

Pamela Christel Allendorf
Dr. med.

Entwicklung und Evaluierung von zwei Assays zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern im Rahmen von Zytomegalievirus-Infektionen aus Trockenblutkarten Neugeborener

Geboren am 13. Juli 1979 in Fulda
Staatsexamen am 05. Dezember 2007 an der Universität Marburg

Promotionsfach: Labormedizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Ernst W. Rauterberg

Eine Infektion mit dem Humanen Zytomegalievirus ist die häufigste konnatale Infektion und gehört besonders zu der häufigsten nicht genetisch bedingten Ursache einer frühkindlichen Hörstörung.

Das frühzeitige Erkennen einer Infektion mit dem Zytomegalievirus ist besonders für Neugeborene von großer Bedeutung. Zum Zeitpunkt der Geburt sind im Falle einer Infektion mit dem HCMV 90% der Neugeborenen asymptomatisch, 5% der Neugeborenen weisen leichte, sich völlig zurückbildende Symptome wie Ikterus und Hepatosplenomegalie auf. Lediglich 5% der Kinder sind klinisch schwer auffällig und leiden an bleibenden Schäden wie intracerebralen Verkalkungen, Mikrocephalie, Chorioretinitis, geistiger sowie körperlicher Retardierung und Organmissbildungen.

Wenn auch bisher die Datenlage im Einzelnen noch ungenau ist, so zeichnet sich doch in mehreren Studien ein Zusammenhang der Entstehung einer frühkindlichen Hörstörung und dem Vorausgehen einer Infektion mit dem Zytomegalievirus ab. Dies kann einerseits bedingt sein durch eine Primärinfektion der Mutter und vertikalen Übertragung des Virus auf das Baby während der Schwangerschaft, oder einer vertikalen Übertragung des Virus unter der Geburt, andererseits aber auch mit einer horizontalen Übertragung durch infizierte Kinder untereinander oder engen Kontakt mit den Eltern in der frühen Kindheit. Besonders gefährdet ist das Ungeborene bei einer Primärinfektion der Mutter während des ersten Trimenon. Hierbei sind die Schäden des Virus durch das Einwirken auf die inneren Organe besonders ausgeprägt und können im schlimmsten Fall sogar zum Tod des Feten führen. Die Entstehung einer Hörstörung ist bei einer Infektion im ersten Trimenon besonders häufig anzutreffen.

Für die Infektion mit dem Zytomegalievirus existieren zwei Hauptaltersgruppen. Das Maximum der Durchseuchung einer Bevölkerung ist normalerweise im jungen Erwachsenenalter während der Pubertät erreicht, da es besonders in dieser Zeit durch die beginnende Sexualität zu einer horizontalen Übertragung des Virus kommt. Die zweite Altersgruppe stellt die Gruppe der Neugeborenen und Kleinkinder dar. Hier wird eine Infektion durch eine perinatale Infektion, über die Muttermilch oder durch engen Kontakt der Kinder untereinander oder mit den Eltern angenommen.

Auch eine zum Zeitpunkt der Geburt asymptomatische CMV-Infektion kann später zu Schädigungen führen. Primär klinisch gesunde Kinder können im Laufe der Zeit eine mentale und körperliche Retardierung, Knochenwachstumsstörungen und Hörschäden aufweisen. Da zum Zeitpunkt der Geburt jedoch nur ein geringer Teil der infizierten Kinder klinisch auffällig ist, kann es mitunter Jahre dauern, bis es zur Diagnosestellung einer frühkindlichen Hörstörung kommt. Die Entwicklung des Gehörs und der basalen Reifungsprozesse ist bis dahin abgeschlossen und die bereits erworbenen Sprach- und kognitiven Störungen können nur noch

gering beeinflusst werden, wodurch das Kind auch weiterhin eine eingeschränkte Entwicklung erfährt.

Bisher gibt es in Deutschland noch kein generelles Screening auf das Zytomegalievirus. In anderen Ländern – zum Beispiel einigen Regionen der USA – wird das Screening auf CMV schon seit längerer Zeit durchgeführt.

Besteht der Verdacht auf eine mögliche Hörstörung, so wird zunächst durch pädaudiologische Zentren das TORCH-Screening empfohlen. Hierbei wird das Blut auf Toxoplasmose, Röteln, Zytomegalie und Herpes-Simplex-Viren untersucht.

Die Früherkennung einer kongenitalen Infektion mit dem Humanen Zytomegalievirus im Rahmen des gängigen Stoffwechsel-Screenings in Verbindung mit BERA-Hörtests könnte die Frühbehandlung – etwa mit Ganciclovir oder Valganciclovir – ermöglichen und damit die Entwicklung von Hörstörungen vermindern oder sogar aufheben. Besonders die Früherkennung der HCMV-Infektion durch Anti-HCMV-Antikörper der Klasse M oder über eine PCR für CMV-DNA ist dabei von Interesse. Sollte es möglich sein, frühzeitig anti-CMV-Immunglobuline oder CMV-DNA nachzuweisen, so könnte in Verbindung mit audiologischen Kontrollen frühstmöglich eine antiretrovirale Therapie oder auch Anpassung einer Hörhilfe eingeleitet werden, die das Fortschreiten der Hörminderung verlangsamt oder auch aufhält.

In dieser Promotionsarbeit wurden nach einigen Vorarbeiten zwei Assays zum Nachweis von humanen IgM-anti-CMV- beziehungsweise IgG-anti-CMV-Antikörpern über zahlreiche Stufen entwickelt. Dazu sind Mikrotiterplatten mit gereinigtem, nicht-infektiösem CMV-Antigen beschichtet und nacheinander zuerst mit den Eluaten aus Neugeborenen-Trockenblutproben oder verdünnten Serumproben infizierter Blutspender und, nach intensivem Waschen, mit Alkalische Phosphatase-markierten Ziegen-anti-human-IgG-Antikörpern (zur Messung von Anti-CMV-IgG) beziehungsweise Alkalische Phosphatase-markierten Ziegen-anti-human-IgM-Antikörpern inkubiert worden. Bei dem ersten Schritt binden sich die in der zu untersuchenden Probe vorhandenen IgG- und IgM-Antikörper an das fixierte CMV-Antigen; in dem zweiten Schritt werden diese bindenden Antikörper durch die Ziegenantikörper und deren Enzymmarkierung messbar. In einem letzten Schritt wird jeweils das Substrat der Alkalischen Phosphatase hinzugefügt und schließlich das in einer festen Zeiteinheit entstehende Produkt photometrisch gemessen.

Als Positivkontrollen dienten bei der Evaluierung der beiden Assays CMV-positive Seren der Blutbank Giessen sowie Blutseren von Blutspendern vor und nach einer CMV-Serokonversion des Blutspendedienstes Hessen/Baden-Württemberg.

Als Negativkontrollen wurden unter anderem Seren der Labormitarbeiter eingesetzt, die weder CMV-DNA noch Anti-CMV-Antikörper positiv waren.

Die evaluierten Tests wurden schließlich an den Eluaten der Trockenblutproben von 1422 Neugeborenen eingesetzt. Hierbei waren alle Proben anonymisiert. Es zeigte sich, dass bei keinem der Proben ein eindeutiger Anti-CMV-IgM-Nachweis möglich war. Dies kann einerseits daran liegen, dass die Mehrzahl der Trockenblutproben zwischen der 36. und 72. Lebensstunde entnommen wurden, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Antikörperproduktion bei perinataler Infektion noch nicht ausgereift war; andererseits muss die in der Literatur benannte Inzidenz von 1:5.000 beachtet werden: möglicherweise war also die Zahl der untersuchten Proben zu klein.

Es wird geplant, bei allen hier untersuchten Proben zusätzlich eine CMV-DNA-Untersuchung mittels PCR und Hybridisierung durchzuführen. Dies ist aber nicht Thema der vorliegenden Studie. Hier wurde aber gezeigt, dass Anti-CMV-Antikörper – dies galt für solche der Klasse

IgG – im Trockenblut von Neugeborenen nachweisbar sind, das heißt, dass der IgG-Assay bei Trockenblut funktioniert. Da es sich hier aber in der Regel um diaplazentar übergebene mütterliche Antikörper handelt, kann dies eine CMV-Infektion des Kindes nicht nachweisen. Da aber der IgM-Antikörper-Test praktisch identisch aufgebaut ist, wie der IgG-Antikörper-Assay, und da er in Positivseren IgM-Anti-CMV-Antikörper zu entdecken in der Lage war, kann daraus geschlossen werden, dass es gelungen ist, einen IgM-Anti-CMV-Antikörperassay zu entwickeln, der auch mit Trockenblut funktioniert.

Es sind weitere Studien notwendig, um zu zeigen, wie sich beide Assays unter Massenanwendung bei Trockenblut von Neugeborenen bewähren.