

Über den Nachweis von HIV-Antikörpern in Blutspuren

A. Stiebler¹, S. Neifer², U. Sucker³, U. Bienze², und V. Schneider¹

¹Institut für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin, Hittorfstrasse 18A, D-1000 Berlin 33, Bundesrepublik Deutschland

²Landesinstitut für Tropenmedizin Berlin, Königin-Elisabeth-Strasse 32–42, D-1000 Berlin 19, Bundesrepublik Deutschland

³Landesmedizinaluntersuchungsamt Berlin, Rubenstrasse 111, D-1000 Berlin 41, Bundesrepublik Deutschland

On the detection of HIV-antibodies in bloodstains

Summary. Blood samples were collected on cotton wool and stored at +20°C. These samples were tested in an enzyme linked immunosorbent assay and the immunoblotting test. HIV-antibodies could be detected in samples stored up to four month.

Key word: HIV-antibodies in bloodstains

Zusammenfassung. Es wurden Blutspuren auf Baumwolltextil asserviert und bei Raumtemperatur gelagert. Diese Proben wurden im HIV-ELISA und -Western Blot untersucht. Dabei gelang ein HIV-Antikörpernachweis an bis zu vier Monate alten Proben.

Schlüsselwort: HIV-Antikörper in Blutspuren

Einleitung

Die Diagnostik der HIV-Infektion gewinnt auch in der rechtsmedizinischen Praxis zunehmend an Bedeutung. Im gerichtsmedizinischen Untersuchungsgut finden sich überproportional häufig Personen, die den bekannten Risikogruppen angehören. In Berlin sind inzwischen nahezu 50% aller obduzierten Drogentoten HIV-Antikörper-positiv [4, 11].

Gerade bei der zunehmenden Zahl an Obduktionen von Drogentoten ist zu beobachten, daß der HIV-Antikörpertest immer häufiger von der Staatsanwaltschaft selbst angeordnet wird [1]. Ein solcher Test sollte aber bei der Obduktion von Angehörigen der Risikogruppen allein deshalb zum Regelfall werden, um alle, die beruflich mit der Leiche oder deren Körperflüssigkeiten befaßt sind, vor einer Infektionsgefahr zu schützen [8].

Auch gibt es Stimmen, die eine standardisierte Durchführung eines HIV-Testes bei jeder Obduktion fordern, sowohl aus epidemiologischen als auch aus gesundheitspolitischen Gründen [1].

Der Nachweis einer HIV-Infektion erfolgt durch einen enzymgekoppelten Immunoabsorptionsassay (ELISA). Dieser wird als Suchtest eingesetzt. Ein positiver Befund wird üblicherweise durch einen Western Blot kontrolliert. Diese Verfahren können auch bei der Untersuchung von Leichenblut eingesetzt werden. Ein HIV-Antikörpernachweis ist nach eigener Erfahrung selbst in Fällen fortgeschrittener Leichenfäulnis möglich. Dies wird auch von Püschel et al. bestätigt [9, 10].

Ob ein Nachweis von HIV-Antikörpern auch an Spurenmaterial gelingt und damit eventuell bei der Zuordnung und Bestimmung einzelner Blutspuren zweckdienlich sein kann, war Gegenstand dieser Untersuchung, die in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tropenmedizin Berlin sowie dem Landesmedizinaluntersuchungsamt Berlin durchgeführt wurde.

Methodik

In einem Vorversuch wurde Vollblut von 17 HIV-positiven Patienten gewonnen. Als Kontrolle diente Vollblut von 5 HIV-negativen Personen.

Jeweils 25–30 µl Blut wurden auf Leinenläppchen (0,5 cm Ø) aufgebracht, an der Luft getrocknet und in ein Nunc-Röhrchen überführt. Die anschließende Lagerung der Leinenläppchen erfolgte unter Lichtabschluß bei Temperaturen von –20 Grad, +4 Grad sowie bei Raumtemperatur. Nach unterschiedlichen Lagerungszeiten von 1, 2, 4, 7, 30 und 90 Tagen wurden die Proben in 400 µl Verdünnungslösung aufgeschwemmt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:20. Das Eluat diente als Probeneinsatz sowohl für den ELISA (Fa. Du Pont) als auch den Western Blot (Fa. Du Pont).

In einem zweiten Versuchsabschnitt wurden dann auf Leinenläppchen asservierte Blutproben aus dem gerichtsmedizinischen Untersuchungsgut der Freien Universität Berlin verwendet. Die Proben waren durch Auftropfen einiger Milliliter bei der Sektion gewonnenen Leichenblutes auf größere Baumwolltextilstücke hergestellt worden. Sie hatten ein Alter von vier Monaten bis zu maximal drei Jahren, die Lagerung war bei Raumtemperatur erfolgt. Sie stammten von 22 Sektionsfällen, bei denen mittels ELISA direkt nach der Sektion ein HIV-Antikörpernachweis im Leichenblut gelungen war. Neun dieser positiven Ergebnisse waren zusätzlich im Western Blot untersucht und bestätigt worden.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt einen positiven Kontrollstreifen des verwendeten Du Pont Western Blots mit Anfärbung neun virusspezifischer Proteinbanden. Die Auswertung erfolgt anhand festgelegter testspezifischer Kriterien (Tabelle 1). Neben diesem Kontrollstreifen ist der Teststreifen eines HIV-Antikörper-positiven Patienten, dessen Blut am Tage der Blutabnahme untersucht wurde, dargestellt.

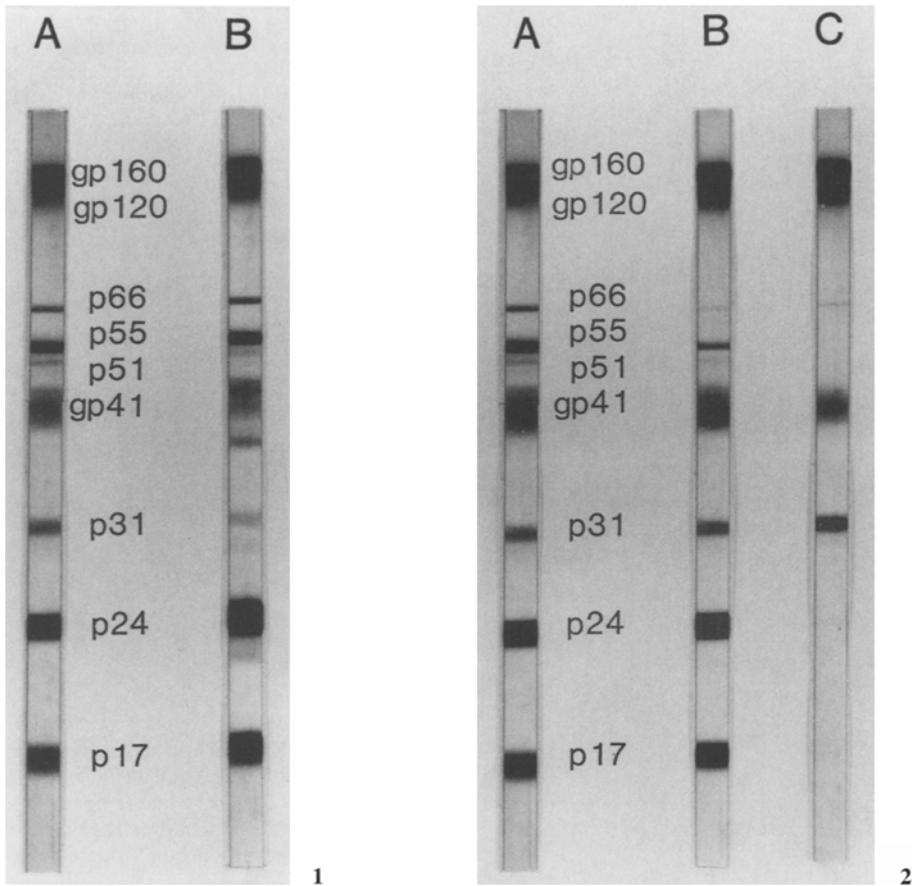


Abb. 1. Vorversuch, A: positive Kontrolle, B: HIV-AK positiver Patient, Untersuchung des Blutes direkt nach der Blutabnahme

Abb. 2. A: positive Kontrolle, B/C: Proteinbandenmuster zweier Proben nach dreimonatiger Lagerung bei Raumtemperatur, Probe B mit Abschwächung der Banden p66 und p51, Probe C mit Abschwächung der Banden p66 und p51 sowie mit Verlust der Banden p17, p24 und p55

Ein ähnliches Bild mit Anfärbung sämtlicher virusspezifischer Banden zeigten auch die Blutproben der übrigen Patienten des Vorversuches bei der Erstuntersuchung.

Nach dreimonatiger Lagerung dieser Proben bei Raumtemperatur war es in keinem Fall im ELISA zu einem signifikanten Titerabfall gekommen. Alle Ergebnisse konnten im Western Blot bestätigt werden, in dem es allerdings in mehreren Fällen zum Verlust einiger Banden gekommen war (Abb. 2).

Hinsichtlich der verschiedenen Lagerungstemperaturen konnten bei den Ergebnissen keine Differenzen gefunden werden.

Auffällig waren einige falsch positive ELISA-Befunde der negativen Kontrollen, die vor allem nach längerer Lagerungszeit temperaturabhängig gehäuft auftraten (Tabelle 2).

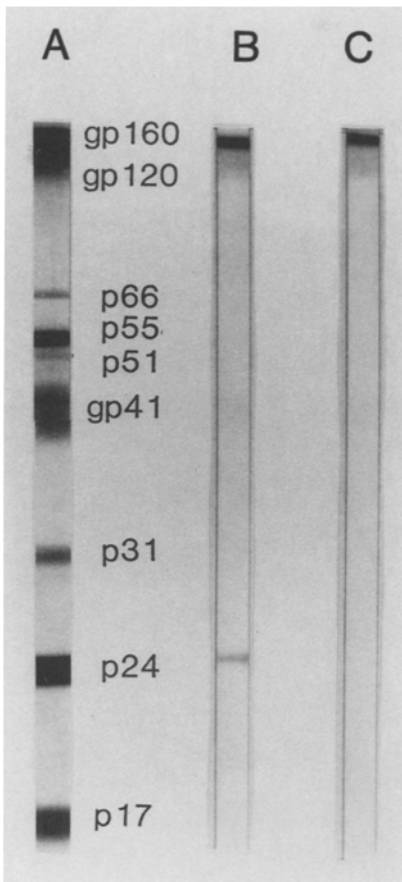


Abb. 3. A: positive Kontrolle, B: Drogenintoxikation, Sektion fünf Tage nach dem Tod, Probenlagerung vier Monate bei Raumtemperatur, C: Kopfschuß, Suizid, Sektion drei Tage nach dem Tod, Probenlagerung sieben Monate bei Raumtemperatur

Die Verwendung eines anderen Konjugates (Peroxidase statt Phosphatase) im DU Pont ELISA wie auch die Verwendung eines anderen ELISA-Testkits (biochrom) führten ebenso zu falsch positiven Ergebnissen. Eine bakterielle Kontamination oder eine Beeinflussung durch das verwendete Trägermaterial Baumwolle konnten ebenfalls durch eine sterile Sammlung und Lagerung der Proben bzw. durch eine Versuchswiederholung mit Filterpapier als Trägermaterial als Ursache der falsch positiven Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Der Western Blot blieb in allen Fällen spezifisch, falsch positive Ergebnisse wurden hier nicht beobachtet.

Alle rechtsmedizinischen Proben wurden sowohl im ELISA als auch im Western Blot untersucht. Zwei vier Monate alte sowie eine sieben Monate alte Probe reagierten dabei im ELISA positiv. Die Bestätigung der ELISA-Befunde durch den Western Blot gelang bei einer der beiden vier Monate alten Proben (Abb. 3). In diesem Fall konnten Antikörper gegen p24, gp120 und gp160 nachgewiesen werden. Dies ist nach den oben genannten Kriterien (Tabelle 1) ein positiver Befund. Die zweite vier Monate alte und die sieben Monate alte Probe

Tabelle 1. Auswertkriterien des Du Pont Western Blots

Ergebnis	Auswertung
– keine virusspezifische Proteinbande	Negativ
– eine Doppelbande ohne diffusen Hintergrund im Bereich von gp41	
– gp41 alleine	Positiv
– gp24 und gp120	
– gp41 und eine andere virusspezifische Bande	
– p24 alleine	Fraglich positiv
– eine andere virusspezifische Proteinbande oder die Kombination mehrerer Banden in allen anderen Bereichen	

Tabelle 2. ELISA-Ergebnisse der negativen Kontrollen: Ein Anstieg des Extinktionswertes der negativen Kontrollen über den reaktiven Grenzwert (cut off) wurde ab dem siebenten Tag gemessen. Der OD-Quotient (= Extinktionswert Probe/cut off), erreichte aber in keinem Fall Werte im Bereich der positiven Proben (s. a. R. Hoff et al. [5])

Lagerungs- temp.:	+20°C		–20°C	
	pos.	neg.	pos.	neg.
ELISA- befund:				
Tag 0	0	5	0	5
Tag 1	0	5	0	5
Tag 2	0	5	0	5
Tag 4	0	5	0	5
Tag 7	2	3	0	5
Tag 30	5	0	3	2

reagierten im Western Blot mit den Glykoproteinen gp120 und gp160. Diese Befunde gelten als fraglich positiv.

Eine weitere acht Monate gelagerte Probe mit negativen ELISA-Befund reagierte im Western Blot fraglich positiv (gp160). An den übrigen Proben, die alle älter als acht Monate waren, gelang ein HIV-Antikörper-Nachweis nicht mehr. Einen Überblick über die gesamten Untersuchungsbefunde gibt Tabelle 3.

Diskussion

Püschel et al. [9, 10] konnten zeigen, daß HIV-Antikörper in Blutproben, die bei 4 Grad Celsius gelagert wurden, bis zu mindestens 16 Monaten nachweisbar sein können.

Tabelle 3. Übersicht über sämtliche Untersuchungsergebnisse

Zeit	ELISA	WB	Anzahl
Vorversuch ($n = 17$)			
t_0	+	+	17
90 Tage	+	+	17
Rechtsmedizinische Proben ($n = 22$)			
I. Gruppe (ohne Bestätigung durch WB im Leichenblut (t_0))			
t_0	+	0	13
14–36 Mo.	–	0	13
II. Gruppe (mit Western Blot Bestätigung im Leichenblut (t_0))			
t_0	+	+	9
4 Mo.	+	+	1
4 Mo.	+	(+)	1
7 Mo.	+	(+)	1
8 Mo.	–	(+)	1
9–20 Mo.	–	–	5

+, positiv; (+), fraglich positiv; –, negativ; 0, nicht durchgeführt

Varnier et al. [12] beschreiben die Eignung der Aufbewahrung von Vollblut auf Filterpapier zur nachfolgenden Untersuchung auf HIV-Antikörper. Lindhard et al. [7] demonstrierten, daß HIV-Antikörper in Vollblut, das auf Filterpapier asserviert wurde, für mindestens drei Monate stabil sind. Die lange Haltbarkeit von HIV-Antikörpern dürfte in der relativen Stabilität der γ -Globulinfraktion gegenüber postmortalem Zerfall und Fäulnis begründet sein [6].

In der hier durchgeführten Untersuchung gelang ein HIV-Antikörpernachweis an bei Raumtemperatur gelagerten Spurenmaterial für mindestens vier Monate.

Wie aber der Vorversuch zeigte, kann es im ELISA zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Dies muß bei der Untersuchung von älterem Spurenmaterial beachtet werden.

Bakterielle Kontamination oder eine Beeinflussung des ELISA durch das verwendete Trägermaterial konnten als Ursache dieser falsch positiven Ergebnisse ausgeschlossen werden. Da aber der ELISA und der Western Blot üblicherweise mit Serum durchgeführt werden [2, 3], kommen als mögliche Ursache auch unspezifische Antikörperreaktionen in Betracht, die durch die Verwendung von Vollblut statt Serum auftreten.

Dies zeigt die Notwendigkeit einer Kontrolle jedes positiven ELISA Befundes an Spurenmaterial durch einen Western Blot.

Literatur

1. Dufkova J (1988) „AIDS-Test“ auch bei der Obduktion? Deutsches Ärzteblatt 85:1477
2. Du Pont, HTLV-III ELISA, Arbeitsanleitung (1986) Du Pont Company/Medical Products, Wilmington, DE 19898
3. Du Pont, HTLV-III Western Blot IgG, Arbeitsanleitung (1986) Du Pont Company/Medical Products, Wilmington, DE 19898
4. Harms G, Bienze U, Schneider V, Bschor F (1988) HIV-Antikörperprävalenz bei Berliner i.v.-Drogenabhängigen. AIFO 3:392–393
5. Hoff R, Berardi V, Weiblen B (1988) Seroprevalence of Human Immunodeficiency Virus among childbearing woman. N Engl J Med 318:525–530
6. Leithoff H, Leithoff I (1963) Immunelektrophoretische Differenzierung der Proteine faulen Leichenblutes. Dtsch Z Gerichtl Med 54:286–296
7. Lindhardt BO, Bygbjerg IC, Ulrich K (1987) Detection of antibodies to HIV in eluates from whole blood impregnated filter paper discs. J Virol Methods 18:73–77
8. Penning R, Spann W (1987) Der AIDS-Test im Rahmen gerichtlicher Leichenöffnungen und bei körperlichen Untersuchungen nach §§ 81a. MED Recht 4:171–176
9. Püschel K, Lieske K, Hashimoto Y (1987) Aids-Diagnostik unter postmortalen Bedingungen. Beitr Gerichtl Med 45:129–134
10. Püschel K, Lieske K, Janssen W (1987) HIV-infection in forensic autopsy cases. Forens Sci Int 34:169–174
11. Püschel K, Lieske K, Laufs R (1988) Entwicklung der HIV-III-Antikörperprävalenz bei Rauschgifttoten in Berlin und Hamburg. AIFO 3:452–454
12. Varnier O, Lillo F, Reina S (1988) Aids Research and retroviruses, Vol. 4, No. 2:131–136

Eingegangen am 12. Oktober 1988