

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Untersuchungen zum Verlauf der CMV-spezifischen Antikörperantwort
bei immunkompetenten Patienten mittels eines Aviditäts-Assays

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Ulla Herre
aus Northeim

Würzburg, Dezember 2007

Referent: Professor Dr. A. Rethwilm

Korreferent: Professor Dr. H. Klinker

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Cytomegalievirus.....	1
1.2	Epidemiologie und Transmission.....	1
1.3	Pathogenese und Klinik.....	2
1.4	Diagnostik.....	4
1.5	Die Rolle der Aviditätsbestimmung in der Virusserologie.....	5
1.6	Fragestellung und Ziel.....	8
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Serumproben.....	9
2.2	Kontrollen.....	11
2.2.1	CMV-IgG- und CMV-IgM-Kontrollen.....	11
2.2.2	Aviditätskontrollen.....	11
2.3	CMV-IgG-Aviditätsbestimmung.....	12
2.3.1	Vorbereitung und Testdurchführung.....	12
2.3.2	Berechnung der Avidität.....	14
2.4	Bestimmung des Aviditätsindex mittels eines virtuellen Extinktionsquotienten.....	15
2.5	CMV-IgM-Antikörper-Bestimmung.....	16
2.6	Statistische Analyse.....	17
2.7	Testwiederholung und Ausschluss aus der Auswertung.....	17
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Evaluation des Enzygnost Anti-CMV/IgG-Tests in Verbindung mit dem LTA- Reagenz.....	19
3.2	Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Berechnung des Aviditätsindex.....	23
3.2.1	Aviditätsindex aus Titern mit Einpunkt-Quantifizierung (alpha-Methode).....	23
3.2.2	Aviditätsindex auf der Basis eines virtuellen Extinktionsquotienten.....	26
3.3	CMV-IgM-Antikörper-Bestimmung.....	29
4	Diskussion.....	31
5	Zusammenfassung.....	38
6	Literaturverzeichnis.....	41

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AI	Aviditätsindex
BEP III	Behring ELISA Processor III
CMV	Cytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
E-Phase	Early Phase
HHV-5	Humanes Herpesvirus Typ 5
IE-Phase	Intermediate early Phase
IgG	Immunglobulin G bzw. M
kbp	Kilobasenpaare
L-Phase	Late Phase
MTP	Mikrotiterplatte
pp	Phosphoprotein
ROC	Receiver-Operator-Charakteristik
TMB	Tetramethylen-Benzidin-Dihydrochlorid

1 Einleitung

1.1 Das Cytomegalievirus

Das Cytomegalievirus (CMV), auch als humanes Herpesvirus Typ 5 (HHV-5) bezeichnet, gehört zur Beta-Subfamilie der Herpesviren. Die Eigenschaft, infizierte Zellen zu vergrößern und die Bildung charakteristischer DNA-haltiger intranukleärer Einschlusskörperchen zu induzieren, war namensgebend für das Virus (griech. kytos: Zelle; megas: groß) und führte zur Bezeichnung „Einschlusskörperchen-Krankheit“. 1956 gelang Smith erstmalig die Züchtung des Erregers in menschlichen Zellen in vitro (Falke 1996).

Das Virion von CMV hat einen Durchmesser von ca. 150 nm und ist, wie alle Herpesviren, aus einem Nucleokapsid, einem Tegument und einer Hülle (Envelope) aufgebaut. Unter Tegument versteht man die virusproteinhaltige Schicht zwischen Nucleokapsid und Hülle. In die lipidhaltige äußere Hülle sind ebenfalls verschiedene Glykoproteine eingelagert.

Das Genom von CMV liegt im Virion als lineare Doppelstrang-DNA vor und ist mit seinen 229 kbp, die für ca. 200 Genprodukte kodieren, das größte innerhalb der Herpesviren.

Die Proteinsynthese gliedert sich in drei voneinander abhängige Phasen, bei denen erst Regulatorproteine („immediate early phase; IE“), dann Proteine u.a. für die DNA-Replikation („early phase; E“) sowie zuletzt Strukturproteine („late phase; L“) gebildet werden. Bekannte Vertreter der in der L-Phase gebildeten Proteine sind unter anderem pp65 und pp150, welche wesentliche Bestandteile des Teguments sind. Das Phosphoprotein pp65 gilt hierbei als primäres Antigen, welches durch die Antikörper des Wirts erkannt wird (Reimer and Meisel 1996).

1.2 Epidemiologie und Transmission

CMV tritt ubiquitär und saisonunabhängig auf, wobei der Mensch das einzige Erregerreservoir darstellt. Der Grad der Durchseuchung variiert zwischen 30 % und

100 % in Abhängigkeit von Alter, geographischer Lokalisation und soziohygienischen Umständen.

Als Übertragungswege fungieren horizontale und vertikale Mechanismen. Die horizontale Übertragung des Virus erfolgt sowohl über Körperflüssigkeiten als auch leukozytenassoziiert durch Bluttransfusionen sowie durch Transplantationen.

Von besonderer Bedeutung ist die konnatale Infektion. Sie tritt bei ca. 2 % aller Neugeborenen in entwickelten Ländern auf und ist somit die häufigste Form intrauteriner Infektionen (Pass 2001).

Eine symptomatische konnatale CMV-Infektion ist meist auf eine CMV-Primärinfektion der Mutter in der Schwangerschaft zurückzuführen. Dabei beträgt das Risiko einer Infektion des Ungeborenen 20-40 %. Im Gegensatz dazu führt eine CMV-Reaktivierung oder –Reinfektion selten zu Schäden des Ungeborenen (Stagno, 1982). Man vermutet, dass die Infektion hauptsächlich auf hämatogenem Weg stattfindet, da in vitro Untersuchungen an Zytotrophoblastzellen, welche mütterliche und fetale Zirkulation voneinander trennen, ergaben, dass sich das Virus in diesen Zellen replizieren kann. Die häufigste postnatale Übertragung erfolgt über die Muttermilch und kann, in Abhängigkeit von der Dauer des Stillens und der Viruslast der Muttermilch, 70 % betragen (Stagno, Pass et al. 1982; Pass 2001).

1.3 Pathogenese und Klinik

Wie histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen gezeigt haben, dienen vor allem die Epithelzellen des oberen Respirations- und Verdauungstraktes sowie des Urogenitaltraktes als Eintrittspforte für das Virus (Landolfo, Gariglio et al. 2003).

Die Inkubationszeit beträgt in Abhängigkeit von Infektionsdosis und Immunitätszustand des Infizierten zwischen 4 und 10 Wochen. Danach kommt es zur Virämie, wobei die Ausbreitung des Virus hauptsächlich hämatogen über polymorphkernige Leukozyten erfolgt. Prinzipiell ist eine Infektion aller Organsysteme durch CMV möglich. Charakteristischerweise werden jedoch Epithelzellen von Drüsenausführungsgängen infiziert, wie das Tubulusepithel der Nieren und Speicheldrüsenepithelien; ferner

Hepatozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Zellen der Plazenta (Reimer and Meisel 1996).

Wie alle Herpesviren, so verfügt auch CMV nach Primärinfektion über die Fähigkeit, ohne Virionbildung und Zellzerstörung latent im Körper zu persistieren. Aus dieser Latenzphase kann es lebenslang zum Eintritt in den lytischen Zyklus und somit zur Reaktivierung der Infektion kommen. Die Reaktivierung scheint vor allem von zellulären Faktoren abzuhängen, wobei die zytokinvermittelte Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unter proinflammatorischen Bedingungen als wichtiges Ereignis angesehen wird (Hummel and Abecassis 2002). Da sich die Antigenstrukturen bei einzelnen Virusstämmen unterscheiden, treten auch Reinfektionen mit CMV auf (Mocarski and Courcelle 2001).

Der klinische Verlauf einer CMV-Infektion hängt in erster Linie vom Immunstatus und dem Infektionszeitpunkt ab. Bei immunkompetenten Patienten verlaufen sowohl Primär- als auch Sekundärinfektion meist subklinisch. Sie können jedoch auch ein mononukleoseartiges Krankheitsbild mit allgemeinem Krankheitsgefühl, persistierendem Fieber, Myalgien, zervikaler Lymphadenopathie und Splenomegalie sowie eine milde Hepatitis hervorrufen, analog dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Pneumonien, Myokarditiden, peripher- wie zentralnervöse und gastrointestinale Beteiligung sowie Retinitis sind selten, Todesfälle wurden jedoch auch für Immungesunde beschrieben (Eddleston, Peacock et al. 1997).

Bei einer Primärinfektion in der Schwangerschaft kann es zum konnatalen CMV-Syndrom kommen (Pass 2001). 10 % der intrauterin infizierten Kinder sind bereits bei Geburt symptomatisch (Stagno, Pass et al. 1982). Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch Hepatosplenomegalie, Ikterus, Petechien, Chorioretinitis oder Optikusatrophie sowie aufgrund der Infektion des zentralen Nervensystems durch Mikrozephalie, mentale Retardierung, generalisierte Muskelhypotonie und Zerebralparese, an deren Folgen etwa 10 % der Erkrankten versterben (Griffiths and Emery 2002). Oft treten diese Defekte in Kombination auf. Auch Laborveränderungen wie Thrombozytopenie, hämolytische Anämie, Hyperbilirubinämie, erhöhte Transaminasen und erhöhtes Liquoreiweiß werden häufig beobachtet. Der weitere Verlauf hängt auch vom betroffenen Organsystem ab. So kommt es bei Schäden der Leber sowie der blutbildenden Organe meist Wochen nach der Geburt zu einer spontanen Remission,

wohingegen neurologische Defekte sich in der Regel nicht zurückbilden und meist eine langwierige medizinische Betreuung erfordern. Auch bei Geburt asymptomatische Kinder haben in 10 % der Fälle ZNS-Folgeschäden, die sich zumeist in Form von Hörschäden manifestieren (Williamson, Demmler et al. 1992; Fowler, McCollister et al. 1997).

Ist die Immunität des Wirts durch Immunsuppression, z. B. im Rahmen einer Organtransplantation oder einer HIV-Infektion herabgesetzt, können ernste, teilweise letale Verläufe beobachtet werden. Eine CMV-Infektion kann sich hierbei in jedem Organsystem manifestieren, betrifft jedoch in erster Linie Lunge, zentrales Nervensystem und Gastrointestinaltrakt (Pass 2001).

1.4 Diagnostik

Bei immunkompetenten Patienten steht der Nachweis einer Primärinfektion im Vordergrund. Gerade in der Schwangerschaft ist die Abgrenzung einer Primärinfektion von einer Reaktivierung von entscheidender Bedeutung, da eine Reaktivierung im Gegensatz zu einer Primärinfektion nur selten zu konnatalen Infektionen führt (Stagno, Pass et al. 1982).

Häufig erfolgt der Nachweis bzw. der Ausschluss einer akuten viralen Infektion durch die Bestimmung von spezifischen Immunglobulin M (IgM) Antikörpern. Sie beruht auf der Erkenntnis, dass im Zuge der Immunantwort zunächst IgM-Antikörper gebildet werden, die nach einigen Wochen bis Monaten verschwinden, während IgG-Antikörper mit zeitlicher Verzögerung auftreten, dafür aber meist über Jahre oder Jahrzehnte nachweisbar sein können (Nielsen, Sorensen et al. 1988). Idealerweise sollte ein positives IgM-Ergebnis eine Primärinfektion anzeigen und ein negativer IgM-Nachweis diese ausschließen.

Auf die IgM-Bestimmung als alleiniges diagnostisches Mittel ist jedoch nicht in allen Fällen Verlass. Zwar ist CMV-IgM ein sensitiver Parameter für die Diagnose einer Primärinfektion, aber seine Spezifität in dieser Beziehung ist nur begrenzt. CMV-IgM-Antikörper können einige Monate nach Primärinfektion persistieren (Kangro, Griffiths et al. 1982; Nielsen, Sorensen et al. 1988). Des weiteren kann CMV-IgM auch bei

Reaktivierungen, Reinfektionen oder im Rahmen einer polyklonalen B-Zell-Stimulation produziert werden (Pass, Griffiths et al. 1983; Miendje Deyi, Goubau et al. 2000).

Andererseits kann es durch falsch negative Ergebnisse auch zum voreiligen Ausschluss einer Primärinfektion kommen. Die IgM-Antwort ist interindividuell sehr variabel und kann im Vergleich zum IgG-Titeranstieg verzögert auftreten oder nur für einen sehr kurzen Zeitraum nachweisbar sein (Nielsen, Sorensen et al. 1988). Auch kann ein sehr schwacher IgM-Befund im betreffenden Testsystem unter der jeweiligen Nachweisgrenze liegen und zu einer falsch negativen Bewertung der Probe führen (Wolter, Gassmann et al. 1997). Auf der Suche nach Lösungsansätzen dieser Problematik bezog man die Avidität von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern mit ein (Hedman and Rousseau 1989; Andersson, Vetter et al. 1994)

1.5 Die Rolle der Aviditätsbestimmung in der Virusserologie

Im Gegensatz zum Begriff „Affinität“, der die Summe aller abstoßenden und anziehenden Kräfte einer einzelnen Epitop-Antikörperbindung beschreibt, umfasst der Terminus „Avidität“ die Gesamtbindungskraft spezifischer Antikörper an ein Antigen mit mehreren verschiedenen Epitopen (Hedman, Lappalainen et al. 1993; Bauer 1996).

Der diagnostische Nutzen der Aviditätsbestimmung liegt in der Reifung der IgG-Antikörper im Verlauf der humoralen Immunantwort auf ein infektiöses Agens. Als Grundlage für diesen Reifungsprozess wird eine Selektion von B-Zellklonen durch Hypermutation des für den variablen Teil des IgG-Moleküls kodierenden Abschnitts angenommen. Hierdurch kommt es, aufgrund einer kontinuierlichen Veränderung der genetischen Information, zur positiven Selektion der B-Zellklone, die Antikörper mit hoher Affinität synthetisieren. Bei erneuter Konfrontation des Immunsystems mit dem Antigen synthetisieren Gedächtniszellen unmittelbar hochavidiges IgG. Demgegenüber unterliegen die weniger aviden IgG produzierenden B-Zellen durch zunehmenden Selektionsdruck dem apoptotischen Zelltod (Wolter, Gassmann et al. 1997).

Somit sind niedrig avide Antikörper typisch für eine primäre Infektion, während hoch avides IgG eine zurückliegende, reaktivierte oder Reinfektion anzeigt. Dieser Zusammenhang ist vereinfacht in Abbildung 1 dargestellt.

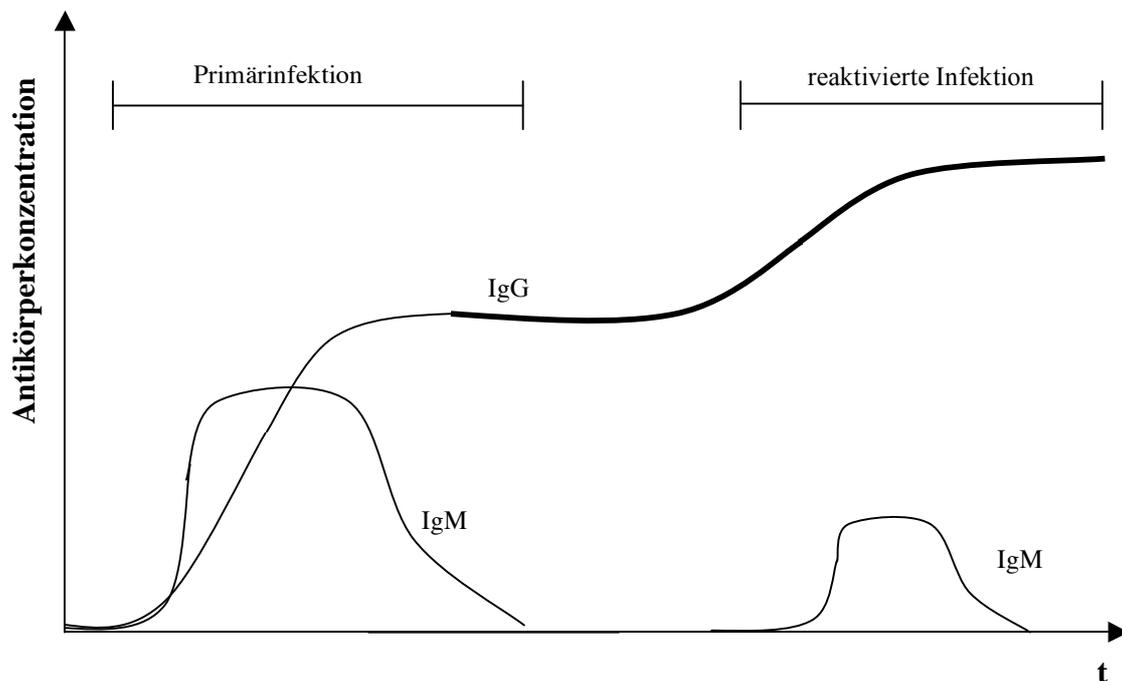


Abbildung 1: Titerverläufe der IgG- und IgM-Immunantwort bei primärer und reaktiver Infektion. IgM kann in beiden Fällen positiv sein. Im Laufe der Primärinfektion steigt die Avidität der IgG-Antikörper an (dünne Linie entspricht niedriger, dicke Linie hoher Avidität). Bei einer Reaktivierung wird direkt hochavidiges IgG produziert. (modifiziert nach Wolter, 1997)

Insbesondere bei unklarer IgM-Serologie oder für die genauere Bestimmung des Infektionsstatus ist die Bestimmung der Avidität von IgG ein wichtiger zusätzlicher Parameter (Wolter, Gassmann et al. 1997).

Der zeitliche Verlauf der Aviditätsreifung differiert je nach Immunstatus und infektiösem Agens. So zeigen z.B. Patienten nach Nierentransplantation sowie konnatal infizierte Kinder im Vergleich zu Immungesunden oft einen deutlich verzögerten Reifungsprozess der CMV-Antikörper. Der Nachweis niedrig aviden Antikörper beweist daher bei eingeschränktem Immunsystem keine frische Infektion, wohingegen hoch avides IgG auch hier eine kürzliche Primärinfektion ausschließt (Lutz, Ward et al. 1994).

Grundlage für die Bestimmung der Avidität ist die Verwendung von denaturierenden Reagenzien, meist Harnstoff. Bei der Dilutionsmethode mit Harnstoff dissoziieren die Antigen-Antikörperkomplexe niedrig aviden Antikörper, hochavide Komplexe bleiben hiervon unbeeinflusst. Als biophysikalischer Mechanismus für den Denaturierungsprozess wird eine Zerstörung von Proteinbindungen durch hydrophob-

hydrophile Wechselwirkungen vermutet (Kamoun 1988). Je nach verwendetem Testsystem wird die Avidität quantitativ (z.B. ELISA) oder semiquantitativ (z.B. Immunoblot) bestimmt. Zur Objektivierung quantitativ serologischer Methoden wird die Patientenprobe mit und ohne Aviditätsreagenz untersucht. Das daraus resultierende Verhältnis ist der Aviditätsindex, der das Bindungsverhalten der Antikörper entweder an den Gesamtkomplex des natürlich vorkommenden Antigens oder an eine Mischung aus rekombinanten Antigenen bestimmt (Wolter, Gassmann et al. 1997).

Anwendung fand diese Methode erstmals 1989 für die Diagnose einer Rubellavirus-Infektion (Hedman and Rousseau 1989) und wurde bisher schon für viele Pathogene angewendet (Hedman, Lappalainen et al. 1993; Wolter, Gassmann et al. 1997). Wegen der Gefahr ernster Schäden des Ungeborenen bei einer Primärinfektion in der Schwangerschaft hat sich für das Cytomegalievirus, das Rötelnvirus und *Toxoplasma gondii* die Bestimmung als besonders nützlich erwiesen (Andrews 2004) und wurde erfolgreich eingesetzt, um eine Primärinfektion bei Patienten mit positiven CMV-IgM-Antikörpern zu bestätigen oder auszuschließen.

Zu diesem Thema sind Evaluierungsstudien für CMV-Aviditäts-„in-house“-Teste (Blackburn, Besselaar et al. 1991; Ruellan-Eugene, Barjot et al. 1996; Grangeot-Keros, Mayaux et al. 1997; Bodeus, Feyder et al. 1998; Eggers, Bader et al. 2000; Prince and Leber 2002) sowie für kommerzielle Teste (Lazzarotto, Spezzacatena et al. 1997; Bodeus, Feyder et al. 1998; Baccard-Longere, Freymuth et al. 2001; Revello, Gorini et al. 2004; Dangel, Bader et al. 2006) veröffentlicht worden. Hierbei streuten sowohl Sensitivität als auch Spezifität über einen breiten Bereich, der überwiegende Teil der Untersuchungen zeigte jedoch hervorragende Messwerte. Ein Nachteil der „in-house“-Teste ist jedoch die fehlende Standardisierung sowie die mangelnde Anpassung an verbindliche Vorschriften für den Gebrauch von in-vitro-Testen. Ausserdem muss vor der Verwendung eines Tests in der Routinediagnostik die spezifische Reifungskinetik der jeweiligen Antikörper bestimmt werden (Steininger, Kundi et al. 2004).

1.6 Fragestellung und Ziel

Wie bereits dargestellt, ist die Bestimmung der CMV-IgG-Antikörperavidität von signifikanter Bedeutung für die Diagnostik einer CMV-Primärinfektion. Der Enzygnost Anti-CMV/IgG-Aviditätstest (Dade Behring, Marburg, Deutschland) bestand vormals aus dem Enzymimmunoassay (EIA) Enzygnost Anti-CMV/IgG in Kombination mit dem Dade Behring Aviditätsreagenz (Urea Hydrogenperoxid). Dieses Reagenz ist jedoch nicht mehr auf dem Markt. Es wurde durch das LTA-Aviditätsreagenz (LTA, Bussero, Italien) ersetzt, welches in der Zusammensetzung mit dem Dade Behring Aviditätsreagenz identisch ist. Diese Änderung bot die Gelegenheit, die Cut-off-Kriterien sowie die Vorgehensweise für die Aviditätsbestimmung erneut zu bewerten.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Enzygnost Anti-CMV/IgG-Aviditätsassay evaluiert und optimiert werden. Eingesetzt wurde das LTA-Aviditätsreagenz in Kombination mit dem Enzygnost Anti-CMV/IgG-Test. Die Sensitivität und Spezifität des Tests sollte an einem Kollektiv von klinisch gut charakterisierten Serum- und Plasmaproben getestet werden. Neben der Bestimmung der CMV-IgG-Avidität mit Hilfe von Extinktionswerten sollte ein Vergleich mit Aviditätswerten erfolgen, die auf der Basis der Einpunkt-Quantifizierungsmethode berechnet wurden. Zusätzliches Ziel war die Bewertung des klinischen Nutzens des Enzygnost Anti-CMV/IgM-Tests mittels der Studienproben.

2 Material und Methoden

2.1 Serumproben

Die Proben dieser Studie waren dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg für virologische Routineuntersuchungen zugesandt worden. Restmaterial wurde bei – 20°C gelagert. Für die Evaluierung des CMV-Aviditätsassays wurden zwei Gruppen von Patientenproben getestet. Die erste Gruppe umfasste 115 Serum- oder Plasmaproben von 37 immunkompetenten Erwachsenen mit akuter oder kürzlicher CMV-Primärinfektion. Von 35 Patienten standen mehrere Proben (zwei bis neun) zur Verfügung. Dabei betrug der kürzeste Abstand von der ersten bis zur letzten Probenentnahme zwei Tage, der längste Abstand umfasste 2788 Tage.

Nachfolgende Tabelle bietet eine Übersicht über das untersuchte Patientenkollektiv der Gruppe 1:

Patient	Geschlecht	Alter¹⁾	Probenanzahl	Verlauf in Tagen
1	w	75 J	2	11
2	m	36 J	3	439
3	m	29 J	2	10
4	w	34 J	2	48
5	m	25 J	3	820
6	m	25 J	4	1326
7	m	40 J	2	14
8	w	27 J	7	2219
9	m	23 J	1	-
10	m	34 J	3	142
11	w	73 J	3	20
12	w	63 J	5	97
13	m	44 J	4	248
14	w	42 J	2	289
15	m	29 J	6	2788
16	w	24 J	3	38
17	w	24 J	3	273
18	w	23 J	2	2
19	m	40 J	2	13
20	w	47 J	3	852

Patient	Geschlecht	Alter¹⁾	Probenanzahl	Verlauf in Tagen
21	m	28 J	3	2535
22	m	31 J	1	-
23	m	33 J	4	54
24	m	52 J	3	28
25	w	30 J	3	47
26	m	44 J	3	61
27	w	31 J	3	144
28	m	43 J	2	21
29	w	33 J	2	58
30	w	23 J	4	197
31	m	30 J	2	37
32	m	29 J	2	261
33	m	33 J	9	324
34	w	27 J	3	47
35	m	35 J	3	71
36	m	34 J	4	168
37	m	19 J	2	9

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die in die Studie eingeschlossenen immunkompetenten Patienten aus Gruppe 1

¹⁾ Alter zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme

Alle Proben dieses Kollektivs erfüllten folgende Kriterien: Serokonversion für CMV-IgG (Enzygnost Anti-CMV/IgG, Dade Behring, Marburg, Deutschland); oder mindestens vierfacher Titeranstieg in Kombination mit positiven CMV-IgM-Antikörpern (Enzygnost Anti-CMV/IgM, Dade Behring); oder positive CMV-IgM-Antikörper in Kombination mit klinischen Symptomen, die eine CMV-Primärinfektion bei Erwachsenen nahe legen. Für 22 dieser Patienten lagen Informationen über den genauen Krankheitsbeginn vor. Für die anderen 15 Patienten war der genaue Krankheitsbeginn nicht bekannt, konnte jedoch mit Hilfe der vorhandenen klinischen Daten auf eine Zeitspanne von höchstens vier Wochen geschätzt werden. Für diese Fälle wurde das Datum in der Mitte dieses Zeitraums als Krankheitsbeginn ausgewählt. Bei drei Patienten aus Gruppe 1 waren keine Krankheitssymptome dokumentiert worden. Die CMV-IgG-Serokonversion wurde hier zufällig festgestellt. Als Zeitpunkt der Serokonversion wurde der zeitliche Mittelwert zwischen der letzten IgG-negativen und der ersten IgG-positiven Probe genommen.

Gruppe 2 umfasste 120 Proben von gesunden Blutspendern der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universität Würzburg, die im Zeitraum von 2001 bis 2004 gesammelt worden waren. Diese Proben waren dadurch charakterisiert, dass von den Spendern ein positiver CMV-Status mindestens zwei Jahre vor der Entnahme der für die Studie verwendeten Probe festgestellt worden war. Bei diesen Blutspendern lag somit die CMV-Primärinfektion mindestens 2 Jahre zurück, tatsächlich wahrscheinlich sehr viel länger.

Tabelle 2 zeigt zusammenfassend die Daten der 37 immunkompetenten Patienten sowie der 120 Blutspender:

	Immunkompetente Patienten	Blutspender
n (weiblich/männlich)	37 (15/22)	120 (61/59)
Durchschnittsalter	36 Jahre	35 Jahre
(von - bis)	19 bis 75	20 bis 67

Tabelle 2: Alters- und Geschlechterverteilung der beiden Studienkollektive

2.2 Kontrollen

Um die korrekte Durchführung des Tests gewährleisten zu können, wurden bei jedem Lauf zusätzlich zu den Probenverdünnungen folgende Kontrollseren mitgeführt:

2.2.1 CMV-IgG- und CMV-IgM-Kontrollen

Anti-CMV-Referenz P/N (RP/N) bzw. Anti-CMV-Referenz P/P (RP/P) des Enzygnost Testkits

2.2.2 Aviditätskontrollen

- Serumprobe von Patient Nr. 1 mit CMV-Primärinfektion und niedriger CMV-IgG-Avidität („Akut-Kontrolle“), deren Entnahme 38 Tage nach Krankheitsbeginn datierte.
- Die Serumkontrolle RP/N des IgG-Testkits diente gleichzeitig als „Alt-Kontrolle“; sie zeigte Aviditäten von im Mittel 42 %.

2.3 CMV-IgG-Aviditätsbestimmung

2.3.1 Vorbereitung und Testdurchführung

Für die CMV-IgG-Aviditätsbestimmung der Serum- und Plasmaproben kamen folgende Geräte, Reaktionskits und Chemikalien zum Einsatz und wurden gemäss Herstellerangaben unter Einhaltung von Vorsichtsmassregeln, Handhabungs- und Lagerungsvorschriften verwendet:

- Geräte: Behring ELISA Processor III (BEP III)
- Reaktionskits und Chemikalien:

Enzygnost Anti-CMV/IgG	Lot 36468, Bestell-Nr. OWBA 15
Zusatzreagenzien für Enzygnost TMB	Lot 36586, Bestell-Nr. OUVF 15
LTA Aviditätsreagenz	Lot A170.6

Von jeder Probe, der Referenz P/N sowie der Akut-Kontrolle wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:231 angelegt. Dazu wurden 10 µl der Seren und der Referenz jeweils in 200 µl Probenpuffer vorverdünnt. Anschließend wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte (MTP) 200 µl Probenpuffer vorgelegt. Dazu wurden dann 20 µl der Vorverdünnung in jeweils zwei Nöpfe pipettiert und gut durchmischt. Je ein Napf war mit CMV-Antigen, der andere mit einem „Kontroll-Antigen“ einer nicht infizierten Zellkultur beschichtet.

Um die Avidität der Antikörper experimentell bestimmen zu können, wurden jeweils zwei Vertiefungen einer MTP mit einer verdünnten Probe parallel inkubiert. Hierfür wurde die MTP in zwei Hälften unterteilt. Abbildung 2 zeigt die Anordnung beispielhaft für alle Testreihen.

	Riegel 1		Riegel 2		Riegel 3		Riegel 4		Riegel 5		Riegel 6	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RP/N	KoAg	P 8	KoAg	P 15	KoAg	RP/N	KoAg	P 8	KoAg	P 15	KoAg
B	P 1	KoAg	P 9	KoAg	P 16	KoAg	P 1	KoAg	P 9	KoAg	P 16	KoAg
C	P 2	KoAg	P 10	KoAg	P 17	KoAg	P 2	KoAg	P 10	KoAg	P 17	KoAg
D	P 3	KoAg	P 11	KoAg	P 18	KoAg	P 3	KoAg	P 11	KoAg	P 18	KoAg
E	P 4	KoAg	P 12	KoAg	P 19	KoAg	P 4	KoAg	P 12	KoAg	P 19	KoAg
F	P 5	KoAg	P 13	KoAg	P 20	KoAg	P 5	KoAg	P 13	KoAg	P 20	KoAg
G	P 6	KoAg	P 14	KoAg	P 21	KoAg	P 6	KoAg	P 14	KoAg	P 21	KoAg
H	P 7	KoAg	Akut	KoAg	RP/N	KoAg	P 7	KoAg	Akut	KoAg	RP/N	KoAg

CMV/ IgG mit Referenzreagenz	CMV/ IgG mit Aviditätsreagenz
-------------------------------------	--------------------------------------

Abbildung 2: Pipettierschema der Mikrotiterplatte für die Aviditätstestung.

R P/N: Referenz P/N; Akut: Akut-Kontrolle; P n: Serumvorverdünnung der Proben n; KoAg: Kontroll-Antigen.

Der linke Teil der Mikrotiterplatte enthielt den Probenansatz für die Testung mit Aviditätsreferenzreagenz ohne denaturierende Eigenschaften, der rechte Teil war mit identischem Probenansatz bestückt und für die Abarbeitung mit LTA-Aviditätsreagenz vorgesehen. Bei einer voll bestückten Platte wurde in Napf A1 bzw. A2 sowie Napf H5 bzw. H6 die Referenz P/N pipettiert. Napf H3 bzw. H4 enthielt die „Akut-Kontrolle“. Analog wurde mit der Bestückung der rechten Plattenhälfte verfahren. In einem Testdurchlauf konnten bei einer voll bestückten 96-Well-MTP 21 Proben untersucht werden.

Die weitere Abarbeitung erfolgte automatisch durch den Behring Elisa Processor III (BEP III, Dade Behring). Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C wurde die eine Hälfte der Platte nach Herstelleranleitung mit der Gebrauchswaschlösung POD als Aviditätsreferenzreagenz gewaschen. Die andere, jeweils identisch bestückte Hälfte der Platte wurde mit dem LTA-Aviditätsreagenz für 3 min inkubiert. Anschließend wurde viermal mit Gebrauchswaschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde in jede

Vertiefung 100 µl der vorbereiteten Anti-human-IgG-Konjugatlösung hinzugefügt und die Platte wurde 60 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten mit Waschpuffer wurde Tetramethylen-Benzidin-Dihydrochlorid als Substrat zugegeben und bei Raumtemperatur für 30 min stehen gelassen. Die Reaktion wurde mit 0,5 N Schwefelsäure abgestoppt und die Extinktion der Näpfe photometrisch bei 450 nm sowie einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Hierbei wurde für jedes Napf-Paar die Extinktion des Kontrollantigen-Napfes von der des Antigen-Napfes subtrahiert.

2.3.2 Berechnung der Avidität

2.3.2.1 Aviditätsindex aus Extinktionswerten

Die Avidität wurde berechnet als Quotient der Extinktionswerte mit und ohne denaturierende Behandlung. Hierfür wurden die Extinktionen der entsprechenden Probenverdünnung, die sich aus der Behandlung mit Aviditäts- und Referenzreagenz ergeben hatten, in ein Verhältnis gesetzt. Multipliziert mit 100, ergab sich der Aviditätsindex in Prozent:

$$\text{Aviditätsindex (\%)} = \frac{\text{Extinktion mit Aviditätsreagenz}}{\text{Extinktion mit Referenzreagenz}} \times 100$$

2.3.2.2 Aviditätsindex aus Titern mit Einpunkt-Quantifizierung (alpha-Methode)

Zum Vergleich wurde der Aviditätsindex auch auf der Basis von CMV-IgG-Titern anstelle von Extinktions-Werten berechnet. Dazu wurden die Titer aus der Extinktion durch die Einpunkt-Quantifizierungsmethode (alpha-Methode) gemäss den Angaben im Enzygnost Anti-CMV/IgG-Testkit bestimmt.

Zunächst wurde mit Hilfe der Extinktionen aus Referenz P/N sowie einem chargenspezifischen Nominalwert ein Korrekturfaktor ermittelt, mit dem alle Extinktionen multipliziert wurden. Die korrigierten Extinktionswerte wurden in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Log}_{10} \text{ Titer (U/l)} = \alpha \times E^\beta$$

wobei α und β testchargenspezifische Konstanten und E die Extinktion darstellen.

Danach wurde der Aviditätsindex wie oben dargestellt berechnet:

$$\text{Titer-Aviditätsindex (\%)} = \frac{\text{Titer mit Aviditätsreagenz}}{\text{Titer mit Referenzreagenz}} \times 100$$

Die Cut-off-Berechnung für die Unterscheidung zwischen niedriger und hoher Avidität wird im Ergebnisteil beschrieben.

2.4 Bestimmung des Aviditätsindex mittels eines virtuellen Extinktionsquotienten

Als zusätzlich Methode zur Aviditätsberechnung wurde der virtuelle Extinktionsquotient bestimmt (Kneitz, Schubert et al. 2004). Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass bei Verdünnungsreihen zwischen den Extinktionen mit bzw. ohne Denaturierungswaschgang ein linearer Zusammenhang besteht. Somit kann diese Beziehung mit der Gleichung $y = m \times x + c$ beschrieben werden, wobei m die Steigung, c die Konstante, x die Extinktion ohne und y die Extinktion mit denaturierendem Agens darstellt. Die experimentelle Bestimmung der Extinktion wurde für 23 Proben wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Verdünnungsreihen umfassten die Standardverdünnung (1:231) und zwei zusätzliche Verdünnungen (1:693 und 1:2310). Die Extinktionen wurden im Koordinatensystem graphisch dargestellt (mit Referenzreagenz = Abszisse; mit Aviditätsreagenz = Ordinate). Die m- und c-Werte der Geradengleichung wurden für jede Probe mit Hilfe der Excel Software (Microsoft) aus den experimentell bestimmten

Punktwerten bestimmt. Der Aviditätsindex wurde berechnet als das Verhältnis der Extinktionswerte mit und ohne Denaturierung:

$$\text{Aviditätsindex (\%)} = \frac{m \times x + c}{x} \times 100$$

Durch Verwendung des Wertes 1,000 für x bei allen Berechnungen erhält man einen von der Antikörperkonzentration unabhängigen Aviditätsindex (normalisierter virtueller Extinktionsquotient).

2.5 CMV-IgM-Antikörper-Bestimmung

Die Bestimmung von CMV-IgM mit dem Enzygnost Anti-CMV/IgM-Testkit wurde gemäss Herstelleranleitung unter Verwendung des BEP III für die Abarbeitung der MTP durchgeführt. Hierfür kamen folgende Geräte, Reaktionskits und Chemikalien zum Einsatz:

- Geräte: Behring ELISA Processor III (BEP III)
- Reaktionskits und Chemikalien:

Enzygnost Anti-CMV/IgM	Lot 36409, Bestell-Nr. OWBK 15
Zusatzreagenzien für Enzygnost TMB	Lot 36586, Bestell-Nr. OUVF 15

Zunächst wurden die Serumproben im Verhältnis 1:21 mit Probenpuffer vorverdünnt. Dann wurde ein ebenso großes Volumen anti-human IgG hinzugefügt, um IgG-Antikörper und Rheumafaktor in der Probe zu präzipitieren, wodurch sich letztendlich eine Serumverdünnung von 1:42 ergab.

Die verdünnten Serum- oder Plasma-Proben sowie die entsprechenden Kontrollproben wurden manuell in jeweils zwei Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, wobei eine Vertiefung analog zur IgG-Antikörper-Bestimmung mit CMV-Antigen, die andere mit Kontroll-Antigen beschichtet war. Nach 60 min Inkubationszeit bei 37°C wurden

die Vertiefungen dreimal hintereinander mit Gebrauchswaschlösung gewaschen. Peroxidase-konjugiertes anti-human-IgM wurde in einer Verdünnung von 1:51 hinzugefügt und die Platte wurde nochmals 60 min bei 37°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit dem Waschpuffer wurde Tetramethylen Benzidin Dihydrochlorid als Substrat hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 N Schwefelsäure abgestoppt und die optische Dichte der Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde bei 450 nm sowie bei 650 nm (Referenzwellenlänge) photometrisch gemessen.

2.6 Statistische Analyse

Die Receiver-Operator-Charakteristik (ROC)-Analyse wurde schon in zahlreichen Studien eingesetzt, um die diagnostische Leistungsfähigkeit von Labortests zu beurteilen, weil man mit diesem Verfahren für jeden einzelnen Cut-off-Wert die Sensitivität und Spezifität feststellen kann (Stephan, Wesseling et al. 2003).

Zur Beurteilung des Enzygnost Anti-CMV/IgG-Aviditätstest hinsichtlich seiner diagnostischen Aussagekraft wurde eine ROC-Analyse mit SPSS 13.0 für Mac OS X erstellt und die errechnete Sensitivität und Spezifität im Koordinatensystem aufgetragen. Um eine eindeutige Trennung zu erzielen wurden in die Analyse nur Proben einbezogen, deren Entnahme maximal 100 Tage nach Krankheitsbeginn datierte („Akut-Proben“) sowie Proben mit einem Entnahmedatum mindestens ein Jahr nach Beginn der Symptome („Alt-Proben“). Der Entnahmezeitraum zwischen 100 Tagen und einem Jahr wurde für die ROC-Analyse nicht berücksichtigt.

2.7 Testwiederholung und Ausschluss aus der Auswertung

Unter folgenden Voraussetzungen wurden Proben einem zweiten Testlauf unterzogen:

- Proben, die beim ersten Testlauf ohne denaturierende Behandlung eine Extinktion von 2,000 oder höher aufwiesen. Sie wurden in einer zusätzlichen Vorverdünnung von 1:10 erneut getestet. Dies betraf insgesamt 33 Proben.

- Fünf Proben, deren Entnahme unter 100 Tagen nach Krankheitsbeginn datierte und einen Aviditätsindex $> 30\%$ aufwiesen, wurden erneut in der gleichen Verdünnung getestet. Bei drei Proben bestätigte sich das Ergebnis in diesem Bereich. Zwei Proben, deren initialer Aviditätsindex geringfügig über 30% lag, erzielten im zweiten Durchlauf Werte knapp unterhalb von 30% . In die Endauswertung kamen die Ergebnisse des ersten Durchlaufs.
- Sechs Proben, die später als 100 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen worden waren und für die sich ein Aviditätsindex von $< 30\%$ ergab, wurden nochmals einer Testung unterzogen. In der Hälfte der Fälle bestätigte sich das Ergebnis in diesem Bereich. Auch hier wurden die initial erzielten Werte berücksichtigt.
- Sechs Proben, mit einer Extinktion von 0,200 oder niedriger ohne denaturierende Behandlung wurden als „nicht auswertbar“ klassifiziert.
- Für fünf Proben ergab sich in der IgG-Aviditätstestung Extinktionen $> 0,200$ bei Reaktion mit dem Kontrollantigenapf der Testplatte. Sie wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluation des Enzygnost Anti-CMV/IgG-Tests in Verbindung mit dem LTA-Reagenz

Für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Enzygnost Anti-CMV/IgG-Tests und des LTA-Reagenz in Bezug auf die Aviditätstestung wurden Serum- und Plasmaproben von Patienten mit akuter CMV-Infektion mit eingrenzbarem Krankheitsbeginn (Gruppe 1) und von gesunden Blutspendern mit einer lange zurückliegenden CMV-Primärinfektion (Gruppe 2) getestet. Die Berechnung des Aviditätsindex erfolgte initial auf der Basis von Extinktionsquotienten. Die Aviditätswerte wurden in Abhängigkeit von der Zeit nach Krankheitsbeginn graphisch dargestellt. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse aller Proben von Gruppe 1 und 2.

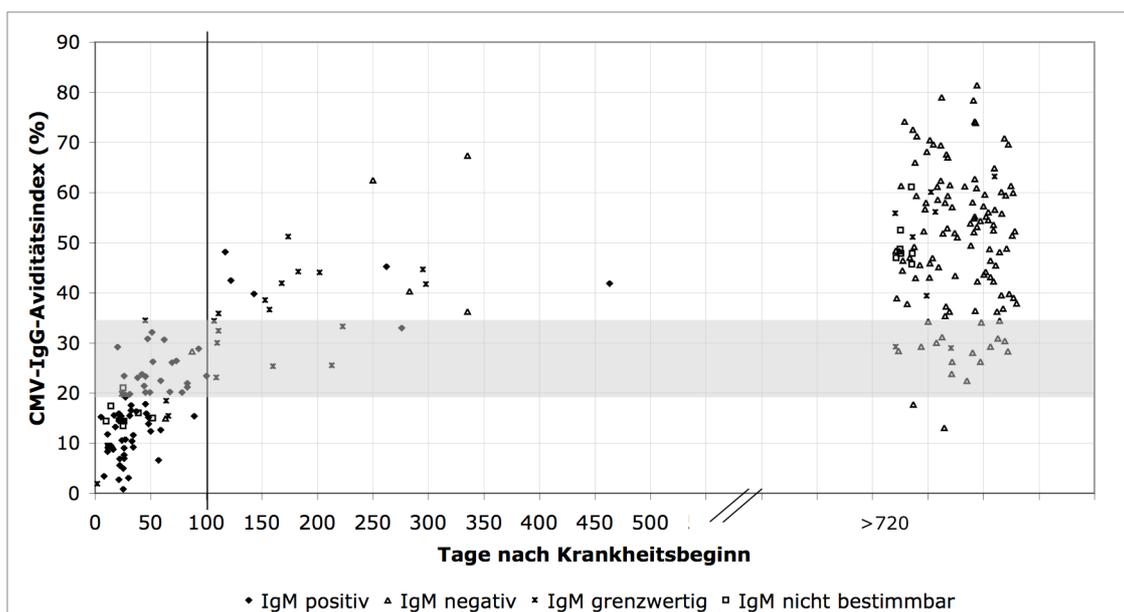


Abbildung 3: CMV-IgG-Aviditätsreifung nach Primärinfektion. Die senkrechte Linie markiert den Zeitpunkt 100 Tage nach Krankheitsbeginn. Die schattierte Fläche stellt den mit Hilfe der ROC-Analyse definierten Graubereich von 20-35 % dar. Unterschiedliche Symbole wurden in Abhängigkeit vom IgM-Status der jeweiligen Probe verwendet.

Eine Zeitspanne von 100 Tagen nach Symptombeginn wurde als frische Krankheitsphase gewählt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass alle Proben, die innerhalb der ersten 100 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen worden sind, einen Aviditätsindex unter 35 % aufwiesen. Für die zu einem späteren Zeitpunkt entnommenen Seren ergab sich eine breite Streuung mit Werten von 13,1 bis 81,5 %. Nach 2 Jahren lagen die meisten Proben mit der Avidität über 35 %. Ein erheblicher Teil lag jedoch darunter, zwei Seren zeigten eine Avidität von 13,1 bzw. 17,8 %. Der IgM-Status war für beide Proben negativ. Einige Proben mit einer Avidität über 35 % zeigten positive IgM-Antikörper. Dabei datierte der späteste positive CMV-IgM-Antikörperrnachweis 463 Tage nach Krankheitsbeginn.

Um den Aviditätsindex-Grenzwert für eine optimale Unterscheidung der Proben von Patienten mit akuter und lange zurückliegender Infektion zu bestimmen, wurde eine Receiver-Operator-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Proben, die innerhalb der ersten 100 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen wurden, der Gruppe der Primärinfektionen zugeordnet, während die Proben, deren Entnahme mindestens 1 Jahr nach Primärinfektion datierte, die Gruppe der alten Infektionen bildeten. Es wurde für jeden möglichen Cut-off-Wert die Sensitivität und Spezifität errechnet (Abbildung 4).

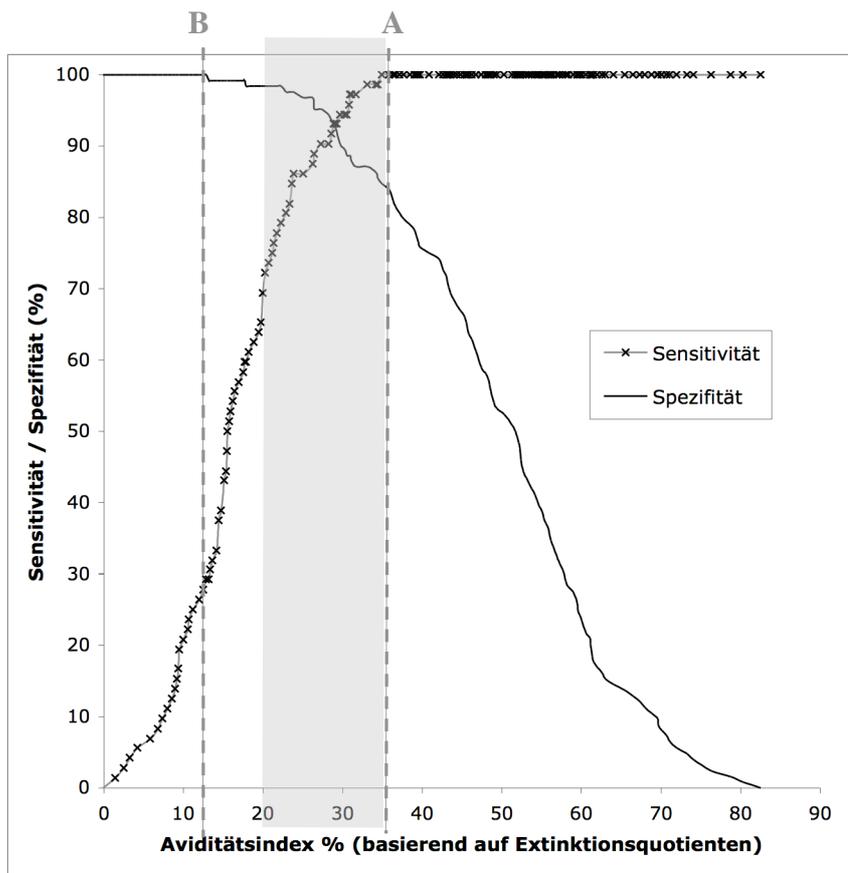


Abbildung 4: Receiver-Operator-Kurvenanalyse für CMV-IgG-Aviditätsberechnungen auf der Basis von CMV-IgG-Extinktions-Quotienten. Die Linien A und B kennzeichnen die Cut-off-Werte, mit denen eine 100 %ige Sensitivität bzw. Spezifität erreicht wurde. Die schattierte Fläche kennzeichnet den neu definierten Grenzbereich für intermediäre Aviditätswerte.

Eine 100 %ige Sensitivität wurde bei einem Cut-off-Wert von 34,9 % und höher erzielt. Die Spezifität lag hierbei jedoch nur bei 84,7 % (Linie A in Abbildung 4). Eine Spezifität von 100 % für die korrekte Einordnung der Proben zur Gruppe der alten Infektionen wurde mit einem Cut-off von 12,8 % erreicht, die Sensitivität lag hierbei jedoch lediglich bei 27,8 % (Linie B in Abbildung 4). Um sowohl eine hohe Sensitivität als auch Spezifität zu erzielen, wurde ein Grenzbereich für intermediäre Aviditätswerte von 20-35 % definiert (schattierte Fläche in Abbildung 4). Damit fallen alle Seren, deren Aviditätsindex ≤ 20 % liegt, in den Bereich niedriger Avidität, Proben mit einem Aviditätsindex von ≥ 35 % gelten als hoch avid.

Die Verteilung aller Seren unter Berücksichtigung des Grenzbereichs zeigt Tabelle 3.

Tage nach Krankheitsbeginn	n	Avidität ≤ 20 % (niedrig)	20 % < Avidität < 35 % (intermediär)	Avidität ≥ 35 % (hoch)
0 bis 100	81	57 (70,4 %)	24 (29,6 %)	0
100 bis 365	25	0	8 (32,0 %)	17 (68,0 %)
> 365	129	2 (1,6 %)	18 (14,0 %)	109 (84,5 %)

50 (21,3 %)

Tabelle 3: Aviditätswerte in Abhängigkeit vom Krankheitsbeginn. Graphisch hervorgehoben ist der Bereich intermediärer Avidität.

57 (70,4 %) von 81 Proben von Patienten mit einer Primärinfektion im Zeitraum von < 100 Tagen nach Krankheitsbeginn wurden durch den Test als niedrig avid (IgG-Aviditätsindex < 20 %) erkannt. 109 (84,5 %) der 129 Proben, die länger als 365 Tage nach Primärinfektion entnommen wurden, wiesen einen Aviditätsindex von > 35 % auf. Wenn Proben mit intermediären Aviditätswerten ausgeschlossen sowie die Proben aus dem Zeitraum von 100 bis 365 Tagen nach Krankheitsbeginn als nicht primäre Infektionen bewertet wurden, errechnete sich folgende Sensitivität und Spezifität:

Sensitivität, basierend auf einem Cut-off von 20 %:

$$\frac{57}{57} = 100 \%$$

Spezifität, basierend auf einem Cut-off von 35 %:

$$\frac{17 + 109}{2 + 17 + 109} = 98,4 \%$$

Insgesamt 50 (21,3 %) aller Proben konnten nicht zugeordnet werden, da sie intermediäre Ergebnisse lieferten, einschließlich 29,6 % der Proben, deren Entnahme innerhalb der ersten 100 Tage nach Krankheitsbeginn datierte.

3.2 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Berechnung des Aviditätsindex

3.2.1 Aviditätsindex aus Titern mit Einpunkt-Quantifizierung (alpha-Methode)

Da für EBV-Aviditätsbestimmungen gezeigt wurde, dass Aviditätsindices, die mittels der Einpunkt-Quantifizierungsmethode bestimmt worden waren, bessere Ergebnisse lieferten als auf der Basis von Extinktionswerten berechnete (Weissbrich 1998), wurden die Aviditätsindices für 221 Proben auch mit Hilfe von CMV-IgG-Einpunkt-Quantifizierungs-Titern anstelle von Extinktionswerten ermittelt (Abbildung 5).

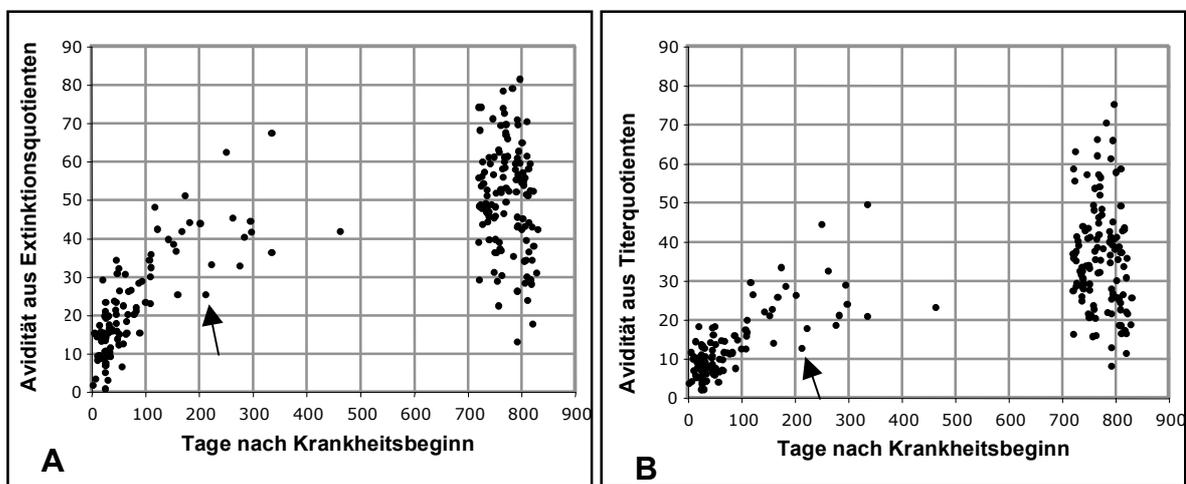


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der Aviditätswerte, ermittelt durch Extinktionsquotienten (A) und Titerquotienten (B). Der Pfeil markiert jeweils beide Ergebnisse einer Probe für die verschiedenen Auswertungsmethoden.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die mit Hilfe der CMV-IgG-Titer ermittelten Aviditätsindices im Gesamten auf einem niedrigeren Niveau lagen als die Aviditätswerte auf der Basis von Extinktionswerten. Bei der mit einem Pfeil markierten Probe handelt es sich z. B. um ein Serum, das 213 Tage nach Symptombeginn entnommen wurde. Hierfür ergab sich ein Aviditätswert von 12,7 % mit der Titermethode bzw. ein Wert von 25,6 % mit der Extinktionsmethode. Diese Werte legen nahe, dass für die auf der Basis von Titerquotienten ermittelten Werte andere Maßstäbe zum Nachweis bzw. Ausschluss einer akuten Infektion angelegt werden müssen. Nach oben aufgestellten Kriterien würde das Ergebnis in den Bereich der niedrig aviden Ergebnisse fallen und so eine frische Infektion nahe legen. Für diese Werte wurde deshalb ebenso eine ROC-Analyse durchgeführt (Abbildung 6).

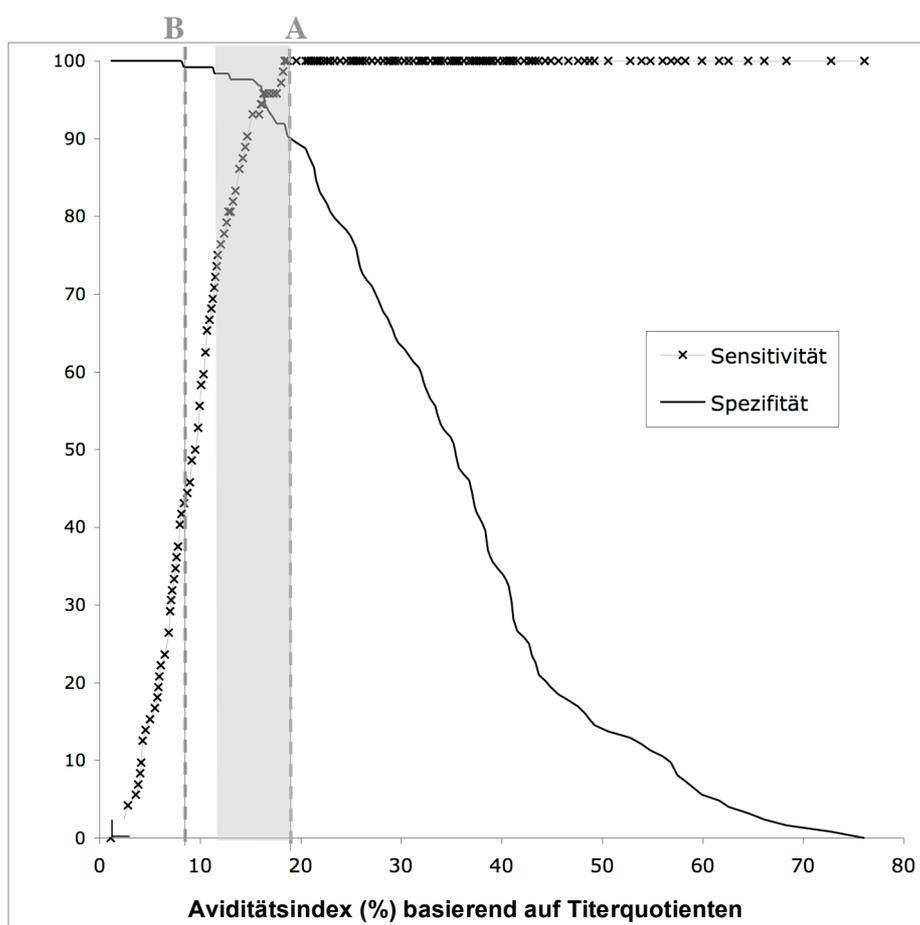


Abbildung 6: Receiver-Operator-Kurvenanalyse für CMV-IgG-Aviditätsberechnungen auf der Basis von CMV-IgG-Titer-Quotienten. Die Linien A und B kennzeichnen die Cut-off-Werte, mit denen eine 100 %ige Sensitivität bzw. Spezifität erreicht wurde. Die schattierte Fläche kennzeichnet den neu definierten Grenzbereich für intermediäre Aviditätswerte.

Eine Sensitivität von 100 % ergab sich bei einem Cut-off von 18,3 %. Die Spezifität lag hierbei jedoch nur bei 92 % (Linie A). Bei einem Cut-off von 8,2 % wurde eine Spezifität von 100 % erreicht, jedoch ergab sich hierbei eine Sensitivität von nur 42 % (Linie B). Mit der Einführung eines Grenzbereiches für intermediäre Ergebnisse zwischen 12 und 19 % ergaben sich für die mittels Alpha-Methode errechneten Ergebnisse eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98,5 %. 16,3 % der Proben fielen dann in den Grenzbereich und konnten nicht zugeordnet werden.

Tage nach Krankheitsbeginn	n	Avidität ≤ 12 % (niedrig)	12 % < Avidität < 19 % (intermediär)	Avidität ≥ 19 % (hoch)
0 bis 100	72	55 (76,4 %)	17 (23,6 %)	0
100 bis 365	25	0	8 (32,0 %)	17 (68,0 %)
> 365	124	2 (1,6 %)	11 (8,9 %)	111 (89,5 %)

36 (16,3 %)

Tabelle 4: Verteilung der Seren, wenn die Avidität auf der Basis von Titern zugrunde gelegt wurde. Graphisch hervorgehoben ist der Bereich intermediärer Avidität.

Sensitivität, basierend auf einem Cut-off von 12 %:

$$\frac{55}{55} = 100 \%$$

Spezifität, basierend auf einem Cut-off von 19 %:

$$\frac{17 + 111}{2 + 17 + 111} = 98,5 \%$$

3.2.2 Aviditätsindex auf der Basis eines virtuellen Extinktionsquotienten

Wie bereits in früheren Untersuchungen gezeigt wurde (Kneitz, Schubert et al. 2004; Dangel, Bader et al. 2006), werden die mittels der Einpunkt-Methode ermittelten Aviditätswerte von der Menge der in der Probe enthaltenen CMV-IgG-Antikörper beeinflusst. Diese Tatsache kann durch die Verwendung von Endpunkt-Verdünnungstechniken (Hedman, Lappalainen et al. 1989) umgangen werden oder durch Einsatz eines normalisierten Extinktionsquotienten. In einer initialen Untersuchung wurde letztere Methode, welche den Einsatz von zusätzlichen Verdünnungen erfordert, für eine ausgewählte Zahl von Proben ($n = 23$ für Gruppe 1 und $n = 17$ für Gruppe 2) durchgeführt.

Hierfür wurden die Seren in zwei zusätzlichen Verdünnungen getestet und die Ergebnisse in einem Koordinatensystem graphisch aufgetragen.

Folgende Abbildungen zeigen die Vorgehensweise stellvertretend für 2 Seren der Gruppen 1 und 2.

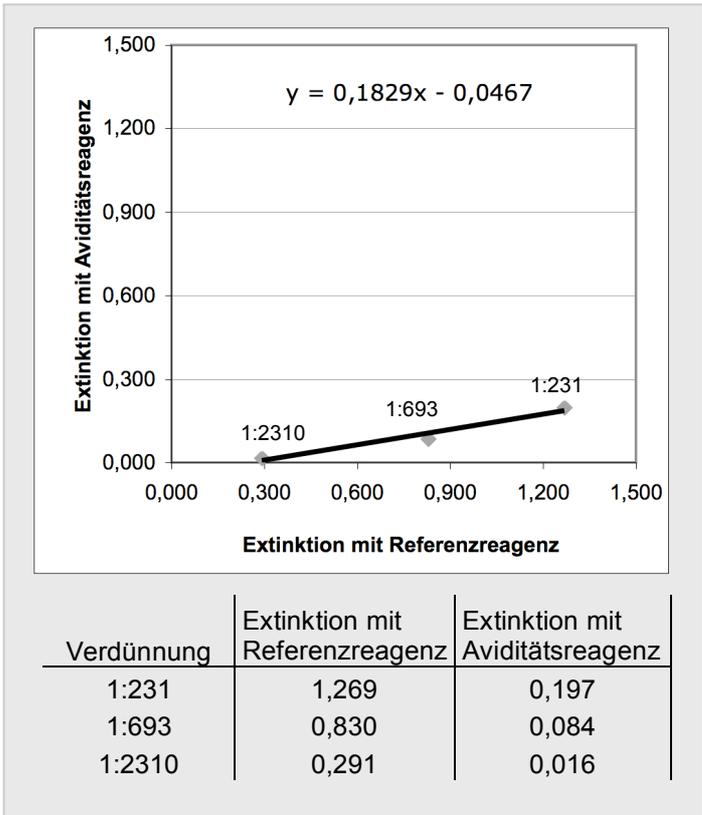


Abbildung 7: Patient 28, Probe entnommen 25 Tage nach Krankheitsbeginn. Die Punkte stellen die Extinktionswerte der Proben mit Referenzreagenz ohne Harnstoff und mit Aviditätsreagenz für Verdünnungen von 1:231 bis 1:2310 dar. Wegen der verminderten Extinktionswerte nach Denaturierung ist die Steigung der Verbindungslinie gering. Aus der Geradengleichung ergab sich somit die Avidität $0,1829 - 0,0467 = 0,139$ (für $x = 1$).

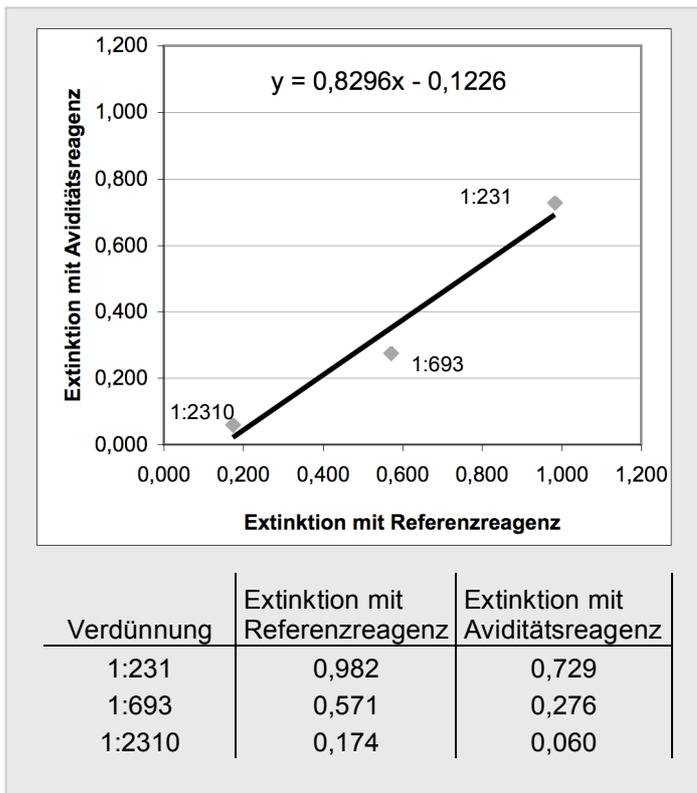


Abbildung 8: Blutspender, Probe entnommen mindestens 2 Jahre nach Primärinfektion. Die Punkte stellen die Extinktionswerte der Proben mit Referenzreagenz ohne Harnstoff und mit Aviditätsreagenz für Verdünnungen von 1:231 bis 1:2310 dar. Die im Vergleich zur Abb. 7 höhere Steigung der Verbindungslinie visualisiert die geringe Änderung der Extinktion nach Denaturierung durch das Aviditätsreagenz bei einer lange zurückliegenden Infektion. Die Avidität errechnete sich demnach aus der Geradengleichung $0,8296 - 0,1226 = 0,707$ (für $x = 1$).

Für alle 23 Proben wurden mit Hilfe der normalisierten Extinktionsquotienten die Aviditätswerte errechnet. Für einen visuellen Vergleich dieser Ergebnisse mit den durch Einpunkt-Extinktionsquotienten ermittelten Werten wurden beide in einem Koordinatensystem dargestellt.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist, ergab sich insgesamt eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der Einpunkt-Extinktions-Quotienten und der normalisierten virtuellen Extinktions-Quotienten.

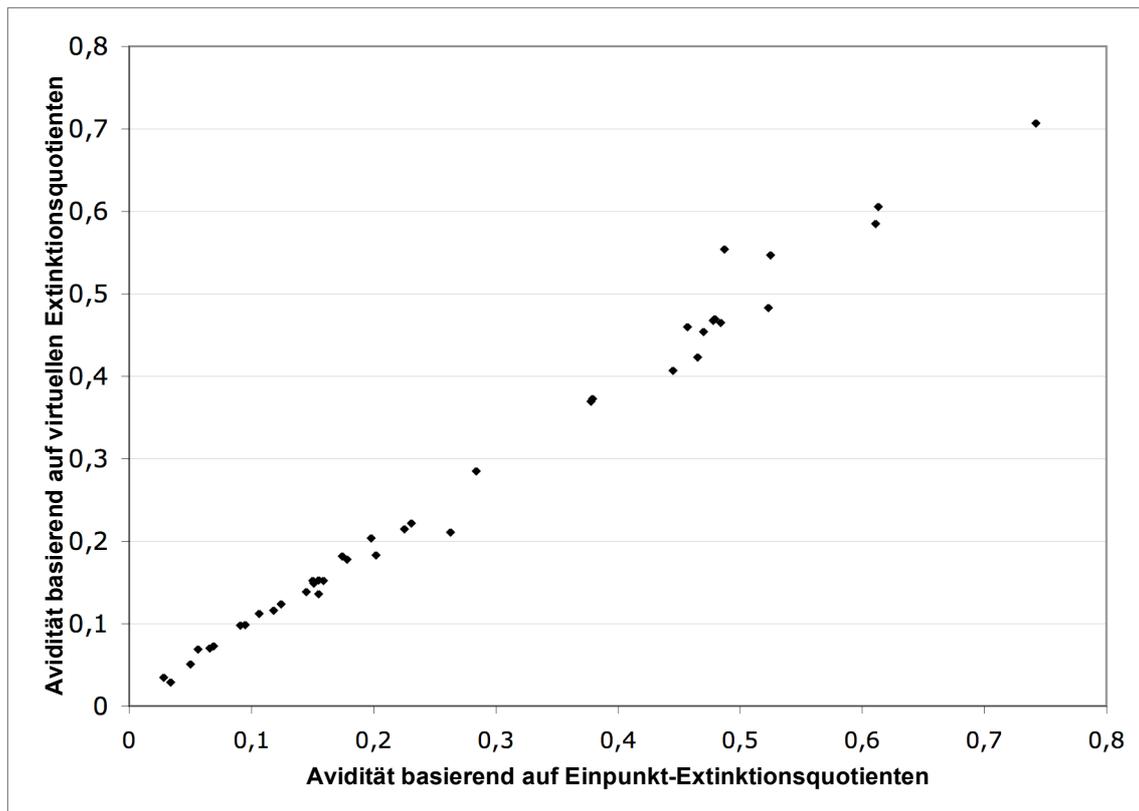


Abbildung 9: Korrelation zwischen Aviditätswerten basierend auf Einpunkt-Extinktionsquotienten und normalisierten virtuellen Extinktionsquotienten

Die übrigen Proben wurden nicht mit dieser Methode untersucht, da aufgrund der hohen Übereinstimmung kein Vorteil gegenüber den mit der Einpunktmethode ermittelten Werten zu erwarten war.

3.3 CMV-IgM-Antikörper-Bestimmung

Um den klinischen Nutzen des Enzygnost Anti-CMV/IgM-Tests in Kombination mit der CMV-IgG Avidität zu untersuchen, wurden 229 der 235 Studienproben ebenso auf CMV-IgM getestet. Für sechs Proben war kein ausreichendes Material für die Testung mehr verfügbar. Die Ergebnisse wurden in Abhängigkeit von der Zeit nach Krankheitsbeginn graphisch dargestellt. Der vom Hersteller vorgegebene Bereich für grenzwertige IgM-Ergebnisse von 0,100 bis 0,200 wurde berücksichtigt (Abbildung 10).

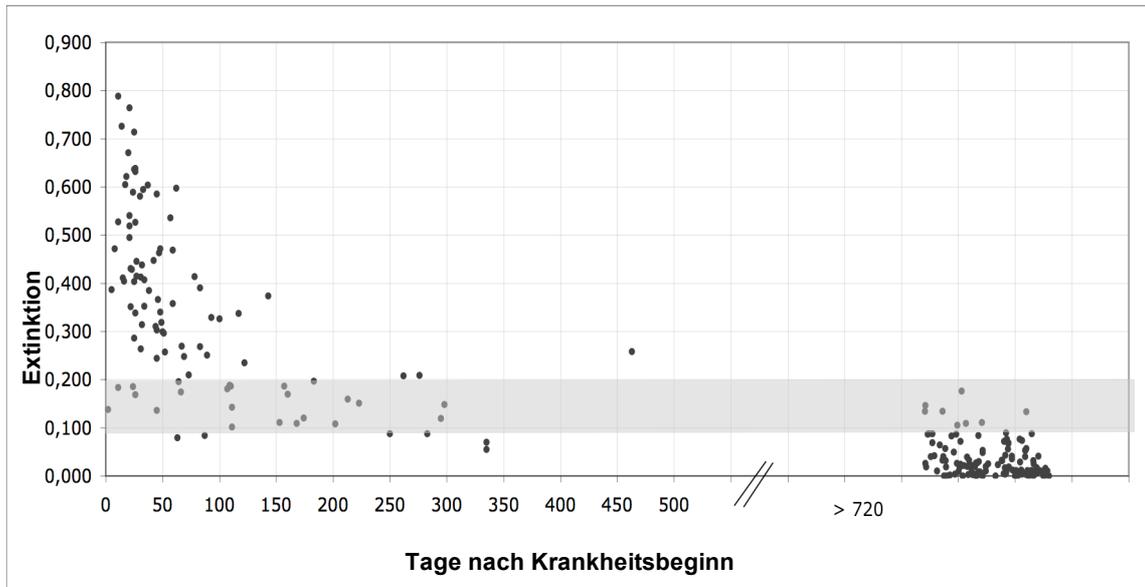


Abbildung 10: CMV-IgM-Antikörper-Antwort auf eine CMV-Primärinfektion. Der vom Hersteller angegebene Grenzbereich ist schattiert.

Von den 73 Proben, die während der ersten 100 Krankheitstage entnommen wurden, waren 64 (87,7 %) positiv für CMV-IgM, zwei (2,7 %) negativ und sieben (9,6 %) zeigten grenzwertige Ergebnisse. 100 Tage bis 1 Jahr nach Primärinfektion ergaben sich positive IgM-Ergebnisse bei fünf (20 %) und grenzwertige Ergebnisse bei 16 (64 %) der 25 Proben. Dabei war eine Verlaufsprobe, die 453 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen wurde, immer noch CMV-IgM positiv. Sieben andere Verlaufsprouben, deren Entnahme länger als 1 Jahr nach Krankheitsbeginn datierte, waren CMV-IgM negativ. Keine der 120 Blutspenderproben war CMV-IgM positiv und acht (6,7 %) zeigten grenzwertige IgM-Ergebnisse. Neun der Gesamtstudienproben zeigten eine starke Reaktion mit dem Kontrollantigen-Napf des Testsystems (Extinktion $> 0,300$), ein CMV-IgM-Ergebnis konnte deshalb nicht ermittelt werden. Acht dieser Proben wurden innerhalb der ersten 100 Tage, eine Probe 2587 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen.

4 Diskussion

CMV-Aviditätsassays haben sich als hilfreiches diagnostisches Mittel zur Unterscheidung einer Primärinfektion von einer lange zurückliegenden Infektion bewährt. Gegenstand dieser Arbeit war die Bewertung der Leistungsfähigkeit des kommerziellen Aviditätstests „Enzygnost Anti-CMV/IgG ELISA in Kombination mit dem neuen LTA-Aviditätsreagenz“ durch Untersuchung der Avidität von klinisch gut charakterisierten Proben.

Zu Beginn einer akuten Infektion werden Antikörper niedriger Avidität produziert. Im Verlauf mehrerer Wochen kommt es zu einer Reifung der Immunantwort und in der Folge können hoch avide Antikörper nachgewiesen werden (Wolter, Gassmann et al. 1997). Zwei Hauptaspekte erklären die Variabilität der Antikörperreifung und ihrer Bestimmung mit Aviditätsassays. Erstens ist die Antikörperreifung interindividuell unterschiedlich. Zweitens sind die Ergebnisse der Aviditätsmessung in großem Ausmaß vom verwendeten Test abhängig. Die Aviditätsindices sind beispielsweise vom Typ des Immunoassays, der Antigenaufbereitung, dem denaturierenden Agens und seiner Konzentration, den Denaturierungsbedingungen und der Berechnungsmethode abhängig (Thomas and Morgan-Capner 1991; Hedman, Lappalainen et al. 1993; Polanec, Seppälä et al. 1994; Weissbrich 1998). Aus diesem Grund sind Aviditätsassays unzureichend standardisiert und neue Assays sollten genauestens anhand von vorcharakterisierten Serumproben evaluiert werden, um so den testspezifischen Zeitrahmen für die Reifung von niedrig zu hoch aviden Antikörpern festzulegen. Die Sensitivität und Spezifität zum Nachweis bzw. Ausschluss einer Primärinfektion innerhalb dieses Zeitrahmens sind wichtige Parameter eines Tests, besonders im Hinblick auf Infektionen in der Schwangerschaft.

Der Enzygnost Anti-CMV/IgG EIA wurde in Kombination mit verschiedenen denaturierenden Reagenzien sowohl für In-house als auch für kommerzielle CMV-IgG-Aviditätsassays eingesetzt (Ruellan-Eugene, Barjot et al. 1996; Grangeot-Keros, Mayaux et al. 1997; Bodeus, Feyder et al. 1998; Eggers, Bader et al. 2000). Für die kommerzielle Ausführung wurde initial das Dade Behring Aviditäts-Reagenz verwendet, welches jedoch nicht länger verfügbar ist. Der Ersatz durch das LTA-Aviditätsreagenz in identischer Zusammensetzung war Anlass für eine Reevaluation der

klinischen Eigenschaften dieses Tests. Für das Dade Behring Aviditätsreagenz war ein Cut-off-Wert von 40 % für die Unterscheidung niedriger und hoher Avidität empfohlen worden. Legt man diesen der Auswertung zugrunde, werden alle Proben, die von Patienten in den ersten 100 Krankheitstagen entnommen wurden, als niedrig avid klassifiziert, entsprechend einer Sensitivität von 100 %. Allerdings kann mit diesem Cut-off nur bei 94 von 124 Proben, deren Entnahmedatum länger als ein Jahr zurücklag infolge hoher Avidität eine akute Infektion ausgeschlossen werden. Demzufolge war die Spezifität auf der Basis eines Cut-off-Wertes von 40 % nur 75,8 %. Um eine frische Infektion zu einem höheren Prozentsatz auszuschließen und eine höhere Spezifität zu erreichen, ist demnach ein niedrigerer Grenzwert nötig, was jedoch zu Lasten der Sensitivität ginge. Um die Spezifität des Assays zu optimieren, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Aus der ROC-Kurve ist ersichtlich, dass eine 100 %ige Spezifität bei einem Cut-off von 12,8 % erreicht wird, allerdings zum Preis einer mangelhaften Sensitivität von 29,2 %. Um sowohl eine gute Sensitivität als auch Spezifität zu erreichen, wurde ein intermediärer Bereich von 20-35 % eingeführt. Keine Probe der Patientengruppe mit Primärinfektionen zeigte einen Aviditätsindex über 35 % und nur bei zwei Proben der Gruppe mit lange zurückliegenden Infektionen wurde eine Avidität unter 20 % gemessen. Schließt man die Proben des neu definierten Grenzbereichs aus der Bewertung aus, errechnet sich eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98,4 %. Es fallen jedoch 21,3 % aller Aviditätsindices der Patientenproben in die intermediäre Zone und könnten deshalb nicht als primäre oder nicht-primäre CMV-Infektion erkannt werden. Somit lag die Ausschlussfähigkeit (d.h. die Fähigkeit, eine frische Infektion innerhalb der letzten 100 Tage auszuschließen) mit einem Cut-off von 35 % bei 81,8 %. Ähnliche Ergebnisse erzielten Bodeus et al. in einer Vergleichsstudie mit drei CMV-IgG-Aviditäts-Assays, einschließlich des Enzygnost Anti-CMV/IgG Testkits in Kombination mit dem Dade Behring Aviditätsreagenz (Bodeus, Beulne et al. 2001). Bei Verwendung des vormals empfohlenen Cut-off-Wertes von 40 % ohne einen intermediären Bereich wurden eine Sensitivität von 97,9 % und eine Spezifität von 30,4 % erzielt, ein Grenzbereich wurde hierbei nicht berücksichtigt. Die von dieser Arbeitsgruppe durchgeführte ROC-Analyse zeigte jedoch schon, dass die Eigenschaften des Assays möglicherweise durch die Einführung eines Intermediärbereichs verbessert werden könnten.

Vergleichbar mit der Beobachtung, die für einen In-house EBV-Aviditätstest unter Verwendung des Enzygnost EBV Anti-IgG Testkit gemacht wurde (Weissbrich, 1998), besserte sich die Trennung von Proben niedriger und hoher Avidität geringfügig, wenn anstelle von Extinktionswerten Titer für die Berechnung des Aviditätsindex verwendet wurden. Das Gesamtniveau der Aviditätswerte, welches auf der Basis von Einpunkt-Quantifizierungs-Titern erreicht wurde, war niedriger und eine „Grauzone“ von 12 bis 19 % wurde definiert. Während die mit Hilfe der Einpunkt-Quantifizierungs-Titer erzielte Sensitivität (100 %) und Spezifität (98,5 %) vergleichbar war zu denen auf der Basis der Extinktion gewonnenen Ergebnisse, war die Anzahl der Proben, die in den Bereich nicht zuzuordnender Ergebnisse fielen, mit der Titermethode etwas geringer (16,3 %). Wegen der komfortableren Berechnung sowie des nur unwesentlichen Vorteils durch weniger Grauzonen-Proben wurde die Kalkulation der Aviditätsindices auf der Basis von Extinktionswerten beibehalten.

Als Verbesserung im Vergleich zum „Vorgänger“-Test wurde der Extinktions-Grenzwert für eine Testwiederholung in höherer Verdünnung bei der Abarbeitung der Proben ohne denaturierendes Agens beim neuen Enzygnost Anti-CMV/IgG von 2,500 auf 2,000 gesenkt. Diese Änderung zielte darauf ab, falsch hohe Aviditätsindices durch Proben mit hochtitrigem CMV-IgG, deren Extinktionswerte in der Sättigungszone des Tests zu finden sind, zu vermeiden. Als zusätzliches Bewertungskriterium für die Beständigkeit der Ergebnisse der Einpunkt-Quotientenmethode, wurde der Aviditätsindex auf der Basis des virtuellen Extinktionsverhältnisses für einen Teil der Proben bestimmt (Kneitz, Schubert et al. 2004). Zwischen beiden Methoden konnte eine hohe Korrelation beobachtet werden. Das normalisierte virtuelle Extinktionsverhältnis hängt definitionsgemäß nicht von der Probenverdünnung ab. Die hohe Korrelation dieser Methode mit der Einpunkt-Quantifizierungsmethode legt nahe, dass letztere ebenso weitestgehend unabhängig von der Probenverdünnung ist.

Ein Nachteil der Anwendung des Enzygnost Anti-CMV/IgG mit dem LTA-Aviditätsreagenz für die Bestimmung der CMV-IgG-Avidität ist die erhebliche Zahl der Proben, deren Aviditätsindices in den Bereich der nicht zuzuordnenden Ergebnisse fallen. In der Studie von Bodeus und Kollegen konnte gezeigt werden, dass eine schmalere Grauzone durch die Verwendung einer 8 Molaren Harnstofflösung als denaturierendes Reagenz erreicht werden kann, ohne dabei Abstriche hinsichtlich der

Sensitivität und Spezifität zu machen (Bodeus, Beulne et al. 2001). Bei Verwendung eines Cut-offs von 65 % ergaben sich eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 96,2 % für den Nachweis bzw. den Ausschluss einer Primärinfektion in den letzten drei Monaten. Hoch molare Harnstofflösungen sind allerdings im Hinblick auf eine Automatisierung weniger anwenderfreundlich als die wässrigere Hydrogen-Peroxid-Lösung des LTA-Aviditätsreagenz. Andere Möglichkeiten, die zu einer Reduzierung der nicht zuordenbaren Ergebnisse führen könnten, beinhalten die Konzentration und die Inkubationszeit der Aviditätsreagenzien. Eine Modifizierung der Antigen-Zusammensetzung könnte zu einer Änderung der Eigenschaften des Aviditätstests führen und ist ebenso in Betracht zu ziehen. In diesem Zusammenhang wäre eine Option, das polyvalente Antigengemisch durch rekombinante Einzelantigene zu ersetzen. Für *Toxoplasma spezies* und Rötelnvirus konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich gerade in frühen Stadien der Infektion signifikante Unterschiede in der Avidität der Einzelantigene ergeben können (Marcolino, Silva et al. 2000; Nedeljkovic, Jovanovic et al. 2001). Der Nutzen dieses Ansatzes für die CMV-Diagnostik muss jedoch experimentell bewertet werden und kann nicht vorhergesagt werden.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Antikörperavidität erfolgte von den Studienproben ein CMV-IgM-Antikörpernachweis mittels des Enzygnost Anti-CMV/IgM-Testkit. Der Studienaufbau schließt eine Bewertung der Sensitivität dieses CMV-IgM-EIA aus, da die Patienten mit akuter oder kürzlicher CMV-Infektion teilweise auf der Basis der Ergebnisse dieses Testsystems für die Studie ausgewählt wurden. Dennoch veranschaulichen die gewonnenen Ergebnisse wichtige Aspekte der CMV-IgM-Serologie und beleuchten die Probleme, die mit einer kurz- oder langdauernden IgM-Antikörperantwort verbunden sind. Einerseits zeigten zwei Proben von Patienten mit kürzlicher CMV-Infektion, welche 63 und 87 Tage nach Krankheitsbeginn entnommen worden waren, ein negatives Ergebnis für IgM-Antikörper. Andererseits ergaben sich für Verlaufsproben von Patienten mit CMV-Primärinfektion bis zu 463 Tagen nach Krankheitsbeginn positive IgM-Ergebnisse. Darüber hinaus wurden grenzwertige CMV-IgM-Antikörpertiter in 64 % der Verlaufsproben, deren Entnahme zwischen 100 Tagen und einem Jahr nach Krankheitsbeginn datierte, nachgewiesen. Die Spezifität des Enzygnost Anti-CMV/IgM Tests war hervorragend, da bei den lange

zurückliegenden Infektionen in der Blutspendergruppe kein positives IgM beobachtet wurde. 4,4 % der Proben dieses Kollektivs zeigten jedoch grenzwertige CMV-IgM-Werte, was eine weitere diagnostische Abklärung erforderlich machen könnte. Die bei diesen Proben ermittelten Aviditätsindices variierten von 29 bis 63 %.

Um eine akute oder kürzliche CMV-Primärinfektion zu einem hohen Prozentsatz nachzuweisen oder auszuschließen, halten wir folgendes Vorgehen für geeignet: Es ist zunächst die konventionelle CMV-IgG-/IgM-Serologie durchzuführen. Hierbei können sich folgende Konstellationen ergeben:

- Negativer Nachweis für CMV-IgG- und IgM-Antikörper.
Ein Ausschluss einer akuten Infektion ist nicht möglich, da es sich um ein ganz frisches Krankheitsstadium kurz vor dem Einsetzen der Antikörperbildung handeln kann. Die Untersuchung einer Verlaufsprobe im Abstand von ein bis zwei Wochen ist empfehlenswert.
- Negativer Nachweis für CMV-IgG-Antikörper bei positivem CMV-IgM.
Vermutlich handelt es sich hierbei um eine frische Infektion. Zum Nachweis einer Serokonversion bei IgG sollte eine kurzfristige Kontrolluntersuchung erfolgen.
- Positive CMV-IgG-Antikörper bei negativem IgM-Nachweis.
Bei dieser Konstellation kann in seltenen Fällen eine weitere diagnostische Abklärung mittels Aviditätstestung sinnvoll sein, um nicht eine akute Infektion bei fehlendem oder bereits unter die Nachweisgrenze gesunkenen CMV-IgM zu übersehen.
- Positiver CMV-IgG- und IgM-Antikörper-Nachweis.
Bei dieser serologischen Konstellation ist die IgG-Antikörper-Aviditätsbestimmung sehr von Nutzen, da persistierende IgM-Antworten, polyklonale IgM-Stimulation oder nicht spezifische IgM-Testergebnisse eine akute CMV-Infektion vortäuschen können.
Die Einordnung der mit Hilfe des Enzygnost Anti-CMV/IgG-Tests und des LTA-Aviditätsreagenz gewonnenen Ergebnisse nach dem in Abbildung 11 gezeigten Schema hat sich für unser Probenkollektiv als sinnvoll gezeigt.

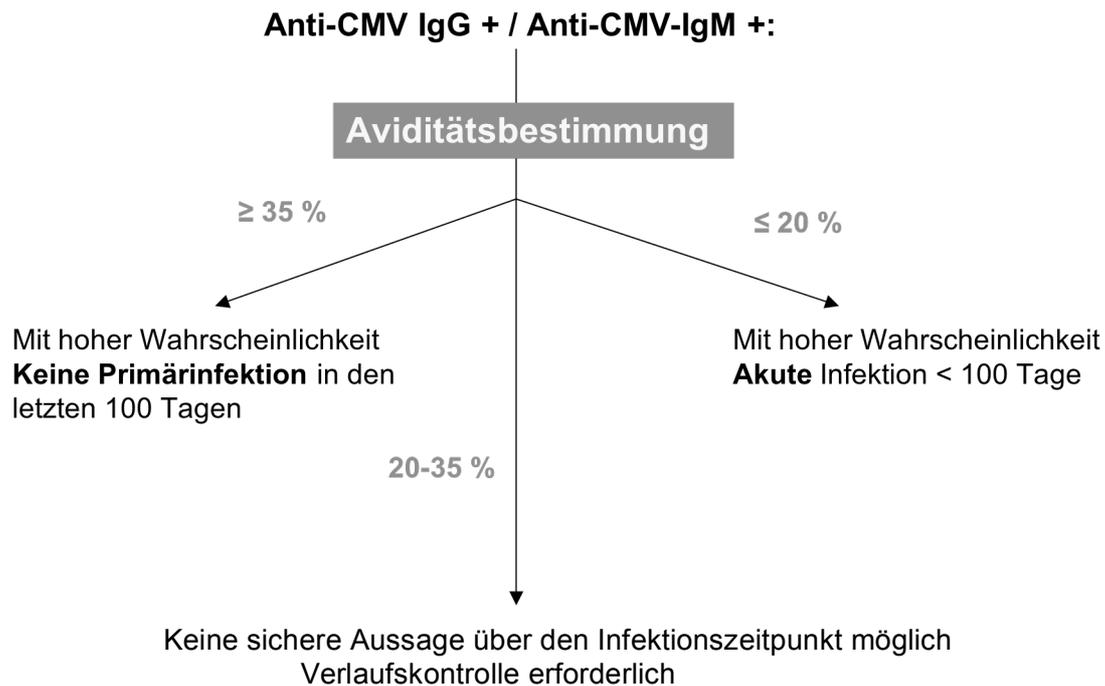


Abbildung 11: Algorithmus für die Einordnung von Proben mit positivem CMV-IgG und positivem CMV-IgM

Beträgt die Avidität mindestens 35 %, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um eine frische CMV-Infektion der letzten 100 Tage. Bei einem Aviditätswert von 20 % und darunter ist von einer akuten CMV-Infektion auszugehen. Eventuell können eine Verlaufskontrolle im Abstand von einigen Tagen sowie zusätzliche diagnostische Verfahren wie z. B. CMV-Immunoblots oder Neutralisationsteste sinnvoll sein. In jedem Falle sollten auch ausführliche anamnestische und klinische Daten durch den behandelnden Arzt erhoben werden. Ist eine Primärinfektion in der Schwangerschaft anzunehmen, kann invasive pränatale Diagnostik notwendig werden (Revello et al., 2004). Liegt der ermittelte Aviditätsindex zwischen 20 und 30 %, ist keine sichere Auskunft über den Infektionsstatus möglich und es muss anhand des Antikörperverlaufs und anhand zusätzlicher diagnostischer Methoden eine Eingrenzung versucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aviditätsbestimmung mit der Kombination Enzygnost Anti-CMV/IgG und LTA-Aviditätsreagenz sich zur Unterscheidung einer Primär- von einer Nicht-Primärinfektion eignet. Bei unserem Probenkollektiv schließt

ein Aviditätsindex von $> 35\%$ eine primäre CMV-Infektion innerhalb der letzten 100 Tage aus, wohingegen ein Aviditätsindex von $< 20\%$ diese nahezu bestätigt. Für etwa ein Fünftel aller getesteten Proben lässt sich wegen der intermediären Avidität keine zusätzliche Aussage über den Infektionszeitpunkt gewinnen.

5 Zusammenfassung

Für viele klinische Fragestellungen, insbesondere in der Schwangerschaft, ist es wichtig, zwischen einer frischen Primärinfektion und einer lange zurückliegenden oder einer reaktivierten Infektion mit dem Cytomegalievirus (CMV) zu unterscheiden.

In Ergänzung zur IgM-Bestimmung kann dazu auch die Aviditätsbestimmung von IgG-Antikörpern verwendet werden. Eine Primärinfektion ist durch einen niedrigen Aviditätsindex (AI) und eine lange zurückliegende Infektion durch einen hohen AI charakterisiert.

Ziel der Studie war die Evaluierung des LTA-Aviditätsreagenz in Kombination mit Enzygnost Anti-CMV/IgG. Dazu wurde die CMV-IgG-Avidität von klinisch gut charakterisierten Serumproben bestimmt. Zusätzlich wurden aus diesen Proben auch CMV-IgM-Antikörper mittels Enzygnost Anti-CMV/IgM untersucht.

Folgende Proben wurden getestet:

- 115 Serumproben von 37 immunkompetenten Erwachsenen mit gesicherter CMV-Primärinfektion und bekanntem Krankheitsbeginn
- 120 Seren von gesunden Blutspendern, welche mindestens zwei Jahre vorher bereits als CMV-Antikörper positiv getestet wurden.

Die CMV-IgG-Aviditätsbestimmung mit Enzygnost Anti-CMV/IgG und dem LTA-Aviditätsreagenz sowie die CMV-IgM-Bestimmung mit Enzygnost Anti-CMV/IgM wurden gemäß Herstelleranleitung durchgeführt. Die Abarbeitung erfolgte durch den Behring ELISA-Prozessor (BEP) III. Als Cut-off für die CMV-IgG-Aviditätsberechnung wurde der Extinktionswert 0,200 beim Ansatz ohne Behandlung mit Aviditätsreagenz verwendet. Die Ergebnisse des Aviditätsindex wurden in die Kategorien niedrig avid (< 20 %), intermediär (20 – 35 %) und hoch avid (> 35 %) eingeteilt.

70,4 % der Proben von Patienten mit einer Primärinfektion im Zeitraum von <100 Tagen nach Krankheitsbeginn wurden durch den Test als niedrig avid erkannt. 84,5 % der Proben, die länger als 365 Tage nach Primärinfektion entnommen wurden, wiesen einen Aviditätsindex von > 35 % auf. Wenn Proben mit intermediären Aviditätswerten aus der Bewertung ausgeschlossen wurden, errechneten sich eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 98,4 %.

229 der 235 Proben wurden im Enzygnost Anti-CMV/IgM ELISA getestet. Dieser Test zeigte eine hervorragende Spezifität, da Proben aus dem Kollektiv der Blutspendergruppe mit lange zurückliegenden Infektionen keine positiven IgM-Ergebnisse aufwiesen. 6,7 % der Proben dieses Kollektivs zeigten jedoch grenzwertige CMV-IgM-Werte. Eine Verlaufsprobe aus dem Patientenkollektiv war nach 300 Tagen noch IgM positiv. Die Avidität dieser Probe war jedoch hoch.

Der Enzygnost Anti-CMV/IgG-Test in Kombination mit dem LTA-Aviditätsreagenz eignet sich zur genaueren Eingrenzung des Zeitpunktes einer CMV-Primärinfektion. Im getesteten Probenkollektiv schließt eine Avidität von $> 35\%$ eine akute Primärinfektion (Krankheitsbeginn < 100 Tage) zu 100 % aus. Die Avidität von ca. 20 % aller getesteten Proben lag im intermediären Aviditätsbereich. Für diese Proben ermöglicht die Aviditätsbestimmung keine zusätzliche Aussage über den Infektionszeitpunkt.

6 Literaturverzeichnis

Andersson, A., V. Vetter, et al. (1994). "Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology." J Med Virol 43: 238-44.

Andrews, J. I. (2004). "Diagnosis of fetal infections." Curr Opin Obstet Gynecol 16: 163-6.

Baccard-Longere, M., F. Freymuth, et al. (2001). "Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of cytomegalovirus immunoglobulin G avidity." Clin Diagn Lab Immunol 8: 429-31.

Bauer, G. (1996). "IgM: Ein variabler und mehrdeutiger diagnostischer Marker." Der Mikrobiologe 6: 44-51.

Blackburn, N. K., T. G. Besselaar, et al. (1991). "Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity." J Med Virol 33: 6-9.

Bodeus, M., D. Beulne, et al. (2001). "Ability of three IgG-avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20: 248-52.

Bodeus, M., S. Feyder, et al. (1998). "Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women." Clin Diagn Virol 9: 9-16.

Dangel, V., U. Bader, et al. (2006). "Improvement of cytomegalovirus avidity testing by adjusting the concentration of CMV-specific IgG in test samples." J Clin Virol 35: 303-9.

Eddleston, M., S. Peacock, et al. (1997). "Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients." Clin Infect Dis 24: 52-6.

Eggers, M., U. Bader, et al. (2000). "Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy." J Med Virol 60: 324-30.

Falke, D. (1996). Zytomegalie. Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. A. Grumbach and O. Bonin. Band II: 1348-1351.

Fowler, K. B., F. P. McCollister, et al. (1997). "Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection." J Pediatr 130: 624-30.

Grangeot-Keros, L., M. J. Mayaux, et al. (1997). "Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women." J Infect Dis 175: 944-6.

Griffiths, P. D. and V. C. Emery (2002). Cytomegalovirus. Clinical Virology. D. D. Richman, R. J. Whitley and F. G. Hayden. Washington DC, American Society for Microbiology: 433-461.

Hedman, K., M. Lappalainen, et al. (1989). "Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG." J Infect Dis 159: 736-40.

Hedman, K., M. Lappalainen, et al. (1993). "Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases." Rev Med Microbiol 4: 123-129.

Hedman, K. and S. A. Rousseau (1989). "Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella." J Med Virol 27: 288-92.

Hummel, M. and M. M. Abecassis (2002). "A model for reactivation of CMV from latency." J Clin Virol 25 Suppl 2: S123-36.

Kamoun, P. P. (1988). "Denaturation of globular proteins by urea: breakdown of hydrogen or hydrophobic bonds?" Trends Biochem Sci 13: 424-5.

Kangro, H. O., P. D. Griffiths, et al. (1982). "Specific IgM class antibody production following infection with cytomegalovirus." J Med Virol 10: 203-12.

Kneitz, R. H., J. Schubert, et al. (2004). "A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid." BMC Infect Dis 4: 33.

Landolfo, S., M. Gariglio, et al. (2003). "The human cytomegalovirus." Pharmacol Ther 98: 269-97.

Lazzarotto, T., P. Spezzacatena, et al. (1997). "Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects." Clin Diagn Lab Immunol 4: 469-73.

Lutz, E., K. N. Ward, et al. (1994). "Maturation of antibody avidity after primary human cytomegalovirus infection is delayed in immunosuppressed solid organ transplant patients." J Med Virol 44: 317-22.

Marcolino, P. T., D. A. Silva, et al. (2000). "Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting." Clin Diagn Lab Immunol 7: 384-9.

Miendje Deyi, Y., P. Goubau, et al. (2000). "False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19: 557-60.

Mocarski, E. S. and C. T. Courcelle (2001). Cytomegaloviruses and their replication. Fields Virology. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 2629-2673.

Nedeljkovic, J., T. Jovanovic, et al. (2001). "Maturation of IgG avidity to individual rubella virus structural proteins." J Clin Virol 22: 47-54.

Nielsen, S. L., I. Sorensen, et al. (1988). "Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay." J Clin Microbiol 26: 654-61.

- Pass, R. F. (2001). Cytomegalovirus. Fields Virology. D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin et al. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2: 2675-2705.
- Pass, R. F., P. D. Griffiths, et al. (1983). "Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections." J Infect Dis 147: 40-6.
- Polanec, J., I. Seppälä, et al. (1994). "Evaluation of protein-denaturing immunoassays for avidity of immunoglobulin G to rubella virus." J Clin Lab Anal 8: 16-21.
- Prince, H. E. and A. L. Leber (2002). "Validation of an in-house assay for cytomegalovirus immunoglobulin G (CMV IgG) avidity and relationship of avidity to CMV IgM levels." Clin Diagn Lab Immunol 9: 824-7.
- Reimer, K. and H. Meisel (1996). Humanes Zytomegalievirus. Virusdiagnostik. Diagnostische Bibliothek. T. Porstmann, Blackwell Wissenschaftsverlag. Band I: 258-278.
- Revello, M. G., G. Gorini, et al. (2004). "Clinical evaluation of a chemiluminescence immunoassay for determination of immunoglobulin g avidity to human cytomegalovirus." Clin Diagn Lab Immunol 11: 801-5.
- Ruellan-Eugene, G., P. Barjot, et al. (1996). "Evaluation of virological procedures to detect fetal human cytomegalovirus infection: avidity of IgG antibodies, virus detection in amniotic fluid and maternal serum." J Med Virol 50: 9-15.
- Stagno, S., R. F. Pass, et al. (1982). "Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection." N Engl J Med 306: 945-9.
- Steininger, C., M. Kundi, et al. (2004). "Antibody maturation and viremia after primary cytomegalovirus infection, in immunocompetent patients and kidney-transplant patients." J Infect Dis 190: 1908-12.
- Stephan, C., S. Wesseling, et al. (2003). "Comparison of eight computer programs for receiver-operating characteristic analysis." Clin Chem 49: 433-9.

Thomas, H. I. and P. Morgan-Capner (1991). "The Use of Antibody Avidity Measurements for the Diagnosis of Rubella." Reviews in Medical Virology 1: 41-50.

Weissbrich, B. (1998). "The use of semi-automated EBV IgG avidity determination for the diagnosis of infectious mononucleosis." J Med Virol 54: 145-53.

Williamson, W. D., G. J. Demmler, et al. (1992). "Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection." Pediatrics 90: 862-6.

Wolter, T., C. Gassmann, et al. (1997). "Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows improvement of the serodiagnosis of infections." Clin Lab 43: 125-135.

Danksagung

An dieser Stelle wird es Zeit, vielen Menschen meinen herzlichen Dank auszusprechen. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Diagnostik des Instituts für Virologie und Immunbiologie sei gedankt für die kollegiale Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Axel Rethwilm für die Vergabe des interessanten Themas sowie bei Herrn Professor Dr. Hartwig Klinker für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Herrn Dr. Benedikt Weissbrich gilt mein besonderer Dank für die intensive Betreuung, Geduld und motivierenden Worte, die entscheidend zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Sehr hilfreich waren die konstruktiven Beiträge von Herrn Dr. Jörg Schubert zur praktischen Durchführung und theoretischen Ausarbeitung der Studie.

Gleichfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Barbara Saam und Frau Carolin Dittmeier für die technische Hilfe und Unterstützung bei der Bedienung des BEP-III-Prozessors.

Herrn Dr. Helmut Peters von der Firma Dade Behring, Marburg, gilt mein Dank für die Bereitstellung der Testmaterialien sowie für die konstruktive Diskussion bei der Auswertung der Daten.

Zum Schluss sei von ganzem Herzen meiner Patentante gedankt, die mich auf meinem langen Weg der Ausbildung immer wieder motiviert und unterstützt hat und niemals müde wurde, mich in meiner beruflichen Entscheidung zu bekräftigen.