

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstände: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm  
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig**

**Untersuchung der Avidität von virusspezifischen Antikörpern  
in Serum und Liquor bei Patienten mit  
Virusenzephalitiden und Multipler Sklerose**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Ralf-Herbert Kneitz  
aus Kulmbach**

**Würzburg, Oktober 2004**

Referent: Prof. Dr. med. Volker ter Meulen

Koreferent: Prof. Dr. med. Peter Rieckmann

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2005

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Laborchemische Diagnostik von entzündlichen ZNS-Erkrankungen	1
1.1.1	Eiweiße im Liquor	1
1.1.2	Entzündliche ZNS-Erkrankungen	2
1.1.2.1	Subakute Sklerosierende Panenzephalitis	3
1.1.2.2	VZV-Infektion	3
1.1.2.3	Multiple Sklerose	3
1.2	Avidität als diagnostischer Marker bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen?	4
1.2.1	Definition der Begriffe „Avidität“ und „Affinität“	5
1.2.2	Anwendung	6
1.2.3	Methoden und Reagenzien zur Aviditätsbestimmung	7
1.2.4	Berechnung der Avidität	8
1.2.5	Bisherige Ergebnisse von Aviditätsbestimmungen bei Masernvirus, VZV und MS	9
1.2.5.1	Masernvirus-Avidität	9
1.2.5.2	VZV-Avidität	10
1.2.5.3	Multiple Sklerose	10
1.3	Aufgabenstellung	11

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.	MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1	Patientenproben	12
2.1.1	VZV-Serumproben	12
2.1.2	Serum-Liquor-Paare für ZNS-Test	15
2.1.2.1	VZV-Infektion	15
2.1.2.2	SSPE	17
2.1.2.3	Multiple Sklerose	18
2.1.2.4	Kontroll-Patienten	19
2.2	Messmethoden	20
2.2.1	Materialien	20
2.2.1.1	ELISA-Testkit	20
2.2.1.2	Aviditäts- und Referenzreagenzien	20
2.2.1.3	Kontrollen	21
2.2.2	Testmethoden	22
2.2.2.1	Serumtest	22
2.2.2.2	ZNS-Test	24
2.2.3	Berechnung der Avidität	27
2.2.3.1	Aviditätsindex aus Einpunktbestimmung mit Extinktionen	27
2.2.3.2	Aviditätsindex aus Einpunktbestimmung mit Einpunktquantifizierung ( $\alpha$ -Methode)	27
2.2.3.3	Endpunkttitermethode	28

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.2.3.4	Geradenmethode	29
2.3	Testwiederholung	34
2.4	Statistische Testmethoden	36
3.	ERGEBNISSE	37
3.1	Ergebnisse der Vortests zu VZV-Antikörpern	37
3.1.1	Optimierung des Aviditätsreagens	37
3.1.2	Evaluierung des Anti-VZV-IgG-Aviditätstestes für Serumproben	39
3.1.2.1	Aviditätsindex berechnet durch Einpunktbestimmung mit Extinktionen	39
3.1.2.2	Aviditätsindex berechnet durch Einpunktquantifizierung mittels $\alpha$ -Methode	41
3.1.2.3	Modifikation des Serumtestes für Liquormessungen	44
3.1.3	Validierung der Aviditätsbestimmung im ZNS-Test	46
3.1.3.1	Ergebnisse der Verdünnungsreihen	46
3.1.3.2	Berechnung der Aviditätsindices mit Endpunkttitermethode	52
3.1.3.3	Linearer Zusammenhang von Nativ- und Denaturiert-Extinktion	57
3.1.3.4	Theoretische Überlegungen zur neuen Aviditätsberechnung	64
3.1.4	Reproduzierbarkeit der neuen Rechenmethode	70
3.2	Optimierung der Inkubationstemperatur	72
3.2.1	Vergleich der Ergebnisse der VZV-Antikörper bei Raumtemperatur bzw. 37°C	72

## **INHALTSVERZEICHNIS**

---

3.2.2	Vergleich der Ergebnisse der Masernvirusantikörper bei Raumtemperatur bzw. 37°C	74
3.3	ZNS-Avidität der VZV-Antikörper	76
3.3.1	Aviditätsspektren	76
3.3.1.1	VZV-Infektionen	76
3.3.1.2	Multiple Sklerose	80
3.3.1.3	Kontroll-Patienten	80
3.3.1.4	Vergleich der Patientenkollektive	81
3.3.2	Differenzen der Aviditäten von Serum und Liquor	81
3.3.2.1	VZV-Infektionen	81
3.3.2.2	Multiple Sklerose	84
3.3.2.3	Kontroll-Patienten	86
3.3.2.4	Statistik, Spezifität und Sensivität	88
3.4	ZNS-Avidität der Masernvirusantikörper	92
3.4.1	Aviditätsspektren	92
3.4.1.1	SSPE	92
3.4.1.2	Multiple Sklerose	94
3.4.1.3	Kontroll-Patienten	94
3.4.1.4	Vergleich der Patientenkollektive	95
3.4.2	Differenzen der Aviditäten von Serum und Liquor	95
3.4.2.1	SSPE	95
3.4.2.2	Multiple Sklerose	97

## **INHALTSVERZEICHNIS**

---

3.4.2.3	Kontroll-Patienten	98
3.4.2.4	Statistik, Spezifität und Sensitivität	100
3.5	Gegenüberstellung und Vergleich der Serum-Liquor-Paare mit VZV- und Masernvirusantikörperspiegel	104
3.5.1	Multiple Sklerose	104
3.5.2	Kontroll-Patienten	105
4.	<b>DISKUSSION</b>	107
4.1	Evaluierung des Aviditätsreagens für die VZV-Aviditätsbestimmung	108
4.2	Bestimmung der VZV-Avidität im Serum mit dem Enzygnost <sup>®</sup> Anti VZV/IgG-Testkit	109
4.3	Optimierung der Inkubationstemperatur	112
4.4	Entwicklung einer neuen Rechenmethode zur Aviditätsbestimmung	113
4.5	ZNS-Avidität	117
4.5.1	Virusenzephalitiden und Kontrollgruppe	117
4.5.2	Multiple Sklerose	120
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	125
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	129

### Abkürzungen

AI	Antikörper-Index
BEP III	Behring ELISA Processor III
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
IgG / IgM	Immunglobuline der Klasse G bzw. M
Max	Maximum
Min	Minimum
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
OD	Optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
RIA	radio-immunoassay
SSPE	Subakute Sklerosierende Panenzephalitis
VK	Variationskoeffizient
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Laborchemische Diagnostik von entzündlichen ZNS-Erkrankungen

Die Diagnose von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wird heute in der Medizin durch klinische Befunde, neurophysiologische Tests und bildgebende Verfahren, aber auch besonders von laborchemische Untersuchungen gestützt. Vor allem bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen wird hauptsächlich durch Laboruntersuchungen von Proteinen aus dem Blutserum und dem Liquor cerebrospinalis - im Folgenden kurz Liquor - unterschieden, ob die Ursache der Krankheit exogen in einer Infektion liegt oder endogen in einem Autoimmunprozess. Dabei spielen die Bestimmungen von Immunglobulinen (Antikörpern) eine Rolle. Sie haben neben einer Erregerspezifizierung auch zum Ziel zu unterscheiden, ob die Antikörper aus dem Blut in den Liquor übergetreten sind, oder ob die Antikörper autochthon, d.h. intrathekal synthetisiert und sezerniert worden sind.

### 1.1.1 Eiweiße im Liquor

Die Proteine aus dem Blutserum diffundieren entlang ihres jeweiligen Konzentrationsgefälles über die Blut-Liquor-Schranke in den Liquor. Dabei können sie umso besser aus dem Serum in den Liquorraum diffundieren, je kleiner die einzelnen Eiweißmoleküle sind (Reiber, 1998a).

Bei vielen entzündlichen Erkrankungen des ZNS sind die Konzentrationen der Serumproteine im Liquor als Folge einer Störung der Blut-Liquor-Schranke über die Norm erhöht. Insbesondere die Liquorkonzentration des niedermolekularen Albumins kann stark ansteigen. Als Parameter für die Funktion der Blut-Liquor-Schranke gilt der altersabhängige Liquor-Serum-Quotient des Albumins ( $Q_{Alb}$ ). Zum Beispiel gilt ein  $Q_{Alb} > 7 \times 10^{-3}$  bei 20- bis 40-Jährigen als Marker für eine

## 1. EINLEITUNG

---

pathologische Blut-Liquor-Schrankenstörung (Felgenhauer, 1992 & 1998; Reiber, 1998a).

Bei einer Störung der Blut-Liquor-Schranke treten auch Immunglobuline vermehrt in den Liquor über. Das Verhältnis der Konzentrationen aller IgG-Antikörper im Liquor gegenüber dem Serum wird mit dem Quotienten  $Q_{IgG}$  angegeben. Bei einer Schrankenstörung nimmt der Quotient des niedermolekularen Albumins ( $Q_{Alb}$ ) mehr zu als der des höhermolekularen IgG ( $Q_{IgG}$ ), und dieser mehr als der von IgA ( $Q_{IgA}$ ) oder gar IgM ( $Q_{IgM}$ ) (Reiber, 1998a).

Bei manchen Erkrankungen des ZNS aber steigen die Immunglobuline stärker an als das Albumin. Dies ist dadurch zu begründen, dass sowohl Albumin als auch Antikörper aus dem Serum in den Liquor übertreten, zusätzlich aber noch Immunglobuline im Liquorraum synthetisiert werden (Norby, 1978).

Die Diagnose einer erregerspezifischen intrathekalen Antikörpersynthese wird anhand des sogenannten Antikörper-Index (AI) der spezifischen Antikörper gestellt (Reiber, 1991 & 1994). Der AI gilt als sensitivster Entzündungsparameter des ZNS (Felgenhauer, 1992). Ein  $AI > 1,5$  ist beweisend für eine intrathekale IgG-Synthese wie bei Infektionen des ZNS und bei chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen, z.B. einer Multiplen Sklerose (MS) (Felgenhauer, 1992 & 1998; Reiber, 1991).

### 1.1.2 Entzündliche ZNS-Erkrankungen

Im Folgenden sind einige entzündliche ZNS-Erkrankungen kurz erläutert, die durch eine intrathekale IgG-Synthese charakterisiert sind, dadurch oligoklonale Banden in der isoelektrischen Fokussierung aufweisen, und die für diese Arbeit von Relevanz sind:

Subakute Sklerosierende Panenzephalitis (SSPE), Varizella-Zoster-Virus-(VZV-) Infektionen mit neurologischen Komplikationen und Multiple Sklerose.

Eine virologische Diagnostik kann bei diesen Erkrankungen insofern Schwierigkeiten bereiten, wenn eine virusspezifische, intrathekale Synthese nachgewiesen wird. Dabei ist zunächst unklar, ob diese Antikörperantwort im ZNS auf eine

## **1. EINLEITUNG**

---

Virusinfektion oder eine chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung mit Autoimmuncharakter, wie z.B. eine MS, zurückzuführen ist.

### **1.1.2.1 Subakute Sklerosierende Panenzephalitis**

Diese sehr seltene neurologische Spätkomplikation einer Masernvirus-Infektion geht mit einer extrem starken intrathekalen Anti-Masernvirus-IgG-Synthese (Schiff, 1992) und immens hohen Antikörperindices (Reiber, 1991) einher.

### **1.1.2.2 VZV-Infektion**

Enzephalitiden, Myelitiden bzw. Enzephalomyelitiden, Meningitiden und Fazialispareesen sind seltene neurologische Komplikationen bei Varizellen oder Zoster bzw. VZV-Reaktivierung (Haller, 1999).

### **1.1.2.3 Multiple Sklerose**

Die MS (auch „Enzephalomyelitis disseminata“) zeichnet sich durch eine intrathekale IgG-Synthese aus, die bei etwa 98% der Patienten zu oligoklonalen Banden in der isoelektrischen Fokussierung führt (Felgenhauer, 1992; Reiber, 1998a & 1998b). Diese intrathekale humorale Immunantwort wird mit einer Sensitivität von 98% als beständigstes pathologisches Zeichen im Liquor von MS-Patienten angesehen (Carp, 1978; Reiber, 1998b).

Bei ca. 90% der Patienten mit Multipler Sklerose sind ein Teil der intrathekal gebildeten Antikörper gegen neurotrope Viren gerichtet (Reiber, 1998a; Sindic, 1994). Mit besonderer Häufigkeit trifft man darunter Spezifitäten gegen Masern- (79%), Röteln- (70%) und Varizella-Zoster-Virus (62%) an, was auch als sogenannte „MRZ-Reaktion“ bezeichnet wird (Felgenhauer, 1992).

Der Anteil antiviraler Antikörper an der Gesamtmenge der intrathekal synthetisierten Antikörper ist jedoch sehr gering (Felgenhauer, 1992). So machen die MRZ-Antikörper bei der Multiplen Sklerose weniger als 2% aller Immunglobuline im Liquor aus. Eine MRZ-Reaktion wird bei einer MS etwa 50- bis 100-fach häu-

## 1. EINLEITUNG

---

figer beobachtet als bei anderen akuten, subakuten oder chronischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Reiber, 1998b) und ist typisch für den chronisch ablaufenden Autoimmunprozess bei der MS (Felgenhauer, 1998).

Laut Norby rühre diese Antikörperantwort nicht von viralen Antigenen her. Er sah die Möglichkeit, dass eine Kombination von genetischer Disposition und der Exposition an ein ubiquitär vorkommendes Virus oder Viren den Krankheitsprozess initiiert (Norby, 1978). Später wurde gezeigt, dass im ZNS tatsächlich keine viralen Antigene persistieren (Godec, 1992; Reiber, 1998b). Felgenhauer bezeichnete daher die MRZ-Reaktion auch als „Nonsense-Antwort“ (Felgenhauer, 1992).

Die MRZ-Reaktion sowie weitere erregerspezifische Antikörper scheinen ein sekundäres Krankheitsphänomen der Multiplen Sklerose zu sein (Luxton, 1990 & 1995), bei dem intrathekale B-Zellen unabhängig Antikörper produzieren.

### **1.2 Avidität als diagnostischer Marker bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen?**

Bei den bisher beschriebenen Krankheiten sowie bei vielen anderen infektiösen und nichtinfektiösen Entzündungen des ZNS findet eine intrathekale IgG-Synthese statt, die zu oligoklonalen Banden in der isoelektrischen Fokussierung führt. Aus diesem Grund stellt das Phänomen der oligoklonalen Banden keinen spezifischen, pathognomonischen Marker für eine dieser Krankheiten dar (Luxton, 1995; Reiber, 1998a).

Klinisch stellt die Unterscheidung zwischen einer MS und einer viralen Infektion des ZNS in der Regel zwar kein Problem dar. Wie oben bereits erwähnt treten dennoch immer wieder Fälle auf, bei denen eine virusspezifische, intrathekale Synthese nachgewiesen wird, und bei denen zunächst unklar ist, ob diese Antikörperantwort im ZNS auf eine Virusinfektion oder eine chronisch entzündliche ZNS-Erkrankung mit Autoimmuncharakter, wie z.B. eine MS, zurückzuführen ist.

## 1. EINLEITUNG

---

Einen Ansatz zu einer ausgefeilteren Differenzierung könnte hier die Aviditätsbestimmung der Antikörper bieten.

### 1.2.1 Definition der Begriffe „Avidität“ und „Affinität“

„Avidität“ und „Affinität“ sind heute in der Serodiagnostik infektiöser und entzündlicher Erkrankungen häufig angewandte Begriffe. Die Bestimmung der Avidität hat bislang vor allem in der Unterscheidung von kürzlichen und lange zurückliegenden Infektionen eine wichtige Stellung eingenommen.

Der Begriff „Affinität“ gibt Auskunft über die Bindungsstärke eines Paratops des spezifischen Antikörpers bzw. Immunglobulins der Klasse G (IgG) an das entsprechende Epitop des Antigens.

„Avidität“ dagegen beschreibt die Gesamtstärke der Antigen-Antikörperbindung aller spezifischen IgG-Antikörper gegen ein Antigen bedingt durch die Affinität der einzelnen Antikörper (Hedman, 1993; Bauer, 1996).

Bereits 1962 haben Eisen und Siskind die höhere Affinität der Antikörper in der Spätphase einer Infektion oder Immunisierung erkannt. Sie deuteten dies als eine Optimierung der humoralen Infektabwehr bei niedrigen Antikörperspiegeln (Eisen, 1964).

1973 entdeckte Werblin, dass nach einer Erstinfektion im Rahmen der Immunantwort die Heterogenität der Antikörperaffinität abnimmt. Ein breites „Gemisch“ aus spezifischen Antikörpern mit durchschnittlich niedriger Affinität wird aussortiert, so dass schließlich ein Antikörperkollektiv mit hoher Affinität übrigbleibt (Werblin, 1973a & 1973b).

Als Mechanismus für diese Reifung der Immunantwort wird heute eine Selektion von B-Lymphozyten durch Hypermutation angenommen (Wolter, 1997):

Die B-Zellen wandern aus dem Knochenmark aus und siedeln sich in den Lymphknoten an. Auf ihren Zellmembranen tragen sie Immunglobuline. Können deren Paratope an spezifische Antigene binden, die von dendritischen Zellen präsentiert werden, proliferieren die B-Zellen, während ein Fehlen dieser Bin-

## **1. EINLEITUNG**

---

dung ein apoptotisches Zugrundegehen verursacht. In den restlichen proliferierenden Zellen finden Hypermutationen auf den DNA-Abschnitten statt, die für den variablen Teil des Antikörpers kodieren. Durch weitere Apoptose werden die Zellen soweit selektioniert, dass schließlich nur wenige hypermutierte B-Zellklone übrigbleiben, die sich zu Gedächtnis- und Plasmazellen differenzieren und Antikörper mit hoher Affinität synthetisieren.

### **1.2.2 Anwendung**

Die Messung der Avidität von IgG-Antikörpern gilt seit Längerem als hochspezifische und -sensitive Diagnostikmethode zur Unterscheidung von kürzlichen mit niedriger Avidität und lange zurückliegenden Infektionen mit hoher Avidität (Hedman, 1993; Wolter, 1997).

Nach klassischer Sichtweise gilt ein positiver IgM-Titer als Indikator für eine akute oder kürzliche Infektion, und bis heute ist diese Annahme auch in der Mehrzahl der Fälle richtig. Doch hat sich in der Vergangenheit wiederholt bei zahlreichen Infektionen durch „untypische“ IgM-Antworten bestätigt, dass es durch diese Annahme immer wieder zu Fehlinterpretationen kommt. Somit ist ein IgM-Befund als Marker für eine akute Infektion nicht sicher (Bauer, 1996; Hedman, 1989a; Kunakorn, 1992; Narita, 1996; Thomas, 1991; Weber, 1997). Eine kürzliche Infektion kann zum Beispiel gänzlich ohne bzw. mit einer niedrigen oder sehr kurzdauernden oder persistierenden IgM-Antwort einhergehen. Weiterhin lassen sich in einer signifikanten Anzahl der Fälle IgM-Antikörper bei chronischen Infektionen, Reaktivierungen oder polyklonaler Stimulation nachweisen (Bauer, 1996; Hedman, 1988; Thomas, 1992).

Deshalb wird heute eine zeitliche Stadieneinteilung einer Infektion mittels Aviditätsbestimmung von manchen Autoren als zuverlässiger angesehen (Bauer, 1996; Hedman, 1989a; Narita, 1996; Thomas, 1992; Weber, 1997).

Besonders im Falle einer Schwangerschaft ist es von Interesse, ob bei neu entdeckten Antikörperspiegeln, z.B. gegen Cytomegalie- oder Rötelnvirus sowie *Toxoplasma gondii*, die Infektion bereits vor der Schwangerschaft bestanden

## **1. EINLEITUNG**

---

hatte oder erst währenddessen erworben wurde, und somit die Gefahr einer Embryopathie besteht. Deswegen ist schon in zahlreichen Arbeiten die Avidität für Röteln (Hedman, 1988, 1989a, 1993; Kunakorn, 1992; Lehtonen, 1982; Thomas, 1991), Toxoplasmose (Hedman, 1989b & 1993) und Cytomegalie (Wolter, 1997) ermittelt worden. Daneben wird die Aviditätsmessung auch zur Diagnostik bei Infektionen mit vielen weiteren Erregern eingesetzt, wie z.B. Epstein-Barr-, FSME-, Hanta-, Hepatitis-C-, Masern-, Mumpsvirus (Bauer, 1996; Hedman, 1993; Weissbrich, 1998; Wolter, 1997).

### **1.2.3 Methoden und Reagenzien zur Aviditätsbestimmung**

Um eine nichtkovalente Antigen-Antikörperbindung zu lösen oder zu verhindern, was zur Messung der Avidität notwendig ist, wurden in der Vergangenheit zwei Methoden und mehrere denaturierende Reagenzien angewandt (Hedman, 1993).

Die sogenannte Elutionsmethode mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Hedman, 1988 & 1993) gilt als Methode der Wahl zur Aviditätsbestimmung (Wolter, 1997). Nach Inkubation der Probenverdünnung wird eine mehrmolare Harnstofflösung zugesetzt, die die niedrigaviden Antikörper wieder aus ihrer Antigen-Antikörperbindung lösen soll.

1988 hat Kangro diese Elutionsmethode statt mit einem ELISA auch mit einem RIA (radio-immunoassay) angewandt (Kangro, 1988).

Die Fähigkeit von Harnstoff, Antigen-Antikörperbindungen reversibel zu lösen, ist bereits seit Ende der 1950er Jahre bekannt (Karush, 1958; Ram, 1959). Als Mechanismus wird eine Verminderung hydrophober Wechselwirkungen vermutet (Kamoun, 1988). Auch Guanidinhydrochlorid und Thiocyanat wurden als denaturierende Agenzien für die Elutionsmethode erfolgreich evaluiert, jedoch hat sich Harnstoff als Standardagens durchgesetzt (Hedman, 1988; Macdonald, 1988).

Inouye hat 1984 die sogenannte Dilutionsmethode mit Guanidinhydrochlorid und Thomas 1988 mit Diethylamin beschrieben (Inouye, 1984; Thomas, 1988).

## 1. EINLEITUNG

---

Grundlage für diese Methode ist auch wieder der ELISA, allerdings soll hier das denaturierende Agens schon während der Inkubation die Antigen-Antikörperbindung der niedrigaviden Antikörper verhindern.

### 1.2.4 Berechnung der Avidität

Es ist üblich, die Avidität als sogenannten Aviditätsindex anzugeben, der theoretisch einen Wert zwischen 0 und 100% annehmen kann. Niedrige Indices sprechen für eine niedrige und hohe für eine hohe Avidität. Die Grenzwerte für niedrige, intermediäre und hohe Avidität müssen für jedes Testsystem individuell bestimmt werden. Für die Berechnung dieses Index werden hauptsächlich folgende zwei Methoden verwendet:

Als bisherige Referenzmethode gilt die Endpunkttitermethode (Hedman, 1989b; Korhonen 1999). Hierbei werden von der jeweiligen Probe zwei Verdünnungsreihen angelegt. Nach Inkubation wird eine der beiden Reihen mit Waschpuffer, die andere mit denaturierendem Agens gewaschen. Die optischen Dichten werden schließlich in einem Diagramm über ihrer Verdünnung aufgetragen und graphisch zwei imaginäre Verdünnungen, bei denen der Test negativ ausfällt, die sogenannten Endpunkttiter ermittelt. Die optische Dichte, bei der der Test negativ ausfällt, wird als „Cut-off“ bezeichnet. Den Aviditätsindex erhält man dann durch Division des Endpunkttiters mit denaturierendem Reagens durch den Endpunkttiter ohne denaturierendes Reagens. Der Index ist dabei weitgehend unbeeinflusst von der Antikörperkonzentration in der Verdünnung (Mauracher, 1992; Korhonen, 1999).

Zur einfacheren Berechnung des Index mit dieser Methode wurde mittlerweile ein Computerprogramm entwickelt (Korhonen, 1999).

Die zweite etablierte und weniger aufwendige Methode erfolgt mittels Einzelpunktbestimmung (Hedman, 1988 & 1989). Dabei wird von einer Probe lediglich eine Verdünnung angefertigt, von der zwei Ansätze getestet werden. Nach Inkubation wird ein Ansatz mit Waschpuffer, der andere mit denaturierendem Agens gewaschen. Durch Division der optischen Dichten erhält man schließlich

## **1. EINLEITUNG**

---

den Aviditätsindex. Diese Methode ist aber mit dem Problem behaftet, dass nämlich die Aviditätsindices abhängig von der Antikörperkonzentration sind (Hedman, 1988).

Weißbrich ermittelte den Index, indem er zuerst die optischen Dichten durch Endpunktquantifizierung mit der von Dopatka entwickelten sogenannten  $\alpha$ -Methode in Titer umrechnen ließ und anschließend diese dividierte (Dopatka, 1992; Weissbrich, 1998).

### **1.2.5 Bisherige Ergebnisse von Aviditätsbestimmungen bei Masernvirus, VZV und MS**

Bei durch Masern- und Varizella-Zoster-Virus hervorgerufenen Erkrankungen sowie bei Multipler Sklerose wurden einige Aviditätsuntersuchungen bereits durchgeführt.

#### **1.2.5.1 Masernvirus-Avidität**

Für Masern beschrieb Tuokko über einen Zeitraum von sieben Wochen nach erstmaligem Auftreten des typischen Hautausschlags Aviditätswerte zwischen 0 und 30% (Mittelwert 13,3%). Im weiteren Verlauf stiegen die Aviditäten auf über 50% an (Mittelwert 58,9%) (Tuokko, 1995).

Bei Narita wiesen alle Patienten in den ersten 15 Tagen nach erstmaligem Auftreten des Hautausschlags bei Primärinfektion niedrige Aviditäten von weniger als 30% auf (Narita, 1996).

Ebenfalls niedrige Aviditäten ( $8,3\% \pm 4,6\%$ ) beschrieb de Souza nach erstmaliger Immunisierung gegen Masernvirus, während hohe Aviditäten bei Patienten mit Masernvirus-Reinfektion ( $56,2\% \pm 15,6\%$ ) bzw. zurückliegender Immunisierung ( $66,3\% \pm 15,5\%$ ) nachweisbar waren (de Souza, 1997).

Narita erhielt aus Serum-Liquor-Paaren von Patienten mit SSPE sehr hohe Serumaviditäten, während die entsprechenden Liquoraviditäten zwar auch hoch-

## **1. EINLEITUNG**

---

vide waren, jedoch im Vergleich zum dazugehörigen Serum deutlich niedriger ausfielen (Narita, 1996 & 1997).

Luxton dagegen beschrieb sehr hohe Affinitäten sowohl im Serum als auch im Liquor bei SSPE (Luxton 1990 & 1995).

### **1.2.5.2 VZV-Avidität**

Kangro beschrieb niedrige Aviditäten von unter 50% (Mittelwert 19,8%) für bis zu zwölf Wochen nach Ausbruch von Windpocken, während hohe Aviditäten von über 80% bei Patienten mit Zosterausschlag oder mit lange zurückliegender VZV-Infektion auftraten (Kangro 1991).

Ebenfalls niedrige Aviditätswerte (Mittelwert 34,0%) zeigten Patienten mit akuten Windpocken, während hohe Werte bei Zosterpatienten (Mittelwert 66,1%) beobachtet wurden (Schoub, 1992).

Junker wies niedrige Avidität bei Patienten mit rezidivierenden Varizellen nach ( $31,3\% \pm 26,8\%$ ), während Kontrollen im Mittel weit höhere Indices aufzeigten (65,2% bis 80,0%) (Junker, 1994).

Antikörper mit sehr hoher Affinität fand Luxton ebenfalls im Liquor bei Patienten mit einer durch VZV hervorgerufene Enzephalitis (Luxton 1990 & 1995).

### **1.2.5.3 Multiple Sklerose**

Über Aviditäten in Serum und Liquor bei Multipler Sklerose ist bisher wenig bekannt.

Luxton untersuchte Affinitäten von IgG-Antikörper mit Spezifitäten gegen Marn-, Herpes-simplex- und Varizella-Zoster-Virus in Seren und Liquores von MS-Patienten. Sämtliche Antikörperaffinitäten aller untersuchten Spezifitäten waren bei den MS-Patienten sowohl im Liquor als auch im Serum signifikant geringer als die Aviditäten von solchen Antikörpern, die intrathekal bei Patienten mit durch diese Viren verursachten Enzephalitiden synthetisiert wurden (Luxton 1990 & 1995).

## 1. EINLEITUNG

---

Bei dieser Untersuchung diente Thiocyanat in verschiedenen Molaritäten als denaturierende Agens. Die Proben wurden in je einer Verdünnung mit zwölf verschiedenen Thiocyanatmolaritäten getestet, die so angelegt worden waren, dass die Antikörperkonzentrationen keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben sollten. Die Affinität wurden je Probe in zwölf Stufen mit relativ niedriger Affinität bei niedriger Thiocyanatmolarität und relativ hoher Affinität bei hoher Thiocyanatmolarität angegeben. Luxtons Untersuchungen bezogen zwar sowohl Serum als auch Liquor der Patienten ein, doch zielte die Arbeit vor allem darauf ab, die Unterschiede der Aviditäten zwischen den Krankheitskollektiven MS und infektiöse Enzephalitis aufzuzeigen. Weniger berücksichtigt wurde, wie sich bei ein und demselben Patienten die Aviditäten derselben IgG-Spezifität in Serum und Liquor verhalten.

### 1.3 Aufgabenstellung

In vorliegender Arbeit sollte nun also untersucht werden, ob bei Patienten mit MS, SSPE oder VZV-Infektion mit neurologischen Komplikationen Unterschiede in den Aviditäten von IgG-Antikörpern zwischen Serum und Liquor bestehen, die möglicherweise differentialdiagnostisch verwertbar sind. Untersucht wurden daher Serum-Liquor-Paare von Patienten mit MS, die Antikörpertiter gegen Masern- und Varizella-Zoster-Virus aufwiesen, sowie weiterhin von Patienten mit SSPE und florider VZV-Infektion. Als Kontrollgruppe wurden Proben von Patienten mit psychiatrischen Krankheiten herangezogen.

Für diese Untersuchungen wurde ein VZV-IgG-Aviditätstest neu etabliert und evaluiert.

Als Referenz für die Avidität der Liquorantikörper wurde die Avidität der Antikörper in der dazugehörigen Serumprobe verwandt. Für die Auswertung wurde die Differenz der Aviditätswerte der Serum-Liquor-Paare berechnet.

Diese Art der Auswertung stellte neue Anforderungen an die Exaktheit der Aviditätsbestimmungen, so dass im Laufe der Arbeit auch verschiedene Berechnungsarten von Aviditätswerten verglichen wurden und schließlich eine neuartige Berechnungsmethode etabliert worden ist.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Patientenproben**

Es wurden Serum- und Liquorproben untersucht, die in den Jahren von 1988 bis 2000 dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg für virologische Routineuntersuchungen zugesandt worden waren.

#### **2.1.1 VZV-Serumproben**

Für die Evaluierung eines neu etablierten VZV-Aviditätstestes wurden insgesamt 65 Serumproben von 56 Patienten getestet.

Bei 19 dieser Patienten war das Blut während oder innerhalb der ersten fünf Monate nach einer Windpockenerkrankung entnommen worden. Von zwei dieser Patienten gab es darüberhinaus noch vier bzw. fünf Verlaufskontrollen.

Genauere Angaben zu den Patienten sind Tabelle 1 zu entnehmen:

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

Tabelle 1: Serumproben von Patienten mit Windpockenerkrankung

Patient	Probe	Alter [Jahre]	Geschlecht	Tage nach Exanthemausbruch	IgM
1	1	3	m	4	+
2	1	33	w	5	+
3	1	1	w	6	+
4	1	2	w	0	+
5	1	6	w	12	+
6	1	30	w	16	+
7	1	6	m	12	+
8	1	0,3	m	28	+
9	1	2	w	1	+
10	1	1	w	5	+
11	1	19	w	156	n.b.
12	1	31	m	14	+
13	1	3	w	8	+
14	1	13	w	8	+
15	1	0,7	m	7	+
16	1	50	w	11	+
17	1	35	w	16	+
18	1	4	m	5	+
	2	4	m	8	+
	3	4	m	36	+
	4	4	m	106	n.b.
	5	5	m	358	n.b.
19	1	32	w	15	+
	2	32	w	28	+
	3	32	w	42	+
	4	32	w	163	gw.
	5	32	w	336	n.b.
	6	33	w	431	-

n.b.= nicht bestimmt; gw.= grenzwertig

Weitere 37 Serumproben stammten von 37 Patienten mit einer lange zurückliegenden VZV-Primärinfektion. Bei all diesen Patienten war Anti-VZV-IgG bereits in Vorproben nachgewiesen worden, die mindestens 240 Tage vor den hier untersuchten Proben entnommen worden waren. Bei allen Patienten lag somit die VZV-Primärinfektion mindestens 8 Monate zurück, tatsächlich wahrscheinlich sehr viel länger. Exakte Angaben zum Zeitpunkt der Windpockeninfektion lagen für diese Patienten jedoch nicht vor. Tabelle 2 zeigt eine detaillierte Auflistung der Eigenschaften dieser Proben:

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

Tabelle 2: Serumproben von Patienten mit lange zurückliegender VZV-Primärinfektion

Probe	Alter [Jahre]	Geschlecht	Tage nach Anti-VZV-IgG-positiver Vorprobe
1	39	m	356
2	32	w	249
3	17	w	314
4	29	m	734
5	29	w	1133
6	28	w	844
7	28	m	1058
8	19	w	1071
9	28	w	784
10	21	w	314
11	23	w	358
12	22	w	390
13	27	m	259
14	20	m	314
15	21	w	1324
16	19	w	580
17	19	w	319
18	18	w	322
19	19	w	306
20	24	w	598
21	32	w	341
22	27	w	1417
23	24	w	417
24	34	w	1708
25	31	w	703
26	28	w	756
27	28	w	730
28	32	m	1617
29	22	w	1612
30	29	w	1674
31	27	m	704
32	20	w	853
33	21	w	569
34	18	w	579
35	31	w	893
36	30	w	854
37	30	m	1242

### 2.1.2 Serum-Liquor-Paare für ZNS-Test

Für die Aviditätsuntersuchungen im Liquor wurden insgesamt 89 Serum-Liquor-Paare herangezogen.

Diese 89 Probenpaare stammten von Patienten mit vier verschiedenen Krankheitsbildern, nämlich VZV, SSPE, MS und psychiatrischen Erkrankungen.

#### 2.1.2.1 VZV-Infektion

Untersucht wurden 28 Serum-Liquor-Paare von zwölf Patienten mit VZV-Infektion mit neurologischen Komplikationen. Die Diagnose wurde durch folgende Kriterien gesichert:

- Zoster oder Windpocken mit klinischen Zeichen einer neurologischen Komplikation (Enzephalitis, Myelitis, Meningitis, Fazialisparese)
- positive VZV-PCR im Liquor
- positive VZV-IgM-Antikörper und / oder Anti-VZV-IgG-Titeranstieg
- intrathekale Synthese von VZV-spezifischen IgG-Antikörpern (AI > 1,5)

Die Laboruntersuchungen zur Diagnosesicherung waren im Rahmen der virologischen Routinediagnostik durchgeführt worden.

Für den Aviditätsvergleich stand von jedem Patient ein Serum-Liquor-Paar zu Verfügung, das innerhalb der ersten 14 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen worden war. Bei elf der zwölf Patienten wurden noch ein bis fünf Verlaufskontrollen untersucht, die zwischen Tag 10 bis Tag 500 nach Erkrankungsbeginn gewonnen worden waren. Einzelheiten dazu sind in Tabelle 3 aufgeführt:

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

Tabelle 3: Serum-Liquor-Paare von Patienten mit VZV-Infektion

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Klinik	Serum-Liquor-Paar	Krankheitstage	VZV-PCR (Liquor)	IgM im Serum	IgG-Titeranstieg (Serum)	AI	Q <sub>Alb</sub> [ $\times 10^3$ ]	Q <sub>IgG</sub> [ $\times 10^3$ ]
V1	17	m	Enzephalitis, Meningitis	1	7	+	-		1,00	15,15	8,99
				2	12	+	-	+	5,30	10,92	4,85
				3	43	-	-	+	5,30	4,48	2,17
V2	30	w	Zoster, Enzephalitis	1	9	+	-		5,20	28,49	8,40
				2	16	-	gw.	+	9,50	16,56	7,20
				3	29	-	gw.	-	3,30	8,59	4,23
V3	55	w	Zoster	1	3	+	+		3,00	7,91	3,14
				2	305	-	-	-	1,50	4,45	1,36
V4	58	w	Zoster, Enzephalitis	1	n.b.	+	-		1,30	17,81	10,02
				2	n.b.	-	-	+	>10,10	10,72	5,45
V5	62	w	Zoster, Enzephalitis	1	11	+	+		0,70	12,46	6,19
				2	30	-	+	+	1,60	9,91	5,60
V6	86	w	Zoster	1	6	+	+		4,70	17,75	7,06
				2	22	-	+	+	2,10	9,12	3,99
V7	54	m	Zoster, Enzephalitis	1	2	+	+		n.b.	7,06	3,99
				2	12	-	+	+	2,50	18,56	10,90
V8	41	w	Myelitis	1	3	+	-	+	0,80	25,49	14,11
				2	11	+	-	+	n.b.	7,53	4,31
				3	16	-	-	+	n.b.	6,30	3,93
				4	116	-	-	-	32,80	3,76	2,25
				5	500	-	-	-	48,70	4,27	2,16
V9	33	m	Zoster, Meningitis	1	6	+	+		n.b.	n.b.	n.b.
				2	18	-	+	+	3,20	29,55	14,13
V10	33	w	Zoster, Meningitis	1	4	+	-		n.b.	n.b.	n.b.
				2	24	-	-	+	4,40	3,05	1,38
V11	55	m	Fazialisparese	1	n.b.	+	gw.		4,80	13,63	7,81
				2	n.b.	-	gw.	-	1,80	5,96	2,85
V12	6	m	Varizellen, Enzephalitis	1	n.b.	-	+	entfällt	8,20	3,09	2,89

n.b.= nicht bestimmt; gw.= grenzwertig

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

### 2.1.2.2 SSPE

Diese Serum-Liquor-Paare stammten von sechs SSPE-Patienten. Von jedem Patienten standen jeweils zwei Serum-Liquor-Paare, also insgesamt zwölf Serum-Liquor Paare zur Verfügung. Die erste Kontrolle wird im weiteren Verlauf als SSPE1, die zweite als SSPE2 bezeichnet.

Alle Patienten hatten eine zur SSPE passende klinische Symptomatik. Die Diagnose war serologisch gesichert worden durch den Nachweis einer exzessiven intrathekalen Synthese von Masernvirus-spezifischen IgG-Antikörpern ( $AI \gg 1,5$ ). Einzelheiten zu den SSPE-Proben sind in Tabelle 4 aufgeführt:

Tabelle 4: Serum-Liquor-Paare von Patienten mit SSPE

Patient	Alter	Geschlecht	S-L-Paar	AI	$Q_{Alb}$ [ $\times 10^3$ ]	$Q_{IgG}$ [ $\times 10^3$ ]
S1	3	m	1	24,10	1,71	8,29
	3	m	2	17,10	1,49	6,48
S2	13	w	1	123,00	2,72	17,16
	23	w	2	101,00	5,45	12,28
S3	6	m	1	36,10	3,81	17,46
	7	m	2	53,00	3,30	14,07
S4	16	m	1	4,00	5,47	5,55
	16	m	2	65,00	19,48	32,36
S5	22	w	1	74,00	2,30	11,30
	24	w	2	79,00	4,10	8,90
S6	31	w	1	>53,00	2,45	13,51
	32	w	2	108,00	2,46	18,03

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1.2.3 Multiple Sklerose

Für das MS-Kollektiv wurden 29 Patienten ausgesucht, bei denen im Rahmen der Routinediagnostik ein erhöhter Antikörperindex für Anti-Masernvirus- und / oder Anti-VZV-IgG nachgewiesen worden war. Die Patienten hatten klinisch-neurologisch und laborgestützt gesichert eine MS. Von jedem Patienten wurde jeweils ein Serum-Liquor-Paar untersucht. Einzelheiten zu den Patienten sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Spalten „Mas“ und „VZV“ geben an, für welche Antikörperspezifität im jeweiligen Paar Aviditätsuntersuchungen durchgeführt wurden.

Tabelle 5: Serum-Liquor-Paare von Patienten mit Multipler Sklerose

Patient	Alter	Geschlecht	MS seit [a]	Klassifikation	AI <sub>Mas</sub>	AI <sub>VZV</sub>	Q <sub>Alb</sub> [x10 <sup>3</sup> ]	Q <sub>IgG</sub> [x10 <sup>3</sup> ]	Mas	VZV
M1	39	w	13	n.b.	<b>&gt;1,60</b>	0,90	7,67	9,76	x	
M2	45	m	20	scp	<b>&gt;4,00</b>	0,90	7,87	9,51	x	
M3	32	w	3	sf	<b>1,80</b>	<0,60	6,32	5,58	x	
M4	52	m	5	scp	<b>2,40</b>	1,00	8,74	5,53	x	
M5	23	w	n.b.	n.b.	<b>&gt;3,10</b>	<b>&gt;2,70</b>	7,15	9,69	x	x
M6	28	w	6	sf remitt.	9,40	<b>&gt;4,6</b>	4,70	7,58		x
M7	37	m	0	sf	4,40	<b>4,10</b>	5,01	11,01		x
M8	30	w	0	sf	5,90	<b>11,90</b>	5,49	4,77		x
M9	36	w	0	sf	<b>1,70</b>	<b>&gt;5,00</b>	5,53	7,27	x	x
M10	36	m	1	cp	<b>3,30</b>	n.n.	3,06	4,54	x	
M11	23	w	0	sf	1,10	<b>&gt;5,60</b>	4,69	7,37		x
M12	47	m	n.b.	n.b.	<b>&gt;6,70</b>	<b>2,20</b>	5,13	9,63	x	x
M13	30	w	0,2	lab.gest.	1,70	<b>1,80</b>	6,02	4,40		x
M14	37	m	n.b.	scp	<b>11,10</b>	0,90	4,94	6,16	x	
M15	32	m	0,5	sf	<b>2,60</b>	0,40	9,06	7,21	x	
M16	47	w	1	cp	>1,40	<b>&gt;5,30</b>	4,65	19,69		x
M17	35	w	0,1	lab.gest.	<b>&gt;3,80</b>	<b>1,80</b>	2,45	2,90	x	x
M18	33	w	0	sf	3,40	<b>&gt;2,30</b>	3,10	3,75		x
M19	39	w	0	cp	<b>2,70</b>	<b>9,50</b>	5,35	7,32	x	x
M20	27	w	1	sf	11,40	<b>2,50</b>	4,49	4,39		x
M21	45	w	n.b.	n.b.	<b>2,40</b>	1,20	12,94	6,13	x	
M22	41	w	11	sf	12,30	<b>&gt;6,70</b>	4,51	12,52		x
M23	39	m	12	scp	<b>7,80</b>	7,00	6,30	15,94	x	
M24	35	m	6	cp	1,10	<b>6,30</b>	7,06	4,42		x
M25	60	w	n.b.	scp	<b>9,80</b>	n.n.	9,00	12,49	x	
M26	29	w	7	sf	<b>&gt;2,50</b>	<b>1,90</b>	5,48	11,19	x	x
M27	59	m	6	cp	<b>&gt;2,40</b>	1,20	6,63	5,74	x	
M28	32	w	0,7	lab.gest.	<b>&gt;5,80</b>	<b>2,70</b>	2,04	1,95	x	x
M29	24	w	n.b.	n.b.	<b>4,90</b>	<b>2,10</b>	4,29	4,55	x	x

cp: chronisch progredient; scp: sekundär chronisch progredient; sf: schubförmig; sf remitt.: schubförmig remittierend; lab.gest.: laborgestützt; n.n.: nicht nachgewiesen; n.b.: nicht bekannt.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1.2.4 Kontroll-Patienten

Als Kontrollkollektiv wurde jeweils ein Serum-Liquor-Paar von 18 Patienten mit einer psychiatrischen Diagnose, z.B. einer Demenz, endogenen Depression oder anderen Psychose, untersucht. Alle Patienten hatten einen normalen IgG-Index und normale Antikörperindices für Anti-Masern-, Anti-Röteln- und Anti-VZV-IgG, so dass sich aus diesen Untersuchungen kein Hinweis auf eine chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung ergab. Einzelheiten zu den Patienten sind in Tabelle 6 aufgeführt, wobei wiederum die Spalten „Mas“ und „VZV“ angeben, für welche Antikörperspezifität im jeweiligen Serum-Liquor-Paar Aviditätsuntersuchungen durchgeführt wurden.

Tabelle 6: Serum-Liquor-Paare von Kontroll-Patienten

Patient	Alter	Geschlecht	Klinische Angaben	AI <sub>Mas</sub>	AI <sub>VZV</sub>	Q <sub>Alb</sub> [ $\times 10^3$ ]	Q <sub>IgG</sub> [ $\times 10^3$ ]	Mas	VZV
N1	60	m	Demenz	1,10	<b>0,90</b>	4,90	2,16		x
N2	63	w	Psychose	<b>0,60</b>	<b>0,90</b>	4,93	2,09	x	x
N3	44	w	Depression	<b>0,90</b>	<b>0,90</b>	9,63	4,87	x	x
N4	69	w	Demenz	<b>0,70</b>	0,90	4,20	2,01	x	
N5	78	w	Psychose	<b>0,80</b>	<b>0,80</b>	5,95	3,25	x	x
N6	65	w	Depression	<b>1,00</b>	0,90	4,02	1,79	x	
N7	42	m	Psychose	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	8,73	3,64	x	x
N8	66	m	Demenz	0,60	<b>0,70</b>	6,74	3,63		x
N9	50	m	HOPS	0,90	<b>0,70</b>	3,99	2,28		x
N10	42	w	keine	<b>0,90</b>	<b>0,80</b>	6,07	3,42	x	x
N11	20	m	Psychose	<b>0,80</b>	0,70	3,87	2,38	x	
N12	62	w	Demenz	<b>1,40</b>	<b>1,20</b>	8,20	3,91	x	x
N13	62	w	Demenz	<b>1,30</b>	n.n.	4,36	1,96	x	
N14	84	m	Demenz	<b>1,10</b>	1,10	4,38	2,04	x	
N15	55	m	Demenz	<b>0,90</b>	0,90	5,09	2,82	x	
N16	76	m	Demenz	<b>1,10</b>	1,00	9,84	4,53	x	
N17	58	m	Demenz	<b>1,00</b>	0,90	5,15	2,67	x	
N18	75	w	Demenz	<b>&lt;1,10</b>	0,80	3,66	1,59	x	

n.n.= nicht nachgewiesen; HOPS= hirnorganisches Psychosyndrom

### 2.2 Messmethoden

#### 2.2.1 Materialien

##### 2.2.1.1 ELISA-Testkit

Für die Aviditätsuntersuchungen wurde sowohl für VZV als auch für Masernvirus der handelsübliche Enzygnost<sup>®</sup>-IgG-ELISA-Testkit der Firma Dade Behring, Marburg, benutzt, sowie die Zusatzreagenzien aus dem handelsüblichen Combi-pack Zusatz-Reagenzien für Enzygnost<sup>®</sup>/TMB.

Bestellnummern:

- Enzygnost<sup>®</sup> Anti VZV/IgG OWLT 15
- Enzygnost<sup>®</sup> Anti-Masern-Virus/IgG OWLN 15
- Zusatz-Reagenzien für Enzygnost<sup>®</sup>/TMB OUVF 17

Eine Mikrotitrationsplatte dieses Testkits besteht aus sechs auch einzeln verwendbaren Riegeln im Halterahmen. Die Näpfe der linken Reihe jedes Riegels sind mit Antigen, die der rechten mit Kontrollantigen beschichtet.

##### 2.2.1.2 Aviditäts- und Referenzreagenzien

Für den denaturierenden Waschgang nach Inkubation der Probenverdünnungen wurden folgende Aviditätsreagenzien eingesetzt:

- fünfmolare Harnstofflösung mit Urea-Pulver zur Synthese der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, USA; Bestellnummer: U-1250

## **2. MATERIALIEN UND METHODEN**

---

- viermolare Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung mit Wasserstoffperoxid-Harnstoff-Pulver zur Synthese der Firma MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn; Bestellnummer: 8.18356.0500

Als Lösungsmedium sowie als Reagens für den Aviditätsreferenzwaschgang diente die Gebrauchswaschlösung POD aus dem Combipack Zusatz-Reagenzien.

### **2.2.1.3 Kontrollen**

Zusätzlich zu den Probenverdünnungen wurden auf jeder ELISA-Testplatte Kontrollseren mitgeführt und deren Aviditäten ausgewertet.

Diese waren für VZV und Masernvirus:

- die virusspezifische Referenz P/N aus dem Enzygnost<sup>®</sup>-IgG-ELISA-Testkit
- Serum einer Primärinfektion („Akut-Kontrolle“)  
für VZV: Patient 17 aus Tabelle 1 (S. 13)  
für Masern: Serum einer 29-jährigen Patientin, entnommen 14 Tage nach Exanthemausbruch, IgM positiv
- Serum / Plasma einer lange zurückliegenden Infektion („Alt-Kontrolle“)  
für VZV: Patient 2 aus Tabelle 2 (S. 14)  
für Masern: Hierfür wurde ein Plasmapool von gesunden Blutspendern verwandt, der am Institut für Virologie und Immunbiologie hergestellt worden war.

### 2.2.2 Testmethoden

#### 2.2.2.1 Serumtest

##### Vorbereitung:

Von jeder Serumprobe, Referenz P/N sowie der Akut- und Alt-Kontrolle wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:231 angelegt.

Dazu wurden 10 µl der Seren und der Referenz jeweils in 200 µl Proben-Puffer POD in einem Reagensröhrchen 1:21 vorverdünnt. Danach wurden in die Näpfe auf der mit Antigen und Kontrollantigen beschichteten Mikrotiterplatte 200 µl Proben-Puffer POD vorgelegt. Dort hinein wurden anschließend 20 µl der Vorverdünnung einpipettiert und gut durchgemischt. Damit war eine Verdünnung von 1:231 entstanden.

##### Beschickung der Mikrotiterplatte:

Um die Avidität experimentell bestimmen zu können, wurde jede Probe im Doppelansatz getestet. Der erste Ansatz wurde nach der Inkubation der Proben auf der Mikrotiterplatte mit dem Referenzreagens, der zweite mit dem Aviditätsreagens gewaschen.

Beide Ansätze wurden zusammen auf einer Mikrotiterplatte in einem Testlauf durchgeführt. Dazu wurde die Platte in eine linke und rechte Hälfte geteilt. Bei einer voll bestückten Testplatte waren dies die Reihen A bis F und G bis L, wie aus Abbildung 1 (folgende Seite) ersichtlich ist. Die linke Hälfte wurde nach der Inkubation der Probenverdünnungen mit Waschpuffer, die rechte mit der denaturierenden Harnstofflösung gewaschen.

Linke und rechte Hälfte wurden exakt identisch bestückt.

Die Näpfe A1 und G1 wurde immer mit der Referenz P/N, A2 und G2 mit der Akut- sowie A3 und G3 mit der Alt-Kontrolle beschickt. Daran schlossen sich die Probenverdünnungen an, die in die Reihen A, C und E bzw. G, I und K von oben nach unten fortlaufend einpipettiert wurden. An das Ende jeder Hälfte, bei

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

einer voll bestückten Platte in E8 und K8, wurde nochmals die Referenz P/N pipettiert.

Die Näpfe der Reihen B, D, F, H, J und L waren mit dem Kontrollantigen beschichtet. In diese kamen dieselben Probenverdünnungen wie in den Napf direkt links daneben aus demselben Verdünnungsansatz.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	R P/N	KoAg	SER 6	KoAg	SER 14	KoAg	R P/N	KoAg	SER 6	KoAg	SER 14	KoAg
2	akut	KoAg	SER 7	KoAg	SER 15	KoAg	akut	KoAg	SER 7	KoAg	SER 15	KoAg
3	alt	KoAg	SER 8	KoAg	SER 16	KoAg	alt	KoAg	SER 8	KoAg	SER 16	KoAg
4	SER 1	KoAg	SER 9	KoAg	SER 17	KoAg	SER 1	KoAg	SER 9	KoAg	SER 17	KoAg
5	SER 2	KoAg	SER 10	KoAg	SER 18	KoAg	SER 2	KoAg	SER 10	KoAg	SER 18	KoAg
6	SER 3	KoAg	SER 11	KoAg	SER 19	KoAg	SER 3	KoAg	SER 11	KoAg	SER 19	KoAg
7	SER 4	KoAg	SER 12	KoAg	SER 20	KoAg	SER 4	KoAg	SER 12	KoAg	SER 20	KoAg
8	SER 5	KoAg	SER 13	KoAg	R P/N	KoAg	SER 5	KoAg	SER 13	KoAg	R P/N	KoAg

Abbildung 1: Beschickung der Mikrotitrationsplatte beim Serumtest

R P/N: Referenz P/N, akut: Akut-Kontrolle, alt: Alt-Kontrolle, SER n: Serumverdünnung der Probe n.

Tabelle 7 und Tabelle 8 geben Aufschluss über den zeitlichen Ablauf, die Reagenzmengen und -verdünnungen sowie die Temperaturen des Serumtests:

Tabelle 7: Ablauf des Serumtests mit fünfmolarem Harnstofflösung

Reagens	Verdünnung	Inkubationszeit	µl	Temperatur
Proben	1:231	1 h	220	37°C mit Aufheizen
Aviditäts-/Referenzreagens	5 M Urea	3x5 min	200	Raumtemperatur
Konjugat	1:50	1 h	100	37°C mit Aufheizen
Chromogen TMB	1:11	0,5 h	100	Raumtemperatur
Stopplösung POD	wie geliefert	-	100	Raumtemperatur

Tabelle 8: Ablauf des Serumtests mit viermolarem Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung

Reagens	Verdünnung	Inkubationszeit	µl	Temperatur
Proben	1:231	1 h	220	37°C mit Aufheizen
Aviditäts-/Referenzreagens	4 M Urea-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 min	200	Raumtemperatur
Konjugat	1:50	1 h	100	37°C mit Aufheizen
Chromogen TMB	1:11	0,5 h	100	Raumtemperatur
Stopplösung POD	wie geliefert	-	100	Raumtemperatur

Im Anschluss wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm die Extinktionen gemessen. Daraufhin

## **2. MATERIALIEN UND METHODEN**

---

wurde von der Extinktion des Antigens die zugehörige Kontrollantigenextinktion subtrahiert.

### **2.2.2.2 ZNS-Test**

#### Vorbereitung:

Für jedes Serum-Liquor-Paar war bereits routinemäßig der Anti-Masernvirus- und Anti-VZV-IgG-AI bestimmt worden. Diese Bestimmungen liefen unter denselben Voraussetzungen für Inkubationszeiten und Temperaturen wie der hier verwandte ZNS-Aviditätstest. Auf der Grundlage der Ergebnisse der AI-Bestimmungen wurde individuell für jede Probe auf eine Anfangsverdünnung einer Verdünnungsreihe geschlossen, so dass die zu erwartende höchste Extinktion möglichst zwischen 2,0 und 2,5 lag.

Die Werte dieser Anfangsverdünnungen reichten von 1:6 für Liquorproben mit niedrigem Antikörperspiegel und bis zu 1:2694384 (als Vielfaches von 1:231) als höchste Verdünnung bei extrem hochtitrigen Seren von SSPE-Patienten. Die niedrigste Verdünnung für die Serumproben war 1:1386.

Da Liquorproben erfahrungsgemäß extrem selten mit dem ELISA-Kontrollantigen reagieren, und weil für einen Aviditätstest in der 1:6-Verdünnung sehr viel nativer Liquor benötigt wird, wurde auf eine Kontrollantigentestung in der 1:6-Verdünnung verzichtet, um Liquormaterial einzusparen.

Die höheren Verdünnungen wurden in möglichst wenigen Schritten angelegt. Bis zur Verdünnung 1:231 erfolgte dies in einem Schritt, darüber in zwei oder mehr Schritten. Die Mindestmenge, die dabei von einer Verdünnung in die nächste pipettiert wurde, war nie kleiner als 10 µl, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren so gering wie möglich zu halten.

Die Aviditätsberechnungen wurden zunächst mittels einer Zweipunktbestimmung durchgeführt. Dazu wurde jede Serum- bzw. Liquorprobe nochmals 1:4 relativ zur Anfangsverdünnung weiterverdünnt. Die Anfangs- sowie die weiteren Verdünnungen wurden alle außerhalb der Mikrotiterplatte in Reagensröhrchen erstellt.

Referenz P/N sowie Kontrollen wurden in der Verdünnung 1:1386 verwandt.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

Im Verlauf der Untersuchung der Serum-Liquor-Paare stellte sich heraus, dass vier statt zwei Verdünnungen bei den Aviditätsberechnungen eine größere Genauigkeit erzielen (siehe Kapitel 3.1.3.4, S. 64). Daher wurde die Ausgangsverdünnung in Schritten von 1:2 weiterverdünnt, d.h. es wurden relativ zur Anfangsverdünnung die Verdünnungen 1:2, 1:4 und 1:8 hergestellt.

Gleichzeitig wurde von der Referenz P/N und den beiden Kontrollverdünnungen eine zweite Verdünnung im Verhältnis 1:4 zur ersten Verdünnung erstellt.

Die Pipettierschemata für die Testungen der Serum-Liquor-Paare in zwei bzw. vier Verdünnungen sind aus Abbildung 2 bzw. Abbildung 3 ersichtlich:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	R P/N	KoAg	SER 2b	KoAg	SER 4b	KoAg	R P/N	KoAg	SER 2b	KoAg	SER 4b	KoAg
2	akut	KoAg	LIQ 2a	KoAg	LIQ 4a	KoAg	akut	KoAg	LIQ 2a	KoAg	LIQ 4a	KoAg
3	alt	KoAg	LIQ 2b	KoAg	LIQ 4b	KoAg	alt	KoAg	LIQ 2b	KoAg	LIQ 4b	KoAg
4	SER 1a	KoAg	SER 3a	KoAg	SER 5a	KoAg	SER 1a	KoAg	SER 3a	KoAg	SER 5a	KoAg
5	SER 1b	KoAg	SER 3b	KoAg	SER 5b	KoAg	SER 1b	KoAg	SER 3b	KoAg	SER 5b	KoAg
6	LIQ 1a	KoAg	LIQ 3a	KoAg	LIQ 5a	KoAg	LIQ 1a	KoAg	LIQ 3a	KoAg	LIQ 5a	KoAg
7	LIQ 1b	KoAg	LIQ 3b	KoAg	LIQ 5b	KoAg	LIQ 1b	KoAg	LIQ 3b	KoAg	LIQ 5b	KoAg
8	SER 2a	KoAg	SER 4a	KoAg	R P/N	KoAg	SER 2a	KoAg	SER 4a	KoAg	R P/N	KoAg

Abbildung 2: Beschickung der Mikrotitrationsplatte beim ZNS-Test mit zwei Probenverdünnungen

R P/N: Referenz P/N, akut: akut-Kontrolle, alt: Alt-Kontrolle, SER bzw. LIQ na: Serum- bzw. Liquor in der ersten Verdünnung, SER bzw. LIQ nb: Serum- bzw. Liquor in der zweiten Verdünnung

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	R P/N a	KoAg	SER 1c	KoAg	SER 2c	KoAg	R P/N a	KoAg	SER 1c	KoAg	SER 2c	KoAg
2	R P/N b	KoAg	SER 1d	KoAg	SER 2d	KoAg	R P/N b	KoAg	SER 1d	KoAg	SER 2d	KoAg
3	akut a	KoAg	LIQ 1a	KoAg	LIQ 2a	KoAg	akut a	KoAg	LIQ 1a	KoAg	LIQ 2a	KoAg
4	akut b	KoAg	LIQ 1b	KoAg	LIQ 2b	KoAg	akut b	KoAg	LIQ 1b	KoAg	LIQ 2b	KoAg
5	alt a	KoAg	LIQ 1c	KoAg	LIQ 2c	KoAg	alt a	KoAg	LIQ 1c	KoAg	LIQ 2c	KoAg
6	alt b	KoAg	LIQ 1d	KoAg	LIQ 2d	KoAg	alt b	KoAg	LIQ 1d	KoAg	LIQ 2d	KoAg
7	SER 1a	KoAg	SER 2	KoAg	R P/N a	KoAg	SER 1a	KoAg	SER 2	KoAg	R P/N a	KoAg
8	SER 1b	KoAg	SER 2b	KoAg	R P/N b	KoAg	SER 1b	KoAg	SER 2b	KoAg	R P/N b	KoAg

Abbildung 3: Beschickung der Mikrotitrationsplatte beim ZNS-Test mit vier Probenverdünnungen

R P/N a bzw. b: Referenz P/N in erster bzw. zweiter Verdünnung, akut a bzw. b: Akut-Kontrolle in erster bzw. zweiter Verdünnung, alt a bzw. b: Alt-Kontrolle in erster bzw. zweiter Verdünnung, SER bzw. LIQ na-d: Serum- bzw. Liquor in der ersten bis vierten Verdünnung

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

Tabelle 9 gibt Aufschluss über Reagensmengen, -verdünnungen, Temperaturen und Inkubationszeiten:

Tabelle 9: Ablauf des ZNS-Tests

Reagens	Verdünnung	Inkubationszeit	$\mu\text{l}$	Temperatur
Proben	individuell	3 h	100	Raumtemperatur oder 37°C mit Aufheizen
Aviditäts-/Referenzreagens	4M Urea-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 min	150	Raumtemperatur
Konjugat	1:30	1,5 h	100	Raumtemperatur oder 37°C mit Aufheizen
Chromogen TMB	1:11	0,5 h	100	Raumtemperatur
Stopplösung POD	wie geliefert	-	100	Raumtemperatur

Im Anschluss wurden auch hier photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm die Extinktionen gemessen und wiederum anschließend von der Extinktion des Antigens die zugehörige Kontrollantigenextinktion subtrahiert.

Sämtliche Testläufe wurden ab der Konjugatinkubation mit dem Mikrotiterplattenanalysegerät Behring ELISA Processor III (BEP III) durchgeführt. Um dessen Kapazitäten besser auszunutzen zu können, wurde anfangs die Probeninkubation bei den ZNS-Tests extern durchgeführt. Die Mikrotitrationsplatten wurden dazu abgeklebt und bei Raumtemperatur in eine feuchte Kammer gestellt. Daraufhin wurden die Platten manuell abgesaugt und jeder Napf mit der Pufferlösung POD versehen. Nach dem anschließenden denaturierenden Waschschritt leistete dann der BEP III automatisch die weitere Arbeit.

Nachdem im Verlauf der Untersuchungen noch ein zweiter BEP III zur Verfügung stand, wurden sämtliche Tests vollständig automatisch damit abgearbeitet, d.h. einschließlich der Probeninkubation und des ersten Waschschrittes.

Die vom BEP III ermittelten Extinktionen werden in der vorliegenden Arbeit auch synonym als „optische Dichten“ (OD) bezeichnet.

### 2.2.3 Berechnung der Avidität

#### 2.2.3.1 Aviditätsindex aus Einpunktbestimmung mit Extinktionen

Für die Berechnung des Aviditätsindex aus Extinktionen von Einpunktbestimmungen wurden die Extinktionen einer Probe, die mit Aviditäts- und Referenzwaschgang aus derselben Probenverdünnung ermittelt worden war, in ein Verhältnis gesetzt. Der Aviditätsindex in Prozent ergibt sich aus dem Extinktionsquotienten multipliziert mit 100 wie in Gleichung 1:

Gleichung 1:

$$\text{Aviditätsindex [\%]} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Aviditätsreagens}}}{\text{Extinktion}_{\text{Referenzreagens}}} \times 100\%$$

#### 2.2.3.2 Aviditätsindex aus Einpunktbestimmung mit Einpunktquantifizierung ( $\alpha$ -Methode)

Durch die von Dade Behring entwickelte sogenannte  $\alpha$ -Methode (Dopatka, 1992) werden Extinktionen aus einer Probenverdünnung rechnerisch in Antikörperaktivitäten mit der Einheit IU/l (für Anti-VZV-IgG und Anti-Masernvirus-IgG) umgewandelt. Der Aviditätsindex aus Einpunktbestimmung mit Einpunktquantifizierung wird unter Verwendung des Aktivitätswertes anstelle der Extinktionen wie oben unter 2.2.3.1 mit folgender Gleichung 2 beschrieben berechnet:

Gleichung 2:

$$\text{Avidität [\%]} = \frac{\text{Aktivität}_{\text{Aviditätsreagens}}}{\text{Aktivität}_{\text{Referenzreagens}}} \times 100\%$$

### 2.2.3.3 Endpunkttitermethode

Für die Endpunkttitermethode wurden von einer Probe zwei Verdünnungsreihen mit jeweils vier Verdünnungen angelegt. Die eine Reihe wurde mit denaturierendem Reagens, die andere mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden graphisch die Extinktionen über der Verdünnung in zwei Kurven aufgetragen.

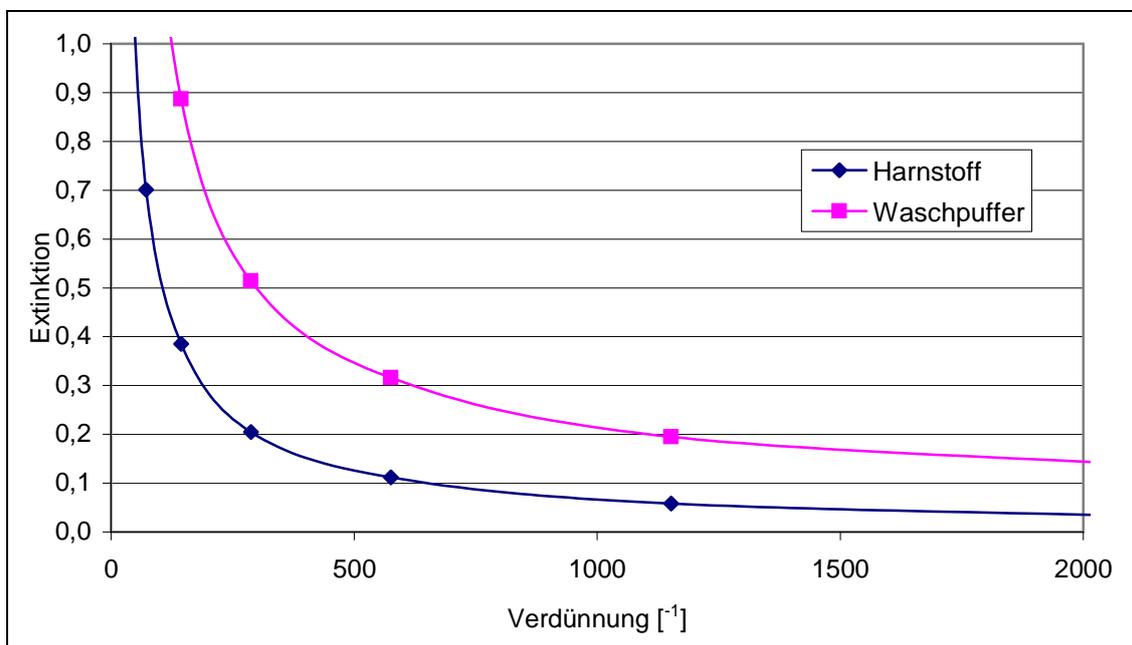


Diagramm 1: Extinktionen aus beiden Waschgängen in Abhängigkeit von der entsprechenden Verdünnung

Es wurden für beide Kurven diejenigen Verdünnungen durch Interpolation ermittelt, bei denen eine Extinktion von 0,2 („Cut-off“) erreicht wurde. Durch Division der beiden Ergebnisse erhält man den Aviditätsindex mit Werten zwischen 0 und 100%.

Zur Berechnung des Aviditätsindex mit der Endpunkttitermethode wurde auch die von Hedman und Mitarbeitern entwickelte Computersoftware „Avidity 1.2“ eingesetzt. Das Programm ermöglicht eine einfache und schnelle Berechnung der Avidität aus zwei anstatt vier Verdünnungen (Korhonen, 1999).

### 2.2.3.4 Geradenmethode

Da sich die unter 2.2.3.1 bis 2.2.3.3 beschriebenen Methoden zur Aviditätsberechnung als unzureichend für Untersuchungen der Serum-Liquor-Paare herausgestellt hatten, war es notwendig, eine neue Rechenmethode zu entwickeln, mit der Aviditätsdifferenzen zwischen Serum und Liquor unabhängig von der Probenverdünnung möglichst exakt und reproduzierbar berechnet werden konnten.

Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich bei Verdünnungsreihen, dass zwischen den Extinktionen aus Referenz- und denaturierendem Waschgang ein annähernd linearer Zusammenhang besteht. Dieser wurde für die Aviditätsbestimmung ausgenutzt (siehe Beispiel 1, S. 31).

Serum-Liquor-Paare wurden im ZNS-Test in zwei oder vier Verdünnungen getestet. Die Extinktionen wurden graphisch dargestellt, indem auf der x-Achse die nativen und auf der y-Achse die Extinktionen aus dem denaturierenden Waschgang aufgetragen wurden. Durch Verbindung der Punkte resultieren Geraden, deren Verlauf mit der allgemeinen Geradengleichung (Gleichung 3) beschrieben werden kann:

Gleichung 3:

$$y = mx + c$$

m: Steigung  
c: Konstante

Mit Gleichung 3 kann nun fiktiv für jedes beliebige x, also die Nativ-Extinktion, jedes y, also die Denaturiert-Extinktion ausgerechnet werden. Dividiert man wiederum diese y-Werte durch das zugehörige x, erhält man folgende Gleichung 4 für die Avidität:

Gleichung 4:

$$\text{Avidität [\%]} = \frac{mx + c}{x} \times 100\%$$

Als Standard-x-Wert wurde sowohl für Masern als auch VZV 2,0 gewählt.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

Eine Vereinfachung der Formel zur Aviditätsberechnung ergibt sich, wenn angenommen wird, dass die Geraden im Extinktions-Extinktions-Diagramm durch den Ursprung verlaufen. Dann entspricht der nach obiger Gleichung 4 berechnete Aviditätsindex der Steigung der Extinktions-Extinktions-Geraden. Diese Annahme erwies sich jedoch nicht in allen Fällen als richtig, so dass die Steigung  $m$  als Aviditätsmaß im Ergebnisteil nicht weiter berücksichtigt wird.

Im Rahmen der Auswertung wurde die Liquoravidität stets mit der Avidität der dazugehörigen Serumprobe verglichen. Die Ergebnisse für Serum und Liquor eines jeden Paares aus obiger Gleichung wurden nun in folgende Gleichung 5 eingesetzt, um die Differenz zwischen Serum und Liquor zu erhalten:

Gleichung 5:

$$\Delta \text{ Avidität} = \text{ Avidität}_{\text{Liquor}} - \text{ Avidität}_{\text{Serum}}$$

Als grundlegende Hypothese für die Berechnung der Aviditäten und deren Differenzen galt, dass sich die Aviditäten von Serum und Liquor nicht unterscheiden, deren Differenzen also Null oder annähernd Null betragen. Daher wurden die Aviditäten so berechnet, dass der Betrag der Differenz so gering wie nur möglich ausfiel.

Damit waren folgende allgemeine Kriterien unbedingt maßgeblich für die Auswahl der Extinktionswerte, die zur Aviditätsberechnung herangezogen wurden:

Die Ergebnisse jedes Serum-Liquor-Paares aus dem ZNS-Test wurden graphisch im Extinktions-Extinktions-Diagramm als Geradenpaar dargestellt. Grundvoraussetzung war, dass beide Geraden linear oder annähernd linear sein mussten. Auf ihnen wurden Abschnitte gesucht, die möglichst parallel oder deckungsgleich zueinander lagen. Die  $x$ -Werte dieser Abschnitte sollten möglichst ähnliche Beträge haben und den für die Berechnungen verwandten Standard- $x$ -Wert 2,0 einrahmen. Dazu wurden die  $x$ -Werte grundsätzlich aus dem Intervall  $0,2 \leq x \leq 3,0$  gewählt. Extinktionswerte größer als 3,0 liegen im Sättigungsbereich des ELISA und sind daher zur Berechnung nicht verwertbar. Werte unter 0,2 zeigten oft keine Linearität mehr und wurden deshalb ebenfalls in die Berechnungen nicht mit einbezogen.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

Die beiden x-Wert-Punkte, die zur Berechnung verwendet wurden, sollten optimalerweise einen 1:4-Verdünnungsschritt auseinanderliegen. Dies war bei den meisten Tests mit vier Verdünnungen sowie bei den Testläufen mit nur zwei Verdünnungen im Abstand 1:4 gewährleistet. Falls auf Grund nicht optimaler Ausgangsverdünnungen Punkte im Abstand 1:4 in der Graphik keine parallelen oder deckungsgleichen Geraden ergaben, konnten auch Ergebnisse aus 1:2-Verdünnungsschritten genommen werden, wenn damit parallele oder deckungsgleiche Geraden erstellt werden konnten.

Folgendes Beispiel 1 veranschaulicht die Aviditätsberechnung:

Beispiel 1:

In nachfolgendem Extinktions-Extinktions-Diagramm 2 haben die Geraden von Serum und Liquor einen sehr ähnlichen, linearen Verlauf:

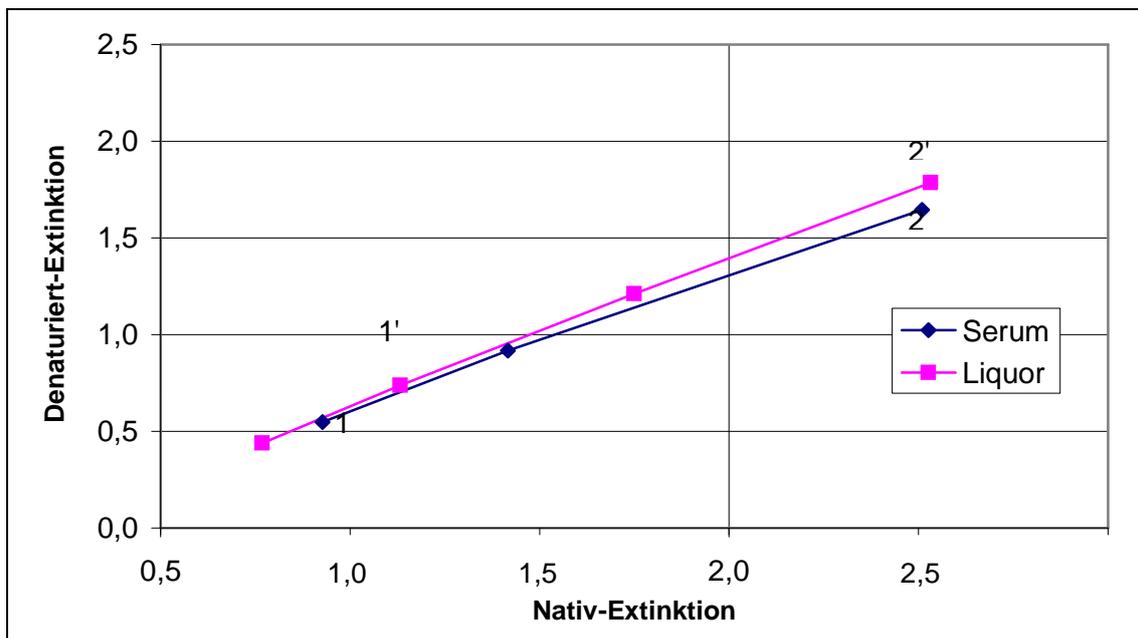


Diagramm 2: Beispiel einer Reihenverdünnung eines Serum-Liquor-Paares

Für  $x = 2,0$  wird für beide Geraden der y-Wert errechnet. Entsprechend der allgemeinen Kriterien werden dazu zwei Punkte pro Gerade ausgewählt, die möglichst  $x = 2,0$  einrahmen, deren x-Werte ähnliche Beträge haben, und die zwei Verdünnungsschritte und damit im Verhältnis 1:4 auseinanderliegen. In obigem

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

Fall trifft dies für diejenigen Punkte zu, die mit 1 bzw. 1' und 2 bzw. 2' markiert sind. Deren Werte zeigt Tabelle 10:

Tabelle 10: x- und y-Werte der markierten Punkte aus Diagramm 2

	x	y
<b>1</b>	0,927	0,548
<b>1'</b>	1,133	0,738
<b>2</b>	2,509	1,646
<b>2'</b>	2,532	1,785

Aus diesen Werten werden mit der Geradengleichung die Aviditäten von Serum und Liquor berechnet.

Für die Geradengleichung gilt:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \text{bzw.} \quad m = \frac{y_2' - y_1'}{x_2' - x_1'} \quad \text{mit} \quad 0,2 \leq x \leq 3,0$$

$$c = y_2 - mx_2 \quad \text{bzw.} \quad c' = y_2' - mx_2' \quad \text{mit} \quad 0,2 \leq x \leq 3,0$$

Damit ergeben sich folgende Werte (Tabelle 11):

Tabelle 11: Ergebnisse für Werte aus Diagramm 2 und Tabelle 10, interpoliert auf  $x = 2$

	Avidität	Differenz
<b>Serum</b>	64,64%	4,71%
<b>Liquor</b>	69,34%	

Bei Verwendung der Steigung  $m$  als Aviditätsmaß ergeben sich folgende Werte (Tabelle 12):

Tabelle 12: Ergebnisse für Werte aus Diagramm 2 und Tabelle 10, Steigung als Aviditätsmaß

	Steigung	Differenz
<b>Serum</b>	69,41%	5,43%
<b>Liquor</b>	74,84%	

Falls alle im ELISA ermittelten x-Werte kleiner als 2,0 waren, wurden die Aviditäten per Extrapolation berechnet (siehe Beispiel 2, folgende Seite). Unbedingt

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

notwendige Voraussetzung hierfür war, dass auch im Bereich  $0,2 \leq x \leq 2,0$  die Geradenabschnitte im Diagramm Linearität aufwiesen.

Beispiel 2:

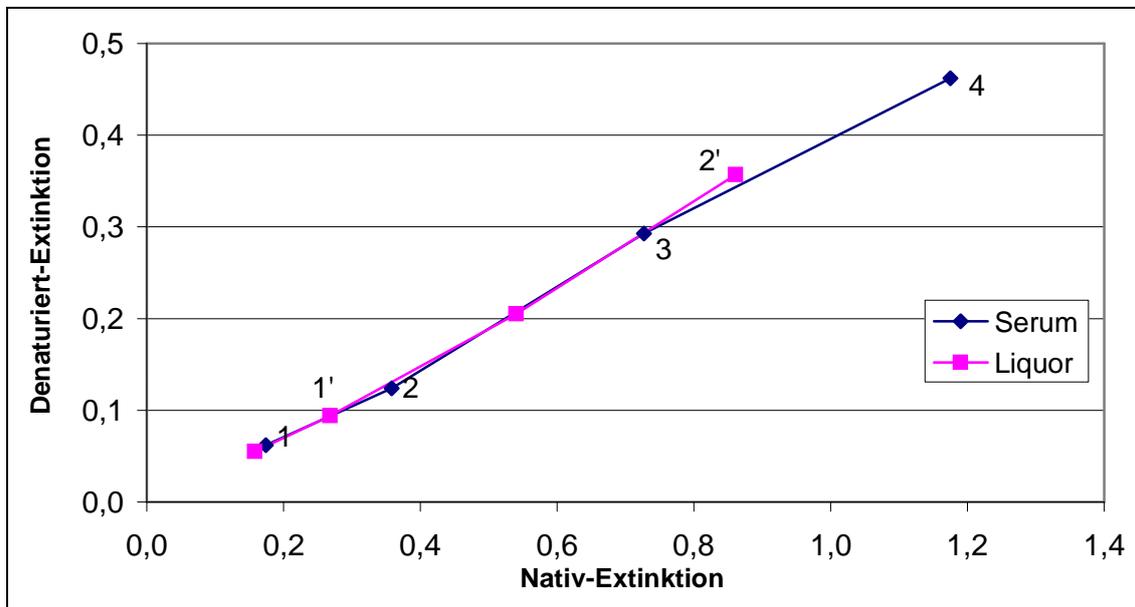


Diagramm 3: Beispiel einer Reihenverdünnung mit jeweils vier Verdünnungen eines Serum-Liquor-Paares, alle x-Werte kleiner als 2,0

In diesem Beispiel sind alle x-Werte beider Geraden zwar kleiner als 2,0 aber teilweise noch größer als 0,2. Da bei beiden Geraden Linearität als Grundvoraussetzung vorliegt, kann extrapoliert werden.

Für die Avidität des Liquors werden die Punkte 1' und 2' im Abstand 1:4 für die Berechnung hergenommen. Für die des Serums erweisen sich bei diesem Beispiel die Punkte 2 und 3 im Abstand 1:2 als am günstigsten. Damit unterscheiden sich die beiden Aviditäten nämlich um nur -0,69%.

Wählte man die Punkte 1 und 3 oder 2 und 4, wäre die Differenz größer, nämlich 1,87 bzw. 2,94%.

Zur Evaluierung dieser Rechenmethode siehe Kapitel 3.1.3 (S. 46).

### 2.3 Testwiederholung

Wenn die oben genannten Kriterien (Linearität und Parallelität der Geraden; x-Werte aus dem Intervall  $0,2 \leq x \leq 3,0$  mit ähnlichen Beträgen auf beiden Geraden, die möglichst  $x = 2,0$  einrahmen; Verdünnungsabstand möglichst 1:4) beim ersten Testlauf nicht erfüllt worden waren, oder die initial erzielten Testergebnisse von Serum-Liquor-Paaren aus anderen Gründen (siehe unten) nicht verwertbar oder unplausibel gewesen waren, wurden Testwiederholungen durchgeführt. Grundsätzlich flossen die Ergebnisse des Wiederholungstests in die Auswertung ein, wenn diese den allgemeinen Kriterien entsprachen und nicht wiederum zur Testwiederholung zwangen.

Im Einzelnen haben folgende Situationen zu Testwiederholungen geführt:

- a) Die graphische Darstellung zeigte wie in Beispiel 3 keine Linearität als wichtigstes Kriterium für die Verwertbarkeit.

Beispiel 3:

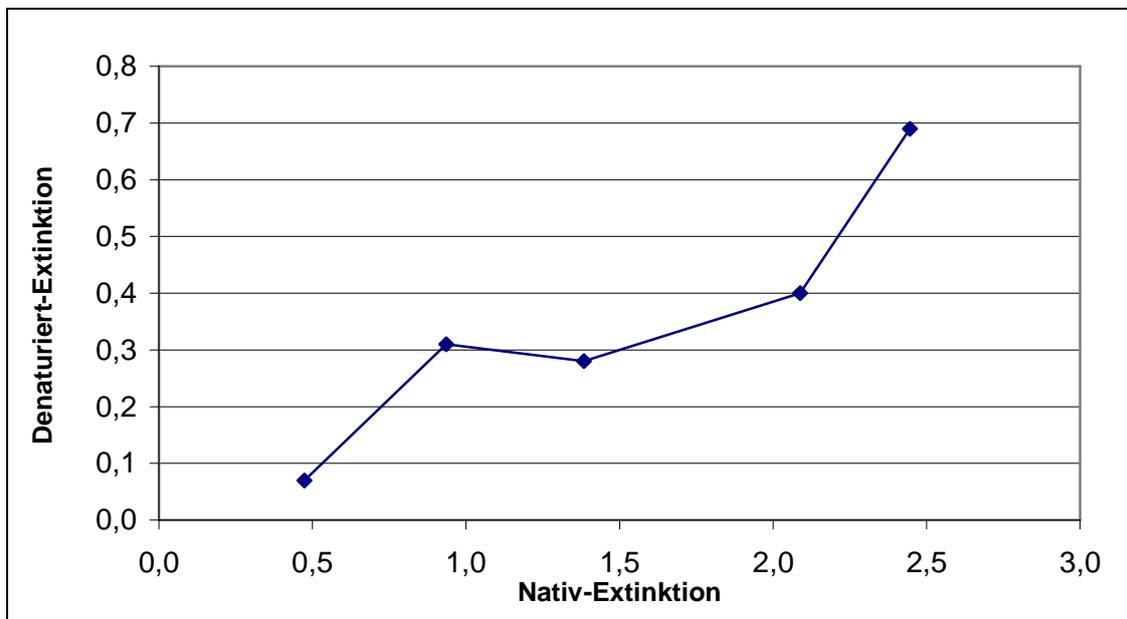


Diagramm 4: Beispiel für eine Probe, die im ersten Testlauf keine Linearität zeigte.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

- b) Die Verdünnung der Probe war zu hoch oder zu niedrig, so dass mindestens zwei Extinktionen aus dem Referenzwaschgang nicht im Intervall 0,2 bis 3,0 lagen. Grundsätzlich ist der Test in höheren Verdünnungen wiederholt worden, wenn sämtliche x-Werte größer als 2,0 waren.
- c) Auf Grund unzureichender Verdünnung lagen die Extinktionen aus dem Referenzwaschgang beider Proben zwar im Intervall  $0,2 \leq x \leq 3,0$  doch zu weit auseinander, so dass sich im Diagramm die Geraden nicht deckten, d.h. die x-Werte nicht ähnliche Beträge hatten (siehe Beispiel 4). Auch wenn sich möglicherweise rechnerisch sogar gleiche oder ähnliche Aviditäten ergaben, ist ein solches Probenpaar in anderen Verdünnungen wiederholt untersucht worden.

Beispiel 4:

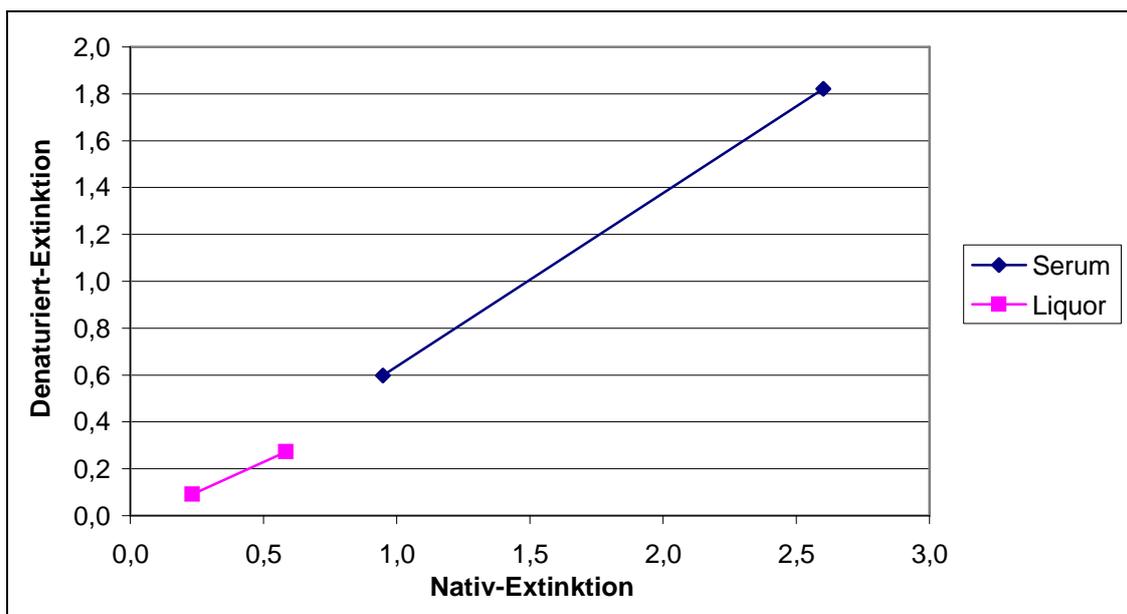


Diagramm 5: Beispiel für x-Werte, die zu weit auseinanderliegen.

- d) Während der Untersuchungen zeigte sich, dass die Geraden im Diagramm in Verlängerung durch den Nullpunkt verlaufen bzw. die x- oder y-Achse nahe des Ursprungs schneiden. Wenn nun die Konstellation der Geraden wie in Beispiel 5 gezeigt vermuten ließ, dass mindestens eine der Geraden

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

---

nicht dieses Merkmal aufwies, ist der Test mit diesem Probenpaar wiederholt worden:

Beispiel 5:

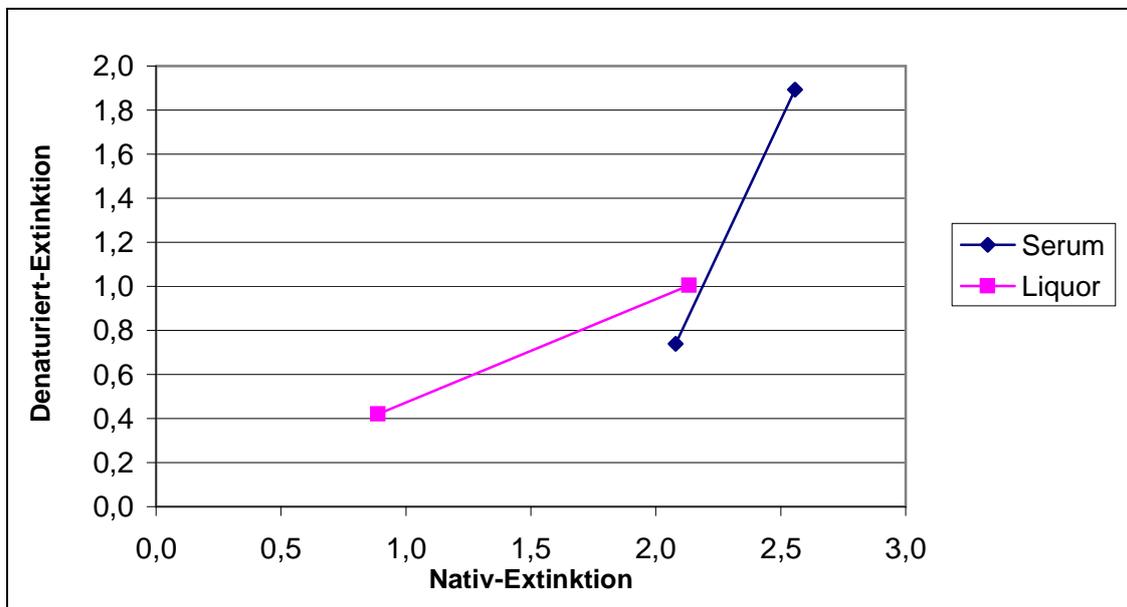


Diagramm 6: Beispiel, bei dem die Verlängerung der Gerade einer Serumprobe nicht durch oder nahe des Ursprungs verläuft.

Ergebnisse, die zuvor aus einem Testlauf mit zwei Verdünnungen stammten und wiederholt werden mussten, sind anschließend in vier Verdünnungen neu untersucht worden.

### 2.4 Statistische Testmethoden

Statistische Vergleiche wurden mit nichtparametrischen Standardtests (Mann-Whitney-U- und Wilcoxon-Test) durchgeführt.

Zum Ausrechnen der Ergebnisse diente gängige Software wie „SPSS®“ und „StatView® Student“.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Vortests zu VZV-Antikörpern

#### 3.1.1 Optimierung des Aviditätsreagens

Zunächst ist ein Test zur Aviditätsbestimmung von VZV-IgG-Antikörpern etabliert worden. Dazu wurden zuerst optimale Bedingungen für den denaturierenden Waschgang ausgetestet, weswegen zwei Tests mit jeweils denselben sechs Patientenseren durchgeführt wurden. Beim ersten Test kam als Aviditätsreagens eine fünfmolare Harnstofflösung, beim zweiten eine viermolare Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung zum Einsatz.

Die Seren 12, 17 und 19.1 aus Tabelle 1 (S. 13) sowie 2 und 37 aus Tabelle 2 (S. 14) und 19.4 aus Tabelle 1 wurden für diese Evaluierung hergenommen. Bei ersteren Seren wurde auf Grund der Krankheitsdauer eine niedrige, bei letzteren eine hohe Avidität erwartet.

Die Proben wurden im Serumtest bearbeitet, und die Aviditätsindices aus den Extinktionen per Einpunktbestimmung errechnet. Folgendes Diagramm 7 stellt die ermittelten Aviditätsindices aus den beiden Tests gegenüber:

### 3. ERGEBNISSE

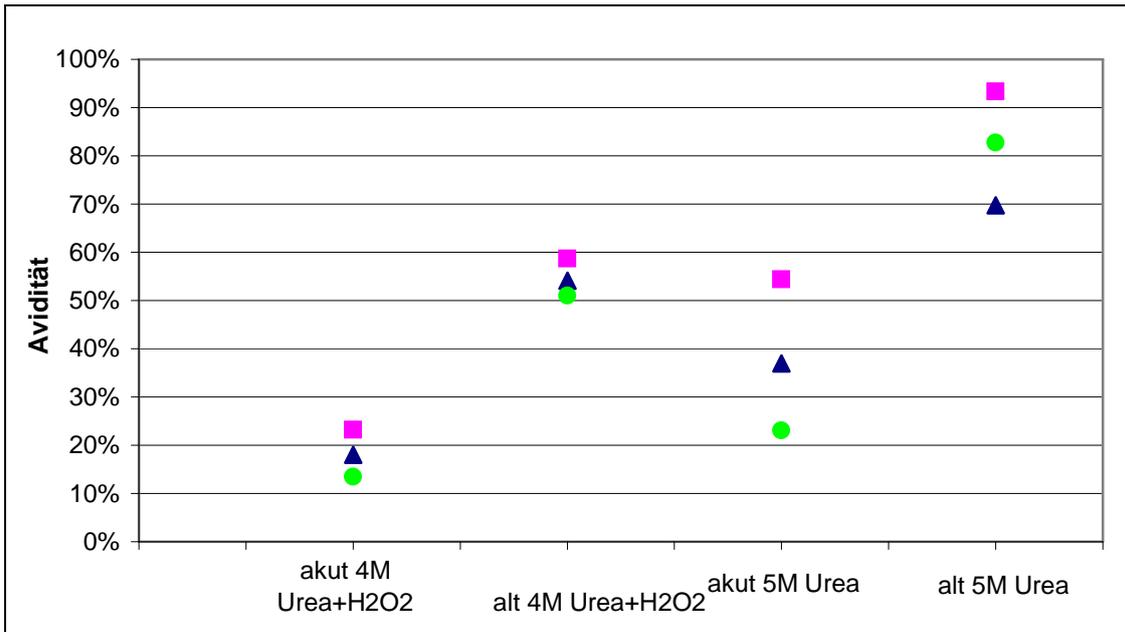


Diagramm 7: Vergleich von Urea und Urea+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Testung von jeweils drei Serumproben von akuter und lange zurückliegender VZV-Infektion

In Tabelle 13 stehen die Maxima der Aviditäten bei den akuten und die Minima bei den länger zurückliegenden Infektionen sowie deren Differenz gegenüber.

Tabelle 13: Maxima (Max) der Akut-Kontrollen und Minima (Min) der Alt-Kontrollen der Aviditätsindices sowie deren Differenz

	4M Urea+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5M Urea
<b>Max akut</b>	23,15%	54,39%
<b>Min alt</b>	51,01%	69,75%
<b>Differenz</b>	27,86%	15,36%

Mit beiden Reagenzien ist also eine Diskriminierung von niedrig- und hochaviden VZV-Antikörpern möglich. Auf Grund der größeren Differenz der Maxima und Minima mit viermolarer Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung, wurde für alle folgenden Tests zur Bestimmung der VZV-Avidität diese Lösung als Aviditätsreagens verwandt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1.2 Evaluierung des Anti-VZV-IgG-Aviditätstestes für Serumproben

##### 3.1.2.1 Aviditätsindex berechnet durch Einpunktbestimmung mit Extinktionen

Als Nächstes sollte festgestellt werden, ob mit dem Serumtest auf dem ELISA-Testkit auch für ein größeres Probenkollektiv eine gute Diskriminierung von akuten und alten VZV-Infektionen anhand des Aviditätsindex möglich ist.

Dazu wurden sämtliche 65 Serumproben aus Tabelle 1 (S. 13) und Tabelle 2 (S. 14) mit dem Serumtest per Einpunktbestimmung ausgetestet. Die Unterscheidung stellte sich als signifikant heraus, was Diagramm 8 zeigt:

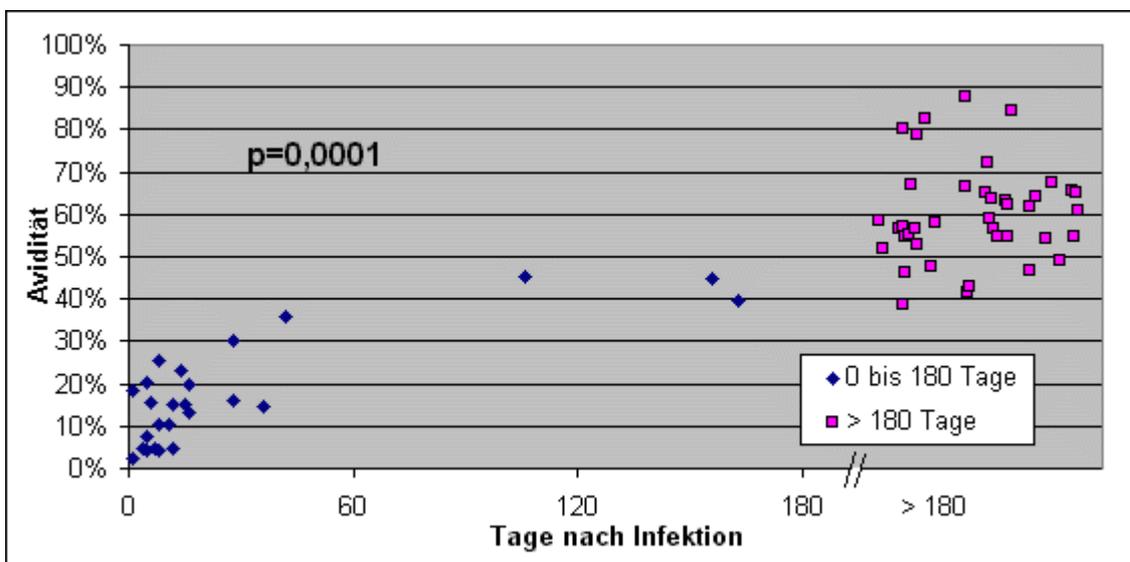


Diagramm 8: Diskriminierung akuter und alter VZV-Infektionen anhand Einpunkt-Aviditätsindex mit Extinktionen im VZV-IgG-Serumtest

Zu diesen Ergebnissen sind in folgender Tabelle 14 sowie in Diagramm 9 einige statistische Werte aufgeführt, die sich auf folgende Einteilung beziehen: Unter „akut“ sind diejenigen Aviditätswerte von Tag 0 bis 42 nach Infektion zusammengefasst, unter „alt“ diejenigen über 180 Tagen nach Infektion.

### 3. ERGEBNISSE

Tabelle 14: Minima, Maxima und Mittelwerte der VZV-Serumproben

	akut	alt
Minimum	2,44%	38,74%
Maximum	35,99%	87,56%
Mittelwert	14,38%	60,19%

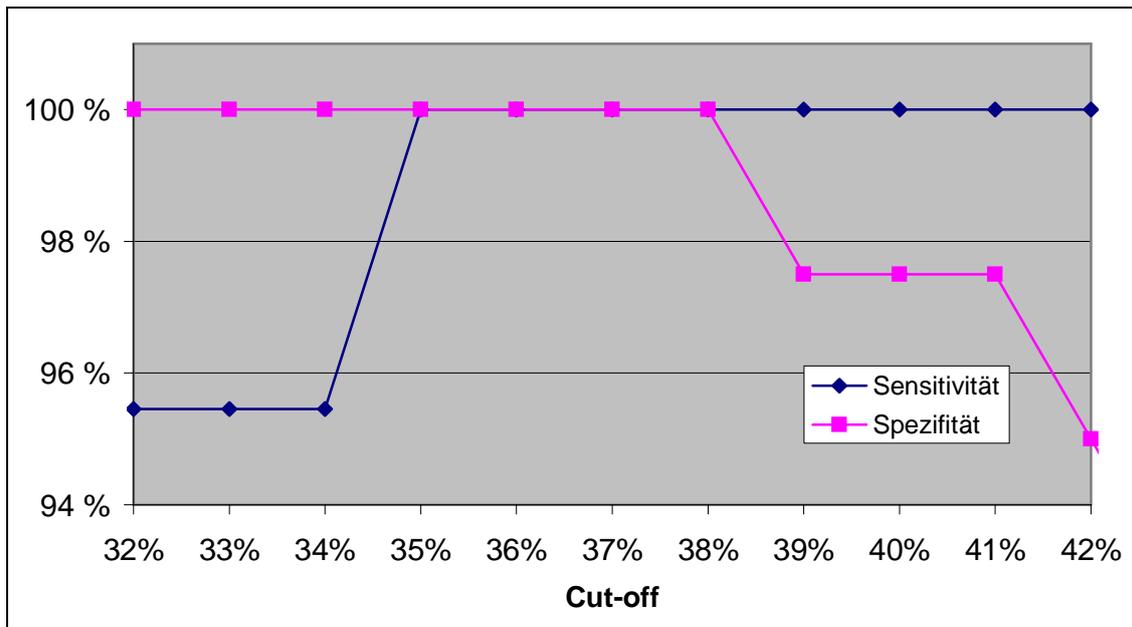


Diagramm 9: Sensitivität und Spezifität für die Diagnose bzw. den Ausschluss von akuten VZV-Infektionen in Abhängigkeit vom gewählten Cut-off

Diese Ergebnisse zeigen für die VZV-Serumproben mit dieser Testmethode eine Spezifität und Sensitivität von 100% im Intervall von 35% bis 38%. Das bedeutet, dass Anti-VZV-IgG aus Proben von Patienten mit einer akuten VZV-Infektion immer, d.h. in 100% der Fälle, eine Avidität  $< 35\%$  und von Patienten mit einer lange zurückliegenden Infektion immer eine Avidität  $> 38\%$  haben.

Da von den Patienten 18 und 19 aus Tabelle 1 (S. 13) mehrere Proben vorlagen, war es somit möglich, die Avidität der VZV-Antikörper im zeitlichen Verlauf darzustellen. Die Werte zeigen im folgenden Diagramm 10 stetig steigende Aviditätsindices mit zunehmender Krankheitsdauer:

### 3. ERGEBNISSE

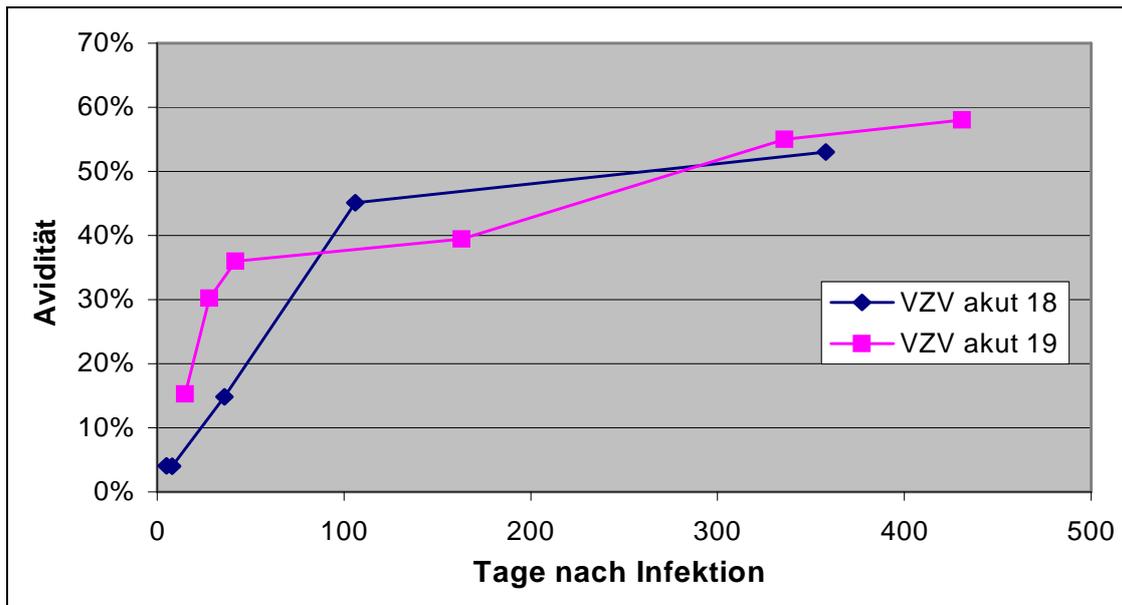


Diagramm 10: Aviditätsverläufe zweier akuter VZV-Infektionen

#### 3.1.2.2 Aviditätsindex berechnet durch Einpunktquantifizierung mittels $\alpha$ -Methode

Mit der Fragestellung, ob eine Diskriminierung in ebensolcher Weise möglich ist, wurden die Aviditätsindices derselben Serumproben auch noch mittels Einpunktquantifizierung gemäß der  $\alpha$ -Methode von Dade Behring berechnet. Mittels der  $\alpha$ -Methode können allerdings nur Titerwerte von wenigstens 50 IU/l errechnet werden. Bei Ergebnissen  $< 50$  IU/l liegt der eigentliche Wert also zwischen 0 und 50 IU/l. Der Aviditätsindex von Proben, bei denen der Harnstofftiter so niedrig gewesen ist, dass das Ergebnis  $< 50$  IU/l beträgt, ist also der oberste Grenzwert für einen Aviditätswert, dessen eigentlicher Betrag im Intervall zwischen diesem und 0 zu suchen ist.

Diagramm 11 zeigt nun die Einpunkt-Aviditätsindices mit  $\alpha$ -Methodentitern einschließlich dieser obersten Grenzwerte. Hier gilt wiederum: Unter „akut“ sind diejenigen Aviditätswerte von Tag 0 bis 42 nach Infektion zusammengefasst, unter „alt“ diejenigen über 180 Tagen nach Infektion.

### 3. ERGEBNISSE

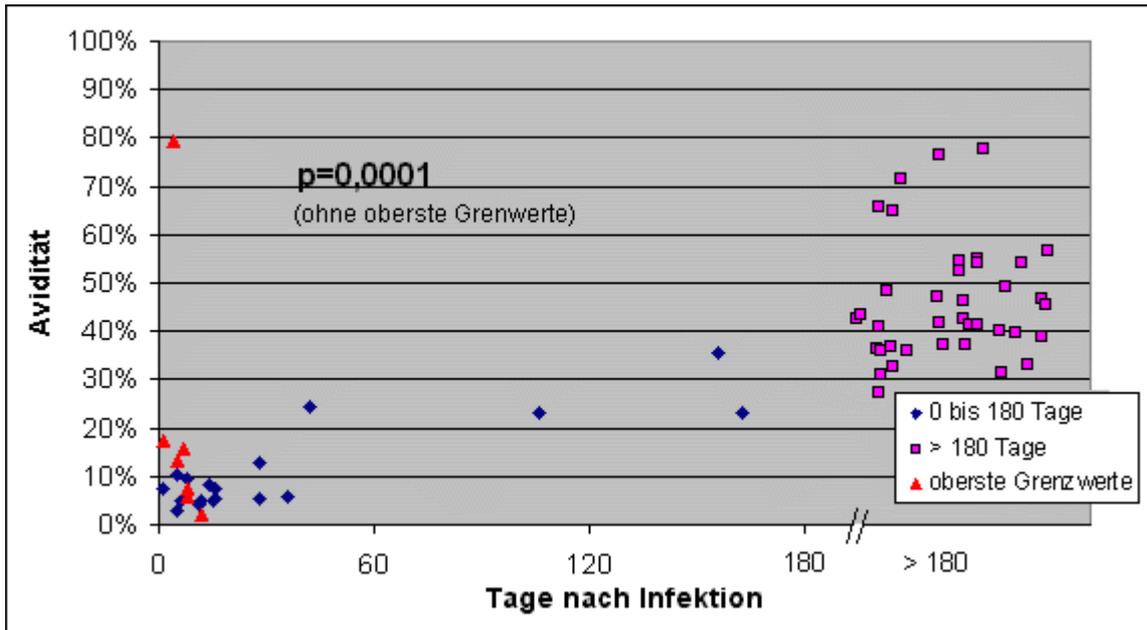


Diagramm 11: Diskriminierung akuter und alter VZV-Infektionen anhand Einpunkt-Aviditätsindex mit  $\alpha$ -Methodentitern im VZV-IgG-Serumtest

Tabelle 15: Minimal-, Maximal- und Mittelwerte der VZV-Serumproben

	akut	alt
<b>Minimum</b>	2,89%	27,08%
<b>Maximum</b>	24,29%	77,50%
<b>Mittelwert</b>	7,93%	46,10%

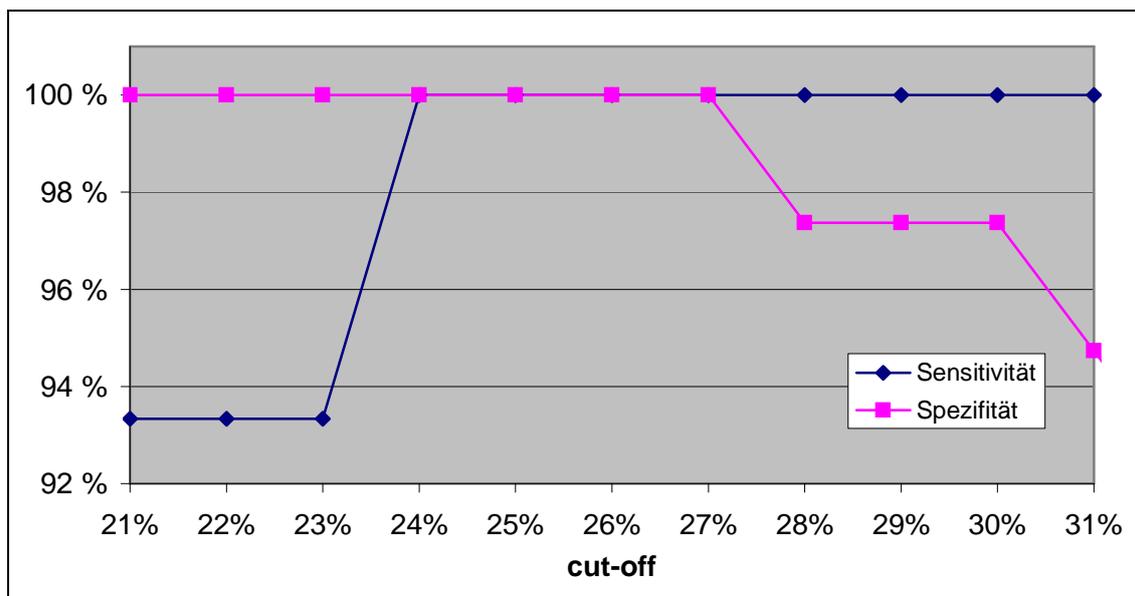


Diagramm 12: Sensitivität und Spezifität für die akuten VZV-Serumproben anhand Endpunkt-quantifizierung mit Serumtest

### 3. ERGEBNISSE

Auch für diese Testmethode kann infolge dieser Ergebnisse für VZV-Serumproben festgestellt werden, dass Anti-VZV-IgG aus Proben von Patienten mit einer akuten VZV-Infektion immer eine Avidität < 24% und von Patienten mit einer lange zurückliegenden Infektion immer eine Avidität > 27% haben.

Diagramm 13 veranschaulicht die Korrelation  $r$  der beiden Aviditätsindices:

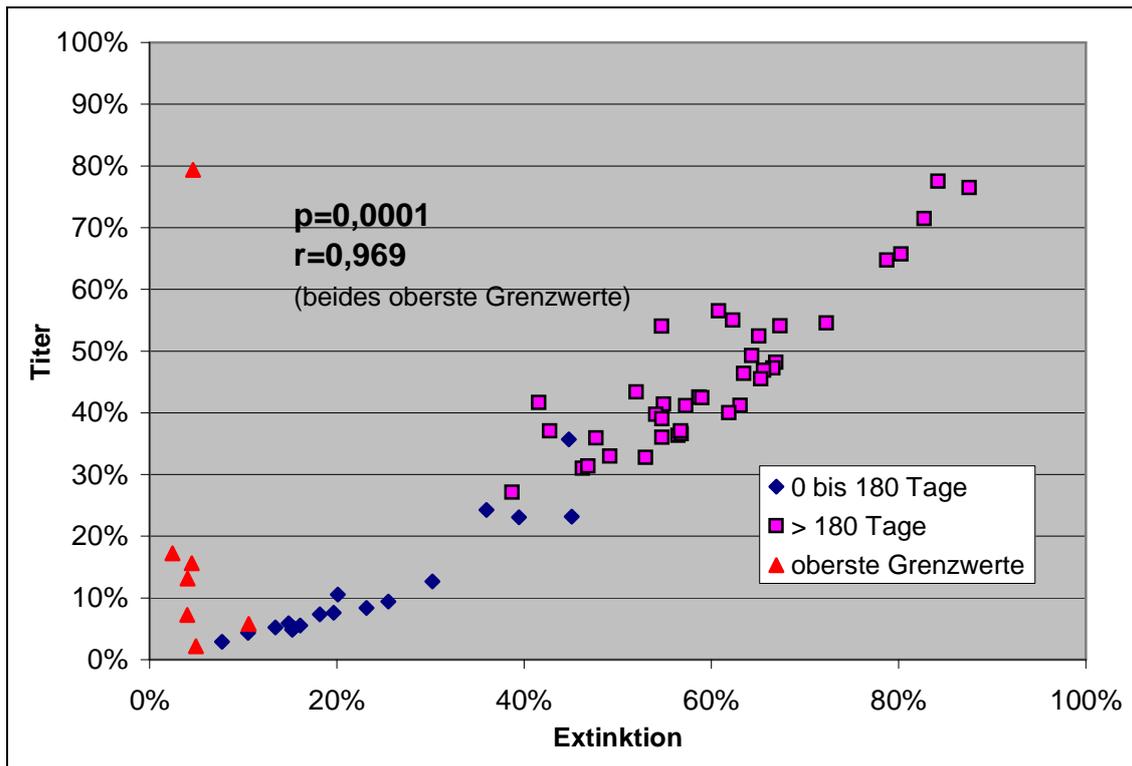


Diagramm 13: Korrelation der Aviditätsindices aus Extinktion bzw. Titer

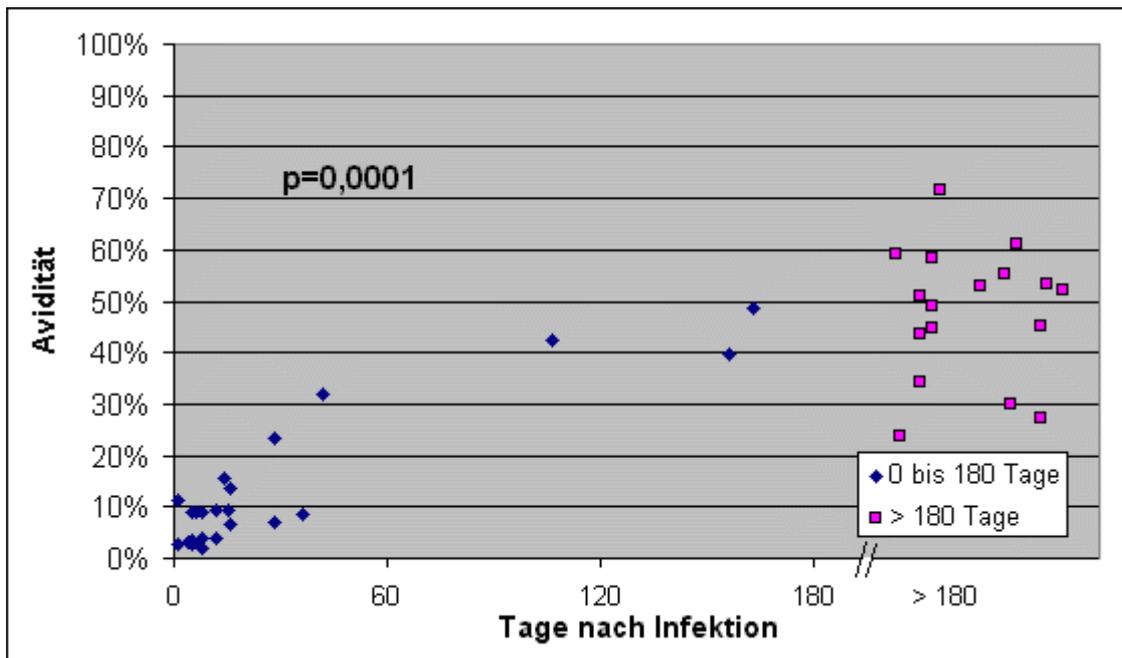
Weil jedoch diese Berechnungsmethode auf die für die Liquortestung modifizierte Testmethode nicht anwendbar war und auch gegenüber der Aviditätsberechnung mit Extinktionswerten keine Vorteile zeigte, wurde sie im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr verwandt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1.2.3 Modifikation des Serumtestes für Liquormessungen

Da für die Austestung der Serum-Liquor-Paare der ZNS-Test mit höheren Probenverdünnungen, verlängerten Inkubationszeiten und höherer Konjugatkonzentration herangezogen wurde, war es notwendig, auch bei diesem Test zu überprüfen, ob eine gute Diskriminierung von kürzlichen und alten Infektionen anhand der Aviditätsindices möglich ist, und ob diese Indices auch in etwa denen des Serumtests entsprechen.

Hierzu wurden nochmals 41 der zuvor verwandten 65 Serumproben mit dem ZNS-Test bei Raumtemperatur getestet. Die Aviditätsindices sind per Einpunktbestimmung aus den Extinktionen berechnet worden. Die Ergebnisse sind Diagramm 14 zu entnehmen:



### 3. ERGEBNISSE

Tabelle 16: Minimal-, Maximal- und Mittelwerte der VZV-Serumproben im ZNS-Test

	akut	alt
<b>Minimum</b>	1,95%	23,89%
<b>Maximum</b>	32,04%	71,56%
<b>Mittelwert</b>	8,94%	47,78%

Obwohl mit dieser Testmodifikation die Trennung zwischen Proben von Patienten mit akuter und lange zurückliegender Infektion nicht so gut wie mit dem in Kapitel 3.1.2.1 (S. 39) beschriebenen Serumtest ist, hat sich auch hier bei einem Cut-off von 23% eine hohe Sensitivität (100%) und Spezifität (95%) für die Diagnose bzw. den Ausschluss einer akuten VZV-Infektion ergeben, wie nachfolgendes Diagramm 15 nochmals veranschaulicht:

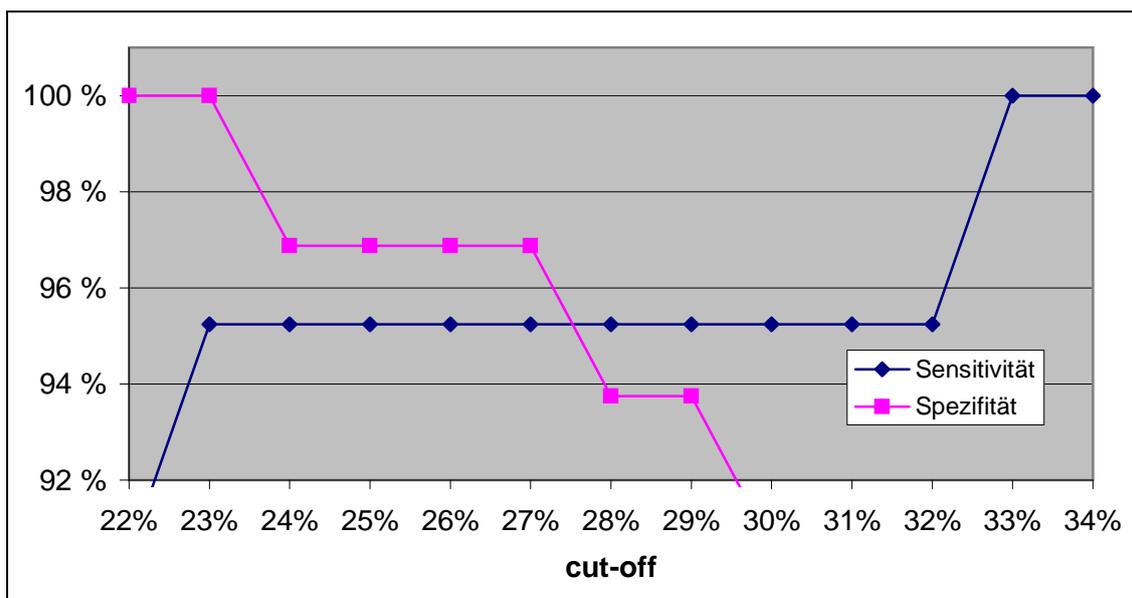


Diagramm 15: Sensitivität und Spezifität für die akuten VZV-Serumproben anhand ZNS-Test

Die Aviditätswerte des Serumtestes und die des modifizierten Testes haben darüber hinaus eine sehr gute Korrelation, wie nachfolgendes Diagramm 16 zeigt, so dass für die Testung von Liquorproben der modifizierte VZV-IgG-Aviditätstest als tauglich erschien und im folgenden ZNS-Test genannt wird.

### 3. ERGEBNISSE

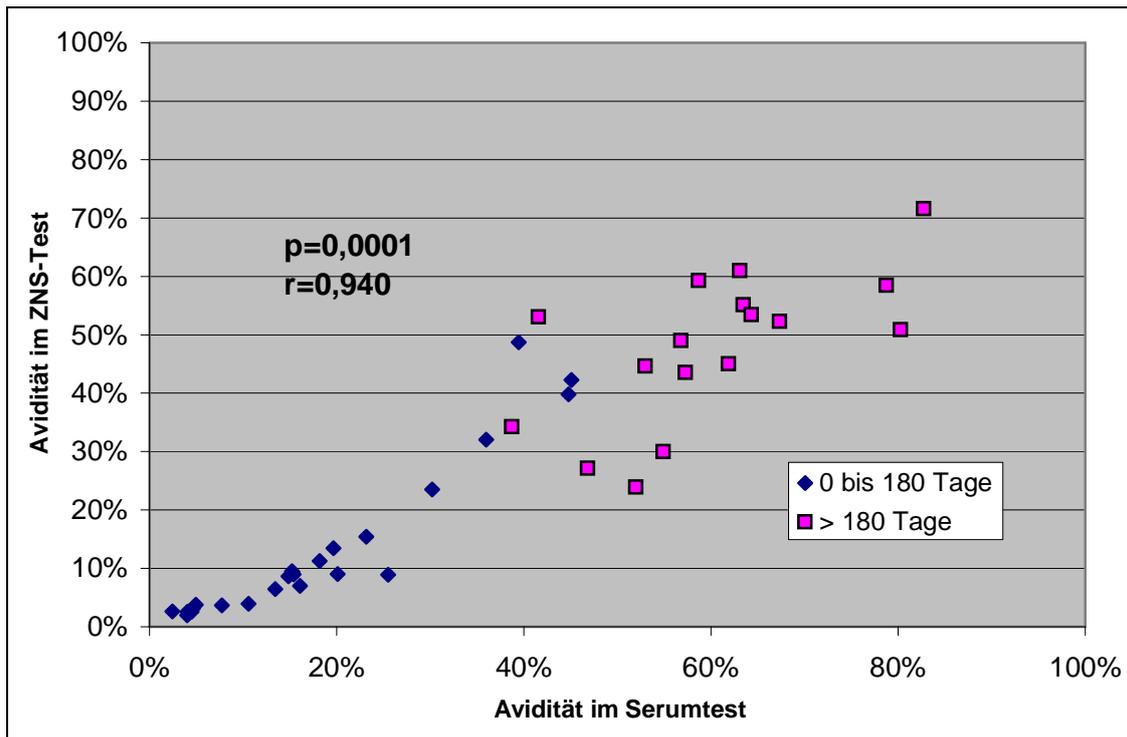


Diagramm 16: Korrelation der Aviditätsindices aus Serum- und ZNS-Test

### 3.1.3 Validierung der Aviditätsbestimmung im ZNS-Test

#### 3.1.3.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihen

Nach der Etablierung der Abarbeitungsparameter des ZNS-Testes wurden Proben aus den Patientenkollektiven kürzliche und lange zurückliegende Windpocken, VZV-Infektion und MS in Verdünnungsreihen mit dem ZNS-Test auf ihre VZV-Avidität hin untersucht. Dazu wurde von jeder Probe eine Verdünnungsreihe mit vier bis sechs Schritten im Abstand 1:2 angelegt. Mit der Einpunktbestimmung wurden für die jeweilige Verdünnung die Aviditätsindices aus den Extinktionswerten ermittelt. Es sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Aviditätswerte in Abhängigkeit von der Ausgangsextinktion schwanken. Dabei stellte sich heraus, dass die Indices innerhalb einer Verdünnungsreihe bei vielen Proben keinen konstanten Wert einnehmen. Es gab zwar einige Proben,

### 3. ERGEBNISSE

die über einen großen Extinktionsbereich konstante Aviditätsindizes liefern, aber demgegenüber nicht wenige mit erheblichen Schwankungen.

Für alle evaluierten Krankheitsentitäten sei dieses Phänomen in Beispielen in folgenden Diagrammen graphisch dargestellt. Auf der x-Achse sind dabei jeweils die nativen Extinktionen, auf der y-Achse die Aviditätsindizes aufgetragen.

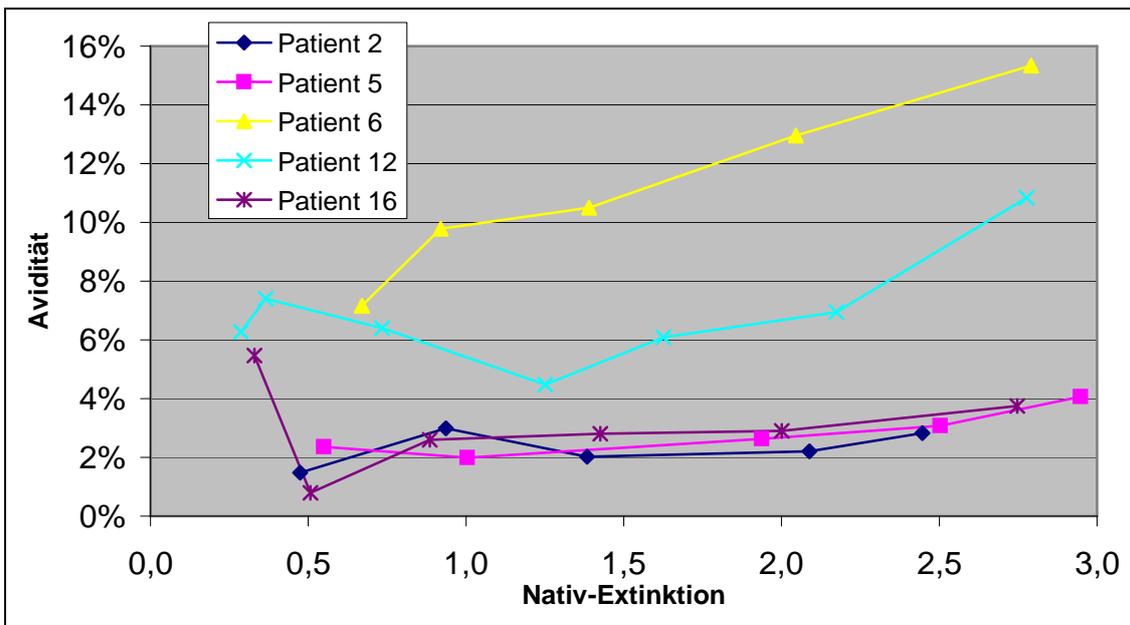


Diagramm 17: Aviditätsindizes einiger Patienten mit akuten Windpocken aus Tabelle 1 (S. 13)

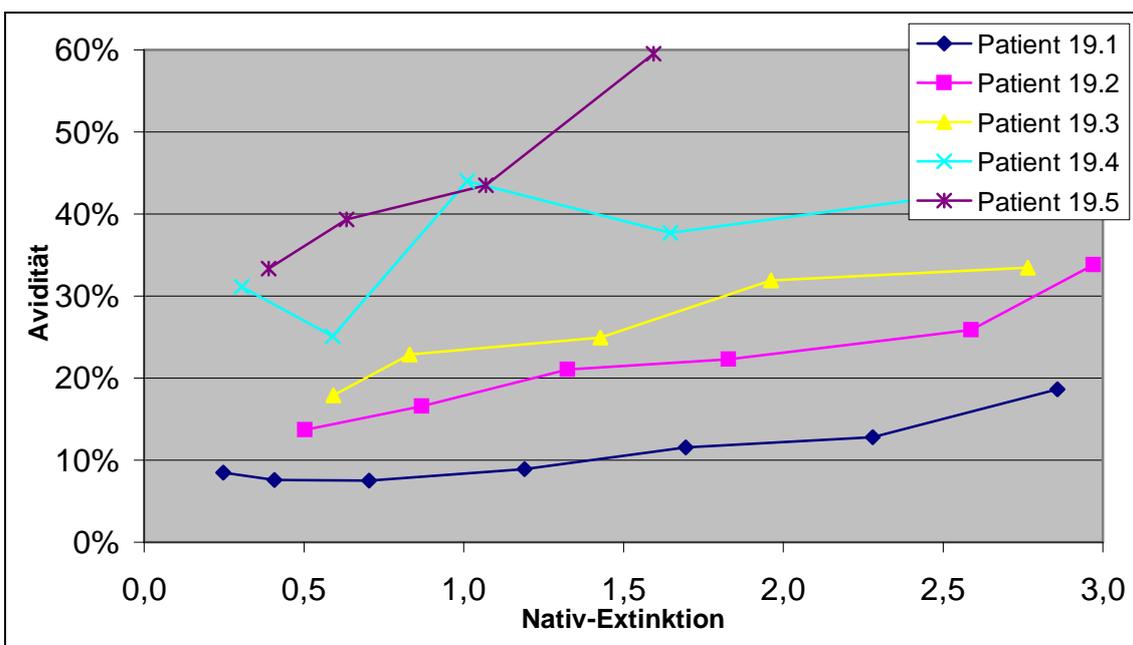


Diagramm 18: Aviditätsindizes von Patient 19 mit akuten und abgelaufenen Windpocken aus Tabelle 1 (S. 13)

### 3. ERGEBNISSE

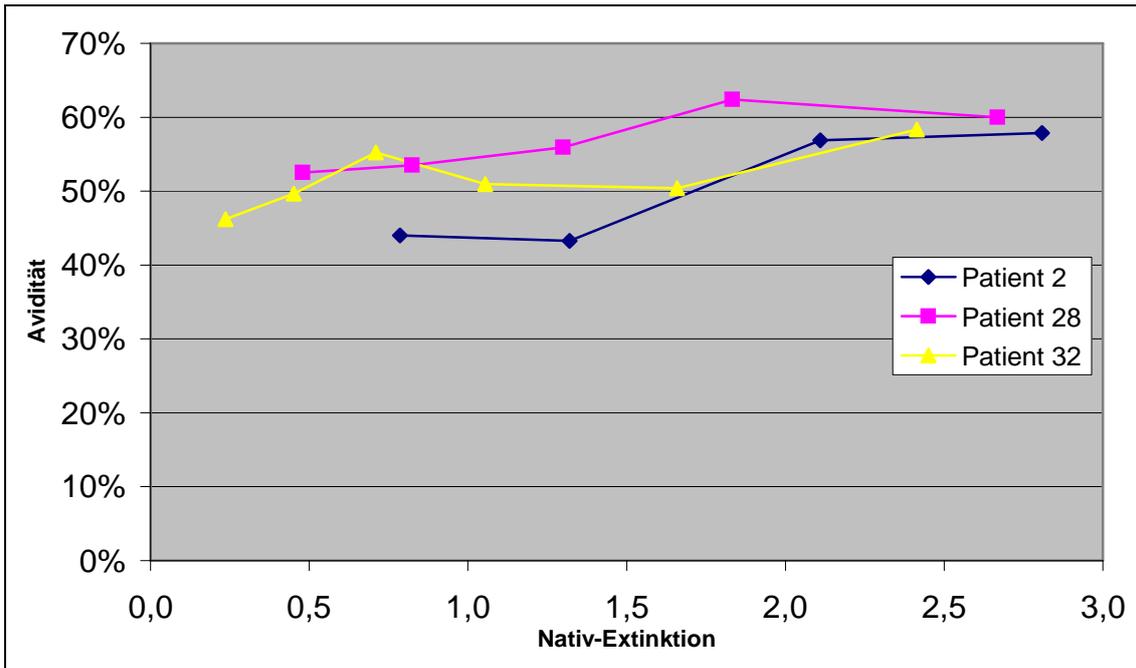


Diagramm 19: Aviditätsindices von Patienten mit abgelaufener VZV-Infektion aus Tabelle 2 (S. 14)

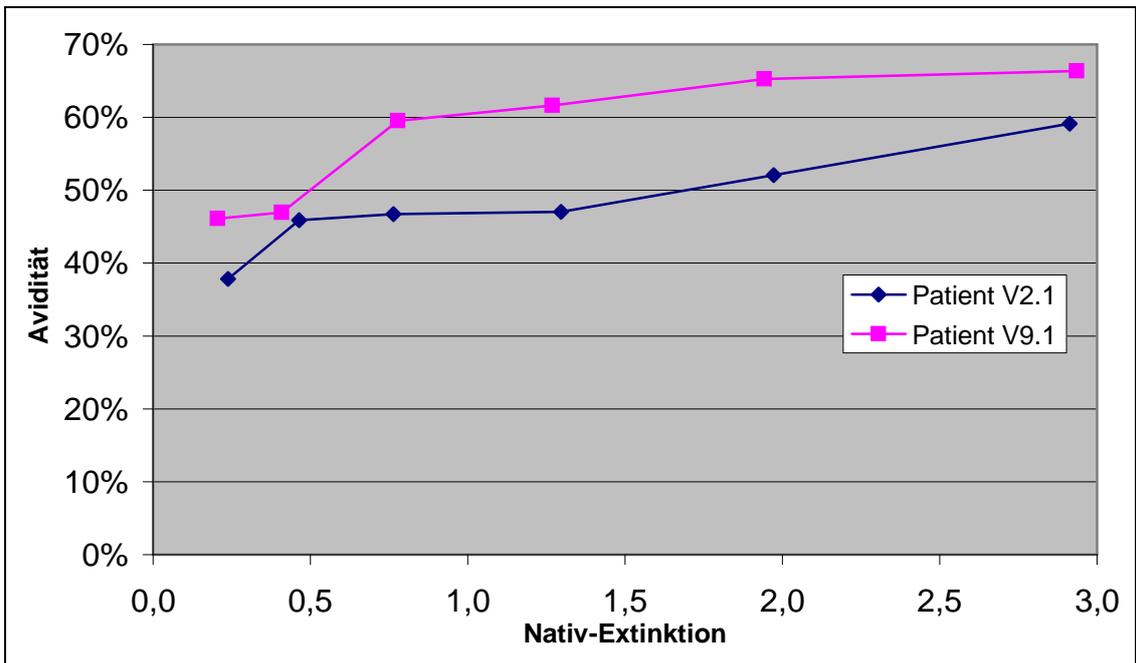


Diagramm 20: Aviditätsindices von Seren von Patienten mit VZV-Infektion aus Tabelle 3 (S. 16)

### 3. ERGEBNISSE

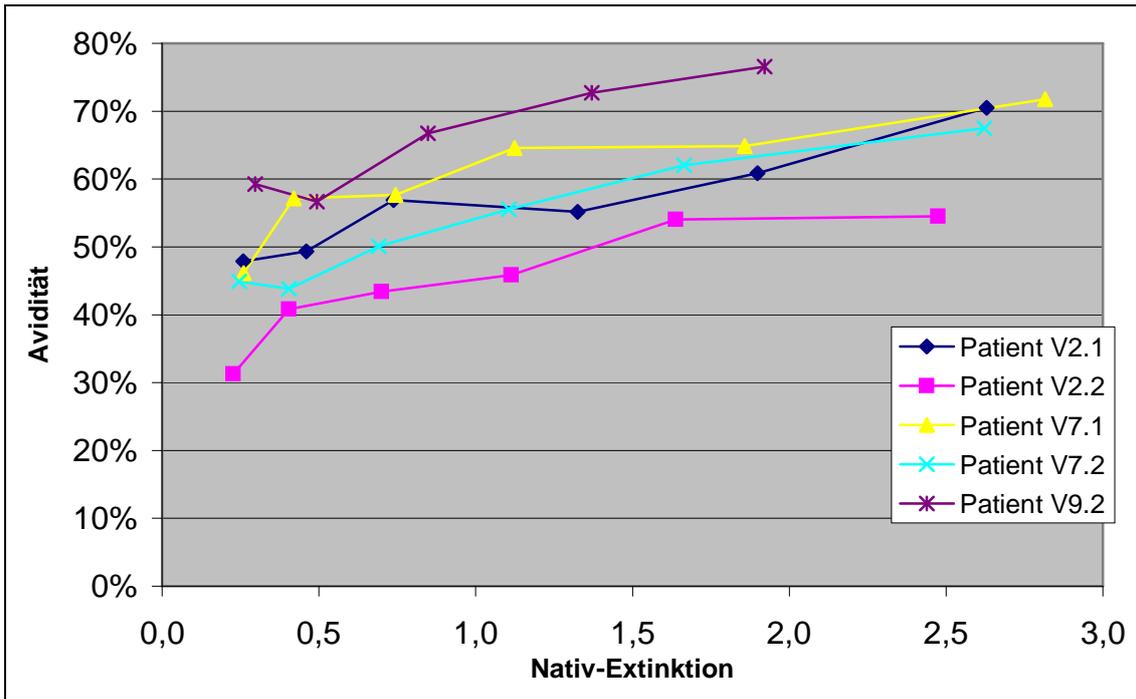


Diagramm 21: Aviditätsindices von Liquores von Patienten mit VZV-Infektion aus Tabelle 3 (S. 16)

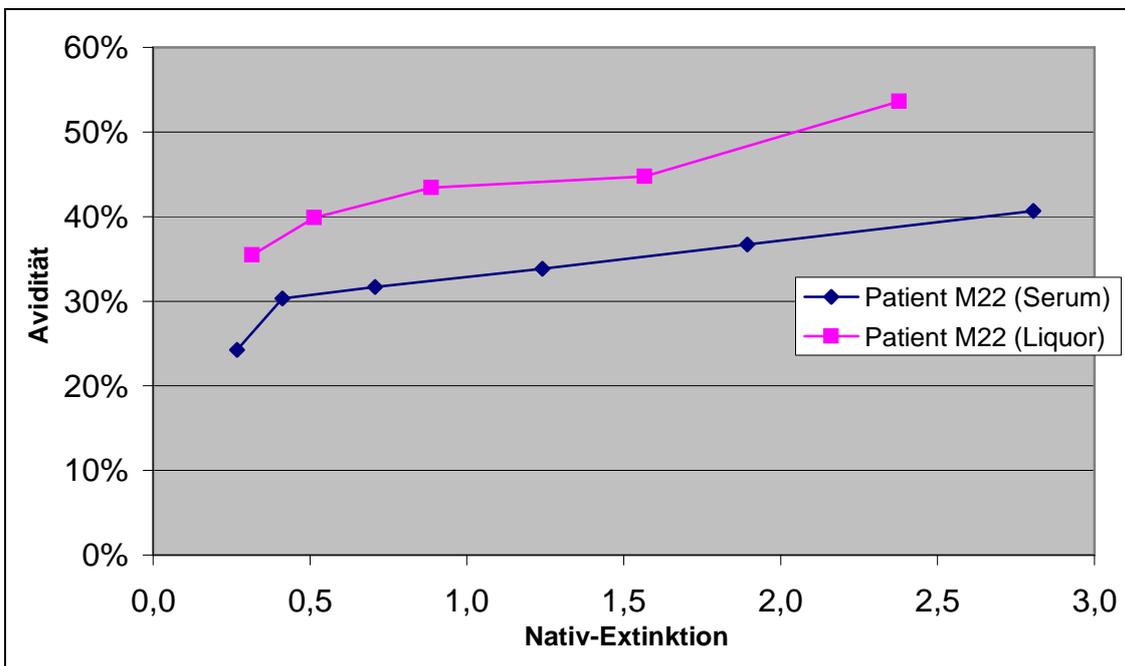


Diagramm 22: Aviditätsindices eines Serum-Liquor-Paares eines Patienten mit MS aus Tabelle 5 (S. 18)

Betrachtet man die Graphen, so zeigen sie einen annähernd hyperbolischen Verlauf: Die Aviditätsindices steigen im Bereich der hohen Verdünnungen, also

### 3. ERGEBNISSE

bei Nativ-Extinktionen zwischen 0,0 und 0,5 sehr schnell an, worauf sie im Verlauf von etwa 0,5 bis 2,5 relativ wenig zunehmen und danach teilweise zwischen 2,5 und 3,0 teilweise wieder stark ansteigen.

Damit gibt es über den gesamten Messbereich keinen konstanten Aviditätsindex, sondern er fällt mit zunehmender Verdünnung stetig ab. In manchen Fällen bedeutet dies eine Differenz von mehr als 30% zwischen niedrigster und höchster Verdünnung.

Bei einer Evaluierung einiger Proben auf Masernvirusantikörper zeigt sich ein ähnliches Bild, was Diagramm 23 bis Diagramm 25 zu entnehmen ist:

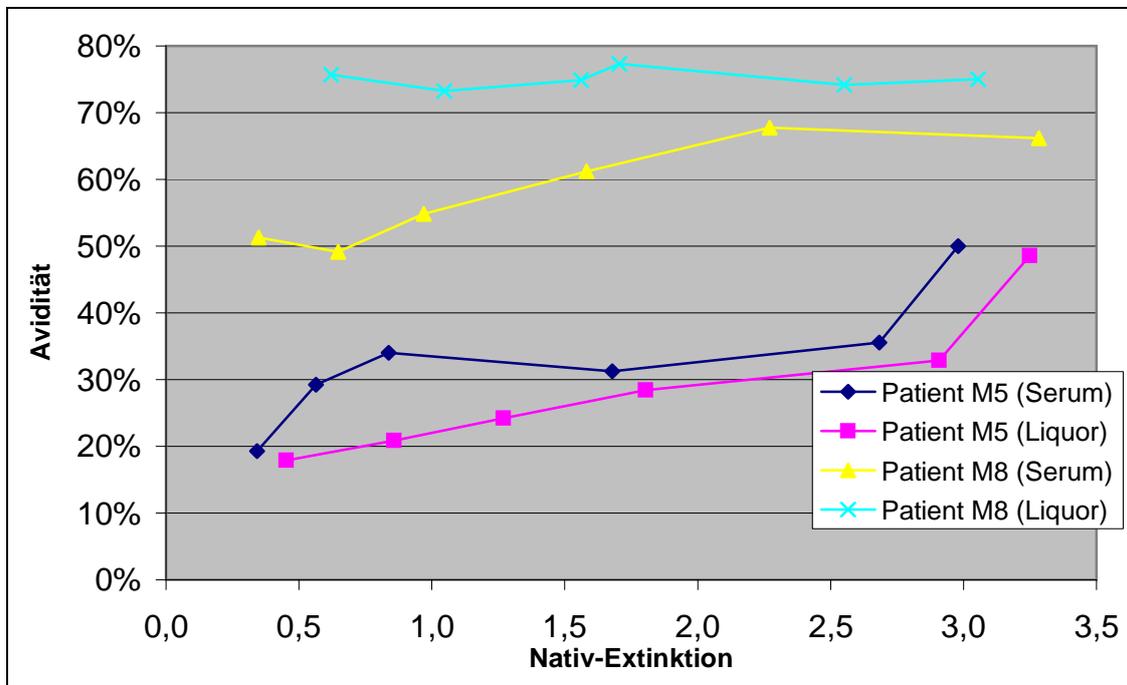


Diagramm 23: Aviditätsindices zweier Serum-Liquor-Paare von Patienten mit MS aus Tabelle 5 (S. 18)

### 3. ERGEBNISSE

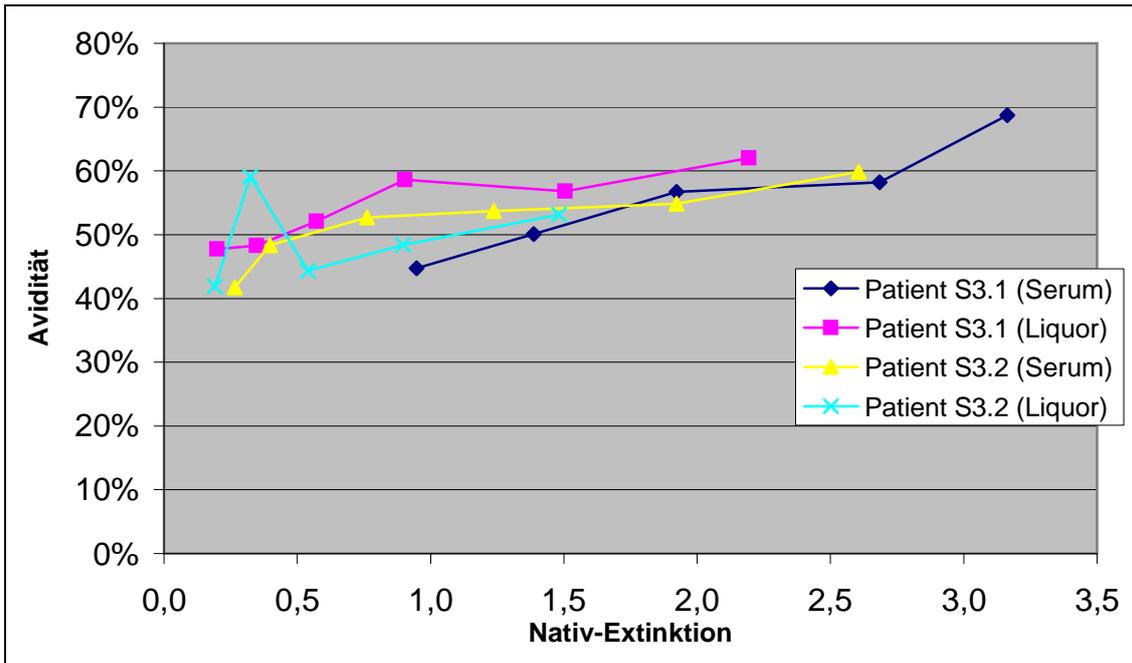


Diagramm 24: Aviditätsindices zweier Serum-Liquor-Paare von Patienten mit SSPE aus Tabelle 4 (S. 17)

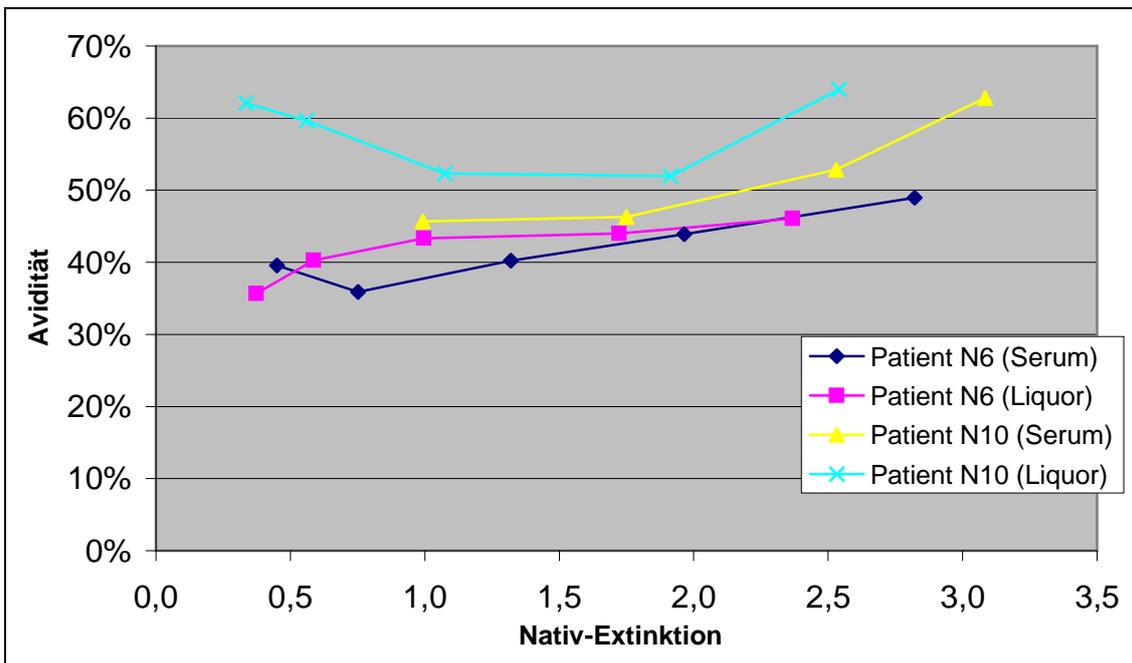


Diagramm 25: Aviditätsindices zweier Serum-Liquor-Paare von Kontroll-Patienten aus Tabelle 6 (S. 19)

Da es für die geplanten Vergleichsuntersuchungen notwendig war, dass die Aviditätswerte von der IgG-Konzentration bzw. der gewählten Probenverdünnung unabhängig sind, stellte sich die Berechnungsmethode für Aviditätsindices

### 3. ERGEBNISSE

---

mittels Extinktions-Einpunktbestimmung als nicht suffizient heraus. Deswegen musste nach einer alternativen Methode gesucht werden.

#### **3.1.3.2 Berechnung der Aviditätsindices mit Endpunkttitermethode**

Da die Endpunkttitermethode als Referenzmethode gilt und zur Auswertung Verdünnungsreihen erfordert, wurden aus den vorherigen Proben vier willkürlich ausgesucht und deren Aviditätsindices und deren Variationskoeffizienten (VK) versuchsweise damit berechnet (Beispiel 6 bis Beispiel 9, folgende Seiten).

Mit der Software „Avidity 1.2“ von Klaus Hedman können die Ergebnisse von entweder vier oder zwei Verdünnungsschritten verrechnet werden. Da die Verdünnungsreihen in den Vorversuchen in 1:2 Schritten angelegt worden sind, kann das Programm diese aufeinanderfolgenden und auch die jeweils übernächste und überübernächste Verdünnung also im Abstand 1:4 und 1:8 für die Berechnung verwenden.

### 3. ERGEBNISSE

---

Beispiel 6:

Tabelle 17: Extinktionswerte des Serum von Patient V9.2 aus Tabelle 3 (S. 16)

Schritt	Verdünnung <sup>[1]</sup>	OD ohne Harnstoff	OD mit Harnstoff
1	399168	2,936	1,948
2	798336	1,943	1,268
3	1596672	1,269	0,782
4	3193344	0,778	0,463
5	6386688	0,409	0,192
6	12773376	0,206	0,095

Tabelle 18: Aviditätsindices des Serum von Patient V9.2 aus verschiedenen Kombinationen berechnet mit der Software Avidity 1.2

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2
1 & 2	46,1%
2 & 3	49,2%
3 & 4	50,0%
4 & 5	56,6%
5 & 6	46,4%
	<b>VK</b> 8,53%
	<b>Verdünnungsabstand 1:4</b>
1 & 3	48,2%
2 & 4	50,1%
3 & 5	50,2%
4 & 6	53,2%
	<b>VK</b> 4,10%
	<b>Verdünnungsabstand 1:8</b>
1 & 4	52,8%
2 & 5	51,3%
3 & 6	50,6%
	<b>VK</b> 2,18%

### 3. ERGEBNISSE

---

Beispiel 7:

Tabelle 19: Extinktionswerte des Serum von Patient 19.3 aus Tabelle 1 (S. 13)

Schritt	Verdünnung <sup>[1]</sup>	OD ohne Harnstoff	OD mit Harnstoff
1	1512	2,765	0,925
2	3024	1,962	0,626
3	6048	1,428	0,356
4	12096	0,831	0,190
5	24192	0,592	0,106

Tabelle 20: Aviditätsindices des Serum von Patient 19.3 aus verschiedenen Kombinationen berechnet mit der Software Avidity 1.2

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2
1 & 2	9,5%
2 & 3	15,2%
3 & 4	18,0%
4 & 5	11,7%
	<b>VK</b> 27,62%
	<b>Verdünnungsabstand 1:4</b>
1 & 3	11,6%
2 & 4	17,3%
3 & 5	13,5%
	<b>VK</b> 20,54%
	<b>Verdünnungsabstand 1:8</b>
1 & 4	14,7%
2 & 5	15,0%
	<b>VK</b> 1,43%

### 3. ERGEBNISSE

---

Beispiel 8:

Tabelle 21: Extinktionswerte des Serum von Patient M22 aus Tabelle 5 (S. 18)

Schritt	Verdünnung <sup>[1]</sup>	OD ohne Harnstoff	OD mit Harnstoff
1	432	2,805	1,141
2	864	1,894	0,695
3	1728	1,241	0,420
4	3456	0,707	0,224
5	6912	0,412	0,125
6	13824	0,268	0,065

Tabelle 22: Aviditätsindices des Serum von Patient M22 aus verschiedenen Kombinationen berechnet mit der Software Avidity 1.2

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2
1 & 2	20,2%
2 & 3	20,2%
3 & 4	27,0%
4 & 5	23,8%
5 & 6	nicht berechenbar
	<b>VK</b> 14,63%
	<b>Verdünnungsabstand 1:4</b>
1 & 3	21,1%
2 & 4	24,1%
3 & 5	20,4%
4 & 6	25,4%
	<b>VK</b> 10,49%
	<b>Verdünnungsabstand 1:8</b>
1 & 4	24,9%
2 & 5	25,0%
3 & 6	24,9%
	<b>VK</b> 0,23%

### 3. ERGEBNISSE

---

Beispiel 9:

Tabelle 23: Extinktionswerte des Serum von Patient 28 aus Tabelle 2 (S. 14)

Schritt	Verdünnung <sup>[1]</sup>	OD ohne Harnstoff	OD mit Harnstoff
1	399168	2,668	1,600
2	798336	1,833	1,144
3	1596672	1,300	0,727
4	3193344	0,824	0,441
5	6386688	0,480	0,252

Tabelle 24: Aviditätsindices des Serum von Patient 28 aus verschiedenen Kombinationen berechnet mit der Software Avidity 1.2

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2
1 & 2	33,4%
2 & 3	40,4%
3 & 4	41,5%
4 & 5	44,6%
	<b>VK</b> 11,83%
	<b>Verdünnungsabstand 1:4</b>
1 & 3	35,5%
2 & 4	41,8%
3 & 5	43,5%
	<b>VK</b> 10,47%
	<b>Verdünnungsabstand 1:8</b>
1 & 4	41,3%
2 & 5	42,0%
	<b>VK</b> 1,19%

Aus den Tabellen 18, 20, 22 und 24 ist zu ersehen, dass sich die Aviditätsindices derselben Probe in verschiedenen Verdünnungen teilweise erheblich unterscheiden. Bei den Verdünnungsschritten im Abstand 1:4 variieren die Indices geringer als im Abstand 1:2.

Variationskoeffizienten von über 10% ja sogar über 20% wie in Beispiel 7, ließen hinsichtlich der vorliegenden Fragestellung auch die Software Avidity 1.2 für die Aviditätsberechnung als ungeeignet erscheinen, und es stellte sich weiterhin die Frage nach einer noch exakteren Methode.

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.1.3.3 Linearer Zusammenhang von Nativ- und Denaturiert-Extinktion

Versuchsweise wurden anders als zuvor die Ergebnisse von obigen Patienten graphisch so dargestellt, indem auf der x-Achse die nativen und auf der y-Achse die Extinktionen aus dem denaturierenden Waschgang aufgetragen wurden (Beispiele zu jeder Entität in Diagramm 26 bis Diagramm 31):

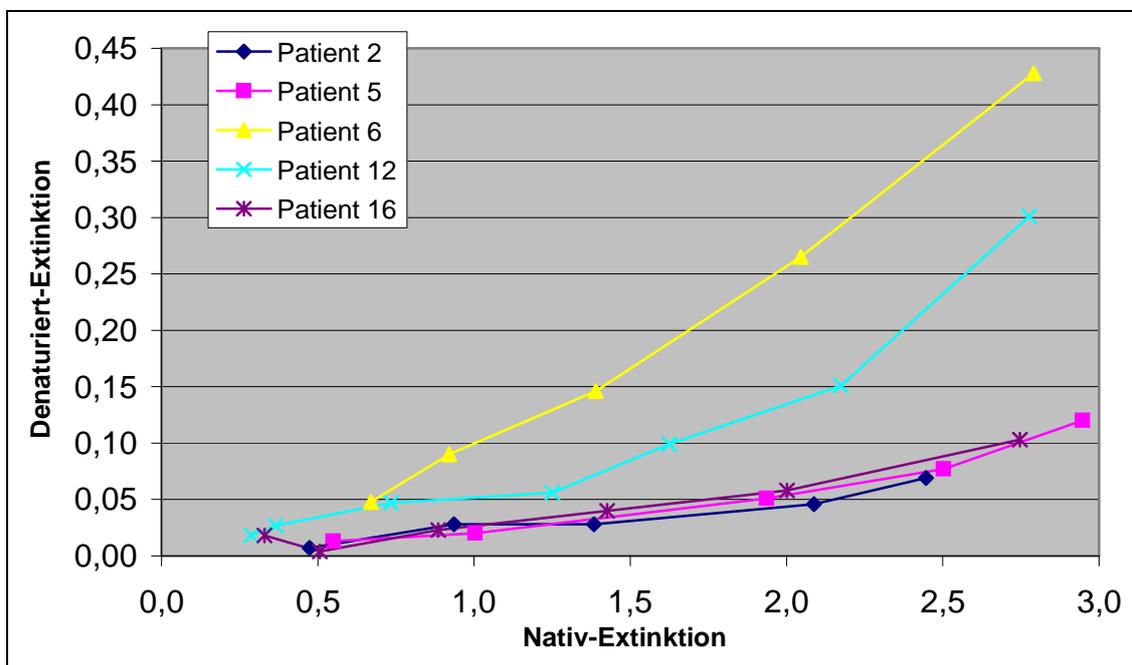


Diagramm 26: Extinktionen einiger Patienten mit akuten Windpocken aus Tabelle 1 (S. 13)

### 3. ERGEBNISSE

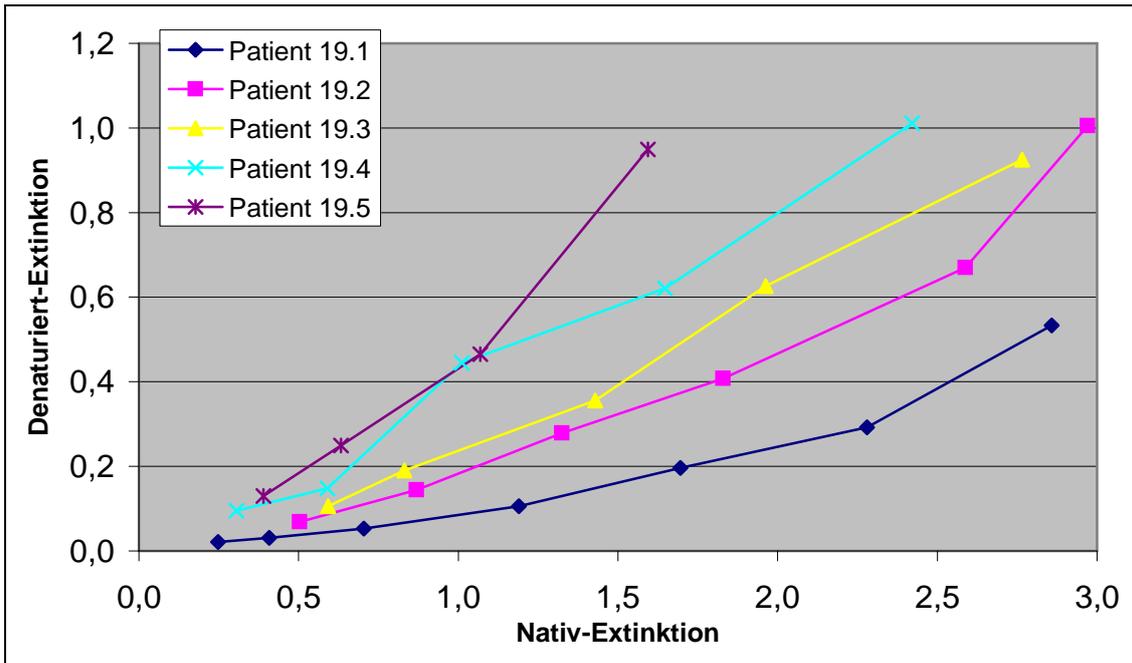


Diagramm 27: Extinktionen von Patient 19 mit akuten und abgelaufenen Windpocken aus Tabelle 1 (S. 13)

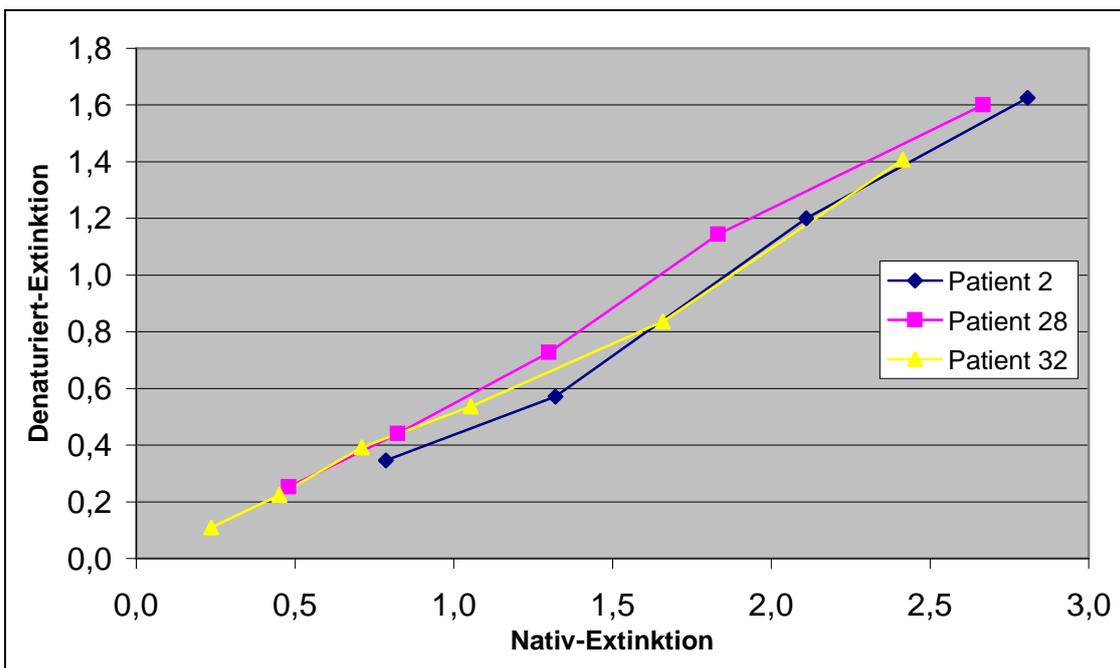


Diagramm 28: Extinktionen von Patienten mit lange zurückliegender VZV-Infektion aus Tabelle 2 (S. 14)

### 3. ERGEBNISSE

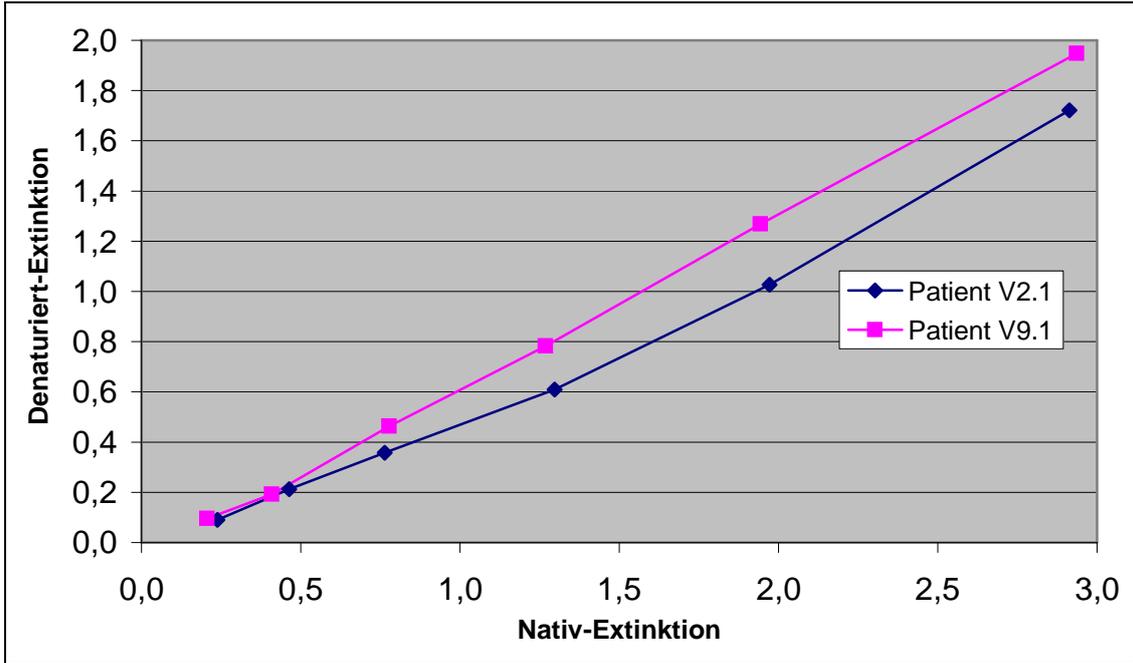


Diagramm 29: Extinktionen von Seren von Patienten mit VZV-Infektion aus Tabelle 3 (S. 16)

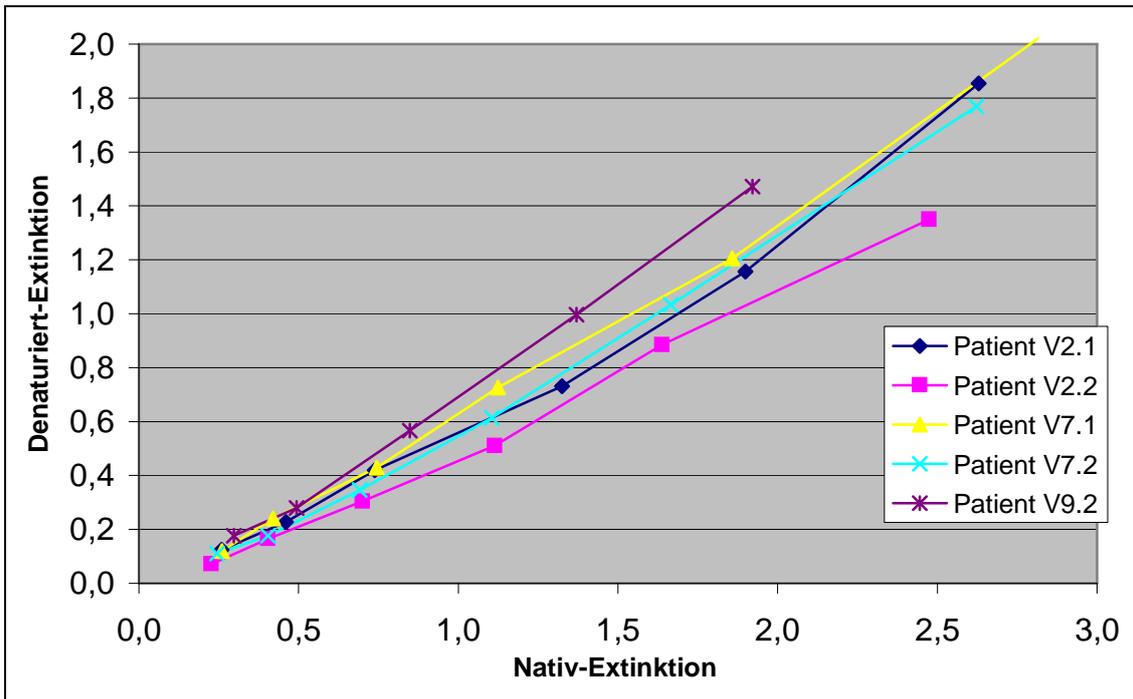


Diagramm 30: Extinktionen von Liquores von Patienten mit VZV-Infektion aus Tabelle 3 (S. 16)

### 3. ERGEBNISSE

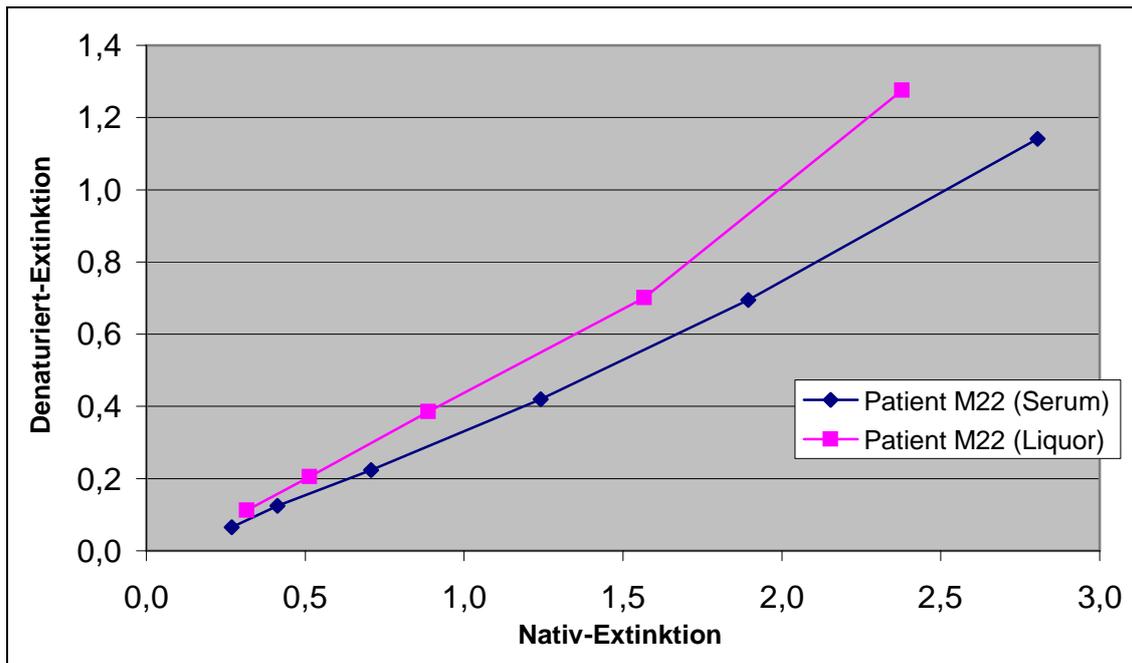


Diagramm 31: Extinktionen eines Serum-Liquor-Paares eines Patienten mit MS aus Tabelle 5 (S. 18)

Die Diagramme zeigen einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen den beiden Extinktionen. Wie in den vorherigen Diagrammen weichen im Intervall zwischen 2,5 und 3,0 manche Werte von diesem Phänomen ab und steigen stärker an.

Ähnliches hat sich auch bei den Masernproben bestätigt (Diagramm 32 bis Diagramm 34):

### 3. ERGEBNISSE

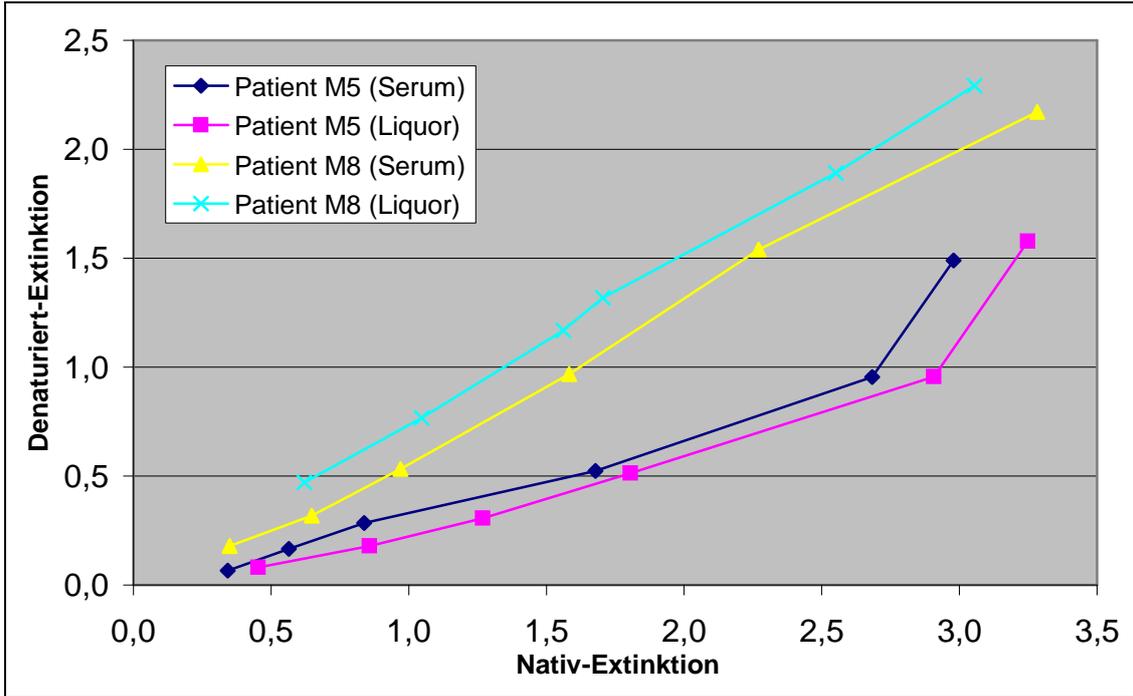


Diagramm 32: Extinktionen zweier Serum-Liquor-Paare von Patienten mit MS aus Tabelle 5 (S. 18)

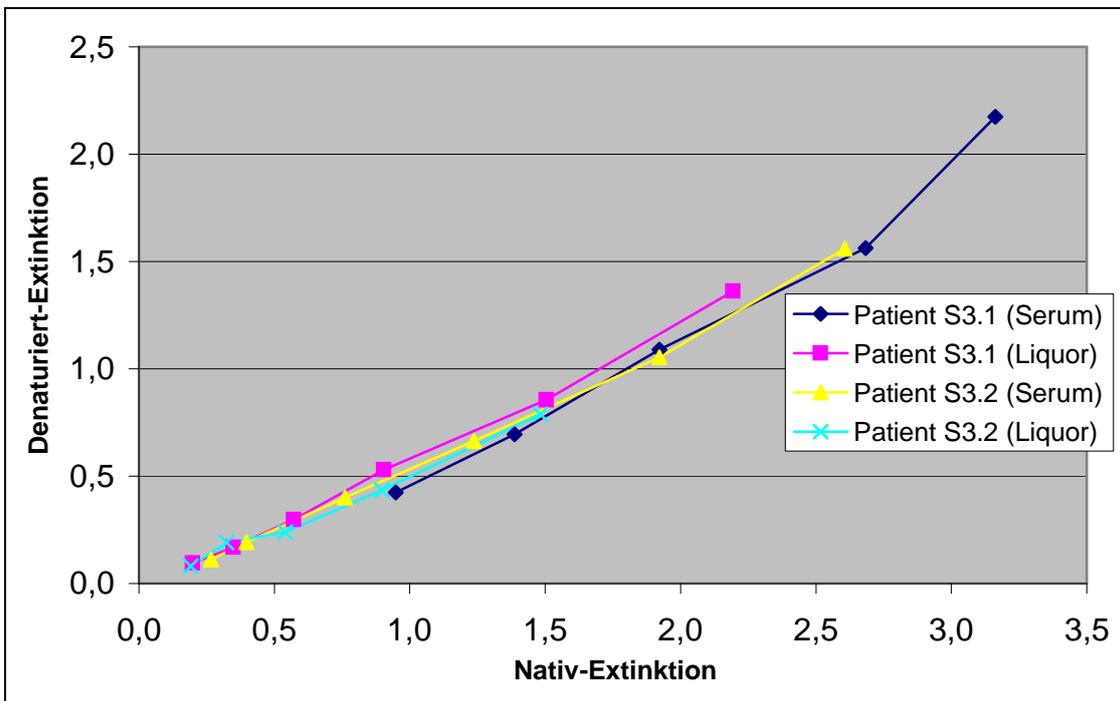


Diagramm 33: Extinktionen zweier Serum-Liquor-Paare von Patienten mit SSPE aus Tabelle 4 (S. 17)

### 3. ERGEBNISSE

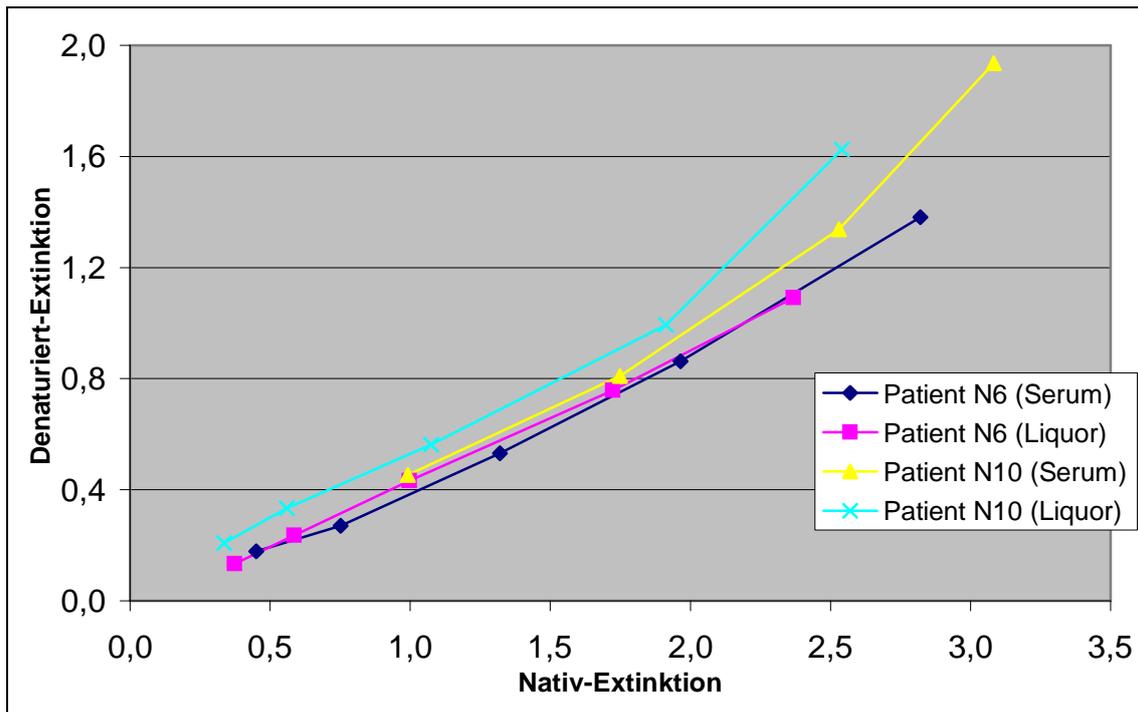


Diagramm 34: Extinktionen zweier Serum-Liquor-Paare von Kontroll-Patienten aus Tabelle 6 (S. 19)

Demzufolge liegt den Extinktionen aus denaturierendem und dem Referenzwaschgang ein Zusammenhang zugrunde, der approximativ mit der Geradengleichung (vgl. Gleichung 3, S. 29) beschrieben werden kann:

Gleichung 6:

$$y = mx + c$$

m: Steigung

c: Konstante

Aus dieser Tatsache kann folgender Schluss gezogen werden: Je steiler die Gerade ansteigt, umso höher ist die Avidität der Antikörper.

Dies hat sich vor allem darin bestätigt, dass bei der Austestung von Seren eines Patienten mit akuter Windpockeninfektion im Krankheitsverlauf die Graphen immer steiler werden:

### 3. ERGEBNISSE

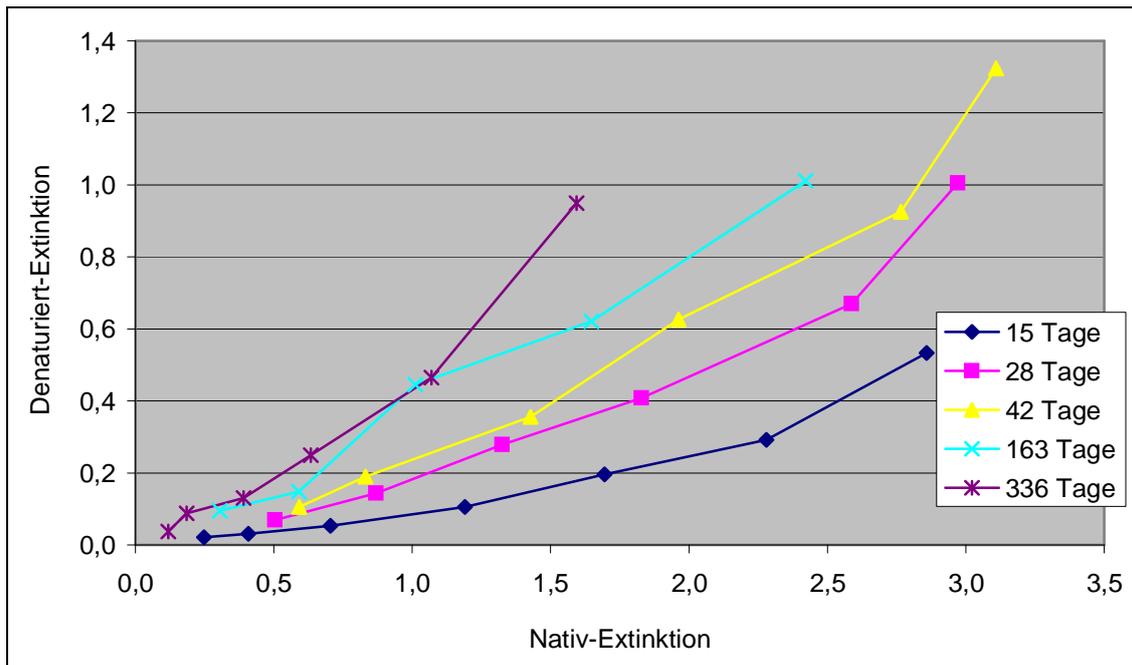


Diagramm 35: Immer steiler werdende Geraden bei Patient 19 aus Tabelle 1 (S. 13) mit akuter Windpockeninfektion 15, 28, 42, 163 und 336 Tage nach Auftreten der Symptome

Für diesen annähernd linearen Zusammenhang müssen nun folgende Schlüsse geltend gemacht werden:

a) Der Wert der Steigung  $m$  muss zwischen 0 und 1 liegen.

Im Falle  $m > 1$  gäbe es sonst Aviditäten größer 100%, bzw. man erhielte negative Prozentwerte bei  $m < 0$ . Da beides nicht möglich ist, muss die Behauptung hinsichtlich der Größenordnung von  $m$  zutreffen.

b) Der Wert der Konstanten  $c$  ist negativ.

Die Extinktionen aus dem denaturierenden Waschgang liegen auf einer annähernden Geraden mit einer Steigung zwischen 0 und 1. Durch Division einer dieser Extinktionen durch ihren dazugehörigen  $x$ -Wert, der Nativ-Extinktion, erhält man einen verdünnungsabhängigen Prozentwert, der den Anteil an hochaviden, nicht abgewaschenen Antikörpern darstellt.

Ist nun der Graph durch ein positives  $c$  auf der  $y$ -Achse verschoben, gilt irgendwann für  $x \rightarrow 0$ :

$$mx + c > x$$

### 3. ERGEBNISSE

---

Dies ergäbe für  $\frac{mx + c}{x}$  einen Wert von mehr als 100%. Dies ist aber nicht

möglich, so dass  $c$  also gleich oder kleiner 0 sein muss.

Bestätigt wird dieser Schluss dadurch, dass es Verdünnungen geben muss, bei denen im Referenzwaschgang noch ein positives Signal ermittelt werden kann, während im denaturierenden Waschgang alle Antikörper fortgewaschen worden sind, hier das Signal also gegen 0 geht. Demnach ist der Graph in negativer  $y$ -Richtung verschoben;  $c$  kann deshalb nicht positiv sein, sondern maximal den Wert 0 annehmen.

#### 3.1.3.4 Theoretische Überlegungen zur neuen Aviditätsberechnung

Für die Verdünnungsreihen kann man die zugrundeliegende Geradengleichung ermitteln, indem man für zwei Punkte, die durch eine ideale Gerade verbunden werden und einige Verdünnungsschritte Abstand haben, die Werte für  $m$  und  $c$  ermittelt.

Mit der vollständigen Formel  $y = mx + c$  kann nun für jedes beliebige  $x$ , also der Nativ-Extinktion, künstlich jedes  $y$ , also die Denaturiert-Extinktion, ausgerechnet werden. Dividiert man wie zur Einpunktbestimmung wiederum diese  $y$ -Werte durch das zugehörige  $x$ , erhält man folgende Gleichung 7:

Gleichung 7:

$$\text{Avidität [\%]} = \frac{mx + c}{x} \times 100\%$$

Lässt man nun mit dieser Formel für die obigen Beispiele die Avidität künstlich für  $x \in \mathbb{R}_0^+$  errechnen und trägt sie graphisch auf, stellt sich Folgendes in Diagramm 36 dar:

### 3. ERGEBNISSE

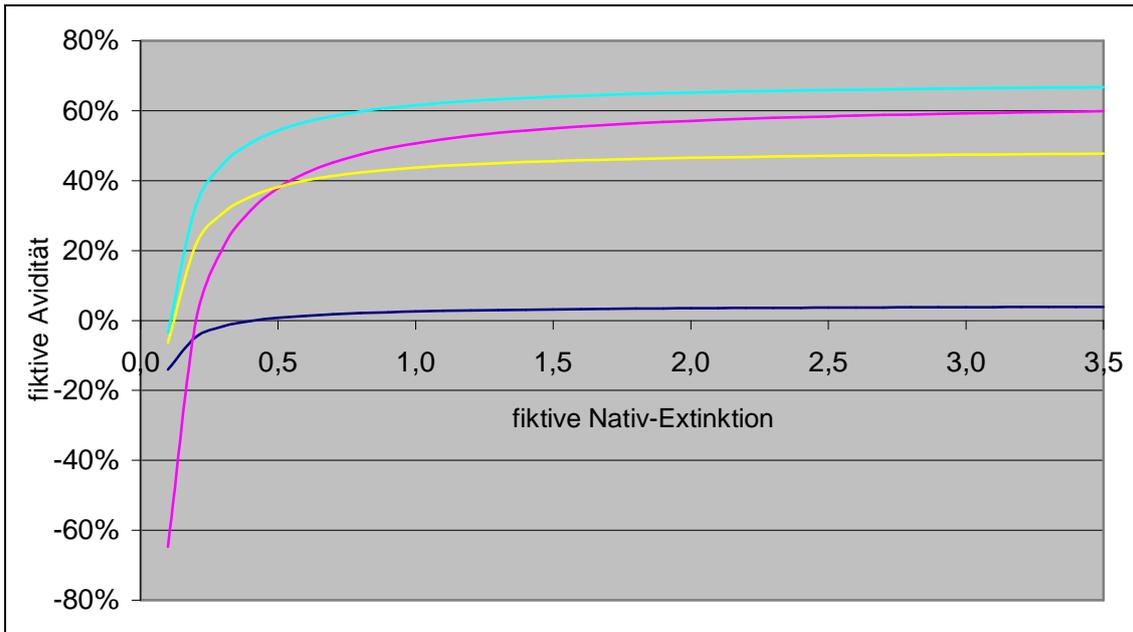


Diagramm 36: Fiktiv errechnete Aviditätskurven nach der Formel  $\frac{mx + c}{x}$

Es resultieren nichtlineare, hyperbolische Graphen mit einer positiven monotonen Steigung die offenbar in einen asymptotischen Verlauf für  $x \rightarrow \infty$  münden. Der Vergleich dieser Graphen mit denen aus Diagramm 18 erklärt die Nichtlinearität der Avidität, die per Einpunktbestimmung ermittelt wurden (siehe Kapitel 3.1.3.1, S. 46).

Während die berechneten Aviditätskurven einen asymptotischen Verlauf zeigen, weisen die echten Aviditätskurven teilweise einen steilen Anstieg bei  $x$  größer 2,5 bis 3,0 auf. Erklären lässt sich dies dadurch, dass die Extinktionsmessung durch den BEP III auf Grund der Sättigung der optischen Dichte oberhalb dieses Bereichs nicht mehr linear verläuft. Demnach muss also für die Extinktionswerte über 3,0 ein etwa asymptotischer Verlauf gegen 4,0 als maximal möglicher Messwert angenommen werden.

Während nun also die Extinktionen aus dem Referenzwaschgang nur noch langsam, nicht mehr proportional ansteigen, steigen die Extinktionen aus dem denaturierenden Waschgang noch proportional an, da sie durch den Waschgang in einen Extinktionsbereich unter 3,0 verschoben worden sind.

Damit dividiert man stetig zunehmende y-Werte durch weniger steigende x-Werte. Das Resultat ist demnach ein schnell anwachsender Aviditätsindex,

### 3. ERGEBNISSE

---

weshalb sich Aviditäten aus Messwerten im Sättigungsbereich nicht sinnvoll berechnen lassen.

Der oben gezeigte lineare Zusammenhang zwischen den Extinktionen aus den beiden Waschgängen weist eine erstaunliche Ausgeprägtheit und Konstanz durch alle in Reihe getesteten Proben auf, so dass dieses Phänomen als Grundlage für die Aviditätsberechnung dienen kann.

Im Folgenden wird nun erörtert, wie mit Hilfe der gezeigten linearen sowie hyperbolischen Beziehungen ein verdünnungsunabhängiger Aviditätswert berechnet werden kann.

Bei der Betrachtung der hyperbolischen Kurven in Diagramm 36 liegt der Gedanke nahe, die Avidität der spezifischen Antikörper einer Probe liege auf Grund ihres asymptotischen Verlaufs in der Asymptote.

Der Wert einer Asymptote ist derjenige y-Wert, den eine Funktion bei einem unendlich großen oder kleinen x-Wert annimmt. In unserem Fall trifft ein unendlich großes x zu:

Im Term  $mx + c$  wird für  $x \rightarrow \infty$  die Konstante  $c$  vernachlässigbar klein.

Für die Aviditätsformel  $\frac{mx + c}{x}$  gilt also folgende Asymptotengleichung (Gleichung 8):

Gleichung 8:

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \left( \frac{mx + c}{x} \right) = \frac{mx}{x} = m$$

Die Steigung  $m$  der durch Extinktionspaare festgelegten Geraden entspricht also der Asymptote.

Dass die Steigung aber nicht mit der Avidität identisch sein kann, beweist Diagramm 37:

### 3. ERGEBNISSE

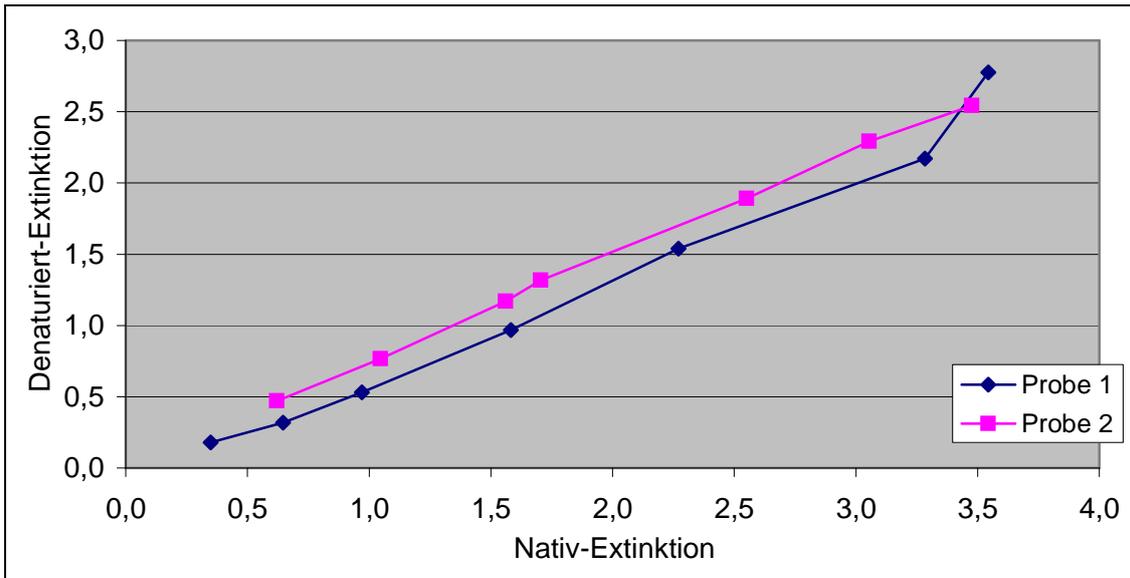


Diagramm 37: Unterschiedliche Aviditäten bei ähnlicher Steigung

Augenscheinlich haben beide Geraden eine sehr ähnliche Steigung. Probe 2 weist aber insgesamt höhere Extinktionen aus dem denaturierenden Waschgang auf. Hier sind also weniger Antikörper abgewaschen worden, was ohne Zweifel dafür spricht, dass Probe 2 eine höhere Avidität haben muss als Probe 1.

Demnach spiegelt die Steigung den Aviditätswert nur ungenügend wider; die Konstante  $c$  muss also für die Aviditätsberechnung ebenfalls von elementarer Bedeutung sein.

Deshalb wurde wie oben beschrieben der Aviditätsindex nach Gleichung 7

$$\text{Avidität [\%]} = \frac{mx + c}{x} \times 100\%$$

angenommen, indem für einen festen  $x$ -Wert der entsprechende  $y$ -Wert berechnet wird. Als  $x$ -Wert wurde 2,0 festgesetzt.

Für die in Abschnitt 3.1.3.2 (S. 52) gezeigten vier Beispiele seien hier nochmals die Aviditätsindices mit dieser Geradenmethode und zum Vergleich mit der Software Avidity 1.2 mit ihren jeweiligen Variationskoeffizienten aufgeführt:

### 3. ERGEBNISSE

Beispiel 6:

Tabelle 25: Aviditätsindices des Serum von Patient V9.2 aus Tabelle 3 (S. 16) mit Geraden- und Endpunkttitermethode aus verschiedenen Kombinationen

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2		
	OD 2,0	Steigung m	Avidity 1.2
1 & 2	65,35%	68,48%	46,1%
2 & 3	65,46%	72,11%	49,2%
3 & 4	62,85%	64,97%	50,0%
4 & 5	68,02%	73,44%	56,6%
5 & 6	nicht berechenbar	nicht berechenbar	46,4%
	VK 3,23%	5,47%	8,53%
Verdünnungsabstand 1:4			
1 & 3	64,67%	69,95%	48,2%
2 & 4	65,37%	69,10%	50,1%
3 & 5	64,18%	68,60%	50,2%
4 & 6	62,46%	64,34%	53,2%
	VK 1,93%	3,68%	4,10%

Beispiel 7:

Tabelle 26: Aviditätsindices des Serum von Patient 19.3 aus Tabelle 1 (S. 13) mit Geraden- und Endpunkttitermethode aus verschiedenen Kombinationen

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2		
	OD 2,0	Steigung m	Avidity 1.2
1 & 2	32,01%	37,24%	9,5%
2 & 3	32,26%	50,56%	15,2%
3 & 4	25,75%	27,81%	18,0%
4 & 5	30,04%	35,15%	11,7%
	VK 10,03%	25,18%	27,62%
Verdünnungsabstand 1:4			
1 & 3	29,97%	42,56%	11,6%
2 & 4	32,03%	38,55%	17,3%
3 & 5	26,35%	29,90%	13,5%
	VK 9,76%	17,48%	20,54%

### 3. ERGEBNISSE

Beispiel 8:

Tabelle 27: Aviditätsindices des Serum von Patient M22 aus Tabelle 5 (S. 18) mit Geraden- und Endpunkttitermethode aus verschiedenen Kombinationen

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2		
	OD 2,0	Steigung m	Avidity 1.2
1 & 2	37,34%	48,96%	20,2%
2 & 3	36,98%	42,11%	20,2%
3 & 4	34,93%	36,70%	27,0%
4 & 5	32,90%	33,56%	23,8%
5 & 6	39,33%	41,67%	nicht berechenbar
VK	6,78%	14,47%	14,63%
Verdünnungsabstand 1:4			
1 & 3	38,49%	46,10%	21,1%
2 & 4	36,85%	39,68%	24,1%
3 & 5	34,50%	35,59%	20,4%
4 & 6	34,62%	36,22%	25,4%
VK	5,31%	12,23%	10,49%

Tabelle 28: Aviditätsindices des Serum von Patient 28 aus Tabelle 2 (S. 14) mit Geraden- und Endpunkttitermethode aus verschiedenen Kombinationen

kombinierte Schritte	Verdünnungsabstand 1:2		
	OD 2,0	Steigung m	Endpunkttiter
1 & 2	61,76%	54,61%	33,4%
2 & 3	63,73%	78,24%	40,4%
3 & 4	57,38%	60,08%	41,5%
4 & 5	54,36%	54,94%	44,6%
VK	7,14%	17,96%	11,83%
Verdünnungsabstand 1:4			
1 & 3	58,69%	63,82%	35,5%
2 & 4	63,02%	69,67%	41,8%
3 & 5	56,62%	57,93%	43,5%
VK	5,49%	9,20%	10,47%

Die Variationskoeffizienten zeigen, dass mit allen drei Berechnungsmethoden die Aviditätsindices konstanter sind, wenn die Verdünnungsschritte im Abstand 1:4 angelegt werden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Indices berechnet mit der Geradenmethode über dem Referenzwert 2,0 durch die verschiedenen Verdünnungen weniger variieren als mit der Steigung oder der Endpunkttitermethode.

### 3. ERGEBNISSE

---

Die Variationskoeffizienten aus der Geradenmethode mit dem Referenzwert 2,0 fallen insgesamt niedriger aus als die aus der Endpunkttitermethode mit der Software Avidity 1.2 oder der mit Steigung m. Bis auf eine Ausnahme sind die Koeffizienten kleiner als 10%. Dieser eine mit 10,03% stammt von einer Probe mit niedriger Avidität. Da bei niedrigen Werten mathematisch bedingt häufig höhere Variationskoeffizienten auftreten, ist dieser durchaus akzeptabel.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde diese Geradenmethode mit dem Referenzwert 2,0 als Standardberechnungsmethode bei den ZNS-Tests angewandt.

#### 3.1.4 Reproduzierbarkeit der neuen Rechenmethode

Um die Reproduzierbarkeit der neuen Berechnungsmethode zu überprüfen, wurden im ZNS-Test die vier Kontrollen in jeweils zwei Verdünnungen getestet. Aus den VZV-Tests bei Raumtemperatur liegen für die Kontrollen Ergebnisse aus sechs Läufen vor:

Tabelle 29: Statistische Parameter von VZV-Kontrollen über Referenzwert 2,0 aus sechs Läufen

	RPN 1	RPN 2	akut	alt
<b>Minimum</b>	57,41%	66,33%	8,43%	51,85%
<b>Maximum</b>	67,12%	76,04%	9,85%	63,65%
<b>Mittelwert</b>	64,27%	71,81%	9,07%	58,56%
<b>Standardabweichung</b>	4,07%	4,05%	0,56%	4,77%
<b>Variationskoeffizient</b>	6,33%	5,64%	6,14%	8,14%

Tabelle 30: Statistische Parameter von VZV-Kontrollen bei Steigung m aus sechs Läufen

	RPN 1	RPN 2	akut	alt
<b>Minimum</b>	59,33%	68,51%	9,03%	51,73%
<b>Maximum</b>	71,28%	79,59%	13,18%	60,48%
<b>Mittelwert</b>	66,71%	74,58%	11,32%	56,92%
<b>Standardabweichung</b>	4,56%	4,31%	1,47%	3,90%
<b>Variationskoeffizient</b>	6,84%	5,79%	12,99%	6,85%

Sowohl mit 2,0 als auch mit m berechnet zeigen die Aviditätsindices der Kontrollen niedrige Variationskoeffizienten.

Die Masernkontrollen wurden 15 mal bei Raumtemperatur getestet:

### 3. ERGEBNISSE

---

Tabelle 31: Statistische Parameter von Masern-Kontrollen über Referenzwert 2,0 2,0 aus 15 Läufen

	<b>RPN 1</b>	<b>RPN 2</b>	<b>akut</b>	<b>alt</b>
<b>Minimum</b>	49,35%	33,29%	9,95%	50,36%
<b>Maximum</b>	65,59%	76,31%	15,46%	68,30%
<b>Mittelwert</b>	58,56%	54,27%	12,21%	56,52%
<b>Standardabweichung</b>	4,03%	11,30%	1,57%	4,59%
<b>Variationskoeffizient</b>	6,87%	20,83%	12,86%	8,11%

Tabelle 32: Statistische Parameter von Masern-Kontrollen bei Steigung m aus 15 Läufen

	<b>RPN 1</b>	<b>RPN 2</b>	<b>akut</b>	<b>alt</b>
<b>Minimum</b>	49,34%	26,71%	10,12%	52,27%
<b>Maximum</b>	66,37%	81,75%	16,97%	72,65%
<b>Mittelwert</b>	59,50%	53,42%	12,72%	62,69%
<b>Standardabweichung</b>	4,54%	14,65%	2,07%	6,21%
<b>Variationskoeffizient</b>	7,64%	27,42%	16,28%	9,91%

Mit Bezug auf den Referenzwert 2,0 ergeben sich für die RPN1-, akut- und alt-Kontrolle niedrige Variationskoeffizienten. Bei RPN2 ist es wegen vier Ausreißern zu dem hohen Variationskoeffizienten gekommen, wobei diese Kontrollen Differenzen zwischen 15% bis 23% im Vergleich zur RPN1 aus demselben Test aufweisen. Mit der Endpunkttitermethode liegt der Variationskoeffizient bei 23,3%. Insgesamt kann auch für Masern auf gute Reproduzierbarkeit geschlossen werden.

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.2 Optimierung der Inkubationstemperatur

Während der Austestung der Patientenproben mit dem ZNS-Test machten sich bei den Kontrollen große Schwankungen sowohl der Extinktionswerte als auch der Aviditätsindices trotz immer gleicher Vorbedingungen bemerkbar. Als mögliche Fehlerursache wurde die Inkubationstemperatur in Betracht gezogen, und es wurde ein Vergleich zwischen den Ergebnissen aus Testungen bei konstant 37°C und Raumtemperatur, die zwischen 21°C bis 27°C schwankte, durchgeführt.

In jedem von mehreren Testläufen wurden bei den Akut- und Alt-Kontrollen sowie zweimal bei den Referenzen P/N – im Folgenden RPN1 und RPN2 bezeichnet – Extinktionen und Aviditätsindices bestimmt. Die Kontrollen waren in jeweils zwei Verdünnungen 1:1386 und 1:5544 vorbereitet worden.

##### 3.2.1 Vergleich der Ergebnisse der VZV-Antikörper bei Raumtemperatur bzw. 37°C

Die folgenden zwei Tabellen zeigen die Variationskoeffizienten für die Extinktionen und Aviditätsindices der Kontrollen für den VZV-ZNS-Test auf. Die Kontrollen wurden sechsmal bei Raumtemperatur getestet. Die Indices wurden mit der Einzelpunktbestimmung aus den Extinktionen berechnet.

Tabelle 33: Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (VK) der Extinktionen (OD = optische Dichte) der VZV-Kontrollen bei Raumtemperatur in verschiedenen Verdünnungen

Kontrolle	Verdünnung	MW OD mit Urea	VK OD mit Urea	MW OD ohne Urea	VK OD ohne Urea	MW Aviditätsindex	VK Aviditätsindex
RPN1	1:1386	0,865	22,92%	1,363	19,02%	63,09%	6,83%
RPN2		1,058	8,89%	1,496	9,25%	70,82%	5,62%
akut		0,196	7,83%	2,131	5,78%	9,91%	6,08%
alt		0,516	13,35%	0,906	13,84%	57,09%	6,08%
RPN1	1:5544	0,278	25,15%	0,487	20,11%	56,48%	8,54%
RPN2		0,366	13,68%	0,566	16,88%	64,88%	5,09%
akut		0,073	19,15%	1,038	10,48%	6,96%	12,54%
alt		0,166	15,44%	0,330	18,44%	50,66%	4,51%

### 3. ERGEBNISSE

Ebenso wurden diese Kontrollen bei einer Inkubationstemperatur von konstant 37°C achtmal ausgewertet:

Tabelle 34: Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (VK) der Extinktionen (OD = optische Dichte) der VZV-Kontrollen bei 37°C in verschiedenen Verdünnungen

Kontrolle	Verdünnung	MW OD mit Urea	VK OD mit Urea	MW OD ohne Urea	VK OD ohne Urea	MW Aviditätsindex	VK Aviditätsindex
RPN1	1:1386	0,763	31,75%	1,245	28,58%	60,94%	5,33%
RPN2		0,741	38,49%	0,959	35,80%	76,67%	3,50%
akut		0,131	59,65%	2,201	13,83%	5,76%	42,55%
alt		0,284	19,77%	0,698	8,02%	40,42%	13,16%
RPN1	1:5544	0,221	48,53%	0,392	34,16%	54,00%	15,37%
RPN2		0,203	50,43%	0,283	46,60%	70,64%	6,64%
akut		0,038	80,21%	1,174	27,96%	3,03%	48,82%
alt		0,067	37,18%	0,205	16,98%	31,99%	22,78%

Trotz der konstanten Temperatur lassen sich bei 37°C größere Schwankungen sowohl bei den Extinktionswerten als auch den Aviditätsindices feststellen. Die Variationskoeffizienten bei Raumtemperatur erreichen teilweise auch sehr hohe Werte, laut Herstelleranleitung aber sind hier Variationskoeffizienten der Extinktionen bis 21,6% im Interassayvergleich bei Standardtestbedingungen bekannt.

Mit denselben Ergebnissen ist auch eruiert worden, ob es Unterschiede bei den Aviditätsindices in Abhängigkeit von der Temperatur gibt. Dazu wurden die Mittelwerte der einzelnen Indices erhoben und der Betrag der Differenz zwischen Raumtemperatur und 37°C angegeben (Tabelle 35):

Tabelle 35: Differenzen der mittleren Aviditätsindices bei Raumtemperatur und 37°C in verschiedenen Verdünnungen

Kontrolle	Verdünnung	Raumtemperatur	37°C	Differenz
RPN1	1:1386	63,09%	60,94%	2,15%
RPN2		70,82%	76,67%	5,85%
akut		9,19%	5,76%	3,43%
alt		57,09%	40,42%	16,67%
RPN1	1:5544	56,48%	54,00%	2,48%
RPN2		64,88%	70,64%	5,76%
akut		6,96%	3,03%	3,93%
alt		50,66%	31,99%	18,67%

### 3. ERGEBNISSE

---

Schließlich wurde die Avidität der Kontrollen mit denselben Ergebnissen noch mit der Geradenmethode bei 2,0 errechnet. Tabelle 36 zeigt hierzu die Mittelwerte sowie Variationskoeffizienten:

Tabelle 36: Mittelwerte und Variationskoeffizienten (VK) der Aviditäten der VZV-Kontrollen bei verschiedenen Temperaturen mit der Geradenmethode bei 2,0

Kontrolle	Raumtemperatur		37°C	
	Mittelwert	VK	Mittelwert	VK
RPN1	64,27%	6,33%	62,56%	6,41%
RPN2	71,81%	5,64%	77,87%	3,03%
akut	9,07%	6,14%	5,01%	25,50%
alt	58,56%	8,14%	42,64%	12,44%

Laut diesen Ergebnissen lassen sich zwar mit beiden Temperaturen sehr ähnliche und einigermaßen konstante Aviditätswerte erzielen.

Da sich aber, wie oben zu sehen ist, bei Raumtemperatur die Ergebnisse als konstanter erwiesen hatten, wurden im Folgenden die ZNS-Testes für VZV bei Raumtemperatur durchgeführt. Einige Serum-Liquor-Paare waren zu diesem Zeitpunkt schon bei 37°C getestet. Diese Ergebnisse sind trotzdem mit verwendet worden, da die Unterschiede zwischen Raumtemperatur und 37°C bis auf die Alt-Kontrollen gering waren und davon ausgegangen werden kann, dass sich mögliche Einflüsse der Temperatur gleichsinnig auf die jeweils zusammen getesteten Liquor- und Serumproben auswirken. Die Ergebnisse durch Tests bei 37°C sind daher nicht gesondert gekennzeichnet.

#### 3.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Masernvirusantikörper bei Raumtemperatur bzw. 37°C

In gleicher Weise wurden für Masern Untersuchungen bei den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen vorgenommen.

Die folgenden zwei Tabellen zeigen die Variationskoeffizienten für die Extinktionen und Aviditätsindices der Kontrollen für den Masernvirus-ZNS-Test auf. Die Kontrollen wurden dafür 15 mal bei Raumtemperatur getestet.

### 3. ERGEBNISSE

Tabelle 37: Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (VK) der Extinktionen (OD = optische Dichte) der Masern-Kontrollen bei Raumtemperatur in verschiedenen Verdünnungen

Kontrolle	Verdünnung	MW OD mit Urea	VK OD mit Urea	MW OD ohne Urea	VK OD ohne Urea	MW Aviditätsindex	VK Aviditätsindex
RPN1	1:1386	0,804	21,99%	1,381	20,94%	58,09%	6,69%
RPN2		0,755	20,77%	1,413	18,78%	54,37%	19,33%
akut		0,109	15,39%	0,946	13,20%	11,58%	9,12%
alt		1,214	11,31%	2,137	11,68%	56,99%	7,62%
RPN1	1:5544	0,249	25,42%	0,448	23,01%	55,42%	6,60%
RPN2		0,265	24,09%	0,473	26,17%	56,60%	9,06%
akut		0,035	20,60%	0,355	8,77%	9,94%	20,61%
alt		0,447	14,86%	0,911	16,18%	49,38%	9,59%

Ebenso wurden diese Kontrollen bei einer Inkubationstemperatur von konstant 37°C sechsmal ausgewertet:

Tabelle 38: Mittelwerte (MW) und Variationskoeffizienten (VK) der Extinktionen (OD = optische Dichte) der Masern-Kontrollen bei 37°C in verschiedenen Verdünnungen

Kontrolle	Verdünnung	MW OD mit Urea	VK OD mit Urea	MW OD ohne Urea	VK OD ohne Urea	MW Aviditätsindex	VK Aviditätsindex
RPN1	1:1386	0,366	82,77%	1,192	42,41%	26,55%	66,44%
RPN2		0,440	75,75%	1,070	58,43%	38,60%	32,37%
akut		0,105	34,34%	0,827	29,39%	12,56%	11,09%
alt		0,758	28,46%	1,912	14,47%	39,09%	18,29%
RPN1	1:5544	0,155	99,27%	0,452	59,47%	27,85%	69,61%
RPN2		0,130	86,83%	0,337	66,42%	35,89%	35,32%
akut		0,035	44,25%	0,312	30,53%	10,81%	22,62%
alt		0,246	22,93%	0,720	18,15%	34,11%	12,88%

Hier machten sich bei 37°C extreme Schwankungen bemerkbar, so dass bei Masern die ZNS-Testes ausschließlich bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

#### 3.3 ZNS-Avidität der VZV-Antikörper

Die nun anschließend dargestellten Aviditätswerte der Serum-Liquor-Paare wurden gänzlich mittels ZNS-Test mit der Geradenmethode über dem Referenz-x-Wert 2,0 ermittelt.

##### 3.3.1 Aviditätsspektren

Nachfolgend werden die Aviditätswerte der verschiedenen Krankheitsgruppen tabellarisch mit ihren Mittelwerten, Standardabweichungen sowie Minima und Maxima charakterisiert.

###### 3.3.1.1 VZV-Infektionen

Da in dieser Krankheitsgruppe bei fast allen Patienten mehrere Verlaufskontrollen vorhanden waren, wurde für die Charakterisierung der Avidität sowie auch für spätere Berechnungen ausschließlich das erste Serum-Liquor-Paar herangezogen.

Bei elf der zwölf Patienten liegt die Erstinfektion mit VZV schon lange zurück, was sich in den relativ hohen Aviditäten widerspiegelt.

Tabelle 39 zeigt statistische Parameter für diese elf Patienten:

Tabelle 39: Aviditätsspektrum bei VZV-Infektion bei lange zurückliegender Erstinfektion, erste Probenentnahme

	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Mittelwert</b>	52,29%	55,43%
<b>Standardabweichung</b>	9,30%	9,93%
<b>Median</b>	52,13%	56,63%
<b>Minimum</b>	35,86%	40,99%
<b>Maximum</b>	64,65%	69,04%

### 3. ERGEBNISSE

---

Bei einem Cut-off von 23 % ist für alle elf Seren und alle elf Liquores das Anti-VZV-IgG hochavide. Die Aviditäten der Serum- und Liquorproben unterscheiden sich im Wilcoxon-Test nicht statistisch signifikant.

Patient V12 litt zur Zeit der Entnahme des Serum-Liquor-Paares an einer Enzephalitis hervorgerufen durch eine Primärinfektion mit VZV.

Seine Aviditätswerte stellen sich folgendermaßen dar (Tabelle 40):

Tabelle 40: Aviditätswerte bei VZV-Enzephalitis durch Primärinfektion

	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Avidität</b>	3,30%	4,44%

Tabelle 41 zeigt statistische Parameter für diejenigen Patienten, für die es zwischen Tag 14 und Tag 50 nach Erkrankungsbeginn eine Verlaufskontrolle gab. Es handelt sich dabei um folgende Proben (vgl. Tabelle 3, S. 16): V1.3; V2.2; V5.2; V6.2; V8.3; V9.2; V10.2; V11.2.

Tabelle 41: Aviditätsspektrum bei VZV-Infektion bei lange zurückliegender Erstinfektion, Verlaufskontrolle zwischen Tag 14 und 50

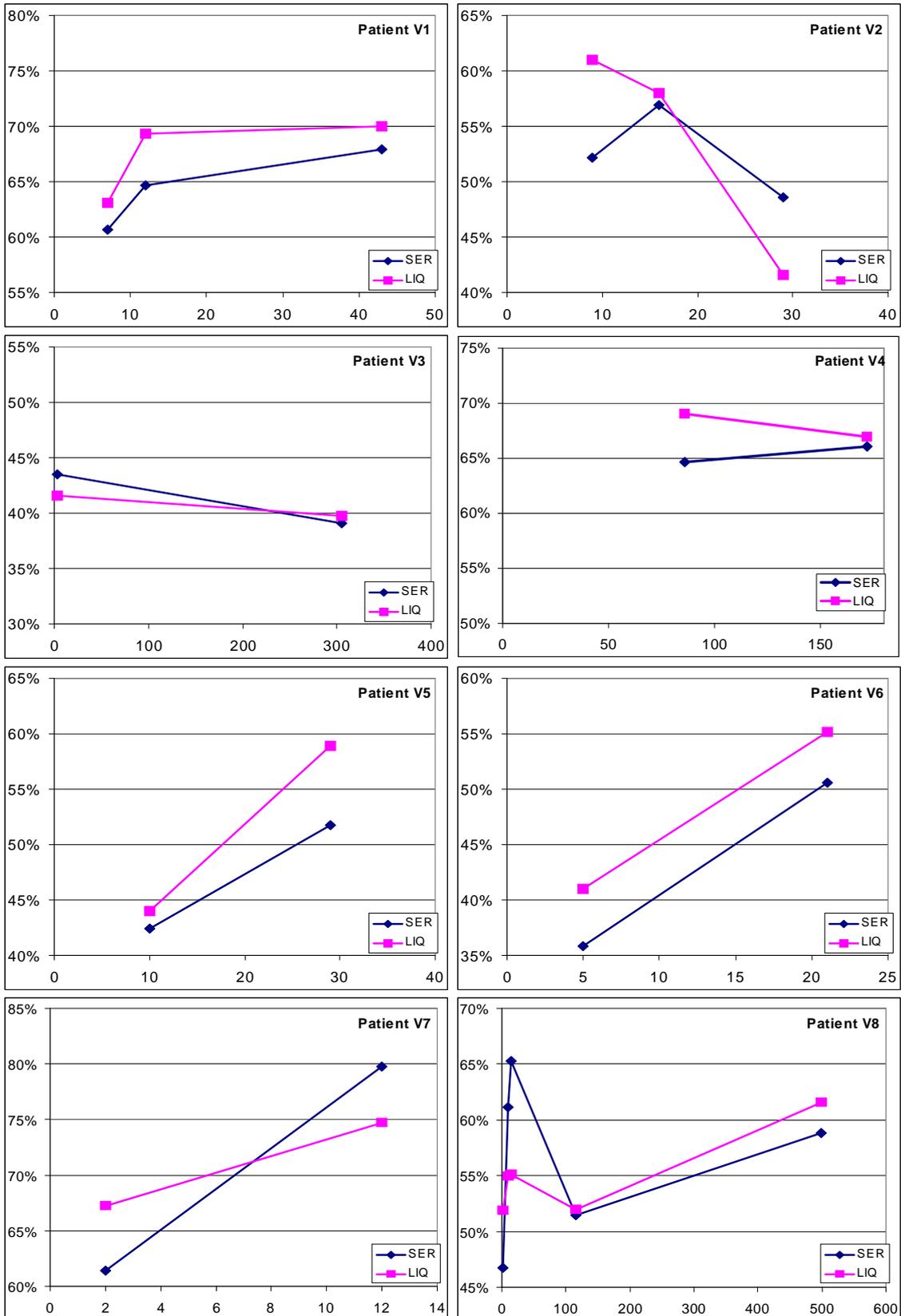
	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Mittelwert</b>	56,52%	56,81%
<b>Standardabweichung</b>	6,97%	5,65%
<b>Median</b>	54,34%	55,14%
<b>Minimum</b>	48,94%	49,69%
<b>Maximum</b>	67,91%	70,00%

Mit einem Minimalwert von 48,94% sind alle Aviditätswerte hochavide.

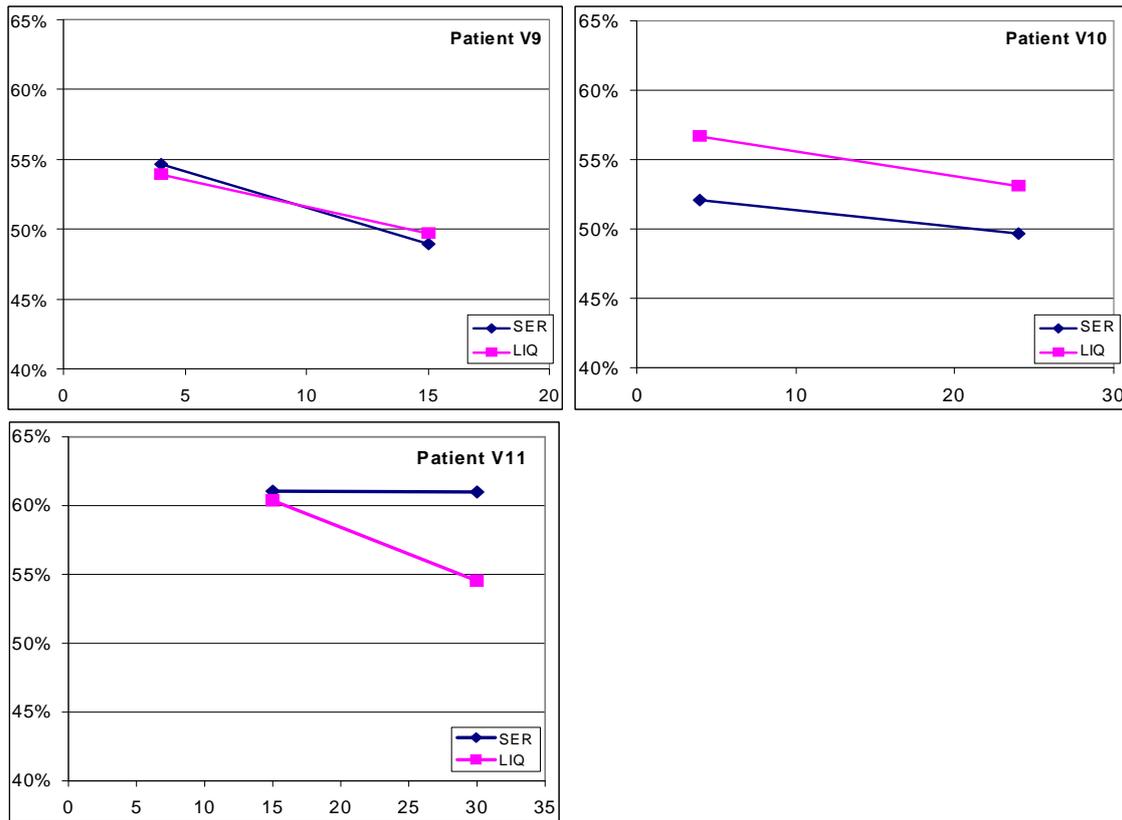
Folgendes Diagramm 38 gibt den zeitlichen Verlauf der Aviditäten der Patienten V1 bis V11 im Einzelnen wieder.

### 3. ERGEBNISSE

Diagramm 38: Aviditäten bei den Serum-Liquor-Paaren der Patienten V1 bis V11 im zeitlichen Verlauf (x-Achse: Krankheitstage, y-Achse: Avidität)



### 3. ERGEBNISSE



Die Aviditätsverläufe bei den VZV-Patienten lassen keine Systematik erkennen. Egal ob die Patienten über einen kürzeren oder längeren Zeitraum untersucht wurden, sind die Aviditäten nicht einheitlich ansteigend (z.B. V5, V6, V7), sondern auch abfallend (z.B. V3, V9, V10). Bei zwei Patienten sind im Verlauf sowohl ansteigende als auch abfallende Aviditäten zu beobachten (V2, V8). Weiterhin besteht keine Einheitlichkeit darüber, ob die Serum- oder Liquoravidität die höhere ist (vgl. V5 mit V6), bisweilen überkreuzen sich die beiden Aviditätswerte auch im Verlauf (u.a. V7).

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.3.1.2 Multiple Sklerose

Das Spektrum der Aviditäten bei den 18 Patienten mit Multipler Sklerose, deren Serum und Liquor VZV-Antikörper aufgewiesen hatten, ist in Tabelle 42 dargestellt:

Tabelle 42: Aviditätsspektrum der VZV-Antikörper bei Patienten mit Multipler Sklerose

	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Mittelwert</b>	53,14%	54,02%
<b>Standardabweichung</b>	14,65%	16,06%
<b>Median</b>	51,90%	58,28%
<b>Minimum</b>	29,52%	20,04%
<b>Maximum</b>	83,05%	83,34%

Im MS-Kollektiv sind jeweils 15 Seren und Liquores für Anti-VZV-IgG hochavide. Auch hier unterscheiden sich die Aviditäten der Serum- und Liquorproben im Wilcoxon-Test nicht statistisch signifikant.

#### 3.3.1.3 Kontroll-Patienten

Aus der Gruppe der Kontroll-Patienten weisen neun Serum-Liquor-Paare VZV-Antikörper auf. Tabelle 43 fasst das Spektrum zusammen:

Tabelle 43: Aviditätsspektrum der VZV-Antikörper bei Kontroll-Patienten

	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Mittelwert</b>	60,90%	61,63%
<b>Standardabweichung</b>	8,41%	9,22%
<b>Median</b>	60,53%	58,82%
<b>Minimum</b>	45,10%	49,81%
<b>Maximum</b>	76,10%	77,86%

In der Kontrollgruppe sind alle getesteten Proben für Anti-VZV-IgG hochavide. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Avidität der Serum- und Liquorproben ist im Wilcoxon-Test nicht feststellbar.

### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.3.1.4 Vergleich der Patientenkollektive

Ebenso als nicht signifikant erweist sich der Vergleich mittels Man-Whitney-U-Test der Liquoraviditäten einer Krankheitsgruppe mit denen einer anderen.

#### 3.3.2 Differenzen der Aviditäten von Serum und Liquor

Um zu untersuchen, ob sich die Aviditäten der Liquor-Antikörper in Bezug auf den jeweiligen Serumwert in den verschiedenen Patientenkollektiven unterscheiden, ist für jedes Serum-Liquor-Paar im Einzelnen die Differenz der Avidität von Serum und Liquor bestimmt worden. Dabei wurde zur Berechnung der Avidität grundsätzlich die Geradenmethode herangezogen. Es wurde danach immer wie in Gleichung 9 die Avidität des Serum von der des Liquor subtrahiert:

Gleichung 9:

$$\Delta \text{ Avidität} = \text{ Avidität}_{\text{Liquor}} - \text{ Avidität}_{\text{Serum}}$$

Die Differenzwerte sind anschließend wieder entsprechend der Krankheitsgruppen aufgeführt.

##### 3.3.2.1 VZV-Infektionen

Wie unter 3.3.1.1 (S. 76) beschrieben wurden zur Gegenüberstellung der Ergebnisse der einzelnen Krankheitsgruppen bei VZV-Infektionen nur die Ergebnisse der ersten Verlaufskontrolle verwandt. In die Ergebnisse sind auch die von Patient V12 mit der akuten Enzephalitis einbezogen. Bei dieser Krankheitsgruppe sind bei neun von zwölf Paaren die Aviditäten des Liquor größer als die des Serum.

Folgendes Diagramm stellt diese Ergebnisse noch einmal graphisch dar:

### 3. ERGEBNISSE

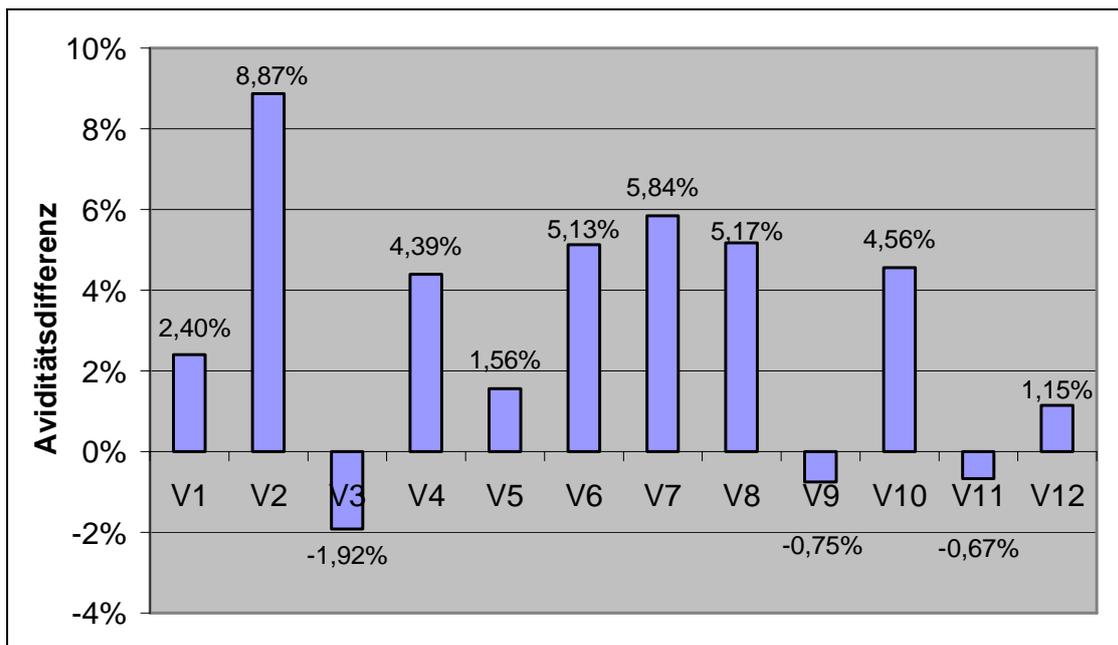


Diagramm 39: Aviditätsdifferenzen bei VZV-Infektion

In Tabelle 44 sind von den Beträgen dieser Ergebnisse Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichungen angegeben:

Tabelle 44: Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei VZV-Patienten

<b>Minimum</b>	0,67%
<b>Maximum</b>	8,87%
<b>Median</b>	3,40%
<b>Mittelwert ± mittlere Abweichung</b>	3,53% ± 2,13%

Diagramm 40 veranschaulicht die Verteilung der Differenzbeträge:

### 3. ERGEBNISSE

---

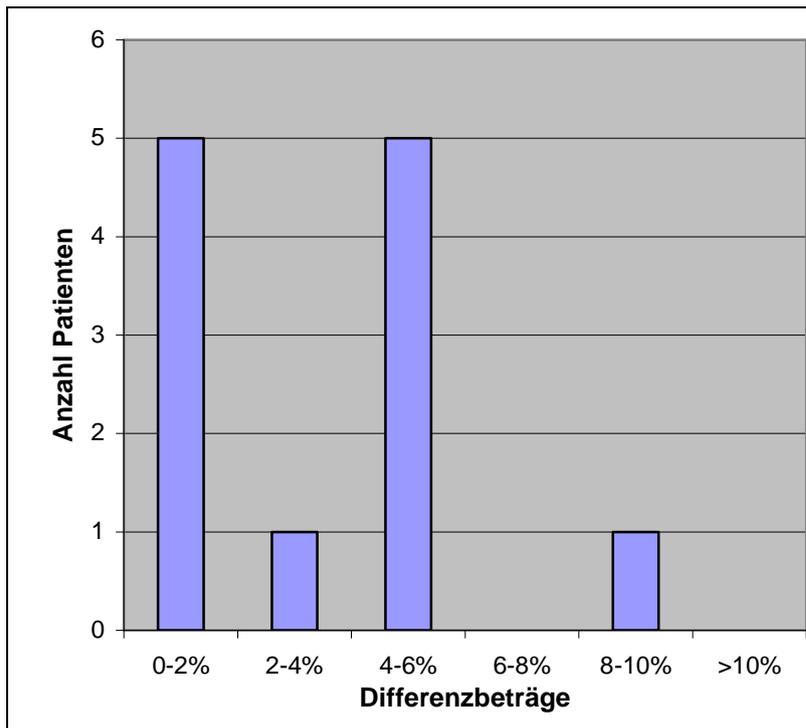


Diagramm 40: Verteilung der Differenzbeträge bei VZV-Infektion

Alle Differenzen sind damit kleiner als 10%.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.3.2.2 Multiple Sklerose

Hier sind bei zehn von 18 Paaren die Aviditäten des Liquor größer als die des Serum.

Diagramm 41 zeigt diese Ergebnisse:

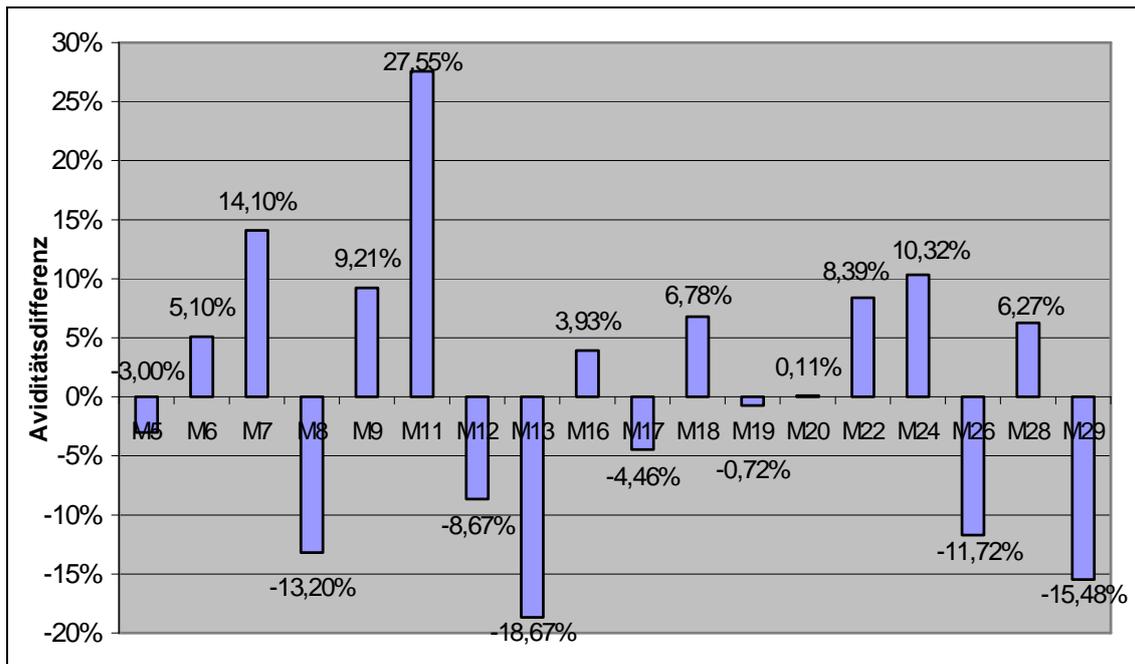


Diagramm 41: Aviditätsdifferenzen bei Multipler Sklerose

Auch hier fasst Tabelle 45 Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichungen der Beträge zusammen:

Tabelle 45: Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei Multipler Sklerose

<b>Minimum</b>	0,11%
<b>Maximum</b>	27,55%
<b>Median</b>	8,53%
<b>Mittelwert ± mittlere Abweichung</b>	9,32% ± 5,09%

Diagramm 42 veranschaulicht die Verteilung der Differenzbeträge für die MS-Patienten:

### 3. ERGEBNISSE

---

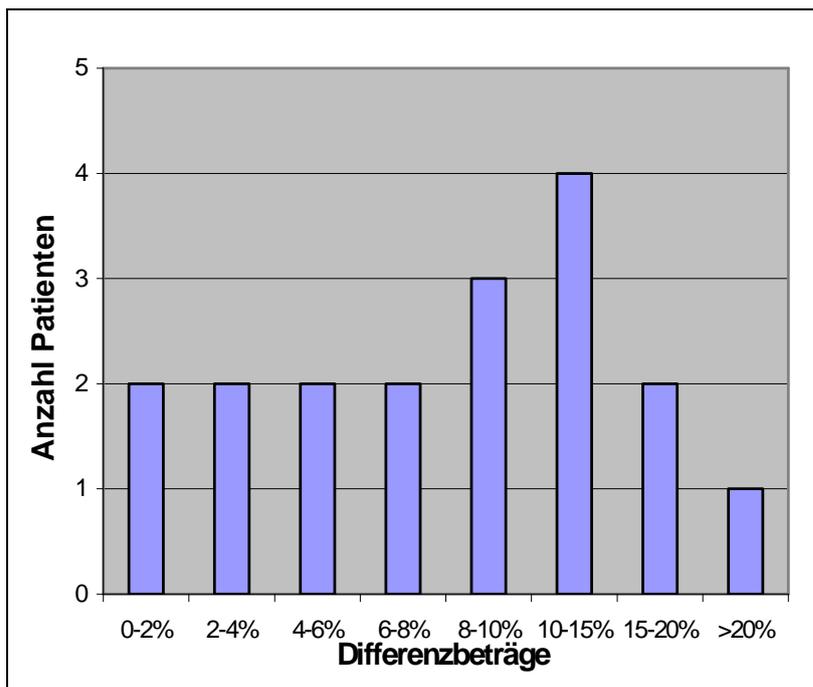


Diagramm 42: Verteilung der Differenzbeträge bei MS-Patienten

Damit sind bei sieben von 18 Serum-Liquor-Paaren (38,9%) in diesem Kollektiv die Differenzbeträge der Aviditäten größer als 10%.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.3.2.3 Kontroll-Patienten

In dieser Krankheitsgruppe sind bei vier von neun Paaren die Aviditäten des Liquor größer als die des Serum, was auch aus Diagramm 43 ersichtlich ist:

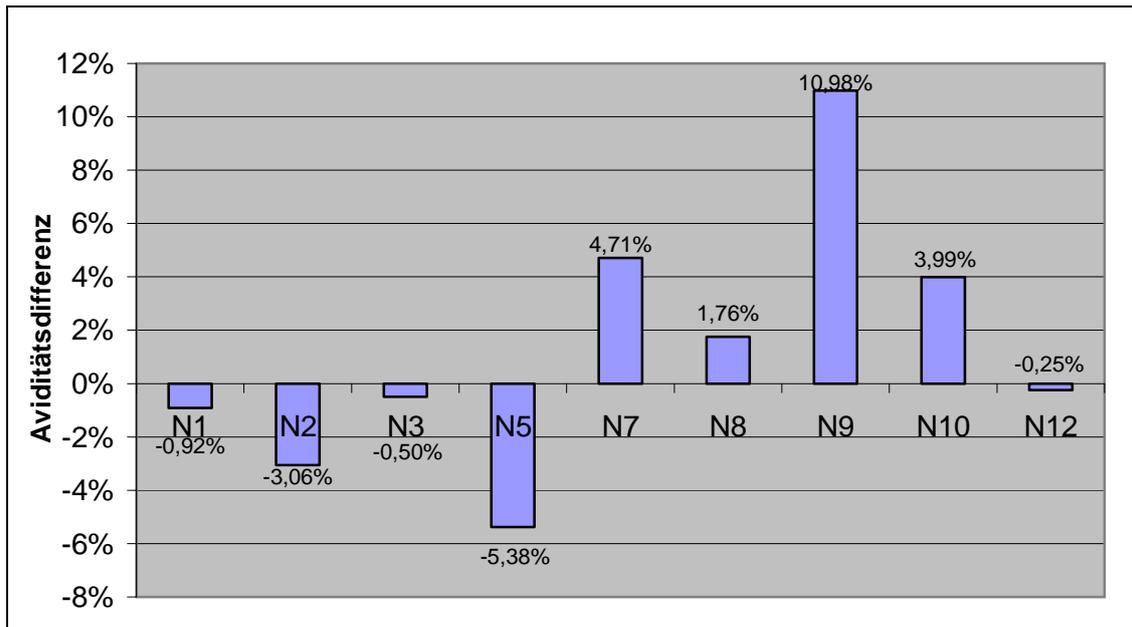


Diagramm 43: Aviditätsdifferenzen bei Kontroll-Patienten

Tabelle 46: Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei Kontroll-Patienten

<b>Minimum</b>	0,25%
<b>Maximum</b>	10,98%
<b>Median</b>	3,06%
<b>Mittelwert <math>\pm</math> mittlere Abweichung</b>	3,51% $\pm$ 2,45%

### 3. ERGEBNISSE

---

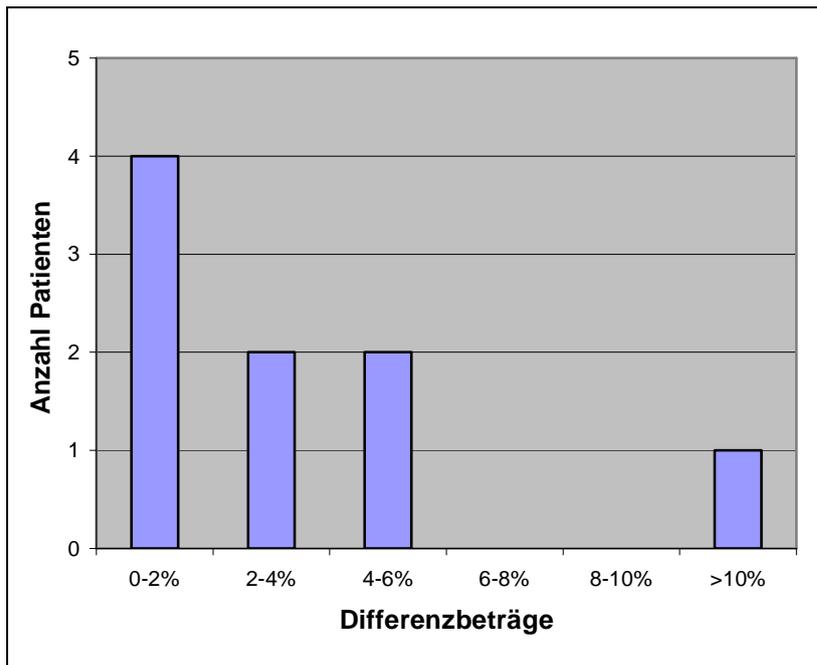


Diagramm 44: Verteilung der Differenzbeträge bei Kontroll-Patienten

Alle Differenzen sind kleiner als 11%.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.3.2.4 Statistik, Spezifität und Sensivität

Nachfolgende Tabelle 47 spiegelt nochmals sämtliche Eigenschaften der Serum-Liquor-Paare von den MS-Patienten wider, die auf VZV-Antikörper getestet wurden:

Tabelle 47: Zusammenfassung der Eigenschaften der Serum-Liquor-Paare von MS-Patienten mit VZV-Antikörpern

Patient	Alter	Geschlecht	MS seit [a]	Klassifikation	AI <sub>VZV</sub>	Q <sub>Alb</sub> [ $\times 10^3$ ]	Q <sub>IgG</sub> [ $\times 10^3$ ]	Serum-avidität	Liquor-avidität	Betrag der Differenz
M5	23	w	n.b.	n.b.	>2,70	7,15	9,69	63,26%	60,26%	3,00%
M6	28	w	6	sf remitt.	>4,6	4,70	7,58	78,24%	83,34%	5,10%
M7	37	m	0	sf	4,10	5,01	11,01	44,99%	59,09%	14,10%
M8	30	w	0	sf	11,90	5,49	4,77	83,05%	69,85%	13,20%
M9	36	w	0	sf	>5,00	5,53	7,27	64,77%	73,98%	9,21%
M11	23	w	0	sf	>5,60	4,69	7,37	29,52%	57,08%	27,55%
M12	47	m	n.b.	n.b.	2,20	5,13	9,63	43,96%	35,29%	8,67%
M13	30	w	0,2	lab.gest.	1,80	6,02	4,40	45,06%	26,39%	18,67%
M16	47	w	1	cp	>5,30	4,65	19,69	43,62%	47,54%	3,93%
M17	35	w	0,1	lab.gest.	1,80	2,45	2,90	64,29%	59,84%	4,46%
M18	33	w	0	sf	>2,30	3,10	3,75	52,43%	59,20%	6,78%
M19	39	w	0	cp	9,50	5,35	7,32	63,96%	63,24%	0,72%
M20	27	w	1	sf	2,50	4,49	4,39	51,38%	51,49%	0,11%
M22	41	w	11	sf	>6,70	4,51	12,52	36,85%	45,25%	8,39%
M24	35	m	6	cp	6,30	7,06	4,42	47,15%	57,47%	10,32%
M26	29	w	7	sf	1,90	5,48	11,19	31,76%	20,04%	11,72%
M28	32	w	0,7	lab.gest.	2,70	2,04	1,95	56,21%	62,48%	6,27%
M29	24	w	n.b.	n.b.	2,10	4,29	4,55	56,06%	40,58%	15,48%

cp: chronisch progredient; scp: sekundär chronisch progredient; sf: schubförmig; sf remitt.: schubförmig remittierend; lab.gest.: laborgestützt; n.b.: nicht bekannt.

Bei Betrachtung des Antikörperindex, des Q<sub>Alb</sub> oder Q<sub>IgG</sub> scheint es keinen Zusammenhang zwischen den Aviditäten in Serum oder Liquor noch zwischen deren Differenz zu geben. Stellt man statistisch insbesondere den jeweiligen Q<sub>Alb</sub> als Maß für die Liquorschrankenstörung in Relation zum Differenzbetrag der Aviditätsindices, so beträgt der Korrelationskoeffizient 0,14 und spricht gegen einen direkten Zusammenhang dieser beiden Domänen.

Auffällig ist allerdings, dass vier der sieben Patienten (57,1%), bei denen die Differenz mehr als 10% beträgt, zum Entnahmezeitpunkt an dem schubförmigen Typ der Multiplen Sklerosen litten. Ebenfalls zur schubförmigen MS gehört

### 3. ERGEBNISSE

ein großer Anteil der Patienten – drei von fünf (60%) –, die in mindestens einer der beiden Proben eine relativ niedrige Avidität (< 40%) aufweisen.

Da nur 1/6 der untersuchten Patienten männlich sind, sollte einer Prädominanz etwaiger Eigenschaften beim weiblichen Geschlecht keine Bedeutung beigegeben werden.

Daraufhin wurde untersucht, ob es zwischen den Differenzwerten der drei auf VZV-Antikörper getesteten Patientengruppen einen Unterschied gibt. Dazu sind die Minima, Maxima sowie Mittelwerte der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei den verschiedenen Krankheitsbildern in Diagramm 45 vergleichend erfasst:

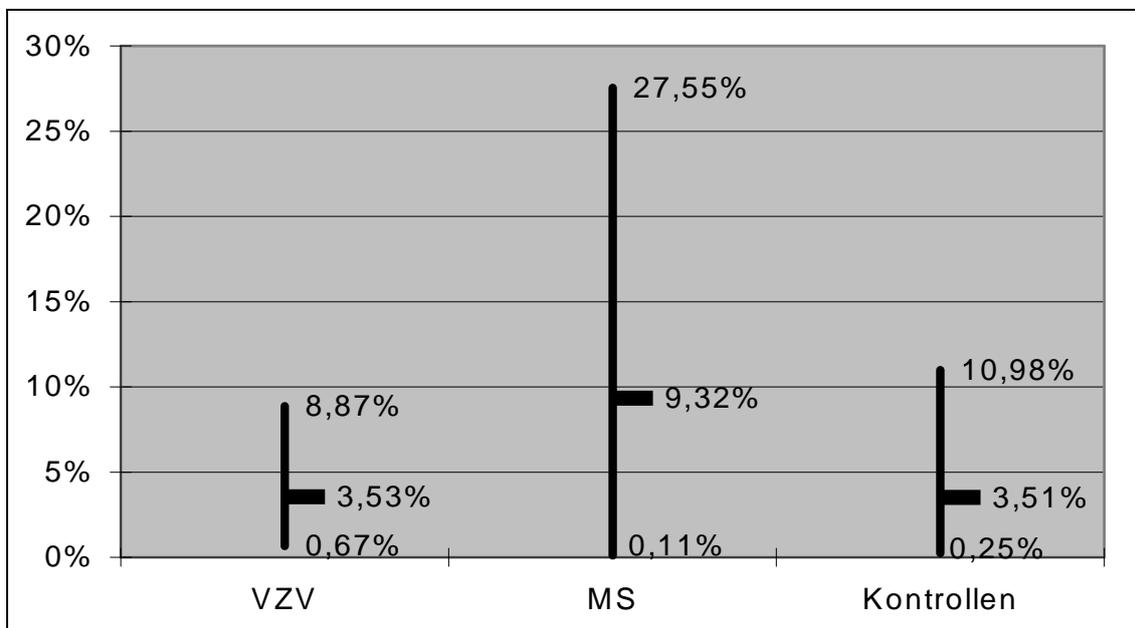


Diagramm 45: Minima, Maxima und Mittelwerte der Aviditätsdifferenzen zwischen Serum und Liquor bei VZV

Im statistischen Vergleich sind zunächst die realen Aviditätsdifferenzen der Krankheitsgruppen untereinander mittels Man-Whitney-U-Test verglichen worden, was aber keinen signifikanten Unterschied ergeben hat.

Weiterhin wurden auf dieselbe Weise die Beträge der Aviditätsdifferenzen miteinander per Man-Whitney-U-Test verglichen.

Dabei stellte sich nun Folgendes dar (Tabelle 48):

### 3. ERGEBNISSE

Tabelle 48: p-Werte für die Vergleiche der Beträge der Aviditätsdifferenzen zwischen Serum und Liquor bei VZV

Vergleich	p
VZV / Kontrollen	0,702
MS / Kontrollen	0,020
VZV / MS	0,010

Bei den Vergleichen der Differenzbeträge aus der Gruppe der MS-Patienten mit den beiden anderen Gruppen VZV-Infektion und Kontroll-Patienten gibt es also signifikante Unterschiede, die sich sowohl durch den größeren Maximal- als auch größeren Mittelwert der Differenzbeträge bei den MS-Patienten widerspiegeln.

Graphisch veranschaulicht Diagramm 46 das weiter gefächerte Verteilungsmuster der Differenzbeträge der MS-Patienten gegenüber der VZV- und Kontrollgruppe:

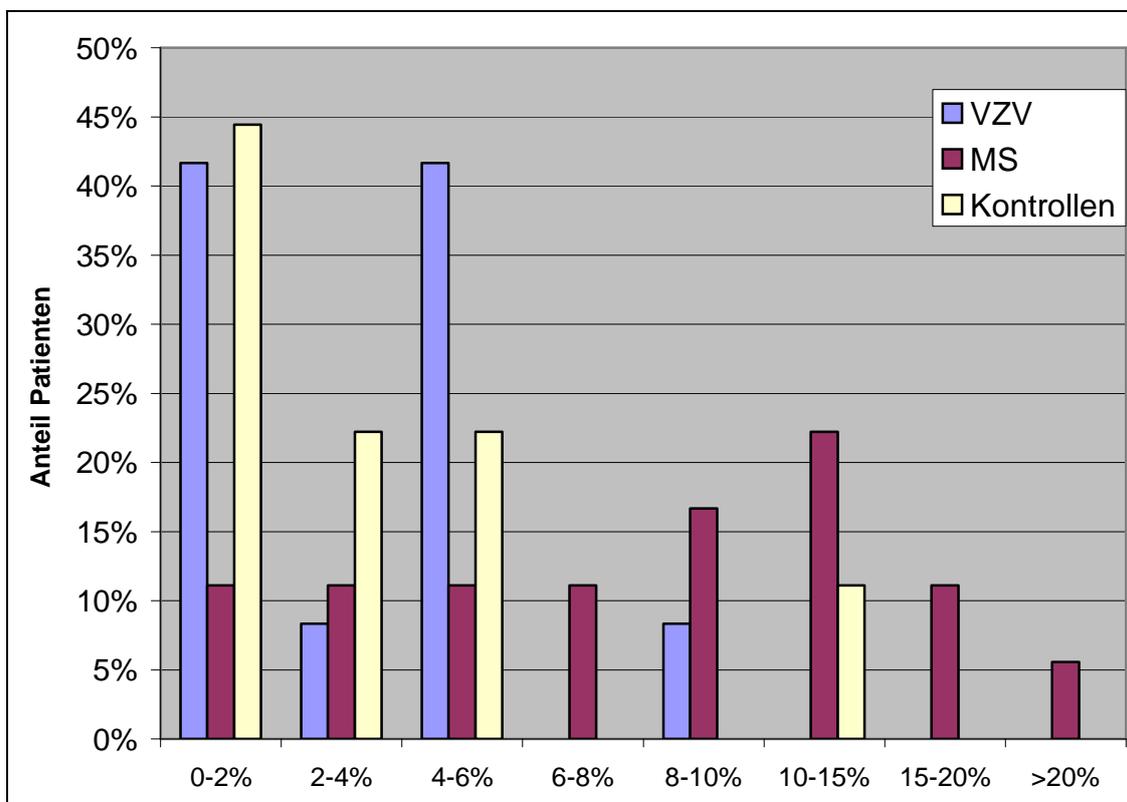


Diagramm 46: Verteilung der Aviditätsdifferenzen zwischen Serum und Liquor aller drei Krankheitskollektive unter VZV

### 3. ERGEBNISSE

Die Aviditätsdifferenz einiger Serum-Liquor-Paare von Patienten mit Multipler Sklerose sind also als erheblich größer als die maximale Differenz der anderen Krankheitsgruppen von etwa 10%. Diagramm 47 zeigt die Spezifität und Sensitivität der Aviditätsdifferenz im Hinblick auf das Vorliegen einer MS. Auf der x-Achse ist die Aviditätsdifferenz als Cut-off aufgetragen:

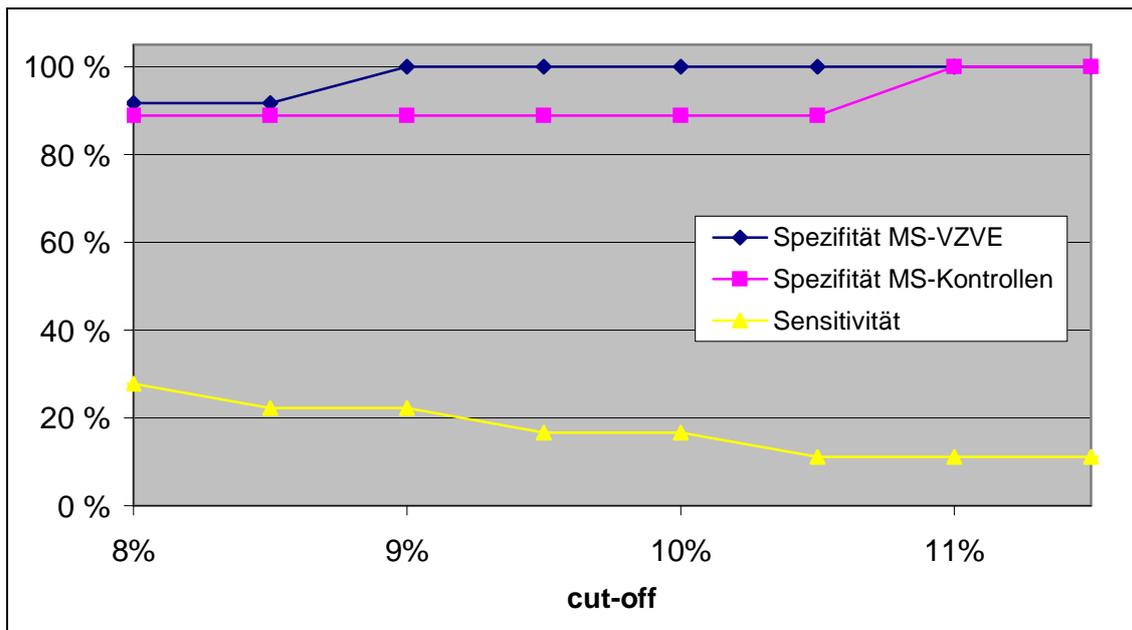


Diagramm 47: Sensitivität und Spezifität für VZV

Danach gilt für die Avidität der VZV-Antikörper im Liquor bei MS-Patienten: 22,2% der Patienten mit Multipler Sklerose zeigen eine Differenz der Aviditäten von Serum und Liquor von mehr als 9,0%. Diese Differenz ist zu 100% spezifisch für die MS im Vergleich mit Patienten mit VZV- Infektion bzw. zu 88,9% im Vergleich mit Patienten mit nichtentzündlichen Hirnerkrankungen. 100% spezifisch für eine MS im Vergleich zu beiden Vergleichskollektiven ist eine Differenz von mehr als 11%, was bei 11,1% der Patienten mit MS anzutreffen ist.

## 3.4 ZNS-Avidität der Masernvirusantikörper

In gleicher Weise wie bei VZV werden nun die Aviditätsspektren, die Differenzen sowie deren Beträge bei den Masernvirusantikörper beschrieben.

### 3.4.1 Aviditätsspektren

Erneut werden nachfolgend die Aviditätswerte der verschiedenen Krankheitsgruppen tabellarisch mit ihren Mittelwerten, Standardabweichungen sowie Minima und Maxima charakterisiert.

#### 3.4.1.1 SSPE

Tabelle 49 charakterisiert für die beiden SSPE-Proben (SSPE1: erste Probe, SSPE2: Verlaufsprobe) die Aviditäten der Serum-Liquor-Paare:

Tabelle 49: Aviditätsspektrum der Proben der SSPE-Patienten

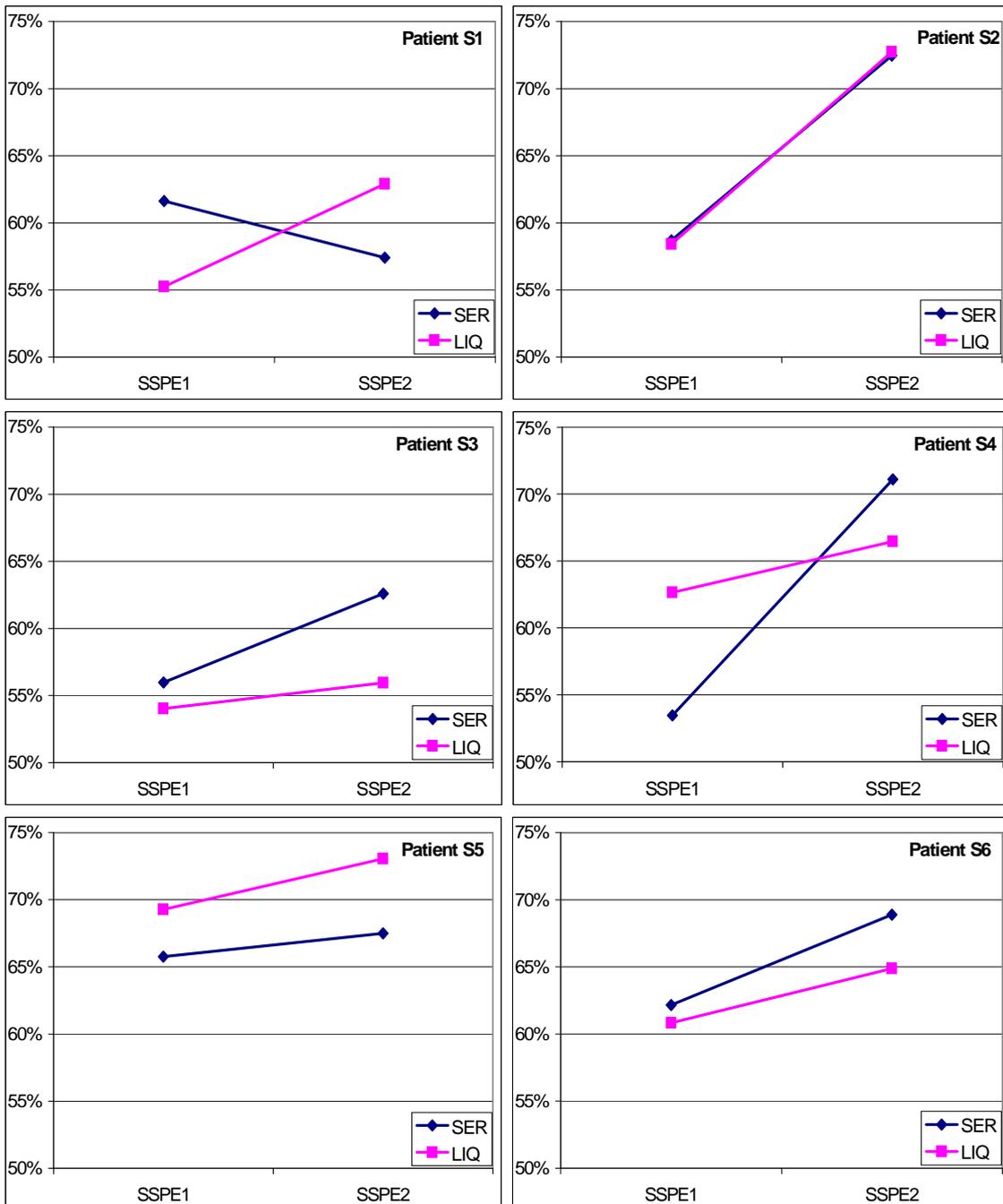
	SSPE1		SSPE2	
	Serum	Liquor	Serum	Liquor
<b>Mittelwert</b>	59,61%	60,07%	66,66%	66,00%
<b>Standardabweichung</b>	4,48%	5,56%	5,68%	6,44%
<b>Median</b>	60,15%	59,62%	68,19%	65,67%
<b>Minimum</b>	53,45%	54,02%	57,41%	55,94%
<b>Maximum</b>	65,76%	69,27%	72,46%	73,05%

Sowohl bei den SSPE1- als auch bei den SSPE2-Paaren unterscheiden sich im Wilcoxon-Test die Aviditätswerte von Serum und Liquor aus demselben Paar nicht signifikant.

In Diagramm 48 ist die Entwicklung der Avidität der SSPE1- und SSPE2-Paare zu verfolgen:

### 3. ERGEBNISSE

Diagramm 48: Aviditäten bei den Serum-Liquor-Paaren aus dem SSPE1- und SSPE2-Kollektiven (x-Achse: Probe1/ Verlaufsprobe, y-Achse: Avidität)



Im Mittel liegen die Aviditäten der Seren und Liquores aus SSPE1 um 60%. Bis auf eine Ausnahme (Serum von Patient S1) steigen dann die Aviditäten von SSPE1 nach SSPE 2 an. Der Mittelwert liegt bei 66%. Offenbar unterliegen die Masernvirusantikörper bei der SSPE im Verlauf der Krankheit weiterhin einem

### 3. ERGEBNISSE

---

Reifungsprozess. Vier der Paare zeigen einen gleichsinnigen Anstieg der Avidität; bei Patient S2 und S4 ist eine Überkreuzung der Anstiege zu beobachten.

#### 3.4.1.2 Multiple Sklerose

Über das Spektrum der Aviditäten bei den 19 Patienten mit Multipler Sklerose, deren Serum und Liquor Masernvirusantikörper aufgewiesen hatten, gibt Tabelle 50 einen Überblick:

Tabelle 50: Aviditätsspektrum der Masernvirusantikörper bei Patienten mit Multipler Sklerose

	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Mittelwert</b>	52,80%	56,76%
<b>Standardabweichung</b>	12,91%	16,75%
<b>Median</b>	56,35%	55,93%
<b>Minimum</b>	18,39%	10,57%
<b>Maximum</b>	68,79%	80,30%

Wiederum unterscheiden sich im statistischen Vergleich (Wilcoxon-Test) die Aviditäten der Serum- und Liquorproben nicht signifikant.

#### 3.4.1.3 Kontroll-Patienten

Aus der Gruppe der Kontroll-Patienten weisen 14 Serum-Liquor-Paare Masernvirusantikörper auf. Tabelle 51 fasst das Spektrum zusammen:

Tabelle 51: Aviditätsspektrum der Masernvirusantikörper bei Kontroll-Patienten

	<b>Serum</b>	<b>Liquor</b>
<b>Mittelwert</b>	55,13%	54,76%
<b>Standardabweichung</b>	9,02%	8,47%
<b>Median</b>	54,83%	54,65%
<b>Minimum</b>	42,91%	39,99%
<b>Maximum</b>	72,13%	68,58%

Die Aviditäten der Serum- und Liquorproben unterscheiden sich auch hier im Wilcoxon-Test nicht signifikant.

#### 3.4.1.4 Vergleich der Patientenkollektive

Wie schon bei VZV erweist sich bei Masern der Vergleich mittels Man-Whitney-U-Test der Liquoraviditäten einer Krankheitsgruppe mit denen einer anderen als nicht signifikant.

#### 3.4.2 Differenzen der Aviditäten von Serum und Liquor

Um auch für Masern zu untersuchen, ob sich die Aviditäten der Liquor-Antikörper in Bezug auf den jeweiligen Serumwert in den verschiedenen Patientenkollektiven unterscheiden, wurde wie unter 3.3.2 (S. 81) für jedes Serum-Liquor-Paar im einzelnen die Differenz der Avidität von Serum und Liquor mit Gleichung 9 (S. 81) bestimmt.

Die Differenzwerte sind nachfolgend wieder entsprechend den Krankheitsgruppen aufgeführt.

##### 3.4.2.1 SSPE

Diagramm 49 zeigt nun die Ergebnisse der Aviditätsdifferenzen sowohl des ersten (SSPE1) als auch des zweiten (SSPE2) Serum-Liquor-Paares eines jeden SSPE-Patienten:

### 3. ERGEBNISSE

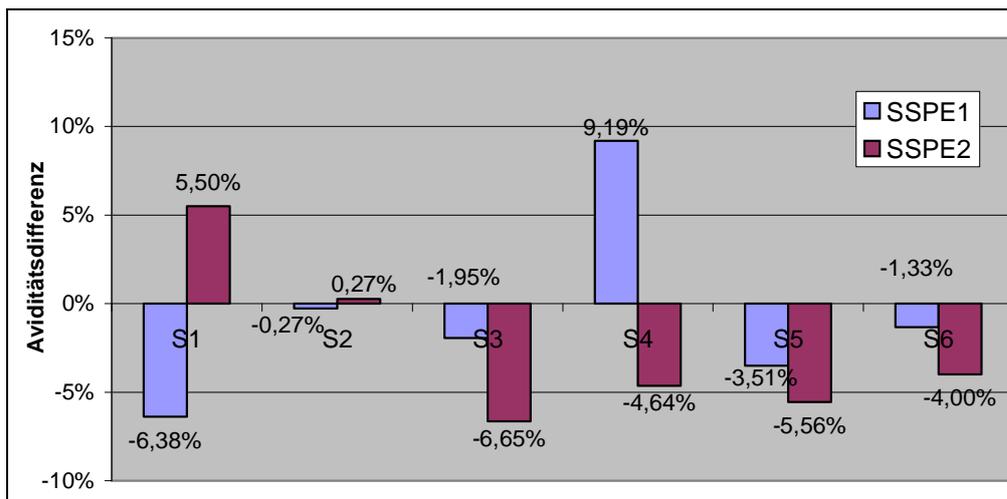


Diagramm 49: Aviditätsdifferenzen von SSPE1 und SSPE2

Bei den SSPE1-Paaren ist bei Patient S4 die Avidität des Liquors deutlich größer als die des Serums. Bei SSPE2 ist dies bei Patient S1 der Fall.

Bei diesen beiden Patienten ist somit auch eine Umkehrung des jeweiligen höheren Wertes von Serum auf Liquor bzw. umgekehrt zu beobachten.

In Tabelle 52 sind von den Beträgen dieser Ergebnisse Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichungen angegeben:

Tabelle 52: Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge der Aviditätsdifferenzen von SSPE1 und SSPE2

	SSPE1	SSPE2
<b>Minimum</b>	0,27%	0,27%
<b>Maximum</b>	9,19%	6,65%
<b>Median</b>	2,73%	5,07%
<b>Mittelwert</b>	3,77% ± 2,68%	4,44% ± 1,53%

Das Differenzmaximum liegt bei SSPE1 zwar höher als bei SSPE2, doch steigt der Mittelwert von SSPE1 nach SSPE2 an.

Dies ist auch aus in der Graphik von Diagramm 50 zu erkennen: Bei SSPE1 sind nämlich alle Differenzen kleiner als 10%, während bei SSPE2 keine Differenz größer als 8% ist. Zusätzlich wird gezeigt, dass bei SSPE2 die meisten Werte im Intervall 4 bis 6%, bei SSPE1 dagegen zwischen 0 und 2% liegen.

### 3. ERGEBNISSE

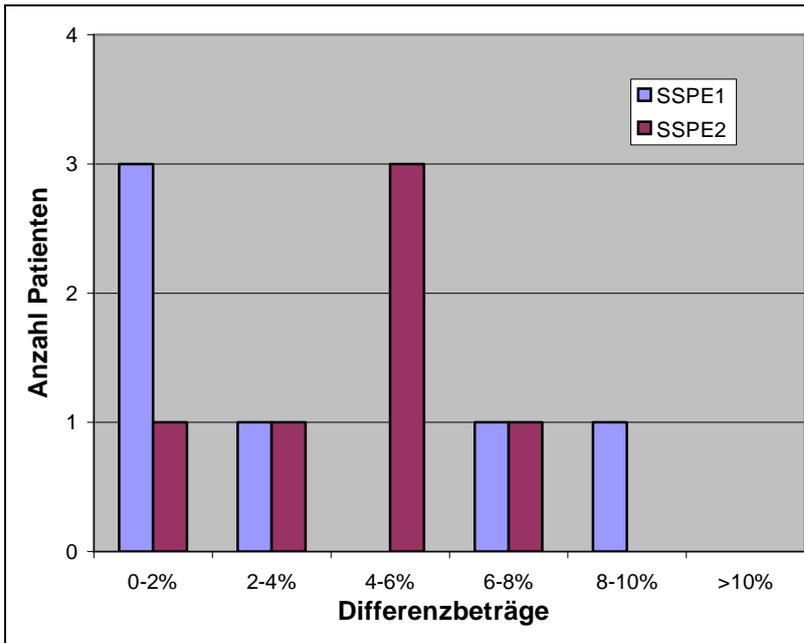


Diagramm 50: Verteilung der Differenzbeträge von SSPE1 und SSPE2

#### 3.4.2.2 Multiple Sklerose

Hier sind bei zwölf von 19 Paaren die Aviditäten des Liquor größer als die des Serum. Diagramm 51 zeigt diese Ergebnisse:

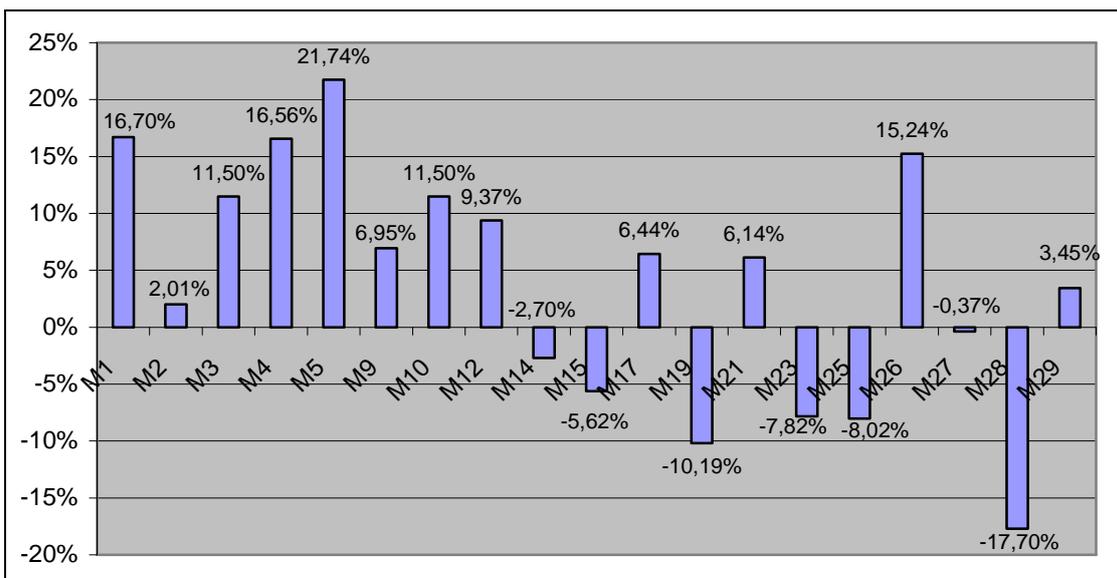


Diagramm 51: Aviditätsdifferenzen bei Multipler Sklerose

### 3. ERGEBNISSE

Wiederum sind in Tabelle 53 von den Beträgen dieser Ergebnisse Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichungen angegeben:

Tabelle 53: Minima, Maxima und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei Multipler Sklerose

<b>Minimum</b>	0,37%
<b>Maximum</b>	21,74%
<b>Median</b>	8,02%
<b>Mittelwert</b>	9,47%±4,77%

Diagramm 52 veranschaulicht für die MS-Patienten die Verteilung der Differenzbeträge:

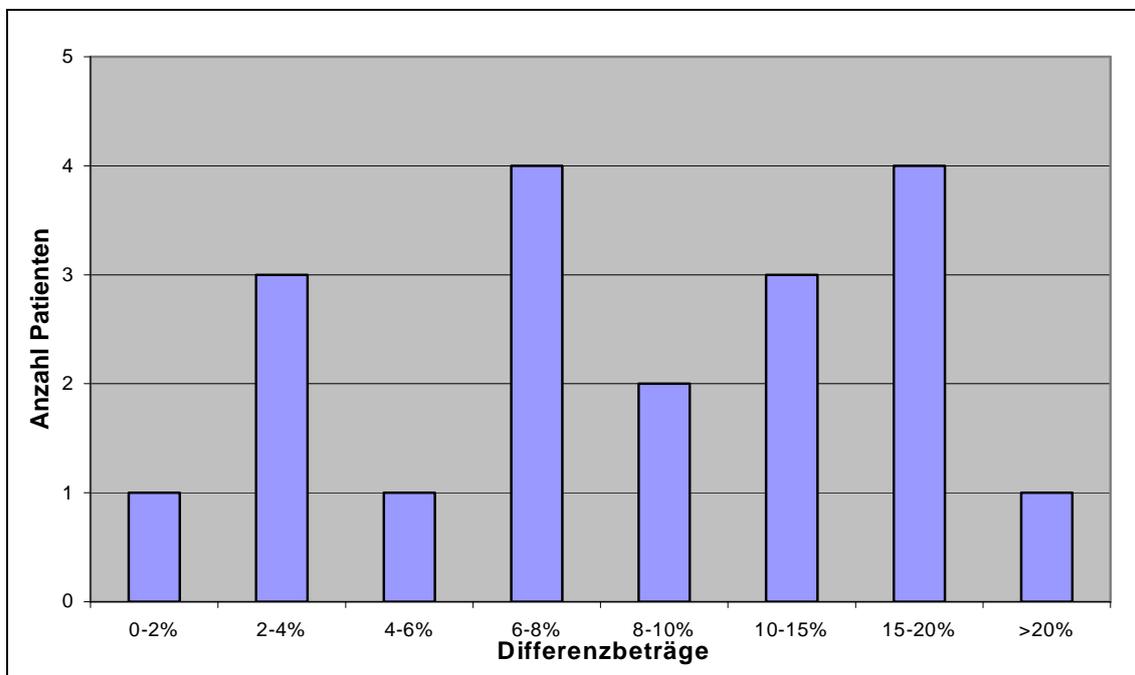


Diagramm 52: Verteilung der Differenzbeträge bei MS-Patienten

Damit sind bei acht von 19 Serum-Liquor-Paaren (42,1%) in diesem Kollektiv die Differenzbeträge der Aviditäten größer als 10%.

#### 3.4.2.3 Kontroll-Patienten

In dieser Krankheitsgruppe ist bei sechs von 14 Paaren die Avidität des Liquor größer als die des Serum. Diagramm 53 veranschaulicht wieder diese Ergebnisse:

### 3. ERGEBNISSE

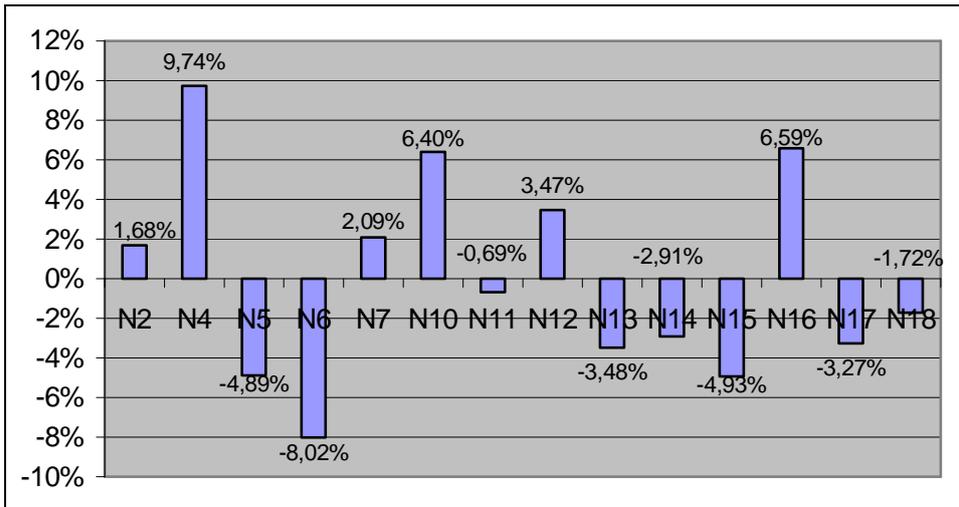


Diagramm 53: Aviditätsdifferenzen bei Kontroll-Patienten

Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge dieser Ergebnisse sind in Tabelle 54 angegeben:

Tabelle 54: Minima, Maxima, Mediane und Mittelwerte mit mittlerer Abweichung der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei Kontroll-Patienten

<b>Minimum</b>	0,69%
<b>Maximum</b>	9,74%
<b>Median</b>	3,48%
<b>Mittelwert</b>	4,28% ± 2,13%

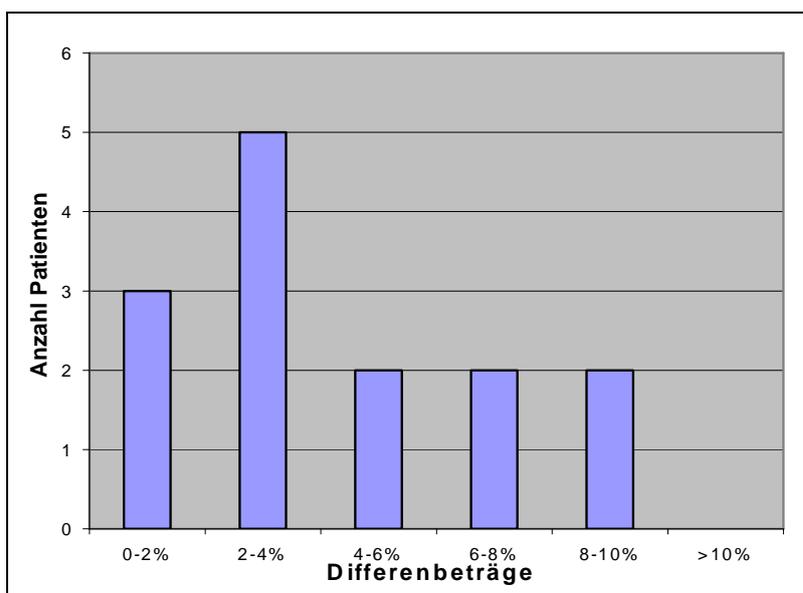


Diagramm 54: Verteilung der Differenzbeträge bei Kontroll-Patienten

Alle Differenzen sind damit auch in diesem Kollektiv kleiner als 10%.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.4.2.4 Statistik, Spezifität und Sensitivität

Nachfolgende Tabelle 55 spiegelt nochmals sämtliche Eigenschaften der Serum-Liquor-Paare von den MS-Patienten wider, die auf Masernvirusantikörper getestet wurden:

Tabelle 55: Zusammenfassung der Eigenschaften der Serum-Liquor-Paare von MS-Patienten mit Masernvirusantikörpern

Patient	Alter	Geschlecht	MS seit [a]	Klassifikation	AI <sub>Mas</sub>	Q <sub>Alb</sub> [ $\times 10^3$ ]	Q <sub>IgG</sub> [ $\times 10^3$ ]	Serum-avidität	Liquor-avidität	Betrag der Differenz
M1	39	w	13	n.b.	>1,60	7,67	9,76	54,51%	71,21%	16,70%
M2	45	m	20	scp	>4,00	7,87	9,51	59,37%	61,38%	2,01%
M3	32	w	3	sf	1,80	6,32	5,58	49,81%	61,32%	11,50%
M4	52	m	5	scp	2,40	8,74	5,53	63,63%	80,19%	16,56%
M5	23	w	n.b.	n.b.	>3,10	7,15	9,69	26,05%	47,70%	21,74%
M9	36	w	0	sf	1,70	5,53	7,27	38,60%	45,54%	6,95%
M10	36	m	1	cp	3,30	3,06	4,54	68,79%	80,30%	11,50%
M12	47	m	n.b.	n.b.	>6,70	5,13	9,63	56,35%	65,72%	9,37%
M14	37	m	n.b.	scp	11,10	4,94	6,16	57,51%	54,81%	2,70%
M15	32	m	0,5	sf	2,60	9,06	7,21	61,55%	55,93%	5,62%
M17	35	w	0,1	lab.gest.	>3,80	2,45	2,90	44,32%	50,75%	6,44%
M19	39	w	0	cp	2,70	5,35	7,32	59,00%	48,82%	10,19%
M21	45	w	n.b.	n.b.	2,40	12,94	6,13	62,08%	68,22%	6,14%
M23	39	m	12	scp	7,80	6,30	15,94	18,39%	10,57%	7,82%
M25	60	w	n.b.	scp	9,80	9,00	12,49	59,70%	51,68%	8,02%
M26	29	w	7	sf	>2,50	5,48	11,19	62,98%	78,22%	15,24%
M27	59	m	6	cp	>2,40	6,63	5,74	53,14%	52,77%	0,37%
M28	32	w	0,7	lab.gest.	>5,80	2,04	1,95	51,42%	33,72%	17,70%
M29	24	w	n.b.	n.b.	4,90	4,29	4,55	55,99%	59,44%	3,45%

cp: chronisch progredient; scp: sekundär chronisch progredient; sf: schubförmig; sf remitt.: schubförmig remittierend; lab.gest.: laborgestützt; n.n.: nicht nachgewiesen; n.b.: nicht bekannt.

Auch bei den Masernvirusantikörpern gibt es bezüglich des Antikörperindex, des Q<sub>Alb</sub> oder Q<sub>IgG</sub> keinen Zusammenhang zwischen den Aviditäten in Serum oder Liquor oder deren Differenz. Mit einem Korrelationskoeffizient von  $-0,09$  gibt es ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Q<sub>Alb</sub> als Maß für die Liquorschrankenstörung und dem Differenzbetrag der Aviditätsindices.

Im Gegensatz zu den VZV-Antikörpern ist die Prädominanz der schubförmigen MS mit Differenzen von größer als 10% bei den Masernvirusantikörpern nicht zu beobachten. Auch diejenigen Proben mit relativ niedriger Avidität ( $< 40\%$ ) verteilen sich gleichmäßig über alle verschiedenen MS-Typen. Eine bestimmte Systematik lässt sich daher nicht erkennen.

### 3. ERGEBNISSE

Auch für die Masernvirus-Avidität wurde untersucht, ob es zwischen den Differenzwerten der drei Patientengruppen einen Unterschied gibt. Dazu sind wieder die Minima, Maxima sowie Mittelwerte der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei den verschiedenen Krankheitsbildern zum Vergleich in Diagramm 55 nebeneinander gestellt:

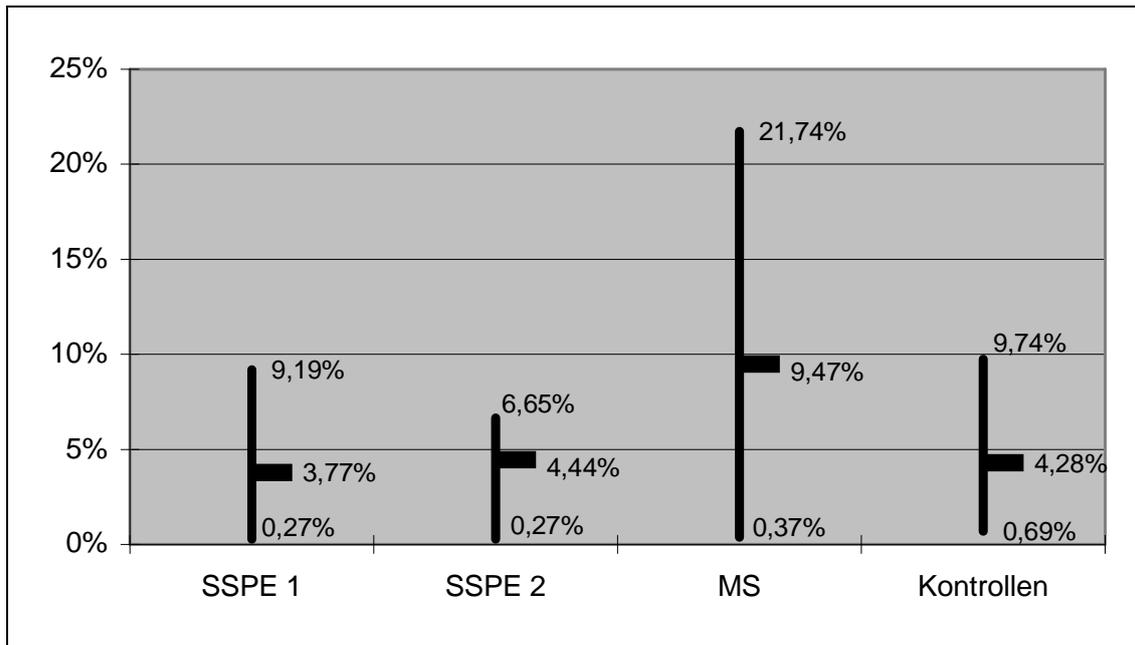


Diagramm 55: Minima, Maxima und Mittelwerte der Differenzbeträge bei Masern

Hier sind auch zunächst wie bei VZV die realen Aviditätsdifferenzen der Krankheitsgruppe untereinander verglichen worden, was aber ebenso keinen signifikanten Unterschied ergeben hat.

Weiterhin wurden auch auf dieselbe Weise die Beträge der Aviditätsdifferenzen miteinander verglichen. Die p-Werte aus den statistischen Tests zeigt Tabelle 56:

### 3. ERGEBNISSE

Tabelle 56: p-Werte für die Vergleiche der Beträge der Aviditätsdifferenzen bei Masern

Vergleich	p	Test
SSPE1 / SSPE2	0,116	Wilcoxon-Test
SSPE1 / Kontrollen	0,602	U-Test
SSPE2 / Kontrollen	0,659	U-Test
SSPE1 / MS	0,011	U-Test
SSPE2 / MS	0,0495	U-Test
Kontrollen / MS	0,005	U-Test

Ebenso wie bei VZV gibt es signifikante Unterschiede bei den Vergleichen der Differenzbeträge aus der Gruppe der MS-Patienten mit den drei anderen Gruppen SSPE1 und SSPE2 sowie Kontroll-Patienten bedingt durch den größeren Maximal- als auch Mittelwert der Differenzbeträge bei den MS-Patienten.

Nachfolgendes Diagramm 56 zeigt wiederum das weiter gefächerte Verteilungsmuster der Differenzbeträge der MS-Patienten im Vergleich zum SSPE-Kollektiv und der Kontrollgruppe:

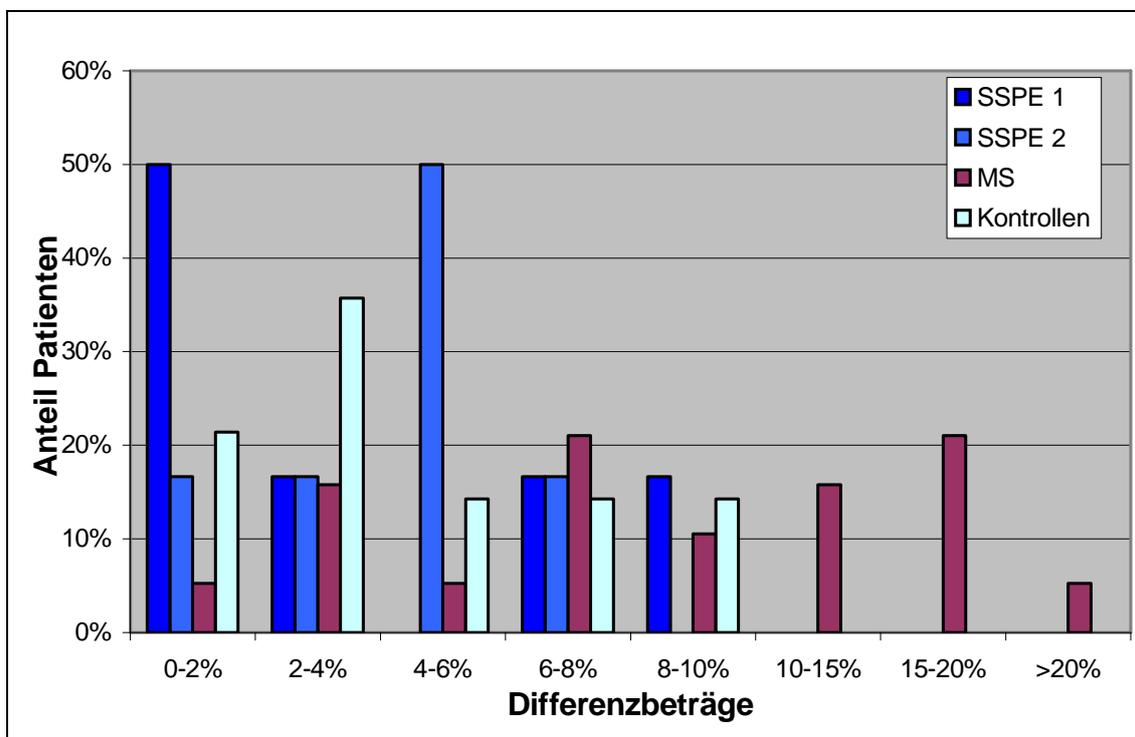


Diagramm 56: Verteilung der Differenzbeträge aller drei Krankheitskollektive unter Masern

### 3. ERGEBNISSE

Auch im Masernkollektiv ist also die Aviditätsdifferenz einiger Serum-Liquor-Paare von Patienten mit Multipler Sklerose deutlich größer als die maximale Differenz der anderen Krankheitsgruppen, die wie bei VZV bei etwa 10% liegt. Diagramm 57 zeigt die Spezifität und Sensivität der Masern-Aviditätsdifferenz im Hinblick auf das Vorliegen einer MS. Auf der x-Achse ist die Aviditätsdifferenz als Cut-off aufgetragen:

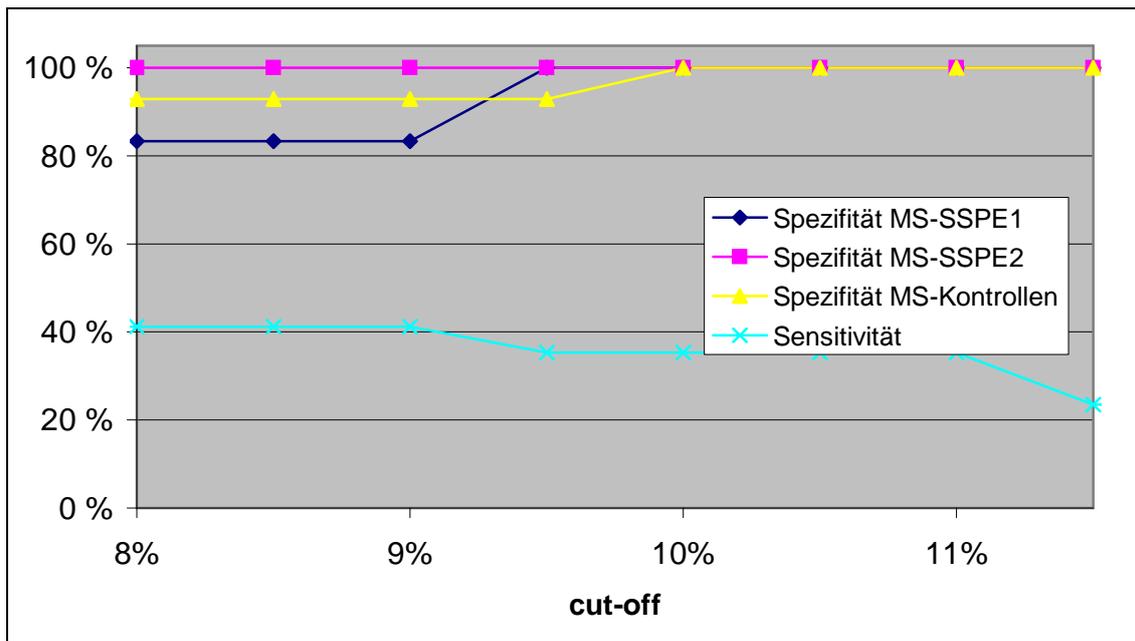


Diagramm 57: Sensitivität und Spezifität für Masern

Für die Avidität der Masernvirusantikörper im Liquor bei MS-Patienten gilt hier demnach in gleicher Weise wie bei VZV:

Bei 35,3% der MS-Patienten beträgt die Differenz der Aviditäten von Serum und Liquor mehr als 10%, was zu 100% spezifisch für die MS im Vergleich zu allen drei Vergleichskollektiven ist.

## 3.5 Gegenüberstellung und Vergleich der Serum-Liquor-Paare mit VZV- und Masernvirusantikörperspiegel

Da die Kollektive der Multiple-Sklerose- und Kontroll-Patienten einige Serum-Liquor-Paare beinhalten, die sowohl VZV- als auch Masernvirusantikörper aufweisen, soll im Folgenden noch für diese Paare deren Avidität sowie die Differenzen gegenübergestellt und verglichen werden.

Beim statistischen Vergleich sowohl der Aviditäten, als auch der Differenzen oder der Beträge der beiden Kollektive miteinander, gibt es in keinem Fall einen signifikanten Unterschied.

### 3.5.1 Multiple Sklerose

In diesem Kollektiv weisen acht Serum-Liquor-Paare Antikörperspiegel gegen VZV und Masernvirus auf.

Diagramm 58 führt die Differenzen der Aviditäten von Seren und Liquores der MS-Patienten auf:

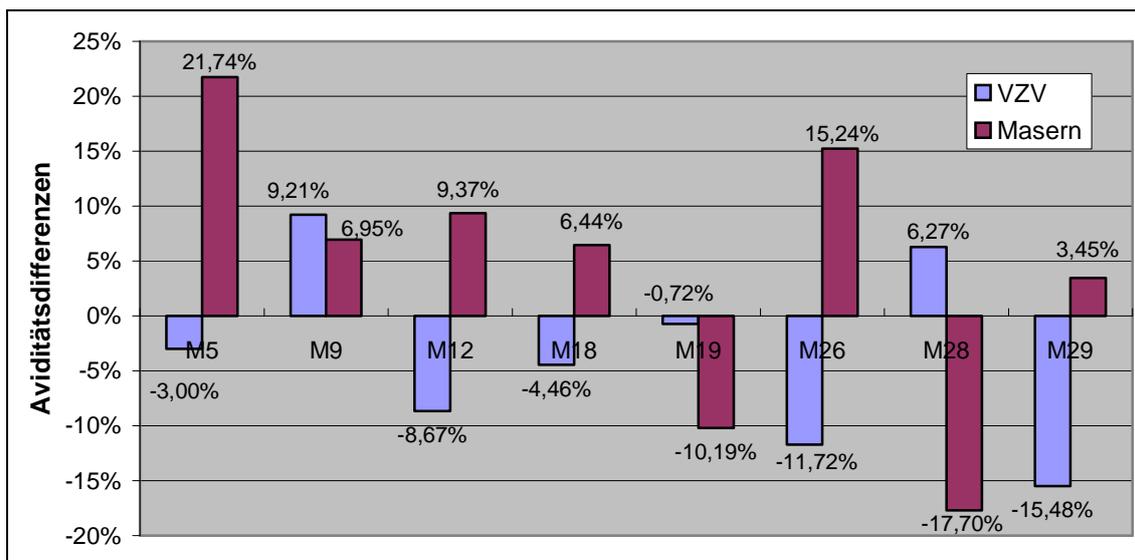


Diagramm 58: Graphische Gegenüberstellung der Aviditätsdifferenzen zwischen Serum und Liquor bei MS-Patienten mit Antikörpern gegen VZV und Masernvirus

### 3. ERGEBNISSE

Sowohl aus den Aviditätsindices als auch aus den Differenzen lässt sich keine Systematik erkennen.

Es gibt Proben, bei denen die Aviditätsdifferenzen beider Spezifitäten annähernd gleich sind (z.B. Seren M5 und M29), wogegen es aber auch genügend Beispiele v.a. bei den Liquores für unterschiedlich ausgeprägte Aviditätsdifferenzen gibt (z.B. Serum und Liquor M26). Sowohl die Masernvirus- als auch die VZV-Antikörper können dabei höheravide sein.

#### 3.5.2 Kontroll-Patienten

In diesem Kollektiv weisen fünf Serum-Liquor-Paare Antikörperspiegel gegen VZV und Masernvirus auf. Die Aviditätsdifferenzen zeigt Diagramm 59:

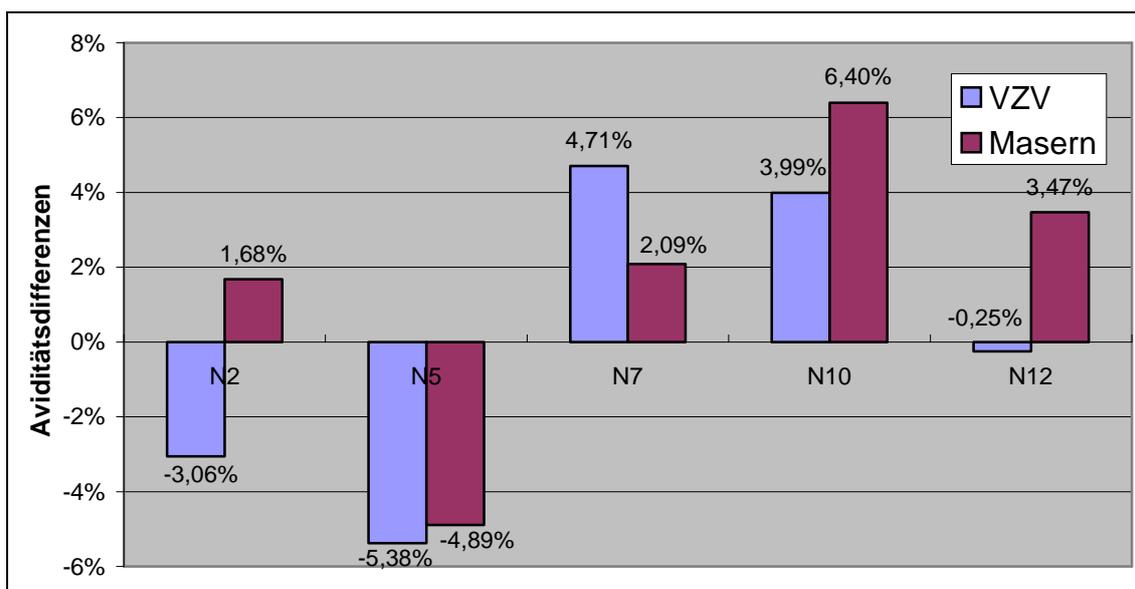


Diagramm 59: Graphische Gegenüberstellung der Aviditätsdifferenzen zwischen Serum und Liquor bei Kontroll-Patienten mit Antikörpern gegen VZV und Masernvirus

Die Aviditäten der Antikörper beider Spezifitäten sind sowohl im Serum als auch im Liquor hochavide und unterscheiden sich nicht wesentlich in ihren Werten. Die Differenzen zeigen keine Systematik. Sowohl positive als auch negative Werte bei beiden Spezifitäten (z.B. N5, N10) und widersinnige Vorzeichen sind zu sehen (z.B. N2, N12).

### **3. ERGEBNISSE**

---

Betrachtet man beide Kollektive, MS und Kontrollen, so lassen sich keine Vergleiche ziehen und keine Ähnlichkeiten finden. Der Unterschied, dass bei den Kontrollen drei der fünf (N5, N7, N10), bei den MS-Patienten zwei der acht Differenzen (M9,M19) gleiche Vorzeichen tragen, ist nicht signifikant ebenso wie bei den Differenzen mit widersinnigen Vorzeichen.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Aviditäten spezifischer IgG-Antikörper gegen die neurotopen Varizella-Zoster- und Masernviren untersucht. Über die Avidität von Antikörpern beider Spezifitäten wurde bereits mehrfach berichtet (siehe Kapitel 1.2.5.1, S. 9, und 1.2.5.2, S. 10). Im Wesentlichen sollte die Avidität von Antikörpern gegen diese beiden Viren in Serum-Liquor-Paaren von Patienten mit Multipler Sklerose, Subakuter Sklerosierender Panenzephalitis und VZV-Infektion mit neurologischen Komplikationen untersucht werden. Bei etwa 90% aller MS-Patienten finden sich intrathekal gebildete Antikörper gegen neurotrope Viren, besonders häufig gegen Masern- und Varizella-Zoster-Virus. Das Auftreten dieser beiden Antikörperspezies zusätzlich zusammen mit Anti-Rötelnvirus-IgG im Liquor von MS-Patienten wird als „MRZ-Reaktion“ bezeichnet. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob bei Patienten mit MS, SSPE oder VZV-Infektion Unterschiede zwischen Serum und Liquor in den Aviditäten der VZV- und Masernvirusantikörpern bestehen, die möglicherweise differentialdiagnostisch verwertbar sind.

Nachdem am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bereits gute Erfahrungen mit dem Enzygnost<sup>®</sup>-IgG-ELISA-Testkit der Firma Dade Behring u.a. bei Masernaviditätsbestimmungen gemacht worden waren, war es für diese Arbeit noch notwendig zu evaluieren, ob eine VZV-Aviditätsbestimmung mit diesem Testkit unter denselben Bedingungen wie für Masern durchgeführt werden kann. Dazu gehörte auch die Optimierung des Aviditätsreagens. Anschließend mussten für die Aviditätsbestimmungen von intrathekalen Antikörpern Testkit, Reagens, Methode und Temperatur validiert werden. Und schließlich konnte untersucht werden, ob es Unterschiede der Aviditäten in gleichzeitig entnommenen Seren und Liquores von Patienten mit o.g. Erkrankungen gibt.

### 4.1 Evaluierung des Aviditätsreagens für die VZV-Aviditätsbestimmung

Nachdem Junker bereits Erfahrungen mit dem Behring-ELISA-Testkit zusammen mit achtmolarer Harnstofflösung zur VZV-Avidität Erfahrungen gemacht hatte (Junker, 1994), und am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg für Masernaviditätsbestimmungen viermolare Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung erprobt worden war, sollte nun letzteres Reagens für die VZV-Aviditätsmessung evaluiert werden.

Je drei Seren mit frischer und mit länger zurückliegender VZV-Infektion wurden im Doppelansatz mit dem Serumtest auf dem Enzygnost<sup>®</sup> Anti VZV/IgG-Testkit von Behring getestet, einmal mit der viermolaren Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung und ein zweites Mal mit fünfmolarer Harnstofflösung, die sich im Hause bereits bei einer EBV-Aviditätsbestimmung als optimal erwiesen hatte (Weissbrich, 1998).

Mit beiden Reagenzien ist eine Diskriminierung von niedrig- und hochaviden VZV-Antikörpern sehr gut möglich (siehe Diagramm 7 und Tabelle 13, S. 38). Die Aviditätswerte mit der Wasserstoffperoxidlösung waren in beiden Gruppen zwar niedriger als die mit der reinen Harnstofflösung. Doch auch bei niedrigeren Werten zeigte sich eine deutlichere Trennung von niedrig- und hochaviden Antikörpern mit der Wasserstoffperoxidlösung. Deswegen ist für weitere VZV-Aviditätsmessungen in dieser Studie dasselbe Aviditätsreagens wie für die Masernavirusaviditätsbestimmungen verwandt worden, nämlich die viermolare Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung.

### 4.2 Bestimmung der VZV-Avidität im Serum mit dem Enzygnost<sup>®</sup> Anti VZV/IgG-Testkit

Die Austestung von 65 Serumproben von Patienten akuter Windpockenerkrankung und lange zurückliegender VZV-Primärinfektion auf ihre VZV-Avidität im Serumtest mit dem Enzygnost<sup>®</sup> Anti VZV/IgG-Testkit und Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung als Aviditätsreagens sollte diese Testmethode für eine Aviditätsbestimmung von Anti-VZV-IgG in Seren validieren.

Dabei erwies sich die Messung der Aviditätsindices durch Einpunktbestimmung über die Extinktionen, wie sie Hedman beschrieben hat (Hedman, 1988 & 1989a), als sinnvoller als die von Weißbrich angewandte Methode der Einpunktbestimmung, bei der die optischen Dichten in Titer umgerechnet und diese dividiert werden (Dopatka, 1992; Weissbrich, 1998). Mit dieser sogenannten Einpunktquantifizierung können nämlich bei niedrigen Titern Werte unter 50 IU/ml nicht mehr angegeben werden.

Die Serumaviditätswerte berechnet nach Hedman von Patienten mit einer kürzlichen Infektion unterscheiden sich hochsignifikant ( $p = 0,0001$ ) von solchen aus Seren von Patienten mit abgelaufener Infektion (siehe Diagramm 8, S. 39), womit ein VZV-Aviditätstest mit dem Enzygnost<sup>®</sup>-IgG-ELISA-Testkit der Firma Dade Behring für VZV-Antikörper aus Serumproben validiert und etabliert ist. Eine VZV-Aviditätsbestimmung konnte und kann somit einfach und mit derselben Testmethode durchgeführt werden wie eine Masernaviditätsbestimmung, die zuvor am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg evaluiert worden war.

Aus den Ergebnissen der VZV-Serumtests gilt:

Bei einem Aviditätsindex von weniger als 38% der IgG-Antikörper ist mit hundertprozentiger Spezifität und Sensivität eine kürzliche Infektion zu diagnostizieren, die maximal 42 Tage zurückliegt.

#### 4. DISKUSSION

---

Die Untersuchungen von Verlaufskontrollen zweier Patienten nach akuter VZV-Infektion bestätigen ebenfalls durch stetig steigende Aviditätsindices mit zunehmendem zeitlichen Abstand vom Zeitpunkt der Primärinfektion die Brauchbarkeit der Methode für die Messung der Antikörperreife (siehe Diagramm 10, S. 41).

Zusätzlich zu einer VZV-Aviditätsbestimmung von Serumantikörpern war es für diese Arbeit notwendig, auch Antikörper aus dem Liquor zu testen. Erfahrungsgemäß sind dazu für den Liquor weitaus niedrigere Verdünnungen und längere Inkubationszeiten notwendig als bei Serumtests, was durch die niedrigeren Antikörperspiegel im Liquor bedingt ist. Zur Liquoraviditätsbestimmung wurde daher eine Testmethode herangezogen, die sich am Institut vorher bereits bei der Antikörperindexbestimmung bewährt hatte. Mit verlängerten Inkubationszeiten und sechsfach höherer Verdünnung wurden nochmals 41 der zuvor verwandten 65 Serumproben mit dem ZNS-Test ausgewertet. In gleicher Weise unterscheiden sich auch mit dieser Testmethode die Serumaviditätswerte berechnet wie zuvor von Patienten mit einer kürzlichen Infektion hochsignifikant ( $p = 0,0001$ ) von solchen aus Seren von Patienten mit abgelaufener Infektion (siehe Diagramm 14, S. 44). Diese Werte verglichen mit den Ergebnissen aus den Serumvortests korrelierten sehr gut miteinander ( $r = 0,940$ ), so dass mit dem ZNS-Test eine VZV-Aviditätsbestimmung ebenso möglich ist wie mit dem Serumtest. Dabei ist allerdings zu beachten, dass dabei der Cut-off 23% beträgt, unter dem zwar zu 100% sensitiv aber nur zu 95% spezifisch von einer kürzlichen, d.h. vor weniger als 42 Tagen stattgehabten VZV-Infektion gesprochen werden kann.

Eine VZV-Aviditätsdiagnostik ist somit allgemein möglich, die aber in der Praxis bisher kaum durchgeführt wird. Bei folgendem Beispiel wäre die Indikation für eine VZV-Aviditätsdiagnostik denkbar:

Ein Aviditätstest ist sinnvoll bei schwangeren Frauen ohne bekannte Windpockenvorerkrankung, bei denen als Zufallsbefund im Serum ein positiver IgM-

#### 4. DISKUSSION

---

und IgG-Titer gegen Varizella-Zoster-Virus erhoben wurde. Denn besonders in der Schwangerschaft besteht ein großes Risiko durch eine VZV-Infektion.

Falls sich die Mutter im ersten oder zweiten Trimenon infiziert hat, droht eine Embryopathie, das kongenitale Varizellensyndrom. Bei Ansteckung vier Tage vor bis zwei Tage nach dem Geburtstermin besteht die Gefahr einer peripartalen Übertragung auf das Kind, die mit einer kindlichen Letalität von etwa 30% durch den fehlenden Anti-VZV-Nestschutz behaftet ist (Martius, 2000).

Dehalb ist bei positivem Anti-VZV-IgM und -IgG eine weitere Abklärung zur Bestimmung des Infektionszeitpunktes sinnvoll, da bei dieser Antikörperkonstellation nicht beurteilt werden kann, wie lange der Erwerb der Infektion zurückliegt. Möglicherweise hat ein Kontakt mit VZV bereits vor der Schwangerschaft bestanden und ist subklinisch verlaufen, und dabei ist es zu einer IgM-Persistenz gekommen. Oder die Infektion wurde während der Schwangerschaft erworben und ist symptomlos verlaufen, denn ein subklinischer Verlauf ist bei etwa 5% der VZV-Infektionen bekannt (Gershon, 1997).

### 4.3 Optimierung der Inkubationstemperatur

Während der Austestung der Patientenproben mit dem ZNS-Test machten sich bei den Kontrollen große Schwankungen sowohl der Extinktionswerte als auch der Aviditätsindices trotz immer gleicher Vorbedingungen bemerkbar. Als mögliche Fehlerursache wurde die Inkubationstemperatur in Betracht gezogen. Deshalb wurde ein Vergleich zwischen den Ergebnissen aus Testungen bei Raumtemperatur und konstant 37°C durchgeführt.

In Testläufen mit den Akut-, Alt- und Referenz-P/N-Kontrollen sowohl für VZV als auch Masern zeichnete sich ab, dass trotz schwankender Temperaturen bei schwankender Raumtemperatur in einem Intervall von 21°C bis 27°C konstantere Extinktionen und damit auch Aviditätsindices gewonnen wurden als bei konstanten 37°C Inkubationstemperatur (siehe Kapitel 3.2.1, S. 72, und 3.2.2, S. 74). Selbstverständlich wurden auch bei Raumtemperatur Schwankungen beobachtet, veranschaulicht durch die Variationskoeffizienten. Allerdings fielen die Variationskoeffizienten bei allen Kontrollen niedriger aus als der vom Hersteller angegebene VK für diese Testmethode bei Raumtemperatur.

Aus diesem Grunde sind bei der Masernauswertung alle Serum-Liquor-Paare, bei VZV bis auf wenige Ausnahmen fast alle bei Raumtemperatur untersucht worden.

Verantwortlich für die konstanteren Ergebnisse bei Raumtemperatur im Vergleich zu 37°C sind wahrscheinlich Verdunstungseffekte im ELISA-Prozessor BEP III bei höherer Temperatur während der Testabarbeitung.

### 4.4 Entwicklung einer neuen Rechenmethode zur Aviditätsbestimmung

Da bereits bekannt ist, dass bei der Einzelpunktbestimmung mit Extinktionen die Aviditätsindices abhängig von der Antikörperkonzentration in der Probe sind (Hedman, 1988), wurde untersucht, inwiefern eine Einzelpunktbestimmung für eine ZNS-Aviditätstestung möglich ist, oder ob nicht besser in Verdünnungsreihen getestet werden sollte.

Aus allen zu untersuchenden Patientenkollektiven zeigten die Aviditätsindices auf der Basis von Einzelpunkt-Quotienten von sowohl Anti-VZV-IgG als auch Anti-Masern-IgG innerhalb einer Verdünnungsreihe keine konstanten Werte (siehe Diagramme in Kapitel 3.1.3.1, S. 46). Mit zunehmender Verdünnung fallen die Werte stetig ab, was in manchen Fällen eine Differenz von mehr als 30% zwischen niedrigster und höchster Verdünnung bedeutet. Laut Hedman kann deshalb nur ein Antikörperindex aus einer Einzelpunktbestimmung diagnostisch verwendet werden, wenn dabei die Konzentration des spezifischen IgG mit in Betracht gezogen wird (Hedman, 1988). Daraus erscheint eine Aviditätsmessung mit der einfachen Einzelpunktbestimmung zwar im Einzelfall als möglich und sinnvoll, doch bei einer Untersuchung wie der vorliegenden sind vergleichbare und konstante Werte gefordert, die ohne Einfluss von Konzentration bzw. Verdünnung ist. Die Aviditätsindices berechnet nach der Methode der Einzelpunktbestimmung sind, wie gezeigt, stark abhängig von der Probenverdünnung, so dass Schwankungen des Index von durchaus  $\pm 30 - 40\%$  in Kauf genommen werden müssen. Vergleichbare Werte könnten erzielt werden, wenn man die Verdünnungen pro Probe individuell so anlegte, dass immer eine einheitliche Extinktion erzielt würde. Dies ist praktisch aber nur näherungsweise möglich.

Die Endpunkttitermethode nach Hedman wählt als Cut-off diejenige Verdünnung als Endpunkt, bei der der Test negativ, d.h. die Extinktion kleiner 0,2 ausfällt, und definiert die Avidität als Division der bei diesem Cut-off ermittelten Verdünnungen (Hedman, 1989b; Junker, 1994). Es wurde beschrieben, dass die Antikörperkonzentration dabei keinen Einfluss haben soll (Mauracher, 1992;

#### 4. DISKUSSION

---

Korhonen, 1999). Dies konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Aviditätswerte, die mit der auf der Endpunkttitermethode basierenden Software „Avidity 1.2“ errechnet worden waren, zeigten innerhalb einer Verdünnungsreihe Variationskoeffizienten von über 10%, bisweilen sogar über 20% (siehe Tabellen in Kapitel 3.1.3.2, S. 52). Dies deutet auf einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss der Verdünnung bzw. Antikörperkonzentration in der Probe auch bei dieser Methode, so dass diese weder zur Aviditätsbestimmung noch zu einem Vergleich mit der neuen Geradenmethode herangezogen wurde.

Die in dieser Arbeit beschriebene Geradenmethode macht sich zu Nutze, dass zwischen den Extinktionen aus Referenz- und denaturierendem Waschgang ein annähernd linearer Zusammenhang besteht (siehe Kapitel 3.1.3.3, S. 57). Die Evaluierung dieser Methode mit ELISA-Technik zeigt, dass der tatsächliche Aviditätswert an einen Extinktionswert aus dem nativen Waschgang geknüpft ist, der wahrscheinlich im Unendlichen liegt, dessen exakte Messung aber nicht möglich ist. In ihrer Grundidee entspricht diese neue Methode der Einzelpunktbestimmung. Jedoch werden dabei durch Verdünnungsreihen und die mathematisch errechnete Denaturiert-Extinktion über dem willkürlich gewählten Referenzwert von 2,0 der Einfluss der Probenverdünnung bzw. der Antikörperkonzentration weitgehend ausgeschaltet, als ob in jeder Probenverdünnung dieselbe Antikörperkonzentration vorläge, mit der im ELISA-Testlauf eine native Extinktion von 2,0 erreicht würde. Doch auch bei dieser Methode hat die Verdünnung einen nachweisbaren wenn auch geringeren Effekt. Im direkten Vergleich der Ergebnisse einiger Verdünnungsreihen aus der Geradenmethode und Avidity 1.2 belegen durchweg niedrigere Variationskoeffizienten den geringeren Einfluss auf die Aviditätswerte durch die Antikörperkonzentration bzw. Verdünnung bei der Geradenmethode (siehe Tabelle 25, S. 68, bis Tabelle 28, S. 69).

Je nachdem zu welchem Zweck eine Aviditätsbestimmung durchgeführt werden soll, können die genannten Methoden ihren Einsatz in Abwägung ihrer Vor- und Nachteile in der Aviditätsdiagnostik finden. Einen absoluten Aviditätswert gibt es nicht. Bei der Wahl der Methode sollte daher auch in Betracht gezogen werden, welche Methode Ergebnisse liefert, die am geringsten von der Probenverdünnung bzw. IgG-Konzentration der Probe beeinflusst werden.

#### 4. DISKUSSION

---

Hauptindikation für eine Aviditätsbestimmung ist heute in der Routinediagnostik die Frage nach einer kürzlichen oder schon länger stattgehabten Infektion (Wolter, 1997). Dabei ist lediglich wichtig, ob der Aviditätsindex kleiner als der Testspezifische Cut-off ist. Für diese Fragestellung kann durchaus die Einpunktbestimmung herangezogen werden, da sie am wenigsten zeit- und materialaufwendig, einfach vorzubereiten und nicht zuletzt dadurch auch am kostengünstigsten ist. Verdünnungsabhängige Ungenauigkeiten können dabei in Kauf genommen werden, da sie in den meisten Fällen den Index nicht auf die andere Seite des Cut-offs verschieben. In diesem Fall kann aber eine zusätzliche Messung der IgM- und IgG-Konzentration entscheidende Hinweise zur Diagnose einer kürzlichen bzw. abgelaufenen Infektion liefern.

Die Endpunkttitermethode dagegen ist sehr aufwendig und zeitintensiv vorzubereiten und von daher auch kostenintensiv, v.a. weil pro Testlauf zwei- bis viermal mehr Näpfe auf einer Mikrotiterplatte in Anspruch genommen werden als bei der Einpunktbestimmung. Zusätzlich wird für die Berechnung eine eigene Computersoftware benötigt. Da diese Testmethode relativ konstante Ergebnisse liefert, sollte sie Evaluierungen vorbehalten bleiben, die dies erfordern. Für eine Routinediagnostik erscheint sie eher ungeeignet.

Die in dieser Arbeit neu beschriebene Geradenmethode mit vier Verdünnungsschritten liefert Aviditätswerte, die am wenigsten von der Probenverdünnung bzw. IgG-Konzentration beeinflusst werden, und ist weniger aufwendig und dadurch auch kostengünstiger als die Endpunkttitermethode. Trotzdem sollte auch sie nur für Untersuchungen vorbehalten bleiben, die genaue, v.a. vergleichbare Ergebnisse erfordern. Der Test wurde hier für den Enzygnost<sup>®</sup>-ELISA-Testkit von Behring für den Referenzwert 2,0 evaluiert. Für ELISA von anderen Firmen bleibt dies noch zu durchzuführen. Um Arbeitsaufwand und Zeit zu sparen, ist es auch möglich, die Geradenmethode wie oben beschrieben in nur zwei statt vier Verdünnungen durchzuführen. Allerdings fallen dabei in der graphischen Darstellung der Extinktionen etwaige Abweichungen von der Linearität im Gegensatz zu vier Verdünnungen nicht auf, womit genaue Aviditätswerte weniger garantiert werden.

#### **4. DISKUSSION**

---

Inwiefern diese Methode in der Zukunft Einzug in die serologische Aviditätsdiagnostik finden wird, bleibt abzuwarten.

## 4. DISKUSSION

---

### 4.5 ZNS-Avidität

Durch die Evaluierung von viermolarer Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung als Aviditätsreagens und von denselben Testbedingungen für je Serum- als auch ZNS-Test für die Masern- und VZV-Aviditätsbestimmung, konnten in der vorliegenden Arbeit die Aviditätsbestimmungen für beide Virusspezifitäten unter denselben Voraussetzungen durchgeführt werden. Mit der neuartigen Geradenmethode ist es möglich, die Aviditätswerte über eine fiktive Extinktion zu berechnen, so dass diese weitgehend ohne den Einfluss von Probenverdünnung bzw. IgG-Konzentration sind. Insofern werden die Testergebnisse und Aviditätswerte aus dieser Studie als weitgehend zuverlässig, vergleichbar und valide angesehen.

Im Folgenden wird nochmals einzeln auf die verschiedenen Krankheitsentitäten eingegangen.

#### 4.5.1 Virusenzephalitiden und Kontrollgruppe

Bei den Patienten mit SSPE zeigen sich die masernviruspezifischen IgG-Antikörper aus allen Proben der Serum-Liquor-Paare ausnahmslos als hochavide, d.h. die Aviditätswerte liegen über 50% (siehe Tabelle 49, S. 92). Dies bedeutet, dass bei dieser Krankheit in beiden Flüssigkeitsräumen eine Antikörperreifung unter Antigenpräsenz stattfindet, die sich möglicherweise auch noch im weiteren Verlauf der Krankheit fortsetzt; denn vier der sechs getesteten Paare zeigen einen gleichsinnigen Anstieg der Avidität im Verlauf. Womöglich geschieht dies durch persistierende Antigenpräsenz in beiden Kompartimenten.

Ausgehend von Mittelwert und Median erweisen sich auch die Aviditäten der VZV-spezifischen Antikörper der Patienten mit komplizierter VZV-Infektion als hochavide mit Werten über 50% (siehe Tabelle 39, S. 76). Allerdings gibt es hier im Einzelnen Aviditätswerte unterhalb der 50%. Bei der Evaluierung des ZNS-Test für die VZV-Aviditätsbestimmung ist der Cut-off bei 23% festgelegt worden. Demzufolge ist mit rund 36% als niedrigstem Ergebnis im Serum bei Patient V8 nicht mehr von einer niedrigen Avidität und damit nicht von dem

#### 4. DISKUSSION

---

Verdacht auf eine kürzliche Infektion auszugehen. In den Verlaufkontrollen ist kein einheitlicher Anstieg der Aviditäten und damit ein Reifungsprozess zu beobachten (siehe Diagramm 38, S. 78). Bei einigen Patienten zeigen sich sogar abfallende Aviditäten. Die Ursache für dieses uneinheitliche Phänomen bleibt spekulativ, wobei auch Schwankungen im Rahmen der Messgenauigkeit zu berücksichtigen sind.

Für die Patienten aus der Kontrollgruppe wurden Aviditätswerte von mindestens 40% sowohl im Serum als auch im Liquor gemessen (siehe Tabelle 43, S. 80, und Tabelle 51, S. 94). Die Antikörper sind also hochavide, was durch Reifung nach durchgemachter Virusinfektion entstanden ist. Bei Antikörperindices kleiner 1,5 besteht keine intrathekale Synthese (siehe Tabelle 6, S. 19). Die virus-spezifischen Antikörper haben sich demnach durch physiologische Diffusion durch die Blut-Liquor-Schranke in beiden Kompartimenten verteilt, weswegen es keinen signifikanten Unterschied der Aviditäten in Serum und Liquor gibt.

Sowohl bei den Patienten mit Virusenzephalitiden als auch den Kontroll-Patienten betragen die Differenzen der Aviditäten [Liquor minus Serum] aus der vorliegenden Arbeit etwa 10% (siehe Kapitel 3.3.2, S. 81, und 3.4.2, S. 95). Da die Aviditäten der Seren und der Liquores jeweils eines Krankheitskollektives sich statistisch nicht signifikant unterscheiden, kann angenommen werden, dass eine Differenz um weniger als 10% gleiche Avidität in Serum und Liquor bedeutet.

Die Ergebnisse von Narita können somit nicht bestätigt werden. Bei der SSPE erhielt Narita zwar ebenso sehr hohe Aviditätsindices im Serum von  $88,8\% \pm 6,6\%$ , während diese im Liquor mit  $51,2\% \pm 8,9\%$  auch noch relativ hoch ausfielen, doch mit einer Differenz von  $37,6\% \pm 8,5\%$  deutlich niedriger waren (Narita, 1996 & 1997). Er nahm an, dass diese Differenzen dadurch entstünden, indem bei der SSPE die Antikörper intrathekal synthetisiert würden und nicht die Blut-Liquor-Schranke passierten. Die Reifung finde im Liquor nicht in demselben Maße statt wie im Serum.

Naritas Ergebnisse sind mit denen aus dieser Arbeit nur bedingt vergleichbar. Die Aviditätsmessungen führte er per Einpunktbestimmung durch. Er bestätigte

#### 4. DISKUSSION

---

zwar, dass im Liquor bei der SSPE extrem hohe IgG-Titer zu beobachten sind. Inwiefern er aber berücksichtigt hatte, die Verdünnungen bei den Tests so zu wählen, damit die Extinktionen vergleichbare Werte annahmen und somit den Fehler der Abhängigkeit der Aviditätsindices von der Antikörperkonzentration auszuschalten, geht aus dem veröffentlichten Artikel nicht hervor. Wie hier gezeigt worden ist, können schon kleine Unterschiede der Antikörperkonzentrationen in den Probenverdünnungen zu Schwankungen der Extinktionen und damit auch der Aviditätsindices führen. Die Anti-Masern-IgG-Spiegel der SSPE-Seren, die für die vorliegende Arbeit untersucht worden sind, waren um ein Vielfaches höher als die Liquorkonzentrationen. Dies war bei Narita auch der Fall gewesen, wie aus den in der Veröffentlichung angegebenen Titern zu schließen ist. Von daher ist anzunehmen, dass bei Narita möglicherweise die gleiche Verdünnung für Serum- und Liquorprobe verwandt worden war, wodurch bei niedrigerer Antikörperkonzentration im Liquor das Liquortestergebnis sowie damit verknüpft die Avidität niedriger ausfielen als im Serum. Daher müssen Naritas Ergebnisse angezweifelt werden.

Die Verwendung von achtmolarer Harnstofflösung anstatt viermolarer Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung als Aviditätsreagens dürfte keinen Einfluss auf die Unterschiede der Aviditäten in Serum und Liquor bei Narita gehabt haben.

Luxton beschrieb bei Affinitätstestungen von verschiedenen Virusenzephalitiden, darunter SSPE und VZV-Enzephalitis, ebenfalls hohe Affinitäten der Antikörper (Luxton 1990 & 1995). Allerdings führte Luxton die Testungen mit Thio-cyanat als denaturierendes Reagens in verschiedenen Molaritäten durch und berechnete die „relative Affinität“ mit einer anderen mathematischen Methode als in dieser Arbeit (s.u.), so dass Luxtons Ergebnisse und diejenigen aus der vorliegenden Arbeit nur qualitativ vergleichbar sind.

In der Annahme, dass bei den neurotopen Virusinfektion wie hier bei der Subakuten Sklerosierenden Panenzephalitis und der komplizierter VZV-Infektion sowohl intrathekal als auch im Serum die ubiquitären Antigene die immunkompetenten Zellen gleichermaßen zur Antikörpersynthese und -reifung stimulieren, so scheint es plausibler, dass die Serum- und Liquorantikörper der Klasse IgG

## 4. DISKUSSION

---

annähernd gleiche Aviditätswerte aufweisen. Deshalb müssen wohl erneut eher Naritas Ergebnisse in Frage gestellt werden als die Luxtons oder die aus vorliegender Arbeit.

### 4.5.2 Multiple Sklerose

Bei den Patienten mit Multipler Sklerose besteht zwischen Serum und Liquor für beide untersuchten Virusspezifitäten kein signifikanter Unterschied. Allerdings ist das Aviditätsspektrum in beiden Fällen deutlich weiter gestreut als bei den anderen Krankheitsgruppen. Die Verteilung reicht von unter 30% bei den VZV-spezifischen Antikörpern bzw. unter 20% bei den masernspezifischen Antikörpern bis über 80% für beide Spezifitäten. Es gibt sowohl MS-Patienten, die deutlich niedrigere Aviditäten aufweisen als Enzephalitis-Patienten, aber auch MS-Erkrankte mit sehr hohen Aviditätswerten. Die Mediane der Aviditätswerte liegen über 50%, so dass mehr als die Hälfte der MS-Patienten hohe Aviditäten aufweisen (siehe Tabelle 42, S. 80, und Tabelle 50, S. 94).

Luxton dagegen fand generell weitaus niedrigere relative Affinitäten in Seren und Liquores von MS-Patienten als bei Patienten mit Virusenzephalitiden (Luxton 1990 & 1995). Er folgerte daraus, verantwortlich für das Fehlen hochaffiner Antikörper im Liquor bei MS sei eine fehlende intrathekale Selektion von B-Lymphozyten oder die „genetische Unfähigkeit“ hochaffine Antikörper zu produzieren (Luxton, 1990).

Dabei ist aber zu beachten, dass in Luxtons Studien andere Testbedingungen gegolten hatten, und deshalb die Ergebnisse daraus nur qualitativ vergleichbar mit denen aus dieser Arbeit sind.

Als Aviditätsreagens hatte Luxton Thiocyanat verwendet, das den Probenverdünnungen in zwölf verschiedenen Molaritäten zugefügt wurde. Die Extinktionen wurden zu einer Referenzextinktion zu jeder Probe ins Verhältnis gesetzt, was für jede Probe ein Spektrum von „relativen Affinitäten“ lieferte. Je nach Probe waren pro Thiocyanatmolarität unterschiedliche Antikörperkonzentrationen messbar, so dass die Affinität in zwölf Stufen mit relativ niedriger Affinität bei niedriger Thiocyanatmolarität und relativ hoher Affinität bei hoher Thiocya-

#### 4. DISKUSSION

---

natmolarität angegeben werden konnte. Luxton beachtete dabei die unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen der Proben und deren Auswirkung auf die Aviditätsmessung. Deshalb wurden die Verdünnungen so angelegt, dass die Referenzextinktionen im Intervall 0,5 bis 1,0 zu liegen kamen.

Luxtons Affinitäten verteilten sich bei den MS-Patienten in Serum und Liquor generell über die niedrigeren Stufen, während sie bei den Virusenzephalitiden (SSPE, Herpes-simplex-Virus- und VZV-Enzephalitis) zu den höheren Stufen tendierten. Dabei gab es MS-Patienten, die im Liquor andere Affinitätsverteilungsmuster als im Serum zugunsten großer Anteile niedrigstaffiner Antikörper im Liquor aufwiesen. Luxton folgerte, dass die Diffusion der Antikörper durch die Blut-Liquor-Schranke eher eine untergeordnete Rolle spielt, und schrieb diese Erscheinung der lokalen intrathekalen Antikörpersynthese bei der MS zu. Verantwortlich für das Fehlen hochaffiner Antikörper im Liquor bei MS sei laut Luxton eine fehlende intrathekale Selektion von B-Lymphozyten, so dass die Antikörper nicht reifen. Als Alternative schloss er auf eine „genetische Unfähigkeit“ der B-Lymphozyten hochaffine Antikörper zu produzieren.

Als Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse aus Luxtons Arbeiten und der vorliegenden Studie sollten mehrere Aspekte in Betracht gezogen werden. Bei den relativ kleinen Probenkollektiven müssen zufällige Verteilungsmuster berücksichtigt werden. Insofern können bei Luxton Patienten mit hochaviden Antikörpern gefehlt haben. Womöglich kann auch Thiocyanat eine andere Wirkung auf die nichtkovalenten Antigen-Antikörperbindungen haben als Harnstoff-Wasserstoffperoxid. Eventuell löst Thiocyanat die Bindungen bei MS-Patienten stärker, da hier die Bindungsstärke der Antikörper von anderer Qualität sein könnte, was eventuell aus der Reifung bei fehlender Antigenpräsenz resultiert (Godec, 1992; Reiber, 1998b).

Zusätzlich liefert die Messung verschiedener Affinitätsstufen mit verschiedenen Reagensmolaritäten wie bei Luxton zwar ein sehr dezidiertes Affinitätsprofil einer einzelnen Probe, wogegen eine Avidität sozusagen den „Mittelwert“ sämtlicher spezifischen Antikörper in der Probe beschreibt. Jedoch scheint diese Methode der Affinitätsbestimmung zu diagnostischen Zwecken bei größerer Probenanzahl sehr aufwendig und von daher eher ungeeignet.

#### 4. DISKUSSION

---

Betrachtet man die Differenz der Serum- und Liquoraviditäten bei den MS-Patienten mit VZV-Antikörpern der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 3.3.2.2, S. 84), so fällt auf, dass mehr als ein Zehntel (11%) der Patienten eine Differenz von mehr als 11% aufweisen. Dies ist zu 100% spezifisch für die MS im Vergleich mit Patienten mit komplizierter Varizella-Zoster-Infektion bzw. mit nicht-entzündlichen Hirnerkrankungen.

Bei über einem Drittel (35%) der MS-Patienten mit Masernvirusantikörpern beträgt diese Differenz der Aviditäten mehr als 10% (siehe Kapitel 3.4.2.2, S. 97). Ebenfalls zu 100% spezifisch für die MS ist diese Tatsache im Vergleich zu den Vergleichskollektiven.

Diese Differenzen erweisen sich damit als statistisch signifikant unterschiedlich im MS-Kollektiv für beide untersuchten Virusspezifitäten, wogegen sich die Differenzen in den anderen Krankheitsgruppen nicht signifikant unterscheiden.

Eine erhöhte Differenz genauso wie relativ niedrige Aviditäten von weniger als 40% bei den VZV-Antikörpern finden sich vorherrschend beim schubförmigen Typ der Multiplen Sklerose. Dieses Phänomen ist bezogen auf die Masernvirusantikörper jedoch nicht zu beobachten. Bei dem relativ kleinen Patientenkollektiv mit ungleichmäßiger Verteilung der verschiedenen MS-Formen kann deshalb von einem zufälligen Trend ausgegangen werden.

Die Betrachtung der Aviditätsdifferenz als diagnostischen Marker zur Differenzierung einer Multiplen Sklerose von einer infektiösen Enzephalitis ist neu. Durch die Subtraktion der beiden Aviditätsindices eines Serum-Liquor-Paares von ein und demselben Patienten ist also nach den vorgelegten Ergebnissen eine serologische Differenzierung in manchen Fällen möglich. Dazu ist mit der hier beschriebenen Methode kein Vergleich der Aviditäten mit anderen Krankheitskollektiven wie z.B. den Virusenzephalitiden notwendig. Das ist ein klarer Vorteil gegenüber Luxtons Erhebung, der eine Subtraktion außer Acht ließ und nur die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kollektiven beschrieb (Luxton 1990 & 1995 ).

Allerdings ist die Sensitivität sehr gering und die Testvorbereitung und -durchführung sehr aufwendig, weswegen diese Methode wohl speziellen Fra-

#### 4. DISKUSSION

---

gestellungen vorbehalten bleiben wird, bei denen die Unterscheidung zwischen MS und virusassoziiertes ZNS-Erkrankung schwierig ist.

Als Ursache der Unterschiede der Aviditäten in Serum und Liquor bei Patienten mit Multipler Sklerose kommt auf der Grundlage von Reibers Hypothese Folgendes in Betracht (Reiber, 1998b):

Zu Beginn der Multiplen Sklerose wandern spezifische B-Lymphozyten aus dem Blut ins zentrale Nervensystem ein, vermehren sich dort im Verlauf unabhängig von den B-Zellen im Blut und reifen zu Plasmazellen. Mit zunehmender Zahl an B-Zellen pro Klon bzw. B-Zellklonen werden intrathekal spezifische Immunglobuline einer oder mehrerer antiviralen Spezifitäten synthetisiert. Wenn Antikörper gegen Masern-, Röteln- und Varizella-Zoster-Viren produziert werden, so hat die „MRZ-Reaktion“ eingesetzt. Die Synthese dieser sowie weiterer erregerspezifischer, intrathekaler Antikörper bei Patienten mit MS scheinen nicht die Primärantwort auf eine infektiöse Ätiologie zu sein, sondern stellen wahrscheinlich als eine nichtspezifische Reaktivierung von B-Lymphozyten ein sekundäres Krankheitsphänomen dar (Luxton, 1990 & 1995). Denn wie gezeigt wurde, geschieht dies ohne den Einfluss erregerspezifischer Antigene (Godec, 1992; Reiber, 1998b). Das Fehlen dieser Antigene bewirkt somit ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Spezifitäten zu denen im Blut. Damit einhergehend kann sich auch die Avidität unterscheiden, was aber nur bei einem kleineren Anteil der MS-Patienten der Fall ist. Beim Großteil der MS-Patienten unterscheidet sich die Avidität von Serum und Liquor nicht. Durch Austausch von Immunglobulinen über die Blut-Liquor-Schranke nähern sich wohl die Aviditäten in Serum und Liquor einander an. Der Liquor-Serum-Quotient des Albumins scheint aber aufgrund mangelnder Korrelation zu den Beträgen der Aviditätsdifferenzen kein quantitativer Marker für das Ausmaß des Austausches zu sein. Als Hypothese zur Erklärung der Differenzen zwischen Serum und Liquor wird hier vorgeschlagen, dass oligoklonale intrathekal synthetisierte Masernvirus- und VZV-spezifische IgG-Antikörper, die zufällig eine niedrigere, identische oder höhere Avidität als die Serum-IgG haben, sich auf die Avidität der Serumantikörper ad-

#### **4. DISKUSSION**

---

diert, die durch die Blut-Liquor-Schranke gelangen. Dadurch erhält man in der Summe im Liquor eben niedrigere, identische oder höhere Werte.

### 5. Zusammenfassung

Es sollten in dieser Arbeit Aviditäten von IgG-Antikörper gegen neurotope Viren bei Patienten mit Subakuter Sklerosierender Panenzephalitis (SSPE), Varizella-Zoster-Virus-(VZV-) Infektion mit neurologischen Komplikationen, Multipler Sklerose (MS) und mit nichtentzündlichen, psychiatrischen Hirnerkrankungen untersucht werden. Es galt insbesondere für Masernvirus- und VZV-Antikörper herauszufinden, ob es in gleichzeitig entnommenen Serum- und Liquorproben bei Patienten mit oben genannten Erkrankungen einen Unterschied, d.h. eine signifikante Differenz der Aviditäten in Serum und Liquor gibt. Möglicherweise könnte eine derartige Differenz bei der Differenzialdiagnostik dieser Krankheiten hilfreich sein.

Als Voraussetzung war es zunächst notwendig zu wissen, ob überhaupt eine Aviditätsmessung von Varizella-Zoster-spezifischen IgG-Antikörpern möglich ist.

Eine solche Messung ist mit dem ELISA-Testkit „Enzygnost<sup>®</sup> Anti VZV/IgG“ von der Firma Dade Behring möglich und einfach durchzuführen, nachdem sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den 65 Serumaviditäten von 56 Patienten mit kürzlicher VZV-Neuinfektion und von 37 mit lange abgelaufener Infektion gezeigt hat. Verwandt wurde dabei viermolare Harnstoff-Wasserstoffperoxidlösung, mit der in der sogenannten Elutionsmethode nach der Probeninkubation die niedrigaviden Antikörper wieder aus ihrer Antigen-Antikörperbindung gelöst werden. Mit modifizierter Methodik kann dieses Testkit auch zur VZV-Aviditätsbestimmung im Liquor herangezogen werden.

Nach dieser Untersuchung sind Aviditätswerte zwischen 0 und 38% absolut spezifisch und sensitiv für eine VZV-Neuinfektion, die maximal 42 Tage zurückliegt.

Weiterhin ist mit dieser Arbeit eine neue Methode zur Aviditätsbestimmung etabliert worden. Eine exakte Bestimmung eines Aviditätswertes ist mit den bisherigen Methoden nicht möglich gewesen. Der Einfluss der Antikörperkonzentration auf den Aviditätswert war vor allem dafür ursächlich, dass Aviditätswerte

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

von Proben, die unterschiedliche Antikörperspiegel oder Verdünnungen hatten, nicht vergleichbar waren. Um einen relativ genauen und v.a. vergleichbaren Wert für eine ZNS-Aviditätsbestimmung zu erhalten, war es notwendig, eine neuartige Rechenmethode zu entwickeln.

Diese sogenannte neue „Geradenmethode“ macht sich zu Nutze, dass im Aviditätstest zwischen den Extinktionen aus Referenz- (nativem) und denaturierendem Waschgang unterschiedlicher Verdünnungen einer Probe ein annähernd linearer Zusammenhang besteht. Die Probe wird dabei in einer Verdünnungsreihe verdünnt und in einem ELISA-Testlauf nach Elutionsmethode ausgewertet. Die Extinktionen werden anschließend in einem x-y-Diagramm aufgetragen, wobei als x-Werte die nativen und als y-Werte die Extinktionen aus dem denaturierenden Waschgang dargestellt werden. Es entsteht dabei eine Gerade. Für diese Gerade wird mit zwei nativen Extinktionen aus dem Intervall  $0,2 \leq x \leq 3,0$  und den Extinktionen derselben Verdünnungen aus dem denaturierenden Waschgang die Gleichung entsprechend der allgemeinen Geradengleichung aus der Mathematik  $y = mx + c$  aufgestellt. Über diese Gleichung wird für  $x = 2,0$  der zugehörige y-Wert ermittelt. Durch Division wiederum dieses errechneten y-Wertes durch 2,0 erhält man einen Aviditätswert, als ob in jeder Probe dieselbe Antikörperkonzentration vorläge, mit der im ELISA-Testlauf eine native Extinktion von 2,0 erreicht würde. Dadurch werden konzentrationsabhängige Schwankungen des Aviditätswertes eliminiert, so dass mit den errechneten Ergebnissen eine weitgehend fehlerbereinigte Berechnung von Aviditätsunterschieden möglich ist.

Diese Rechenmethode sollte sich schließlich bei der Erhebung von IgG-Aviditäten in insgesamt 71 Serum-Liquor-Paaren von Patienten mit Subakuter Sklerosierender Panenzephalitis, Varizella-Zoster-Virus-Infektion, Multipler Sklerose und mit nichtentzündlichen Hirnerkrankungen nützlich machen.

Bei zwölf Serum-Liquor-Paaren von sechs SSPE-Patienten sind ausschließlich hochavide masernspezifische Antikörper mit mittleren Aviditäten von jeweils rund 60% in Serum und Liquor entdeckt worden. In 28 Serum-Liquor-Paaren von zwölf Patienten mit Varizella-Zoster-Virus-Infektion haben sich ebenfalls

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

ausnahmslos hochavide VZV-spezifische Immunglobuline dargestellt. Die Aviditätsindices betragen im Mittel 52% im Serum und 55% im Liquor. Aus einem Kontrollkollektiv von 18 psychiatrisch erkrankten Patienten mit jeweils einem Serum-Liquor-Paar sind neun Paare auf VZV-spezifische und 14 auf masernspezifische Avidität untersucht worden. Die VZV-Antikörper weisen eine Avidität von rund 61% in Serum und Liquor auf. Die der Masernvirusantikörper beträgt 55% in Serum und Liquor.

Von den 29 Serum-Liquor-Paaren von Patienten mit Multipler Sklerose sind 15 Paare auf VZV-spezifische und 19 auf masernspezifische Avidität untersucht worden. Die VZV-Antikörper weisen eine Serumavidität von 53% und eine Liquoravidität von 54% auf. Die der Masernvirusantikörper beträgt 53% im Serum und 57% im Liquor. Das Spektrum der Aviditäten ist deutlich weiter gestreut als in den anderen Krankheitskollektiven. Während dort sämtliche Aviditäten im hochaviden Bereich liegen, sind die Antikörper bei den MS-Patienten sowohl hoch- als auch niedrigavide. Die Mediane der Aviditäten liegen im MS-Kollektiv über 50%, so dass im Schnitt hohe Aviditäten bei mehr als der Hälfte der MS-Patienten vorliegen.

Der direkte statistische Vergleich der Aviditäten der einzelnen Serum- und Liquorkollektive zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Schließlich ist noch die Avidität des Serum von der des Liquor eines jeweiligen Paares subtrahiert worden. Außer bei den Patienten mit Multipler Sklerose sind diese Differenzbeträge bei den übrigen Patienten kleiner als 10%. Bei einem Teil der MS-Patienten sind die Differenzen in beiden untersuchten Spezifitäten größer als 10%. 11% der MS-Patienten mit VZV-Antikörpern hat eine Aviditätsdifferenz von mehr als 11%. Bei 35% der MS-Patienten mit Masernvirusantikörpern ist die Differenz größer als 10%. Bei Patienten, die diese Differenz aufweisen, liegt in jedem Fall eine Multiple Sklerose vor, d.h. die Spezifität beträgt 100%. Statistisch unterscheiden sich die Aviditätsdifferenz der MS-Serum-Liquor-Paare signifikant von den übrigen Kollektiven. Anhand dieses Ergebnisses kann festgestellt werden, dass Differenzen von weniger als 10% gleiche, Differenzen darüber signifikant unterschiedliche Avidität bedeuten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

---

Diese Erkenntnis bietet einen neuen Ansatz für spezielle Fragestellungen in der Differentialdiagnostik neurologischer Erkrankungen mit intrathekalen, viruspezifischer Antikörperproduktion. Serologisch könnte z.B. die Diagnose bei Patienten gefestigt werden, bei denen die Differenzierung zwischen Multipler Sklerose und neurologisch komplizierter Virusinfektion schwierig ist. Allerdings ist die Sensitivität mit 11% für die VZV-Antikörper und 35% für die Masernantikörper recht gering.

Diese statistisch signifikanten Unterschiede der Differenzen bei der Multiplen Sklerose könnten daher rühren, dass intrathekale B-Lymphozyten ohne Einfluss erregerspezifischer Antigene unabhängig von den B-Zellen im Blut ihre Antikörper synthetisieren. Das kann zu unterschiedlichen Aviditäten in Liquores verglichen mit den Seren von Patienten mit Multipler Sklerose führen. Dagegen sind bei den Virusinfektionen die Antigene in beiden Kompartimenten präsent, weswegen die Antikörper sowohl im Serum als auch im Liquor optimal reifen können. Das führt zu hohen, nicht signifikant unterschiedlichen Aviditäten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Bauer, G. (1996): IgM: Ein variabler und mehrdeutiger diagnostischer Marker. *Der Mikrobiologe* 1996; 6: 44-51.
- Carp, R.I., Warner, H.B. and Merz, G.S. (1978): Viral Etiology of Multiple Sclerosis. *Prog. Med. Virol.*, vol 24, pp. 158-177 (Karger, Basel 1978).
- de Souza, V.A.U.F., Pannuti, C.S., Sumita, L.M. and de Andrae, Jr., H.F. (1997): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-IgG Antibody Avidity Test for Single Sample Serologic Evaluation of Measles. *J Med Virol*, Jul 1997, 52(3) p275-9.
- Dopatka, H.D. and Giesendorf, B. (1992): Single point quantification of antibody by ELISA without need of a reference curve. *J Clin Lab Anal*, 1992, 6(6) p417-22.
- Eisen, H.N., and Siskind, G.W. (1964): Variations of Affinities of Antibodies during the Immune Response. *Biochemistry* 3, 996-1008, 1964.
- Felgenhauer, K. and Reiber, H. (1992): The diagnostic significance of antibody-specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig*, Jan 1992, 70(1) p28-37.
- Felgenhauer, H.: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. In: Thomas, L.: *Labor und Diagnose*. Frankfurt, <sup>5</sup>1998. S. 1341-1359.
- Felgenhauer, H.: Pathophysiologie des Liquorkompartiments. In: Kunze, K.: *Lehrbuch der Neurologie*. Stuttgart, 1992. S. 501-507.
- Gershon, A.A. and Silverstein, S.J.: Varizella-Zoster Virus. In: Richman, D., Whitley, R.J. and Hayden, F.G.: *Clinical Virology*. New York, 1997. p421-444.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Godec, M.S., Asher, D.M., Murray, R.S et al. (1992): Absence of measles, mumps, and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Ann Neurol (United States)*, Sep 1992, 32(3) p401-4.
- Haller, O.A. und Mertens, T.: *Varicella-Zoster-Virus (VZV)*. In: *Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten*. München, Jena, 1999. S. 230-234.
- Hedman, K. and Seppälä, I. (1988): Recent Rubella Virus Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. *J Clin Immunol*, May 1988, 8(3) p214-21.
- Hedman, K. and Rousseau, S.A. (1989a): Measurement of Avidity of Specific IgG for Verification of Recent Primary Rubella. *J Med Virol*, Apr 1989, 27(4) p288-92.
- Hedman, K., Lappalainen, M. and Seppälä, I. (1989b): Recent Primary Toxoplasma Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. *J Infect Dis*, Apr 1989, 159(4) p736-40.
- Hedman, K., Lappalainen, M., Söderlund, M. and Hedman, L. (1993): Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Microbiology* (1993) 4, 123-129.
- Inouye, S., Hasegawa, A., Matsuno, S. et al. (1984): Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J Clin Microbiol*, Sep 1984, 20(3) p525-9.
- Junker, A.K. and Tilley, P. (1994): Varicella-Zoster Virus Antibody Avidity and IgG-Subclass Patterns in Children With Recurrent Chickenpox. *J Med Virol*, Jun 1994, 43(2) p119-24.
- Kamoun, P.P. (1988): Denaturation of globular proteins by urea: breakdown of hydrogen or hydrophobic bonds? *Trends Biochem Sci*, Nov 1988, 13(11) p424-5.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Kangro, H.O., Manzoor, S. and Harper, D.R. (1991): Antibody Avidity Following Varicella-Zoster Virus Infections. *J Med Virol*, Feb 1991, 33(2) p100-5.
- Karush, F. (1958): In Cole, W.H.: Serological and biochemical comparison of proteins. New Brunswick N.Y., Rutgers University Press 1958.
- Korhonen, M.H., Brunstein, J., Haario, H., Katnikov, A., Rescaldani, R. and Hedman, K. (1999): A New Method with General Diagnostic Utility for the Calculation of Immunoglobulin G Avidity. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 Sep;6(5):725-8.
- Kunakorn, M., Petchclai, B. and Liemsuwan, C. (1992): Laboratory diagnosis of congenital and maternal rubella infection: a review. *J Med Assoc Thai* 1992 Jan;75 Suppl 1:282-7.
- Lehtonen, O.P. and Meurman, O.H. (1982): An ELISA for the estimation of high-avidity and total specific IgG and IgM antibodies to rubella virus. *J Virol Methods* 5: 1-10,1982.
- Luxton, R.W. and Thompson, E.J. (1990): Affinity distribution of antigen-specific IgG in patients with multiple sclerosis and in patients with viral encephalitis. *J Immunol Methods* 1990 Aug 7;131(2):277-82.
- Luxton, R.W., Zeman, A., Holzel, H., Harvey, P., Wilson, J., Kocen, R., Morgan-Hughes, J., Miller, D.H., Compston, A. and Thompson, E.J. (1995): Affinity of antigen-specific IgG distinguishes multiple sclerosis from encephalitis. *J Neurol Sci* 1995 Sep;132(1):11-9.
- Macdonald, R.A., Hosking, C.S. and Jones, C.L. (1988): The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*, Feb 10 1988, 106(2) p191-4.
- Martius, J.: Infektionen in der Schwangerschaft. In: Pfeleiderer, A., Breckwoldt, M. und Martius, G.: Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart, <sup>3</sup>2000. S. 355-368.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Mauracher, C.A., Mitchell, L.A. and Tingle, A.J. (1992): Differential IgG Avidity to Rubella Virus Structural Proteins. *J Med Virol* 1992 Mar;36(3):202-8.
- Narita, M., Yamada, S., Matsuzono, Y., Itakura, O., Togashi, T. and Kikuta, H. (1996): Immunoglobulin G Avidity Testing in Serum and Cerebrospinal Fluid for Analysis of Measles Virus Infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996 Mar;3(2):211-5.
- Narita, M., Yamada, S., Matsuzono, Y., Itakura, O., Togashi, T. and Kikuta, H. (1997): Measles virus-specific immunoglobulin G subclass response in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Diagn Virol* 1997 Nov;8(3):233-9.
- Norby, E. (1978): Viral Antibodies in Multiple Sklerosis. *Prog. Med. Virol.*, vol 24, pp. 1-39 (Karger, Basel 1978).
- Paar, D. and Straus, S.E.: Cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus, Epstein-Barr Virus, and Human Herpesvirus Type 6. In: Specter, S. and Lancz, G.: *Clinical Virology Manual*. New York, <sup>2</sup>1992. p501-526.
- Ram, J.S., and Maurer, P.H. (1959): Effect of urea on the combining site of an antibody. *Arch. Biochem. Biophys* 80, 464-466.
- Reiber, H. and Lange, P. (1991): Quantification of Virus-specific Antibodies in Cerebrospinal Fluid and Serum: Sensitive and Specific Detection of Antibody Synthesis in Brain. *Clin Chem* 1991 Jul;37(7):1153-60.
- Reiber, H. (1994): Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) - a concept of common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci*, Apr 1994, 122(2) p189-203.
- Reiber, H. (1998a): Cerebrospinal fluid - physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler*, Jun 1998, 4(3) p99-107.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Reiber, H., Ungefehr, S., and Jacobi, C. (1998b): The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1998 Jun;4(3):111-117.
- Schiff, G.M.: Measles. In: Lenette, E.H.: *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. New York, <sup>2</sup>1992. S.535-547.
- Schoub, B.D., Blackburn, N.K., Johnson, S., McAnerney, J.M. and Miller, B. (1992): Low Antibody Avidity in Elderly Chickenpox Patients. *J Med Virol*, Jun 1992, 37(2) p113-5.
- Sindic, C.J.M., Monteyne, P. and Laterre, E.C. (1994): The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG antibodies in multiple sklerosis. *J Neuroimmunol*, Oct 1994, 54(1-2) p75-80.
- Thomas, H.I.J. and Morgan-Capner, P. (1988): Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidemiol Infect*, Dec 1988, 101(3) p591-8.
- Thomas, H.I.J. and Morgan-Capner, P. (1991): The Use of Antibody Avidity Measurements for the Diagnosis of Rubella. *Reviews in Medical Microbiology* (1991) 1, 41-50.
- Thomas, H.I.J., Morgan-Capner, P., Enders, G., O'Shea, S., Caldicott, D. and Best, J.M. (1992): Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG<sub>1</sub> following primary rubella. *J Virol Methods*, Sep 1992, 39(1-2) p149-55.
- Tuokka, H. (1995): Detection of Acute Measles Infections by Indirect and  $\mu$ -Capture Enzyme Immunoassays for Immunoglobulin M Antibodies and Measles immunoglobulin G Antibody Avidity Enzyme Immunoassay. *J Med Virol*, Mar 1995, 45(3) p306-11.
- Weber, (1997): Current developments in the laboratory diagnosis of rubella. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb* 1997;134(2):31-41.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Weissbrich, B. (1998): The Use of Semi-Automated EBV IgG Avidity Determination for the Diagnosis of Infectious Mononucleosis. *J Med Virol* 1998 Feb;54(2):145-53.
- Werblin, T.P., Kim, Y.T., Quagliata, E. and Siskind; G.W. (1973a): Studies on the Control of Antibody Synthesis: III. Changes in Heterogeneity of Antibody Affinity During the Course of the Immune Response. *Immunology*, Mar 1973, 24(3) p477-92.
- Werblin, T.P., Kim, Y.T., Mage, R., Benacerraf, B. and Siskind; G.W. (1973b): The Generation of Antibody Diversity: I. Studies on the Population Distribution of Anti-DNP Antibody Affinities and on the Influence of Allotype on Antibody Affinity and Concentration. *Immunology*, 1973, 25 p17-32.
- Wolter, T., Gassmann, C., Vetter, V. and Bauer, G. (1997): Avidity Determination: Utilization of a Basic Immunological Mechanism Allows Improvement of the Serodiagnosis of Infections. *Clin. Lab.* 1997; 43: 125-135.

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bedanken bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der virologischen Diagnostikabteilung des Institutes für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, insbesondere Herrn Dr. Benedikt Weißbrich für das interessante Thema dieser Arbeit sowie seine intensive Betreuung und Unterstützung.

Weiterhin danke ich herzlich meinen beiden Referenten Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen sowie Herrn Prof. Dr. Peter Rieckmann.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Zens von der Firma Dade Behring, Marburg, für die freundliche Unterstützung und Bereitstellung der Testmaterialien.

# LEBENS LAUF

Ralf-Herbert Kneitz

Hagleite 37  
95326 Kulmbach

Tel: 09221-823080  
eMail ralf.kneitz@gmx.de

geboren am 29. August 1974 in Kulmbach

Familienstand: ledig

Vater: Wilhelm Kneitz, Unternehmer  
Mutter: Rosemarie Kneitz, geb. Hugel, Hausfrau  
Schwester: Sibylla, Pharmazeutisch-technische Assistentin



## Werdegang

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1981-1985                     | Besuch der Grundschule in Kulmbach-Ziegelhütten   |
| 1985-1994                     | Besuch des Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasiums in Kulmbach; Abitur am 1.7.1994  |
| Juli1994-September 1995       | Zivildienst im Pflegebereich am Klinikum Kulmbach   |
| Oktober 1995-Oktober 1998     | abgeschlossene Berufsausbildung (Volontariat) zum Rundfunkredakteur und -moderator bei den privaten Rundfunk-sendern Radio Plassenburg in Kulmbach, Bayerisches Lokalradioprogramm in München, Antenne Thüringen in Weimar  |
| 1. April 1996 – November 2002 | Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg, Abschluß mit 3. Staatsexamen am 26. November 2002   |
| seit November 1998            | Doktorarbeit bei Prof. Dr. V. ter Meulen am Institut für Virologie der Universität Würzburg über Untersuchung der Avidität von virusspezifischen Antikörpern in Serum und Liquor bei Patienten mit Virusenzephalitiden und Multipler Sklerose;<br>Promotion und Veröffentlichung voraussichtlich 2005 |

## Famulaturen

- |             |   |
|-------------|---|
| August 1999 | Famulatur, Klinische und diagnostische Virologie (Labordiagnostik und klinische Visiten) am Institut für Virologie der Universität Würzburg                   |
| März 2000   | Praxisfamulatur bei Allgemeinmediziner Dr. Walter Heppner in Würzburg, dabei Erfahrungen auf dem Gebiet der Chirotherapie, Lokalanästhesie und Neuraltherapie |

August – September 2000 Klinikfamulatur auf der Abteilung für Innere Medizin am Klinikum Kulmbach

September – Oktober 2000 Klinikfamulatur auf der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Kulmbach

### **Praktisches Jahr**

Oktober 2001 – Februar 2002 1. Terial im Fach Dermatologie an der Universitätshautklinik Würzburg, besondere Erfahrungen in der ambulanten und operativen Behandlung

Februar – April 2002 2. Terial im Fach Innere Medizin, achtwöchiger Auslandsaufenthalt am Royal North Shore Hospital in Sydney, Australien; Pneumologie und Endokrinologie;

April – Mai 2002 Fortsetzung des 2. Terials am Klinikum Coburg, Gastroenterologie und Onkologie

Mai – Juni 2002 3. Terial im Fach Chirurgie am Klinikum Coburg, Unfallchirurgie und Plastische Chirurgie;

Juli – September 2002 zwölfwöchiger Auslandsaufenthalt am Strong Memorial Hospital in Rochester, New York, USA; Herz-Thorax-Chirurgie, Gefäßchirurgie, Oto-Rhino-Laryngologie

### **Berufserfahrung:**

1. März 2003 – 31. August 2004 Arzt im Praktikum auf der Inneren Abteilung am Klinikum Kulmbach

seit 1. September 2004 Assistenzarzt auf der chirurgischen Abteilung der Fachklinik Stadtsteinach

### **Außerplanmäßige Fortbildungsveranstaltungen während des Studiums**

jeweils 1 Semester: Kursus Klinische Röntgendiagnostik von Thoraxerkrankungen, Röntgenologisches Kolloquium, EKG-Kurs, Kursus Englisch für Mediziner, Vorlesung Differentialdiagnostik Internistischer Krankheiten, Vorlesung Naturheilverfahren, Venenpunktionskurs

Chirurgischer Nahtkurs

Hospitationen in den Ambulanzen der Chirurgischen Klinik, Hautklinik, Hals-Nasen-Ohren-Klinik und Schmerzambulanz der Universität Würzburg

### **Bisherige berufliche Zusatzqualifikationen / Kenntnisse:**

Sonographiekurs, Fachkunde im Strahlenschutz, Chirotherapie

**geplantes Berufsziel** Arzt für Allgemeinmedizin, Chirotherapie, Naturheilverfahren

**Interessen** Sport (Karate, Schilaufen, Radfahren, Windsurfen, Wandern), Lesen, Musik, Theater

Kulmbach, 31. Mai 2005

