstest) getestet. Keines der positiven Ergebnisse konnte dadurch bestätigt werden.

Studie 2: Validierung des Siemens-BEP III-Automatensystems für die infektionsserologische Testung von Anti-HIV 1/2, Anti-HCV, HBsAg und Anti-HBc aus postmortalem Blut

Methodik

Im Zeitraum von Februar bis April 2010 wurden bei 20 Augenhornhautspendern der Universitätsgewebebank der Charité, Hornhautbank Berlin, Campus Virchow-Klinikum, postmortale Blutproben gewonnen. Alter und Geschlecht der Spender sowie die Zeit der Probenahme postmortem wurden erfasst.

Für die Nachversuche zum HIV-low-Spiking wurden im Zeitraum Mai bis August 2010 nochmals Proben von 20 Hornhautspendern gesammelt.

Unmittelbar nach der standardisierten Blutentnahme (Hautdesinfektion, Punktion der Vena subclavia mit sterilem Equipment, Gewinnung von mindestens 6 ml postmortalem Vollblut in BD Vacutainer SST II Advance Serum-Röhrchen aus PET, 8,5 ml Fassungsvermögen, mit Trenngel, der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) wurden die Proben zentrifugiert (Hettich-Tischzentrifuge Universal, Tuttlingen, Deutschland), das Serum in drei Portionen unterteilt und bei -30 ± 5 °C tiefgefroren. Das Volumen pro Probenanteil betrug 1,5 – 2 ml. Einen Tag vor der Testdurchführung wurden die Proben aufgetaut und bis zum Spiking im Kühlschrank bei +2 bis +8 °C zwischengelagert.

Die gefriergetrockneten Standards (Anti-HCV IgG, HIV-Reference IV, Paul-Ehrlich Institut, Langen, Deutschland) wurden in Natriumchlorid-Lösung (isotonische Natriumchloridlösung 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland) aufgelöst. Die benötigten Vorverdünnungen der Standards (HIV-Reference IV, HBsAg ad 1000 Standard Original, Paul-Ehrlich Institut, Langen, Deutschland) erfolgten mittels infektionsserologisch negativ getesteten Humanserums von Blutspendern. Das Probenvolumen pro Messansatz betrug 500 µl.

Das erste Aliquot der Originalprobe wurde ohne Zusatz getestet. Das zweite Aliquot wurde in geringer Menge nahe dem cut-off Wert (low-Standard) mit dem jeweils zu untersuchenden Antigen oder Antikörper gespiked. Das dritte Aliquot wurde, bis auf Anti-HBc, in hoher Konzentration (high-Standard) mit dem zu untersuchenden Antigen oder Antikörper gespiked. Das Spiking erfolgte mittels einer geeichten Biomaster®-Eppendorf-Pipette.

Alle Messungen erfolgten am BEP-III-System (Siemens) im infektionsserologischen Labor des Institutes für Transfusionsmedizin der Charité, Campus Mitte.

Ergebnisse

Die infektionsserologische Testung der primären prämortalen Laborrückstellproben der eingeschlossenen Hornhautspender ergab am BEP-III-System für alle Parameter (Anti-HIV 1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV) eindeutig negative Ergebnisse.

Anti-HCV

Alle ungespikten Proben waren richtig negativ. Sowohl die mit dem low-Standard als auch die mit dem high-Standard gespikten Proben zeigten für Anti-HCV richtig positive Ergebnisse.

HBsAg

18 von 20 ungespikte Proben waren richtig negativ. 2 von 20 der ungespikten Kontrollproben wiesen ein falsch positives Ergebnis auf. Die veranlassten, jeweils im Doppelansatz durchgeführten Bestätigungsteste dieser Proben zeigten eindeutig negative Ergebnisse. Alle mit dem high-Standard gespikten Proben sowie 19 von 20 mit dem low-Standard gespikte Proben zeigten für HBsAg richtig positive Ergebnisse. In einer der 20 Proben wurden Werte ermittelt, die auffällig niedriger waren. Nach Prüfung der Proben konnte ein Pipettierfehler des Volumens des postmortalen Serums als Ursache ermittelt werden.

Anti-HBc

Alle ungespikten Proben waren richtig negativ. Alle mit dem low-Standard gespikten Proben zeigten für Anti-HBc richtig positive Ergebnisse. Auf die Validierung eines high-Standards wurde nach Rücksprache mit dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) verzichtet.

Anti-HIV

Alle ungespikten Proben waren richtig negativ. Alle mit dem high-Standard gespikten Proben zeigten für Anti-HIV richtig positive Ergebnisse.

Für den low-Standard ergaben sich bei 18 von 20 Proben falsch negative und nur bei 2 von 20 Proben richtig positive Ergebnisse. Daraufhin wurde mithilfe weiterer 10 postmortalen Blutproben eine Verdünnung von 1:4000 getestet und mit der ursprünglichen Verdünnung von 1:5000 verglichen. Alle Ergebnisse waren bei einer Verdünnung des HIV Referenzmaterials von 1:4000 richtig positiv. Ursache der falsch negativen Messwerte im ersten Versuchsansatz dürfte somit ein systematischer Pipettierfehler gewesen sein. Der Versuchsansatz wurde mit 20 neuen postmortalen Blutproben wiederholt. Diese 20 Blutproben ergaben zusammen mit den 10 Blutproben aus der Verdünnungs-Vergleichsreihe für 29 von 30 mit dem low-Standard gespikte Proben richtig positive Ergebnisse für Anti-HIV. Ein falsch negatives Ergebnis wurde in 1 von 30 Proben ermittelt. Ursache hierfür war mit hoher Wahrscheinlichkeit ein präanalytisches Problem der Probe.

Bei keinem der getesteten Parameter konnte ein Einfluss der postmortalen Abnahmezeit der Leichenblutproben, des Spenderalters oder des Spendergeschlechts auf das Ergebnis festgestellt werden.

Studie 3: Untersuchung serologischer Parameter im postmortalen Blut von Verstorbenen mit einer Infektion des Humanen Immundefizienz-Virus, Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus bis zu 48 Stunden

Methodik

In die Studie wurden Verstorbene mit gesicherter oder sehr wahrscheinlicher HIV- und/oder, HBV- und/oder HCV-Infektion oder gesichertem Hinweis auf eine positive Infektionsserologie eingeschlossen. Nach Eintreffen in das Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf erfolgten die Todeszeitbestimmung gemäß den rechtsmedizinischen Vorgaben sowie die Erfassung der Infektionsanamnese. Die Verstorbenen wurden im gesamten Untersuchungszeitraum im Kühlraum des Institutes unter Temperaturüberwachung bei +7 bis +9°C gelagert.

Die Blutentnahmen erfolgten nach Einlieferung sowie nach 12, 24, 36 und 48 Stunden. Dazu wurde zunächst die Punktionsstelle desinfiziert. Anschließend wurden mittels steriler TSK-Supra Punktionskanüle 2.00 x 100 und steriler 20 ml Spritze (Discardit, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) 20ml Vollblut aus peripheren großen Gefäßen (A.V. femoralis, A.V. subclavia) entnommen und in etikettierte, leere 10 ml Probenröhrchen (Harre GmbH&Co. KG, Hannover, Deutschland) umgefüllt. In Ausnahmefällen war die Punktion des Herzens nötig. Die Zentrifugation und das Abseren erfolgten im direkten Anschluss an die Entnahme. Ein Teil des Serums wurde danach bei +2-+6°C gelagert und innerhalb von 12 Stunden im infektionsserologischen Labor des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie, gemessen. Die Messungen erfolgten am Architect-System der Firma Abbott Diagnostics (Wiesbaden, Deutschland) mittels ELISA-Test. Der zweite Teil der Serumproben wurde unverzüglich eingefroren und bei unter -70°C zwischengelagert. In regelmäßigen Abständen wurden mit diesen Proben Kontrollmessungen (spätestens nach 9 Monaten) im infektionsserologischen Labor der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, Campus Charité Mitte durchgeführt. Die Messungen erfolgten am BEP-III-System der Firma Siemens (Eschborn, Deutschland) mittels ELISA-Test.

Ergebnisse

Humanes Immundefizienz-Virus

Insgesamt konnten 6 Verstorbene (5 Männer/1 Frau) im Alter von 37 bis 61 Jahre eingeschlossen werden. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Einlieferung Anti-HIV positiv. In den Folgemessungen bis 48 Stunden postmortal blieben alle Befunde eindeutig positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden nicht erhoben. Alle Befunde wurden durch die Kontrollmessung in der Charité (nach 8-10 Monaten Lagerung bei unter -70°C) bestätigt.

Hepatitis-C-Virus

Insgesamt konnten 20 Verstorbene (14 Männer/6 Frauen) im Alter von 32 bis 81 Jahre eingeschlossen werden. 3 Probanden mussten ausgeschlossen werden, da die Angehörigen keine Zustimmung für die Teilnahme an der Studie erteilten. Alle Probanden waren bei Einlieferung Anti-HCV positiv. 16 von 17 Probanden waren auch nach 48 Stunden postmortal noch Anti-HCV positiv. Bei einem Probanden konnte nur bis 36 Stunden postmortal gemessen werden, da für den 48-Stundenwert kein Material mehr zur Verfügung stand. Der 36-Stundenwert dieses Probanden war positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden nicht erhoben. Alle Befunde wurden durch die Kontrollmessung in der Charité (nach 8-10 Monaten Lagerung bei unter -70°C) bestätigt. In 2 von 17 Fällen war der 48-Stundenwert schwach positiv.

Hepatitis-B-Virus

Insgesamt konnten 10 Verstorbene (6 Männer/4 Frauen) im Alter von 32 bis 74 Jahre eingeschlossen werden. 1 Proband musste ausgeschlossen werden, da die Angehörigen keine Zustimmung für die Teilnahme an der Studie erteilten. 5 der 9 Probanden waren bei Einlieferung und nach 48 Stunden HBsAg positiv. 4 von 9 Probanden waren trotz positiver Infektionsanamnese bei der Eingangsuntersuchung und in allen Folgetests (12-48 (36) h) HBsAg negativ, so dass in diesen Fällen von einer durchgemachten/abgeheilten Infektion ausgegangen werden kann. Alle Probanden waren bei Einlieferung (<12, 12, 24 oder 36 h p.m.) und nach 48

Stunden (1 Proband nur bis 36 Stunden, da der 48-Stundenwert fehlt) Anti-HBc positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden in Hamburg nicht erhoben. In den Kontrollmessungen in der Charité (nach 8-10 Monaten Lagerung bei unter -70°C) konnten 5 positive Messergebnisse nicht bestätigt werden.

Kontrollgruppe

Es wurden 12 postmortale Augenhornhautspender mit bekannt negativer Eingangsserologie untersucht. Bis zu 48 Stunden postmortal blieben alle Befunde richtig negativ. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden nicht erhoben.

Diskussion

Wie in Studie 1, einem retrospektiven Vergleich der infektionsserologischen Befunde aus prä- und postmortalen Blutproben von 487 Augenhornhautspendern, gezeigt werden konnte, treten in 4,3% der Fälle abweichende Ergebnisse auf. Auch wenn in 95,7% identische Ergebnisse gefunden wurden, kam es in knapp 1% zu falsch negativen Ergebnissen in der postmortalen Blutprobe. Die Rate falsch positiver Ergebnisse ist mit etwa 3,3% deutlich niedriger, als in der Literatur beschrieben. Challine et al. und Heim et al. geben die Rate von falsch positiven Ergebnissen mit 19,1% bzw. 51,5% an (Challine 2006, Heim 1999). Falsch negative Befunde sind sehr selten, jedoch wurde eine solche Konstellation bei einer prä mortal positiven Hepatitis C Virus-Serologie in der postmortalen Blutprobe in der Arbeit von Heim et al. beschrieben.

Challine et al. zeigten einen direkten und signifikanten Zusammenhang zwischen dem Anstieg makroskopisch abnormaler Befunde (v.a. Hämolyse, ikterische bzw. trübe Seren) und der postmortalen Entnahmezeit. Jedoch hing weder die Prävalenz positiver Befunde noch die Richtigkeit von der postmortalen Entnahmezeit ab (Challine 2006).

Bei 6,4% der untersuchten Gesamtpopulation zeigten sich in unserer Studie sowohl in der postmortalen als auch in der prä mortalen Rückstellprobe übereinstimmende positiv reaktive serologische Befunde. Dieses Ergebnis wird in den Arbeiten von Karhunen et al. und Pepose et al. bestätigt, die dieser Fragestellung in der Untersuchung von Verstorbenen mit einer Infektion mit Humanem Immundefizienz Virus nachgingen (Karhunen 1994, Pepose 1987).

In Studie 2 wurde die Fragestellung der Detektion auffälliger serologischer Marker in postmortalem Blut im Rahmen einer standardisierten Validierungsuntersuchung am BEP-III System der Firma Siemens prospektiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Parameter (Spiking mit ermittelter niedriger und hoher Konzentration des PEI/WHO-Standards) unabhängig von der postmortalen Entnahmezeit des Blutes zuverlässig detektiert werden konnten. Die Validierung eines Testsystems für die infektionsserologische Diagnostik aus postmortalem Blut ist mit der vorgelegten Methodik möglich und kann daher für die Eignungstestung anderer Messsysteme genutzt werden.

Der postmortale Verlauf von infektionsserologischen Parametern für das Humane Immundefizienz Virus, das Hepatitis B Virus und das Hepatitis C Virus wurde in Studie 3 erstmals prospektiv untersucht. In allen Fällen wurden die auffälligen serologischen Parameter über den gesamten Beobachtungszeitraum eindeutig als positiv identifiziert. Die Kontrolluntersuchungen an infektionsserologisch unauffälligen Verstorbenen blieben über 48 Stunden richtig negativ. Die Ergebnisse sprechen für eine hohe Stabilität der Antikörper bzw. Antigene im postmortalen Verlauf und bestätigen damit die Befunde von Pepose et al. (Pepose 1987, 1992).

Insgesamt lässt sich eine 24 Stundengrenze für postmortale Ergebnisse wissenschaftlich mit unseren Ergebnissen nicht unterstützen.

Im Regelfall können serologische Parameter für HIV, HBV und HCV richtig positiv bzw. richtig negativ bis zu einer postmortalen Entnahmezeit der Blutproben von 48 Stunden identifiziert werden. In Einzelfällen zeigte die retrospektive Analyse jedoch auf, dass die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Befunde im postmortalen Blut, unabhängig von der Entnahmezeit, nicht ausgeschlossen werden kann. Daher ist es primär zwingend erforderlich, das genutzte Testsystem für die Diagnostik aus postmortalem Blut nach standardisierten Verfahren zu validieren. Um die Gefahr falscher Laborbefunde weiter zu reduzieren, muss insbesondere der Präanalytik große Beachtung geschenkt werden. Die Probenaufbereitung des postmortalen Blutes, die sich bei der retrospektiven bzw. den beiden prospektiven Studien deutlich unterschied, hat sehr wahrscheinlich einen signifikanten Einfluss auf die serologische Diagnostik. Die sofortige Zentrifugation nach Entnahme mit unmittelbarer Separation des Überstandes und sorgfältiger Kühlung bei +2 bis +4°C, bzw. Einfrieren bei etwa -20°C bei längerem Intervall bis zur Diagnostik, wirkt sich positiv auf die Zuverlässigkeit serologischer Testsysteme aus.

Weitere Untersuchungen zu postmortalen Veränderungen von Eiweiß- und Zellstrukturen in den Blutproben sind notwendig, um deren Zustand und Eignung für die serologische bzw. molekulargenetische Diagnostik noch besser einschätzen zu können.

Referenzen

Challine, D., Roudot-Thoraval, F., Sabatier, P., Dubernet, F., Larderie, P., Rigot, P., & Pawlotsky, J.M. (2006). Serological Viral Testing of Cadaveric Cornea Donors. *Transplantation* 82(6) 788-793rd

European Union: Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, 9.2.2006; 38:40-52

Federal Ministry of Justice: TPG-Gewebeverordnung (TPG-GewV) [Regulation on quality and safety requirements regarding tissue removal and transplantation according to the German transplant law]. 26 March 2008, BGB1 I: 512

Heim, A., Wagner, D., Rothämel, T., et al. Evaluation of Serological Screening of Cadaveric Sera for Donor Selection for Cornea Transplantation. *J Med Virol* 1999; 58 (3): 291-295

Karhunen, P.J., Brummer-Korvenkontio, H., Leinikki, P., Nyberg, M. (1994), Stability of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antibodies in Post-mortem Samples, *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 39, No. 1, pp. 129-135

Pepose, J.S., MacRae, S., Quinn, T.C. & Ward, J.W. (1987). Serologic Markers After the Transplantation of Corneas from Donors Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Am J Ophthalmol* 103, 798-801

Pepose, J.S., Buerger, D.G., Paul, D.A., Quinn, T.C., Darragh, T, M. & Donegan, E. (1992). New Developments in Serologic Screening of Donors for Corneal HIV-1 and Hepatitis B Virus. *Infections Ophthalmology* 99:879-88

Pruss, A., Caspari, G., Krüger, D.H., Blümel, J., Nübling, C.M., Gürtler, L. & Gerlich, W.H. (2010). Tissue Donation and Virus Safety: More Nucleic Acid Amplification is Needed. *Transpl Infect Dis.* 2010 Oct; 12(5):375-86

Erklärung über Anteil an Publikationen

Ina Wilkemeyer hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

I. Wilkemeyer, A. Pruss, U. Kalus, J. Schroeter

Comparative infectious serology testing of pre- and post-mortem blood samples from cornea donors

Cell and Tissue Banking, DOI: 10.1007/s10561-012-9326-0, Online First™, 17 July 2012

80%: Bei dieser Publikation stammten das Studiendesign und die entsprechende Planung von Frau Wilkemeyer. Sie führte eine retrospektive Auflistung aller prä- und postmortalen serologischen Blutbefunde (Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg) der Hornhautspender aus den Jahren 2004-2009 selbständig durch, traf eine Auswahl geeigneter Befunde und führte dessen Auswertung durch. Sie verfasste auf der Grundlage einer eigenen Literaturrecherche selbständig eine erste Fassung des Manuskripts und hat dazu beigetragen, die Endversion in die englische Sprache zu übersetzen.

Publikation 2:

Kalus U, Wilkemeyer I, Caspari G, Schroeter J, Pruss A

Validation of the Serological Testing for Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg and Anti-HBc from Post-mortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic System

Transfus Med Hemother. 2011 Dec; 38(6):365-372. Epub 2011 Nov 17

30%: Hier bestand der Anteil von Frau Wilkemeyer in der postmortalen Blutentnahme und der Sammlung geeigneter prä- und postmortaler Blutproben von Augenhornhautspendern. Sie aliquotierte und spikte alle prä- und postmortalen Blutproben im Labor mit den jeweiligen PEI/WHO-Standards selbst, begleitete die Laboranalytik am BEP-III-Automaten und erstellte die Tabellen zur Auswertung der Befunde. Sie führte eine Literaturrecherche durch, hatte einen geringen Anteil bei der Anfertigung des Manuskripts und hat dazu beigetragen, die Endversion in die englische Fassung zu übersetzen.

Publikation 3:

Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U, Pruss A

A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death

J Med Microbiol. 2011 Jul; 60(Pt 7):920-6. Epub 2011 Mar 24

15%: Frau Wilkemeyers Anteil an dieser Arbeit bestand in der Prüfung, Etikettierung und Überführung der primären Blutproben der infektiös Verstorbenen aus dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in das infektionsserologische Labor der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin. Sie beteiligte sich an der Durchführung der Kontrollmessungen im infektionsserologischen Labor der Charité, Universitätsmedizin Berlin und fertigte die Tabellen zur Auswertung der Befunde an. Sie hat dazu beigetragen, die Endversion des Manuskripts in die englische Sprache zu übersetzen und präsentierte die Ergebnisse der Studie auf dem EATB-Kongress 2010 und dem EEBA-Kongress 2011.

.....
Ina Wilkemeyer

Vergleich infektionsserologischer Testergebnisse prä- und postmortalen Blutproben von Gewebespendern

Cell and Tissue Banking, Online First™, 17 July 2012
DOI: 10.1007/s10561-012-9326-0

**Validierung des Siemens-BEP III-Automatensystems für die infektionsserologische
Testung von Anti-HIV 1/2, AntiHCV, HBsAg und Anti-HBc aus postmortalem Blut**

Transfus Med Hemother. 2011 Dec; 38(6):365-372. Epub 2011 Nov 17
DOI: 10.1159/000334481

Untersuchung serologischer Parameter im postmortalen Blut von Verstorbenen mit einer Infektion des Humanen Immundefizienz-Virus, Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus bis zu 48 Stunden

J Med Microbiol. 2011 Jul; 60(Pt 7):920-6. Epub 2011 Mar 24.
DOI: 10.1099/jmm.0.027763-0

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Form meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Liste eigener Publikationen - Ina Wilkemeyer

Originalarbeiten

1. Wilkemeyer I, Pruss A, Kalus U, Schroeter J
Comparative infectious serology testing of pre- and post-mortem blood samples from cornea donors
Cell and Tissue Banking, DOI: 10.1007/s10561-012-9326-0, Online First™, 17 July 2012
Impact Factor: 0.965
2. Kalus U, Wilkemeyer I, Caspari G, Schroeter J, Pruss A
Validation of the Serological Testing for Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg and Anti-HBc from Post-mortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic System
Transfus Med Hemother. 2011 Dec; 38(6):365-372. Epub 2011 Nov 17
Impact Factor: 1.164
3. Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U, Pruss A
A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death
J Med Microbiol. 2011 Jul; 60(Pt 7):920-6. Epub 2011 Mar 24
Impact Factor: 2.502

Kongressbeiträge

1. Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U, Pruss A
A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death
19th International Congress of the European Association of Tissue Banks, Berlin, 03.-05.11.2010
2. Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U, Pruss A
A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death
XXIII Annual Meeting of the European Eye Bank Association, Freiburg, 21.-22.01.2011
3. Schroeter J, Wilkemeyer I, Pruß A
Validation of Microbiological Diagnostics of Culture Medium Using BacTec Blood Culture Bottles
XXIV Annual Meeting of the European Eye Bank Association, Rotterdam, 20.-21.01.2012
4. Wesslau C, Pruß A, Schroeter J, Meyer R, Wilkemeyer I, Hetzer R
Gewebebank Berlin-Brandenburg - A Successful Example of Regional Tissue Recovery
Foundation of European Tissue Banks, Mini-Symposium, München, 14.-15.06.2012

Erklärung

"Ich, Ina Wilkemeyer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Charakterisierung und Validierung von infektionsserologischen Laborparametern des Humanen Immundefizienz-Virus, des Hepatitis-B-Virus und des Hepatitis-C-Virus aus postmortalem Blut" selbst verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

.....
Datum

.....
Ina Wilkemeyer

Danksagung

Recht herzlich bedanke ich mich bei meinem Lebensgefährten, Daniel Huss, für seine großartige moralische Unterstützung und der Durchsicht sämtlicher englischer Fassungen meiner Publikationen.

Ebenso gilt mein Dank meinen Eltern, Horst und Anni Wilkemeyer, für die moralische Unterstützung. Sie haben mir während meiner Promotionszeit immer zur Seite gestanden.

Ich danke OA Dr. med. Ulrich Kalus für die wissenschaftliche Unterstützung, der Durchsicht meiner Publikationen, sowie der interessanten und produktiven Zusammenarbeit.

In großer Form danke ich Professor Dr. med. Axel Pruß für die wissenschaftliche Unterstützung, die Durchsicht meiner Publikationen und meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, an aus- und inländischen Kongressen teilzunehmen und mich selbst, wie auch meine Vorliebe für die Wissenschaft zu fördern.

Schließlich gilt mein besonderer Dank Herrn OA Dr. med. Jan Schroeter für die ununterbrochene moralische und wissenschaftliche Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit, sowie der Durchsicht meiner Publikationen und meiner Doktorarbeit.