

Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Solbach

Die Durchlässigkeit einer Dialysemembran für Hepatitis B und C Viren

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Henrike Heiling
aus Halle/Saale
Lübeck 2005



1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Helge Ohgke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Maria Rob

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2005
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.09.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
-Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhalt

I. Einleitung

| | | |
|-------|---|-------|
| 1.1 | Problem und Fragestellung | S. 6 |
| 1.2 | Die Dialyse | S. 6 |
| 1.2.1 | Dialysatoren und Dialysemembranen | S. 7 |
| 1.2.2 | Dialysierflüssigkeit | S.11 |
| 1.3 | Probleme während der Dialyse | S.11 |
| 1.3.1 | Bakterien | S.11 |
| 1.3.2 | Viren | S. 12 |

II. Methodik

| | | |
|---------|--|-------|
| 2.1 | Geräte | S. 15 |
| 2.2 | Beschreibung der Membran | S. 15 |
| 2.3 | Herkunft und Anzahl der Seren | S. 15 |
| 2.4 | Darstellung des Vorgangs | S. 17 |
| 2.5 | Prinzipien der Probennahme und standardisierte Konditionen... | S. 19 |
| 2.5.1 | Leerwert | S. 20 |
| 2.5.2 | Adsorptionskontrolle | S. 20 |
| 2.6 | Ablauf der einzelnen Filtrationsversuche | S. 21 |
| 2.7 | Prinzip der Nachweismethoden | S. 23 |
| 2.7.1 | Qualitative und quantitative RT – PCR zur Detektion von HCV RNA (COBAS Amplicor HCV Monitor Test, v2.0) | S. 23 |
| 2.7.2 | „nested“ - PCR zur Detektion von HBV DNA, qualitativ | S. 24 |
| 2.7.2.1 | Basensequenz der Primer | S. 25 |
| 2.7.3 | Gelelektrophorese | S. 26 |
| 2.8 | Validierung der Methoden | S. 26 |

III. Ergebnisse

| | | |
|-------|---|-------|
| 3.1 | Ergebnisse der HCV - Vorversuche 1 und 2 | S. 28 |
| 3.2 | Ergebnisse für die Durchlässigkeit einer Dialysemembran gegenüber HCV | S. 29 |
| 3.2.1 | Filtrat | S. 29 |
| 3.2.2 | Adsorptionskontrolle | S. 30 |
| 3.2.3 | Verdünnungsprobe | S. 31 |
| 3.2.4 | Leerwert | S. 32 |
| 3.3 | Ergebnisse für die Durchlässigkeit einer Dialysemembran gegenüber HBV | S. 32 |
| 3.3.1 | Filtrat | S. 32 |
| 3.3.2 | Adsorptionskontrolle | S. 33 |
| 3.3.3 | Leerwert | S. 34 |
| 3.4 | Sichtbar machen der Amplifikationsprodukte der HBV Versuche mittels Gelelektrophoresefotos | S. 34 |

IV. Diskussion

| | | |
|-----|---|-------|
| 4.1 | Hauptergebnisse | S. 38 |
| 4.2 | Was spricht für eine Übertragung von HCV und HBV über eine Dialysemembran? | S. 39 |
| 4.3 | Was spricht gegen eine Übertragung von HCV und HBV über eine Dialysemembran? | S. 41 |
| 4.4 | Ausblick | S. 42 |

| | |
|--------------------------|-------|
| V. Zusammenfassung | S. 44 |
|--------------------------|-------|

| | |
|--------------------------------|-------|
| VI. Literaturverzeichnis | S. 46 |
|--------------------------------|-------|

VII. Anhang

| | | |
|-----|-----------------------------|-------|
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | S. 50 |
| 7.2 | Tabellenverzeichnis | S. 51 |
| 7.3 | Abbildungsverzeichnis | S. 53 |
| 7.4 | Anhang – Geräte | S. 54 |

| | |
|------------------------|-------|
| VIII. Danksagung | S. 56 |
|------------------------|-------|

| | |
|------------------|-------|
| Lebenslauf | S. 57 |
|------------------|-------|

I. Einleitung

1.1 Problem und Fragestellung

Nach Behandlung eines Dialysepatienten, der mit Hepatitis B (HBV) oder C (HCV) infiziert ist, können nicht nur die Blut führenden Teile, sondern auch die Wasser führenden Teile des Dialysegeräts kontaminiert sein. Der nächste Patient, welcher an diesem Gerät behandelt wird, kann infiziert werden. Man muss annehmen, dass eine Passage der Viren durch die Dialysemembran möglich ist.

Heutzutage werden neue Filter mit synthetischen Dialysemembranen verwendet. Die Poren dieser Membranen sind optimal 0,001 bis 0,01 μm groß und damit deutlich kleiner als Viren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Dialysefiltermembran auf ihre Durchlässigkeit für HCV und HBV zu testen. Die Viren sollten anhand ihres Genoms molekularbiologisch nachgewiesen werden.

Es sollte ermittelt werden:

1. Inwieweit diese Dialysemembran ein mögliches Leck für HCV und HBV darstellt und ob die Dialysegeräte auf diesem Weg mit Viren kontaminiert werden können und somit eine horizontale Übertragung von Patient zu Patient stattfindet.
2. Ob betriebs- und patientenbedingte Voraussetzungen existieren, unter denen eine mögliche Durchlässigkeit von Viren durch die Membran unterstützt wird.
3. Inwieweit die adsorptive Bindung von HCV und HBV an die Membran eine entscheidene Rolle bei der möglichen Filtration von Viren vom Blutkompartiment in die Dialysierflüssigkeit spielt.

1.2 Die Dialyse

In Deutschland gibt es ca. 50.000 dialysepflichtige Patienten. 2001 wurden

weltweit rund 1.1 Millionen Patienten dialysiert. Nach Lysaght (2002) wird angenommen, dass die Population der Dialysepatienten weltweit jährlich um 7% ansteigt. Danach würden 2010 rund 2 Millionen Patienten eine Dialysetherapie benötigen. Die Nierendialysebehandlung ist nach der Nierentransplantation die zweitbeste Möglichkeit, die exkretorische Funktion der Niere zu ersetzen. Zurzeit stehen für die Nierentransplantation zu wenig Spenderorgane zur Verfügung.

Die akute und die terminale Niereninsuffizienz sind Indikationen für eine Dialysetherapie. Zusätzlich kann die Dialyse bei der Entgiftung dialysierbarer Substanzen aus dem Blut eingesetzt werden. Nach Ploth et al. (2003) hat sich die Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz innerhalb der letzten zehn Jahre verdoppelt. Weltweit ist dieser Anstieg vor allem mit der erhöhten Lebenserwartung und den damit verbundenen Erkrankungen, vor allem Arteriosklerose, Diabetes mellitus Typ 2 und den Folgeerscheinungen (z.B. Nephropathie) zu erklären (Fillastre, 1999; Manes et al., 1999).

1.2.1 Dialysatoren und Dialysemembranen

Dialysatoren sind Schnittstellen zwischen dem Blutkreislauf und der Dialysierflüssigkeit.

Es existieren Hohlfaser- und Plattendialysatoren (siehe Abbildungen 1 bis 4). Beide Dialysatortypen werden in der Klinik gleichwertig eingesetzt (Nowack et al., 2002). Hohlfaserdialysatoren besitzen kapillarähnliche Membranen, die in Bündeln zusammengefasst sind. Die Plattendialysatoren haben breite, schlauchähnliche Membranen. Diese Membranen sind in mehreren Lagen parallel zueinander angeordnet (Franz et al., 1990).

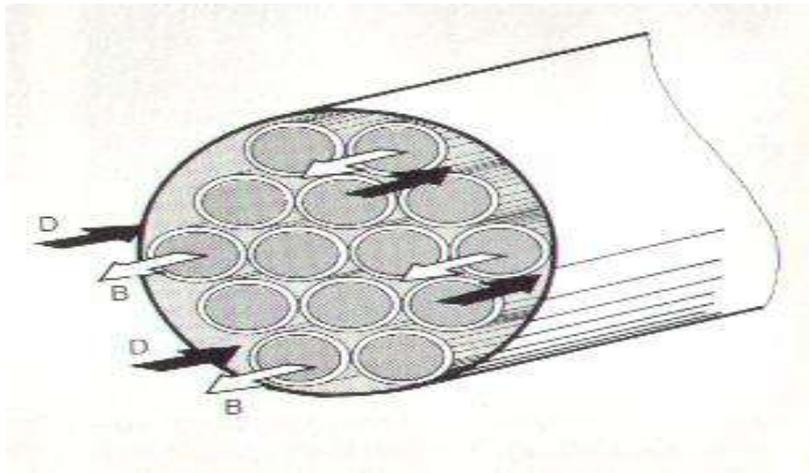


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Hohlfaserdialysators im Querschnitt (aus Franz et al., 1990)

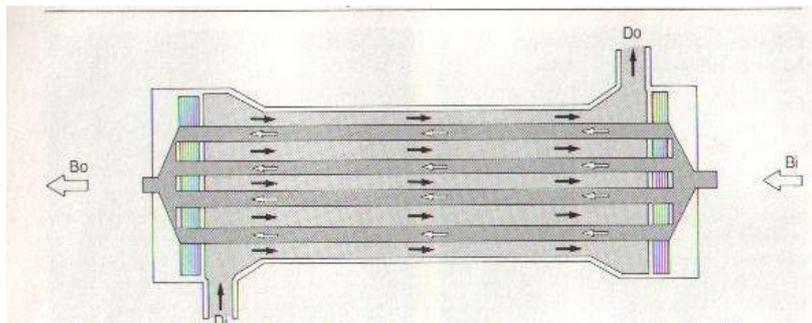


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Hohlfaserdialysators im Längsschnitt (aus Franz et al., 1990)

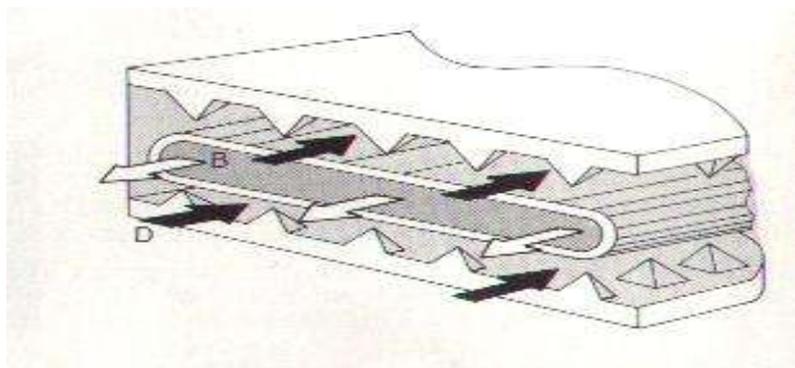


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Plattendialysators im Querschnitt (aus Franz et al., 1990)

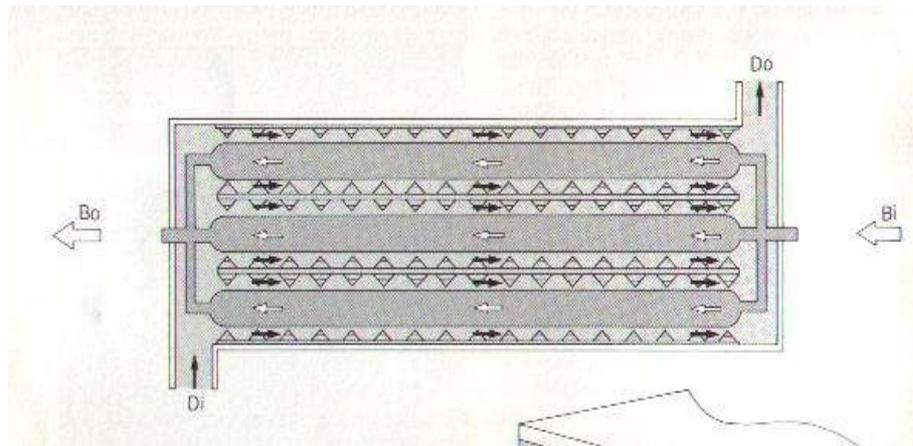


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Plattendialysators im Längsschnitt (aus Franz et al., 1990)

Die Abkürzungen in den Abb. 1-4 bedeuten:

| | |
|----------------------|---------------------------------------|
| Bi: Bluteinfluss | Di: Dialysierflüssigkeiteinfluss |
| Bo: Blutausfluss | Do: Dialysierflüssigkeitausfluss |
| B: Blutflussrichtung | D: Dialysierflüssigkeitsflussrichtung |

Das Blut und die Dialysierflüssigkeit strömen in Hohlfaser- und Plattendialysatoren im Gegenstrom aneinander vorbei. Sie sind voneinander durch die semipermeable Dialysemembran getrennt (Franz et al., 1990). Der Stoffaustausch zwischen dem Blut und der Dialysierflüssigkeit erfolgt per Diffusion, Ultrafiltration und Konvektion.

Es existieren biologische und synthetische Membranen. Die biologischen Membranen basieren auf einem natürlichen Polymer, der Baumwollzellulose. Zu ihnen zählen die Cuprophan-, Hemophan- und Zellulose-triacetatmembranen. Die biologischen Membranen werden heutzutage mehr und mehr durch die synthetischen Membranen ersetzt. Diese bestehen aus polymeren Kunststoffen (z.B. Polysulfon, Polyamid, Polyacrylnitrile) (Vienken und Bowry, 2002). Die Vorteile der synthetischen gegenüber den biologischen Membranen liegen in der erhöhten Durchlässigkeit für Wasser und große Moleküle. Des Weiteren ist ihre Oberfläche hydrophob, außerdem besitzen sie adsorptive Eigenschaft für Proteine (Nowack et al., 2002). Die Adsorption wurde erst vor kurzem als Mechanismus zur Bindung von Proteinen an die Membran während der Dialyse anerkannt (Cheung und Leypoldt, 1997).

Aufgrund der Durchlässigkeit für verschieden große Moleküle unterscheidet man

Low-flux-Membranen und High-flux-Membranen. Low-flux-Membranen weisen eine Permeabilität für Moleküle mit einem Molekulargewicht bis ca. 5.000 Dalton auf. High-flux-Membranen weisen eine Permeabilität für Moleküle mit einem Molekulargewicht bis ca. 50.000 Dalton auf. Als High-flux-Membranen werden aufgrund ihrer Eigenschaften vor allem synthetische Membranen verwendet (Nowack et al., 2002).

Die Effektivität des Stoffaustausches über die Dialysemembran ist von der Porengröße, der Membranoberfläche in Quadratmetern, der Porenanzahl je Quadratmeter und der Molekülgröße abhängig (Franz et al., 1990). Die Effektivität einer Membran kann anhand der Messung der Clearance eines zu eliminierenden Stoffes bestimmt werden.

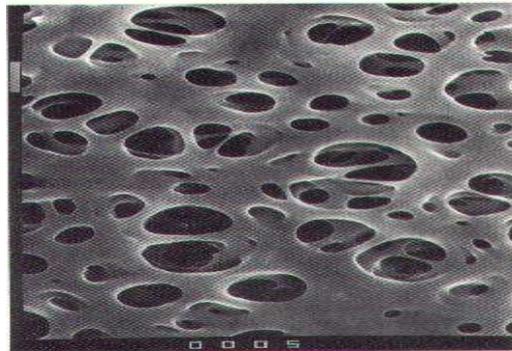


Abb. 5: Poren einer asymmetrischen Polysulfondialysemembran (aus Franz et al., 1990)

Es gibt symmetrische und asymmetrische Membranen. Symmetrische Membranen sind über die gesamte Membrandicke homogen aufgebaut. Die asymmetrischen Membranen besitzen meistens eine dünnere Innenschicht zur Blutkompartimentseite und eine großporige Außenschicht (Nowack et al., 2002). Die Mikroporen sind im Durchschnitt 1 nm groß. Eine einheitliche Porengröße ist heutzutage noch nicht möglich. Die Porengröße folgt der Gauss-Normalverteilung mit einem Optimum von 0,001 bis 0,01 μm . Es existieren aber auch Riesenlöcher oder Nadelstichlöcher, sogenannte „Pinholes“ (üblicher Begriff, daher wird dieser auch weiterhin verwendet) (Franz et al., 1990).

1.2.2 Die Dialysierflüssigkeit

Während einer Dialysesitzung werden bis zu 150 Liter Dialysierflüssigkeit verbraucht. Sie ist isotonisch / isoionisch und enthält Elektrolyte, Glukose und Puffer. Die Konzentrationen der Elektrolyte und Puffer bestimmt die Richtung der Diffusion über die Dialysemembran (Nowack et al., 2002). Zu Therapiezwecken können auch Konzentrationsänderungen der Salze der Dialysierflüssigkeit eingesetzt werden, z.B. zum Ausgleich einer Hypokaliämie (Pastan und Bailey, 1998). Neben der Zusammensetzung der Dialysierflüssigkeit ist auch die Temperatur von Bedeutung. Sie sollte annähernd Körpertemperatur, also 36-37°C betragen.

1.3 Probleme während der Dialyse

1.3.1. Bakterien

Während oder nach der Dialyse können bei Dialysepatienten Unwohlsein, aber auch Fieberschübe auftreten, bedingt durch Endotoxine in der Dialysierflüssigkeit. Es finden sich bei Untersuchungen der Dialysierflüssigkeit und des Wassers hauptsächlich Gram negative Bakterien (z.B. Pseudomonaden, Serratia), aber auch Gram positive Vertreter (z.B. Staphylococcus aureus). Es versteht sich, dass diese Bakterien die Membran nicht als Ganzes penetrieren, dafür sind sie um ein Vielfaches zu groß (Vaslaki et al., 2000; Weber et al., 2000). Es ist aber bekannt, dass Bestandteile der Bakterienzellwände, die Endotoxine, die Membran passieren können (Vaslaki et al., 2000). Daher gibt es für die Dialysierflüssigkeit und das Wasser zum Verdünnen konzentrierter Hämodialyselösung auch Richtlinien (Deutsches Arzneibuch 1998) hinsichtlich des Endotoxingehalts. Dieser darf nicht größer als 0,25 EU/ml sein. Für die mikrobielle Verunreinigung gilt, es dürfen höchstens 100 Mikroorganismen/ml enthalten sein (Deutsches Arzneibuch,

1998).

Dialysegeräte können an mehreren Stellen mit Ultrafiltern ausgerüstet sein, welche pyrogen-zurückweisende Membranen haben. Diese Ultrafilter liefern eine hochgereinigte, sterile Dialysierflüssigkeit. Diese Dialysierflüssigkeit erfüllt noch höhere Anforderungen hinsichtlich des Endotoxingehalts (nicht größer als 0,03 EU/ml) als nach DAB erforderlich (Vaslaki et al., 2000).

Während der Dialyse müssen zur Wahrung der Gesundheit des Patienten und des Personals hohe hygienische Maßstäbe angelegt und eingehalten werden. Die Dialysatoren stehen als Einwegmaterialien im sterilen Zustand zur Verfügung. Sie können jedoch bei adäquater Reinigung und Sterilisation für den selben Dialysepatienten wieder verwendet werden (Nowack et al., 2002).

Es sollte zur Herstellung der Dialysierflüssigkeit nur absolut reines Wasser verwendet werden. Es wird empfohlen, dass während der Dialyse ein kontinuierlicher Wasserzulauf und ein kontinuierlicher Dialysierflüssigkeitsdurchlauf im Gerät erfolgen (Nowack et al., 2002). Lebedo empfiehlt, dass das gesamte Wasser- und Dialysierflüssigkeitssystem regelmäßig gereinigt und desinfiziert werde, um der Entstehung eines Biofilms vorzubeugen (1999).

Das Bikarbonatkonzentrat zur Herstellung der Pufferlösung stellen ebenfalls ideale Medien für Mikroorganismen dar. Daher wird empfohlen, dass das Bikarbonat in Pulverform gelagert und erst unmittelbar vor der Dialyse aufgelöst werden sollte (Ledebo, 1999). Während der Dialyse sollte, nach weiteren Empfehlungen, ein Ultrafilter benutzt werden (Canaud et al., 2000).

1.3.2 Viren

Dialysepatienten tragen während der Dialysebehandlung ein erhöhtes Risiko, sich mit parenteral übertragbaren Viren zu infizieren. In Deutschland werden heute alle Blutkonserven unter anderem auf HBV und HCV mittels PCR überprüft. Dadurch sollen Infektionen auf diesem Weg vermieden werden. Außerdem werden Dialysepatienten Impfungen empfohlen (z.B. gegen HBV). Es sind heutzutage weniger Bluttransfusionen nötig, da Dialysepatienten mit Erythropoetin behandelt

werden können. Bekannte HCV oder HBV Patienten werden in einigen Dialysestationen räumlich getrennt behandelt (Nowack et al., 2002). Des Weiteren sind vom Personal die Vorsichtsmaßnahmen bei diesem Patienten, deren Blut und den Dialysegerätschaften einzuhalten.

Die Prävalenz von HCV in deutschen Dialyseeinrichtungen unter Dialysepatienten rangiert von 15-30% (Grethe et al., 2000). Die Prävalenz von HBV in deutschen Dialysestationen beträgt im Durchschnitt rund 4,6% (Burdick et al., 2003). Im Vergleich dazu lag die Prävalenz von HCV-Antikörpern in der Normalbevölkerung in Deutschland bei 0,4%, von HBV bei 7,0% und von HbsAg bei 0,6%. (Gürtler, 2002; Thierfelder et al., 2001)

Damit liegt die Prävalenz von HCV bei Dialysepatienten höher als in der Normalbevölkerung. Außerdem zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit einer HCV- oder HBV-Infektion bei Dialysepatienten während der Langzeitdialysebehandlung zunimmt (Hosokawa et al., 2000).

In mehreren Studien fanden sich gehäuft Dialysepatienten, bei denen kein eindeutiger Übertragungsweg eruiert werden konnte (Machida et al., 1992; Jadoul et al., 1993; Caramelo et al., 1999). Daraufhin wurden mögliche Transmissionswege erforscht. Es wurde untersucht, inwieweit Hygienestandards eingehalten wurden. Das Blut der Dialysepatienten wurden mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Recombinant immunoblot assay (RIBA) und PCR auf HCV und HBV untersucht. Es wurde versucht, phylogenetische Stammbäume hinsichtlich der HCV- oder HBV-Infektionen innerhalb einer Dialysestation zu erstellen (Kokuba et al., 2002; Grethe et al., 2000; Hosokawa et al., 2000; Fabrizi et al., 1999). Mit all diesen Studien und Untersuchungen wurde versucht, einen plausiblen Transmissionsweg innerhalb einer Dialysestation zu ermitteln. Dabei wurden die Patienten, das Personal, die Dialysegeräte und das Dialysezubehör untersucht. Die Untersuchung der Dialysemembranen ergab widersprüchliche Aussagen hinsichtlich des Infektionswegs für Viren. Eine Transmission durch die Membran konnte bis jetzt nicht ausgeschlossen werden, aber auch nicht bewiesen werden.

Fabrizi et al. (1999) meinte, dass es schon während der Produktion der Membranen zu Mikrofrakturen kommen kann. Des Weiteren wird auf die unterschiedliche Porengröße hingewiesen. Auch während des Dialysevorgangs kann es möglicherweise zu Beschädigungen der Membran und zur Kontamination der Dialysegeräte kommen. Bei dem geringen Mengen, für eine Infektion

ausreichend, lösen Blutleckdetektoren keinen Alarm aus.

Es bestände daher die Möglichkeit, dass Viren über das Schlauchsystem der Dialysegeräte in das Blut der Dialysepatienten gelangen.

II. Methodik

2.1 Geräte

Eine Liste der verwendeten Geräte befindet sich im Anhang.

2.2 Beschreibung der Membran

Es wurden Nikkiso Medical Einmalpyrogenfilter EFL-015 benutzt. Die Membran des Filters besteht aus Polyester-Polymer Alloy (Legierung). Der Begriff Alloy bezeichnet die Kombination der synthetischen Polymere Polyarylat-Resin (Harz) und Polyether-Sulfon-Resin. Es ist eine asymmetrische Membran (Mahiout, 2000). Die verwendeten Filter wiesen ein kleineres internes Volumen auf als üblicherweise während der Dialyse für Erwachsene benutzte Filter. Diese Filter werden vorzugsweise in der Kinderdialyse benutzt. Daher kam es zu einer geringeren Verdünnung innerhalb des Filters. Bei Benutzung eines üblichen Filters an einem realen Dialysegerät würden zur Verdünnung eines Filtrats 2-3 l Dialysierflüssigkeit benötigt. Die Blutmenge außerhalb des Körpers im extrakorporalen System (Dialysator, zu- und abführendes Schlauchsystem) während einer Dialyse würden rund 300 – 400 ml Blut betragen (Nowack et al., 2002).

2.3 Herkunft und Anzahl der Seren

Das Ausgangsmaterial für die Filtration durch die Membran setzte sich aus 15 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 1,5-2 ml Serum zusammen.

Das Serum war Patientenmaterial. Es war im Vorfeld der Arbeit im Rahmen klinischer Diagnostik auf HCV oder HBV untersucht worden. Es wurde nur Serum verwendet, welches eindeutig HCV oder HBV positiv war. Nach abgeschlossener Labordiagnostik wurde das Patientenmaterial bei -80°C eingefroren. Diese Proben (Patientenmaterial) wurden im Rahmen der Arbeit verwendet. Jede Probe wurde erstmals für den jeweiligen Filtrationsvorgang aufgetaut. Es wurden 12 HCV und 5 HBV positive Patientenserum verwendet.

Tab. 2-1: Charakterisierung des HCV-Ausgangsmaterials: Aus der Tabelle ist ersichtlich, welche HCV-Belastung im Dialysator vorlag

| Probennr. | HCV RNA copies/ml (1) | eingesetzte Menge Serum in ml | eingesetzte Menge NaCl für Spülung in ml (2) | NaCl Menge eingerechnet in Verdünnung in ml (3) | Verdünnung Serum zu NaCl (4) |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|--|---|------------------------------|
| 1 | ca. 1 000 000 | 2 | 20 | 35 | 1 zu 17,5 |
| 2 | ca. 1 000 000 | 1,5 | 40 | 55 | 1 zu 37 |
| 3 | ca. 800 000 | 2 | 5 | 20 | 1 zu 10 |
| 4 | ca. 800 000 | 2 | 20 | 35 | 1 zu 17,5 |
| 5 | ca. 1 000 000 | 2 | 40 | 35 | 1 zu 17,5 |
| 6 | ca. 1 000 000 | 1,5 | 40 | 25 | 1 zu 16,6 |
| 7 | ca. 1 104 000 | 2 | 40 | 27 | 1 zu 13,5 |
| 8 | ca. 996 000 | 2 | 40 | 28 | 1 zu 14 |
| 9 | ca. 4 910 000 | 2 | 40 | 21 | 1 zu 10,5 |
| 10 | ca. 5 320 000 | 1,5 | 40 | 20 | 1 zu 13,3 |
| 11 | ca. 4 040 000 | 2 | 40 | 23 | 1 zu 11,5 |
| 12 | ca. 4 280 000 | 2 | 40 | 22 | 1 zu 11 |

(1): HCV RNA in copies/ml im unverdünnten Ausgangsmaterial

(2): Menge NaCl in ml für Spülung des Filters vor der eigentlichen Filtration

(3): NaCl Anteil in der Verdünnungsprobe des Ausgangsmaterials

(4): theoretische Verdünnung: eingesetzte Menge Serum in ml : NaCl Menge eingerechnet in Verdünnung in ml

Tab. 2-2: Charakterisierung des HBV-Ausgangsmaterials: Aus der Tabelle ist ersichtlich, welche HBV-Belastung im Dialysator vorlag

| Probennr. | HBV DNA in pg/ml (1) | eingesetzte Menge Serum in μl | eingesetzte Menge NaCl für Spülung in ml (2) | NaCl Menge eingerechnet in Verdünnung in ml (3) | Verdünnung Serum zu NaCl (4) |
|-----------|----------------------|--|--|---|------------------------------|
| 1 | 3 | 100 | 20 | 25 | 1 zu 250 |
| 2 | 4 100 | 200 | 20 | 23 | 1 zu 115 |
| 3 | > 8 100 | 400 | 40 | 22 | 1 zu 55 |
| 4 | 370 | 400 | 40 | 21 | 1 zu 52,5 |
| 5 | 8 000 | 400 | 40 | 22,5 | 1 zu 56,25 |

- (1): HBV DNA in pg/ml im unverdünnten Ausgangsmaterial
- (2): Menge NaCl in ml für Spülung des Filters vor der eigentlichen Filtration
- (3): NaCl Anteil in der Verdünnungsprobe des Ausgangsmaterials
- (4): theoretische Verdünnung: eingesetzte Menge Serum in μl : NaCl Menge eingerechnet in Verdünnung in ml

2.4 Darstellung des Vorgangs

Die folgenden Abbildungen stellen den Versuchsaufbau dar. An die Spritze C wurde über einen Dreiwegehahn ein Druckmessgerät angeschlossen.



Abb. 6: Versuchsaufbau

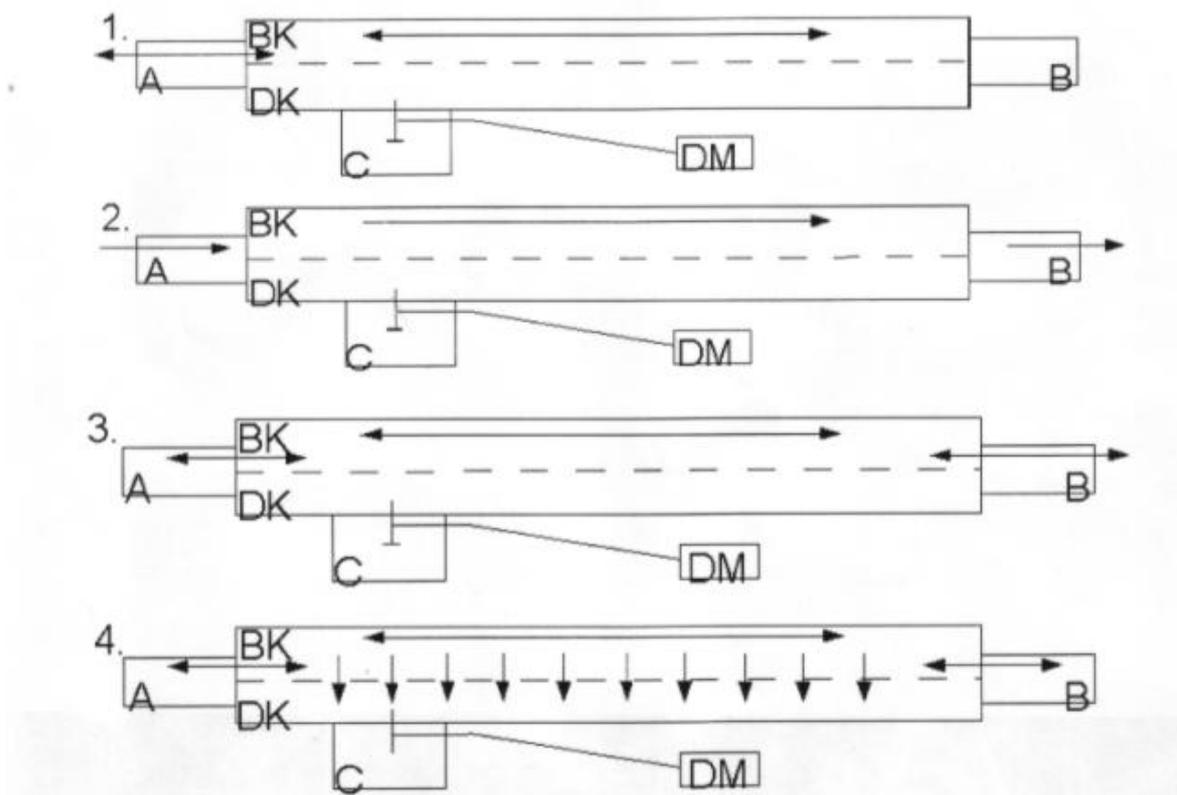


Abb. 7: Schematische Darstellung des Filtriervorgangs

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| A: Spritze A | I: Dreiwegehahn |
| B: Spritze B | Dm: Druckmessgerät |
| C: Spritze C | - - -: Dialysemembran |
| BK: Blutkompartiment | DK: Dialyseflüssigkeitskompartiment |

1. Eingabe und Abzug von 5 – 40 ml NaCl über Ausgang A, welches zum Benetzen der Membran von der Blutkompartimentseite aus verwendet wurde
2. Eingabe verdünntes Ausgangsmaterial über Ausgang A, einmaliger Durchlauf innerhalb des Blutkompartiments von Ausgang A nach Ausgang B, dann Abnahme einer Verdünnungsprobe am Ausgang B
3. Mehrmaliges Verschiebung innerhalb des Blutkompartiments zwischen den Ausgängen B und A (wiederholend), Abnahme einer Adsorptionskontrolle über Ausgang A
4. Weitere kontinuierliche Verschiebung des Materials zwischen den Ausgängen

gen A und B im Blutkompartiment, Öffnung des Dreiwegehahns, Schaffung eines Unterdrucks, kontinuierliche Kontrolle des Drucks über das angeschlossene Druckmessgerät, Filtration über die Membran ins Dialyseflüssigkeitskompartiment und Abnahme des Filtrats in Spritze C

2.5 Prinzipien der Probennahme und standardisierte Konditionen

Es wurden 12 Filter für die HCV- und 5 Filter für die HBV-Versuche verwendet. Jeder Filter wurde nur für je einen Filtrationsversuch genutzt.

Ausgänge A und B des Filters sind an das Blutkompartiment angeschlossen und Ausgang C an das Dialysierflüssigkeitskompartiment. Ein Nikkiso Medical Einmalpyrogenfilter EFL-015 wurde vor dem eigentlichen Filtrationsversuch mit 0,9iger NaCl-Lösung (5 bis 40 ml) gespült. Das von der Membran nicht aufgenommene NaCl wurde wieder aus dem Filter abgezogen. Die gewonnene Probe wurde als Leerwert bezeichnet. Mit dieser Probe sollte gezeigt werden, dass vor der Filtration noch kein HCV oder HBV in den Filter gelangt war.

Das Ausgangsmaterial (für HCV 1,5 bis 2 ml Serum; für HBV 100 bis 400 µl Serum) wurde in den Filter gegeben. Das eingesetzte Serum zur HBV-Filtration wurde jeweils mit 10 ml NaCl verdünnt. Es wurde einmalig innerhalb des Blutkompartiments des Filters verschoben und ein geringer Anteil wurde wieder aufseiten des Blutkompartiments abgezogen. Diese Probe wurde als Verdünnungsprobe bezeichnet. Die quantitative Angabe dieser Probe stellt die eigentliche Belastung des Filters mit HCV oder HBV dar.

Es erfolgten weitere mehrmalige Verschiebungen innerhalb des Blutkompartiments und es kam zu einer weiteren Probenentnahme aus diesem Kompartiment. Diese Probe wurde als Adsorptionskontrolle bezeichnet. Es sollte untersucht werden, inwieweit quantitative Aussagen über eine mögliche Adsorption von HCV und HBV an die Membran gemacht werden können.

Das im Filter befindliche Material wurde weiterhin mehrmals verschoben. Es kam zur Filtration über die Membran und aufseiten des Dialysierflüssigkeitskompartiments wurde eine weitere Probe, das Filtrat, entnommen. Die Filtration vom Blutkompartiment zum

Dialysierflüssigkeitskompartiment erfolgte über eine Druckdifferenz zwischen den beiden Kompartimenten. Dabei wurde der Unterdruck von -200 mmHg aufseiten des Dialysierflüssigkeitskompartiments mittels eines Druckmessgeräts kontrolliert. Alle entnommenen Proben (Leerwert, Verdünnungsprobe, Adsorptionskontrolle, Filtrat) wurde auf das Vorhandensein von HCV RNA bzw. HBV DNA untersucht.

2.5.1 Leerwert

Innerhalb des Filters sollte ein sichtbarer NaCl-Pegel nach der Spülung erkennbar sein. Ein nicht genau verifizierbarer Anteil der NaCl wurde von der Membran aufgenommen.

Die Spülung des Filters und das Aufnehmen des NaCl waren nötig, damit die Membran mittels des aufgenommenen NaCl aufquoll. Einer Beschädigung der Membran während des Filtrierversuchs sollte so vorgebeugt werden.

2.5.2 Adsorptionskontrolle

Die Adsorption per definitionem ist die Konzentrationsverschiebung einer Substanz im Bereich einer Grenzschicht zweier benachbarter Phasen. Sie ist besonders stark an festen Stoffen mit einer großen Oberfläche.

Mit den quantitativen Ergebnissen der Adsorptionskontrolle sollte ermittelt werden, ob nach mehrmaliger Verschiebung entlang der Dialysemembran diese Viren aufgenommen hatte. Dies wäre an einer deutlichen Verminderung des quantitativen Werts der RT-PCR bzw. der „nested“-PCR erkennbar.

2.6 Ablauf der einzelnen Filtrationsversuche

Nicht alle HCV- bzw. HBV-Filtrationen verliefen gleich. Während einiger Versuche wurde die NaCl-Menge zur Verdünnung des Ausgangsmaterials variiert, daraus ergaben sich für den weiteren Ablauf Schwankungen des gewinnbaren Materials und es konnten bei einigen Versuchen keine Verdünnungsproben gewonnen werden.

In den ersten HCV-Filtrationsversuchen wurden noch keine Adsorptionskontrollen gewonnen.

Die ersten zwei HCV-Filtrationsversuche werden aufgrund der Vorgehensweise als Vorversuche bezeichnet.

Die Viruslast des Ausgangsmaterials wurde bei den verschiedenen Filtrationsversuchen variiert, da der Einfluss der Viruslast untersucht werden sollte. Es wurde bei jedem Versuch eine Filtratprobe gewonnen.

Erste HCV-Filtration

Die zur Spülung verwendeten 20 ml NaCl verblieben frei im Filter.

Es wurde für die qualitative und die quantitative RT-PCR der Thermocycler Perkin Elmers verwendet. Die Proben wurden bei -27°C für ein halbes Jahr eingefrohren und erneut getestet mit dem Thermocycler COBAS Amplicor. Verdünnungs- und Adsorptionsproben wurden nicht gewonnen.

Die Ergebnisse wurden nicht in die Endauswertung einbezogen.

Zweite HCV-Filtration

Die 40 ml NaCl für die Spülung wurden im Filter belassen, es wurde keine Probe entnommen. Es sollte überprüft werden, ob somit mehr Material für die Filtration zur Verfügung stehen würde. Dies bestätigte sich nicht. Des Weiteren wurde dem Ausgangsmaterial zur Sensibilisierung der RT-PCR 100 µl Negatives Human Plasma zugefügt. Es ergab sich allerdings kein genaueres Ergebnis und daher wurde dies bei keinem weiteren Versuch hinzugefügt.

Es wurde für die qualitative und die quantitative RT-PCR der Thermocycler Perkin Elmers verwendet. Die Proben wurden bei -27°C für ein halbes Jahr eingefrohren und erneut getestet mit dem Thermocycler COBAS Amplicor. Es wurde keine Verdünnungs- und Adsorptionsproben gewonnen.

Die Ergebnisse wurden nicht mit in die Endauswertung einbezogen.

Dritte HCV-Filtration

Es wurden nur 5 ml NaCl für die Spülung verwendet. Das NaCl verblieb frei im Filter und wurde nicht abgezogen. Es konnte daher aufgrund Materialmangels keine Verdünnungs- und Adsorptionsprobe gewonnen werden.

Vierte HCV-Filtration

Es wurden 20 ml NaCl zur Spülung des Filters verwendet und nach Aufquellen des Filters frei im Filter belassen. Eine Verdünnungsprobe wurde abgenommen, eine Adsorptionskontrolle wurde nicht gewonnen.

Fünfte HCV-Filtration

Es wurden 40 ml NaCl zur Spülung des Filters verwendet und es wurden 20 ml NaCl nach dem Aufquellen der Membran abgezogen. Eine Verdünnungsprobe konnte aufgrund Materialmangels nicht gewonnen werden. Eine Adsorptionskontrolle wurde ebenfalls nicht durchgeführt.

Sechste bis achte HCV-Filtration

Es wurden jeweils 40 ml NaCl zur Spülung des Filters verwendet, der verbleibende Rest nach dem Aufquellen der Membran wurde wieder abgezogen. Es wurde jeweils eine Verdünnungsprobe abgenommen. Eine Adsorptionskontrolle wurde nicht abgenommen.

Neunte HCV-Filtration

Die HCV RNA im Ausgangsmaterial wurde mit 4 910 000 HCV RNA copies/ml deutlich höher gewählt. Damit wurde für die Membran eine deutlich höhere Belastung als in den vorherigen Versuchen gewählt, um zu überprüfen, ob die Viruslast einen Einfluss auf die Durchlässigkeit der Membran gegenüber HCV hat. Es wurde 40 ml NaCl zur Spülung des Filters verwendet, der verbleibende Rest nach dem Aufquellen der Membran wurde wieder abgezogen. Verdünnungs- und Adsorptionsprobe wurde ebenfalls gewonnen. Die Adsorptionsprobe wurde aufgrund Materialmangel nur qualitativ getestet.

Zehnte bis zwölfte HCV-Filtration

Es wurden wiederholt hohe Konzentrationen von HCV RNA im Ausgangsmaterial gewählt (4 040 000 bis 5 320 000 HCV RNA copies/ml).

Es wurde 40 ml NaCl zur Spülung des Filters verwendet, der verbleibende Rest nach dem Aufquellen der Membran wurde wieder abgezogen. Verdünnungs- und Adsorptionsproben wurden gewonnen und getestet.

Erste HBV-Filtration

Es wurde die geringste Ausgangskonzentration von 3 pg/ml (unverdünnt) HBV DNA gewählt und nur 100 µl Serum als Ausgangsmaterial. Es wurden Verdünnungs- und Adsorptionsproben gewonnen.

Zweite bis fünfte HBV-Filtration

Es wurden deutlich höhere Ausgangskonzentrationen zwischen 370 und > 8000 pg/ml (unverdünnt) HBV DNA gewählt. Es wurden Verdünnungs- und Adsorptionsproben gewonnen.

2.7 Prinzip der Nachweismethoden

Der Nachweis wurde ausschließlich molekularbiologisch durchgeführt. Das Gensondeverfahren wurde zum quantitativen Nachweis eingesetzt.

2.7.1 Qualitative und quantitative RT – PCR zur Detektion von HCV RNA (COBAS Amplicor HCV Monitor Test, v2.0)

Die RT - PCR ist ein standardisiertes Verfahren zur Amplifikation von HCV RNA. Mittels einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) muß eine cDNA-Kopie erstellt werden. Diese cDNA-Kopie bezeichnet man als hybridisiert, da sich ein DNA-Primer an die Ausgangs-RNA bindet und es dann

mittels Polymerase zur Kopierung eines RNA-Abschnittes kommt. Zur Herstellung einer cDNA-Kopie können verschiedene DNA-Polymerasen verwendet werden, welche unter Zugabe von Mangan als Reverse Transkriptase fungieren.

Der weitere Reaktionszyklus ist in drei sich wiederholende Vorgänge gegliedert: die Denaturation (Aufsplittung) der cDNA- Kopie, das Annealing (Anlagern der Primer an entsprechenden RNA-Abschnitt) und die Extension (Verlängerung) mittels Polymerase. Mit Hilfe diese Methode kann man RNA logarithmisch vervielfältigen.

Die Präparation der RNA erfolgte unter Verwendung eines Kits der Firma Roche nach Angaben des Herstellers (Cobas Amplicor, Cobas Amplilink).

Das dabei entstandene Pellet wurde in 200 µl Diluent suspendiert und als eigentliches Ausgangsmaterial für die RT-PCR verwendet.

Die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze für die qualitative RT PCR ist 50 IU/~100 Genomäquivalente HCV RNA. Die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze für die quantitative RT PCR ist 600 IU/~1200 Genomäquivalente HCV RNA.

2.7.2 „nested“ - PCR zur Detektion von HBV DNA, qualitativ

Die nested - PCR ist ein standardisiertes Verfahren zur Vervielfältigung von HBV DNA.

Diese PCR ist in zwei Reaktionsschritte unterteilt, wobei das Produkt der 1. PCR-Reaktion als Matrize für die 2. PCR-Reaktion verwendet wird. Die Primer des 2. Teilschritts hybridisieren dabei innerhalb der Matrize aus dem 1. Teilschritt. Insgesamt wird somit eine kürzere HBV DNA Zielsequenz amplifiziert. Die Spezifität dieser Methode ist durch die doppelte Verkürzung der eigentlichen Ausgangs-DNA erhöht. Da fast alle veränderten Amplifikationsprodukte der 1. Reaktion nicht genügend komplementäre Sequenzen für die Primer der 2. Reaktion aufweisen, bleiben sie bei der 2. Amplifikation unberücksichtigt.

Ein Reaktionszyklus setzt sich ebenfalls aus drei sich wiederholenden Vorgängen zusammen: die Denaturation, das Annealing und die Extension. Mit Hilfe dieser Methode kann man DNA logarithmisch vervielfältigen. Das Sichtbarmachen der

Ergebnisse erfolgt über das Prinzip der Gelelektrophorese mit möglicher nachfolgender Fotografie.

Die Präparation der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Für den ersten Teilschritt der „nested“- PCR wurden 50 µl des vorbereiteten ersten Primeransatzes, 15 µl des extrahierten Ausgangsmaterials, 30 µl destilliertes Wasser zur Verdünnung und 5 µl Taq - DNA Polymerase (1 :10 verdünnt) eingesetzt. Für den zweiten Teilschritt der nested - PCR wurden 50 µl des vorbereiteten zweiten Primeransatzes, 40 µl destilliertes Wasser, 5 µl Taq - DNA Polymerase (1 : 10 verdünnt) und 5 µl DNA aus der ersten Reaktion verwendet.

Ein Zyklus setzt sich aus einer Temperaturerhöhung auf 95°C für 30 sek, einer anschließenden Temperaturminderung auf 56°C für 30 sek und einer erneuten Temperaturerhöhung auf 72°C für 30 sek zusammen. Insgesamt wurden je Amplifikation 35 Zyklen durchgeführt.

2.7.2.1 Basensequenz der Primer

Es wurden folgende Primer aus der Virologie, Universität Ulm von Professor Jilg verwendet

Primer HBV I - 1 – metabion GmbH, Martinsried

5'- CTG TGG AGT TAC TCT CGT TTT TGC – 3'

Primer HBV II - 1 – metabion GmbH, Martinsried

5'- CTA ACA TTG AGA TTC CCG AGA TTG AGA - 3'

Primer HBV J - 3 – metabion GmbH, Martinsried

5'- GCT CAC CTC ACC ATA CTG CAC TCA GGC – 3'

Primer HBV J - 4 – metabion GmbH, Martinsried

5'- CTT CTG CGA CGC GGC GAT TGA GAT CT – 3'

2.7.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde als Verfahren für die Identifizierung der PCR - Produkte verwendet. Für die HBV - Versuche wurden ein 2%iges Agarosegel und Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff benutzt.

50 µl PCR - Produkte des 2. Teilschritts wurden in Spacertaschen des Gels pipettiert und es wurde eine Spannung von 150 V an das Gel angelegt. Nach ungefähr einer Stunde Laufzeit wurde das Gel aus der Gelkammer entnommen und unter UV- Bestrahlung fotografiert.

2.8 Validierung der Methoden

Filtrat, NaCl-Probe, Adsorptionskontrolle und Verdünnungsprobe jedes Durchgangs wurden einzeln jeweils mittels RT-PCR bzw. „nested“- PCR getestet. Zwischen die Proben wurde je eine reine Wasserprobe ohne jegliches Material (HCV oder HBV) platziert (Filtrat – Wasser – NaCl Probe – Wasser – Adsorptionskontrolle – Wasser – Verdünnungsprobe). Bei Nachweis von HBV bzw. HCV im Wasser konnte man von einer Kontamination ausgehen und der Durchlauf wurde wiederholt.

Bei jedem Durchlauf der qualitativen RT-PCR wurde je eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt (vom Hersteller vorgegeben). Die Negativ- und Positivkontrollen wurden mit je 200 µl negativem Human Plasma versetzt, welches zur Anreicherung diente. Außerdem wurde vorher dem Lysepuffer 100 µl Interne Kontrolle (IC) zugesetzt. Mit der IC konnte man überprüfen, ob die Reaktionen während der folgenden PCR funktionsgerecht ablaufen. Lysepuffer dient der Lösung der Viren aus den Zellen. In diesem Fall war dies eigentlich nicht nötig, da die Viren frei im Blut vorliegen. Allerdings ist Lysepuffer ein obligater Bestandteil des Prüfsets.

Bei jedem Durchlauf der quantitativen RT-PCR wurde je eine HCV- negativ -, eine HCV-„low positiv“- und eine HCV-„high positiv“- Kontrolle mitgeführt. Diesen Kontrollen wurde je 100 µl Negatives Human Plasma zugesetzt und in den

Lysepuffer wurde je 100 µl Kontroll- Reagenz pipettiert. Bei jeder „nested“-PCR wurden ebenfalls je eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt.

Die Negativ- und Positivkontrollen sind vom Hersteller vorgegeben, HCV bzw. HBV fehlt (Negativkontrolle) oder HCV bzw. HBV ist sicher vorhanden (Positivkontrolle).

„Low positiv“ und „high positiv“ stellen Konzentrationsunterschiede in der HCV RNA zur weiteren Validierung der Methode dar.

Die Ergebnisse der „nested“ PCR wurden mittels des Gensondeverfahrens durch einen anderen Mitarbeiter des Instituts überprüft.

Zu Beginn wird eine PCR durchgeführt. Im Weiteren werden die PCR - Produkte an eine Mikrotiterplatte gebunden. An die gebundenen PCR - Produkte wird eine markierte erregerspezifische Gensonde angelagert. Über Wasserstoffbrückenbindungen lagert sich die Gensonde an bestimmte Bereiche der PCR - Produkte an. Antikörper gegen die Gensonde reagieren mit der Gensonde. Die Antikörper sind durch Enzyme markiert. Nach Zugabe eines Substrats kommt es nach einer Enzymreaktion zum Farbumschlag. Dieser wird mit einem Photometer gemessen, die Intensität ist ein Maß für die Viruslast.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 1-2 pg/ml.

III. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der HCV - Vorversuche 1 und 2

Tab. 3-1: Ergebnisse der HCV-Filtration, qualitative und quantitative RT-PCR der HCV-Vorversuche

| Versuchsnr. Filtrier- vorgang | Eingabe HCV RNA copies/ml (1) | Filtratauswertung RT-PCR qual. (2) | Filtratauswertung RT-PCR quant. copies/ml (3) |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| 1 | ca. 1 000 000 | + | Target low (4) |
| 2 | ca. 1 000 000 | + | Target low (4) |

+: positiver Nachweis

(1): HCV RNA im unverdünnten Ausgangsmaterial

(2): Ergebnis der qualitativen RT-PCR des Filtrats

(3): Ergebnis der quantitativen RT-PCR des Filtrats

(4): Thermocycler dekliert einen sehr geringen positiven Wert, der unter der eigentlichen Nachweisgrenze liegt

Die Filtratproben der Versuche 1 und 2 wurden für ein halbes Jahr bei -27 °C eingefroren. Sie wurden dann noch einmal mit dem Thermocycler COBAS Amplicor getestet. Es wurde keine HCV RNA mehr nachgewiesen. Die Versuche wurden als Vorversuche definiert. Sie wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen. Bei der Durchführung konnte man sich aber mit den Materialien und der Methodik bekannt machen.

Nachweisgrenze:

Die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze für COBAS Version HCV 2 quantitativ liegt bei 600 IU/~1200 Genomäquivalente HCV RNA.

3.2 Ergebnisse für die Durchlässigkeit einer Dialysemembran gegenüber HCV

3.2.1 Filtrat

Tab. 3-2: Ergebnisse der HCV-Filtrate, qualitative und quantitative RT-PCR der Filtrate

| Versuchsnr. Filtrier- vorgang | Eingabe HCV RNA copies/ml (1) | Filtratauswertung RT-PCR qual. (2) | Filtratauswertung RT-PCR quant. copies/ml (3) |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| 3 | ca. 800 000 | - | n.d. |
| 4 | ca. 800 000 | - | n.d. |
| 5 | ca. 1 000 000 | - | n.d. |
| 6 | ca. 1 000 000 | - | n.d. |
| 7 | ca. 1 104 000 | - | n.d. |
| 8 | ca. 996 000 | - | n.d. |
| 9 | ca. 4 910 000 | - | n.d. |
| 10 | ca. 5 320 000 | - | n.d. |
| 11 | ca. 4 040 000 | - | n.d. |
| 12 | ca. 4 280 000 | + | 87 200 |

+: positiver Nachweis

-: nicht nachweisbar

(1): HCV RNA im unverdünnten Ausgangsmaterial

(2): Ergebnis der qualitativen RT-PCR des Filtrats

(3): Ergebnis der quantitativen RT-PCR des Filtrats

n.d.: nicht durchgeführt

Die mittels qualitativer RT-PCR auf HCV getesteten Filtrate der Versuche 3 - 11 waren negativ. Das bedeutet, dass wahrscheinlich kein HCV die Dialysemembran passierte. Eine quantitative RT-PCR wurde nicht angeschlossen.

Das Ergebnis der qualitativen RT-PCR für HCV des Versuchs 12 fiel positiv aus. Bei der anschließenden quantitativen RT-PCR ergaben sich 87 200 copies/ml HCV RNA im Filtrat. Daraus kann gefolgert werden, dass HCV die Membran im Versuch 12 passiert hat.

3.2.2 Adsorptionskontrolle

Tab.3-3: Ergebnisse der qualitativen und quantitativen RT-PCR der Adsorptionskontrollen für HCV

| Versuchsnr. Filtrier-vorgang | Auswertung Adsorptionskontrolle qual. RT-PCR (1) | Auswertung Adsorptionskontrolle quant. RT-PCR copies/ml (2) | Eingabe HCV RNA copies/ ml (3) | Theoretische Adsorption (4) |
|------------------------------|--|---|--------------------------------|-----------------------------|
| 9 | + | n.d. | ca. 4 910 000 | n.d. |
| 10 | + | 1 790 000 | ca. 5 320 000 | 3 530 000 |
| 11 | + | 1 180 000 | ca. 4 040 000 | 2 860 000 |
| 12 | + | 974 000 | ca. 4 280 000 | 3 306 000 |

+: positiver Nachweis

(1): Ergebnis der qualitativen RT-PCR der Adsorptionskontrolle

(2): Ergebnis der quantitativen RT-PCR der Adsorptionskontrolle

(3): Gegenüberstellung: HCV RNA im unverdünnten Ausgangsmaterial zum quantitativen Ergebnis der Adsorptionskontrolle

(4): theoretische Adsorption von HCV RNA ergibt sich aus dem Vergleich der Eingabe von HCV RNA und dem Ergebnis der quantitativen RT-PCR der Adsorptionskontrolle

n.d.: nicht durchgeführt

Aufgrund nicht ausreichenden Materials konnte eine Adsorptionskontrolle nur für die Versuche 9-12 gewonnen werden. Die Ergebnisse der qualitativen RT-PCR für die Versuche 9-12 waren positiv. Das heißt, zum Zeitpunkt der Gewinnung der Adsorptionskontrolle befand sich HCV positives Material im Filter. Für die Versuche 10-12 wurde eine quantitative RT-PCR angeschlossen. Für Versuch 9 war dies aufgrund Materialmangels nicht mehr möglich. Es kam zu einer Abnahme des eingegebenen Materials nach wiederholten Durchlaufen im Dialysator, d.h., es besteht ein „Materialschwund“ im Vergleich zur quantitativen Angabe des eingegebenen Materials.

3.2.3 Verdünnungsprobe

Tab. 3-4: Ergebnisse der qualitativen und quantitativen RT-PCR der Verdünnungsproben für HCV

| Versuchsnr. Filtrier-vorgang | Auswertung der Verdünnungs-probe qual. RT-PCR (1) | Auswertung der Verdünnungsprobe quant. RT-PCR copies/ml (2) | Eingabe HCV RNA copies/ ml (3) |
|------------------------------|---|---|--------------------------------|
| 3 | + | n.d. | ca. 800 000 |
| 4 | + | 572 000 | ca. 800 000 |
| 5 | + | n.d. | ca. 1 000 000 |
| 6 | + | 215 000 | ca. 1 000 000 |
| 7 | + | 607 000 | ca. 1 104 000 |
| 8 | + | 355 000 | ca. 996 000 |
| 9 | + | 1 280 000 | ca. 4 910 000 |
| 10 | + | 929 000 | ca. 5 320 000 |
| 11 | + | 1 170 000 | ca. 4 040 000 |
| 12 | + | 640 000 | ca. 4 280 000 |

+: positiver Nachweis

(1): Ergebnis der qualitativen RT-PCR der Verdünnungsprobe

(2): Ergebnis der quantitativen RT-PCR der Verdünnungsprobe

(3): Gegenüberstellung: HCV RNA im Ausgangsmaterial zum quantitativen Ergebnis der Verdünnungsprobe

n.d.: nicht durchgeführt

Für die Versuche 3-12 wurde jeweils die Verdünnungsprobe mittels qualitativer RT-PCR auf HCV untersucht. Alle Ergebnisse waren positiv. Das heißt, es befand sich bei der Gewinnung der Verdünnungsprobe HCV im Filter. Die quantitative RT-PCR wurde für die Versuche 3 und 5 aufgrund Materialmangels nicht durchgeführt. Für die Versuche 4 und 6- 12 wurden mittels quantitativer RT-PCR die HCV RNA-Konzentrationen bestimmt. Nach der Verdünnung kam es zu einer Konzentrationsabnahme des eingesetzten Materials.

3.2.4 Leerwert

Ab Versuch 3 wurde eine NaCl-Probe mittels qualitativer RT-PCR auf HCV untersucht. Für alle Versuche konnte in den NaCl-Proben keine HCV RNA nachgewiesen werden. Die Proben wurden vor den eigentlichen Filtrierversuchen gewonnen. Aufgrund der Ergebnisse der qualitativen RT-PCR für die NaCl-Proben kann also angenommen werden, dass die Dialysefilter vor dem Filtriervorgang noch keinen Kontakt zu HCV hatten.

3.3 Ergebnisse für die Durchlässigkeit einer Dialysemembran gegenüber HBV

3.3.1 Filtrat

Tab.3-5: Ergebnisse der HBV Filtration, qualitative „nested“-PCR und Gensonde der Filtrate

| Versuchsnr. Filtrier-vorgang | Eingabe HBV DNA in pg/ml nach Verdünnung (1) | Filtratauswertung „nested“-PCR qual. (2) | Filtratauswertung Gensonde quant.in pg/ml (3) |
|------------------------------|--|--|---|
| 1 | 0,03 | – | – |
| 2 | 41 | – | – |
| 3 | >80 (über Nachweisgrenze) | + | 3,087 grenzwertig (4) |
| 4 | 3,7 | – | – |
| 5 | 80 | – | – |

+: positiver Nachweis

–: nicht nachgewiesen

(1): Ausgangsmaterial nach 1 : 100 Verdünnung mit NaCl

(2): Auswertung „nested“-PCR des Filtrats

(3): Auswertung HBV-Gensonde des Filtrats

(4): niedrigster Wert der Sensitivität, welchen das Gerät anzeigt

Es wurden 5 Filtrierversuche mit HBV durchgeführt. Bei der Testung der Filtrate ergab sich für die Versuche 1-2 und 4-5 ein negativ qualitatives Ergebnis bei der „nested“-PCR. Nach der Durchführung der qualitativen „nested“-PCR des Versuchs 3 ergab sich ein positives Ergebnis. Im nachfolgenden Gensondeverfahren wurde der quantitative Wert für die HBV DNA-Konzentration bestimmt. Das Ergebnis lautete 3,087 pg/ml HBV DNA.

3.3.2 Adsorptionskontrolle

Tab.3-6: Ergebnisse der „nested“-PCR und der Gensonde der Adsorptionskontrollen für HBV

| Versuchsnr. Filtrier- vorgang | qual.Auswertung Adsorptions- kontrolle, „nested“ - PCR (1) | quant. Auswertung Adsorptions- kontrolle in pg/ml, Gensonde (2) | Eingabe HBV DNA in pg/ml nach Verdünnung (3) | Theoretische Adsorption (4) |
|-------------------------------------|--|---|---|-----------------------------------|
| 1 | + | - | 0,03 | n.d. |
| 2 | + | 56,44 | 41 | 0 |
| 3 | + | 478,3 | >80 | n.d. |
| 4 | + | 16,55 | 3,7 | 0 |
| 5 | + | 68,11 | 80 | 0 |

+: positiver Nachweis

-: negativer Nachweis

(1): Ergebnis der qualitativen „nested“ - PCR der Adsorptionskontrolle

(2): Ergebnis der quantitativen Gensonde der Adsorptionskontrolle

(3): Gegenüberstellung: HBV DNA im Ausgangsmaterial nach der Verdünnung zur quantitativen Adsorptionskontrolle

(4): theoretische Adsorption von HBV DNA ergibt sich aus dem Vergleich der Eingabe von HBV DNA und dem Ergebnis der Gensonde der Adsorptionskontrolle

Während allen 5 Versuchen mit HBV wurde eine Adsorptionskontrolle gewonnen. Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchung („nested“-PCR) waren für alle Versuche positiv. Daraus wird ersichtlich, dass zum Zeitpunkt der Abnahme der Adsorptionskontrolle das Material im Filter HBV positiv war.

Im anschließenden Gensondeverfahren ergab sich für die Adsorptionskontrolle des Versuchs 1 kein quantitatives Ergebnis. Wahrscheinlich liegt ein mögliches Ergebnis unter der Nachweisgrenze der Methode. Bei einer unverdünnten Ausgangskonzentration für diesen Versuch von 0,03 pg/ml ist das sehr wahrscheinlich. Die Angaben für die Versuche 2-5 rangieren in der Größenordnung der Ausgangskonzentration.

3.3.3 Leerwert

Die NaCl Proben für die Versuche 1-5 wurden mittels qualitativer „nested“-PCR auf HBV untersucht. Alle Ergebnisse waren negativ.

3.4 Sichtbar machen der Amplifikationsversuche der HBV Versuche mittels Gelelektrophoresefotos

Die Gelelektrophorese wurde als Verfahren für die Identifizierung der PCR - Produkte verwendet. Das Gel wurde nach der Laufzeit unter UV- Bestrahlung fotografiert.

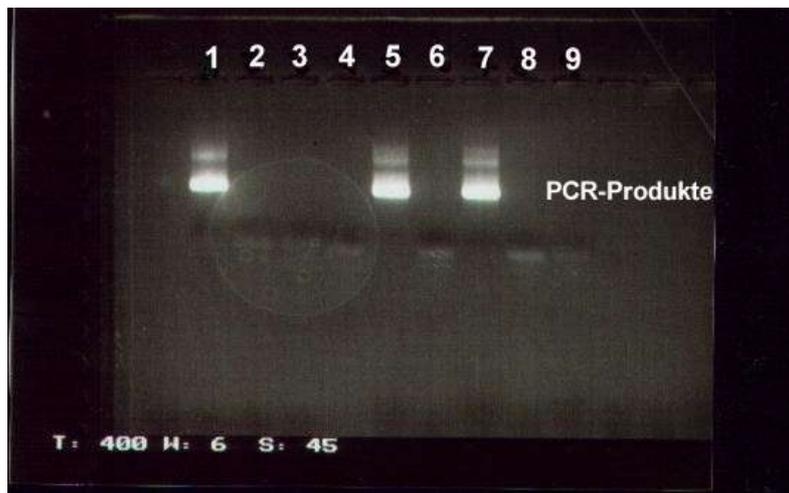


Abb. 8: Erstes Gelelektrophoresefoto

Das Gelelektrophoresefoto wurde nach der Gelelektrophorese für den ersten HBV-Versuch gemacht. Die Spalten 1, 5 und 7 der Abb. 8 sind als Banden dargestellt, in diesen Proben wurde HBV DNA identifiziert. Spalte 1 bezeichnet jeweils die mitgeführte Positivkontrolle (nach Herstellerangaben), welche bekanntes positives Material enthielt. Spalte 5 stellt die Verdünnungsprobe dar. Spalte 7 stellt die Adsorptionskontrollen dar.

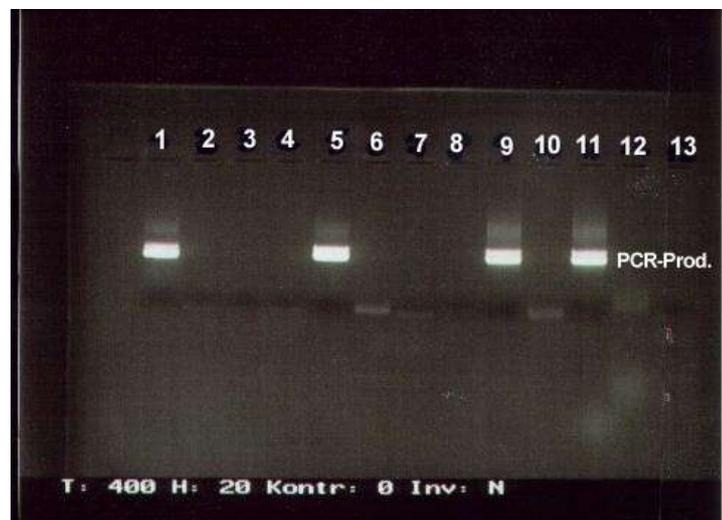


Abb. 9: Zweites Gelelektrophoresefoto

Das Gelelektrophoresefoto wurde nach der Gelelektrophorese für den zweiten HBV-Versuch gemacht. Die Spalten 1, 5, 9 und 11 der Abb. 9 sind als Banden dargestellt, in diesen Proben wurde HBV DNA identifiziert. Spalte 1 bezeichnet jeweils die mitgeführte Positivkontrolle (nach Herstellerangaben), welche bekanntes positives Material enthielt. Spalte 9 stellt die Verdünnungsprobe dar.

Spalte 11 stellt die Adsorptionskontrollen dar. Spalte 5 ist zusätzlich getestetes Patientenmaterial, welches für diese Arbeit keine weitere Bedeutung hat.



Abb. 10: Drittes Gelelektrophoresephoto

Das Gelelektrophoresefoto wurde nach der Gelelektrophorese für den dritten HBV-Versuch gemacht. Die Spalten 1, 7, 9 und 11 der Abb. 10 sind als Banden dargestellt. In diesen Proben wurde HBV DNA identifiziert. Spalte 1 bezeichnet die mitgeführte Positivkontrolle, welche bekanntes positives Material enthielt. Spalte 7 stellt die Verdünnungsprobe dar. Spalte 9 bildet die Adsorptionskontrolle ab. Die Spalte 11 steht für das getestete Filtrat.

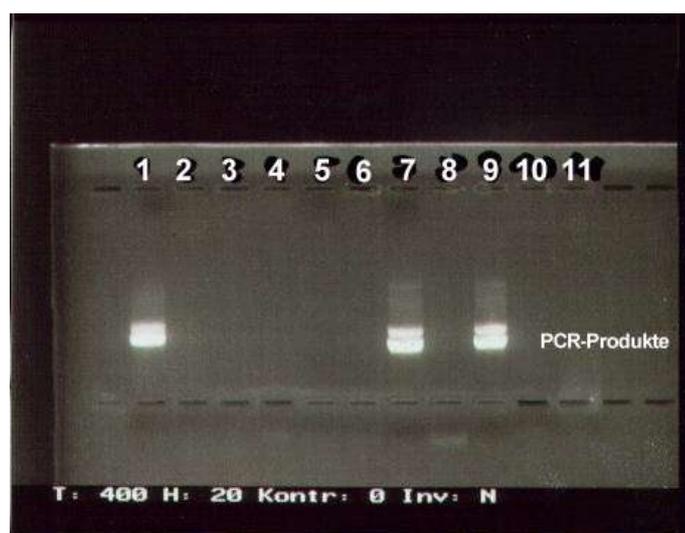


Abb. 11: Viertes Gelelektrophoresephoto

Das Gelelektrophoresefoto wurde nach der Gelelektrophorese für den vierten HBV-Versuch gemacht. Die Spalten 1, 7 und 9 der Abb. 11 sind als Banden dargestellt. In diesen Proben wurde HBV DNA identifiziert. Spalte 1 bezeichnet die mitgeführte Positivkontrolle, welche bekanntes positives Material enthielt. Spalte 7 stellt die Verdünnungsprobe dar. Spalte 9 bildet die Adsorptionskontrolle ab.

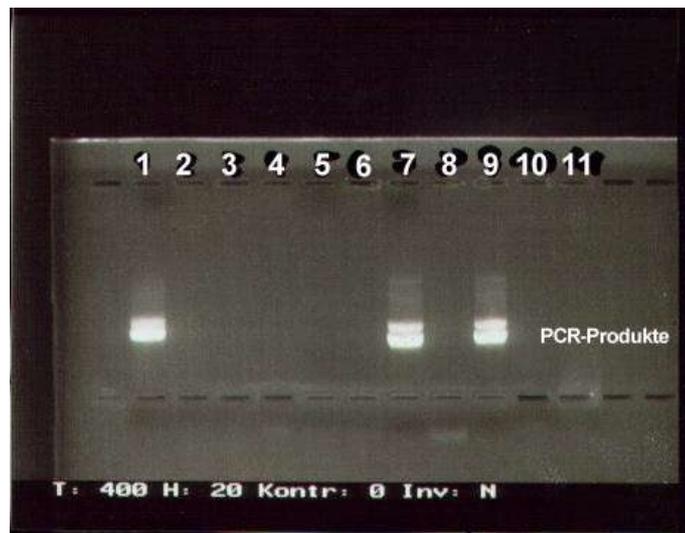


Abb. 12: Fünftes Gelelektrophoresefoto

Das Gelelektrophoresefoto wurde nach der Gelelektrophorese für den fünften HBV Versuch gemacht. Die Spalten 1, 5 und 7 der Abb. 12 sind als Banden dargestellt, in diesen Proben wurde HBV DNA identifiziert. Spalte 1 bezeichnet die mitgeführte Positivkontrolle, welche bekanntes positives Material enthielt. Spalte 5 stellt die Verdünnungsprobe und Spalte 7 die Adsorptionskontrolle dar.

IV. Diskussion

4.1 Hauptergebnisse

1. Die Virusnachweise erfolgten molekularbiologisch als PCR oder mit Hilfe einer Hybridisierungsmethode (Gensonde). Dabei werden für die Viren charakteristische Abschnitte ihres Genoms nachgewiesen. Im vorausgehenden und im folgenden Text wird dieser Nachweis gleich gesetzt mit dem Nachweis des kompletten Virus. Dieses Vorgehen schien gerechtfertigt, da es auch zur Bestimmung der Viruslast im Blut eines Infizierten herangezogen wird. Anhand der Höhe der Viruslast wird die Infektiosität eines Hepatitispatienten eingestuft.
2. In einem von 10 Filtrationsversuchen wurde im Filtrat HCV und in einem von 5 Filtrationsversuchen wurde im Filtrat HBV gefunden. Diese Ergebnisse besagen, dass es bei 2 Versuchen zu einem Übertritt von HCV oder HBV vom Blut zum Dialysierflüssigkeitskompartiment über die Membran kam. Dialysemembranen stellen somit eine Sicherheit bei der möglichen Übertragung von Viren dar, welche aber für diese Arbeit nur 86,66% betrug, d.h. 13 der 15 Versuche verliefen ohne Übertragung von Viren über die Dialysemembran.
3. Während des Versuchsablaufes könnte es betriebsbedingt zur Beschädigung der Membran kommen. Dies geschieht vor allem bei hohem Druck innerhalb des Kapillarsystems des Dialysators, z.B. aufgrund materialbedingtem verengtem Lumen oder hohem Ausgangsvolumen bei kleinem Kapillardurchmesser. Eine weitere Möglichkeit wäre auch ein zu hoher Ausgangsdruck, mit dem das Material durch das Kapillarsystem gepresst wird. Einzelne Fasern können sich darüber hinaus zusammenlagern, sodass der Druck innerhalb des Kapillarlumens erhöht wird. Die Membranen können dann reißen. Ähnliche Gegebenheiten herrschen mitunter auch während der Dialyse, wenn z. B. der arterielle Druck der Patienten stark erhöht ist. Zu bedenken sind auch die hohen Mengen an Blut und Dialysierflüssigkeit, welche während eines Zyklus die Dialysatoren passieren. Außerdem wird das Membranmaterial während der Dialyse ständig beansprucht. Damit wären auch während der Dialyse die physikalischen Bedingungen (hohes Volumen, hoher Druck, kleiner Kapillardurchmes-

ser) zum Entstehen von Rissen erfüllt. Die Dialysemembran wurde nicht per Bubble-point-test getestet, weil dazu die technischen Voraussetzungen fehlten. Die Viruslast stellt eine patientenbedingte Variable dar. Die Ausgangskonzentrationen der Seren der beiden positiven Versuche waren sehr hoch. Sie lagen mit 4 280 000 copies/ml für HCV und mehr als 80 pg/ml für HBV deutlich über den üblichen Viruslasten bei infizierten Patienten. Bei hohen Ausgangskonzentrationen wurde aber nicht bei allen Versuchen HCV bzw. HBV im Filtrat nachgewiesen. Daher ist es möglich, dass die Kombination aus patienten- und betriebsbedingten Faktoren (Risse der Membran, hohe Viruslast) zur Durchlässigkeit der Viren führt.

4. Der Adsorptionseffekt an der Dialysemembran spielt bei der Verhinderung der Filtration von Viren über die Membran keine große Rolle. Es zeigte sich für alle Versuche, dass die Konzentration von HCV RNA bzw. HBV DNA der Adsorptionskontrollen nur gering vermindert war im Vergleich zur Ausgangskonzentration der Versuche. Das heißt, es wurden nur wenige Viren an die Membran gebunden. Eine genaue Aussage, inwieweit HCV bzw. HBV an die Membran adsorbiert wurden, wäre im Weiteren durch eine Untersuchung der Membran möglich.

4.2 Was spricht für eine Übertragung von HCV und HBV über eine Dialysemembran?

Die Prävalenz von Virusinfektionen ist bei Dialysepatienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung erhöht. In einem deutschen Dialysezentrum waren von 105 Patienten 10,5 % anti-HCV positiv, 2,9 % Hepatitis B surface-Antigen (Hbs-Ag) positiv und 8,6 % Hepatitis G Virus (HGV) RNA positiv (Matzkies et al., 2000). Damit stellt sich unweigerlich die Frage nach der Sicherheit in Bezug auf die Übertragung von Viren in Dialyseeinrichtungen.

HCV und HBV könnten innerhalb eines Patientenkollektivs parenteral übertragen werden. Treten HCV bzw. HBV durch die Membran ins Dialyseflüssigkeitskompartiment, besteht die Möglichkeit, dass Hämodialysepatienten auf diesem Weg infiziert werden. Blut und

Dialysierflüssigkeit werden innerhalb der Dialysemaschine ins Schlauchsystem und die Festbestandteile der Dialysemaschine weitergeleitet. Die meisten Komponenten des Blutschlauchsystems sind Einmalmaterialien. Die nicht auswechselbaren sind die, die von der Dialysierflüssigkeit durchflossen werden. Diese werden nach jedem Dialysegang gereinigt und desinfiziert. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die Desinfektion nur unzureichend durchgeführt wird. Möglicherweise werden nicht alle Toträume des Geräts erreicht. Wird der nächste Patient dialysiert, ist dann eine „Weiterleitung“ und somit eine Übertragung von HCV bzw. HBV möglich, z. B. bei unbeabsichtigter Umkehr des transmembranen Druck.

Neben diesen dialysetechnik- bedingten Infektionswegen sollte man jedoch die bekannten Hygieneprobleme nicht ausser Acht lassen:

Gerade in Hinblick auf die „Weiterleitung“ von Viren aus den, bei der Desinfektion nicht erreichten Bereichen, ist der Rücktransport vom Dialysierflüssigkeitskompartiment zum Blutkompartiment zu erwähnen. Der Rücktransport besteht aus zwei Komponenten, der Rückdiffusion und der Rückfiltration. Rückdiffusion ist abhängig von einem Konzentrationsunterschied.

Bei der Rückfiltration ist ein Druckgradient entscheidend. Dieser kann aber vom Bluteinfluss zum Blutausfluss auf der Seite des Blutkompartiments absinken. Auch der Druckgradient im Dialyseflüssigkeitskompartiment sinkt vom Dialyseflüssigkeitseinfluss zum Dialyseflüssigkeitsausfluss ab. Jedoch fließen Blut und Dialyseflüssigkeit entgegengesetzt. Und somit ergibt sich die Möglichkeit, dass bei Blutausfluss der Druck soweit abgesunken ist, dass er unter dem Druck des Dialysierflüssigkeitsflusses liegt und es kommt dann zur Rückfiltration (Ebbighausen et al., 1992). Wenn also eine Dialysemembran passierbar für Viren ist, dann können Viren aus dem Dialysierflüssigkeitskompartiment ins Blutkompartiment gelangen und somit in den Kreislauf des Patienten.

Gerade bei der Dialyse gehört der Umgang mit Blut- und Dialysierflüssigkeitskomponenten zum Alltag. Daher gilt es, die hygienischen Bestimmungen im Umgang mit Blut- und Dialysierflüssigkeitskomponenten genau einzuhalten.

Zusätzlich belastend wirkt meistens die räumliche Enge in Dialysestationen. Außerdem müssen Dialyseeinheiten von verschiedenen Patienten nacheinander mehrfach genutzt werden. Zwischen den Sitzungen herrscht häufig ein zeitlich begrenzter Rahmen.

Bei immer wieder auftretenden HCV- und HBV-Neuinfektionen innerhalb einer Dialysestation sollte man auf solche Mängel achten.

Außerdem ist es heutzutage produktionsbedingt noch nicht möglich, Membranen herzustellen, bei denen die Poren einheitlich 0,001 bis 0,01 μm groß sind. Es finden sich immer wieder Pinholes, welche um ein Vielfaches größer sind. Über diese Pinholes könnte ein direkter Übertritt von Viren erklärbar sein.

Eine Kombination aus mehreren patienten- und betriebsbedingten Faktoren (Pinholes, Risse in der Membran, hoher Druck, großes Flüssigkeitsvolumen, hohe Viruslast des Patienten) wäre es möglich, dass HCV oder HBV die Membran passieren könnten.

Weiterhin spricht der heutige Einsatz von on-line-Verfahren dafür, wobei kontinuierlich Substitutions- oder Dialysatlösung hergestellt wird. Dabei wird ultrareines Wasser verwendet. Es erfolgt zugunsten der Sicherheit eine zweistufige Ultrafiltration nur für das Substrat (Göhl und Pirner, 1999). Die Maschinendesinfektion wird dadurch nicht ersetzt. Sollten Viren in die Dialysierflüssigkeit geraten, dann kann auch das online-Verfahren sie nicht mehr eliminieren.

4.3 Was spricht gegen eine Übertragung von HCV und HBV über eine Dialysemembran?

HCV hat ungefähr 9500 Nukleotide (Major und Feinstone, 1997). HBV ist ein DNA-Virus und gehört zur Gruppe der Hepadna-Viren. Wenn man bedenkt, dass die optimalen Poren der Dialysemembranen nur 0,001 bis 0,01 μm groß sind, passen die Viren als Ganzes nicht hindurch. Virale Partikel könnten die Membran nicht auf diesem Weg passieren.

Der Adsorptionseffekt spielt bei der Filtration von Viren über die Membran keine große Rolle. Die Effektivität der Adsorption ist abhängig von der Größe der Membranoberfläche, von der Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes, von der Molekülgröße und von der Anzahl anderer Moleküle mit ähnlicher Größe.

Kleine Moleküle (kleiner 10 000 Dalton) werden kaum adsorbiert und passieren die Membran ohne weiteres (Morti und Zydney, 1998). HCV und HBV sind

deutlich größer als 10 000 Dalton. Große und mittelgroße Moleküle werden bevorzugt adsorbiert. Das geschieht vorwiegend innerhalb der Membran und nicht an der Membranoberfläche (Cheung und Leypoldt, 1997). Die Moleküle verbleiben dann also innerhalb der Membran. Werden auch andere Moleküle mit ähnlicher Molekülgröße adsorbiert, dann nimmt die Adsorptionseffektivität für jede einzelne dieser Molekülegruppen noch zusätzlich ab. Die Folge ist, dass mit steigender Beladung des Filters die Durchlässigkeit abnimmt.

4.4 Ausblick

Dialysemembranen sind nicht vollständig virussicher. Dabei müssen sicherlich immer mehrere Faktoren zusammen treffen, damit es zu einem Durchtritt von Viren (HCV, HBV) kommen kann. Vorschläge für eine Verbesserung betreffen also nicht nur die Hygiene, sondern auch die Produktion und Anwendung der Dialysemembranen.

Das Material der Membranen sollte sowohl biokompatibel als auch sehr stabil sein. Lumenverengungen innerhalb des Kapillarsystems sollten produktionsbedingt von vornherein minimiert werden. Das gleiche gilt auch für die Porengröße. Die Abweichungen der Porengröße von 0,001 bis 0,01 μm sollten so gering wie möglich gehalten werden. Membranen werden im Verlauf der Produktion mehrfach getestet. Diese Testverfahren sollten überprüft und verfeinert werden. Während der Dialyse ist darauf zu achten, dass die Bedingungen sowohl für den Patienten als auch für die Membran optimal sind. Das heißt, große Druckschwankungen sind zu vermeiden. Die Heparinzufuhr zur Verhinderung der Blutgerinnung ist kontinuierlich zu gewährleisten. Das stellt hohe Anforderungen hinsichtlich der Aufmerksamkeit an das Personal, die Patienten und die Dialysegeräte.

Es sollte üblich sein, dass bei Dialysepatienten vor jeder Dialyse unter anderem die Leberenzyme kontrolliert werden. Bei einer Erhöhung der Enzyme gäbe es erste Hinweise auf eine mögliche Infektion. Man könnte dann frühzeitig Präventionsmaßnahmen treffen, um eine Übertragung auf andere Patienten zu verhindern. Die Patienten sollten dann an separaten Maschinen dialysiert werden.

Des Weiteren wird ein routinemäßiges Screening auf HBV- und HCV-Antikörper empfohlen. Jede weitere Präventionsmaßnahme ist auszuschöpfen, unter anderem auch die Impfung gegen HBV.

Hinsichtlich der Ausnutzung des Adsorptionseffektes wäre eine Vergrößerung der Membranoberfläche denkbar. Außerdem könnten Konzentrationen mittelgroßer und großer adsorptionsrelevanter Proteine bestimmt werden, d.h., ein Monitoring eingeführt werden. Beim Vorliegen hoher Konzentrationen dieser Proteine und bei gleichzeitiger hoher Viruslast des Patienten könnten frühzeitig Rückschlüsse auf eine mögliche Durchlässigkeit von HCV bzw. HBV durch die Membran gezogen werden. Damit könnten Entscheidungen hinsichtlich der weiteren Benutzung des Dialysegerätes schneller getroffen werden. Eine vorherige Desinfektion muss immer erfolgen.

Abschließend ist zu sagen, dass Dialysepatienten heutzutage gefährdet sind, sich während der Dialyse mit HCV oder HBV zu infizieren. Aufgrund der Grunderkrankung und der Dialysetherapie besteht zudem schon eine Beeinträchtigung für viele Patienten. Somit sollte jede weitere vitale Bedrohung durch eine HCV- oder HBV-Infektion und ihre möglichen Folgen vermieden werden. Dies sollte auch im Hinblick auf eine mögliche weitere Verschlechterung der Lebensqualität der Dialysepatienten gesehen werden.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Dialysemembran auf ihre Durchlässigkeit gegenüber HCV und HBV untersucht. Die Versuche wurden außerhalb des Dialysegeräts durchgeführt. Es wurde nur die Filtrationsrichtung vom Blut- zum Dialysierflüssigkeitskompartiment untersucht. Zusätzlich zu den Filtrationsproben wurden jeweils Adsorptionskontrollen gewonnen. Es sollte geprüft werden, ob mit der Adsorption ein effektiver Einfluss auf die Durchlässigkeit der Dialysemembran gegenüber z.B. HCV und HBV erzielt werden kann.

Ist eine Transmission von HCV oder HBV über die Dialysemembran möglich?

Bei den 10 relevanten Filtrierversuchen mit HCV und den 5 Filtrierversuchen mit HBV ergab sich, dass die Dialysemembran eines Hohlfaserdialysators für HCV und eines Hohlfaserdialysators für HBV durchlässig waren. Somit besteht rein rechnerisch für diese Arbeit die Gefahr, dass 13,33% der Hohlfaserdialysatoren für HCV oder HBV durchlässig sind und es im weiteren Verlauf zu einer horizontalen Übertragung von Patient zu Patient kommen könnte.

Gibt es betriebs- oder patientenbedingte Voraussetzungen, welche eine Durchlässigkeit von HCV oder HBV durch die Hohlfaserdialysemembran begünstigen?

Betriebsbedingte Faktoren, welche eine Durchlässigkeit von HCV und HBV durch die Membran begünstigen, sind während der Produktion von Membranen entstehende „Pinholes“ und Risse. Außerdem können Risse auch während des Ablaufs einer Dialyse aufgrund von Druck und Volumenänderungen innerhalb des Dialysators entstehen.

Einen patientenbedingten Faktor, welcher eine Durchlässigkeit von HCV und HBV durch die Membran begünstigt, stellt eine erhöhte Viruslast im Blut des Patienten dar.

Begünstigend kann dabei der Mechanismus des Rücktransportes vom Dialysierflüssigkeitskompartiment zum Blutkompartiment wirken.

Spielt die adsorptive Bindung von HCV oder HBV an die Membran eine entscheidende Rolle für die Durchlässigkeit?

Die Adsorption hat keinen effektiven Einfluß auf die Durchlässigkeit. Die Membranen werden wahrscheinlich bei hoher Viruslast schnell „gesättigt“ und

können dann einen weiteren Durchtritt nicht verhindern. Sie kann nur begrenzt einen Durchtritt von Viren blockieren, wenn die Viruslast gering ist und wenn nicht zu viele Proteine mit ähnlicher Molekülgröße filtriert werden sollen.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass eine Kombination aus diesen Faktoren („Pinholes“, Risse, hohe Viruslast, Filtration von Proteinen mit ähnlicher Molekülgröße) für eine Durchlässigkeit der Hohlfaserdialysemembran gegenüber HCV und HBV spricht.

In die Zukunft blickend sollte die Produktion von Dialysemembranen weiter verbessert werden, vor allem bezüglich der Porengröße. Vielleicht ist eine Oberflächenvergrößerung hinsichtlich einer vermehrten Adsorption möglich. Die Konzentrationen anderer mittelgroßer und großer adsorptionsrelevanter Proteine des Patienten könnten monitoriert werden. Dann wären frühzeitig Rückschlüsse auf eine mögliche Durchlässigkeit von HCV bzw. HBV durch die Membran vielleicht möglich. Patienten sollten regelmäßig auf Leberenzymveränderungen und HCV bzw. HBV Antikörper gescreent werden.

Letztendlich ist heutzutage davon auszugehen, dass Dialysemembranen nicht virussicher sind.

VI. Literaturverzeichnis

Burdick R. A., Bragg-Gresham J. L., Woods J. D., Hedderwick S. A., Kurokawa K., Combe C., Saito A., Labrecque J., Port F. K., Young E. W.: *Patterns of hepatitis B prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: The COPPS*. *Kidney Int* 2003; 96: 2222-2229

Canaud B., Bosc J. Y., Leray H., Morena M., Stec F.: *Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects*. *Blood Purificat* 2000; 18: 200-213

Caramelo C., de Sequera P., López M. D., Ortiz A.: *Hand-borne mechanisms of dissemination of hepatitis C virus in dialysis units: basis for new addenda to the present preventive strategies*. *Clin Nephrol* 1999; 51: 59-60

Cheung A. K., Leypoldt J. K.: *The hemodialysis membranes: a historical perspective, current state and future prospect*. *Semin Nephrol* 1997; 17: 196-213

Deutsches Arzneibuch 1998; Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn

Ebbighausen H., Uhlenbusch I., Vienken J.: *Dialysatqualität und Rücktransport*. EDTNA- ERCA J XVIII; 1992

Fabrizi F., Martin P., Dixit V., Brezina M., Russell J., Conrad A., Schmid P., Gerosa S., Gitnick G.: *Detection of de novo hepatitis C virus infection by polymerase chain reaction in hemodialysis patients*. *Am J Nephrol* 1999; 19: 383-388

Fillastre J. P.: *A priority mission: prevention, early detection, identification of risk factors of progression of chronic renal insufficiency*. *Bull Acad Natl Med* 1999; 183: 79-85

Franz H.E. (Herausgeber), Reinhardt B., Steudle V., Krick G., Schollmeyer P.,

Hörl W., Bommer J.: *Blutreinigungsverfahren, Technik und Klinik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1990; 4. Auflage

Göhl H., Pirner M.: *Ultrafilter und Dialysatoren für on-line Verfahren*. Mt-Medizintechnik 119 (1999), 87

Grethe S., Gemsa F., Masyar M., Böhme I., Uy A., Thomssen R.: *Molecular epidemiology of an outbreak of HCV in a hemodialysis unit: direct sequencing of HCV-HVR1 as an appropriate tool for phylogenetic analysis*. J Med Virol 2000; 60: 152-158

Gürtler L.: *Hepatitis C in germany. More than 5000 new infections annually*. Fortschr Med 2002; 144: 26-28

Hosokawa, Esumi, Iwasaki, Yanai, Enomoto, Kawano: *Phylogenetic evidence, by multiple clone analysis of hypervariable region 1, for the transmission of hepatitis C virus to chronic haemodialysis patients*. J Viral Hepat 2000; 7: 276-282

Jadoul M., Cornu C., van der Ypersele de Strihou C., UCL Collaborative Group: *Incidence and risk factors for hepatitis C seroconversion in hemodialysis: A prospective study*. Kidney Int 1993; 4: 1322-1326

Kokuba S., Horii T., Yonekawa O., Ozawa N., Mukaide M.: *A phylogenetic-tree analysis elucidation nosocomial transmission of hepatitis C virus in a haemodialysis unit*. J Viral Hepat 2002; 9: 450-454

Ledebo I.: *On-Line hemodialfiltration: technique and therapy*. Advance in Renal Replacement Therapy 1999; 6: 195-208

Lysaght M. J.: *Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications*. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 37-40

Machida J., Yamaguchi K., Ueda S., Yoshida M., Kusumoto Y., Nishimura Y., Futami G., Ishii T., Watanabe T., Takatsuki K.: *High incidence of hepatitis C virus*

antibodies in hemodialysis patients. Nephron 1992; 60: 117-118

Mahiout A.: *In vitro und in vivo Untersuchungen einer neuen PEPA-Membran: Blut-Reinigungs- und Biokompatibilitätseigenschaften.* 2000; NIKKISO, Hamburg

Major M. E., Feinstone S. M.: *The molecular virology of hepatitis C.* Hepatology 1997; 25: 1527-1538

Manes M., Paternoster G., Alloatti S.: *Dialysis in the elderly. Indications for and efficacy of hemodialysis.* Minerva Urol Nephrol 1999; 51: 75-78

Matzkies F. K., Bahner U., Weizenegger M., Bartel J., Cullen P., Schäfer R. M.: *Prevalence of hepatitis G in patients on chronic hemodialysis.* Clin Lab Med 2000; 46: 247-250

Morti S. M., Zydney A. L.: *Protein-membrane interactions during hemodialysis: effects on solute transport.* ASAIO J 1998; 44: 319-326

Nowack R., Birck R., Weinreich T.: *Dialyse und Nephrologie für Pflegeberufe 2. Auflage,* 2002, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Pastan S., Bailey J.: *Dialysis therapy.* New Engl J Med 1998; 338: 1428-1437

Plath D. W., Shepp P. H., Counts C., Hutchison F.: *Prospective analysis of global costs for maintenance of patients with ESRD.* Am J Kidney Dis 2003; 42: 12-21

Thierfelder W., Hellenbrand W., Meisel H., Schreier E., Dortsch R.: *Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998.* Eur J Epidemiol 2001; 17: 429-435

Vaslaki L., Karátson A., Vörös P., Major L., Pethö F., Ladányi E., Weber C., Mitteregger R., Falkenhagen D.: *Can sterile and pyrogen-free on-line substitution fluid be routinely delivered? A multicentric study on the microbiological safety of on-line haemodiafiltration.* Nephrol Dial Transpl 2000; 15: 74-78

Vienken J., Bowry S.: *Quo vadis dialysis membrane?* Artif Organs 2002; 26: 152-159

Weber C., Grötsch W., Schlotter S., Mitteregger R., Falkenhagen D.: *Novel online infusate-assisted dialysis system performs microbiologically safely.* Artif Organs 2000; 24: 323-328

VII. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| copies | Genomäquivalente |
| DAB | Deutsches Arzneibuch |
| d.h. | das heißt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbend assay |
| EU | Endotoxin units = Endotoxin Einheiten |
| Hbs-Ag | Hepatitis B surface-Antigen |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HGV | Hepatitis G Virus |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |
| IC | Interne Kontrolle |
| I.E. | Internationale Einheit |
| IU | International Units |
| l | Liter |
| Ltd. | limited |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NHP | Negatives Human Plasma |
| nm | Nanometer |
| Nr. | Nummer |
| PCR | Polymerase Ketter Reaktion |
| pg | Pikogramm |

| | |
|--------|-------------------------------|
| qual. | qualitativ |
| quant. | Quantitativ |
| RIBA | Recombinant immunoblot assay |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| S. | Seite |
| sek | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| Taq | Thermophilus aquaticus |
| TTV | Transfusion transmitted Virus |
| USA | United States of America |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v2.0 | Version 2.0 |
| z.B. | zum Beispiel |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |

7.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| Tabelle 2-1 | Charakterisierung des HCV-Ausgangsmaterials: Aus der Tabelle ist ersichtlich, welche HCV- Belastung im Dialysator vorlag..... S. 16 |
| Tabelle 2-2 | Charakterisierung des HBV–Ausgangsmaterials: Aus der Tabelle ist ersichtlich, welche HBV-Belastung im Dialysator vorlag S. 17 |
| Tabelle 3-1 | Ergebnisse der HCV-Filtration, qualitative und quantitative RT-PCR der HCV Vorversuche..... S. 28 |
| Tabelle 3-2 | Ergebnisse der HCV-Filtrate, qualitative und quantitative RT-PCR der Filtrate S. 29 |
| Tabelle 3-3 | Ergebnisse der qualitativen und quantitativen RT-PCR der Adsorptionskontrollen für HCV S. 30 |
| Tabelle 3-4 | Ergebnisse der qualitativen und quantitativen RT-PCR der Verdünnungsproben für HCV S. 31 |
| Tabelle 3-5 | Ergebnisse der HBV-Filtration, qualitative „nested“-PCR und Gensonde der Filtrate S. 32 |
| Tabelle 3-6 | Ergebnisse der „nested“-PCR und Gensonde der Adsorptionskontrollen für HBV S. 33 |

7.3 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|--|-------|
| Abbildung 1 | Schematische Darstellung eines Hohlfaserdialysators im Querschnitt | S. 8 |
| Abbildung 2 | Schematische Darstellung eines Hohlfaserdialysators im Längsschnitt | S. 8 |
| Abbildung 3 | Schematische Darstellung eines Plattendialysators im Querschnitt | S. 8 |
| Abbildung 4 | Schematische Darstellung eines Plattendialysators im Längsschnitt | S. 9 |
| Abbildung 5 | Poren einer asymmetrischen Polysulfondialysemembran | S. 10 |
| Abbildung 6 | Filtriervorgang | S. 17 |
| Abbildung 7 | Schematische Darstellung des Filtriervorgangs | S. 18 |
| Abbildung 8 | Erstes Gelelektrophoresefoto | S. 35 |
| Abbildung 9 | Zweites Gelelektrophoresefoto | S. 35 |
| Abbildung 10 | Drittes Gelelektrophoresefoto | S. 36 |
| Abbildung 11 | Viertes Gelelektrophoresefoto | S. 36 |
| Abbildung 12 | Fünftes Gelelektrophoresefoto | S. 37 |

7.4 Anhang – Geräte

Abzug Gelairea - Opera, Italien

Amplifikationsring - Roche, Branchburg, USA

Amplifikationsringhalter - Roche, Branchburg, USA

Aufziehkanüle - Braun, Meisungen

Basis Mikro Ampa - Perkin Elmers

Brutschrank

Computer

Detektionsgefäße - Roche, Branchburg, USA

Dreiwegehahn

Drucker

Druckmessgerät - Cogal Electronics Co, Ltd.

Einmalgefäß, steril - Greiner

Einmaluntersuchungshandschuhe - Hartmann, Heidenheim

Eppendorfgefäß 1,5 ml - Eppendorf, Hamburg

Eppendorfgefäßständer - Brand

Feinwaage K800 - Sauter, Hamburg

Fotocomputer I'NTAS® - Kaiser

Gefäß für infektiöse Flüssigkeiten - Biochrom KG, Berlin

Gefrierschrank - Hauschild GmbH, Lübeck

Gefrierschrank luxus - Bosch

Geltrace

Inkubatorständer für Eppendorfgefäße - Nalgene, USA

Kontainer für infektiöse Abfälle - INFA Lentjes GmbH, Dortmund

Kühlbox - Goodrich, USA

Kurzzeitwecker - Kienzle Signal

Nikkiso Medical Einmalpyrogenfilter EFL - 015 - Nikkiso, Hamburg

PCR - Reaktionsgefäß - Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen mit gestopfter Spitze 10 µl - Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen mit gestopfter Spitze 100 µl - Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen mit gestopfter Spitze 100 - 1000 µl - High recovery - Eppendorf, Hamburg

Pipetten EX 10 ml - Greiner Labortechnik

Pipettierhilfe - Brand
Retrainer Micro Ampä - Perkin Elmers, USA
Schraubdeckelröhrchen 10 ml - Sarstedt, Nümbrecht
Spacer 7 mm
Spritze 50 ml - Becton Dickinson, Irland
Sputumbecher
Thermocycler COBAS-Amplicor - Roche, Branchburg, USA
Thermocycler Perkin Elmers - Perkin Elmers, USA
Tischzentrifuge - Heraeus Instruments, Bremen
Trafo (Spannungswandler für Gelelektrophorese)
Transferpipette - Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Beckman 50.1
UV Tisch INTASÒ - Kaiser
Vortexer Reax 2000 - Heidolph
Wasserbad IKAMAG - REBA - Werner Hassa GmbH, Lübeck
Zellstoff - Hartmann
Zentrifugationsröhrchen

VIII. Danksagung

Ich danke herzlichst Herrn Prof. Dr. W. Solbach für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien, sowie die Unterstützung bei der Ausarbeitung.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. R. H. Dennin für die Vergabe des Dissertationsthemas, sowie für die Anleitung und intensive Betreuung bedanken, sowie bei Herrn Prof. Dr. H. Ohgke für die ebenfalls intensive Betreuung, sowie die hilfreiche Beantwortung von Fragen.

Herrn Niemann und Frau Reinhardt danke ich für die Mitbenutzung ihrer Arbeitsplätze und die stets helfende Assistenz.

Und meinen Eltern und Freunden, vor allem Gregor Peter, möchte ich für die Unterstützung beim Korrekturlesen und stetigen Ermuntern danken.

Lebenslauf

| | | |
|---------------|-------------------------------|--|
| 18.07.1974 | in Halle an der Saale geboren | |
| Schulbildung: | 1981-1990 | Polytechnische Oberschule in Neubrandenburg |
| | 1990-1991 | Gymnasium Friedrich Engels in Neubrandenburg |
| | 1991-1992 | Spencer County High School, Kentucky, USA |
| | 1992-1994 | Gymnasium Friedrich Engels in Neubrandenburg |
| Studium: | Oktober 1994 | Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck |
| | August 1996 | Ärztliche Vorprüfung in Lübeck |
| | Februar 1998 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Lübeck |
| | August 2000 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Lübeck |
| | April 2002 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Lübeck |
| Berufsweg: | Oktober 2002 bis März 2004 | Ärztin im Praktikum in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck |
| | ab März 2004 bis Mai 2005 | Assistenzärztin in der Holsteinklinik |

ab Juni 2005 Assistenzärztin im Klinikum Itzehoe

Dissertation: 1998-2005 Dissertation am Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene des Universi-
tätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus
Lübeck,
(praktischer Teil von 1998 bis 2000)

Veröffentlichung

Poster auf dem 6. Internationalen Kongress der Deutschen Gesellschaft für
Krankenhaushygiene

7.4. - 10.4.2002 in Berlin