

**Aus der tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik
Würzburg**

Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg

Chefarzt: Professor Dr. med. August Stich

**Etablierung eines ELISA basierten IgG-Antikörpernachweises aus Dried Blood
Spots zur Erkennung von opportunistischen CMV-, VZV-, HSV- und
Toxoplasmoseinfektionen bei einer HIV-Infektion**

–

**Validierung der methodischen Grundlagen und Evaluierung mit Patientenproben
des Missionsärztlichen Instituts Würzburg**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Frank Oskar Bernard

aus Karlsruhe

Würzburg, November 2016



Referent: Professor Dr. med. August Stich

Koreferent: Professor Dr. rer. nat. Klaus Brehm

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2016

Der Promovend ist Arzt

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gewinnung und Transport von Patientenprobenmaterial in afrikanischen Ländern.....	1
1.2	Dried Blood Spots	1
1.3	Idee und Fokus dieser Dissertation.....	2
1.4	Behets – Studie von 1992	3
1.5	Studiendesign.....	4
1.6	Fragestellung dieser Dissertation.....	5
1.6.1	1. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot entspricht dem Antikörpergehalt in dem zugehörigen Serum.....	5
1.6.2	2. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot bleibt bei idealer Lagerung über 4 Wochen stabil bzw. die Bewertung des Dried Blood Spot bleibt unverändert.....	6
1.6.3	3. Hypothese: Nach Zugabe eines Trockenmittels in einen gasdichten Alubeutel bleiben Antikörpertiter von Dried Blood Spots bei simulierten Klimabedingungen wie Hitze und hoher Luftfeuchtigkeit am längsten stabil.	7
1.6.4	4. Hypothese: Der erwartete Abfall des Antikörpertiters ist bei 45 °C höher, als bei 38° oder niedrigerer Temperatur.....	8
1.6.5	5. Hypothese: Bei hoher Luftfeuchtigkeit ist der Abfall des Antikörpertiters größer.	8

1.7	Kooperation zwischen dem Missionsärztlichen Institut Würzburg und dem Bugando University College of Health Sciences Mwanza, Tansania	9
1.8	HIV und AIDS.....	9
1.9	VZV, CMV, HSV und Toxoplasma als häufige Opportunisten einer HIV-Infektion.....	11
1.9.1	Varicella-Zoster Virus (VZV)	11
1.9.2	Zytomegalievirus (CMV)	12
1.9.3	Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2).....	13
1.9.4	Toxoplasma gondii	14
1.10	Der ELISA	15
1.10.1	Prinzip.....	15
1.10.2	Formen.....	15
1.10.2.1	Direkte und indirekte ELISA	16
1.10.2.2	Kompetitive und nicht-kompetitive ELISA	16
1.10.3	Der ELISA classic der Institut Virion\Serion GmbH.....	16
2	Material und Methoden	19
2.1	Verwendete Materialien	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Herstellung von Dried Blood Spots.....	20
2.2.2	Lagerung der DBS unter verschiedenen Bedingungen zur Simulation afrikanischen Klimas	23
2.2.3	Austestung der DBS im ELISA – Studie A und B	26
2.2.3.1	Vorbereitung Studie A.....	26
2.2.3.2	Vorbereitung Studie B.....	31

2.2.3.3	Elution und Austestung der DBS	31
2.2.3.4	Testablauf – Austestung der DBS	33
2.2.3.5	Testablauf – Institut Virion\Serion ELISA classic IgG	34
2.2.3.6	Auswertung	35
3	Ergebnisse der DBS -Studie.....	36
3.1	Homogenität eines Dried Blood Spots	36
3.2	Das Backgroundphänomen.....	38
3.2.1	Modifikationen der ELISA Abarbeitung zur Verminderung des Backgroundphänomens	38
3.2.1.1	Abarbeitung gemäß Platelia® Toxo IgM Neonatal assay (Bio-Rad, Hercules, California, USA)	39
3.2.1.2	Abarbeitung einer Kombination aus Platelia® Toxo IgM mit herkömmlicher ELISA Abarbeitung	39
3.2.1.3	Abarbeitung mit Enzyminhibitoren.....	40
3.2.1.4	Abarbeitung mit 0,5% Natriumazid	40
3.2.1.5	Abarbeitung mit einer Seruminkubation bei 8°C über Nacht	41
3.2.1.6	Verschiedene Kombinationen aus den vorherigen Modifikationen	41
3.2.1.7	Abarbeitung mit LowCross-Buffer®	42
3.2.1.8	Abarbeitung mit Hemmstoffen der Atmungskette	43
3.2.1.9	Tabelle mit Ergebnissen der modifizierten ELISA Abarbeitungen	44
3.2.2	Abwägung der Notwendigkeit einer neuen Grenzwerteinstellung aufgrund des Backgroundphänomens.....	46
3.2.3	Zusammenfassende Beurteilung der Modifikationen zur Minimierung des Backgroundphänomens	47

3.3	Ergebnisse von Studie B.....	48
3.3.1	Tabelle mit Ergebnissen der Austestungen aus Studie A und B	50
3.3.2	Studie B: Berechnung der Wiederfindung von Studie A und B.....	51
3.3.3	Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Studie A und B.....	52
3.4	Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel mit Trockenmittel	53
3.4.1	Testung auf VZV-Antikörper	53
3.4.1.1	Vor Beginn der Lagerung.....	53
3.4.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	54
3.4.1.3	Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel mit Trockenmittel	55
3.4.2	Testung auf CMV Antikörper	56
3.4.2.1	Vor Beginn der Lagerung.....	56
3.4.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	57
3.4.3	Testung auf HSV Antikörper.....	57
3.4.3.1	Vor Lagerung	57
3.4.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	58
3.4.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper.....	58
3.4.4.1	Vor Lagerung	58
3.4.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	59
3.5	Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel ohne Trockenmittel.....	60
3.5.1	Testung auf VZV-Antikörper	60
3.5.1.1	Vor Beginn der Lagerung.....	60

3.5.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	61
3.5.1.3	Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel ohne Trockenmittel.....	62
3.5.2	Testung auf CMV	63
3.5.2.1	Vor Lagerung	63
3.5.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	64
3.5.3	Testung auf HSV	64
3.5.3.1	Vor Lagerung	64
3.5.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	65
3.5.4	Testung auf Toxoplasma	65
3.5.4.1	Vor Lagerung	65
3.5.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	66
3.6	Ergebnisse der Lagerung bei 45°C in Alubeutel mit Trockenmittel.....	67
3.6.1	Testung auf VZV	67
3.6.1.1	Vor Lagerung	67
3.6.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	68
3.6.2	Testung auf CMV	68
3.6.2.1	Vor Lagerung	68
3.6.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	69
3.6.3	Testung auf HSV	69
3.6.3.1	Vor Lagerung	69
3.6.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	70
3.6.4	Testung auf Toxoplasma	70
3.6.4.1	Vor Lagerung	70

3.6.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung	71
3.7	Ergebnisse der Lagerung bei 45° in Alubeutel ohne Trockenmittel	72
3.7.1	Testung auf VZV Antikörper	72
3.7.1.1	Vor Lagerung	72
3.7.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung	73
3.7.2	Testung auf CMV Antikörper	73
3.7.2.1	Vor Lagerung	73
3.7.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung	74
3.7.3	Testung auf HSV Antikörper	74
3.7.3.1	Vor Lagerung	74
3.7.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung	75
3.7.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper	75
3.7.4.1	Vor Lagerung	75
3.7.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung	76
3.8	Ergebnisse der Lagerung bei 38° mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel mit Trockenmittel	77
3.8.1	Testung auf VZV Antikörper	77
3.8.1.1	Vor Lagerung	77
3.8.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung	78
3.8.2	Testung auf CMV	78
3.8.2.1	Vor Lagerung	78
3.8.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung	79
3.8.3	Testung auf HSV Antikörper	79
3.8.3.1	Vor Lagerung	79

3.8.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	80
3.8.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper.....	80
3.8.4.1	Vor Lagerung	80
3.8.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	81
3.9	Ergebnisse der Lagerung bei 38° mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel ohne Trockenmittel.....	82
3.9.1	Testung auf VZV Antikörper	82
3.9.1.1	Vor Lagerung	82
3.9.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	83
3.9.2	Testung auf CMV Antikörper	83
3.9.2.1	Vor Lagerung	83
3.9.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	84
3.9.3	Testung auf HSV Antikörper.....	84
3.9.3.1	Vor Lagerung	84
3.9.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	85
3.9.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper.....	85
3.9.4.1	Vor Lagerung	85
3.9.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	86
3.10	Ergebnisse der Lagerung bei 38° in Alubeutel mit Trockenmittel.....	87
3.10.1	Testung auf VZV Antikörper	87
3.10.1.1	Vor Lagerung	87
3.10.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	88
3.10.2	Testung auf CMV Antikörper	88
3.10.2.1	Vor Lagerung	88

3.10.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung	89
3.10.3	Testung auf HSV Antikörper	89
3.10.3.1	Vor Lagerung	89
3.10.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung	90
3.10.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper	90
3.10.4.1	Vor Lagerung	90
3.10.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung	91
3.11	Ergebnisse der Lagerung bei 38° in Alubeutel ohne Trockenmittel	92
3.11.1	Testung auf VZV Antikörper	92
3.11.1.1	Vor Lagerung	92
3.11.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung	93
3.11.2	Testung auf CMV Antikörper	93
3.11.2.1	Vor Lagerung	93
3.11.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung	94
3.11.3	Testung auf HSV Antikörper	94
3.11.3.1	Vor Lagerung	94
3.11.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung	95
3.11.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper	95
3.11.4.1	Vor Lagerung	95
3.11.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung	96
3.12	Ergebnisse der Lagerung bei 8° in Alubeutel mit Trockenmittel	97
3.12.1	Testung auf VZV Antikörper	97
3.12.1.1	Vor Lagerung	97
3.12.1.2	Nach 4 Wochen Lagerung	98

3.12.1.3	Ergebnisse der Lagerung bei 8°C in Alubeutel mit Trockenmittel.....	99
3.12.2	Testung auf CMV Antikörper	100
3.12.2.1	Vor Lagerung	100
3.12.2.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	100
3.12.3	Testung auf HSV Antikörper.....	101
3.12.3.1	Vor Lagerung	101
3.12.3.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	102
3.12.4	Testung auf Toxoplasma Antikörper.....	102
3.12.4.1	Vor Lagerung	102
3.12.4.2	Nach 4 Wochen Lagerung.....	103
4	Diskussion.....	103
4.1	Verifizierung der 1. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot entspricht dem Antikörpergehalt in dem zugehörigen Serum.....	103
4.2	Verifizierung der 2. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot bleibt bei idealer Lagerung über 4 Wochen stabil bzw. die Bewertung des Serums bleibt unverändert.....	104
4.3	Verifizierung der 3. Hypothese: In luftdichten Alubeuteln mit ZIP-Verschluss und nach Zugabe eines Trockenmittels bleiben Antikörpertiter von Dried Blood Spots bei simulierten Klimabedingungen wie Hitze und hoher Luftfeuchtigkeit am längsten stabil.	105
4.4	Verifizierung der 4. Hypothese: Der erwartete Abfall des Antikörpertiters ist bei 45 °C höher, als bei 38° oder niedrigerer Temperatur.....	108
4.5	Falsifizierung der 5. Hypothese: Der Abfall des Antikörpertiters ist bei hoher und bei niedriger Luftfeuchtigkeit annähernd gleich.	110

4.6	Zusammenfassung	114
4.7	Schlussfolgerung - Möglicher Algorithmus zur Herstellung, Transport und Diagnostik von Dried Blood Spots aufgrund der Erfahrungen in dieser Studie; Beispielhafte Abarbeitung mit einem ELISA classic Kit der Virion\Serion GmbH Würzburg	115
5	Referenzen	118

Abkürzungen:

AIDS	engl.: aquired immunodeficiency syndrome; AIDS-Erkrankung
Assay	engl. für Test, Probe; hier Test oder Untersuchung zum Antikörpernachweis, z.B.: ELISA
CMV	Zytomegalovirus
DBS	Dried Blood Spot
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DNP	2,4 Dinitrophenol
ELISA	engl.: enzyme linked immunosorbent assay; standardisierter Test der Antikörperdiagnostik
f_n	Falsch Negativ (Bewertung eines Serums im ELISA)
f_p	Falsch Positiv (Bewertung eines Serums im ELISA)
HIV	engl.: human immunodeficiency virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IU/ml	Internationale Units pro Milliliter
Kit	alle für Abarbeitung eines ELISA benötigten Komponenten
LF	Luftfeuchtigkeit
ln	Natürlicher Logarithmus
M	Konzentration 1 Molar
Missio	Missionsärztliche Klinik Würzburg
mM	Konzentration 1 Millimolar
MTP	Mikrotiterplatten beschichtet mit Erregerantigen, 96 Kavitäten
NPV	Negativer Vorhersage Wert
OD	Optische Dichte (im ELISA)
PPV	Positiver Vorhersage Wert
QK	Qualitätskontrolle
RefWert	Referenzwert
r_n	Richtig Negativ (Bewertung eines Serums im ELISA)
RNA	engl.: ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
r_p	Richtig Positiv (Bewertung eines Serums im ELISA)
RT	Raumtemperatur

STD	Standardserum (im ELISA)
TM	Trockenmittel
VZV	Varizella Zoster Virus

1 Einleitung

1.1 Gewinnung und Transport von Patientenprobenmaterial in afrikanischen Ländern

Die klimatischen und ökonomischen Bedingungen in afrikanischen Ländern stellen spezielle Anforderungen für den Versand von Patientenprobenmaterial. So erfordern die hohen Temperaturen kühlbare Versandbehälter, die zusätzlich das Probenmaterial vor dem Einfluss der meist dort herrschenden hohen Luftfeuchtigkeit schützen müssen. Des Weiteren vergeht bedingt durch die oft schlechte Infrastruktur, wertvolle Zeit zwischen Abnahme der Probe und Diagnostik der gewünschten Parameter, so dass eine valide Bestimmung dieser Parameter oft nicht mehr gewährleistet werden kann. (Behets et al. 1992)

Auch die vorausgehende Probengewinnung ist an spezielle Erfordernisse gebunden. Eine venöse Blutabnahme erfordert qualifiziertes Personal, birgt ein Infektionsrisiko für Patient und Personal und benötigt teure Blutabnahmesysteme wie Nadeln und Blutentnahmeröhrchen. Daneben wird eine technische Ausstattung zur Weiterverarbeitung wie Zentrifugen und Kühlmöglichkeiten gebraucht, um eine gleich bleibende Qualität der Proben zu sichern. (Parker und Cubitt 1999)

1.2 Dried Blood Spots

Dried Blood Spots sind Tropfen aus Vollblut (z.B.: aus Ohrläppchen oder Fingerbeere), die auf standardisierten Filterpapierkarten aufgebracht und bei Raumluft getrocknet werden und so in einem verschlossenen Umschlag versandfähig sind. Aus diesen lassen sich die verschiedensten diagnostischen Parameter bestimmen. (Parker und Cubitt 1999; Whatman International Ltd 2008; GUTHRIE und SUSI 1963)

Die Vergleichbarkeit von Kapillarblut (Ohrläppchen, Fingerbeere, Ferse) und venösem Blut haben Novello et al bereits 1996 gezeigt. (Novello et al. 1996)

Dried Blood Spots bieten vielfältige Vorteile. Für die oben beschriebenen klimatischen und ökonomischen Umstände stellen sie eine adäquate und einfache Möglichkeit dar, Blutproben für diagnostische Zwecke ohne Verlust der Nachweisbarkeit der gewünschten Parameter, zu versenden. (Parker und Cubitt 1999).

Die Entnahme von peripherem Blut aus Ohrläppchen oder Fingerbeere mit einer Einmallanzette wird bei Patienten sowie bei Laborpersonal eher akzeptiert als die Blutentnahme mit Kanüle und Spritze. Das Risiko einer Nadelstichverletzung ist geringer und eine erfolgreiche Blutentnahme mit Einmallanzette wahrscheinlicher als bei Kanüle und Spritze, gerade bei Patienten mit schlechtem Venensitus. (Novello et al. 1996; Steger et al. 1990)

Die Herstellung von Dried Blood Spots erfordert keine gesonderte labortechnische Ausbildung, ist einfach durchzuführen und umgeht das potentielle Infektionsrisiko, welches mit der Verwendung von Kanülen und Spritzen einhergeht. Daneben können Dried Blood Spots auch unter Feldbedingungen ohne Stromversorgung hergestellt werden. (Mercader et al. 2006)

Weiterhin verlieren viele Viren (z.B.: HIV-1 und HIV-2) ihre infektiösen Eigenschaften aufgrund der Zerstörung ihrer Hülle bei Trocknung. Beim Transport von Dried Blood Spots ist kein Trockeneis notwendig und die Gefahr eines Austritts von infektiösen Flüssigkeiten durch Bruch der Behältnisse ist nicht gegeben. Darüber hinaus bieten Dried Blood Spots ökonomische Vorteile, denn die benötigten sterilen Lanzetten und das Filterpapier sind billiger als Kanülen und Spritzen. (Parker und Cubitt 1999)

1.3 **Idee und Fokus dieser Dissertation**

Aufgrund des Engagements und der Zusammenarbeit der Abteilung für Tropenmedizin der Missionsärztlichen Klinik Würzburg mit der Bugando University College of Health Sciences in Mwanza, Tansania, entstand die Idee, mit einer Studie die Verwendung von Dried Blood Spots als mögliches Transportmittel von Patientenproben in Tansania zu untersuchen.

Die Umsetzung der Idee in dieser Dissertation basiert auf Erfahrungen aus einer Studie von Behets et al. „Stability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibodies in

Whole Blood Dried on Filter Paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire” aus dem Jahr 1992.

1.4 Behets – Studie von 1992

Behets et al. validierten die Verwendung von Dried Blood Spots zum Nachweis von HI-Virus Typ1 in Kinshasa, Zaire. Über einen Zeitraum von 20 Wochen wurden Dried Blood Spots 14 verschiedenen standardisierten Lagerungsbedingungen ausgesetzt, um den Einfluss der klimatischen Bedingungen in Zaire auf die Antikörperstabilität zu untersuchen.

Es wurden Dried Blood Spots von HIV-positiven Spendern mit hohen Antikörpertitern hergestellt. Um niedrig-titrige Dried Blood Spots zu erhalten, wurde ein hoch-titriges Serum mit HIV-negativem Vollblut verdünnt. Daneben wurden Dried Blood Spots von einem seronegativen Spender hergestellt. Darüber hinaus wurden Qualitätskontroll-DBS, hergestellt vom Center for Disease Control Atlanta (CDC), verwendet.

Zur Herstellung kamen standardisierte Filterpapierkarten von Schleicher und Schüll, Grade 903, zum Einsatz. Auf diesen wurde 75µl Vollblut aufgebracht und 48 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Um extreme Hitze und hohe Luftfeuchtigkeit zu simulieren, wurden Dried Blood Spots in einem Metallcontainer gelagert, der direkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt wurde. Eine andere Gruppe von Dried Blood Spots wurde in einem schattigen Raum gelagert, um die Bedingungen in einem durchschnittlichen Labor in Zaire nachzustellen.

Weitere Lagerungsbedingungen waren ein Kühlschrank 4°C und eine Gefriermöglichkeit von -20°C. Zur Messung der Luftfeuchtigkeit wurden Indikatorkarten (Multiform Desiccants) herangezogen.

Die Dried Blood Spots wurden in folgenden Behältnissen verpackt: Briefumschläge aus Papier, Alubeutel luftdicht und nicht luftdicht und versehen mit oder ohne Trockenmittel.

Die Lagerungsdauer betrug 20 Wochen. Mit einer Stanze wurden runde Plättchen mit einem Durchmesser von 6,3 mm ausgestanzt und in Mikrotiterplatten mit 200µl Verdünnungspuffer über Nacht inkubiert. Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgte

mittels ELISA und Western Blot zu folgenden Zeitpunkten: Zeitpunkt 0 vor Lagerung, 1., 2., 3., 4., 6., 8., 12. und 20. Woche.

Das Ergebnis der Studie zeigte, dass Dried Blood Spots für 6 Wochen unter tropischen Klimabedingungen, bei gleichbleibender Bewertung gelagert werden können, egal ob positiv oder negativ bewertet. Weiterhin ergaben sich keine falsch-positiven Bewertungen. Daneben konnte gezeigt werden, dass luftdichte Alubeutel mit einem Trockenmittel die Stabilität der Antikörpertiter verbessern.

Die Folgerung aus dieser Studie war, dass Dried Blood Spots selbst unter extremsten Bedingungen und einer Transportdauer von 6 Wochen noch eine gute Alternative für den Transport von Patientenproben darstellen. (Behets et al. 1992)

1.5 Studiendesign

Mit den uns zur Verfügung stehenden technischen Mitteln und unseren Vorstellungen und Ideen entwickelten wir eine Studie basierend auf der von Behets et al.

Ziel dieser Dissertation ist es, die Stabilität von Antikörpern in Dried Blood Spots zu untersuchen, wenn diese experimentell simulierten Umwelteinflüssen wie Hitze und Feuchtigkeit ausgesetzt werden. Die möglichen Umwelteinflüsse sollen experimentell unter Laborbedingungen simuliert werden.

Aus 28 HIV-positiven Seren der Missionsärztlichen Klinik wurden Dried Blood Spots hergestellt, die durch simulierte Lagerungsbedingungen, ähnlich den klimatischen Bedingungen Tansanias, über einen Zeitraum von 12 Wochen gelagert werden sollen. Anschließend soll eine ELISA basierte Antikörperdiagnostik auf 4 HIV-Opportunisten erfolgen: VZV, CMV, HSV und Toxoplasma. Unser Hauptaugenmerk gilt der Antikörperstabilität nach 4 Wochen. Diese Zeitspanne ist die angenommene längste Dauer eines Probenverkehrs in Tansania und beruht auf Erfahrungen des Missionsärztlichen Instituts Würzburg.

Anhand des Antikörpertiters soll der Einfluss der simulierten Bedingungen untersucht und die bestmögliche Lagerungsbedingung daraus abgeleitet werden. Die Einzelheiten werden in Material und Methoden beschrieben.

Für Umsetzung und Durchführung konnten wir uns die Erfahrungen und technischen Möglichkeiten der Institut Virion/Serion GmbH Würzburg als Hersteller von qualitativ hochwertigen ELISA-Testsystemen zu Nutzen machen.

Wir erhoffen durch diese Dissertation eine praktikable Anleitung für die Herstellung, den Transport und die anschließende diagnostische Abarbeitung von Dried Blood Spots in Tansania geben zu können, um damit wichtige Lücken in der Diagnostik von Patienten mit HIV-Infektion in Afrika schließen zu können.

1.6 Fragestellung dieser Dissertation

Zunächst soll gezeigt werden, dass Dried Blood Spots aus Vollblut zum Nachweis von Antikörpern herangezogen werden können.

Darauf basierend leitet sich folgende 1. Hypothese ab:

1.6.1 1. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot entspricht dem Antikörpergehalt in dem zugehörigen Serum

$H_0(1)$ Antikörpergehalt Dried Blood Spot = Antikörpergehalt des korrespondierenden Serums

$H_1(1)$ Antikörpergehalt Dried Blood Spot \neq Antikörpergehalt des korrespondierenden Serums

Eine Falsifizierung der 1.Nullhypothese ($H_0(1)$) würde bedeuten, dass Antikörper aus Vollblut nicht auf Dried Blood Spots konservierbar oder fixierbar wären.

Bereits 1963 bestätigten Guthrie und Susi die mögliche Verwendung von Dried Blood Spots zum Screening von Phenylketonurie bei Neugeborenen. (GUTHRIE und SUSI 1963)

Weitere Studien belegen die Vergleichbarkeit des Antikörpergehalts in Dried Blood Spots und dem korrespondierendem Serum. (Steger et al. 1990; Riddell et al. 2002; Hogrefe et al. 2002; Punnarugsa und Mungmee 1991; Condorelli et al. 1994)

Danach soll gezeigt werden, dass Dried Blood Spots bei optimaler Lagerung einen gleichbleibenden Antikörpergehalt über 4 Wochen gewährleisten. Diese Zeitspanne entspricht der längsten angenommenen Zeitspanne zwischen Abnahme und Diagnostik in Tansania nach den Erfahrungen der Missionsärztlichen Klinik.

Folglich lautet die nächste Hypothese:

1.6.2 **2. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot bleibt bei idealer Lagerung über 4 Wochen stabil bzw. die Bewertung des Dried Blood Spot bleibt unverändert.**

H₀-(2) Der Antikörpergehalt bzw. Bewertung eines Dried Blood Spots bleiben bei korrekter Lagerung über einen Zeitraum von 4 Wochen unverändert.

H₁-(2) Der Antikörpergehalt bzw. Bewertung eines Dried Blood Spots ändern sich trotz korrekter Lagerung früher als 4 Wochen.

Die Falsifizierung der 2. Nullhypothese würde bedeuten, dass vor Erreichen der maximalen durchschnittlichen Transportdauer einer Patientenprobe, der Antikörpergehalt derart abnimmt, dass keine korrekte Bewertung des Dried Blood Spots erfolgen kann.

Behets et al. zeigten, dass bei korrekter Lagerung der Patientenproben unter tropischen Bedingungen bis zu 6 Wochen nach Abnahme noch eine korrekte Bewertung der Dried Blood Spots möglich ist. (Behets et al. 1992)

Verschiedene Studien zeigen, dass eine Lagerung in gasdichten Alubeuteln mit ZIP-Verschluss und mit Zugabe eines Trockenmittels die bestmögliche Lagerung zum Erhalt einer validen diagnostischen Bewertung ist. (Mei et al. 2001; Parker et al. 1997; Therrell et al. 1996)

Wir wollen zeigen, dass dies auch für unsere simulierten Klimabedingungen gilt.

Die 3. Hypothese lautet:

1.6.3 3. Hypothese: Nach Zugabe eines Trockenmittels in einen gasdichten Alubeutel bleiben Antikörpertiter von Dried Blood Spots bei simulierten Klimabedingungen wie Hitze und hoher Luftfeuchtigkeit am längsten stabil.

H₀-(3) Antikörpertiter von Dried Blood Spots, gelagert in luftdichten Alubeuteln mit einem Trockenmittel, bleiben am längsten stabil.

H₁-(3) Antikörpertiter von Dried Blood Spots, gelagert in luftdichten Alubeuteln mit Trockenmittel, zeigen trotz dieser Lagerungsweise einen ähnlichen Abfall wie ohne Zugabe des Trockenmittels.

Die Falsifizierung der 3. Nullhypothese bedeutet, dass trotz Verwendung von Trockenmittel in luftdichten Alubeuteln, der Antikörpergehalt derart absinkt, dass sich die Bewertung der Proben ändert.

Weiterhin soll der Einfluss der simulierten Umweltbedingungen untersucht werden.

Wir nehmen an, dass die Geschwindigkeit des Abfalls des Antikörpertiters mit dem Anstieg der Umgebungstemperatur steigt. Für unseren Versuchsaufbau bedeutet dies, dass der erwartete Abfall des Antikörpertiters bei 45 °C höher ist, als bei 38° oder niedriger.

Die 4. Hypothese lautet folglich:

1.6.4 4. Hypothese: Der erwartete Abfall des Antikörpertiters ist bei 45 °C höher, als bei 38° oder niedrigerer Temperatur.

H₀-(4) Der Abfall des Antikörpertiters von Dried Blood Spots erfolgt bei Lagerung unter 45°C schneller als bei 38°C oder niedrigerer Temperatur.

H₁-(4) Der Abfall des Antikörpertiters von Dried Blood Spots ist bei Lagerung unter 45°C gleich wie bei Lagerung bei 38°C oder niedrigerer Temperatur.

Die Falsifizierung der 4. Nullhypothese würde bedeuten, dass die Höhe der Temperatur keinen Einfluss auf das Ausmaß des Abfalls des Antikörpertiters hat.

Weiterhin gehen wir davon aus, dass die Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf die Stabilität der Antikörper haben muss. Bei hoher Luftfeuchtigkeit erwarten wir einen stärker ausgeprägten Abfall des Antikörpertiters.

Unsere 5. Hypothese lautet:

1.6.5 5. Hypothese: Bei hoher Luftfeuchtigkeit ist der Abfall des Antikörpertiters größer.

H₀-(5) Der Abfall des Antikörpertiters von Dried Blood Spots ist bei Lagerung unter hoher Luftfeuchtigkeit größer als bei geringer Luftfeuchtigkeit.

H₁-(5) Der Abfall des Antikörpertiters von Dried Blood Spots ist bei Lagerung unter hoher Luftfeuchtigkeit nicht größer als bei geringer Luftfeuchtigkeit.

Die Falsifizierung bedeutet einen gleichen Abfall des Antikörpertiters bei hoher und bei niedriger Luftfeuchtigkeit.

1.7 **Kooperation zwischen dem Missionsärztlichen Institut Würzburg und dem Bugando University College of Health Sciences Mwanza, Tansania**

Zwischen dem Missionsärztlichen Institut Würzburg und der Medizinischen Hochschule der Bugando Universität in Mwanza, Tansania und dem dazugehörigen Lehrkrankenhaus besteht seit mehreren Jahren eine Kooperation, die zum Ziel hat, die medizinische Versorgung und Infrastruktur im Nordwesten Tansanias zu verbessern. Dies geschieht durch verschiedene Projekte des Missionsärztlichen Instituts und der Universität Würzburg, bei denen sich verschiedene Ärzte und Wissenschaftler in der Lehre und Ausbildung tansanischer Studenten engagieren und ein gegenseitiger Studentenaustausch stattfindet. Das Krankenhaus Bugando Medical Center (BMC) ist eines von 4 Lehrkrankenhäusern in Tansania und versorgt ca. 13 Millionen Einwohner rundum den Viktoria See und die westlichen Teile des Landes. Das Krankenhaus hat 900 Betten und ca. 900 Angestellte. An der Medizinischen Hochschule der Bugando Universität (WBUCHS, Weill Bugando University College of Health Sciences) in Mwanza sind aktuell 65 Studenten eingeschrieben (Stand 2010). Die Hochschule wird hinsichtlich der Betriebskosten, technischer Ausstattung und Infrastruktur von der amerikanischen TOUCH Stiftung unterstützt. (Karl-Heinz Hein-Rothenbücher, Executive Director of the Medical Mission Institute Würzburg 2008)

1.8 **HIV und AIDS**

Das HI-Virus (*Human Immunodeficiency Virus*) gehört zur Familie der Retroviren. Dies sind RNA-Viren, die das Enzym Reverse Transkriptase besitzen, mit welchem sie in der Lage sind ihre RNA in DNA umzuschreiben und so eine RNA-abhängige DNA-Synthese zu betreiben. HIV 1 und HIV 2 sind die Erreger von AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), einem progredienten, unbehandelt tödlich verlaufenden Verlust des Immunsystems. HIV 1 ist der Auslöser einer weltweiten Pandemie, während HIV 2 meist auf Westafrika beschränkt ist. Die Übertragung des Virus geschieht vor allem bei Geschlechtsverkehr und durch Wiederverwendung von infizierten Kanülen

bei Drogenkonsum. Aber auch eine Übertragung durch Blutkonserven und von einer Schwangeren auf den Fetus, peripartal oder durch die Muttermilch ist möglich. (Hof et al. 2005)

Der Infektion folgt eine symptomarme Latenzzeit von ca. 10 -12 Jahren, in der der Erreger T-Helferzellen des Menschen befällt und so die Immunabwehr langsam fortschreitend schwächt. Infolge der immer stärkeren Schwächung des Immunsystems erkrankt der Patient an Infektionen oder Erkrankungen, die für immunkompetente Menschen asymptomatisch oder symptomarm verlaufen würden. Solche Infektionen werden als opportunistische Infektionen bezeichnet. (Hof et al. 2005)

Die Einteilung der HIV-Infektion erfolgt in mehrere klinische Stadien.

Die Primärinfektion verläuft fast ohne Symptome und bleibt so oft unbemerkt. Dieser folgt eine mehrere Jahre dauernde Latenzzeit, in der der Virus sich im Körper vermehrt und T-Helferzellen fortschreitend zerstört. Antikörper gegen das Virus können frühestens nach 3 Wochen nachgewiesen werden. (Hof et al. 2005)

Die Infektion wird erstmals manifest durch eine generalisierte monatelange Schwellung der Lymphknoten (Lymphadenopathie - Syndrom, LAS). (Hof et al. 2005)

Akute Primärinfektion, Latenzzeit und Lymphadenopathie - Syndrom fasst man unter der Kategorie A der HIV Infektion zusammen. Die Kategorie B wird auch als „AIDS - related complex, ARC“ bezeichnet, der gekennzeichnet ist durch das Auftreten der ersten opportunistischen Infektionen und Fieber, Diarrhö und ungewolltem Gewichtsverlust. Die Kategorie C entspricht dem Vollbild der AIDS- Erkrankung, charakterisiert durch viele bestimmte opportunistischen Infektionen (z.B.: Toxoplasma-Enzephalitis, CMV-Retinitis, chronische HSV- Infektionen, das Auftreten des Kaposi-Sarkoms und der Befall des zentralen Nervensystems mit entsprechenden Symptomen (HIV – Enzephalopathie). (Hof et al. 2005)

Aktuelle Zahlen zu HIV/AIDS in Deutschland (Robert Koch Institut 2012):

Geschätzte Zahl der Menschen in Deutschland, die Ende 2012 mit HIV/AIDS lebten:

	78.000
Männer:	63.000
Frauen:	15.000

Kinder:	200
Geschätzte Zahl der HIV-Neuinfektionen in Deutschland im Jahr 2012:	3.400
Männer:	3.000
Frauen:	410
Geschätzte Zahl von Personen mit nicht-diagnostizierter HIV Erkrankung:	14.000
Geschätzte Zahl der Todesfälle bei HIV-Infizierten im Jahr 2012:	550
Geschätzte Zahl der HIV-Infizierten unter antiretroviraler Therapie Ende 2012:	50000

1.9 **VZV, CMV, HSV und Toxoplasma als häufige Opportunisten einer HIV-Infektion**

Opportunistische Erreger befallen den abwehrgeschwächten Patienten. Eine Abwehrschwäche kann angeboren (z.B.: angeborener Immundefekt), durch Krankheit, medikamentöse Immunsuppression oder im höheren Alter erworben sein. Die folgenden Erreger sind häufig Auslöser opportunistischer Infektionen im Rahmen einer HIV Infektion. (Hof et al. 2005)

1.9.1 **Varicella-Zoster Virus (VZV)**

Das Varicella-Zoster Virus gehört zur Familie der Herpesviren, ist der Erreger der Windpocken und des Herpes Zoster (Gürtelrose) und weltweit vorkommend. Eine Durchseuchung von 80-90% bei Erwachsenen spiegelt die hohe Kontagiösität des Virus wieder, welches aerogen oder durch Kontakt mit Inhalt der charakteristischen Bläschen übertragen wird. Die Windpocken sind eine Erkrankung vorwiegend des Kindesalters und charakterisiert durch ein Stamm- und Gesichtsexanthem mit verschiedenen, juckenden Hauterscheinungen wie Papeln, Pusteln und Verkrustungen, die jedoch narbenlos nach ca. 2-3 Wochen abheilen. (Hof et al. 2005)

Tritt die Erstinfektion erst im Erwachsenenalter auf, ist der Verlauf mit Varizellenpneumonie und seltener einer Enzephalitis schwerwiegender. Bei immunsupprimierten Patienten können sich hämorrhagische Formen mit Blutungen des Gastrointestinaltrakts und der Schleimhäute entwickeln. (Hof et al. 2005)

Der Herpes Zoster ist die Rezidivform des Virus, da dieses lebenslang in Ganglien von Neuronen persistiert und typischerweise ab dem 45. Lebensjahr wieder aktiv wird. Das Krankheitsbild stellt sich mit schmerzhaften Läsionen und vorangehenden Hypästhesien im Versorgungsgebiet der befallenen Nerven dar. Häufige Lokalisation ist der mittlere Thoraxbereich, daher der umgangssprachliche Name Gürtelrose. (Hof et al. 2005)

Bei immunsupprimierten Patienten kann die Krankheit sich zu einer generalisierten Form mit einer Pneumonie entwickeln, die eine Letalität von 40% birgt. Weitere schwerwiegende Komplikationen sind eine Facialisparesie und Neuralgien in den betroffenen Nervengebieten, die jahrelang persistieren können. (Hof et al. 2005)

HIV-Infizierte, welche VZV IgG negativ sind, sollten Kontakt mit an VZV erkrankten Personen meiden. Eine Postexpositionsprophylaxe für VZV IgG negative Patienten mit VZV-Immunglobulin sollte innerhalb von 96 Stunden nach engem Kontakt mit an Windpocken oder Gürtelrose erkrankten Personen erfolgen. (Arastéh und Müller 2005)

1.9.2 **Zytomegalievirus (CMV)**

Das Zytomegalievirus ist das größte Virus der Herpesfamilie und weltweit verbreitet. Die Infektion erfolgt vor allem durch Kontakt mit erregerhaltigem Speichel, Blut, Sperma, Zervixsekret, aber auch bei Bluttransfusionen und Transplantationen. Die Durchseuchung liegt im Erwachsenenalter bei über 90%. Die Erstinfektion geschieht meist unbemerkt und auch die anschließende langsame und generalisierte Infektion zeigt selten Symptome. Es können alle Organe befallen werden, wobei die Virusreplikation primär in der Speicheldrüse erfolgt. Es besteht eine lebenslange Persistenz des Virus im Körper. (Hof et al. 2005)

Eine Erstinfektion beim Erwachsenen verläuft meist mild und mit unspezifischen Krankheitssymptomen, jedoch können in schweren Fällen auch eine Hepatitis oder eine Pneumonie auftreten. Bei immunsupprimierten Patienten können Erstinfektionen mit

einer generalisierten Infektion einhergehen und letal enden. Bei HIV positiven Patienten entwickelt sich häufig eine CMV-Retinitis. (Hof et al. 2005)

Findet die Erstinfektion bei einer schwangeren Frau statt, muss in 40% der Fälle mit einem intrauterinen Tod des Kindes gerechnet werden. (Hof et al. 2005)

Durch eine Schwangerschaft wird eine persistierende CMV-Infektion häufig reaktiviert. In 5-10 % der Fälle muss mit körperlichen und geistigen Schäden des Kindes nach der Geburt gerechnet werden, wobei 90% aber asymptomatisch bleiben. Reife Neugeborene zeigen in der Regel keine Symptome. (Hof et al. 2005)

Bei HIV-Infizierten sollte eine Primärprophylaxe mit Ganciclovir oral erwogen werden, wenn die CD4-Zellen unter 50 pro μ l fallen. Daneben sollte der Patient über mögliche Augensymptome zur Früherkennung der CMV-Retinitis aufgeklärt werden und regelmäßig augenärztlich untersucht werden. (Arastéh und Müller 2005)

1.9.3 Herpes Simplex Virus 2 (HSV 2)

Das Herpes Simplex Virus Typ 2 ist der Erreger des Herpes genitalis und neben HSV Typ 1 der häufigere Verursacher des Herpes neonatorum. (Hof et al. 2005)

Die Übertragung erfolgt meist durch Schmierinfektionen, vor allem im Genitalbereich und bevorzugt beim Geschlechtsverkehr. Jedoch können Herpes 2 Läsionen auch im Mund- und Gesichtsbereich auftreten, wenn die Infektion in diesen Bereichen erfolgt. Erkrankt eine Schwangere erstmals an HSV 2 oder kommt es zu einem Rezidiv, kann der Erreger auf das Kind übertragen werden. Fieber, Schwellung der Leistenlymphknoten, Bläschen und Ulcera auf den Genitalschleimhäuten und Geschlechtsorganen sind die häufigsten Manifestationen des HSV 2. (Hof et al. 2005) Als Kofaktor für eine HIV-Übertragung gelten floride Herpes-Läsionen. (Arastéh und Müller 2005; Ghebremichael et al. 2012)

An Herpes neonatorum erkrankt ein Neugeborenes, wenn es sich während der Geburt bei der Mutter infiziert, die an einer Erstinfektion oder rezidivierenden Herpesinfektionen leidet. Möglich ist auch eine Übertragung des Erregers auf ein Neugeborenes, wenn Angehörige an einem Herpes labialis leiden. Der Herpes

neonatorum geht mit einer generalisierten Infektion mit Befall der inneren Organe und des ZNS (HSV - Enzephalitis) einher und verläuft oft tödlich. (Hof et al. 2005)

Eine Primärprophylaxe sowie eine Postexpositionsprophylaxe werden nicht empfohlen. Bei häufigen Rezidiven kann allerdings eine Sekundärprophylaxe mit Aciclovir oral, Valacyclovir oder Famciclovir topisch durchgeführt werden. (Arastéh und Müller 2005)

1.9.4 **Toxoplasma gondii**

Toxoplasma gondii gehört zu den Sporozoen und ist weltweit verbreitet. Der intrazelluläre Parasit ist der Erreger der Toxoplasmose. Der Mensch stellt nur den Zwischenwirt im Entwicklungszyklus des Parasiten dar, wohingegen der eigentliche Hauptwirt die Katze ist, die in ihrem Kot den Erreger ausscheidet. Die Durchseuchung nimmt mit steigendem Lebensalter zu. In manchen Gebieten besteht eine Durchseuchung von bis zu 90%. (Hof et al. 2005)

Die Ansteckung erfolgt durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln wie Gemüse oder Salat, die nicht vorher erhitzt oder gekocht wurden. Daneben stellt auch kontaminiertes und rohes oder nicht gares Rindfleisch eine wichtige Infektionsquelle dar. Bei immunkompetenten Menschen erfolgt die Infektion meist unbemerkt oder mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Lymphknotenschwellung. Der Erreger persistiert als Pseudozysten im Körper. (Hof et al. 2005)

Bei Kindern und Immunsupprimierten verläuft eine Infektion schwerwiegender. Infiziert sich eine Schwangere mit dem Erreger wird auch der Fetus über die Plazenta infiziert. Dies führt meist zu Abort oder einer Frühgeburt und schweren Erkrankungen des Neugeborenen, die als klassische Trias bezeichnet werden: Hydrozephalus, Verkalkungen im Gehirn und Chorioretinitis. (Hof et al. 2005)

Die Erkrankung ist meldepflichtig. (Hof et al. 2005)

Bei Immunsupprimierten (AIDS) kann eine Reaktivierung der latenten Infektion erfolgen, was als endogene Reinfektion bezeichnet wird. Diese wird in Form einer Enzephalitis, Pneumonie oder Myokarditis manifest. (Hof et al. 2005)

Schwangere und Immunsupprimierte sollten einen vorsichtigen Umgang mit Katzen pflegen und auf den Verzehr von rohem oder ungarem Fleisch verzichten. (Hof et al. 2005)

Bei jedem HIV-Patienten sollte eine Screening-Untersuchung auf Toxoplasmose durchgeführt werden. (Arastéh und Müller 2005)

Fallen die CD4- Zellen unter 100 pro ml und ist der Patient Toxoplasma IgG positiv, kann eine Primärprophylaxe mit Cotrimoxazol begonnen werden. Nach einer Toxoplasmose-Enzephalitis ist eine lebenslange Sekundärprophylaxe mit Sulfadiazin, Pyrimethamin und Leucovorin notwendig. (Arastéh und Müller 2005)

1.10 **Der ELISA**

1.10.1 **Prinzip**

Der ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) gehört zu den Festphasen-Immunoassays. Das Prinzip beruht auf der Bindung einer Reaktionskomponente (z.B.: Antigen) an eine Kunststoffoberfläche, während der nachzuweisende Analyt (z.B.: Antikörper) mobil ist und sich an die immobilisierte Komponente durch molekulare Wechselwirkungen (Antigen-Antikörperbindung) binden kann. Der Nachweis der gesuchten Komponente geschieht durch Bindung eines spezifischen Antikörpers, der mit einem Enzym gekoppelt ist, welches durch Umsatz eines Substrats ein messbares und quantifizierbares Signal erzeugt. (Raem und Rauch 2007)

1.10.2 **Formen**

Der ELISA lässt sich in direkte und indirekte, in kompetitive und nicht-kompetitive Formen einteilen.

1.10.2.1 Direkte und indirekte ELISA

Bei der direkten Form wird das Enzym direkt an den Antikörper gebunden, der an das an der Festphase gebundene Antigen bindet. Der Vorteil liegt in der geringeren Zahl der Inkubationsschritte. (Raem und Rauch 2007)

Die indirekte Form arbeitet mit einem zweiten Antikörper (Sekundärantikörper), der an den an das Antigen gebundenen Antikörper (Primärantikörper, aus der Patientenserumprobe) bindet und das Nachweisenzym trägt. Ein Vorteil der indirekten Form ist eine Signalverstärkung durch Bindung mehrerer enzymmarkierter Sekundärantikörper. (Raem und Rauch 2007)

1.10.2.2 Kompetitive und nicht-kompetitive ELISA

Beim kompetitiven ELISA herrscht eine Konkurrenzsituation zwischen dem nachzuweisenden Analyt (z.B.: Antigen) und einer definierten Menge markiertem zugegebenem Antigen um Bindungsstellen des auf der Festphase fixierten Antikörpers. Eine Dosis-Wirkungskurve hat einen umgekehrt proportionalen Verlauf. Ein hohes Signal bedeutet eine geringe Menge Antigen in der Patientenprobe, analog bedeutet ein niedriges Signal eine große Menge des nachzuweisenden Antigens. (Raem und Rauch 2007)

Die häufigste Form eines nicht-kompetitiven ELISA ist der Sandwich-ELISA, bei dem das Antigen zwischen 2 Antikörpern gebunden ist. Ein Antikörper ist auf der Festphase fixiert, während der andere enzymmarkiert ist und als Nachweis an das Antigen bindet. (Raem und Rauch 2007)

1.10.3 Der ELISA classic der Institut Virion\Serion GmbH

Der verwendete ELISA der Institut Virion\Serion GmbH ist ein indirekter, nicht-kompetitiver ELISA (siehe Abbildung 1). Als Festphase werden NUNCTTMLockwellTM

Polystyrol Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten verwendet, auf welchen das Antigen beschichtet wurde. Zusätzlich besitzen die verwendeten Platten verschiedene Oberflächenstrukturen je nach Beschaffenheit des Antigens und dem Verwendungszweck. Die MAXISORP™ Oberfläche hat eine theoretische Bindungskapazität für IgG von 600ng/cm^2 und eignet sich besonders für Moleküle mit hydrophoben und hydrophilen Gruppen (z.B.: Antikörper). MEDISORP™ Platten haben eine geringere Bindungskapazität und sind besonders geeignet für Assays mit Humanserengebrauch. (Rowell 2001)

Patientenseren werden im mitgelieferten Verdünnungspuffer in einer erregerspezifischen Serumverdünnung verdünnt. Ein Standardserum und eine Negativkontrolle werden bei jedem Testlauf mitgeführt. Das IgG - Konjugat besteht aus einem gegen humanes IgG gerichteten polyklonalem Ziegenantikörper, an dem Alkalische Phosphatase als Nachweiszym gebunden wurde. Das Substrat für die Alkalische Phosphatase ist Para-Nitrophenylphosphat, welches zu Para-Nitrophenol umgesetzt wird. Als Waschlösung wird eine Natriumchloridlösung mit Tween 20 und 30mM TRIS verwendet. Die Stopplösung besteht aus 1,2 N Natronlauge. Dem Kit ist ein Qualitätskontroll-Zertifikat mit Standardkurve und Wertetabelle zur Auswertung beigelegt. (Institut Virion\Serion GmbH 2008)

Einleitung



Abbildung 1: Virion\Serion ELISA classic Kit mit Inhalt

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

903® Proteinsaver Card	Whatman
BD 115 Brutschrank (für 45°C Lagerung)	Binder
BE 500 Brutschrank (für 38°C Lagerung)	Memmert
Cellstar® Tubes, aus Polystyrol, 15ml	Greiner Bio-One
CLIMAPAC 2® Aluminium Verbundfolie Flachbeutel	Flöter
COLUMBUS PLUS™ Waschgerät	Tecan
cOmpete™, Tabletten	Roche
2,4 Dinitrophenol	Merck
EDTA Dinatrium Salz	Roth
Feine Pinzette	
Handstanze 3,1 mm	Whatman
HandyStep® electronic Handdispenser	Brand
HUMONITOR® Humidity Indicator Cards	Multisorb
Kühlschrank	Siemens
LowCrossBuffer®	Candor
	Bioscience GmbH
MiniPax® Trockenmittel mit Silica Gel	Multisorb
Natriumazid	Merck
PD-Tips 1,25ml	Brand
Plastibrand® Pipettenspitzen 2 – 200µl	Brand
Reamix 2789 Reagenzglasschüttler	Assistant
Research® Pipette fest, 100µl	Eppendorf
Rotenon	Sigma
S-Monovette® 7,5ml	Sarstedt
S-Monovette® EDTA K2 Gel 7,5ml	Sarstedt
Sunrise™ Mikrotiterplatten Reader	Tecan
Thermometer, geeicht	

Transferpette® 8 Kanal Pipette	Brand
Typ 3502 Zentrifuge	Hettich Rotanta

Virion\Serion GmbH ELISA classic Kits:

Varicella-Zoster Virus IgG	Charge:	SIY.BY	Art.nr: ESR104G
Cytomegalovirus IgG		SGY.FN	ESR109G
Herpes Simplex Virus 2 IgG		SEY.CT	ESR1052G
Toxoplasma Gondii IgG		SIY.CS	ESR110G

Alle Angaben bezüglich der Bestandteile in den ELISA gelten für die verwendeten Chargen und können sich bis zum aktuellen Zeitpunkt geändert haben.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Dried Blood Spots

Das Probenmaterial bestand aus Rückstellproben, welche von 28 HIV-positiven Patienten der tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg zwischen August und Oktober 2008 gewonnen wurden. Den Patienten wurden von Mitarbeitern der Missionsärztlichen Klinik eine Serummonovette und ein Heparin-Röhrchen entnommen. Alle Proben wurden vollständig und irreversibel anonymisiert.

Aus dem Serumröhrchen wurde durch Zentrifugation bei 2500 Umdrehungen für 5min das Serum gewonnen und anschließend bei -30°C tiefgefroren. Dieses wurde in der jeweiligen erregerspezifischen Serumverdünnung des ELISA als Vergleich zu den DBS herangezogen.

Für die Routinediagnostik kann Blut aus Fingerbeere oder Ohrläppchen, die vorher desinfiziert wurden, mit sterilen Lanzetten gewonnen und verwendet werden. (Mei et al. 2001; Novello et al. 1996)

Das heparinisierte Blut wurde mit einem Handdispenser zu je 75 µl nach vorherigem Schütteln des Röhrchens auf eine WHATMAN™ 903® Proteinsaver Card gebracht (siehe Abbildung 2). (Behets et al. 1992)

Pro Patient wurden pro Erreger 3 Karten (1 Ersatz) angefertigt. Jede Karte enthält 5 Ringe mit 15-17mm Durchmesser für die Aufnahme des Bluttröpfens. (Whatman International Ltd 2008)

Anschließend wurden die DBS bei RT 48h getrocknet und danach vorerst in gasdichten Alubeuteln mit ZIP-Verschluss (siehe Abbildung 3) und mit Zugabe eines Trockenmittel bei -30°C gelagert, bis die Phase der Probensammlung beendet wurde. (Behets et al. 1992; Therrell et al. 1996)

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Würzburg als unbedenklich eingestuft und genehmigt (20160529_01).



Abbildung 2: Anfertigung eines DBS auf einer WHATMAN 903® Proteinsaver Card

2.2.2 Lagerung der DBS unter verschiedenen Bedingungen zur Simulation afrikanischen Klimas

Nach abgeschlossener Probensammlung werden alle Beutel mit DBS wieder aufgetaut und diese aufgeteilt auf 9 verschiedene Lagerungsbedingungen:

B1	45°C	Erhöhte Luftfeuchtigkeit mit Trockenmittel
B2	45°C	Erhöhte Luftfeuchtigkeit ohne Trockenmittel
B3	45°C	Normale Luftfeuchtigkeit mit Trockenmittel
B4	45°C	Normale Luftfeuchtigkeit ohne Trockenmittel
B5	38°C	Erhöhte Luftfeuchtigkeit mit Trockenmittel
B6	38°C	Erhöhte Luftfeuchtigkeit ohne Trockenmittel
B7	38°C	Normale Luftfeuchtigkeit mit Trockenmittel
B8	38°C	Normale Luftfeuchtigkeit ohne Trockenmittel
B9	8°C	Normale Luftfeuchtigkeit mit Trockenmittel

Lagerungstemperaturen waren 38°C und 45°C. Diese Temperaturen sollen die Extreme eines afrikanischen oder tropischen Klimas simulieren. Lagerung bei 8°C simuliert einen gekühlten Transport.

Die erhöhten Temperaturen wurden durch Brutschränke gewährleistet, die täglich mit geeichten Thermometern überprüft werden.

Um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu simulieren, wurden die DBS-Alubeutel in Plastikdosen mit feuchtem Filterpapier gelagert, welches jeden 3.Tag befeuchtet wurde. Lagerung bei 8°C erfolgte in einem Kühlschrank. Um die Feuchtigkeit in den Beuteln zu messen, wurden HUMONITOR Indicator Cards verwendet (siehe Abbildung 3). Jede Karte besitzt je einen Anzeigekreis mit 30%, 40%, 50% Luftfeuchtigkeit, die anfänglich blaue Farbe zeigen und sich abhängig vom Anstieg der Luftfeuchtigkeit innerhalb der Beutel bis nach Rosa verändern. Ein nach rosa verfärbter 50% -Kreis bedeutet somit ein Anstieg der LF innerhalb des Behältnisses auf 50%.



Abbildung 3: Alubeutel, Humonitor Card, Trockenmittel

Um einen Ausgangswert für die Antikörpertiter zu erhalten, wurden mit den IgG ELISA initial die optische Dichte für jede Patientenprobe und für jeden Erreger bestimmt, sowohl mit den DBS als auch dem zugehörigen Serum in der Serumverdünnung des Erregers. Danach wurde jeweils ein DBS jedes Patienten unter allen 9 verschiedenen Bedingungen, in Alubeuteln verpackt, gelagert - je nach Lagerungsbedingung mit erhöhter Luftfeuchtigkeit bzw. mit oder ohne Trockenmittel. Humonitor-Cards zur Feuchtigkeitsmessung wurden jedem Alubeutel beigelegt.

Weitere Messungen erfolgten nach 1, 2, 4, 8, 12 Wochen Lagerung.

2.2.3 Austestung der DBS im ELISA – Studie A und B

2.2.3.1 Vorbereitung Studie A

Die Austestung der DBS im ELISA erfolgte an 2 Tagen, denn die Menge der Patientenproben ließ die Vorbereitung und die Austestung nicht an einem Tag zu.

Am ersten Tag erfolgten die Vorbereitung, das Ausstanzen (siehe Abbildung 4) und die Verteilung auf die Antigen-beschichteten ELISA Mikrotiterplatten (siehe Abbildung 5). Am folgenden Tag erfolgten Elution, Inkubation und Auswertung der DBS. Zu Beginn der Vorbereitung wurden alle Proben und benötigten MTP der einzelnen ELISA auf RT gebracht.

Mit den Seren und dem im ELISA - Kit mitgelieferten Verdünnungspuffer wurde die jeweilige Serumverdünnung laut der zugehörigen Arbeitsanleitung in PS-Röhrchen angesetzt und bis zur Austestung bei -8°C gelagert.

Mit der Handstanze werden von jedem DBS jedes Patienten ein Plättchen (Ø 3,1mm) ausgestanzt und mit einer feinen Pinzette analog dem Pipettierplan (s. Anhang) in die zugewiesene Kavität gegeben.

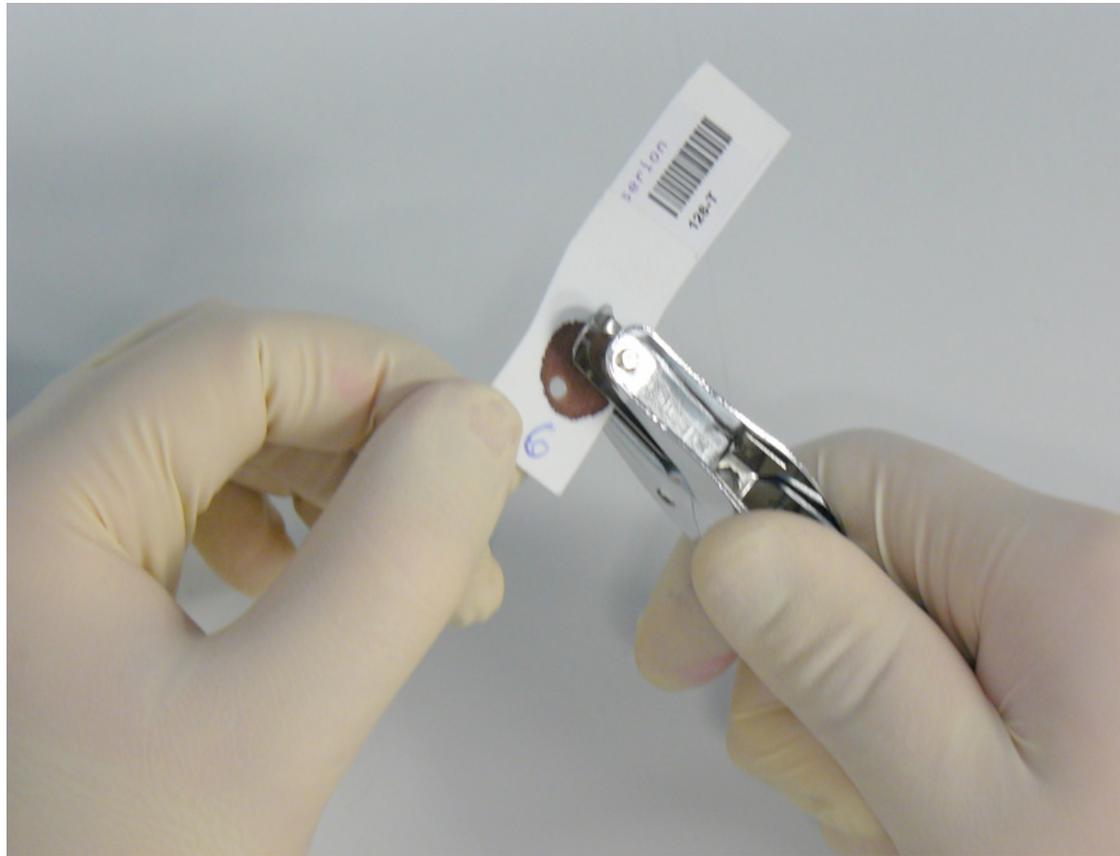


Abbildung 4: Ausstanzen von Plättchen aus DBS

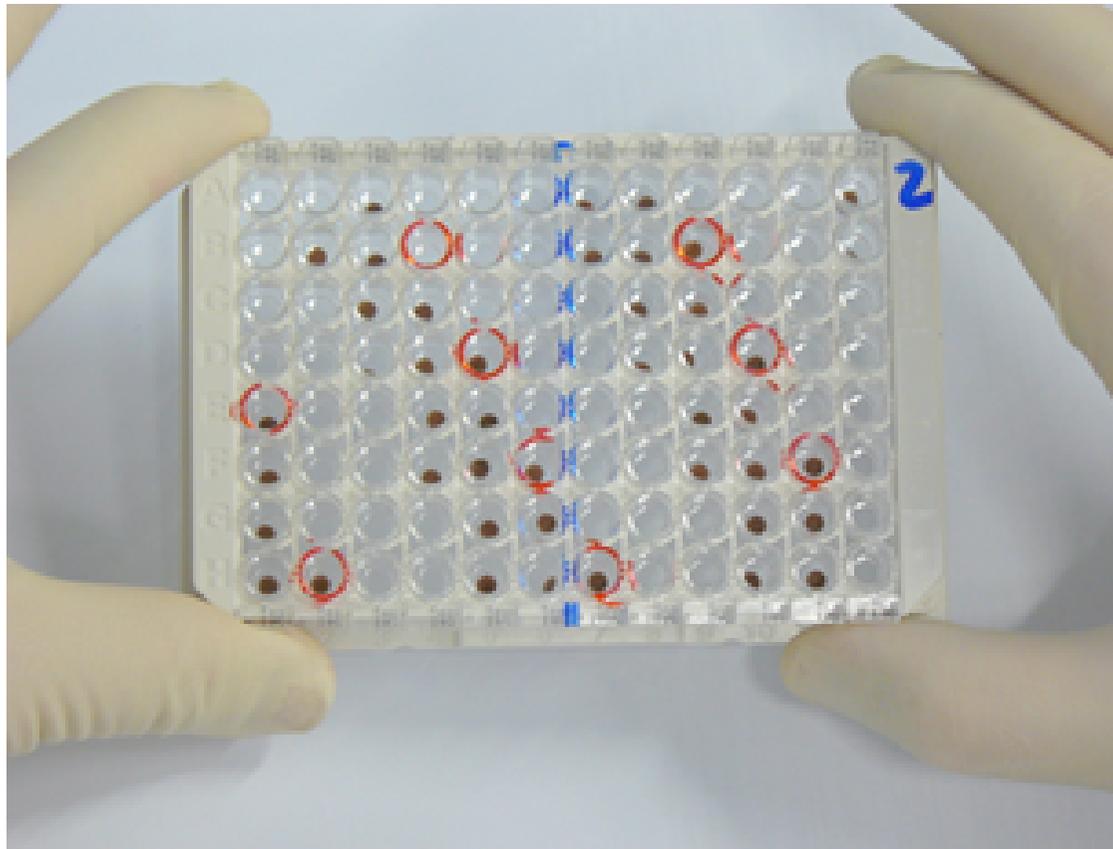


Abbildung 5: Mikrotiterplatte mit DBS-Plättchen

Der Pipettierplan (siehe Abbildung 6) ist so aufgebaut, dass Kavität A1 laut ELISA Arbeitsanleitung für den Substratleerwert (Blank), B1 für die kitspezifische Negativkontrolle und C1 und D1 für die beiden Einzelwerte des kitspezifischen Standardserums vorgesehen sind. Dann erfolgt spaltenweise die Verteilung der Patienten Dried Blood Spots von allen 9 Lagerbedingungen, so dass pro Erreger 4 Mikrotiterplatten benötigt werden.

Nachdem alle Plättchen auf die MTP gegeben wurden, wird diese wieder in ihren Alubeutel gegeben und bis zur Austestung am folgenden Tag bei -8°C gekühlt.

Symbolerklärung:

BLK	Substratleerwert
NeKO	Negativkontrolle, kitspezifisch
STD	Standardserum, kitspezifisch
Pat.:XXX	Barcode-Nummer der Patientenprobe
1-9	Lagerbedingung
QK 1-4	QK-Seren 1-4
Kitcharge	Chargennummer des verwendeten ELISA-Kits
mit TM / ohne TM	Trockenmittel im Beutel / kein Trockenmittel

2.2.3.2 Vorbereitung Studie B

Nach Abschluss von Studie A wurde Studie B begonnen um die Reproduzierbarkeit zu zeigen.

Die DBS der Studie B wurden zum gleichen Zeitpunkt wie diejenigen von Studie A, aus denselben Patientenproben der Missionsärztlichen Klinik angefertigt. In der Zwischenzeit lagerten diese bei -30°C. Es wurden nur 13 der 28 Proben verwendet und diese in nur 6 verschiedenen Lagerbedingungen gelagert:

1	45°C	Erhöhte Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel
2	45°C	Erhöhter Luftfeuchtigkeit	ohne Trockenmittel
3	45°C	Normale Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel
4	38°C	Erhöhter Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel
5	38°C	Erhöhter Luftfeuchtigkeit	ohne Trockenmittel
6	38°C	Normale Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel

Die Messungen erfolgten am Tag 0, nach 4 Wochen, nach 8 Wochen und nach 12 Wochen. Die Abarbeitung erfolgte gleichermaßen wie Studie A.

2.2.3.3 Elution und Austestung der DBS

Die Austestungen für Studie A fanden von Oktober 2008 bis Februar 2009 im Labor der Qualitätskontrolle der Virion\Serion GmbH Würzburg statt.

Die Durchführung von Studie B fand von April 2009 bis Juli 2009 ebenfalls in oben genannten Räumlichkeiten statt.

Am folgenden Tag nach Vorbereitung der DBS wurden die bestückten MTP der ELISA und die zugehörigen Testbestandteile auf RT gebracht.

Verschiedene Autoren berechnen die in einem DBS-Plättchen von 6,3 mm Durchmesser enthaltene Serummengung mit ca. 5-6 µl. (Riddell et al. 2002; Steger et al. 1990; Mei et al. 2001)

Whatman International Ltd gibt die Serummenge in einem ausgestanzten DBS-Plättchen von 3,1 mm Durchmesser mit 1,37-1,71 µl an. (Whatman International Ltd 2008)

Für unsere Berechnung gingen wir von einem Serumgehalt von ca. 2 µl aus. Dies entspricht bei Zugabe von 100 µl Verdünnungspuffer einer Verdünnung von 1:50.

Resultate aus Vorabaustestungen der Virion\Serion GmbH haben gezeigt, dass eine Elution in 100µl ELISA classic Verdünnungspuffer ausreichend ist, um vergleichbare Ergebnisse zwischen DBS und Serum zu erhalten. Behets et al. verwendeten für 6mm DBS-Plättchen 200 µl Verdünnungspuffer zur Elution.

Mit einem Handdispenser wird 100µl des mitgelieferten Verdünnungspuffers in jede Kavität gegeben, die einen DBS enthält. In diesem Volumen werden die Antikörper aus dem DBS eluiert. Danach werden 100 µl der Serumverdünnungen der Patientenproben als Einzelwert mit einer Pipette analog dem Pipettierplan auf die MTP pipettiert und zuletzt 100 µl der kitspezifischen Kontrollseren. Die MTP werden nun für 60 min bei 37°C im Brutschrank in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation entfernt man die DBS vollständig durch Ausklopfen aus den Kavitäten.

Mit einem Waschgerät werden die MTP in 4 Zyklen mit jeweils 300µl der mitgelieferten Waschlösung gewaschen und anschließend auf Papiertüchern ausgeklopft.

Mit einer 8-Kanal-Pipette werden 100µl des mitgelieferten Konjugats auf die MTP gegeben. Lediglich Kavität A1 wird davon ausgenommen, um den Substratleerwert zu bestimmen.

Es erfolgt eine Inkubation für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank.

Anschließend wird erneut mit jeweils 300µl in 4 Zyklen gewaschen und danach 100 µl der Kit-Substratlösung auf die MTP pipettiert und erneut für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert.

Nach Beenden der Inkubation wird die Reaktion mit 100 µl der mitgelieferten Stopplösung gestoppt. In einem Plattenreader werden die MTP bei 420 nm photometrisch gemessen (Referenzwellenlänge 620nm).

2.2.3.4 Testablauf – Austestung der DBS



Auswertung mit SERION evaluate Software
4-Parameterformel – Unitbewertung

2.2.3.5 Testablauf – Institut Virion\Serion ELISA classic IgG



<p>Auswertung mit SERION evaluate Software 4-Parameterformel – Unitbewertung</p>
--

2.2.3.6 Auswertung

Sind die in der ELISA Arbeitsanleitung angegebenen Testgültigkeitskriterien erfüllt, kann die quantitative Bewertung erfolgen.

Testgültigkeitskriterien:

- Substratleerwert sollte < 0,25 OD sein
- Die Negativkontrolle muss negativ bewertet werden
- Der STD-Tageswert muss im chargenspezifischen Gültigkeitsbereich liegen
- Die OD-Einzelwerte des Standardserums dürfen nicht mehr als 20% differieren

Mit der SERION evaluate Software wird eine Unitbewertung mit einer 4 Parameter- Logistic Formel durchgeführt:

$$\exp(\text{Parameter C} - \ln((\text{Parameter D} - \text{A}) / ((\text{ProbenOD}) \times (\text{STD Refwert}) / (\text{STD-Tageswert} - \text{Parameter A}) - 1) / \text{Parameter B})$$

Die erforderlichen Parameter und der Referenzwert des Standardserums werden dem mitgelieferten Kit - Zertifikat entnommen und in die Formel eingesetzt. Von allen OD-Werten wird der Substratleerwert abgezogen, der auf jeder Platte in Kavität A1 gemessen wird. Der Standard-Tageswert entspricht dem Mittelwert der beiden Standard-Einzelwerte der zugehörigen MTP. Die Parameter sind mit 3 Kommastellen angegeben. Mit den erhaltenen Unit-Werten und dem erregerspezifischen Grenzwert kann nun eine qualitative Bewertung und Einteilung der Seren in positiv, grenzwertig und negativ erfolgen.

3 Ergebnisse der DBS -Studie

3.1 Homogenität eines Dried Blood Spots

Um die Homogenität eines Dried Blood Spot bezüglich des Antikörpergehalts zu zeigen, wurden von 15 verschiedenen Dried Blood Spots jeweils 3 Discs vom Rand und jeweils 3 von der Mitte eines jeden DBS ausgestanzt und anschließend im ELISA classic ausgetestet. Die Ergebnisse zeigen, dass alle Bereiche eines Dried Blood Spots vergleichbare OD-Werte liefern (siehe Tabelle 1).

Nur bei niedrigem Antikörpergehalt werden hohe VK bis zu 21 Prozent erreicht.

Bei hohen OD-Werten werden VK unter 10 Prozent erreicht, was sogar den Anforderungen der Serumbestimmung mit ELISA entspricht.

Somit konnte gezeigt werden, dass bei Dried Blood Spots eine Homogenität hinsichtlich des Antikörpergehalts auf der gesamten Fläche gegeben ist.

Ergebnisse der DBS -Studie

Tabelle 1: Variationskoeffizienten von verschiedenen Discs aus einem DBS;
1-3 = Mitte des DBS, 4-6 = Rand des DBS

	Pat 100	103	104	105	108	113	114	117	118	124	126	127	120	121	129
	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs	OD VKs
1 Mitte	0,400	0,643	0,426	0,312	0,412	0,357	0,291	0,345	0,465	0,381	0,307	0,381	1,617	1,766	2,069
2	0,341	0,712	0,482	0,294	0,373	0,469	0,362	0,473	0,491	0,381	0,237	0,373	1,653	1,738	1,987
3	0,311 12,9	0,548 13,0	0,464 6,3	0,320 4,3	0,346 8,8	0,347 17,3	0,372 12,9	0,427 15,6	0,497 3,5	0,420 5,7	0,211 19,7	0,317 9,8	1,685 2,1	1,799 1,2	2,066 2,3
4 Rand	0,492	0,653	0,484	0,395	0,499	0,406	0,329	0,383	0,508	0,357	0,309	0,390	1,684	1,685	2,053
5	0,467	0,781	0,458	0,347	0,446	0,423	0,387	0,402	0,526	0,410	0,356	0,382	1,631	1,755	2,007
6	0,375 13,9	0,807 11,0	0,434 5,5	0,315 11,4	0,469 5,6	0,457 6,1	0,296 13,7	0,394 2,4	0,582 7,2	0,453 11,8	0,360 8,3	0,418 4,8	1,671 1,7	1,801 3,3	1,972 2,0
Gesamt-Vk	17,8	13,9	5,3	10,9	13,7	12,3	11,9	10,7	7,8	8,6	20,6	8,8	1,7	2,3	2,1

3.2 Das Backgroundphänomen

Bei mehreren Patientenproben zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem OD-Wert des Dried Blood Spots und dem des zugehörigen Serums. Der Unterschied beträgt zwischen 0,2 und 0,7 OD. Dieser Unterschied kann zu einer unterschiedlichen Unitbewertung führen, weshalb beispielsweise ein Dried Blood Spot eines negativen Serums als grenzwertig oder positiv bewertet wird.

Als Konsequenz kann daraus je nach getestetem Erreger eine falsche Behandlungsindikation für den Patienten abgeleitet werden.

Als Ursache für diese Unterschiede kommen unspezifische Reaktionen in Frage, die man auch als Background bezeichnet. (Rauch et al. 2005)

Beim ELISA classic *Toxoplasma gondii* IgG führt ein Background von 0,5 OD, je nach Standard-Tageswert, zu einer Bewertung mit ≥ 10 IU, was bei einer eigentlich negativ zu bewertenden Patientenprobe zu einer grenzwertigen Bewertung führen kann, denn der Grenzwert des genannten *Toxoplasma* ELISA liegt zwischen 10 und 20 IU. Mit verschiedenen Austestungen soll beispielhaft am *Toxoplasma gondii* IgG ELISA der Virion\Serion GmbH untersucht werden, ob eine Anpassung des Grenzwerts für die Abarbeitung von DBS mit dem ELISA notwendig ist.

3.2.1 Modifikationen der ELISA Abarbeitung zur Verminderung des Backgroundphänomens

Mit verschiedenen Modifikationen der Abarbeitung des Virion\Serion ELISA classic *Toxoplasma gondii* IgG wurde versucht, anhand von 12 ausgewählten Proben, die keine übereinstimmende Bewertung zwischen Serum und Dried Blood Spot im *Toxoplasma* IgG zeigten, mögliche Ursachen und Verbesserungsmöglichkeiten herauszufinden. Daneben wurden noch 3 hoch positive Proben mit übereinstimmender Bewertung, als Positivkontrolle mitgeführt.

Bei herkömmlicher Abarbeitung des Virion\Serion ELISA nach Arbeitsanleitung des Herstellers erfolgte eine unterschiedliche Bewertung bei 11 von 15 ausgewählten Patientenproben. Die 3 positiven Proben wurden übereinstimmend positiv bewertet (siehe Tabelle 2).

3.2.1.1 Abarbeitung gemäß Platelia® Toxo IgM Neonatal assay (Bio-Rad, Hercules, California, USA)

Der Hersteller des ELISA Platelia Toxo IgM Neonatal assay (Bio-Rad, Hercules, California, USA) empfiehlt eine abgewandelte Abarbeitung des ELISA zur Minimierung des Backgrounds. Statt der Inkubation von Seren, Konjugat und Substrat bei 37°C im Brutschrank wird hier eine verlängerte Inkubation der Seren und des Konjugats für 2 Stunden und des Substrats für 30 Minuten bei RT durchgeführt. (Bio-Rad Laboratories Headquarters 2008)

Diese Modifikation wurde auf den Virion\Serion ELISA classic angewendet.

Mit dieser Abwandlung konnte aber noch keine signifikante Verbesserung bewirkt werden. 7 der 12 ausgewählten Proben wurden unterschiedlich bewertet. Daneben lief der STD mit 1,698 OD außerhalb des Toleranzbereichs von 0,40 bis 1,36 OD, weshalb keine korrekte Quantifizierung möglich ist (siehe Tabelle 2).

3.2.1.2 Abarbeitung einer Kombination aus Platelia® Toxo IgM mit herkömmlicher ELISA Abarbeitung

Im nächsten Schritt wurde die Seruminkubation für 2h bei RT beibehalten, Konjugat und Substrat wurden jedoch im Brutschrank bei 37°C für 30 min inkubiert.

Damit konnte eine deutliche Verbesserung gezeigt werden. Nur 3 der 11 Proben wurden nicht übereinstimmend quantifiziert. Der STD lief innerhalb seines Toleranzbereiches und die Bewertung der Proben erfolgte korrekt (siehe Tabelle 2).

3.2.1.3 Abarbeitung mit Enzyminhibitoren

Wie sich gezeigt hat, ist das Backgroundphänomen bei Seruminkubation bei niedrigerer Temperatur schwächer ausgeprägt. Dies könnte auf eine enzym-katalysierte Reaktion hinweisen. (Löffler et al. 2007)

Um dies zu untersuchen, wurden Dried Blood Spots desselben Serumpanel mit zwei verschiedenen Enzyminhibitoren ausgetestet. Diese wurden direkt dem Verdünnungspuffer zugegeben, mit welchem die Elution während der Seruminkubation erfolgte.

Folgende Substanzen wurden verwendet:

EDTA	50mM	in DILB verdünnt
cOmplete™ Tabletten	7x conc.	in DILB gelöst

Die Elution der DBS erfolgte für 1h bei 37°C im Brutschrank mit anschließender herkömmlicher ELISA Abarbeitung.

Mit beiden Substanzen konnte eine Verminderung des Backgrounds erreicht werden.

Mit EDTA wurden 3 DBS-Serumpaare, hingegen mit cOmplete 6 DBS-Serumpaare unterschiedlich bewertet.

EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die essentiell für die Enzymwirkung sind und beeinflusst so unterschiedliche Enzyme. (AppliChem GmbH)

cOmplete™ hemmt Proteasen. (Roche Diagnostics Deutschland GmbH)

3.2.1.4 Abarbeitung mit 0,5% Natriumazid

Aufgrund von Erfahrungen der Institut Virion\Serion GmbH ist Natriumazid geeignet, das Backgroundphänomen zu verringern. Aus diesem Grund wurde der Verdünnungspuffer in einer Konzentration von 0,5% mit Natriumazid versetzt und mit diesem die DBS-Plättchen in der MTP eluiert.

Mit Natriumazid konnte eine Verminderung des Backgroundphänomens gezeigt werden. Bis auf ein Serum/DBS-Paar wurden alle übereinstimmend bewertet (siehe Tabelle 2).

Natriumazid ist ein Hemmstoff des Komplexes 4 der Atmungskette, der Cytochrom-c-Oxidase. (Schulz 2010)

3.2.1.5 Abarbeitung mit einer Seruminkubation bei 8°C über Nacht

Die Abarbeitung der Kombination aus *Platelia® Toxo IgM* mit herkömmlicher ELISA Abarbeitung zeigte eine deutliche Verringerung des Backgroundphänomens, was auf die veränderte Seruminkubation bei RT zurückgeführt werden kann. Aus diesem Grund wurde versuchsweise eine Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden über Nacht durchgeführt. Konjugat -und Substratinkubation wurden bei 30 Minuten belassen.

Mit dieser Veränderung zeigte sich die deutlichste Verbesserung. Alle DBS-Serumpaare wurden korrekt und übereinstimmend bewertet. Das Standardserum lief in seinem Toleranzbereich (siehe Tabelle 2). Die Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden scheint unspezifische Reaktionen am besten zu unterdrücken.

3.2.1.6 Verschiedene Kombinationen aus den vorherigen Modifikationen

Die bisherigen Änderungen in der Abarbeitung des ELISA wurden miteinander kombiniert, um mögliche synergistische Effekte herauszufinden.

Die Abarbeitung mit Seruminkubation bei 8°C über Nacht wurde mit einer Konjugatinkubation für 1 Stunde bei RT ergänzt.

Weiterhin wurde eine Seruminkubation bei RT für 2 Stunden und eine Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden kombiniert mit der Verwendung von mit Natriumazid versetztem Puffer.

Alle Kombinationen haben eine deutliche Verringerung des Backgroundphänomens gezeigt, jedoch blieb die alleinige Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden über Nacht die effektivste Möglichkeit (siehe Tabelle 2).

3.2.1.7 Abarbeitung mit LowCross-Buffer®

Der LowCross-Buffer® ist ein spezieller Puffer der CANDOR Bioscience GmbH zur Minimierung von negativen Einflüssen durch humane Anti-Maus Antikörper (HAMAs), Rheumafaktoren und Matrix Effekte. (Rauch et al. 2005)

HAMAs entstehen unter anderem durch langjährigen Kontakt mit Tieren und lassen sich in vielen Patientenproben finden. Diese Antikörper können artenübergreifend an andere Antikörper binden und so den Assay stören. Rheumafaktoren sind Autoantikörper der IgM Klasse und können an den Fc-Teil von IgG Antikörpern binden und so die Messung beeinflussen. Unter Matrixeffekten versteht man alle in einer Patientenprobe vorkommenden Faktoren, die eine Messung beeinflussen können. Hierzu zählen Proteine aus der Patientenprobe sowie auch unterschiedliche Viskositäten der Probe. (Rauch et al. 2005)

Dieser spezielle Puffer wird statt des herkömmlichen Probenverdünnungspuffers verwendet. Mit der gewohnten ELISA Abarbeitung unter Verwendung des LowCross-Buffer® konnte keine deutliche Verbesserung des Backgroundphänomens festgestellt werden. Nur 3 von 15 DBS-Serumpaaren wurden übereinstimmend bewertet (siehe Tabelle 2).

Erst in der Kombination mit einer Seruminkubation bei 8°C konnte wieder eine Minimierung des Phänomens festgestellt werden, wobei diese Verbesserung offenbar auf die Seruminkubation über Nacht zurückzuführen ist.

Die Austestungen haben gezeigt, dass der LowCross-Buffer® zu keiner Minimierung des Backgroundphänomens geführt hat, jedoch kann anhand der Ergebnisse der Schluss gezogen werden, dass dem Backgroundphänomen keine der oben genannten Antikörper oder Störfaktoren zugrunde liegen.

3.2.1.8 Abarbeitung mit Hemmstoffen der Atmungskette

Aus der Erfahrung mit Natriumazid als wirksamer Stoff zur Unterdrückung des Backgroundphänomens wurden noch 2 weitere bekannte Hemmstoffe der Atmungskette auf ihre Wirksamkeit getestet.

Natriumazid blockiert den Komplex 4 - die Cytochrom-c-Oxidase. (Schulz 2010)

2,4 Dinitrophenol (DNP) ist ein Entkoppler der Atmungskette indem es den Protonengradienten, der zur ATP-Gewinnung benötigt wird, abbaut. (Löffler et al. 2007)

Rotenon ist ein bekanntes Insektizid und Akarizid. Es blockiert die Atmungskette am Komplex 1 – die NADH - Dehydrogenase. (Löffler et al. 2007)

Von DNP wurden 3 verschiedene Verdünnungen in Verdünnungspuffer hergestellt – 0,01 M, 1mM und 0,1mM. Die Verdünnungen wurden wie herkömmlicher Verdünnungspuffer zur Elution der DBS in den Kavitäten der MTP verwendet.

In 0,01 M Verdünnung konnte kein Effekt gezeigt werden. Erst in 1mM und 0,1mM konnte ein Effekt gezeigt werden, der jedoch weniger deutlich als eine Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden ausfiel. Bei der 0,01 M Verdünnung wurden von 15 DBS-Serumpaaren nur 4 identisch und korrekt bewertet, bei der 1mM Verdünnung wurden 11 von 15 und bei der 0,1 mM 10 von 15.

Rotenon wurde in 3 Verdünnungen in Verdünnungspuffer eingesetzt. Alle 3 Verdünnungen konnten keinen Effekt auf den Background zeigen, denn nur die 3 positiven DBS-Serumpaare, die als Kontrolle mitgelaufen waren, wurden übereinstimmend bewertet. Alle 12 Paare des Serumpanels wurden voneinander abweichend bewertet (siehe Tabelle 2).

Beide Hemmstoffe wurden nur versuchsweise eingesetzt. Sie gelten als giftig und umweltschädlich und zeigen keine deutliche Verbesserung des Backgroundphänomens, weshalb von ihrem Einsatz abzuraten ist.

Ergebnisse der DBS -Studie

3.2.1.9 Tabelle mit Ergebnissen der modifizierten ELISA Abarbeitungen

Tabelle 2: ELISA Toxoplasma – verschiedene modifizierte Abarbeitungsmöglichkeiten zur Verminderung des Backgrounds

Positive Seren	normale Abarbeitung		Platelia®		Platelia® / Virion		EDTA		Complete		Azid		4°C / 21h / uNa / Virion		4°C / 21h / uNa / Virion mod.		Azid/ RT		4°C / 21h / uNa / Azid.	
	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml	OD	IU/ml
120 DBS	1,917	151	2,628	85,3	2,075	104	1,852	83,3	1,938	90,8	2,165	101	1,788	83,1	2,433	75,4	2,108	113	2,053	88,1
Serum	2,021	174	2,786	95,5	2,183	117	2,185	117	2,060	103	2,353	121	2,07	112	2,692	91,1	2,187	123	2,285	110
121 DBS	1,778	125	2,763	93,9	2,006	97,4	1,938	90,8	2,110	108	2,245	109	1,884	91,9	2,399	73,6	2,115	114	2,075	89,9
Serum	2,054	182	2,846	99,7	2,129	110	2,228	122	2,167	115	2,379	124	2,053	110	2,665	89,3	2,133	116	2,211	102
129 DBS	2,323	270	2,852	100	2,397	146	2,297	131	2,225	122	2,502	140	2,042	108	2,644	88	2,372	149	2,109	92,8
Serum	2,480	359	2,828	98,4	2,339	137	2,355	139	2,312	133	2,510	141	2,217	130	2,835	101	2,395	153	2,448	128
Negative Seren																				
100 DBS	0,353	11,3	0,522	9,98	0,225	5,76	0,318	8,38	0,432	11,8	0,319	7,89	0,214	5,66	0,410	7,74	0,303	8,13	0,227	5,37
Serum	0,043	1,10	0,186	3,25	0,067	1,52	0,072	1,65	0,071	1,63	0,080	1,74	0,096	2,37	0,210	3,75	0,053	1,19	0,087	1,88
103 DBS	0,746	27,4	0,759	15,2	0,555	15,7	0,595	17,0	0,688	20,2	0,679	18,5	0,503	14,5	0,944	19,9	0,472	13,3	0,424	10,6
Serum	0,180	5,42	0,678	13,4	0,309	8,13	0,316	8,32	0,308	8,09	0,358	8,95	0,393	11,0	0,781	15,9	0,235	6,2	0,374	9,2
104 DBS	0,746	27,4	0,745	14,9	0,395	10,7	0,400	10,8	0,476	13,1	0,395	9,97	0,343	9,46	0,568	11,1	0,297	7,96	0,284	6,84
Serum	0,180	5,42	0,168	2,91	0,110	2,65	0,135	3,32	0,134	3,29	0,155	3,61	0,198	5,20	0,425	8,05	0,116	2,88	0,195	4,56
105 DBS	0,418	13,7	0,600	11,7	0,298	7,81	0,292	7,64	0,367	9,81	0,305	7,51	0,262	7,04	0,480	9,20	0,247	6,51	0,252	6,01
Serum	0,085	2,4	0,321	5,87	0,131	3,21	0,122	2,97	0,123	2,99	0,144	3,34	0,186	4,86	0,427	8,09	0,101	2,47	0,183	4,25
108 DBS	0,448	14,9	0,644	12,6	0,327	8,65	0,328	8,67	0,435	11,9	0,354	8,84	0,247	6,61	0,417	7,88	0,203	5,27	0,153	3,51
Serum	0,037	0,92	0,170	2,95	0,056	1,24	0,066	1,5	0,067	1,52	0,085	1,87	0,089	2,18	0,205	3,66	0,055	1,24	0,082	1,76
113 DBS	0,723	19,7	0,510	9,72	0,270	7,02	0,298	7,81	0,343	9,11	0,310	7,64	0,226	6,00	0,365	6,82	0,225	5,89	0,159	3,65
Serum	0,034	0,601	0,140	2,39	0,051	1,11	0,055	1,21	0,052	1,13	0,081	1,77	0,081	1,96	0,218	3,91	0,038	0,79	0,069	1,45
114 DBS	0,561	14,6	0,423	7,92	0,212	5,40	0,230	5,89	0,241	6,20	0,250	6,05	0,174	4,52	0,303	5,58	0,190	4,91	0,117	2,62
Serum	0,046	0,893	0,168	2,91	0,074	1,71	0,060	1,34	0,062	1,39	0,068	1,45	0,083	2,02	0,170	2,98	0,057	1,29	0,077	1,64
117 DBS	0,553	14,4	0,618	12	0,269	6,99	0,312	8,21	0,344	9,14	0,304	7,48	0,289	7,84	0,443	8,42	0,261	6,91	0,154	3,53
Serum	0,039	0,723	0,127	2,14	0,058	1,29	0,053	1,16	0,057	1,26	0,072	1,55	0,091	2,23	0,216	3,87	0,048	1,05	0,085	1,84
118 DBS	0,509	18,7	0,826	16,8	0,410	11,1	0,436	11,9	0,548	15,4	0,453	11,6	0,338	9,30	0,591	11,6	0,359	9,8	0,288	6,94
Serum	0,023	0,534	0,276	4,98	0,110	2,65	0,101	2,41	0,104	2,49	0,114	2,59	0,124	3,14	0,282	5,16	0,08	1,91	0,140	3,18
124 DBS	0,491	17,9	0,537	10,3	0,332	8,79	0,352	9,37	0,404	10,9	0,317	7,83	0,244	6,52	0,486	9,32	0,256	6,77	0,166	3,83
Serum	0,009	0,064	0,147	2,52	0,048	1,03	0,052	1,13	0,046	0,974	0,072	1,55	0,074	1,77	0,173	3,04	0,043	0,92	0,073	1,54
126 DBS	0,241	7,97	0,387	7,19	0,159	3,96	0,170	4,25	0,191	4,82	0,227	5,45	0,178	4,64	0,238	4,30	0,151	3,83	0,119	2,67
Serum	0,047	1,32	0,104	1,71	0,048	1,08	0,038	0,765	0,038	0,765	0,043	0,83	0,048	1,07	0,098	1,62	0,039	0,81	0,045	0,87
127 DBS	0,356	12,3	0,538	10,3	0,233	5,98	0,285	7,44	0,342	9,08	0,308	7,59	0,195	5,12	0,449	8,55	0,246	6,48	0,15	3,43
Serum	0,043	1,19	0,246	4,4	0,088	2,07	0,085	1,99	0,078	1,81	0,108	2,44	0,115	2,89	0,283	5,18	0,069	1,61	0,104	2,3
STD-Serum	1,025	42	1,698	42	1,211	42	1,212	42	1,212	42	1,285	42	1,171	42	1,681	42	1,186	42	1,304	42
STD-SW	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42
Grenzwert	10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml		10 - 20 IU/ml	
Richtige Bew.	4		8		12		12		9		13		15		13		14		14	
Falsche Bew.	11		7		3		3		6		2		0		2		1		1	
Abarbeitung:																				
Seruminkub.:	1h	37°C	1h	RT	1h	RT	1h	37°C	1h	37°C	1h	37°C	4°C	21h	4°C	21h	1h	RT	4°C	21h
Konjugatinkub.:	30min	37°C	2h	RT	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	1h	RT	30min	37°C	30min	37°C
Substratinkub.:	30min	37°C	30min	RT	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C	30min	37°C

Ergebnisse der DBS -Studie

Fortsetzung Tabelle 2: ELISA Toxoplasma – verschiedene modifizierte Abarbeitungsmöglichkeiten zur Verminderung des Backgrounds

Positive Seren	normale		LOWCross		LOWCross		4°C / 21h /		DNP 0,01M		DNP 1mM		DNP 0,1mM		Rotenon 100nM		Rotenon 50nM		Rotenon 10nM	
	OD	IU/ml																		
120 DBS	1,917	151	1,407	105	1,982	93,4	1,788	83,1	1,502	96	1,318	74,3	1,142	58,4	1,091	73	1,232	91,5	1,261	95,8
Serum	2,021	174	2,037	307	2,203	117	2,07	112	1,917	168	1,917	168	1,917	168	1,86	274	1,86	274	1,86	274
121 DBS	1,778	125	1,194	76,6	2,061	101	1,884	91,9	1,433	86,7	1,288	71,4	1,603	109	1,16	81,6	1,247	93,7	1,484	137
Serum	2,054	182	1,949	257	2,137	109	2,053	110	1,881	159	1,881	159	1,881	159	1,982	362	1,982	362	1,982	362
129 DBS	2,323	270	1,627	148	2,359	137	2,042	108	1,715	126	1,477	91,9	1,511	96,1	1,276	98,1	1,501	141	1,483	137
Serum	2,480	359	2,171	420	2,441	149	2,217	130	2,201	263	2,201	263	2,201	263	2,287	1081	2,287	1081	2,287	1081
Negative Seren																				
100 DBS	0,353	11,3	0,61	28,3	0,262	6,73	0,214	5,66	0,245	8,54	0,217	7,48	0,318	11,4	0,359	16	0,299	13	0,321	14,1
Serum	0,043	1,10	0,048	1,63	0,096	2,26	0,096	2,37	0,045	1,32	0,045	1,32	0,045	1,32	0,053	1,96	0,053	1,96	0,053	1,96
103 DBS	0,746	27,4	0,403	17,1	0,435	11,8	0,503	14,5	0,678	27,9	0,519	20,1	0,525	20,3	0,647	33,2	0,646	33,1	0,594	29,7
Serum	0,180	5,42	0,237	9,4	0,382	10,2	0,393	11,0	0,155	5,2	0,155	5,2	0,155	5,2	0,138	5,6	0,138	5,6	0,138	5,6
104 DBS	0,746	27,4	0,464	20,2	0,268	6,89	0,343	9,46	0,374	13,7	0,356	12,9	0,363	13,2	0,398	18,1	0,425	19,6	0,342	15,2
Serum	0,180	5,42	0,12	4,47	0,197	4,94	0,198	5,20	0,073	2,29	0,073	2,29	0,073	2,29	0,072	2,75	0,072	2,75	0,072	2,75
105 DBS	0,418	13,7	0,296	12	0,223	5,65	0,262	7,04	0,352	12,8	0,262	9,19	0,204	6,99	0,371	16,70	0,380	17,10	0,293	12,70
Serum	0,085	2,4	0,101	3,71	0,2	5,02	0,186	4,86	0,081	2,57	0,081	2,57	0,081	2,57	0,086	3,34	0,086	3,34	0,086	3,34
108 DBS	0,448	14,9	0,328	13,5	0,16	3,95	0,247	6,61	0,414	15,4	0,305	10,8	0,324	11,6	0,417	19,1	0,453	21,1	0,329	14,5
Serum	0,037	0,92	0,049	1,67	0,078	1,79	0,089	2,18	0,042	1,22	0,042	1,22	0,042	1,22	0,050	1,83	0,050	1,83	0,050	1,83
113 DBS	0,723	19,7	0,421	18,00	0,113	2,71	0,226	6,00	0,408	15,10	0,242	8,42	0,240	8,35	0,432	20,00	0,352	15,70	0,307	13,40
Serum	0,034	0,601	0,049	1,67	0,080	1,85	0,081	1,96	0,032	0,88	0,032	0,88	0,032	0,88	0,039	1,38	0,039	1,38	0,039	1,38
114 DBS	0,561	14,6	0,260	10,4	0,135	3,29	0,174	4,52	0,296	10,5	0,166	5,59	0,178	6,03	0,344	15,3	0,351	15,6	0,302	13,2
Serum	0,046	0,893	0,05	1,71	0,078	1,79	0,083	2,02	0,03	0,81	0,03	0,81	0,03	0,81	0,038	1,34	0,038	1,34	0,038	1,34
117 DBS	0,553	14,4	0,266	10,6	0,153	3,76	0,289	7,84	0,341	12,3	0,233	8,08	0,241	8,38	0,512	24,6	0,386	17,5	0,304	13,3
Serum	0,039	0,723	0,05	1,71	0,099	2,34	0,091	2,23	0,026	0,67	0,026	0,67	0,026	0,67	0,032	1,09	0,032	1,09	0,032	1,09
118 DBS	0,509	18,7	0,684	32,90	0,32	8,36	0,338	9,30	0,47	17,80	0,419	15,60	0,405	15,00	0,527	25,5	0,646	33,1	0,55	26,9
Serum	0,023	0,534	0,088	3,19	0,146	3,58	0,124	3,14	0,056	1,7	0,056	1,7	0,056	1,7	0,064	2,42	0,064	2,42	0,064	2,42
124 DBS	0,491	17,9	0,276	11,1	0,143	3,5	0,244	6,52	0,432	16,2	0,226	7,82	0,231	8,00	0,35	15,6	0,442	20,5	0,409	18,7
Serum	0,009	0,064	0,05	1,71	0,082	1,9	0,074	1,77	0,028	0,74	0,028	0,74	0,028	0,74	0,035	1,22	0,035	1,22	0,035	1,22
126 DBS	0,241	7,97	0,274	11	0,082	1,9	0,178	4,64	0,296	10,6	0,201	6,88	0,214	7,36	0,315	13,80	0,29	12,60	0,295	12,80
Serum	0,047	1,32	0,044	1,48	0,049	1,04	0,048	1,07	0,019	0,43	0,019	0,43	0,019	0,43	0,022	0,68	0,022	0,68	0,022	0,68
127 DBS	0,356	12,3	0,346	14,3	0,135	3,29	0,195	5,12	0,334	12,04	0,232	8,04	0,218	7,51	0,394	17,9	0,379	17,1	0,341	15,1
Serum	0,043	1,19	0,069	2,45	0,12	2,89	0,115	2,89	0,045	1,32	0,045	1,32	0,045	1,32	0,046	1,67	0,046	1,67	0,046	1,67
STD-Serum	1,025	42	0,818	42	1,222	42	1,171	42	0,918	42	0,918	42	0,918	42	0,767	42	0,767	42	0,767	42
STD-SW	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42	0,800	42
Grenzwert	10 - 20 IU/ml																			
Richtig Bew .	4		3		15		14		4		11		10		3		3		3	
Falsche Bew .	11		12		0		1		11		4		5		12		12		12	
Abarbeitung:																				
Seruminkub.:	1h	37°C	1h	37°C	4°C	21h	1h	37°C	1h	37°C	1h	37°C								
Konjugatinkub.:	30min	37°C																		
Substratinkub.:	30min	37°C																		

3.2.2 Abwägung der Notwendigkeit einer neuen Grenzwerteinstellung aufgrund des Backgroundphänomens

Der bei der Abarbeitung von Dried Blood Spots mit dem ELISA auftretende Background kann je nach Grenzwerteinstellung zu falsch grenzwertigen oder auch falsch positiven Ergebnissen führen, was eine Anpassung des Grenzwertes nötig machen würde, um falsche Bewertungen zu vermeiden.

Mit einem DBS - Serumpanel von 30 negativen Patientenproben soll gezeigt werden, ob der daraus errechnete Grenzwert mit dem kitspezifischen Grenzwert für Toxoplasma IgG übereinstimmt. Das Panel wurde sowohl mit der gewöhnlichen ELISA Abarbeitung, als auch mit einer Seruminkubation bei 8°C über 21h ausgetestet, um den positiven Effekt dieser Inkubation auf den Background zu zeigen und so eine womöglich notwendige Anpassung des Grenzwerts zu umgehen.

Bei herkömmlicher Abarbeitung des Probenpanels nach ELISA Arbeitsanleitung werden von 30 DBS-Serumpaaren 22 identisch bewertet und 8 wiesen unterschiedliche Bewertungen auf. Von allen Unit-Werten der Dried Blood Spots wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Um den Grenzwert zu definieren wurde zum Mittelwert die mit 3 multiplizierte Standardabweichung addiert. Der errechnete Grenzwert beträgt 14,7 IU/ml und liegt damit noch im Grenzwert des ELISA classic Toxoplasma gondii IgG der Virion\Serion GmbH von 10 – 20 IU/ml.

Analog wurde aus den, mit der Seruminkubation bei 8°C über 21h gewonnenen Unit-Werten, der Grenzwert bestimmt, welcher 11,0 IU/ml beträgt.

Bei dieser Abarbeitung wurden alle 30 DBS-Serumpaare übereinstimmend negativ bewertet. Es gab keine falsch grenzwertigen Bewertungen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass eine Grenzwertanpassung für die Abarbeitung von DBS mit dem ELISA Toxoplasma gondii IgG der Virion\Serion GmbH nicht notwendig ist.

3.2.3 Zusammenfassende Beurteilung der Modifikationen zur Minimierung des Backgroundphänomens

Die zusammenfassende Beurteilung aller getesteten Modifikationen der ELISA Abarbeitung konnten die zugrunde liegende Ursache des Backgroundphänomens nicht hinreichend klären. Es muss eine Blutkomponente die Ursache sein, die einerseits eine so feste Bindung mit dem Antigen oder mit der Kavität selber eingeht, dass Waschvorgänge diese nicht zu entfernen vermögen, andererseits muss diese unbekannt Komponente in der Lage sein, das Substrat umzusetzen oder den Nachweisantikörper zu binden und so zu einem höheren OD-Wert als das Serum zu führen.

Durch den positiven Effekt der Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden könnte man darauf schließen, dass enzymatische Reaktionen dem Phänomen zu Grunde liegen. Jedoch zeigten die eingesetzten Enzymhemmstoffe wie EDTA, cOmplete, Natriumazid und Rotenon keine deutliche Minimierung des Backgrounds.

Der Einsatz von LowCross-Buffer® führte auch zu keiner Minimierung, woraus geschlossen werden kann, dass das Phänomen nicht durch unspezifische Antikörper oder Matrixeffekte verursacht wird.

Die besten Ergebnisse zeigten sich bei der Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden.

Diese scheint am besten die unspezifischen Reaktionen zu unterdrücken.

Dies zeigt auch eine Austestung, bei der versucht wurde, den Effekt von EDTA und den Effekt von Natriumazid mit der Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden zu kombinieren. Es zeigte sich, dass die Kombinationen keine weitere Verbesserung bewirken können. Der errechnete Grenzwert der EDTA Kombination lag bei 10,2 IU/ml und gleicht annähernd dem von 11 IU/ml der Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden.

Die Natriumazid Kombination führte zum Grenzwert von 4,2 IU/ml, welcher damit niedriger als der Grenzwert des verwendeten ELISA liegt.

Um zu zeigen, dass eine Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden keinen Einfluss auf den OD-Wert des Standardserum hat und nicht bei positiven Proben zu falsch grenzwertigen oder falsch negativen Bewertungen führt, wurden in einer Austestung 15 positive DBS-Serumpaare mit dieser Seruminkubation ausgetestet. Alle 15 Proben wurden übereinstimmend positiv bewertet. Zur Kontrolle wurden noch vorbewertete

Qualitätskontrollseren der Institut Virion\Serion GmbH mitgeführt, die ebenfalls in ihren Referenzbereichen korrekt bewertet wurden. Das Standardserum lief ebenfalls in seinem Referenzbereich.

Abschließend kann eine Seruminkubation bei 8°C für 21 Stunden als effektivste Möglichkeit zur Minimierung des Backgroundphänomens gesehen werden. Dies wurde auch von Riddell et al 2002 und Hogrefe et al 2002 für deren Abarbeitung verwendet. (Riddell et al. 2002; Hogrefe et al. 2002)

Daneben ist diese Modifikation im Laboralltag einfach und praktikabel, da lediglich eine Kühlmöglichkeit nötig ist und man keine giftigen und umweltschädlichen Substanzen verwenden muss, die eine Gefahr für Laborpersonal und womöglich ein Problem für die Entsorgung darstellen.

3.3 Ergebnisse von Studie B

Studie B wurde durchgeführt um die Reproduzierbarkeit der DBS-Abarbeitung zu demonstrieren. Sie wurde mit 13 ausgewählten Proben, welche seit Anfertigung (gleicher Zeitpunkt wie Proben von Studie A) bei -30°C in einem luftdichten Alubeutel versehen mit einem Trockenmittel gelagert wurden. Die Lagerung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1	45°C	mit erhöhter Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel
2	45°C	mit erhöhter Luftfeuchtigkeit	ohne Trockenmittel
3	45°C	normale Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel
4	38°C	mit erhöhter Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel
5	38°C	mit erhöhter Luftfeuchtigkeit	ohne Trockenmittel
6	38°C	normale Luftfeuchtigkeit	mit Trockenmittel

Alle Schritte der Abarbeitung wurden analog Studie A durchgeführt. Die Messungen erfolgten am Tag 0, nach 4 Wochen, nach 8 Wochen und nach 12 Wochen (siehe Tabelle 3).

Beispielhaft für Studie B soll anhand der Ergebnisse aus der Toxoplasma Austestung die Reproduzierbarkeit veranschaulicht werden (vgl. Abbildung 7, 8, 9 sowie Tabelle 3).

Mithilfe der Wiederfindung ($\text{OD-Wert Studie A} \cdot 100 / \text{OD-Wert Studie B}$) kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse veranschaulicht werden (siehe Tabelle 4).

Ergebnisse der DBS -Studie

3.3.1 Tabelle mit Ergebnissen der Austestungen aus Studie A und B

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse (OD und IU/ml) der ELISA Toxoplasma-Austestung von Studie A und Studie B; verschiedene Lagerungsbedingungen; Messung nach 4 Wochen

Zahl = DBS	45° / LF / TM				45° / LF / oTM				45° / TM				38° / LF / TM				38° / LF / oTM				38° / TM			
	OD		IU/ml		OD		IU/ml		OD		IU/ml		OD		IU/ml		OD		IU/ml		OD		IU/ml	
	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	STA	STB	Studie A	STB		
101	0,456	0,336	18,8	13,8	0,147	0,461	5,31	20	0,306	0,367	11,8	15,3	0,565	0,625	24,3	29,2	0,289	0,445	11,1	19,1	0,521	0,409	22	17,3
Serum	1,038	1,076	56,3	63,9	1,038	1,076	56,3	63,9	1,038	1,076	56,3	63,9	1,038	1,076	56,3	63,9	1,038	1,076	56,3	63,9	1,038	1,076	56,3	63,9
102	0,238	0,272	8,96	10,9	0,106	0,108	3,73	3,98	0,229	0,234	8,59	9,21	0,304	0,397	11,8	16,7	0,170	0,206	6,21	8,01	0,370	0,324	14,7	13,2
Serum	0,126	0,146	4,49	5,51	0,126	0,146	4,49	5,51	0,126	0,146	4,49	5,51	0,126	0,146	4,49	5,51	0,126	0,146	4,49	5,51	0,126	0,146	4,49	5,51
106	1,596	1,828	127	205	1,632	1,211	134	78,4	1,961	1,694	225	164	1,755	2,061	161	322	1,292	1,846	81,8	212	1,995	2,293	239	>Max
Serum	2,526	2,567	>Max	>Max	2,526	2,567	>Max	>Max	2,526	2,567	>Max	>Max	2,526	2,567	>Max	>Max	2,526	2,567	>Max	>Max	2,526	2,567	>Max	>Max
107	0,571	0,587	24,7	26,9	0,445	0,495	18,2	21,8	0,823	0,672	39,9	32,1	0,626	0,825	27,7	42,5	0,354	0,773	14	38,8	0,684	0,733	31,1	36
Serum	1,332	1,398	86,6	104	1,332	1,398	86,6	104	1,332	1,398	86,6	104	1,332	1,398	86,6	104	1,332	1,398	86,6	104	1,332	1,398	86,6	104
109	1,966	1,656	154	154	1,474	1,294	82,1	88,8	1,572	1,538	92,8	128	1,796	1,941	123	252	1,860	1,666	134	156	1,785	1,604	121	142
Serum	2,622	2,567	459	>Max	2,622	2,567	459	>Max	2,622	2,567	459	>Max	2,622	2,567	459	>Max	2,622	2,567	459	>Max	2,622	2,567	459	>Max
110	1,367	1,230	71,7	80,7	0,951	0,776	40,7	39	1,385	1,229	73,3	80,6	1,580	1,766	93,8	184	1,277	1,485	63,8	118	1,935	1,424	148	108
Serum	2,359	2,267	275	>Max	2,359	2,267	275	>Max	2,359	2,267	275	>Max	2,359	2,267	275	>Max	2,359	2,267	275	>Max	2,359	2,267	275	>Max
111	2,786	2,680	>Max	>Max	2,680	2,550	>Max	>Max	2,800	2,657	>Max	>Max	2,853	2,681	>Max	>Max	2,857	2,644	>Max	>Max	2,832	2,659	>Max	>Max
Serum	2,885	2,679	>Max	>Max	2,885	2,679	>Max	>Max	2,885	2,679	>Max	>Max	2,885	2,679	>Max	>Max	2,885	2,679	>Max	>Max	2,885	2,679	>Max	>Max
112	0,540	0,511	19,6	22,6	0,311	0,383	10,4	16,1	0,407	0,475	14,1	20,7	0,688	0,513	26,5	22,7	0,530	0,364	19,2	15,1	0,512	0,406	18,4	17,2
Serum	0,105	0,324	3,21	13,2	0,105	0,324	3,21	13,2	0,105	0,324	3,21	13,2	0,105	0,324	3,21	13,2	0,105	0,324	3,21	13,2	0,105	0,324	3,21	13,2
115	0,533	0,615	19,3	28,6	0,374	0,361	12,8	15	0,862	0,499	35,5	22	0,762	0,842	30,2	43,8	0,637	0,741	24	36,6	0,967	0,998	41,7	56,6
Serum	1,488	1,386	83,5	102	1,488	1,386	83,5	102	1,488	1,386	83,5	102	1,488	1,386	83,5	102	1,488	1,386	83,5	102	1,488	1,386	83,5	102
116	1,987	1,402	158	104	1,669	0,884	105	47	1,594	1,724	95,4	172	1,912	2,010	143	289	1,823	1,921	128	243	1,860	1,864	134	218
Serum	2,680	2,490	>Max	>Max	2,680	2,490	>Max	>Max	2,680	2,490	>Max	>Max	2,680	2,490	>Max	>Max	2,680	2,490	>Max	>Max	2,680	2,490	>Max	>Max
119	1,510	1,304	123	90,1	0,992	1,084	56,1	64,7	1,078	1,253	64,2	83,5	1,472	1,364	116	98,6	1,104	1,198	66,8	76,9	1,122	1,860	68,7	217
Serum	2,058	2,201	321	451	2,058	2,201	321	451	2,058	2,201	321	451	2,058	2,201	321	451	2,058	2,201	321	451	2,058	2,201	321	451
123	0,823	0,969	42,4	54	0,768	0,513	38,5	22,7	0,844	0,928	44	50,5	1,185	1,388	75,6	102	1,038	0,921	60,4	50	1,027	0,995	59,3	56,3
Serum	1,785	1,988	191	276	1,785	1,988	191	276	1,785	1,988	191	276	1,785	1,988	191	276	1,785	1,988	191	276	1,785	1,988	191	276
125	1,699	1,292	166	88,5	1,197	1,330	77	93,7	1,459	1,586	114	138	1,553	1,977	131	270	1,557	1,885	132	227	1,741	1,938	177	251
Serum	2,415	2,575	>Max	>Max	2,415	2,575	>Max	>Max	2,415	2,575	>Max	>Max	2,415	2,575	>Max	>Max	2,415	2,575	>Max	>Max	2,415	2,575	>Max	>Max

Unitbewertung: Rot=positiv, Gelb=grenzwertig, Grün=negativ, >Max=ausserhalb der Quantifizierungsgrenze

3.3.2 Studie B: Berechnung der Wiederfindung von Studie A und B

Tabelle 4: Wiederfindung der OD-Werte aus Studie A und Studie B in Prozent

		45° / LF / TM	45° / LF / oTM	45° / TM	38° / LF / TM	38° / LF / oTM	38° / TM
101		136	217	83	90	65	127
	Serum	96	94	96	96	96	96
102		88	926	98	77	83	114
	Serum	86	685	86	86	86	86
106		87	84	116	85	70	87
	Serum	98	41	98	98	98	98
107		97	202	122	76	46	93
	Serum	95	73	95	95	95	95
109		119	79	102	93	112	111
	Serum	102	42	102	102	102	102
110		111	130	113	89	86	136
	Serum	104	46	104	104	104	104
111		104	42	105	106	108	107
	Serum	108	40	108	108	108	108
112		106	261	86	134	146	126
	Serum	32	309	32	32	32	32
115		87	277	173	90	86	97
	Serum	107	74	107	107	107	107
116		142	115	92	95	95	100
	Serum	108	43	108	108	108	108
119		116	93	86	108	92	60
	Serum	94	47	94	94	94	94
123		85	196	91	85	113	103
	Serum	90	52	90	90	90	90
125		132	76	92	79	83	90
	Serum	94	41	94	94	94	94

3.3.3 Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Studie A und B

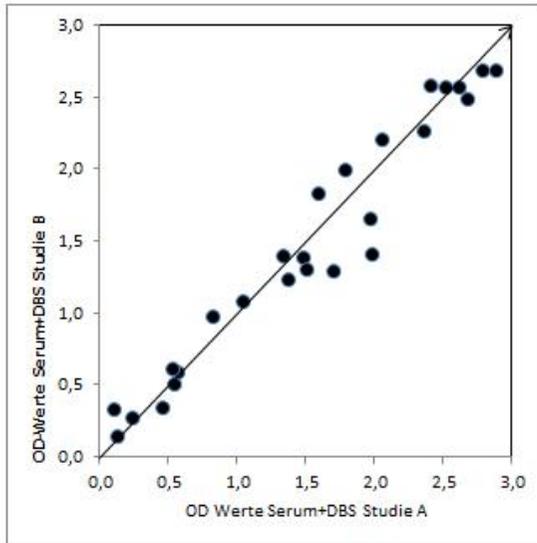


Abbildung 7: Vergleich der OD-Werte aus Studie A und B für 45°/LF/ TM

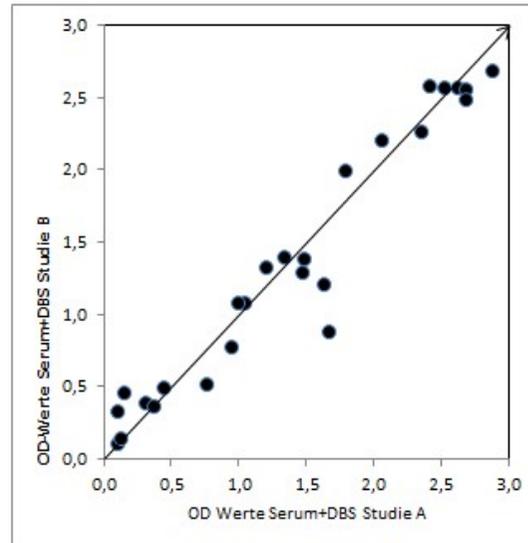


Abbildung 8: Vergleich der OD-Werte aus Studie A und B für 45°/LF/ohne TM

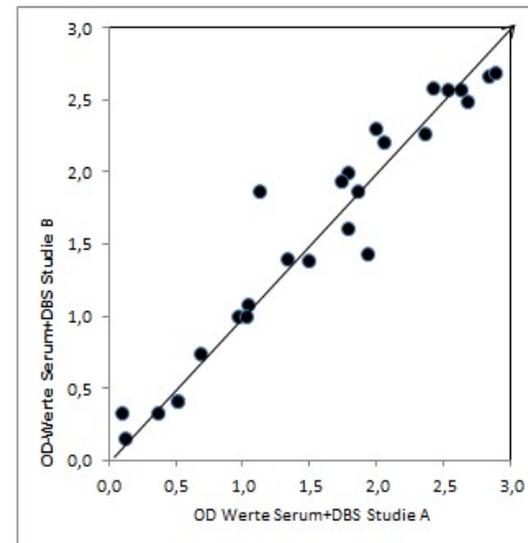


Abbildung 9: Vergleich der OD-Werte aus Studie A und B für 38°/TM

3.4 Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel mit Trockenmittel

Die Austestungen erfolgten unter ELISA Standardbedingungen, das heißt mit einer Seruminkubation von 60 min bei 37°C.

Alle Dried Blood Spots werden mit dem korrespondierenden Serum im ELISA ausgetestet. Sensitivität und Spezifität, sowie Positiver und Negativer Vorhersagewert werden nach folgenden Formeln berechnet. Als grenzwertig bewertete Proben werden in der Berechnung nicht berücksichtigt.

$$\text{Sensitivität} = r_p / r_p + f_n \times 100$$

$$\text{Spezifität} = r_n / r_n + f_p \times 100$$

$$\text{Positiver Vorhersagewert (PPV)} = r_p / r_p + f_p \times 100$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert (NPV)} = r_n / r_n + f_n \times 100$$

3.4.1 Testung auf VZV-Antikörper

3.4.1.1 Vor Beginn der Lagerung

Vor Beginn der Lagerung wurden von 28 Patientenproben 26 serologisch positiv und 2 negativ getestet. Von den Dried Blood Spots wurden 28 positiv getestet und keines negativ. Die beiden falsch positiven Ergebnisse der Dried Blood Spots resultieren am ehesten aufgrund des bereits beschriebenen Backgroundphänomens, denn die falsch positive Bewertung zeigt sich unabhängig der Lagerungsbedingung.

Tabelle 5

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 6

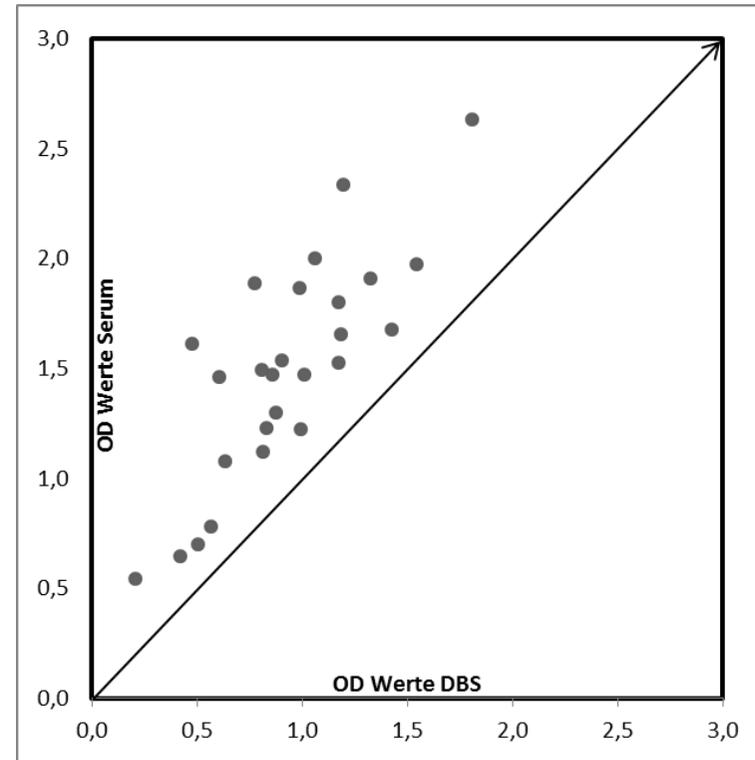
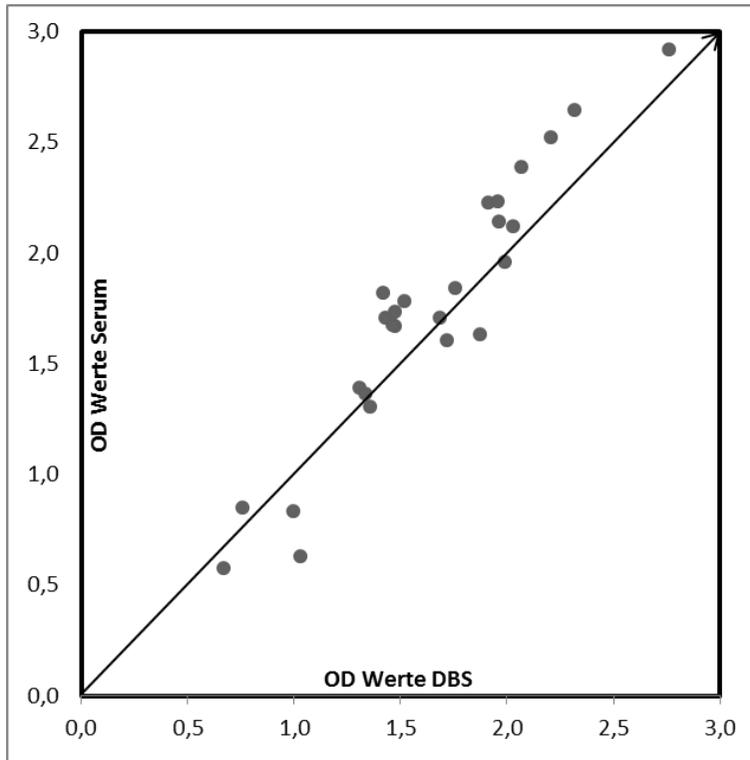
Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,9 %	0 %
Serum	26	2	100 %	100 %	100 %	100%

3.4.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen Lagerung werden 25 Proben korrekt als positiv bewertet. Ein schwach positives Serum ist derart abgefallen, dass es als grenzwertig bewertet wird. Beide negative Proben werden weiterhin als falsch-positiv bewertet (vgl. Abbildung 10, 11).

3.4.1.3 Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel mit Trockenmittel



3.4.2 Testung auf CMV Antikörper

3.4.2.1 Vor Beginn der Lagerung

28 Proben auf DBS werden positiv getestet, jedoch werden 3 Proben als falsch positiv getestet, welche negativ zu bewerten wären. Hierfür zugrunde liegend ist das Backgroundphänomen.

Tabelle 7

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 8

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100%	0%	89,3%	0%
Serum	25	3	100%	100%	100%	100%

3.4.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen werden 27 Seren positiv getestet, wovon 2 erneut die falsch positive Bewertung erhalten. Eine Probe ist abgefallen und wird nur noch als grenzwertig bewertet.

3.4.3 Testung auf HSV Antikörper

3.4.3.1 Vor Lagerung

Aus den DBS werden 22 positiv getestet. 2 Proben werden aufgrund des Backgroundphänomens falsch positiv getestet, sind aber negativ. Von 8 negativen Proben wird nur 1 richtig negativ bewertet, denn 5 werden als grenzwertig und 2 falsch positiv eingestuft.

Tabelle 9

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	2	22
Negativ im DBS	0	1	1
Gesamt	20	3	23
Richtig Positiv r_p :	20		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	1		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	5		

Tabelle 10

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	22	1	100%	33,3%	90,9%	100%
Serum	20	8	100%	100%	100%	100%

3.4.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Die Testung nach 4 Wochen erbringt 14 richtig positiv bewerte Proben. 3 sind abgefallen und werden nun als grenzwertig, 5 negativ bewertet. Alle 5 anfangs grenzwertig getesteten Proben sind abgefallen und werden negativ bewertet. Die anfangs negative Probe wird weiterhin negativ bewertet.

3.4.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.4.4.1 Vor Lagerung

Aus den DBS werden 13 richtig positiv getestet. Eine Probe ist falsch positiv bewertet. Von 14 negativen Proben werden nur 2 richtig negativ bewertet, denn 11 werden durch das Backgroundphänomen als grenzwertig eingestuft. Eine positive Probe wird durch einen Messfehler falsch negativ bewertet, jedoch in den folgenden Messungen wieder korrekt positiv bewertet. Sie wird nicht als falsch negativ in die Berechnung einbezogen.

Tabelle 11

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	13	1	14
Negativ im DBS	0	3	3
Gesamt	13	4	17

Richtig Positiv r_p :	13
Falsch Positiv f_p :	1
Richtig Negativ r_n :	3
Falsch Negativ: f_n :	0
Grenzwertig:	11

Tabelle 12

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	14	3	100%	75%	92,8%	100%
Serum	14	14	100%	100%	100%	100%

3.4.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen werden 12 richtig positiv und eine falsch positiv bewertet, welche schon zu Beginn falsch positiv bewertet wurde. 9 werden weiterhin grenzwertig befundet. 2 Positive sind abgefallen zu Grenzwertig. 2 Grenzwertige verlieren an Aktivität und werden negativ. Eine Negative wird jetzt grenzwertig, während eine weiterhin richtig negativ eingestuft wird.

3.5 Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel ohne Trockenmittel

3.5.1 Testung auf VZV-Antikörper

3.5.1.1 Vor Beginn der Lagerung

Aus den Dried Blood Spots werden 28 positiv getestet, jedoch sind 2 Proben davon falsch positiv bewertet, welche im Serum negativ sind.

Tabelle 13

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 14

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100%	0%	92,8 %	0 %
Serum	28	0	100%	100%	100%	100%

3.5.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach einer Lagerungszeit von 4 Wochen werden 22 Proben positiv getestet, wovon eine der beiden anfangs falsch positiv getesteten Proben weiterhin falsch positiv bleibt, die andere jetzt als richtig negativ gewertet wird. 3 Positive fallen ab und werden grenzwertig und 2 negativ (vgl. Abbildung 12, 13).

3.5.1.3 Ergebnisse der Lagerung bei 45°C mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel ohne Trockenmittel

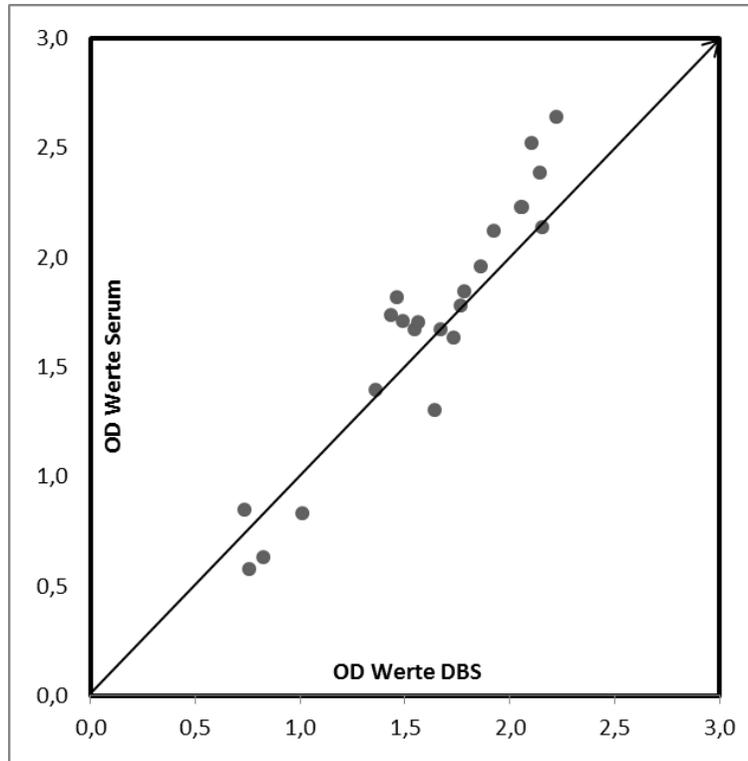


Abbildung 12: Vergleich der OD-Werte DBS und Serum der Lagerung bei 45°C/ LF/ ohne TM; vor Lagerung

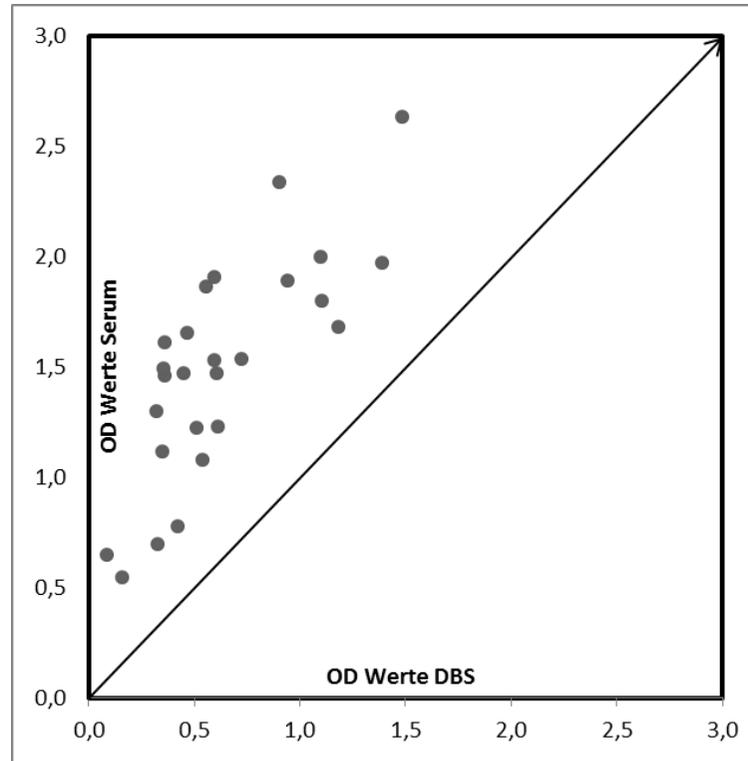


Abbildung 13: Vergleich der OD-Werte DBS und Serum der Lagerung bei 45°C/ LF/ ohne TM; nach 4 Wochen Lagerung

3.5.2 Testung auf CMV

3.5.2.1 Vor Lagerung

Alle Proben werden positiv für CMV getestet, jedoch sind 3 Proben im Vergleich zum Serum als falsch positiv zu werden.

Tabelle 15

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 16

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,3 %	0 %
Serum	25	3	100%	100%	100%	100%

3.5.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen Lagerung sind die 3 zu Beginn als falsch positiv getesteten Proben abgefallen und werden nun richtig negativ bewertet, während die restlichen 25 Proben weiterhin richtig positiv gewertet werden.

3.5.3 Testung auf HSV

3.5.3.1 Vor Lagerung

23 Proben werden positiv bewertet, wovon 3 falsch positiv sind und im Serum negativ bewertet werden. 3 negative werden als grenzwertig eingestuft. 3 Proben werden richtig negativ befundet.

Tabelle 17

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	3	23
Negativ im DBS	0	3	3
Gesamt	20	6	26
Richtig Positiv r_p :	20		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	3		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	3		

Tabelle 18

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	23	3	100 %	50 %	87 %	100%
Serum	20	8	100%	100%	100%	100%

3.5.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

5 vorher positive Proben sind nach 4 Wochen grenzwertig geworden. 11 Positive sind abgefallen und nun negativ. Die 3 anfangs grenzwertigen Proben werden jetzt richtig negativ bewertet, genauso wie die beiden als richtig negativ deklarierten Proben.

3.5.4 Testung auf Toxoplasma

3.5.4.1 Vor Lagerung

16 Proben werden positiv getestet, jedoch wären 2 Proben entsprechend der Serumprüfung negativ und somit falsch positiv. 12 negative Seren werden aufgrund des Backgroundphänomens als grenzwertig deklariert.

Tabelle 19

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	2	16
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	14	2	16
Richtig Positiv r_p :	14		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	12		

Tabelle 20

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	16	0	100%	0 %	87,5 %	0 %
Serum	14	14	100%	100%	100%	100%

3.5.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Ein Positives ist durch den Abfall des Antikörpertiters negativ geworden und 3 Positive zu grenzwertig abgefallen, ein falsch Positives ist jetzt grenzwertig, ein falsch Positives ist falsch positiv geblieben. 10 der Grenzwertigen werden jetzt richtig negativ bewertet.

3.6 Ergebnisse der Lagerung bei 45°C in Alubeutel mit Trockenmittel

3.6.1 Testung auf VZV

3.6.1.1 Vor Lagerung

Alle eingesetzten Proben werden positiv bewertet, allerdings sind 2 Proben falsch positiv.

Tabelle 21

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 22

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100%	0 %	92,8 %	0 %
Serum	26	2	100%	100%	100%	100%

3.6.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Von 28 positiv getesteten Proben wird eine Probe nach 4 Wochen nur noch grenzwertig getestet. Eine der beiden falsch positiven Proben wird grenzwertig, die andere bleibt falsch positiv.

3.6.2 Testung auf CMV

3.6.2.1 Vor Lagerung

Alle 28 Proben werden positiv befundet. Davon sind 3 Proben falsch positiv.

Tabelle 23

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28

Richtig Positiv r_p :	25
Falsch Positiv f_p :	3
Richtig Negativ r_n :	0
Falsch Negativ: f_n :	0

Tabelle 24

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,2 %	0 %
Serum	25	3	100%	100%	100%	100%

3.6.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Es werden 27 Proben positiv befundet, darunter sind 2 falsch Positive die unverändert falsch positiv befundet werden. Eine falsch positive Probe ist ins Grenzwertige abgefallen.

3.6.3 Testung auf HSV

3.6.3.1 Vor Lagerung

2 von 22 als positiv getesteten Proben sind falsch positiv und im Serum negativ. 2 Proben werden richtig negativ bewertet. 4 negative Proben werden als Dried Blood Spot grenzwertig bewertet.

Tabelle 25

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	2	22
Negativ im DBS	0	2	2
Gesamt	20	4	24

Richtig Positiv	r_p :	20
Falsch Positiv	f_p :	2
Richtig Negativ	r_n :	2
Falsch Negativ:	f_n :	0
Grenzwertig:		4

Tabelle 26

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	22	2	100%	50 %	90,9 %	100 %
Serum	20	8	100%	100%	100%	100%

3.6.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

13 positiv bewertete Proben werden weiterhin richtig positiv deklariert. 4 Positive werden nach Lagerung grenzwertig eingestuft und weitere 4 werden negativ. Alle 4 Grenzwertigen fallen ins Negative ab. Eine negative Probe wird grenzwertig, jedoch lief diese direkt am unteren Grenzwert. Eine Negative bleibt negativ. Eine falsch Positive wird grenzwertig, während die andere negativ wird.

3.6.4 Testung auf Toxoplasma

3.6.4.1 Vor Lagerung

19 Proben werden positiv getestet. Darunter befinden sich 4 falsch Positive. Die Testung ergibt daneben 2 richtig Negative. 7 eigentlich Negative werden aufgrund des Background-Phänomens grenzwertig.

Tabelle 27

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	15	4	19
Negativ im DBS	0	2	2
Gesamt	15	6	21
Richtig Positiv r_p :	15		
Falsch Positiv f_p :	4		
Richtig Negativ r_n :	2		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	7		

Tabelle 28

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	19	2	%	%	%	%
Serum	14	14	100%	100%	100%	100%

3.6.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

13 Positive werden weiterhin richtig positiv bewertet. Eine richtig positiv bewertete Probe wird grenzwertig. Ebenso werden 4 der falsch Positiven grenzwertig. Eine der beiden richtig negativ bewerteten Proben wird grenzwertig, jedoch lief sie bereits in der ersten Testung knapp am unteren Grenzwert. Eine negative Probe, die zu Beginn grenzwertig getestet wurde ist nach 4 Wochen schwach positiv geworden.

3.7 Ergebnisse der Lagerung bei 45° in Alubeutel ohne Trockenmittel

3.7.1 Testung auf VZV Antikörper

3.7.1.1 Vor Lagerung

Alle 28 Proben werden positiv bewertet, jedoch sind darunter 2 falsch Positive, die eigentlich negativ sind. Eine Probe wird aufgrund eines Messfehlers als negativ, jedoch in den folgenden Messungen wieder als richtig positiv deklariert.

Tabelle 29

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 30

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,8 %	0 %
Serum	26	2	100%	100%	100%	100%

3.7.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

20 Proben werden weiterhin richtig positiv bewertet. Eines der falsch Positiven wird nach 4 Wochen richtig negativ, das andere grenzwertig bewertet. 4 richtig Positive fallen ins Grenzwertige ab. 2 richtig Positive werden negativ.

3.7.2 Testung auf CMV Antikörper

3.7.2.1 Vor Lagerung

25 positive Proben werden als richtig positiv getestet. 3 Proben sind falsch positiv und eigentlich negativ.

Tabelle 31

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 32

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,2 %	0 %
Serum	25	3	100%	100%	100%	100%

3.7.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen werden 25 Proben richtig positiv bewertet. Die 3 falsch Positiven werden grenzwertig oder negativ, eines wird erneut falsch positiv getestet.

3.7.3 Testung auf HSV Antikörper

3.7.3.1 Vor Lagerung

Im Serum sind 20 Proben positiv und 8 negativ. Alle 20 Proben werden richtig positiv bewertet, jedoch werden von 8 Negativen 3 richtig negativ und 4 grenzwertig getestet. Daneben wird eine negative Probe falsch positiv befundet.

Tabelle 33

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	1	21
Negativ im DBS	0	3	3
Gesamt	20	4	24

Richtig Positiv	r_p :	20
Falsch Positiv	f_p :	1
Richtig Negativ	r_n :	3
Falsch Negativ:	f_n :	0
Grenzwertig		4

Tabelle 34

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	21	3	100 %	75 %	95,2 %	100 %
Serum	20	8	100 %	100 %	100 %	100 %

3.7.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

9 Proben werden nach 4 Wochen richtig positiv bewertet. 4 vormals positive Proben werden nun grenzwertig getestet. 6 positive Proben fallen ins Negative ab. Die vormals falsch positive Probe ist nun richtig negativ befundet. Die 3 richtig negativen Proben sind weiterhin richtig negativ bewertet worden.

3.7.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.7.4.1 Vor Lagerung

Die Testung erbringt 17 positiv getestete Proben, jedoch sind 3 darunter falsch positiv. 2 Proben werden richtig negativ bewertet. 9 im Serum negative Proben werden als grenzwertig eingestuft.

Tabelle 35

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	3	17
Negativ im DBS	0	2	2
Gesamt	14	5	19
Richtig Positiv r_p :	14		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	2		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	9		

Tabelle 36

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	17	2	100 %	40 %	82,4 %	100 %
Serum	14	14	100 %	100 %	100 %	100 %

3.7.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Von 14 anfangs richtig positiv getesteten Proben werden nach 4 Wochen nur noch 11 Proben richtig positiv getestet. 2 der falsch Positiven sind nun grenzwertig die andere negativ. 8 Grenzwertige werden jetzt richtig negativ bewertet, eine bleibt weiterhin grenzwertig. Eine der beiden richtig negativen ist nach 4 Wochen ins Grenzwertige gestiegen, wird jedoch in den folgenden Messungen wieder richtig negativ bewertet.

3.8 Ergebnisse der Lagerung bei 38° mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel mit Trockenmittel

3.8.1 Testung auf VZV Antikörper

3.8.1.1 Vor Lagerung

Die verwendeten Proben bestehen aus 26 positiv für Varicella-Zoster Virus und 2 Negativen. Aus den Dried Blood Spots resultieren 28 Positive und davon 2 falsch positive Proben.

Tabelle 37

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 38

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,8 %	0 %
Serum	26	2	100%	100%	100%	100%

3.8.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen werden noch 26 Proben richtig positiv getestet. Eine der beiden falsch Positiven ist ins Grenzwertige abgefallen, die andere weiterhin falsch positiv.

3.8.2 Testung auf CMV

3.8.2.1 Vor Lagerung

Von 28 positiv getesteten Proben aus den Dried Blood Spots sind 25 richtig positiv und 3 Negative werden falsch positiv bewertet.

Tabelle 39

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 40

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,2 %	0 %
Serum	25	3	100 %	100 %	100 %	100 %

3.8.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Die Bewertung der Proben hat sich über den Zeitraum der Lagerung nicht verändert.

3.8.3 Testung auf HSV Antikörper

3.8.3.1 Vor Lagerung

Die Testung der korrespondierenden Seren ergibt 20 Positive und 8 Negative. Es werden von den Dried Blood Spots 21 positiv, 5 grenzwertig und 2 richtig negativ getestet. Darunter befindet sich ein falsch Positives. Die 5 Grenzwertigen erklären sich durch den Anstieg bedingt durch das Backgroundphänomen.

Tabelle 41

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	1	21
Negativ im DBS	0	2	2
<hr/>			
Gesamt	20	3	23
Richtig Positiv r_p :	20		
Falsch Positiv f_p :	1		
Richtig Negativ r_n :	2		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	5		

Tabelle 42

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	21	2	100 %	66,7 %	95,2 %	100 %
Serum	20	8	100 %	100 %	100 %	100 %

3.8.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

17 Proben werden auch nach 4 Wochen Lagerung richtig positiv bewertet. 3 Positive sind abgefallen und werden negativ getestet. Das falsch Positive ist grenzwertig geworden. 3 Grenzwertige fallen ab und werden negativ. Eine der Grenzwertigen bleibt von ihrem OD-Wert gleich, wird aber durch die Tagesschwankung des Standardserums im ELISA als schwach positiv bewertet.

3.8.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.8.4.1 Vor Lagerung

Es werden 16 Proben aus den DBS positiv getestet. Davon sind 14 richtig positiv und 2 falsch positiv. 11 Grenzwertige sind eigentlich negativ. Eine negative Probe wird richtig negativ bewertet.

Tabelle 43

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	2	16
Negativ im DBS	0	1	1
Gesamt	14	3	17
Richtig Positiv r_p :	14		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	1		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	11		

Tabelle 44

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	16	1	100 %	33,3 %	87,5 %	100 %
Serum	14	14	100 %	100 %	100 %	100 %

3.8.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

14 Proben werden noch richtig positiv bewertet, während eine falsch Positive grenzwertig und die andere falsch positiv geblieben ist. Eine grenzwertig getestete Probe, die eigentlich negativ ist, wurde schwach positiv, da ihr OD-Wert leicht angestiegen ist.

3.9 Ergebnisse der Lagerung bei 38° mit hoher Luftfeuchtigkeit in Alubeutel ohne Trockenmittel

3.9.1 Testung auf VZV Antikörper

3.9.1.1 Vor Lagerung

Es werden 28 Proben in der Testung als positiv ausgewiesen, jedoch sind es 26 richtig Positive und 2 falsch Positive.

Tabelle 45

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 46

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,8 %	0 %
Serum	26	2	100 %	100 %	100 %	100 %

3.9.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

3 Positive ändern nach 4 Wochen ihre Bewertung. Ein richtig Positives wird negativ und ein weiteres grenzwertig. Ein falsch Positives wird negativ getestet.

3.9.2 Testung auf CMV Antikörper

3.9.2.1 Vor Lagerung

Für CMV sind 25 Proben positiv und 3 negativ. Aus den DBS werden 28 Positive und damit 3 falsch Positive getestet.

Tabelle 47

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 48

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,2 %	0 %
Serum	25	3	100 %	100 %	100 %	100 %

3.9.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach Lagerung wird ein falsch Positives grenzwertig, die Übrigen werden gleich wie vor Lagerung bewertet.

3.9.3 Testung auf HSV Antikörper

3.9.3.1 Vor Lagerung

Von 21 aus den DBS getesteten Proben sind nur 20 richtig positiv und somit eine falsch Positiv. 4 Grenzwertige sind eigentlich negativ. 3 Proben werden richtig negativ bewertet.

Tabelle 49

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	1	21
Negativ im DBS	0	3	3
Gesamt	20	4	24

Richtig Positiv	r_p :	20
Falsch Positiv	f_p :	1
Richtig Negativ	r_n :	3
Falsch Negativ:	f_n :	0
Grenzwertig:		4

Tabelle 50

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	21	3	100 %	75 %	95,2 %	100 %
Serum	20	8	100 %	100 %	100 %	100 %

3.9.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Von 20 richtig Positiven sind 7 negativ geworden. 2 richtig Positive sind ins Grenzwertige abgefallen. Somit werden 11 wieder richtig positiv bewertet.

4 Grenzwertige sind nach 4 Wochen Lagerung richtig negativ bewertet. 3 negative Proben werden auch weiterhin richtig negativ bewertet.

3.9.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.9.4.1 Vor Lagerung

Die DBS-Testung ergibt 17 positive Proben. Im Vergleich mit der Testung der Seren ergeben sich 14 richtig positiv bewertete Proben und 3 falsch Positive. Daneben zeigen sich 10 Grenzwertige und eine richtig negativ getestete Probe.

Tabelle 51

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	3	17
Negativ im DBS	0	1	1
Gesamt	14	4	18
Richtig Positiv r_p :	14		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	1		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	10		

Tabelle 52

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	17	1	100 %	25 %	82,4 %	100 %
Serum	14	14	100 %	100 %	100 %	100 %

3.9.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

12 Proben werden richtig positiv bewertet. Eine falsch Positive ist gleich geblieben, wohingegen die beiden anderen grenzwertig geworden sind. Eine richtig positiv bewertete ist grenzwertig geworden. 6 Grenzwertige sind weiterhin grenzwertig, 4 sind negativ geworden. Die richtig negative Probe ist knapp ins Grenzwertige angestiegen.

3.10 Ergebnisse der Lagerung bei 38° in Alubeutel mit Trockenmittel

3.10.1 Testung auf VZV Antikörper

3.10.1.1 Vor Lagerung

Das Probenpanel besteht aus 26 im Serum richtig positiven und 2 richtig negativen Proben. In den DBS werden 28 Positive getestet, womit 2 Proben falsch positiv sind.

Tabelle 53

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 54

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,8 %	0 %
Serum	26	2	100 %	100 %	100 %	100 %

3.10.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

25 Proben werden richtig positiv getestet. Eine richtig Positive ist abgefallen und nunmehr grenzwertig, genau wie eine der beiden falsch Positiven, die andere ist konstant geblieben.

3.10.2 Testung auf CMV Antikörper

3.10.2.1 Vor Lagerung

Unter 28 positiv getesteten Proben sind 3 falsch Positive, die eigentlich negativ sind.

Tabelle 55

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
<hr/>			
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 56

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,2 %	0 %
Serum	25	3	100 %	100 %	100 %	100 %

3.10.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

An der Bewertung hat sich nach 4 Wochen Lagerung bei 38°C mit einem Trockenmittel nichts geändert. Die Bewertungen erfolgen genau wie vor der Lagerung.

3.10.3 Testung auf HSV Antikörper

3.10.3.1 Vor Lagerung

20 Proben werden in den DBS richtig positiv und 2 falsch positiv getestet. 5 Proben wurden richtig negativ bewertet. 8 negative Proben werden einmal grenzwertig und wie oben bereits beschrieben zweimal falsch positiv bewertet.

Tabelle 57

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	21	2	23
Negativ im DBS	0	5	5
Gesamt	21	7	28

Richtig Positiv	r_p :	20
Falsch Positiv	f_p :	2
Richtig Negativ	r_n :	5
Falsch Negativ:	f_n :	0
Grenzwertig:		1

Tabelle 58

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	22	5	100 %	71,4 %	90,9 %	100 %
Serum	20	8	100 %	100 %	100 %	100 %

3.10.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

15 Proben werden auch nach Lagerung richtig positiv angegeben. 4 richtig Positive fallen ab und werden grenzwertig, eine wird negativ. Eine falsch positive Probe bleibt gleich, während die andere negativ wird. 4 Proben werden richtig negativ bewertet, die andere steigt an und wird grenzwertig.

3.10.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.10.4.1 Vor Lagerung

Von 14 positiven Proben werden 14 als richtig positiv getestet, jedoch zeigen sich auch 4 falsch Positive. Daneben gibt es 10 Proben, die grenzwertig getestet wurden und eigentlich negativ sind.

Tabelle 59

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	4	18
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	14	4	18
Richtig Positiv r_p :	14		
Falsch Positiv f_p :	4		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	10		

Tabelle 60

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	18	0	100 %	0 %	77,7 %	0 %
Serum	14	14	100 %	100 %	100 %	100 %

3.10.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

14 Proben werden nach Lagerung richtig positiv gemessen. Drei falsch Positive bleiben konstant, während eine grenzwertig wird. 2 grenzwertige Proben steigen an und werden falsch positiv. Dies resultiert aus der tagesabhängigen Bewertung, denn die OD-Werte sind annähernd gleich geblieben.

3.11 Ergebnisse der Lagerung bei 38° in Alubeutel ohne Trockenmittel

3.11.1 Testung auf VZV Antikörper

3.11.1.1 Vor Lagerung

Vor Beginn der Lagerung zeigen sich in der Messung 26 richtig positive Proben und 2 falsch Positive.

Tabelle 61

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28

Richtig Positiv	r_p :	26
Falsch Positiv	f_p :	2
Richtig Negativ	r_n :	0
Falsch Negativ:	f_n :	0

Tabelle 62

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,8 %	0 %
Serum	26	2	100 %	100 %	100 %	100 %

3.11.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

22 richtig positive Proben werden korrekt bewertet. 3 richtig Positive sind grenzwertig geworden und eine negativ. Eines der beiden falsch Positiven wird nunmehr richtig negativ bewertet. Das andere falsch Positive ist grenzwertig befundet.

3.11.2 Testung auf CMV Antikörper

3.11.2.1 Vor Lagerung

28 Proben wurden positiv getestet, beinhalten aber 3 falsch Positive.

Tabelle 63

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 64

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,3%	0 %
Serum	25	3	100 %	100 %	100 %	100 %

3.11.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Alle Proben werden auch nach 4 Wochen Lagerung gleich bewertet bis auf eine richtig positive Probe, die nun grenzwertig getestet wird.

3.11.3 Testung auf HSV Antikörper

3.11.3.1 Vor Lagerung

Die Testung der DBS ergibt 20 richtig Positive und 1 falsch positive Probe. Weiterhin werden 5 Grenzwertige, eigentlich negative Proben, und 2 richtig Negative erbracht.

Tabelle 65

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	1	21
Negativ im DBS	0	2	2
Gesamt	20	3	23

Richtig Positiv	r_p :	20
Falsch Positiv	f_p :	1
Richtig Negativ	r_n :	2
Falsch Negativ:	f_n :	0
Grenzwertig:		5

Tabelle 66

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	21	2	100 %	66,7 %	95,2 %	100 %
Serum	20	8	100 %	100 %	100 %	100 %

3.11.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

5 richtig Positive sind negativ, 2 richtig Positive sind grenzwertig geworden. Genauso ist die falsch positive Probe jetzt negativ. 4 grenzwertige Proben sind ebenfalls abgefallen und negativ bewertet.

3.11.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.11.4.1 Vor Lagerung

Die Austestung der DBS vor Lagerung zeigt 15 Positive, wobei eine Probe falsch positiv ist. Daneben werden 13 Grenzwertige mit korrespondierenden negativen Seren getestet.

Tabelle 67

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	1	15
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	14	1	15

Richtig Positiv r_p :	14
Falsch Positiv f_p :	1
Richtig Negativ r_n :	0
Falsch Negativ: f_n :	0
Grenzwertig:	13

Tabelle 68

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	15	0	100 %	0 %	93,3 %	0 %
Serum	14	14	100 %	100 %	100 %	100 %

3.11.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

13 Proben werden noch richtig positiv getestet. 1 Richtig Positive wird grenzwertig und 7 Grenzwertige werden negativ.

3.12 Ergebnisse der Lagerung bei 8° in Alubeutel mit Trockenmittel

3.12.1 Testung auf VZV Antikörper

3.12.1.1 Vor Lagerung

Nach Austestung der DBS vor der Lagerung zeigen sich 27 positive und eine grenzwertig getestete Proben. 2 davon sind allerdings falsch positiv und die grenzwertige Probe ist am ehesten durch ein Pipettierfehler bedingt, denn in den folgenden Messungen wird sie richtig positiv wie das zugehörige Serum getestet.

Aus diesem Grund wird mit 28 Positiven gerechnet.

Tabelle 69

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf VZV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	26	2	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	26	2	28
Richtig Positiv r_p :	26		
Falsch Positiv f_p :	2		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 70

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	92,9 %	0 %
Serum	26	2	100 %	100 %	100 %	100 %

3.12.1.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen Lagerung ergeben sich keine Änderungen zur Vorabtestung. 28 positive Proben mit 2 falsch positiven werden getestet (vgl. Abbildung 14, 15).

3.12.1.3 Ergebnisse der Lagerung bei 8°C in Alubeutel mit Trockenmittel

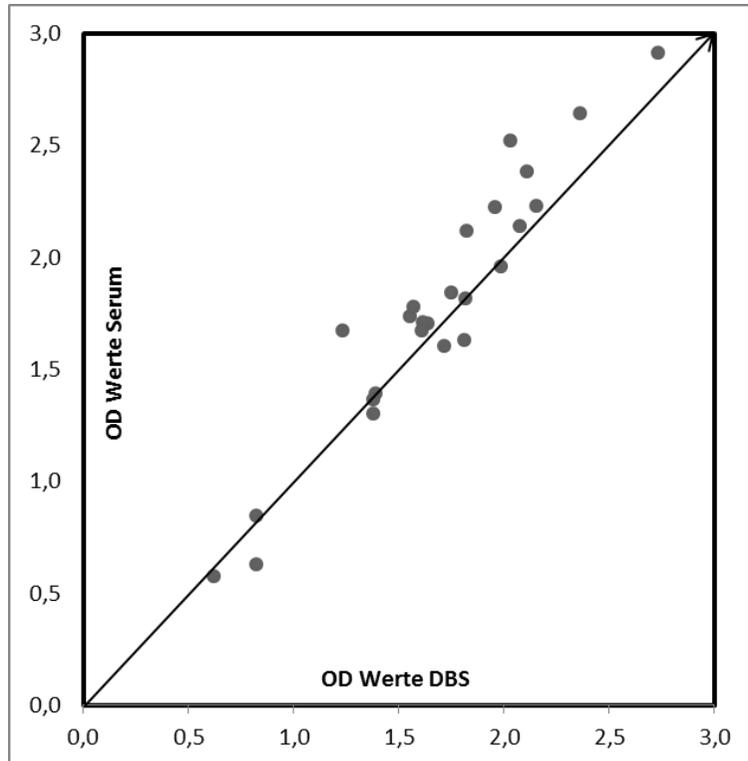


Abbildung 14: Vergleich der OD-Werte DBS und Serum der Lagerung bei 8°C/ TM; vor Lagerung

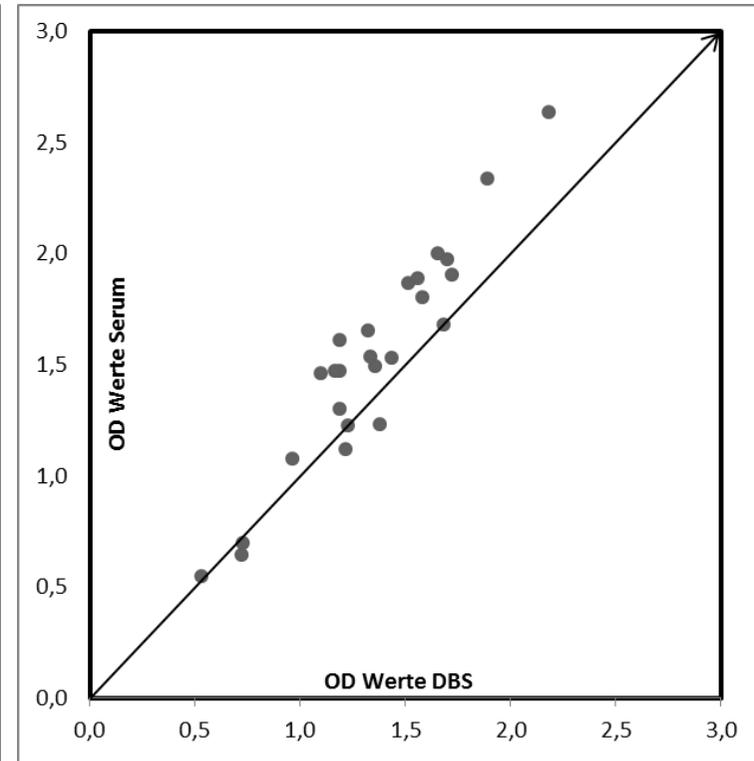


Abbildung 15: Vergleich der OD-Werte DBS und Serum der Lagerung bei 8°C/ TM; nach 4 Wochen Lagerung

3.12.2 Testung auf CMV Antikörper

3.12.2.1 Vor Lagerung

Es zeigen sich 25 richtig positive und 3 falsch positive, eigentlich negative Proben.

Tabelle 71

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf CMV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	25	3	28
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	25	3	28
Richtig Positiv r_p :	25		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		

Tabelle 72

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	28	0	100 %	0 %	89,3 %	0 %
Serum	25	3	100 %	100 %	100 %	100 %

3.12.2.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Es ergeben sich keine Änderungen zu vor der Lagerung. Alle Bewertungen erfolgen identisch zu vorher.

3.12.3 Testung auf HSV Antikörper

3.12.3.1 Vor Lagerung

Es zeigen sich 21 positive Proben, wovon jedoch eine falsch positiv ist. Daneben werden 5 Grenzwertige und 2 richtig negative gemessen.

Tabelle 73

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf HSV-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	20	1	21
Negativ im DBS	0	2	2
Gesamt	20	3	23
Richtig Positiv r_p :	20		
Falsch Positiv f_p :	1		
Richtig Negativ r_n :	2		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	5		

Tabelle 74

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	21	2	100 %	66,7 %	95,2 %	100 %
Serum	20	8	100 %	100 %	100 %	100 %

3.12.3.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Alle Bewertungen bleiben gleich, bis auf 2 Negative die schwach grenzwertig werden und ein Grenzwertiges, welches richtig negativ und ein Grenzwertiges, welches schwach positiv bewertet wird.

3.12.4 Testung auf Toxoplasma Antikörper

3.12.4.1 Vor Lagerung

Die Messung ergibt 17 Positive und 11 Grenzwertige, welche eigentlich negativ sind. Unter den Positiven sind 3 falsch Positive.

Tabelle 75

Ergebnisse der Testung der Dried Blood Spots auf Toxoplasma-Antikörper verglichen mit Testung im Serum

Proben	Positiv im Serum	Negativ i.S.	Gesamt
Positiv im DBS	14	3	17
Negativ im DBS	0	0	0
Gesamt	14	3	17
Richtig Positiv r_p :	14		
Falsch Positiv f_p :	3		
Richtig Negativ r_n :	0		
Falsch Negativ: f_n :	0		
Grenzwertig:	11		

Tabelle 76

Sensitivität und Spezifität der Testung aus DBS und Serum

	Positiv	Negativ	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV
DBS	17	0	100 %	0 %	82,3 %	0 %
Serum	14	14	100 %	100 %	100 %	100 %

3.12.4.2 Nach 4 Wochen Lagerung

Alle Bewertungen sind gleich geblieben bis auf 2 Grenzwertige die ins schwach positive gestiegen sind und eine falsch positive Probe, die nun grenzwertig bewertet wird.

4 Diskussion

4.1 Verifizierung der 1. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot entspricht dem Antikörpergehalt in dem zugehörigen Serum

Um aus Dried Blood Spots valide Antikörperbestimmungen durchführen zu können, muss gezeigt werden, dass der Antikörpergehalt eines Dried Blood Spot annähernd gleich zum korrespondierenden Serum ist. Das bedeutet, dass gerade so viele Antikörper durch die Elution aus dem Dried Blood Spot gewonnen werden können, dass die Bewertung des Dried Blood Spot im ELISA identisch ist zum dazugehörigen Serum.

Wir konnten zeigen, dass die Bewertung nur durch das Background Phänomen verändert wird. Alle anderen DBS/Serumpaare wurden identisch bewertet.

Durch die Wiederfindung konnte gezeigt werden, dass die Menge der aus den Dried Blood Spots eluierten Antikörper annähernd gleich ist zum Antikörpergehalt des Serums.

Eine ideale Wiederfindung von 100% kann selten gezeigt werden. Die Wiederfindung schwankt zwischen 60% und 140%. Diese Schwankungsbreite führt jedoch nicht zu einer unterschiedlichen Bewertung der Probe (siehe Tabelle 4). Eine unterschiedliche Probenbewertung fand sich nur durch den Einfluss des Backgroundphänomens (siehe Tabelle 2).

Aus diesem Grund kann unsere 1. Hypothese verifiziert werden, auch wenn der Antikörpergehalt in Dried Blood Spots und dem Serum nicht genau identisch ist.

4.2 Verifizierung der 2. Hypothese: Der Antikörpergehalt in einem Dried Blood Spot bleibt bei idealer Lagerung über 4 Wochen stabil bzw. die Bewertung des Serums bleibt unverändert.

Damit auch nach 4 Wochen Transport unter extremen klimatischen Bedingungen noch eine valide Bewertung einer Probe erfolgen kann, müssen bestimmte Transportbedingungen eingehalten werden.

Wir haben verschiedene Bedingungen simuliert und können so eine Empfehlung für die nötigen Lagerungs- und Transportbedingungen geben, die eine Antikörperstabilität für 4 Wochen gewährleisten.

Die ideale Lagerung von Dried Blood Spots ist ein luftdichter Alubeutel versehen mit einem Trockenmittel, gelagert in einer gekühlten Umgebung, wie z.B. ein handelsüblicher Kühlschrank oder auch eine Kühlbox. Dies entspricht Lagerungsbedingung B9 (8°C, Alubeutel mit Trockenmittel) (siehe Tabelle 77, sowie Abbildung 14 und 15). (Therrell et al. 1996; Parker und Cubitt 1999)

Bei der Testung auf VZV werden alle Proben bei dieser Lagerung auch nach 4 Wochen noch identisch bewertet. Das gleiche gilt für CMV. Hier ist jedoch anzumerken, dass bei VZV 27 Proben und bei CMV 28 Proben als hoch positiv getestet wurden, was die allgemeine Durchseuchung der Bevölkerung widerspiegelt. Das bedeutet, dass ein Abfall des Antikörpergehalts meist zu keiner Änderung der Bewertung führt.

Doch auch für HSV werden nach 4 Wochen Lagerung in einer gekühlten Umgebung noch 85,7% der Proben identisch bewertet. Alle Positiven bleiben positiv. Lediglich 2

Negative wurden schwach grenzwertig. Ein Grenzwertiges wird nach 4 Wochen richtig negativ bewertet. Nur ein Grenzwertiges steigt an und wird schwach positiv.

Für Toxoplasma stimmen noch 89,3% in ihrer Bewertung überein. Alle Positiven blieben auch nach 4 Wochen positiv. Eine falsch positive Probe wird jetzt grenzwertig bewertet und 2 Grenzwertige werden schwach positiv.

Wir konnten zeigen, dass fast alle positiven Proben aller Erreger auch weiterhin positiv bewertet werden, was in einer durchschnittlichen Sensitivität von 100 % ausgedrückt wird. Die Spezifität liegt bei allen Erregern bei 0%, nur bei HSV bei 66.7%. Die Erklärung der allgemein unbefriedigenden Spezifität liegt im Backgroundphänomen, denn viele negative Proben werden hierdurch grenzwertig oder schwach positiv. Hier sollte die oben beschriebene modifizierte Abarbeitung mit Probeninkubation bei 8°C eine bessere Spezifität ermöglichen. Bestätigt wird dies bei der Toxoplasma Austestung, welche den höchsten Anteil aller falsch positiven Bewertungen aufweist. Mit einer Probeninkubation bei 8°C wurde die Austestung zu 100% spezifisch. Aufgrund dessen sollte diese Beobachtung auch für die anderen Erreger gelten.

4.3 Verifizierung der 3. Hypothese: In luftdichten Alubeuteln mit ZIP-Verschluss und nach Zugabe eines Trockenmittels bleiben Antikörpertiter von Dried Blood Spots bei simulierten Klimabedingungen wie Hitze und hoher Luftfeuchtigkeit am längsten stabil.

Wie bereits in diesen Studien beschrieben, ist die Verwendung von Trockenmittel in luftdichten Alubeuteln von großer Bedeutung für die Antikörperstabilität. (Mei et al. 2001; Parker et al. 1997; Therrell et al. 1996)

Wir konnten zeigen, dass ohne die Zugabe eines Trockenmittels in den Alubeuteln, der Antikörpergehalt derart abfällt, dass daraus eine falsche Bewertung resultiert.

Die extremste simulierte Bedingung ist eine Temperatur von 45°C und eine hohe Luftfeuchtigkeit. Nach 4 Wochen unter dieser Lagerung stimmen bei VZV nur noch 78,6 %, bei CMV 89,3 %, bei HSV 32,1 % und bei Toxoplasma nur noch 46,4 % mit ihrer initialen Bewertung vor Lagerung überein. Beispielsweise bedeutet das für HSV,

dass von 28 Proben 11 vorher positiv bewertete Proben nach 4 Wochen negativ geworden sind.

Betrachtet man die Ergebnisse unter derselben simulierten Bedingung, jedoch mit Verwendung eines Trockenmittels, wird der Effekt des Trockenmittels deutlich (siehe Tabelle 77,78).

Nach 4 Wochen Lagerung bei 45°C, hoher Luftfeuchtigkeit und mit Trockenmittel werden für VZV 96,4 %, CMV 96,4%, HSV 53,6 % und für Toxoplasma 78,6 % identisch wie vor Lagerung bewertet. Für HSV bedeutet dies 14 richtig positiv bewertete Proben. 3 Proben sind ins Grenzwertige und 5 Proben ins Negative abgesunken.

Tabelle 77: Identisch bewertete Proben in Prozent nach 4 Wochen Lagerung unter der angegebenen Bedingung / Vergleich Lagerung mit und ohne Trockenmittel

	45°C, LF hoch, mit TM	45°C, LF hoch, ohne TM	38°C, LF hoch, mit TM	38°C, LF hoch, ohne TM	8°C, TM
VZV	96,4	78,6	96,4	89,3	100
CMV	96,4	89,3	100	96,4	100
HSV	53,6	32,1	71,4	50,0	85,7
TOXO	78,6	46,4	96,4	67,9	89,3
	45°C, mit TM	45°C, ohne TM	38°C, mit TM	38°C, ohne TM	8°C, TM
VZV	92,9	71,4	92,9	78,6	100
CMV	96,4	92,9	100	96,4	100
HSV	50	42,9	75	57,1	85,7
TOXO	67,9	46,4	82,1	64,3	89,3

4.4 Verifizierung der 4. Hypothese: Der erwartete Abfall des Antikörpertiters ist bei 45 °C höher, als bei 38° oder niedrigerer Temperatur.

Aus unten angegebener Aufstellung ist deutlich der Einfluss der Temperatur auf den Anteil der nach 4 Wochen Lagerung noch identisch bewerteten Proben ersichtlich.

Vergleicht man die Bedingungen 45°C und 38°C miteinander, ist der Unterschied am deutlichsten bei HSV und Toxoplasma sichtbar. Der Temperaturanstieg zwischen 38°C und 45°C führt bei HSV im Mittel zu einem 18,7% geringeren Anteil an identisch bewerteten Proben. Für Toxoplasma sind es 17,9 % (siehe Tabelle 74,75). Für VZV und CMV fallen die Unterschiede geringer aus, da wie oben bereits erwähnt die Probenpanels dieser Erreger sehr viele hoch positive Proben enthalten. Unsere 4. Hypothese konnte also bestätigt werden.

Tabelle 78: Identisch bewertete Proben in Prozent nach 4 Wochen Lagerung unter der angegebenen Bedingung / Vergleich
Lagerungstemperatur 45°C und 38°C

	45°C, LF hoch, mit TM	38°C, LF hoch, mit TM	45°C, LF hoch, ohne TM	38°C, LF hoch, ohne TM	8°C, TM
VZV	96,4	96,4	78,6	89,3	100
CMV	96,4	100	89,3	96,4	100
HSV	53,6	71,4	32,1	50,0	85,7
TOXO	78,6	96,4	46,4	67,9	89,3
	45°C, mit TM	38°C, mit TM	45°C, ohne TM	38°C, ohne TM	8°C, TM
VZV	92,9	92,9	71,4	78,6	100
CMV	96,4	100	92,9	96,4	100
HSV	50	75	42,9	57,1	85,7
TOXO	67,9	82,1	46,4	64,3	89,3

4.5 Falsifizierung der 5. Hypothese: Der Abfall des Antikörpertiters ist bei hoher und bei niedriger Luftfeuchtigkeit annähernd gleich.

Durch die Verwendung von HUMONITOR Indicator Cards konnten wir die Feuchtigkeit in den Alubeuteln messen. Aufgrund der Erfahrungen von Behets et al. (1992) in ihrer Studie "Stability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 antibodies in Whole Blood dried on Filter Paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire" gingen auch wir von Luftfeuchtigkeit als bedeutendem Faktor für Antikörperstabilität aus.

Die Indikatorkarten enthalten wie bereits beschrieben Anzeigekreise mit 30%-, 40%-, 50% - Beschriftung, welche für das Maß an Luftfeuchtigkeit der Umgebung stehen. Anfänglich sind alle Anzeigekreise blau und verändern sich abhängig vom Anstieg der Luftfeuchtigkeit innerhalb der Beutel bis nach Rosa. Ähnlich wie Behets et al. haben wir den Farbumschlag der Anzeigekreise in Level eingeteilt.

Tabelle 79: Einteilung der Feuchtigkeit in Level 1-6

Einteilung der Feuchtigkeit in Level 1 - 6 abhängig von Färbung der Anzeigekreise der Indikatorkarten			
Level	Färbung Anzeigekreis 30%	Färbung Anzeigekreis 40%	Färbung Anzeigekreis 50%
1	blau	blau	blau
2	rosa	blau	blau
3	rosa	lila	blau
4	rosa	lila	violett
5	rosa	rosa	lila
6	rosa	rosa	rosa

Nach 4 Wochen konnte in allen Lagerbedingungen, bei denen kein Trockenmittel verwendet wurde, ein Anstieg der Luftfeuchtigkeit auf Level 4 gemessen werden. Das bedeutet eine Luftfeuchtigkeit von ca. 30 %, bei welcher das Trockenmittel erneuert werden sollte. (Therrell et al. 1996) Alle Bedingungen, die ein Trockenmittel beinhalteten, blieben aufgrund dessen auch nach 4 Wochen auf Level 1 (vgl. Tabelle 80).

Der erwartete Abfall des Antikörpertiters bei hoher Luftfeuchtigkeit konnte in unserer Studie nicht gezeigt werden. Der Abfall bei künstlich erhöhter Luftfeuchtigkeit ist annähernd gleich zu dem bei normaler Umgebungsluftfeuchtigkeit. Unsere 5. Hypothese hat sich als nicht zutreffend herausgestellt.

Bei manchen Konstellationen von Lagerungsbedingungen war der Anteil an identischen Bewertungen nach Lagerung bei hoher Luftfeuchtigkeit sogar höher; z.B. bei allen VZV-Austestungen und bei 3 TOXO-Austestungen.

Es konnte jedoch erneut die Wichtigkeit und Notwendigkeit eines Trockenmittels gezeigt werden.

Die Luftfeuchtigkeit hat einen bedeutenden Einfluss auf die Antikörperstabilität in Dried Blood Spots, jedoch scheint eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit gegenüber einer normalen Raumlufteuchtigkeit keine zusätzliche Verschlechterung der Antikörperstabilität zur Folge zu haben. Vielmehr ist es das Trockenmittel, welches die Antikörperstabilität bei Luftfeuchtigkeit gewährleistet.

Tabelle 80: Identisch bewertete Proben in Prozent nach 4 Wochen Lagerung unter der angegebenen Bedingung;
Vergleich zwischen hoher Luftfeuchtigkeit und Umgebungs-Luftfeuchtigkeit

	45°C, LF hoch, mit TM	Feuchtigkeitslevel	45°C, mit TM	Feuchtigkeitslevel
VZV	96,4	1	92,9	1
CMV	96,4	1	96,4	1
HSV	53,6	1	50	1
TOXO	78,6	1	67,9	1
	45°C, LF hoch, ohne TM	Feuchtigkeitslevel	45°C, ohne TM	Feuchtigkeitslevel
VZV	78,6	4	71,4	4
CMV	89,3	4	92,9	4
HSV	32,1	4	42,9	4
TOXO	46,4	4	46,4	4
	38°C, LF hoch, mit TM	Feuchtigkeitslevel	38°C, mit TM	Feuchtigkeitslevel
VZV	96,4	1	92,9	1
CMV	100	1	100	1
HSV	71,4	1	75	1
TOXO	96,4	1	82,1	1
	38°C, LF hoch, ohne TM	Feuchtigkeitslevel	38°C, ohne TM	Feuchtigkeitslevel
VZV	89,3	4	78,6	4
CMV	96,4	4	96,4	4
HSV	50,0	4	57,1	4
TOXO	67,9	4	64,3	4

4.6 Zusammenfassung

Grund für die Arbeit war die Validierung der in der Literatur beschriebenen Methode zur Bestimmung von Antikörpern aus Dried Blood Spots. Wir wollten eine Möglichkeit aufzeigen, wie Dried Blood Spots zu diagnostischen Zwecken in Tansania verwendet werden können und wie diese dafür zu behandeln sind.

Auch nach 4 Wochen Lagerung unter den härtesten von uns simulierten klimatischen Bedingungen kann in den meisten Fällen noch eine verlässliche Diagnostik erfolgen.

Bei einer Lagerung der Proben bei 8°C in gasdichten Alubeuteln versehen mit einem Trockenmittel wurde in allen Serumpanels keine Probe falsch positiv bewertet. Falsch Grenzwertige oder falsch schwach Positive ergaben sich aufgrund des bei Prüfung von Blutproben zu beobachtenden Backgroundphänomens. Zur Vermeidung von falsch positiven oder grenzwertigen Proben ist deshalb eine veränderte Inkubation der DBS (24 h bei 2-8°C) zu empfehlen.

Diese Modifikation führt zu einer Verbesserung der Spezifität, denn das Backgroundphänomen verhindert häufig eine richtig negative Bewertung.

Die von uns vorgeschlagene Modifikation ist in Laboren mit allgemein gängiger technischer Ausstattung praktikabel.

Wir konnten zeigen, dass ein Transport von DBS in ein diagnostisches Zentrum bei oben genannten Bedingungen, ohne Verlust der diagnostischen Sicherheit für 4 Wochen möglich ist, sodass Proben auch in entlegenen Gebieten entnommen und eingesandt werden können.

Erneut sei auf die Notwendigkeit der Verwendung von Alubeuteln und Trockenmitteln hingewiesen. Von diesen beiden Transportkonditionen hängt die valide Bestimmung der Antikörper aus Dried Blood Spots ab.

4.7 Schlussfolgerung - Möglicher Algorithmus zur Herstellung, Transport und Diagnostik von Dried Blood Spots aufgrund der Erfahrungen in dieser Studie; Beispielhafte Abarbeitung mit einem ELISA classic Kit der Virion\Serion GmbH Würzburg

Die praktische Relevanz aus dieser Arbeit ergibt sich aus einer nach unseren Erkenntnissen modifizierten Abarbeitung eines ELISA classic.

Um die bestmögliche Stabilität des Antikörpergehalts in Dried Blood Spots in afrikanischen Klimabedingungen zu gewährleisten werden Vorschläge zur Lagerung der Proben während Transport und der Inkubationszeiten in der Abarbeitung des ELISA gegeben.

Unsere Vorschläge minimieren den Einfluss extremer Klimabedingungen sowie des Background Phänomen auf die Stabilität des Antikörpertiters in Dried Blood Spots.

Stelle für die periphere Blutentnahme auswählen (Fingerbeere, Ferse oder Ohrläppchen)
Desinfektion mit Hautdesinfektionsmittel
Punktion der Stelle mit steriler standardisierter Einmal-Lanzette
Verwerfen des ersten Blutstropfens
Applikation des 2. Tropfens auf vorgedruckten Kreis des standardisierten Filterpapiers
z.B.: 903® Proteinsaver Card, Whatman
Tropfen soll Kreis komplett ausfüllen;
wenn nicht, sofortige erneute Applikation eines weiteren Tropfens
Dokumentation und Beschriftung



Vollständiges Trocknen des Dried Blood Spots bei Raumtemperatur für 48h unter einer Abdeckung z.B.: DIN A4 Papier
DBS nicht stapeln, nicht erhitzen, nicht direkter Sonneinstrahlung aussetzen



Im Falle der Notwendigkeit eines Transports:
Verpackung der Dried Blood Spots in
luftdichte Alubeutel z.B.: CLIMAPAC 2® Aluminium Verbundfolie Flachbeutel, Flöter
mit einem Trockenmittel z.B.: MiniPax®, Multisorb versehen;
Transport dann in einem handelsüblichen Versandbeutel möglich;
Transport idealerweise in einer Kühlbox (ca. 8°C); Dauer < 4 Wochen
für längerer Lagerung: bei -20°C einfrieren mit Zugabe eines Trockenmittels und
Humonitor Card; übersteigt Feuchtigkeit 30% sollte das Trockenmittel erneuert werden
(Therrell et al. 1996)



Mit Handstanze 1 Plättchen (Ø 3,1 mm)
je Antikörperbestimmung ausstanzen
und direkt mit Pinzette in eine Kavität der Antigen-beschichteten ELISA-
Mikrotiterplatte geben
Modifizierte Abarbeitung gemäß Arbeitsanleitung des ELISA
die nicht verwendeten DBS lagern für evtl. weitere Austestungen wie oben beschrieben



Zugabe von 100µl ELISA des kitspezifischen Verdünnungspuffers



Inkubation 24h / 2-8°C / feuchte Kammer



Ausleeren der Kavitäten inkl. DBs durch Ausklopfen der MTP



Waschen mit 300µl kitspezifischer ELISA Waschlösung / 4 Zyklen



Zugabe des kitspezifischen ELISA Konjugats / 100µl

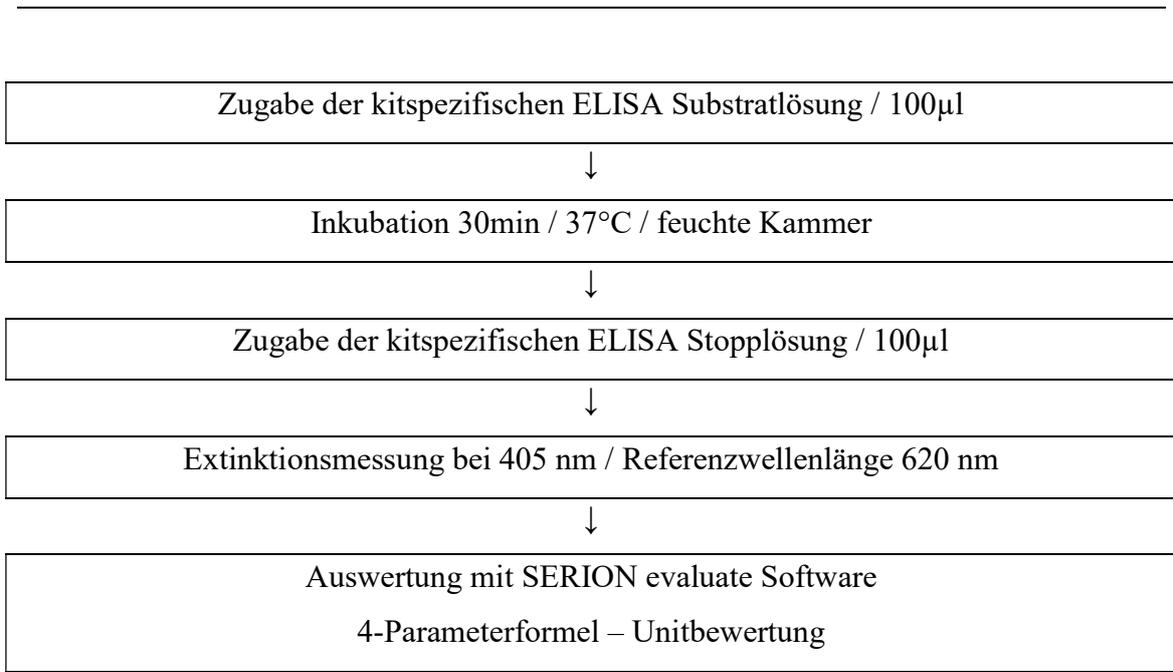


Inkubation 30min / 37°C / feuchte Kammer



Waschen mit 300µl kitspezifischer ELISA Waschlösung / 4 Zyklen





5 Referenzen

AppliChem GmbH, Darmstadt: Produktinformation EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat Biochemica. AccessDate April 2013; Hg. v. AppliChem GmbH. Darmstadt. Online verfügbar unter http://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/a1104_de.pdf.

Arastéh, K.; Müller, M. (2005): Prophylaxen Opportunistischer Infektionen, Stand 07/2005. Hg. v. Robert Koch Institut. Berlin. Access Date April 2013; Online verfügbar unter www.rki.de.

Behets, F.; Kashamuka, M.; Pappaioanou, M.; Green, T. A.; Ryder, R. W.; Batter, V. et al. (1992): Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. In: *J. Clin. Microbiol.* 30 (5), S. 1179–1182.

Bio-Rad Laboratories Headquarters (2008): PLATELIA™ TOXO IgM Neonatal Assay Arbeitsanleitung. Hg. v. Bio-Rad Laboratories Headquarters. Hercules, California, USA.

Condorelli, F.; Scalia, G.; Stivala, A.; Gallo, R.; Marino, A.; Battaglini, C. M.; Castro, A. (1994): Detection of immunoglobulin G to measles virus, rubella virus, and mumps virus in serum samples and in microquantities of whole blood dried on filter paper. In: *J. Virol. Methods* 49 (1), S. 25–36.

Ghebremichael, Musie; Habtzgi, Desale; Paintsil, Elijah (2012): Deciphering the epidemic synergy of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection among women in sub-Saharan Africa. In: *BMC Res Notes* 5, S. 451.

Guthrie, R.; Susi, A. (1963): A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in large populations of newborn infants. In: *Pediatrics* 32, S. 338–343.

Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger; Geginat, Gernot (2005): Medizinische Mikrobiologie. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme. S. 224-229.

Hogrefe, Wayne R.; Ernst, Carolyn; Su, Xin (2002): Efficiency of reconstitution of immunoglobulin g from blood specimens dried on filter paper and utility in herpes simplex virus type-specific serology screening. In: *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9 (6), S. 1338–1342.

Institut Virion\Serion GmbH (2008): ELISA classic Arbeitsanleitung. Hg. v. Institut Virion\Serion GmbH. Würzburg.

Karl-Heinz Hein-Rothenbücher; Executive Director of the Medical Mission Institute Würzburg (2008): Cooperation between Bugando Medical Centre; Bugando University College of Health Sciences, Mwanza, Tanzania and Medical Mission Institute (MMI) / Medical Mission Hospital (MMK), Würzburg, Germany. Hg. v. Karl-Heinz Hein-Rothenbücher ; Executive Director of the Medical Mission Institute Würzburg.

Löffler, G.; Heinrich, P.C; Petrides, P.E (2007): Biochemie und Pathobiochemie. 8.Aufl. Springer London, Limited. S.497-503. Online verfügbar unter <http://books.google.de>.

Mei, J. V.; Alexander, J. R.; Adam, B. W.; Hannon, W. H. (2001): Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. In: *J. Nutr.* 131 (5), S. 1631S-1636S.

Mercader, Sara; Featherstone, David; Bellini, William J. (2006): Comparison of available methods to elute serum from dried blood spot samples for measles serology. In: *J. Virol. Methods* 137 (1), S. 140–149.

Novello, F.; Ridolfi, B.; Fiore, L.; Buttinelli, G.; Medda, E.; Favero, A. et al. (1996): Comparison of capillary blood versus venous blood samples in the assessment of immunity to measles. In: *J. Virol. Methods* 61 (1-2), S. 73–77.

Parker, S. P.; Cubitt, W. D. (1999): The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. In: *J. Clin. Pathol.* 52 (9), S. 633–639.

Parker, S. P.; Cubitt, W. D.; Ades, A. E. (1997): A method for the detection and confirmation of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spots. In: *J. Virol. Methods* 68 (2), S. 199–205.

Punnarugsa, V.; Mungmee, V. (1991): Detection of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies in whole blood on Whatman paper: comparison with detection in sera. In: *J. Clin. Microbiol.* 29 (10), S. 2209–2212.

Raem, Arnold M.; Rauch, Peter (2007): Immunoassays. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum. S.51-69.

Rauch, Peter; Dankbar, Nico; Specht, Christoph; Sperling, Detlef (2005): Assayoptimierung: Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden. Sonderdruck aus *Laborwelt*; Nr.4 / 2005 -Vol. 6, S.33-39; Hg. v. BIOCUM AG (Berlin). Online verfügbar unter www.laborwelt.de.

Riddell, M. A.; Leydon, J. A.; Catton, M. G.; Kelly, H. A. (2002): Detection of Measles Virus-Specific Immunoglobulin M in Dried Venous Blood Samples by Using a Commercial Enzyme Immunoassay. In: *Journal of Clinical Microbiology* 40 (1), S. 5–9.

Robert Koch Institut (2012): HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung Epidemiologische Kurzinformation des Robert Koch-Instituts, Stand Ende 2012. Hg. v. Robert Koch Institut. Berlin. Online verfügbar unter www.rki.de.

Roche Diagnostics Deutschland GmbH: cOmplete ULTRA Tablets, Produktinformation online. Access Date April 2013; Hg. v. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Online verfügbar unter <https://www.roche-applied-science.com>

Rowell, Vibeke (2001): Solid phase Guide. 2. Aufl. Roskilde. Produktinformation NUNC, Brand products.

Schulz, K.L (2010): Funktionelle und strukturelle Veränderungen der mitochondrialen Funktion bei Tauopathien. Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main. Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie.

Steger, K. A.; Craven, D. E.; Shea, B. F.; Fitzgerald, B. R.; Schwerzler, M.; Seage, G. R.; Hoff, R. (1990): Use of paper-absorbed fingerstick blood samples for studies of antibody to human immunodeficiency virus type 1 in intravenous drug users. In: *J. Infect. Dis.* 162 (4), S. 964–967.

Therrell, B. L.; Hannon, W. H.; Pass, K. A.; Lorey, F.; Brokopp, C.; Eckman, J. et al. (1996): Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. In: *Biochem. Mol. Med.* 57 (2), S. 116–124.

Whatman International Ltd, Kent United Kingdom (Hg.) (2008): WHATMAN®, Whatman Neonatal Screening Cards-Capabilities. Produktinformation 2008. Whatman International Ltd, Kent, United Kingdom.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. A. Stich danken für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit, für sein offenes Ohr für meine Ideen und Änderungsvorschläge und für die entspannte Zusammenarbeit.

Weiterhin vielen Dank den Mitarbeitern der tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik Würzburg für den immer freundlichen und hilfsbereiten Umgang.

Vielen Dank meinen Kolleginnen und Kollegen der Institut Virion\Serion GmbH Würzburg, die stets meine Arbeit unterstützt haben und ohne die der reibungslose Ablauf und Erfolg meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre; v.a. Günter Koppatz und Dr. Ilona Kühlmann für ihre Erfahrung und Ideen, Stefanie Kreßmann, Angela Meier Salimi, Eva Knappik, Meike Drung, Linda Vogt, Francesca Caravaggio, Kerstin Siegmann, Dr. Michael Kerner, Matthias Pojar.

Vielen Dank meinen Eltern, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung und Hilfe, sowohl finanziell als auch in sämtlichen Belangen erst ermöglicht haben.

Curriculum Vitae

Frank Bernard

* 12.01.1980 in Erlenbach am Main

Ärztliche Tätigkeit:

01/2012- Assistenzarzt der HNO-Klinik des Städtischen Klinikums
Karlsruhe
Chefarzt Prof. Dr. med. W. Heppt

Ausbildung:

04/2005–05/2011 Studium Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Praktisches Jahr:

Tertial Chirurgie – Hosp.Universitari Sagrat Cor, Universidad de
Barcelona

Tertial Innere Medizin - Hosp.Universitari Sagrat Cor,
Universidad de Barcelona

Tertial Neurologie – Klinikum Aschaffenburg

2001 – 2011 Ausbildung und Anstellung als Biologielaborant der Institut
Virion\Serion GmbH Würzburg, während Studium als
Nebentätigkeit

Sonstiges

Fremdsprachen Englisch, Spanisch, Französisch

Interessen Musik, Bücher, Reisen

Karlsruhe, November 2016