

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Steinhoff

**Optimierung und Evaluation eines neuen Immunoblots im
Hinblick auf die Antigenauswahl und -konzentration unter
Verwendung vorklassifizierter Seren zur Diagnose einer
EBV-Infektion**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Ines Pfeil
aus Boizenburg

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jan Kramer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 28.9.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.9.2017

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Meiner Familie
und in Erinnerung an meinen Vater Herbert Schneider

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Das Epstein-Barr-Virus	1
1.2 Infektionszyklus des EBV	2
1.3 Epidemiologie.....	4
1.4 Krankheitsbilder.....	4
1.4.1 Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber).....	5
1.4.2 EBV-assoziierte Erkrankungen	5
1.4.2.1 Orale Haarleukoplakie.....	5
1.4.2.2 X-linked lymphoproliferatives Syndrom (XLP)	6
1.4.2.3 Burkitt-Lymphom (BL)	6
1.4.2.4 Nasopharynxkarzinom (NPC).....	6
1.4.2.5 Hodgkin Lymphom (HL)	7
1.5 Differentialdiagnosen.....	8
1.6 EBV-Diagnostik beim Immungesunden	9
1.6.1 Unspezifische heterophile Antikörper	9
1.6.2 Spezifische EBV-Antikörper	9
1.6.2.1 Eindeutige serologische Konstellationen	11
1.6.2.2 Atypische oder mehrdeutige serologische Konstellationen.....	11
1.6.2.3 EBV Line Immunoblot	13
1.7 Fragestellung.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Seren	17
2.1.2 Testkits	18
2.1.3 Geräte.....	18
2.1.4 Sonstige Materialien.....	19

2.2 Methoden	19
2.2.1 Probengewinnung und Datenerhebung	19
2.2.2 Klassifizierung der Seren	21
2.2.2.1 EBV-Seren	21
2.2.2.2 Einstufung des Materials in einen EBV-Serostatus nach Antikörperreaktionsmuster der Immunoblots.....	22
2.2.3 Prinzip des EBV Lineassay	26
2.2.4 Austestung der Seren mittels Immunoblot.....	26
2.2.5 Testvorbereitungen	27
2.2.6 EBV Line Immunoblot der Firma Virotech	28
2.2.6.1 Antigene des EBV IgG/IgM Line Immunoblot	28
2.2.6.2 Testdurchführung	28
2.2.7 EBV ViraStripe Immunoblots der Firma Viramed.....	29
2.2.7.1 Antigene des EBV ViraStripe IgG/IgM.....	29
2.2.7.2 Herstellung des F&E EBV ViraStripe IgG/IgM	29
2.2.7.3 Antigene des F&E EBV ViraStripe IgG/IgM	30
2.2.7.4 Testdurchführung	32
2.2.8 Virasorb-RF-Absorbens	32
2.2.9 Auswertung der Immunoblot-Teststreifen.....	33
2.2.9.1 Gültigkeit der Testläufe - Kontrollen	33
2.2.9.2 Auswertung mit der Virascan Software.....	34
2.2.9.3 Visuelle Auswertung.....	34
2.2.10 Statistik	35
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Prävalenz der EBV-Infektion im Patientenkollektiv.....	37
3.2 Einfluss der Probenarchivierung bei -20°C auf das Testergebnis im EBV ViraStripe IgG/IgM	37
3.2.1 Probenstabilität nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C	37
3.2.2 Probenstabilität nach 1-3-monatiger Lagerung bei -20°C	39
3.3 Vergleich der kommerziellen EBV Line Immunoblots.....	41

3.3.1 Serostatus.....	41
3.3.2 Häufigkeitsverteilungen der Antikörperreaktionsmuster.....	43
3.3.2.1 Serostatus „frisch“	43
3.3.2.2 Serostatus „kürzlich“	44
3.3.2.3 Serostatus „zurückliegend“	45
3.3.2.4 Bestätigung der Ergebnisse des Serostatus „zurückliegend“ anhand der EBNA1-IgG-positiven Seren	46
3.3.2.5 Bestätigung der Ergebnisse des Serostatus „frisch“ anhand der EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis	49
3.3.2.6 Negative Seren	52
3.3.3 Auswertung diskrepanter und unklarer Serodiagnosen	53
3.3.3.1 Fazit zu Diskrepanzen des Serostatus „zurückliegend“	53
3.3.3.2 Fazit zu Diskrepanzen des Serostatus „unklar“	53
3.4 Zuordnung des EBV-Infektionsstatus	55
3.5 Optimierung des EBV ViraStripe IgG/IgM der Fa. Viramed.....	56
3.5.1 Untersuchung frischer EBV-Infektionen.....	56
3.5.1.1 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgM	56
3.5.1.2 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgG	62
3.5.2 Untersuchung zurückliegender EBV-Infektionen	65
3.5.2.1 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgG	65
3.5.2.2 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgM	69
3.6 Spezifitätsverbesserung mittels F&E EBV ViraStripe IgM.....	70
3.6.1 Keine unspezifischen VCA-IgM-Antikörper bei frischer Toxoplasmose	70
3.6.2 Reduktion kreuzreagierender VCA-IgM-Antikörper bei CMV-Primärinfektion	71
4 Diskussion	73
4.1 Seroprävalenz	74
4.2 Einfluss der Probenarchivierung bei -20°C	74
4.3 Methodenvergleich der kommerziellen EBV Line Immunoblots	76
4.3.1 EBV-Serostatus-Einteilung.....	77
4.3.2 Vergleich der erhaltenen Antikörperreaktionsmuster.....	78

4.3.2 Fazit aus Einzelfallbetrachtungen des Serostatus „unklar“	82
4.4 Optimierung des EBV ViraStripe IgG/IgM der Fa. Viramed.....	85
4.5 Spezifitätsverbesserung mittels F&E EBV ViraStripe IgM.....	88
4.6 Ausblick.....	90
5 Zusammenfassung	92
6 Literaturverzeichnis.....	94
7 Anhang	107
8 Danksagung.....	120
9 Lebenslauf	121

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
Ala	Alanin
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
BL	Burkitt-Lymphom
BZLF	<i>BamHI-Z-fragment Leftward Frame</i>
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CLIA	Chemiluminescence Immunoassay
CMV	Cytomegalievirus
CR	Komplement-Rezeptor
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EA-D	Early Antigen Diffuse
EBER	<i>EBV-encoded small RNA</i>
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELFA	Enzyme-linked Fluorescence Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
F&E	Forschung und Entwicklung
FP	Fusionsprotein
gH	Glykoprotein H
gL	Glykoprotein L
Gly	Glycin
gp	Glykoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	Humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IM	Infektiöse Mononukleose
kD	Kilodalton
LIS	Laborinformationssystem
LMP	Latentes Membranprotein
LRCHL	lymphozytenreiches HL
MCHL	gemischtzelliges HL
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NLPHL	noduläres Lymphozyten-prädominantes HL
NPC	Nasopharynxkarzinom
NSHL	nodulär-sklerosierendes HL
p	Protein
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PTLD	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation

RF	Rheumafaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
VCA	Virus Capsid Antigen
XLP	X-linked lymphoproliferatives Syndrom

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das humanspezifische, weltweit verbreitete Epstein-Barr-Virus (EBV), systematisch auch als humanes Herpesvirus 4 bezeichnet, gehört zur Subfamilie der Gamma-Herpesviren, Gattung Lymphocryptovirus [1, 2]. Das Virus hat einen Tropismus für B-Lymphozyten und Epithelzellen, aber es kann u.a. auch Monozyten, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Langerhans-Zellen infizieren [3-6]. 1964 gelang es M. A. Epstein, B. Achong und Y.-M. Barr elektronenmikroskopisch in Zellkulturen von einem Burkitt-Lymphom (BL) virusähnliche Strukturen nachzuweisen [7]. Kurz darauf entdeckten Gertrude und Walter Henle 1966, dass es sich bei diesem Virus um eine neue Gattung (Humanes Herpesvirus 4) handelte [8]. 2 Jahre später zeigten sie, zufällig nach Erkrankung einer Labormitarbeiterin durch Nachweis einer Serokonversion, den Zusammenhang zwischen dem nach seinem Entdecker benannten Epstein-Barr-Virus und der Infektiösen Mononukleose (IM) auf [9].

Es sind 2 Subtypen des EBV bekannt, die sich genetisch in den Kernantigenproteinen (EBNA2, -3a-c) unterscheiden [10-14]. Mit Ausnahme einiger Gebiete Afrikas und Neuguinea, wo beide Subtypen in etwa gleich stark vertreten sind, dominiert in der restlichen Welt der Subtyp 1 [15]. Obwohl sehr wenig über die pathogenetischen Unterschiede bekannt ist, scheint das EBV1 onkogener zu sein und eine Bedeutung in der Krankheitsentstehung des Nasopharynxkarzinoms (NPC) und anderer lymphoproliferativer Erkrankungen zu haben [6].

Die Virionen des EBV haben einen Durchmesser von 150-200 nm [16] und den für Herpesviren typischen Aufbau, bestehend aus Viruskern mit linearer doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNA), dem ikosaedrischen Kapsid und umgebender Virushülle mit viralen Glykoproteinen (gp) [17, 18]. Eine amorphe Tegumentschicht füllt den Raum zwischen ikosaedrischem Kapsid und Hüllmembran aus [19]. Das ca. 184 Kilobasenpaare umfassende EBV-DNA-Genom codiert für ca. 100 Proteine [2]. Eine besondere gemeinsame Eigenschaft der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Primärinfektion in einen latenten Zustand überzugehen, d.h. das Virus persistiert lebenslang im menschlichen Organismus. Aus dem Stadium der Latenz kann das Virus unter bestimmten Einflüssen jederzeit reaktiviert werden und erneut in den produktiven lytischen Zyklus übergehen, was beim Immungesunden gewöhnlich klinisch inapparent verläuft. Bei starker Immunsuppression, wie z. B. nach Transplantation oder unter Chemotherapie, kann die Reaktivierung nicht nur wieder symptomatisch werden, sondern aufgrund des kanzerogenen Potentials des EBV Tumore, insbesondere Lymphome, mit auslösen.

1.2 Infektionszyklus des EBV

Lebenslang kann ein EBV-Träger das Virus vorwiegend im Speichel intermittierend ausscheiden. Nach oralem Kontakt („Kissing Disease“) ist das lymphoepitheliale Gewebe des Oropharynx die Eintrittspforte für EBV. Die Infektion von B-Lymphozyten und Epithelzellen erfolgt nach unterschiedlichen Mechanismen. Hauptziel sind die leicht zu infizierenden B-Lymphozyten, vor allem weil sie den Komplementrezeptor (CR) *Cluster of differentiation* (CD) 21, den Hauptrezeptor des Virus exprimieren [20]. Vor Eintritt in die Zielzelle bindet das Virus mit seinem Glykoprotein-Komplex gp220/350 auf der Oberfläche der B-Lymphozyten an CD21 (auch CR 2), dem Rezeptor der Komplementkomponente C3d [21-26]. Ein zweiter B-Zellrezeptor, das komplementregulatorische Protein CD35 (CR1), wurde bei einem Patienten mit CD21-Mangel entdeckt [27]. Der Eintritt von EBV in ruhende B-Zellen erfolgt über Endozytose. Diese wird getriggert durch das Zusammenspiel des EBV Glycoprotein gp42 mit dem Humanen Leukozytenantigen II (HLA-II) an der Oberfläche der B-Zellen und anschließend dann durch den Kernfusionskomplex gH/gL/gp42 vermittelt [28].

Der Viruseintritt in Epithelzellen hingegen erfolgt durch direkte Fusion der Virushülle mit der Zellmembranoberfläche. Der Mechanismus ist bisher weniger gut verstanden [28]. Vermutlich interagiert das virale Glykoprotein BMRF2 mit zellulären $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ Integrinen [29]. Anschließend wird eine Interaktion des viralen Glykoproteinkomplexes gH/gL mit zellulären $\alpha \beta 6 / \alpha \beta 8$ Integrinen angenommen, welches die Fusion der Virushüllproteine mit der Zellmembran auslösen und den Viruseintritt erleichtern könnte [30]. Über die Ereignisse nach der Fusion ist nur wenig bekannt [29]. Die Infektion von Epithelzellen ist viel ineffizienter, da *in vivo* weder CD21 noch HLA-Klasse II-Proteine auf der Epithelzelloberfläche exprimiert werden [20].

Das EBV gH/gL ist sowohl für den Eintritt in B-Zellen als auch in die Epithelzellen notwendig. Gp42 jedoch behindert den Viruseintritt in die Epithelzellen, da es die Bindung zum gHgL-Komplex stört. Durch eine Änderung der Zusammensetzung der Glycoproteine im Virion scheint es dem EBV möglich, seinen zellulären Tropismus zu ändern [29]. EBV-Partikel, welche aus Epithelzellen freigesetzt werden, enthalten viel gp42, die eine Infektion der B-Zellen begünstigen kann. Im Gegensatz dazu fehlt den Viruspartikeln, die aus B-Zellen freigesetzt werden das gp42, was wiederum eine Infektion der Epithelzellen begünstigen würde [30]. Die Affinität des Virus zu beiden Zellen legt nahe, dass es kontinuierlich während der Infektion zwischen B-Zellen und Epithelzellen wechseln könnte und dies für die Etablierung der Persistenz von Bedeutung sein könnte.

Nach dem Eintritt in die Zielzelle wird die virale Nukleinsäure aus der Kapsidhülle freigesetzt und das lineare Virusgenom in den Zellkern transferiert. Anschließend kommt es recht schnell zur Zirkularisierung des Genoms zum Episom. Nach Aufnahme des Virus in

den Kern der B-Zelle, führt EBV meist zur latenten und weniger zur lytischen Infektion. In den Epithelzellen kommt es vorwiegend zur lytischen Vermehrung und Abgabe der infektiösen Viruspartikel nach Zelllyse in den Speichel oder Blutstrom [31].

Der lytische Zyklus besteht aus 3 Phasen (sehr frühe, frühe, späte), in denen in mehreren Kaskaden ca. 100 verschiedene Proteine exprimiert werden. Beim Übergang aus der Latenz in den lytischen Zyklus werden zuerst Transaktivatoren, wie das *BamHI-Z-fragment Leftward Frame1* (BZLF1) exprimiert, welche auf frühe Genexpression gerichtet sind. In der nachfolgenden Phase werden Early-Antigene (EA), unter anderem die virale DNA-Polymerase, und Proteine, die für die Replikation der viralen DNA notwendig sind, exprimiert. Die Virusreifung mit Expression von Viruscapsid-, Tegument- und Membranproteinen erfolgt in der späten Phase [16].

Während der latenten Phase einer EBV-Infektion sind ungefähr 1 bis 10 pro 10^6 der zirkulierenden B-Lymphozyten EBVDNA-positiv [32]. Das EBV-Genom liegt als Episom vor, es kommt nicht zur Produktion von Virionen. Im Stadium der Latenz werden für die Viruspersistenz nur noch wenige Genprodukte exprimiert. In Abhängigkeit der verschiedenen Genexpressionsmuster werden verschiedene Latenz-Typen unterschieden. Während einer Primärinfektion werden zunächst alle Latenz-Gene (Latenz-Typ III) exprimiert, was zur Immortalisierung und permanentem Wachstum der B-Lymphozyten führt [33]. Die verantwortlichen Genprodukte sind die Epstein-Barr nukleären Antigene EBNA1, -2, -3a-c, -*leader protein*, die latenten Membranproteine LMP1, LMP2a, -2b und die kleinen *EBV-encoded ribonucleic acids (RNA) EBER1 und EBER2* [14, 34]. In dieser kurzen Phase werden die proliferierenden B-Zellen vorwiegend von den CD8⁺-T-Zellen erkannt und durch Auslösung von Apoptose in der Anzahl (n) deutlich reduziert. Ungefähr 40% aller CD8⁺-T-Zellen sind während der IM gegen spezifische einzelne immundominante lytische EBV-Epitope ausgerichtet [35]. Durch die massive T-Zell-Reaktion werden die typischen Symptome der IM hervorgerufen. Zusätzlich tragen natürliche Killerzellen und CD4⁺-T-Zellen zur zellulären Immunkontrolle des EBV bei [36]. Zur Umgehung der Immunreaktion wird im weiteren Verlauf EBNA2 herunterreguliert, was zu einem Proliferationsstopp führt. Die Expression von LMP1, welches den CD40-Rezeptor imitiert und die Manipulation des B-Zell-Signalleitungsprozesses durch LMP2a, schützen die Zellen vor Apoptose [37-40]. Die proliferierenden Blasten differenzieren sich weiter in ruhende Memory-B-Zellen, welche nur noch LMP2a, EBER-Transkripte und EBNA1 exprimieren. Das entspricht dem Ruhezustand von gesunden EBV-Trägern und wird als Latenz-Typ 0 bezeichnet [41].

EBNA1 ist ein wichtiger Transaktivator für die Expression latenter Gene und dient zur Aufrechterhaltung der Immortalisierung der B-Zellen. EBNA1 garantiert dabei die Replikation des Episoms und die gleichmäßige Weitergabe nach Zellteilung durch Bindung von viraler DNA an zelluläre Chromosomen [42]. Das Glycin-Alanin (Gly-Ala) repeat-Segment im

EBNA1 verhindert aufgrund der inhibierten Degradation des Proteins im Proteasom die Antigenpräsentation, sodass diese Zellen der Immunabwehr durch die zytotoxischen T-Zellen entgehen [43]. In Untersuchungen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei gesunden EBV-Trägern konnte gezeigt werden, dass bis zu 2% aller CD8⁺-T-Zellen zur Aufrechterhaltung der EBV-Immunkontrolle der lytischen oder latenten Antigene gebraucht werden [44], um das dynamische Gleichgewicht zwischen B-Zell-Proliferation und -Lyse aufrechtzuerhalten.

Der Latenz-Typ III findet sich, außer bei der IM, bei der Lymphoproliferativen Erkrankung nach Transplantation (PTLD) und den immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien, die durch *in vitro* Infektion mit EBV induziert werden können. Latenz-Typ I mit Expression von EBNA1, EBER1 und EBER2 wird häufig beim BL beobachtet. Sind zusätzlich noch LMP1 und LMP2 exprimiert, entspricht das dem Latenz-Typ II, der charakteristisch für das NPC sowie für Hodgkin- und T-Zelllymphome ist [2]. Die Anpassung des Virus an wirtsspezifische Besonderheiten und nachgewiesene atypische Genexpressionsmuster z. B. im BL, sprechen für einen dynamischen Prozess der Expression der Latenz-Gene, daher ist die Einordnung in verschiedene Latenztypen nur als vereinfachtes Modell zu verstehen [45].

Es wird angenommen, dass ein Antigenstimulus die Ausreifung der ruhenden Memory-B-Zelle zur Plasmazelle bewirkt, über zelluläre Veränderungen zu einer Reaktivierung im Oropharynx und zum Übergang in die lytische Phase der Infektion mit Ausschüttung infektiöser Partikel führen kann [32, 41, 46].

1.3 Epidemiologie

Hauptansteckungsquelle ist der Speichel infizierter Personen. Selten kommt es durch Genitalsekrete, nach Organtransplantation oder durch Blutzellen zur Virusübertragung [47, 48]. Die Durchseuchung der adulten Weltbevölkerung mit EBV wird mit mehr als 95% angegeben [49], wobei diese Rate stark vom Alter und sozialökonomischen Status abhängig ist [14]. In den nichtindustrialisierten Ländern läuft bei mehr als 95% der Bevölkerung die EBV-Infektion bereits im Kleinkindalter ab [48]. Hingegen wird in den Industrieländern mit höherem Hygienestandard diese hohe Durchseuchungsrate erst nach einem zweiten Peak im jungen Erwachsenenalter nach Aufnahme von intimen Kontakten („Studentenkusskrankheit“) erreicht. Mehr als 50% der 10-Jährigen sind in diesen Ländern seronegativ für EBV [32].

1.4 Krankheitsbilder

Erste Symptome können ca. 2-6 Wochen nach Ansteckung auftreten [50]. Findet die Primärinfektion mit EBV in den ersten Lebensjahren statt, verläuft diese in der Regel asymptomatisch oder mit unspezifischen Symptomen [25]. Insbesondere Kinder können auch nur mit respiratorischer Symptomatik auffallen [51]. Bei Jugendlichen und Erwachsenen

hingegen manifestiert sich die Erstinfektion in ca. 50% der Fälle mit dem typischen klinischen Bild der IM [49, 52]. EBV ist mit einer Vielzahl von malignen Erkrankungen assoziiert [53].

1.4.1 Infektiöse Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber)

Eine IM beginnt häufig mit Prodromalerscheinungen wie Abgeschlagenheit und subfebrilen Temperaturen. Die klassischen Symptome sind Fieber (meist intermittierend), Tonsillopharyngitis mit grau-weißen Stippchen oder Belägen und eine zervikale oder generalisierte Lymphadenitis, welche häufig mit dem Auftreten von > 10% atypischer Lymphozyten (aktivierte zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, sog. „Pfeiffer-Zellen“) im peripheren Blut einhergehen [54]. In 50 bis 75% der Fälle wird eine Splenomegalie beobachtet, etwas seltener eine Hepatomegalie mit Transaminasenerhöhung [47]. Unter Antibiotika-Therapie mit Aminopenicillinen tritt typischerweise meist ein Arzneimittellexanthem auf. Die IM ist in der Regel eine selbstlimitierende gutartige Erkrankung. Komplikationen, wie hämolytische Anämie, Thrombo- oder Granulozytopenie infolge Autoantikörperbildung nach polyklonaler B-Zellstimulation [55], neurologische Symptome (Meningitis, Enzephalitis, Guillain-Barré-Syndrom), Pneumonitis, Milzruptur sowie Peri-/Myokarditis treten sehr selten auf [14, 48]. Die wenigen beschriebenen Fälle einer chronischen Mononukleose mit anhaltender Virusreplikation über Wochen bis Monate und chronisch oder rezidivierend auftretenden Symptomen der Erstinfektion [56] gingen mit unterschiedlich schweren Verläufen einher. Selten traten schwere Komplikationen wie Leberversagen, Perikarditis, ZNS-Beteiligung und Obstruktion der Atemwege auf.

1.4.2 EBV-assoziierte Erkrankungen

Das onkogene Potential des EBV war schon früh anhand von Untersuchungen des BL bekannt. Beim Immungesunden ist die Assoziation von EBV mit dem NPC und mit dem BL gut untersucht. Unter Immunsuppression aufgrund angeborener oder erworbener Immundefekte werden häufig lymphoproliferative Erkrankungen mit EBV in Zusammenhang gebracht. Zusätzlich zu den nachfolgend beschriebenen Erkrankungen werden in der Literatur ursächliche Verbindungen zwischen EBV mit Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, Rheumatoidarthritis, Systemischer Lupus erythematoses) und Karzinomen wie z. B. dem Magenkarzinom diskutiert [57-60].

1.4.2.1 Orale Haarleukoplakie

Diese orale, meist asymptomatische Manifestation tritt hauptsächlich bei Patienten mit Acquired Immune Deficiency Syndrom (AIDS) auf. Insbesondere an den lateralen Zungenrändern finden sich durch Hyperplasie des Plattenepithels weißliche Streifen, die nicht abwischbar sind. Die Erkrankung scheint durch EBV-Replikation im Mundschleimhautepithel ausgelöst zu werden. EBVDNA ist in den Zellläsionen vorhanden [6]. In selte-

nen Fällen kann die Erkrankung auch bei Immunsuppression anderer Genese auftreten [61]. Die hyperkeratotische, gutartige Läsion kann als erstes klinisches Anzeichen einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) beobachtet werden oder aber ein Fortschreiten der HIV-Erkrankung zum AIDS anzeigen [6].

1.4.2.2 X-linked lymphoproliferatives Syndrom (XLP)

Eine Sonderstellung nimmt das X-chromosomal rezessiv vererbte lymphoproliferative Syndrom, auch Duncan's Disease oder Purtilo-Syndrom genannt, ein. Es handelt sich um einen seltenen angeborenen Immundefekt, der häufig bei Jungen im Kleinkindalter aufgrund einer Störung der Immunantwort gegenüber EBV zu einer akuten IM mit lebensbedrohlichem Verlauf und meist letalem Ausgang führt [62, 63]. Die Überlebenden haben ebenfalls eine schlechte Prognose und versterben meist an den Spätfolgen (maligne Lymphome, Hypogammaglobulinämie).

1.4.2.3 Burkitt-Lymphom (BL)

Das BL ist ein B-Zelllymphom mit einer extrem hohen Proliferationsrate. BL werden unterteilt in endemische, sporadische und AIDS-assoziierte Formen [64]. Die endemische Form wird vor allem bei Kindern im Alter zwischen 4 und 10 Jahren in den stark von Malaria betroffenen Gebieten Afrikas und Neu-Guineas beobachtet [65]. Bei dieser Variante besteht zu 95% der Fälle eine Assoziation mit dem EBV [64, 66] und es kommt häufig zu einer Tumorbildung im Kieferbereich. Das sporadische BL ist nur in 10-25% mit EBV assoziiert, kommt weltweit bei Kindern und jungen Erwachsenen vor und zeigt häufig Manifestationen im Ileozökalbereich, an den Nieren, den Ovarien, den Mammae und im ZNS [67, 68]. Die mit Immundefizienz assoziierte Form findet sich bei HIV-Infizierten häufig als Abdominaltumor, wobei eine EBV-Assoziation von 25-40% in diesen Fällen beschrieben wird [68]. Die pathogenetische Rolle des EBV in der Tumorentstehung ist letztlich noch nicht vollständig geklärt [26]. Ein charakteristisches Merkmal nahezu aller Varianten des BL sind Chromosomentranslokationen des Protoonkogens c-myc, am häufigsten von Chromosom 8 auf Chromosom 14, seltener wird c-myc in einen Immunglobulin-Lokus auf Chromosom 2 oder 22 verlagert und überexprimiert [68-70]. Durch die Dysregulation des Proto-Onkogens c-myc wird die betroffene Zelle in einen Zustand permanenter Proliferation versetzt.

1.4.2.4 Nasopharynxkarzinom (NPC)

Das NPC ist ein schnell infiltrierend und metastasierend wachsender Tumor epithelialen Ursprungs. Histologisch werden verhornendes oder nicht verhornendes differenziertes Plattenepithelkarzinom (Typ 1/2) und das nicht verhornende undifferenzierte Karzinom (Typ 3), auch Schmincke-Tumor genannt, unterschieden. Das NPC tritt endemisch in Südostasien, Südchina, Nordafrika und in Alaska auf. Im Süden Chinas beträgt die Inzi-

denz des NPC 25-55/100.000 Personen/Jahr [71], während es in nichtendemischen Gebieten wie z. B. in den USA und Westeuropa nur sporadisch auftritt. In Südchina sind 97% aller NPC Schmincke-Tumore (Typ 3). Im Gegensatz dazu herrscht in den westlichen Industriestaaten zu 75% der Typ 1 vor [72]. Während sich in nahezu allen schlecht differenzierten oder anaplastischen Typ 3-Karzinomen EBV in den Tumorzellen nachweisen ließ, waren die Typ 1-Karzinome in der Regel EBV-negativ [25, 73]. Die Häufung des NPC in China wird neben dem onkogenen EBV mit dem Auftreten bestimmter HLA-Konstellationen und dem Genuss von nitrosaminhaltigem Fisch sowie bestimmten Kräutern in ursächlichen Zusammenhang gebracht [74-76].

Alkohol- und Nikotinkonsum erhöhen das Risiko für das Entstehen von NPC [77-81]. In der Literatur wurde beschrieben, dass erhöhte Antikörper-Titer insbesondere Immunglobulin A-(IgA)-Antikörper gegen EBV-Strukturproteine der Entwicklung eines NPC vorausgehen [82-85]. Ein Titeranstieg von IgA-Antikörpern gegen Virus Capsid Antigene (VCA) und die Anwesenheit von EA-IgA-Antikörpern nach Therapie wurden als erster Hinweis auf ein Rezidiv gewertet [25, 86]. Heute wird die Plasma-Viruslast, bestimmt mittels *polymerase chain reaction* (PCR), zur Erstdiagnose und als Marker der Tumorlast unter Therapie eingesetzt [53].

1.4.2.5 Hodgkin Lymphom (HL)

Das HL ist die häufigste maligne Erkrankung des lymphatischen Systems in der westlichen Welt [87]. Gekennzeichnet ist es histologisch durch eine kleine Anzahl typischer einkerniger Hodgkin- oder mehrkerniger Sternberg-Reed-Zellen (<1-2%) umgeben von entzündlichem Infiltrat, welches zum überwiegenden Teil aus CD4⁺-T-Lymphozyten besteht [1, 88, 89].

Das HL entsteht vorzugsweise bei jungen Erwachsenen in Lymphknoten des Halsbereichs. Der höchsten Inzidenz im Alter zwischen 25 bis 30 Jahren folgt ein zweiter Erkrankungsgipfel nach dem 45. Lebensjahr [90]. EBV wird seit langem eine begünstigende Rolle für die Entstehung des HL zugesprochen [91, 92]. Jedoch auch Patienten mit Immundefizienz haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Patienten mit später EBV-Exposition, die mit dem typischen Bild der IM erkrankten, hatten ein 3- bis 4-fach höheres HL-Risiko [93, 94]. Histologisch werden das noduläre Lymphozyten-prädominante HL (NLPHL) und das klassische HL unterschieden (CHL). Das CHL wird in Abhängigkeit von der morphologischen Struktur des neoplastischen Infiltrates und des Fibrosegrades in 4 Gruppen unterteilt: lymphozytenreicher Typ (LRCHL), Noduläre Sklerose (NSHL), Mischtyp (MCHL) und lymphozytenarmer Typ (LDHL). In zahlreichen Studien wurde die Assoziation zwischen EBV und HL untersucht. Während das NLPHL nur selten mit EBV assoziiert war, wurde häufig ein Zusammenhang zwischen dem EBV und dem MCHL bzw. dem LDHL mit Positivitäten für EBV von 75 bis 95% gefunden [95, 96]. Die NSHL wird nur in 15 bis 20% der

Fälle mit EBV assoziiert. Beim LRCHL besteht keine Assoziation zu EBV [5].

1.4.2.6 Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (PTLD)

Die PTLD umfasst das breite Spektrum der lymphoproliferativen Erkrankungen, die nach Organ- oder Stammzelltransplantation unter starker Immunsuppression auftreten können. Die klinische Präsentation reicht von Symptomen der IM über die benigne polyklonale lymphoide Hyperplasie bis hin zu malignen monoklonalen Lymphomen [87]. Bei Immunsuppression kommt es, besonders nach Organtransplantation, zur Störung des Gleichgewichtes zwischen viraler Aktivität in den Memory-B-Zellen und der Kontrolle des EBV durch die zytotoxischen T-Zellen. Zur Früherkennung einer PTLD ist die Quantifizierung der EBVDNA im peripheren Blut in regelmäßigen Abständen hilfreich [97-99]. Das Risiko an PTLD zu erkranken, liegt je nach Transplantationstyp zwischen 0,5 bis 20% [100]. Die Inzidenz ist neben der Art des transplantierten Organs abhängig von der immunsuppressiven Therapie, vom EBV-Serostatus und dem Patientenalter [101]. Kinder, die zum Zeitpunkt der Transplantation noch seronegativ für EBV sind, haben ein 1- bis 4-fach höheres Risiko an einer PTLD zu erkranken [102, 103]. Ein seronegativer Empfänger, der ein EBV-positives Organ erhält, entwickelt bis zu 24mal häufiger eine PTLD [104-107]. Die größte Anzahl der PTLD (85%) wird durch B-Zell-Proliferationen, in denen zu 90% EBV nachgewiesen werden kann, hervorgerufen [101]. Die 14% T-Zell-proliferierender PTLD hingegen waren nur zu 40% EBV-positiv. Ca. 1% der PTLD machen NK-Zell- und Plasmazell-Proliferationen aus.

1.5 Differentialdiagnosen

Aufgrund der Vielgestaltigkeit des klinischen Bildes einer akuten EBV-Infektion und der überlappenden Symptomatik mit vielen anderen Krankheiten ist eine sichere serologische Diagnosestellung wichtig. So muss eine harmlose, selbstlimitierende EBV-Infektion beim Immungesunden von schweren Erkrankungen, wie einer akuten HIV-Infektion, einem Lymphom oder einer akuten Leukämie, die häufig im typischen Erkrankungsalter einer akuten IM auftritt, sicher abgegrenzt werden [48, 108-110]. Bei unspezifischer grippeähnlicher Symptomatik oder Lymphadenopathie sind des Weiteren Toxoplasmose, Cytomegalie, Röteln, Mumps, Brucellose, Parvovirus B19- und Humanes Herpesvirus 6-Infektionen in Betracht zu ziehen [109]. In der Kindheit ist zwar EBV die häufigste Ursache für eine IM, dennoch sind 7 bis 10% der Fälle einer akuten Cytomegalievirus-(CMV)-Infektion geschuldet [48, 111-113]. Eine häufig zu Beginn der IM im Vordergrund stehende Tonsillitis sollte möglichst schnell von einer A-Streptokokken-Angina, welche regelhaft antibiotisch zu behandeln ist, unterschieden werden. Bei hepatischen Begleiterscheinungen sind zusätzlich die Hepatitis-Viren abzuklären [51].

Während es keine sicheren Angaben zu fetalen Risiken bei EBV-Primärinfektion in der

Schwangerschaft gibt, wohl auch der bereits sehr hohen Durchseuchungsrate in dem Alter geschuldet, sind hingegen die fetalen Risiken für CMV-, Toxoplasma gondii-, Röteln- oder Parvovirus B19-Erstinfektionen während der Schwangerschaft gut bekannt. Eine differentialdiagnostische Abklärung ist hier nicht nur bei Schwangeren, sondern auch unter Immunsuppression von großer Bedeutung. Mögliche Koinfektionen, wie sie gelegentlich z. B. als CMV- und EBV-Doppelinfectionen vorkommen, sollten bedacht und mittels Serologie, ggf. inklusive Aviditätsmessung, abgeklärt werden [51, 112, 114, 115]. Bei isoliert auftretender respiratorischer Symptomatik kommen differentialdiagnostisch viele andere Viren, wie das Rhino-, Corona-, Respiratorische Synzytial-, Parainfluenza- oder Influenzavirus ursächlich in Betracht [48].

1.6 EBV-Diagnostik beim Immungesunden

In der EBV-Diagnostik kommen unspezifische und spezifische Antikörpernachweise zum Einsatz. Eine relative Lymphozytose mit reichlich atypischen Lymphozyten (> 10%) im Differentialblutbild, häufig begleitet von Transaminasenerhöhungen, kann ein Hinweis auf eine akute EBV-Primärinfektion sein [48, 116].

1.6.1 Unspezifische heterophile Antikörper

Der Nachweis von heterophilen IgM-Antikörpern mittels Agglutinationsreaktion von z. B. Schafs- oder Pferdeerythrozyten mit Patientenserum hat heute kaum noch Bedeutung in der EBV-Diagnostik, da die Sensitivität des Testes stark abhängig von Symptombdauer als auch vom Patientenalter ist. Innerhalb der ersten Krankheitswoche bilden nur rund die Hälfte aller Jugendlichen und Erwachsenen heterophile Antikörper. In der Altersgruppe unter 2 Jahren erreicht der Nachweis bei EBV-Primärinfektion nur eine Sensitivität von 10 bis 30% [117, 118]. Für die Interpretation kommt erschwerend hinzu, dass bei 20% der Patienten der Nachweis für 1 bis 2 Jahre persistiert [119] und eine positive Reaktion auch im Rahmen der 5 bis 10% mononukleoseartiger Erkrankungen anderer Genese (z. B. CMV, Röteln, Parvovirus B19, HIV) oder bei Autoimmunerkrankungen auftreten kann [46, 120- 123]. Aufgrund der eingeschränkten Sensitivität ist insbesondere bei Kindern ein negativer Test diagnostisch wenig richtungsweisend, aber auch ein positiver Nachweis bedarf weiterer Abklärung.

1.6.2 Spezifische EBV-Antikörper

Um beim Immunkompetenten im höchsten Maße zwischen Primärinfektion, zurückliegender Infektion und Seronegativität zu differenzieren, werden heute EBV-spezifische IgG- und IgM-Testverfahren unter regelhaftem Einsatz mehrerer Antigene, die vom Virus in bestimmten Infektionsphasen exprimiert werden (Early-Antigene (EA), virale Capsidantigene (VCA) und Epstein-Barr nukleäre Antigene (EBNA)) in der Routinediagnostik kombiniert. Die typischen Kriterien einer aktiven Infektion mit Nachweis von IgM-Anti-

körpern bzw. signifikantem IgG-Antikörper-Titeranstieg sind nur bedingt anwendbar [124]. Die Zugehörigkeit des EBV zu den langsam wachsenden Gamma-Herpesviren erklärt die z. T. langwierigen serologischen Verläufe, welche von der Seronegativität bis zur serologischen Ausheilung mit Ausbildung von EBNA1-IgG-Antikörpern nicht selten bis zu einem halben Jahr mit entsprechend schleichenden Änderungen in Anspruch nehmen.

Der zeit-, kosten- und arbeitsintensive Immunfluoreszenztest (IFT), welcher lange Zeit als Goldstandard galt, ist heute weitestgehend z. B. von den Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) bzw. Chemolumineszenz-Testen (CLIA) aufgrund vergleichbarer Leistungen bei deutlicher Zeitersparnis besonders in den automatisierten Hochdurchsatzlaboren verdrängt worden [125, 126]. Wie der Vergleich von vier handelsüblichen Enzym-Immunoassays mit einem Immunfluoreszenzassay in der Studie von B. Gärtner et al. jedoch zeigte, schwankt die Qualität der kommerziellen EIA-Teste von Hersteller zu Hersteller bei der Vielzahl der unterschiedlichen verwendeten Antigene einschließlich der Antigenaufbereitungen (gereinigte native oder rekombinante Proteine, synthetische Peptide u.a.) und fehlender Standardisierung [127]. In der Routinediagnostik empfiehlt sich daher der Einsatz sich ergänzender Teste unter Nutzung verschiedener Antigene und Methoden (z. B. EIA, Immunoblot). Aber auch bei Verwendung der gleichen Antigene eines Herstellers, wie von Ory et al. anhand des synthetischen Peptid p18 in den IgM-DiaSorin-Assays (CLIA und ELISA) beschrieben, zeigten sich deutliche Unterschiede in den Sensitivitäten von über 20%, die vermutlich auf verschiedene Verdünnungen zurückzuführen waren [113]. Übereinstimmend berichteten Feng et al., dass der VCA-IgM-CLIA von DiaSorin verglichen mit dem VCA-IgM-ELISA deutlich sensitiver ist [128].

Bei ca. 80% der in der Laborroutine auf EBV getesteten Proben ist die serologische Einordnung aufgrund eindeutiger Konstellationen [108], infolge der detektierten Antikörper und deren Titerhöhen mittels der zum Screening z. B. verwendeten ELISA- bzw. CLIA-Testen sicher zu stellen. Zur rationellen EBV-Diagnostik beim Immungesunden ist meist ein Test-Profil von nur drei EBV-spezifischen Antikörpern ausreichend [129-131]. Der Nachweis beschränkt sich dabei auf IgG- als auch IgM-Antikörper gegen VCA und IgG-Antikörper gegen das EBNA1 [127].

Da EA-IgG-Antikörper nicht nur bei Primärinfektionen und Reaktivierungen, sondern auch bei immungesunden Trägern wie z. B. Blutspendern und Sportlern nachgewiesen wurden, spielt der EA-IgG-Nachweis bei einigen Autoren nur noch eine untergeordnete Rolle [122, 127, 132, 133]. Eine Reaktivierung verläuft zudem beim Immungesunden inapparent [134] und unter Immunsuppression ist die PCR das geeignete diagnostische Mittel [135]. De Pascale untersuchte anhand von 28 Proben mit akuter und 102 Seren mit zurückliegender EBV-Infektion, die isoliert für VCA-IgG-Antikörper positiv waren (EBNA1-IgG und VCA-IgM negativ), den Nutzen der zusätzlichen Bestimmung von EA-D-IgG im ELISA. In der

Studie wurden bei 89% der Seren mit akuter EBV-Infektion EA-D-IgG reaktiv gemessen, hingegen waren es nur 11,8% der Seren mit zurückliegender Infektion. Dieser signifikante Unterschied zeigte, dass der zusätzliche Nachweis von EA-D-IgG trotz 20 bis 30% EA-D-Persistenzen beim Immungesunden oder Nachweis bei Reaktivierungen dennoch hilfreich für die Diagnose der akuten EBV-Infektion sein kann [130].

1.6.2.1 Eindeutige serologische Konstellationen

Die klassische serologische Konstellation einer akuten EBV-Primärinfektion zeigt nicht detektierbares EBNA1-IgG in Kombination mit meist gleichzeitigem Nachweis von VCA-IgM und -IgG, wobei VCA-IgG, wie auch in der Studie von I. Färber et al. gezeigt, in der Regel im niedrigtitrigen Bereich liegt [125]. Die klassische länger zurückliegende EBV-Infektion ist durch den kombinierten Nachweis von VCA- und EBNA1-IgG bei negativem VCA-IgM-Befund gekennzeichnet [49]. EBNA1-IgG wird gewöhnlich frühestens vier Wochen nach Erkrankungsbeginn gebildet und kann daher als serologischer Spätmarker in der Regel eine frische Primärinfektion ausschließen [51, 109, 110, 136]. Durch Verwendung von z. B. vier Screening-Testen (auf VCA-IgG, VCA-IgM, EA-D-IgG und EBNA1-IgG) und den Test auf heterophile Antikörper werden 32 mögliche serologische Muster generiert, die eine Herausforderung für den Befunder darstellen [49, 137], da zwischen Seronegativität, eindeutiger Primärinfektion und zurückliegender Infektion eine Vielzahl atypischer oder mehrdeutiger serologischer Konstellationen vorkommen.

1.6.2.2 Atypische oder mehrdeutige serologische Konstellationen

Eine Verlaufsstudie von Schillinger et al. zeigte, dass in mehr als 20% der untersuchten Fälle von EBV-Primärinfektionen keine VCA-IgM-Antikörper nachweisbar sind. VCA-IgM wird zwar meist kombiniert mit VCA-IgG bei einer Primärinfektion detektiert, kann aber vereinzelt auch vor oder erst nach dem VCA-IgG auftreten [132, 136]. Erschwerend für die serologische Diagnostik ist, dass VCA-IgM nur kurzzeitig, aber auch über viele Monate persistierend nachweisbar sein kann [32, 51, 108, 109]. De Pascale berichtete, dass VCA-IgM noch nach 80 Wochen zusammen mit EBNA1-IgG erkannt wurde [130]. Entscheidend für den VCA-IgM-Nachweis ist, welches Antigen im Test verwendet wird, denn Anti-VCA p18 wird gewöhnlich etwas später als z. B. Anti-VCA gp125 gebildet [131] und persistiert häufig länger. In den ELISA- oder CLIA-Testen wird jedoch oft VCA p18 in den IgM- als auch in den IgG-Testen verwendet, da sich herausstellte, dass VCA p18-IgM ausreichend früh während der akuten Primärinfektion gebildet wird [128, 138]. Berth und Bosmans zeigten jedoch in ihrer Studie anhand des Vergleichs von drei automatisierten Immunoassay-Verfahren, die in der IgM-Analyse VCA p18 p19 verwendeten, mit einem IgM-Immunoblot, auf dem auch VCA gp125 eingesetzt wurde, dass eine Implementierung des VCA gp125 in den IgM-Assays die Sensitivität zum Nachweis einer Primärinfektion verbessern würde [139].

Nicht selten erschweren kreuzreagierende oder unspezifische IgM-Nachweise, insbesondere im Rahmen der akuten CMV-Primärinfektion, Toxoplasmose, HIV- oder Parvovirus B19-Infektion die Diagnostik [110, 124, 137, 139-141]. Ein negatives IgM schließt eine akute Infektion zu einem hohen Prozentsatz aus, aber ein positives IgM sollte sehr vorsichtig interpretiert werden [108, 139].

Während VCA-IgG als Durchseuchungsmarker in der Regel lebenslang nachweisbar ist, kann es unter Immunsuppression zum Verlust von EBNA1-IgG kommen. Eine weitere Besonderheit ist, dass mehr als 5% der Infizierten niemals IgG-Antikörper gegen EBNA1 ausbilden [108, 109, 132]. Weder der Nachweis von VCA-IgM noch das Fehlen von EBNA1-IgG können somit sicher eine Primärinfektion beweisen [142]. In Studien werden bei ca. 2,4 bis 8% aller Patienten nur isoliert VCA-IgG-Antikörper in den Screening-Testen nachweisbar [131, 137, 143], was sowohl bei akuter als auch nach zurückliegender Infektion in Abhängigkeit vom Studiendesign in unterschiedlichen Häufigkeiten auftreten kann. De Paschale et al. zeigten anhand von 24.422 Proben ambulanter Patienten mit vermuteter EBV-Infektion, dass mit zunehmendem Lebensalter die Häufigkeit des isolierten VCA-IgG-Nachweises ansteigt. Im Alter zwischen 1 bis 10 Jahren waren es 4,5%, welche vor allem mit einer akuten Infektion assoziiert waren. Jedoch lag in 1/3 der Fälle auch eine zurückliegende Infektion vor. Das isolierte VCA-IgG-Antikörper-Muster (9% bei Patienten > 60 Jahre) war beim Erwachsenen hauptsächlich assoziiert mit einer zurückliegenden Infektion [143].

Ein weiteres diagnostisches Problem bereiten die ca. 1% isoliert EBNA1-IgG-positiven Seren nach zurückliegender Infektion bei denen keine VCA p18-IgG-Antikörper nachweisbar sind [137, 144], um diese von unspezifischen EBNA1-IgG-Nachweisen abzugrenzen. Eine Untersuchung von De Paschale zeigte, dass ein isoliert auftretendes EBNA1-IgG so gut wie nie vorkommt und die Detektion von VCA-IgG-Antikörpern vom eingesetzten Antigen und der Testmethode abhängt. So konnte er in allen 23 Seren mittels Immunoblot VCA p23-IgG und in 56,6% der Proben auch eine positive VCA p18-IgG-Bande (rekombinant hergestelltes Antigen) nachweisen, während im ELISA-Screening mit dem synthetisch hergestellten VCA p18 nur ca. 19% schwach positive IgG-Nachweise erbracht wurden [144].

Neben dem isolierten Auftreten der drei Screening-Parameter, bereitet auch in einer Häufigkeit von ca. 5% das gleichzeitige Auftreten von EBNA1-IgG, VCA-IgG und -IgM diagnostische Schwierigkeiten [134, 137, 143, 145]. Hier kommen differentialdiagnostisch eine Vielzahl möglicher Ursachen in Betracht: akute Infektion mit atypisch frühem bzw. unspezifischem EBNA1-IgG [134], kürzliche Infektion mit schon nachweisbarem EBNA1-IgG, IgM-Nachweis bei Reaktivierung, kreuzreagierende/unspezifische IgM-Antikörper im Rahmen anderer akuter Infektionen (z. B. CMV, Toxoplasmose, HIV, Parvovirus B19,

Hepatitis) oder persistierende IgM-Antikörper nach zurückliegender EBV-Infektion [116, 118]. So fanden auch Nystad und Myrnel in ihrer Studie bei 12 von 18 Patienten mit EBV-Primärinfektion unspezifische EBNA1-IgG-Nachweise im EIA, die nicht mittels Immunoblot bestätigt werden konnten [134].

Da die Immunantwort in der EBV-Serologie ein hohes Maß an Variabilität aufweisen kann [132], werden zur weiteren Abklärung nicht klassischer Ergebniskonstellationen in den Screeningtesten insbesondere der IgG- und zusätzlich der IgM-Immunoblot oder aber die IgG-Aviditätsmessung zur Einordnung des Befundes eingesetzt.

1.6.2.3 EBV Line Immunoblot

Die Einführung der Lineassay-Testverfahren unter Nutzung verschiedener rekombinant hergestellter oder aufgereinigter nativer Antigene, revolutionierte die bisherige serologische EBV-Diagnostik und der IFT als Goldstandard wurde abgelöst [132]. Durch die Verwendung verschiedener viraler Capsidantigene (z. B. VCA gp125 und VCA p18) zusätzlich zum EBNA1 auf den IgG-Teststreifen lässt sich anhand eines Grundmusters, nach dem die serologische Antwort häufig abläuft, die EBV-Infektion meist in einer einzigen Bestimmung einer Infektionsphase zuordnen [146].

Tabelle 1.1: Schematisierter Ablauf einer idealisierten Immunantwort nach EBV-Primärinfektion unter Verwendung der Antigene VCA p18, VCA gp125, EBNA1 und EA-D im EBV Lineassay

Serostatus	IgM			IgG			
	VCA gp125	VCA p18	EA-D	VCA gp125	VCA p18	EA-D	EBNA1
frisch	+			(+)		(+)	
	++		+	+		+	
	++	(+)	++	++	(+)	+	
	+++	+	++	++	+	++	
	++	++	++	++	+	++	
kürzlich	++	++	+	++	++	++	
	+	+	+	+	++	++	
	+	+	+	+	++	++	(+)
zurückliegend		+	+	+	++	++	(+)
		+		+	++	+	+
		(+)		+	+++	+	++
					+++		+++
					++		++
					+		+
				+			

Während bei einer Primärinfektion VCA gp125-IgG schon häufig bei Symptombeginn nachweisbar ist, rasch ansteigt und danach meist auf niedrigere Titer abfällt, treten die VCA p18-IgG-Antikörper mit zeitlicher Verzögerung auf [108, 109] und nehmen im Verlauf

an Intensität zu. Es findet sich daher auf dem IgG-Test der Lineassays bei den frischen EBV-Primärinfektionen häufig isoliert Anti-VCA gp125 oder in Kombination mit Anti-EA-D. Bei bereits nachweisbarer VCA p18-IgG-Bande hat diese eine deutlich schwächere Intensität als die VCA gp125-IgG-Bande. Im weiteren Verlauf nimmt die Konzentration an VCA p18-IgG zu, sodass bei den kürzlich zurückliegenden Infektionszeitpunkten häufig gleich starke VCA-IgG-Banden detektiert werden. Nach länger zurückliegender EBV-Infektion findet sich meist ein VCA-IgG-Bandenverhältnis mit überwiegender VCA p18-IgG-Antwort gegenüber der VCA gp125-IgG-Reaktivität oder nur noch eine isolierte VCA p18-IgG-Bande in der Regel in Kombination mit dem Nachweis von EBNA1-IgG. Ein schematisierter Ablauf einer idealisierten Immunantwort einer EBV-Primärinfektion, unter Verwendung der Antigene VCA p18, VCA gp125, EBNA1 und EA-D in einem EBV Lineassay, ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Im Vergleich zu den Screening-Testen ist der EBNA1-Nachweis mittels IgG-Immunoblots deutlich sensitiver. Die Verwendung des Line Immunoblots mit homogener Konzentrationsverteilung bei immer gleicher Bandenbreite bietet zusätzlich den Vorteil einer Antikörperquantifizierung mittels Scantechnik [109]. Die Ausbildung des zweiten serologischen Spätmarkers (VCA p18-IgG) unterbleibt nur in sehr wenigen Ausnahmefällen und im Gegensatz zum noch später gebildeten EBNA1-IgG wird er unter Immunsuppression nicht sekundär negativ [116]. So kann bei fehlender EBNA1-IgG-Bildung oder sekundärem Verlust von EBNA1-IgG über den starken Nachweis einer VCA p18-IgG-Bande eine ganz frische Primärinfektion ausgeschlossen und Fehldiagnosen vermieden werden [108, 116]. Bei Seropositivität bietet das Fehlen der beiden Spätmarker (EBNA1-IgG und VCA p18-IgG) einen Hinweis auf eine akute Infektion [147].

Das Bandenverhältnis der VCA-IgG-Antikörper zueinander kann eine weitere wichtige Entscheidungshilfe zur zeitlichen Einordnung einer EBV-Infektion sein, dennoch gibt es unterschiedliche Ergebnisse der nachweisbaren Immunantworten bei Verwendung von Line-Immunoblots verschiedener Hersteller in Abhängigkeit der verwendeten Antigene und deren Aufbereitungen. Mit dem EBV Line IgM Immunoblot werden bei Primärinfektionen häufig Anti-VCA gp125 und Anti-EA-D nachgewiesen, jedoch wird auch VCA p18-IgM bereits im frühen Stadium der Infektion detektiert. Da VCA p18-IgM erfahrungsgemäß sehr lange nach einer Infektion persistieren kann und im Rahmen anderer Primärinfektionen, insbesondere bei CMV-Primärinfektion, sowohl VCA p18- als auch VCA gp125-IgM mittels Immunoblot im Rahmen einer Kreuzreaktivität nachweisbar sein können, kann anhand des Musters im IgM-Immunoblot keine EBV-Primärinfektion diagnostiziert werden.

Die Interpretation der EBV-Serologie setzt eine große Erfahrung des Befunders hinsichtlich der Kenntnis von Besonderheiten der verwendeten Teste voraus. Für die EBV-Serologie lässt sich kein allgemeingültiges starres Interpretationsschema anwenden, da

die serologischen Immunantworten nicht nur testabhängig, sondern auch individuell sehr unterschiedlich ausfallen können.

Die zusätzliche Nutzung insbesondere des IgG-Line-Immunoblots als ergänzenden Test zum Screening-Suchprofil mit seinen frühen (z. B. VCA gp125 und EA) und späten (VCA p18 und EBNA1) Antigenen, dem Verhältnis der detektierten VCA-Antikörper zueinander und der Kenntnis testspezifischer Besonderheiten, wie typische Titerhöhen und Antikörperrelationen zueinander bei Primärinfektion und der Durchseuchungstiter in den Screening-Testen, lassen einen erfahrenen Auswerter einen sehr hohen Prozentsatz der EBV-Serologien schon mittels Erstbefund sicher einordnen. Nur in Ausnahmefällen wird die Untersuchung der IgG-Avidität, welche den Reifegrad der IgG-Antikörper im Verlauf einer Infektion beurteilen kann oder eine längerfristige Verlaufskontrolle notwendig.

Atypisch frühe bzw. unspezifische EBNA1-Nachweise können anhand der Bandenkonstellationen im IgG-Immunoblot erkannt und damit unnötige umfangreiche differentialdiagnostische serologische Abklärungen (wie z. B. CMV, HIV, A-Streptokokken, Toxoplasma gondii, Bartonella, HHV-6, Parvovirus B19) vermieden werden. Umgekehrt könnte durch die Fehldiagnose einer frischen EBV-Infektion bei fehlendem EBNA1-IgG-Nachweis eine weitere Abklärung z. B. einer akuten HIV-Infektion versäumt werden, obwohl das VCA-IgG-Bandenverhältnis zueinander zumindest eine frische Infektion hätte ausschließen können. Es ist wichtig, schwangerschaftsrelevante Infektionen (z. B. CMV, Toxoplasmose, Parvovirus B19) von einer harmlosen EBV-Primärinfektion in der Erstuntersuchung sicher zu differenzieren.

1.7 Fragestellung

Um den EBV-Infektionsstatus definieren zu können, werden zur Routine-Diagnostik regelmäßig mehrere Antigene verschiedener Antigengruppen eingesetzt, die vom Virus in bestimmten Infektionsphasen exprimiert werden: EA (Early-Antigene), VCA (Virus-Capsid-Antigene) und EBNA (Epstein-Barr Virus nukleäre Antigene). Dabei besteht jede Gruppe aus einer Vielzahl von Antigenen mit unterschiedlicher Anzahl von Epitopen. Die von den Herstellerfirmen genutzte Antigenvielfalt einschließlich der Antigen-Aufbereitungen und die Vielzahl der möglichen Testmethoden bedingt bei bislang fehlender Standardisierung zum Teil stark diskrepante Ergebnisse bei einzelnen Seren in der Routine-Diagnostik mit den handelsüblichen Testen. Anlass zu dieser Studie gab ein Testwechsel von den EBV-Lineassays der Firma (Fa.) Virotech zur Fa. Viramed in der Routineanalytik des LADR Zentrallabors Dr. Kramer & Kollegen. Mittels EBV IgG Line Immunoblot der Fa. Virotech konnte bei den länger zurückliegenden EBV-Infektionen zumeist das typische Bandenverhältnis mit Überwiegen der VCA p18-IgG- gegenüber der VCA gp125-IgG-Reaktivität nachgewiesen werden. Insbesondere bei den EBNA1-IgG-negativen Seren und Patienten mit positivem IgM-Nachweis war diese Erfahrung eine wichtige Entschei-

derungshilfe zur Differenzierung zwischen zurückliegender, kürzlicher und frischer EBV-Infektion. Nach dem Testwechsel zum EBV ViraStripe (Viramed) vermuteten wir eine Reduktion der Fälle von zurückliegenden EBV-Infektionen mit diesem IgG-Bandenmuster. Die EBV-Infektion läuft zwar meist nach einem bestimmten serologischen Grundmuster ab, jedoch kann die Diagnostik im Einzelfall aufgrund einer großen Variabilität der Immunantwort sehr komplex sein. Eine sichere EBV-Diagnostik ist auch aufgrund polyklonal stimulierter, kreuzreagierender oder auch lang persistierender IgM-Nachweise in der Erstuntersuchung der Patientenserien nicht immer möglich. Ein verlässlicher Nachweis bestimmter Bandenkonstellationen im IgG-Immunoblot könnte hilfreich sein, um zumindest eine ganz frische Infektion eher unwahrscheinlich zu machen. Daher wurde nach Diskussion mit der Fa. Viramed vereinbart, einen Methodenvergleich der beiden kommerziellen EBV-Immunoblots unter zeitgleicher Austestung eines Forschungs- und Entwicklungsimmunoblots (F&E EBV ViraStripe), welcher eigens von der Fa. Viramed für diese Studie hergestellt wurde, durchzuführen.

In einem ersten Schritt sollten die Seren mit den kommerziell erhältlichen Immunoblots der Firmen Virotech und Viramed bezüglich ihres EBV-Serostatus als Material eingestuft werden, um anschließend die erhaltenen Antikörperreaktionsmuster auf eventuelle Unterschiede überprüfen zu können.

Hauptziel der Arbeit war es, mittels dann vergleichender Auswertung des F&E EBV ViraStripe die EBV-Diagnostik zu verbessern. Es sollten eindeutigere EBV-Antikörperreaktionsmuster, insbesondere bei den zurückliegenden Infektionen, in der Immunoblotbewertung erhalten werden. Zur Optimierung des F&E EBV ViraStripe IgG sollte herausgefunden werden, ob mit Verwendung niedrigerer Antigen-Konzentrationen bzw. durch Einsatz anderer Antigene eine stärkere Reaktivität des VCA p18-IgG bei den länger zurückliegenden Infektionen zu erzielen war, ohne dadurch an Sensitivität des VCA gp125-IgG bei den frischen Infektionen einzubüßen. Es sollte mit dem F&E EBV ViraStripe IgG weiter geprüft werden, ob mit einer niedrigeren EBNA1-IgG-Konzentration die Anzahl atypisch früher bzw. unspezifischer EBNA1-IgG-Reaktivitäten bei frischen Infektionen zu minimieren und somit die Spezifität zu verbessern wäre.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, unspezifische, kreuzreagierende oder lang persistierende IgM-Nachweise im EBV-Immunoblot unter Beibehaltung oder Erhöhung der diagnostischen Sensitivität bei den frischen EBV-Infektionen durch Verwendung anderer Antigene bzw. anderer Antigenkonzentrationen zu reduzieren. Zur Erhöhung der Spezifität in der IgM-Analyse wurden zusätzlich Seren von Patienten mit frischer Toxoplasmose bzw. CMV-Primärinfektion in die Studie mit einbezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Seren

Einen Überblick über die verwendeten Seren gibt Tabelle 2.1.

Im Rahmen von Routine-Blutuntersuchungen auf eine EBV-Infektion wurden ins LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen, Lauenburger Str. 67, 21502 Geesthacht, Vollblut in handelsüblichen Serum-Monovetten oder bereits abzentrifugierte Seren zur EBV-Antikörperbestimmung eingesandt. Während des Untersuchungszeitraums April 2011 bis Mai 2011 wurden unter Einhaltung des geltenden Datenschutzes 300 dieser Seren unmittelbar nach der routinemäßigen Austestung aus dem Kühlarchiv (4°C) herausgesucht, in verschließbare Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Austestung bei -20°C eingefroren.

Tabelle 2.1: Übersicht zu den verwendeten Seren und Immunoblots

Anzahl	Seren mit	Austestung mittels
300	bekanntem EBV-Status	EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) F&E EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed)
32	frischer bzw. kürzlicher CMV-Infektion	EBV ViraStripe IgM (Viramed) F&E EBV ViraStripe IgM (Viramed)
11	frischer Toxoplasmose	EBV ViraStripe IgM (Viramed) F&E EBV ViraStripe IgM (Viramed)
11	bekanntem EBV-Status	EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed)

Zusätzlich wurden 32 Seren von Patienten mit frischer bzw. kürzlicher Cytomegalievirus-Infektion und 11 Patientenserumproben mit frischer Toxoplasma-Infektion aus dem Frostarchiv des Labors für Proben mit besonderen Ergebniskonstellationen ausgewählt und anonymisiert. Bis zum Zeitpunkt ihrer Verwendung blieben diese Proben bei -20°C gefroren. Bei der Auswahl dieser Seren wurde im Vorfeld darauf geachtet, dass in der Routineanalytik des Labors zusätzlich eine EBV-Serologie untersucht wurde. Während der laufenden Studie wurden außerdem 11 Seren mit der Anforderung einer EBV-Serologie nach abgeschlossener Routineanalytik mittels EBV ViraStripe IgG/IgM im Labor anonymisiert. Diese Serumproben wurden anschließend im Gefrierschrank bei -20°C für 2 Tage bis zur erneuten Untersuchung verschlossen aufbewahrt. Für die vorliegende Studie standen somit insgesamt 354 anonymisierte Seren zur Verfügung.

2.1.2 Testkits

Cellognost-Mononucleosis	Siemens
EBV IgG/IgM Line Immunoblot	Virotech
EBV ViraStripe IgG/IgM	Viramed
Enzygnost Anti-CMV IgG/IgM	Siemens
ETI-EBV-M reverse	DiaSorin
ETI-EA-G	DiaSorin
ETI-EBNA-G	DiaSorin
ETI-VCA-G	DiaSorin
F&E EBV ViraStripe IgG/IgM	Viramed
LIAISON CMV IgG II	DiaSorin
LIAISON CMV IgM II	DiaSorin
LIAISON EA IgG	DiaSorin
LIAISON EBNA IgG	DiaSorin
LIAISON EBV IgM	DiaSorin
LIAISON TOXO IgM	DiaSorin
LIAISON VCA IgG	DiaSorin
Platelia Toxo IgA TMB	BIORAD
recomBlot CMV IgG/IgM	Mikrogen
VIDAS CMV IgG Avidity	bioMérieux
VIDAS Toxo Competition	bioMérieux
VIDAS Toxo IgG II	bioMérieux
VIDAS Toxo IgG Avidity	bioMérieux
VIDAS Toxo IgM	bioMérieux

2.1.3 Geräte

Barcodescanner Quantum T MS 3580	Metrologic
Bee Blot 50	Bee Robotics Ltd
BEP III	Siemens
Elektrowarmhalteplatte für GN 1/1	Bartscher
Gefrierschrank Typ 400771	Liebherr
Ionenaustauscher	SG
Kühlschrank Typ 200061	Liebherr
LIAISON	DiaSorin
LIAISON XL	DiaSorin
Schüttler Promax 2020	Heidolph

Vidas	bioMérieux
Viracam mit Virascan-2.07 Software	Viramed
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich

2.1.4 Sonstige Materialien

Combitips advanced 5ml	Eppendorf
EBV ViraStripe IgG/IgM/IgA Negative Control	Viramed
EBV ViraStripe IgG/IgM Positive Control	Viramed
EBV ViraStripe IgG/IgM Weak Positive Control	Viramed
Einzelinkubationswannen 50 Rinnen V-UVNUIG	Viramed
Eppendorfpipette 10-100 µl	Eppendorf
Eppendorfpipette 100-1000 µl	Eppendorf
Eppendorfpipettenspitzen 100 µl	Eppendorf
Eppendorfpipettenspitzen 1000 µl	Eppendorf
Messzylinder 1000 ml	Simax
Multipette plus	Eppendorf
Plastikpinzette	Semadeni
Reagenzienbehälter 1000 ml	Nalgene
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf
Virasorb-RF-Absorbens	Viramed
Zentrifugenröhre 50ml	Sarstedt

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung und Datenerhebung

Jede im Labor eingehende Probe wurde mit einem Barcode und einer 10-stelligen Nummer versehen. Diese Kennzeichnung allein ermöglichte keine Patientenidentifikation. Eine Zuordnung des Materials zum Patienten konnte nur mittels Überweisungsschein, welcher mit dem identischen Barcode versehen wurde, durch die elektronische Datenverarbeitung erfolgen. In dem Laborinformationssystem (LIS) MOLIS 4.20 der Fa. Vision4Health sind alle Resultate unter Achtung des geltenden Datenschutzes für medizinische Laboratorien gespeichert worden.

Unmittelbar nach Probeneingang wurden die Vollblutproben im Laboralltag routinemäßig 10 Minuten bei 3500 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert und entsprechend der Untersuchungsaufträge vollständig bearbeitet. Im Anschluss erfolgte die Verwahrung der Seren für 5 Tage im Kühlarchiv bei 4°C. Bei besonderen serologischen Konstellationen werden

in der Regel Folgeuntersuchungen im Parallelansatz mit dem Vorserum notwendig. Solche Seren wurden in der Laborroutine in einem speziellen Frostarchiv bei -20°C für zu erwartende Verlaufsuntersuchungen eingefroren.

Aus dem LIS wurden für die Promotionsarbeit Arbeitsplatzlisten unter Abfrage spezifischer Laborverfahren (EBV-, CMV- oder Toxoplasmose-Serologie) erstellt. Diese Listen wiesen die Barcodenummern und die Resultate nach Verfahrensbezeichnungen auf. Zusätzlich zu den Serologien vorhandene Angaben wie Lymphozyten, heterophile Antikörper, Transaminasen, C-reaktives Protein (CRP) und das Alter des Patienten wurden aus dem LIS abgefragt und als Resultat übernommen. Anhand der neu erstellten Listen wurde das Studienmaterial über die Barcode- und Archivnummer pseudoanonymisiert aus dem gekühlten Probenarchiv herausgesucht. Die Serumröhrchen und die dazugehörigen Laborresultate erhielten dann jeweils eine neue fortlaufende Nummer. Durch das anschließende Verwerfen der pseudoanonymisierten Liste wurde eine Zuordnung zur Identität des Patienten unmöglich gemacht. Die aus dem LIS gewonnenen Daten wurden in einer Excel-Tabelle unter den neuen fortlaufenden Probennummern zusammengestellt.

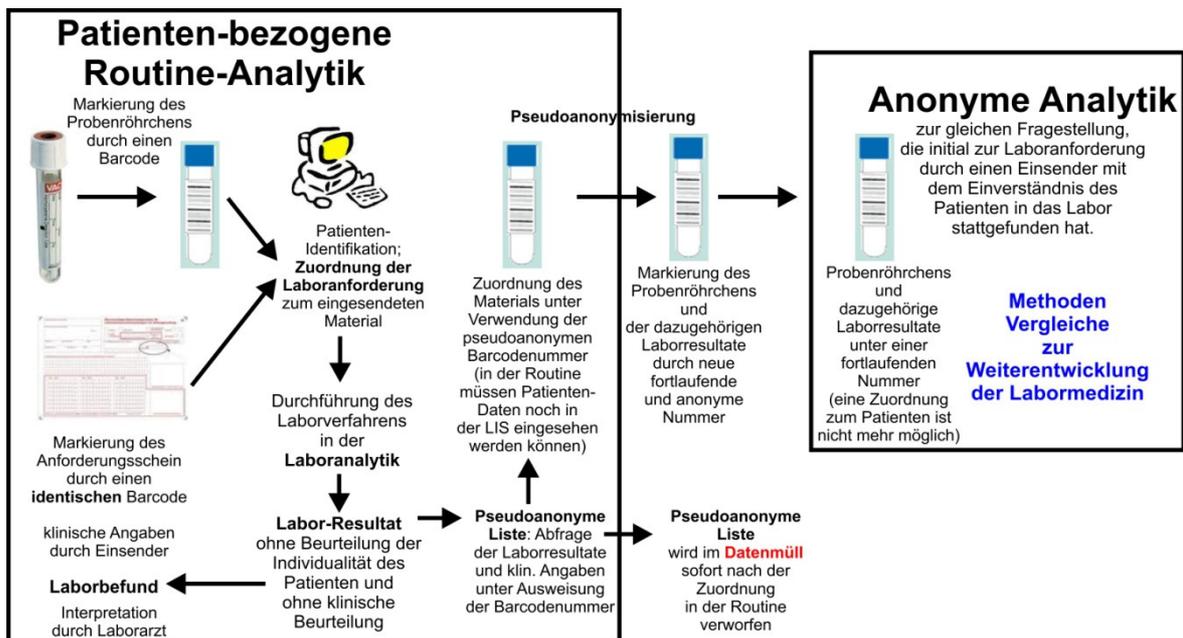


Abbildung 2.1: Anonyme Analytik zur Weiterentwicklung der Labormedizin, für Vergleichsuntersuchungen und Optimierung im LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen unter Beachtung des Datenschutzes des Patienten

Im Rahmen der Studie erfolgte bei allen Serumproben über die vom Einsender angeforderten Untersuchungen hinaus keine weitere Laboranalyse. Alle Untersuchungen im Rahmen der Studie erfolgten in anonymisierter Form. Die Promotionsarbeit zum labordi-

agnostischen Methodenvergleich und deren Weiterentwicklung wurde ordnungsgemäß bei der zuständigen Ethikkommission der Universität zu Lübeck angezeigt (Aktenzeichen Nr. 11 232A). Klinische Angaben waren kaum auf den Überweisungsscheinen vermerkt und konnten daher nur selten in der Studie berücksichtigt werden.

Um einen Überblick zur Durchseuchung mit EBV im Patientenkollektiv zu erhalten, wurden retrospektiv für den Zeitraum von Januar 2008 bis einschließlich Ende April 2011 mit Hilfe der Daten aus dem LIS altersabhängige Seroprävalenzraten ermittelt. Für die Berechnungen wurden nur die Erstbefunde auf VCA-IgG-Antikörper (ELISA) von 57.966 untersuchten Patienten betrachtet. Die Altersgruppe unter einem Jahr wurde wegen möglicher maternaler Leihantikörper nicht in der Statistik berücksichtigt.

2.2.2 Klassifizierung der Seren

2.2.2.1 EBV-Seren

Im Rahmen der täglichen Laborroutine wurden im Zeitraum zwischen April und Mai 2011 alle 300 Seren auf EBV-spezifische Antikörper mittels ELISA-Test-Profil der Fa. DiaSorin auf dem BEP III (Siemens) untersucht. Die Enzyme-linked Immunosorbent Assays detektieren in einer quantitativen immunenzymatischen Bestimmung spezifische IgM- und IgG-Antikörper gegen das Epstein-Barr-Viruscapsid-Antigen (synthetisches Peptid p18), spezifische IgG-Antikörper gegen das synthetische Peptid vom EBNA1-Protein (59 Aminosäure-Peptid ohne Gly-Ala-Sequenz) sowie gegen das rekombinante Polypeptid (47 Kilodalton (kD)) des Early-Antigen Diffuse (EA-D).

In dem Zeitraum, in dem die Proben gesammelt wurden, sind im Rahmen einer Testumstellung der EBV-Diagnostik im Routinelabor 126 der Seren zusätzlich im CLIA-Test-Profil parallel auf dem Gerät LIAISON XL (DiaSorin) analysiert worden. Es handelt sich hierbei um einen indirekten quantitativen Nachweis der spezifischen EBV-Antikörper auf dem Prinzip der Chemilumineszenz. In den CLIA-Testen auf dem LIAISON XL werden dieselben EBV-Antigene wie in ihren ELISA-Testen verwendet, jedoch detektiert der CLIA in der IgM-Analyse laut Herstellerangaben sensitiver als der ELISA.

229 Seren wurden bereits in der Routinediagnostik zur weiteren Differenzierung zusätzlich mit den EBV ViraStripes IgG/IgM (Viramed) untersucht. Es handelt sich hierbei um einen Immunoblot auf der Grundlage eines Enzym-Immunoassays im Line/Stripe Format. Ein diagnostischer Zugewinn im Immunoblot wird durch die zusätzliche Austestung auf Antikörper gegen VCA gp125 und der somit ermöglichten Beurteilung der Bandenverhältnisse zwischen VCA p18- und VCA gp125-Antikörpern sowie durch einen sensitiveren EBNA1-IgG-Nachweis und einen zusätzlichen Nachweis von EA-D-IgM-Antikörpern erreicht. Die

in den Blots und im ELISA verwendeten unterschiedlichen Antigenaufbereitungen des VCA p18 zeigten zudem unterschiedliche Reaktionsspektren.

Bei 29 der Seren wurde gleichzeitig ein Test auf heterophile Antikörper angefordert. Der qualitative Nachweis von heterophilen IgM-Antikörpern erfolgte im direkten Erythrozytenagglutinationstest Cellognost-Mononucleosis (Siemens).

Soweit vorhanden, wurden in die Klassifizierung der Seren das Alter, Vorbefunde, Transaminasen, CRP, der CMV-Status, eine Lymphozytose sowie die heterophilen Antikörper einbezogen. Aus den vorselektierten Seren wurden überwiegend sicher abgelaufene und frische Infektionen ausgewählt. Seronegatives Material wurde in geringer Anzahl als Kontrolle bei den Untersuchungen mitgeführt. Zusätzlich wurden unklare bzw. fragliche Konstellationen aus der Routineanalytik zur weiteren Klassifizierung in die Studie eingeschlossen.

2.2.2.2 Einstufung des Materials in einen EBV-Serostatus nach Antikörperreaktionsmuster der Immunoblots

Unter Berücksichtigung der Interpretationskriterien der Fa. Viramed (Gebrauchsanweisung EBV ViraStripe IgG/IgM Testkit) und der empfohlenen Blotbeurteilung der Fa. Virotech (Gebrauchsanweisung EBV IgG/IgM Line Immunoblot Testkit) erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit der Antikörperreaktionsmuster die Einteilung der Immunblotergebnisse für jeden Test in eine bestimmte Subgruppe eines Serostatus. Grundsätzlich erfolgte eine Einteilung in den Serostatus „negativ“, „frisch“, „kürzlich“, länger „zurückliegend“ oder „unklar“. Diese Zuordnung war nicht gleichzusetzen mit dem tatsächlichen Infektionsstatus des Patienten und in der Routinediagnostik nicht ausschließlich entscheidend für die Befundung. Die Eingruppierung wurde anhand typischer Antikörperreaktionsmuster mit Nachweis von Früh- und/oder Spätmarkern vorgenommen. Die serologische Antwort bei einer EBV-Infektion kann zwar individuell sehr variieren, jedoch folgt sie meist einem gewissen Grundmuster. Die Erfahrungswerte mit den Testen beider Immunoblot-Hersteller wurden genutzt, um einen idealisierten zeitlichen Ablauf der Antikörperantwort einer EBV-Infektion (siehe Tabelle 1.1, Seite 13) schematisch darzustellen. Nach diesem Schema erfolgte dann die Gruppeneinteilung in einen Serostatus zur Klassifizierung der Seren (siehe Interpretationsschema Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Interpretationsschema - Serogruppen-Einteilung anhand der Antikörperreaktionsmuster in frische, kürzliche, zurückliegende Infektionen, Seronegativität und unklare Konstellationen

	Gruppe	EBNA1-IgG	VCA-IgG o. EA-D-IgG*	VCA-IgM*	Serostatus
I	1	negativ	gp125 EA-D	gp125 gp125 ≥ p18	frisch
	2	negativ	gp125	p18 p18 > gp125	frisch
	3	negativ	gp125 > p18	gp125 ≥ p18 gp125	frisch
	4	negativ	gp125 > p18	p18 p18 > gp125	frisch
II	5	positiv	p18 > gp125 p18	negativ oder p18	zurückliegend
	6	positiv	gp125 = p18	negativ oder p18	zurückliegend
	7	negativ	p18 > gp125 p18	negativ oder p18 negativ	zurückliegend
	8	positiv	gp125 > p18 gp125	negativ oder p18 negativ	zurückliegend
III	9	negativ	negativ	negativ	seronegativ
IV	10	negativ	p18 = gp125	gp125 gp125 ≥ p18 p18 > gp125 p18	kürzlich
	11	negativ	p18 > gp125 p18	gp125 ≥ p18 gp125 p18 > gp125	kürzlich
	12	positiv	p18 = gp125	gp125 p18 > gp125	kürzlich
	13	positiv	p18 > gp125	gp125 gp125 = p18	kürzlich
V	14	negativ negativ negativ negativ	negativ gp125 EA-D p18	positiv negativ negativ p18	unklar frische Infektion nicht auszuschließen
	15	positiv	gp125 gp125 > p18	gp125 ≥ p18	unklar V.a. frische Infektion mit atypisch frühem EBNA1-IgG
	16	negativ negativ	p18 = gp125 gp125 > p18	negativ negativ	unklar V.a. zurückliegende Infektion
	17	positiv	negativ EA-D	negativ	unklar DD: zurückliegend oder unspezifisches EBNA1-IgG

* Das EA-D wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur bei isoliert von den VCA-Antikörpern autretendem Nachweis im IgG-Immunoblot aufgeführt. Zum einen, weil isolierte EA-D-IgM-Nachweise in den Viramed-Blots nur als schwache Banden detektiert wurden und somit ebenso wie der isolierte Nachweis im Virotech-Test als negativer Blot zu bewerten war (siehe Tabelle 2.6), zum anderen, weil EA-D-IgM-Antikörper bei Primärinfektionen immer zusammen mit VCA-IgM-Antikörpern nachgewiesen wurden.

I. Frische Infektionen:

Bei akuten Primärinfektionen fand sich in der Regel als erster Marker das VCA gp125-IgM. IgG-Antikörper gegen EBNA1 als Spätmarker waren negativ. VCA p18-IgM-Antikörper traten häufig schon in der frühen Phase einer EBV-Primärinfektion auf. Ein Nachweis der frühen IgG-Antikörper (Anti-EA-D und/oder Anti-VCA gp125) in Kombination mit einem positiven IgM-Antikörper-Nachweis (Anti-VCA gp125 und/oder Anti-VCA p18) wurde als frische Infektion charakterisiert. Nicht selten fand sich bei den frischen Infektionen auch schon ein VCA p18-IgG, allerdings im Verhältnis zum VCA gp125-IgG in der Regel mit deutlich schwächerer Intensität.

II. Länger zurückliegende Infektionen:

Der Nachweis einer deutlichen EBNA1-IgG-Bande (Spätmarker) in Kombination mit VCA-IgG-Antikörpern bei gleichzeitig negativem IgM-Befund bzw. lediglich schwach reaktiver VCA p18-Bande im Immunoblot der Klasse IgM zeigte gewöhnlich das Bild einer abgelauenen Infektion. In den meisten Fällen war der zweite Spätmarker (VCA p18-IgG) deutlich positiv. Seren mit fehlendem EBNA1-IgG-Nachweis und oben genannter IgM-Konstellation konnten aufgrund des starken Nachweises von VCA p18-IgG zu den zurückliegenden Infektionen zugeordnet werden. VCA p18-IgM-Antikörper persistierten zumeist lange und waren im Gegensatz zu den VCA gp125-IgM-Antikörpern häufig über viele Wochen nachweisbar.

III. Seronegativität:

Proben mit keiner Bande oder deutlich schwächeren Banden als die Cut off-Kontrolle wurden als seronegativ bewertet.

IV. Kürzliche Infektionen:

Bei den kürzlich zurückliegenden Infektionen fanden sich gleichzeitig Früh- und Spätmarker in unterschiedlichen Kombinationen. Während im IgG-Immunoblot zumindest einer der Spätmarker (Anti-VCA p18, Anti-EBNA1) sich als deutlich positive Bande darstellte, waren häufig noch IgM-Antikörper gegen VCA gp125 im Immunoblot nachweisbar. Eine Ausnahme bildete die Gruppe 10 mit gleich starker VCA-IgG-Antwort, wobei auch ein isolierter VCA p18-IgM-Nachweis möglich war (siehe Tabelle 2.2). Da ein VCA p18-IgG-Nachweis bei einer EBV-Infektion für gewöhnlich etwas zeitverzögert nach den VCA gp125-IgG-Antikörpern detektiert wird, diente er als zweiter Spätmarker. Die Intensität der VCA gp125-IgG-Bande nahm häufig im weiteren Verlauf einer Infektion wieder ab, während die Intensität der VCA p18-IgG-Bande mit zunehmender Infektionsdauer an Stärke gewann.

V. Unklare serologische Konstellationen

Hierunter wurden u.a. Seren eingeordnet, bei denen eine frische EBV-Infektion mit einmaliger Untersuchung (z. B. isoliert nachweisbaren IgM-Ak) nicht ausgeschlossen werden konnte. Vermeintlich frische EBV-Primärinfektionen mit einem atypisch frühen EBNA1-IgG-Nachweis im Immunoblot bei ansonsten eindeutiger Antikörperkonstellation einer frischen EBV-Primärinfektion wurden vorerst auch den unklaren Konstellationen zugeordnet. Eine weitere Gruppe bildeten scheinbar alte Infektionen mit fehlendem EBNA1-IgG-Nachweis und negativ getesteten IgM-Antikörpern, bei denen die Bandenintensität von VCA p18-IgG nicht stärker als die des VCA gp125-IgG war. Seren mit isoliertem EBNA1-IgG im Immunoblot bzw. lediglich kombiniertem Nachweis von EA D-IgG-Antikörpern und zugleich negativer IgM-Serologie wurden zunächst als unklar eingruppiert, da allein mittels der Immunoblots keine eindeutige Zuordnung zu den zurückliegenden Infektionen oder einer unspezifischen Reaktion erfolgen konnte. Seren mit sehr selten auftretenden Antikörperreaktionsmustern wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit ohne eigenen Serostatus den unklaren Seren zugeordnet.

2.2.2.3 Toxoplasmose-Seren

11 Seren von 7 verschiedenen Patienten wurden in der Laborroutine vor Beginn dieser Studie mit nachfolgend beschriebenen Testsystemen als frische Toxoplasmose klassifiziert. Die Proben waren mit dem Screeningtest VIDAS Toxo Competition (polyvalent) der Fa. bioMérieux mittels Enzyme-linked Fluorescence Assay-(ELFA)-Technik auf dem Gerät Vidas untersucht worden. Als Folgeanalytik bei reaktivem Ergebnis schlossen sich dann der Nachweis von Toxoplasma-IgG-Antikörpern (VIDAS Toxo-IgG II), ein spezifischer IgM-Antikörpertest (VIDAS Toxo-IgM) und die IgG-Aviditätsmessung (VIDAS Toxo-IgG-Avidity) der Fa. bioMérieux mittels ELFA-Technik, sowie der Nachweis von Toxoplasma-IgA-Antikörpern (Platelia Toxo IgA TMB) der Fa. BIORAD, einem Enzymimmunoassay mit doppelter „Sandwich“-Technik an. Als zweiter quantitativer Toxoplasma-IgM-Antikörpertest wurde ein CLIA auf dem Gerät LIAISON (DiaSorin) durchgeführt. Zusätzlich war in der Routinediagnostik des Labors bei jeder dieser Proben eine zurückliegende EBV-Infektion mit deutlich positiven EBNA1-IgG-Antikörpern nachgewiesen worden. Acht dieser Toxoplasmose-Infektionen konnten in der Laborroutineanalytik mittels serologischer Verlaufsuntersuchung bestätigt werden. Zehn Seren wiesen im ETI-EBV-M reverse (EIA) der Fa. DiaSorin eine positive IgM-Reaktivität auf. Eine Probe lag mit dem Rohwert im EBV-IgM-EIA nur knapp unter dem Cut off.

2.2.2.4 Cytomegalievirus-Seren

Vor Beginn des Methodenvergleichs waren die verwendeten 32 Aliquote der Seren mit

frischer bzw. kürzlicher CMV-Infektion in der Routinediagnostik des Labors klassifiziert und im Frostarchiv für Proben mit besonderen Ergebniskonstellationen archiviert worden. Als Suchteste wurden der Enzygnost Anti-CMV IgG/IgM der Fa. Siemens auf dem BEP III (ELISA), bzw. nach einem Testwechsel der CLIA-Test LIAISON CMV IgG II/IgM II der Fa. DiaSorin eingesetzt. Lagen positive IgM-Antikörperbefunde vor, wurden die Seren zur weiteren Differenzierung des Infektionsstaus routinemäßig mit dem recomBlot CMV IgG/IgM (Mikrogen) und der VIDAS CMV IgG Avidity von der Fa. bioMérieux (ELFA) untersucht. Im Laboralltag konnte die Diagnose einer CMV-Primärinfektion bei 19 Proben durch die Testung eines Verlaufsserums serologisch bestätigt werden. Bei allen 32 Seren war in der Routineanalytik des Labors gleichzeitig eine EBV-Serologie angefordert worden. Die Seren waren nicht klinisch charakterisiert und stammten von 26 verschiedenen Patienten. Da die Wahrscheinlichkeit eines kreuzreagierenden IgM-Nachweises bei sicher zurückliegenden EBNA1-IgG-positiven Seren mit positivem IgM-Befund in der EBV-Serologie bei gleichzeitigem Vorliegen einer CMV-Primärinfektion sehr hoch ist, wurden vornehmlich Proben (n = 30) mit dieser Konstellation ausgewählt. Isoliert positive VCA-IgM-Antikörper in der EBV-Serologie bei gleichzeitigem Nachweis einer CMV-Primärinfektion lassen ebenso eine IgM-Kreuzreaktivität vermuten und so wurden zusätzlich 2 Seren mit diesem Antikörperreaktionsmuster in die Studie eingeschlossen. Mittels Verlaufskontrolle konnte die Kreuzreaktivität bei einem der 2 Seren aufgrund der fehlenden IgG-Serokonversion bestätigt werden.

2.2.3 Prinzip des EBV Lineassay

Bei den Enzymimmunoassays im Line-Format wurden aufgereinigte EBV-spezifische Antigene bzw. Antigen-Peptide an einer definierten Linie auf eine Nitrozellulosemembran durch ein spezielles Sprühverfahren vom Hersteller aufgebracht und fixiert.

Der anschließende Testablauf gleicht dem eines klassischen ELISA-Testes:

Sind Antikörper gegen ein spezifisches Antigen in einer Patientenprobe vorhanden, bilden diese an der entsprechenden Position auf dem Teststreifen einen festen Antigen-Antikörper-Komplex. Durch Waschschrte werden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antihuman-IgG- bzw. IgM-Antikörpern. Ungebundenes Konjugat wird durch erneutes Waschen entfernt. Das Chromogen/Substrat färbt bei seiner enzymatischen Umsetzung durch das Konjugat den Antigen-Antikörper-Komplex als blau-lila farbene Bande an. Diese Reaktion wird durch Abgießen der Flüssigkeit beendet. Abschließend erfolgt ein Waschvorgang.

2.2.4 Austestung der Seren mittels Immunoblot

Einen Überblick zu den verwendeten Seren und Immunoblots der vorliegenden Arbeit gibt

Tabelle 2.1 auf Seite 17. Für den Methodenvergleich wurden alle 300 EBV-Seren mit den von der Fa. Viramed kommerziell erhältlichen EBV ViraStripe IgG/IgM Immunoblots zum qualitativen Nachweis EBV-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper und in den EBV IgG/IgM Line Immunoblots der Fa. Virotech parallel getestet. Gleichzeitig erfolgte eine Untersuchung dieser Seren in den eigens von der Fa. Viramed für diese Studie gebrauchsfertig hergestellten F&E EBV ViraStripe IgG/IgM Immunoblots zur Optimierung des EBV ViraStripe (Viramed) im LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen.

11 aliquotierte Seren mit bekanntem EBV-Status wurden 2 Tage nach der Routineanalytik des Labors und zwischenzeitlicher Lagerung bei -20°C erneut mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM derselben Charge untersucht. Die für die Studie eingefrorenen 11 Toxoplasma- und 32 Cytomegalievirus-Seren mit gesicherter frischer bzw. kürzlicher Infektion wurden nur im F&E EBV ViraStripe IgM Immunoblot analysiert. Durch Fachpersonal aus der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Kintrup des F&E-Labors der Fa. Viramed wurden diese Seren dann anschließend im EBV ViraStripe IgM Immunoblot mit und ohne Zusatz von Virasorb-Rheumafaktor (RF)-Absorbens (Viramed) untersucht.

2.2.5 Testvorbereitungen

Um die taggleiche parallele Untersuchung der IgG- und IgM-Antikörper jeder Serie mittels der 3 zu testenden EBV-Immunoblots durchführen zu können, wurden jeweils 20 der 300 EBV-Seren 30 Minuten vor Testbeginn langsam aufgetaut, auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht und vor der Analytik gut durchmischt. In dieser Anzahl konnte die parallele Untersuchung der Seren unter exakt den gleichen Bedingungen im EBV ViraStripe Immunoblot (Viramed), im EBV Line Immunoblot (Virotech) und im F&E EBV ViraStripe (Viramed) gewährleistet werden.

30 Minuten vor Testbeginn wurden alle Bestandteile der Testkits und das deionisierte Wasser auf Raumtemperatur gebracht. Nicht benötigte Teststreifen wurden sofort in die Originalverpackung zurückgegeben, dicht verschlossen und bei 2-8°C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Der Verdünnungs-/Waschpuffer lag in jedem Testkit in zehnfach konzentrierter Form vor und wurde täglich vor Testbeginn frisch angesetzt. Die Konzentrate wurden gemäß Herstellerangaben 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Bei den Testkits der Fa. Viramed war die zusätzliche Zugabe von 5 g Proben/Waschpulversalz erforderlich. Die Lösungen wurden im Anschluss gut gemischt und waren damit gebrauchsfertig. Danach wurden die IgG- und IgM-Konjugatkonzentrate nach den jeweils mitgelieferten Konjugatverdünnungstabellen mit den entsprechenden Waschpuffern verdünnt.

2.2.6 EBV Line Immunoblot der Firma Virotech

2.2.6.1 Antigene des EBV IgG/IgM Line Immunoblot

Das Antigenpeptid EBNA1 wurde nur auf dem IgG-Immunoblot verwendet. Die übrigen Antigene waren sowohl auf dem IgG- als auch auf dem IgM-Line Immunoblot aufgebracht. Genauere Angaben zu den verwendeten Antigenen oder Konzentrationen als in Tabelle 2.3 beschrieben, wurden vom Hersteller nicht gemacht.

Tabelle 2.3: Beschreibung der Antigene des EBV IgG Line Immunoblot (a) und EBV IgM Line Immunoblot (b) laut Gebrauchsinformation der Fa. Virotech. Im Anhang (siehe Abbildung 7.1, Seite 107) ist eine schematische Abbildung der Teststreifen zur Positionierung der Kontroll- und Antikörperbanden wiedergegeben.

a	Nomenklatur	Antigen	Konzentration
	EBNA1	Antigenpeptid des EBV Nukleären Antigen 1	keine Angaben
	VCA gp125	Affinitätsgereinigtes Virales Capsid Antigen Glykoprotein gp125	keine Angaben
	VCA p18	Antigenpeptid des Viralen Capsid Antigen p18	keine Angaben
	EA-D	Antigenpeptid des EA-D Early Diffuses Antigen	keine Angaben

b	Nomenklatur	Antigen	Konzentration
	VCA gp125	Affinitätsgereinigtes Virales Capsid Antigen Glykoprotein gp125	keine Angaben
	VCA p18	Antigenpeptid des Viralen Capsid Antigen p18	keine Angaben
	EA-D	Antigenpeptid des EA-D Early Diffuses Antigen	keine Angaben

2.2.6.2 Testdurchführung

Die Teste wurden gemäß den Herstellerangaben wie folgt durchgeführt (Gebrauchsanweisung für das EBV IgG/IgM Line Immunoblot Testkit der Fa. Virotech):

In je eine Vertiefung der Inkubationswanne wurde ein Nitrozellulose-Teststreifen der jeweils zu testenden Immunglobulinklasse (IgG bzw. IgM) mit der Plastikpinzette eingelegt. Die Beschriftung der Blotstreifen wies dabei nach oben. Nachfolgend wurden in jede Rinne 1,5 ml gebrauchsfertiger Verdünnungs-/Waschpuffer pipettiert. Zum vollständigen Benetzen und Befeuchten der Streifen wurde die Wanne 2 Minuten auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurden je Inkubationsansatz 15 µl unverdünntes Patientenserum bzw. 100 µl der Cut off-Kontrolle hinzugefügt. Die nachfolgend beschriebenen Schritte erfolgten weiter in teilautomatisierter Abarbeitung auf dem Bee Blot 50 (Bee Robotics Ltd).

Die Probeninkubation unter schüttelnden Bewegungen dauerte 30 Minuten. Während der

gesamten Testdurchführung wurde auf gleichmäßige Bedeckung aller Teststreifen mit den Reagenzien geachtet. Die Inkubationslösung wurde aus den einzelnen Rinnen wieder abgesaugt. Im Anschluss wurden die Teststreifen insgesamt dreimal mit jeweils 1,5 ml Waschpuffer pro Vertiefung in einem fünfminütigen Waschschrift gewaschen. Die Flüssigkeit wurde nach jedem Schritt vollständig entfernt. Für die nachfolgende Konjugatinkubation erfolgte die Zugabe von je 1,5 ml frisch hergestellter IgM- bzw. IgG-Konjugatlösung in die entsprechenden Vertiefungen. Nach 30 Minuten Inkubation auf dem Schüttler wurde die Konjugatlösung wieder abgesaugt. Die Teststreifen wurden erneut nach obigem Schema dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden alle Teststreifen 1 Minute mit *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) gespült. Für die folgende Inkubation wurde je Vertiefung 1,5 ml gebrauchsfertige Substratlösung zugegeben. Die zehnmünütige Entwicklung auf dem Schüttler wurde durch das Absaugen der Flüssigkeit beendet. Es schloss sich ein dreimaliger Spülvorgang mit je 1,5 ml *Aqua dest.* ohne Zwischeninkubation an. Die Wanne wurde aus dem Gerät genommen und die Flüssigkeit abgegossen. Die restliche Flüssigkeit wurde dann mit einem Handabsaugsystem entfernt. Die Teststreifen trockneten danach bei Raumtemperatur in der Inkubationswanne.

2.2.7 EBV ViraStripe Immunoblots der Firma Viramed

2.2.7.1 Antigene des EBV ViraStripe IgG/IgM

Bei den kommerziell erhältlichen EBV ViraStripe IgG/IgM wurden in der Fa. Viramed jeweils 4 Proteinlösungen (siehe Tabelle 2.4) in definierten Konzentrationen durch ein spezielles Sprühverfahren auf die Nitrozellulosemembranen aufgetragen. Zu den Standardkonzentrationen wurden vom Hersteller keine Angaben gemacht.

2.2.7.2 Herstellung des F&E EBV ViraStripe IgG/IgM

Die Herstellung der F&E EBV ViraStripe IgG- und IgM Immunoblots erfolgte hinsichtlich der verwendeten Antigene und Antigenkonzentrationen, welche im Verantwortungsbe- reich der Fa. Viramed ausgewählt wurden, getrennt. Die Antigenlösungen wurden im La- bor der Fa. Viramed Biotech AG hergestellt bzw. aufbereitet und entsprechend der Positi- onen (siehe Abbildung 7.3, Seite 108) dort mit einem Dispensierautomaten für Proteinlö- sungen auf die Nitrozellulosemembranen aufgetragen. Anschließend wurden die Memb- ranen geblockt, etikettiert und in Streifen geschnitten. Der Kontrollabschnitt auf jedem Streifen war identisch mit dem des EBV ViraStripe IgG/IgM. Die einzelnen Prozesse er- folgten in der Fa. Viramed unter denselben Bedingungen wie sie für die Produktion der kommerziell erhältlichen EBV ViraStripe Teste gelten. Der Unterschied zur kommerziellen Produktion bestand lediglich darin, dass aus Platzgründen auf den F&E EBV Vira- Stripe IgG/IgM Immunoblots die entsprechenden Konzentrationen der Antigenlösungen in

kleineren Volumina aufgetragen wurden.

Tabelle 2.4: Beschreibung der Antigene des EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed). Im Anhang (siehe Abbildung 7.2, Seite 107) ist eine Abbildung aus der Gebrauchsinformation der Fa. Viramed zur Positionierung der Kontroll- und Antikörperbanden wiedergegeben.

Nomenklatur	Antigen	Konzentration
VCA gp125	Natives Virales Capsid Antigen Glykoprotein 125: glykosiliert, Volllängenprotein 110	keine Angaben
EBNA1	EBV Nukleäres Antigen 1/ Protein 76: ca. 27 kDa Konstrukt vom C-terminalen Ende des Volllängenproteins; ca. ein Drittel des Gesamtproteins, N-terminale Region mit Gly-Ala repeat-Sequenzen ist deletiert	keine Angaben
EA-D p54	EA-D Early Diffuses Antigen/ Protein 54: ca. 28 kDa Protein bestehend aus multiplen Epitopen von verschiedenen Regionen des Volllängenproteins	keine Angaben
VCA p18	Virales Capsid Antigen/ Protein 18: trunkiertes Antigen, ca. ein Drittel des Volllängenantigens, Konstrukt: Sequenzen aus zwei immunodominanten Peptidregionen vom C-terminalen Ende	keine Angaben

Vor Verwendung der F&E EBV ViraStripe IgG/IgM-Teststreifen in dieser Studie wurde nach der gleichen Arbeitsvorschrift, wie sie für den EBV ViraStripe IgG/IgM gilt, bereits deren Eignung anhand einer Reihe gut charakterisierter Serumproben (Qualitätskontrollpanel der Fa. Viramed) durch das Fachpersonal der Fa. Viramed überprüft.

2.2.7.3 Antigene des F&E EBV ViraStripe IgG/IgM

Eine Übersicht über die verwendeten Antigene und deren Konzentrationen auf dem Forschungsblot der Fa. Viramed gibt Tabelle 2.5. Für diese Studie wurden alle Antigenlösungen des kommerziellen EBV ViraStripe IgG mit Ausnahme des EA-D p54, jeweils auch in einer niedrigeren Konzentration, auf die Nitrozellulosemembranen aufgetragen. Zur Optimierung des EBV ViraStripe IgG wurde das VCA p18 nicht nur als trunkiertes Antigen in unterschiedlichen Konzentrationen, sondern auch als Volllängenprotein verwendet. Zusätzlich wurde ein Fusionsprotein (FP) aus trunkierten Antigenen von VCA p18 und VCA gp125 auf die Membranen aufgesprüht, welches vom Hersteller mit hoher Sensitivität in der frühen Phase einer Primärinfektion charakterisiert wurde.

Tabelle 2.5: Beschreibung der Antigene des F&E EBV ViraStripe IgG (a) und IgM (b). Im Anhang (siehe Abbildung 7.3, Seite 108) ist eine Abbildung aus der Gebrauchsinformation der Fa. Viramed zur Positionierung der Kontroll- und Antikörperbanden wiedergegeben.

a	Nomenklatur	Antigen	Konzentration
	VCA gp125 A	Natives Virales Capsid Antigen	Standard
	VCA gp125 B	Glykoprotein 125*	0,5-fach VCA gp125 A
	EBNA1 A	EBV Nukleäres Antigen 1 p76*	Standard
	EBNA1 B		0,5-fach EBNA1 A
	EA-D p54	EA-D Early Diffuses Antigen p54*	Standard
	VCA p18 A	VCA p18 trunkiertes Antigen*	Standard
	VCA p18 B		0,75-fach VCA p18 A
	VCA p18 C	VCA p18 Volllängenprotein	keine Angaben
	FP-VCA	Fusionsprotein aus VCA p18 und VCA gp125: trunkierte Antigene; ca. 20% der Volllängen VCA p18 Sequenz und ca. 33% der Volllängen VCA gp125 Sequenz (mittlere Region) fusioniert	keine Angaben

b	Nomenklatur	Antigen	Konzentration
	VCA gp125 A	Natives Virales Capsid Antigen Glykoprotein gp125*	Standard
	EA-D p54	EA-D Early Diffuses Antigen p54*	Standard
	VCA p18 B	VCA p18 trunkiertes Antigen*	0,75-fach VCA p18 A
	VCA p18 D		0,67-fach VCA p18 B
	VCA p18 C	VCA p18 Volllängenprotein	keine Angaben
	VCA p18 E		0,33-fach VCA p18 C
	FP-VCA	Fusionsprotein aus VCA p18 und VCA gp125*	keine Angaben

* siehe Tabelle 2.4

Auf den IgM-Teststreifen wurden das EA-D p54 und das VCA gp125 in gleicher Konzentration, wie im kommerziell erhältlichen EBV ViraStripe IgM aufgetragen. Das EBNA1 fand keine Verwendung. Die auf dem EBV ViraStripe IgM verwendete kommerzielle Antigenlösung des VCA p18 wurde nur in zwei niedrigeren Konzentrationen auf dem Forschungsblot aufgesprüht. Das Volllängenprotein VCA p18 wurde ebenfalls in zwei verschiedenen Konzentrationen auf den IgM-Nitrozellulosemembranen aufgebracht. Auch das Fusionsprotein aus trunkierten Antigenen von VCA p18 und VCA gp125 wurde im F&E EBV ViraStripe IgM ausgetestet, da es insbesondere in der IgM-Analyse sensitiv bei den frischen EBV-Infektionen reagieren sollte.

2.2.7.4 Testdurchführung

Die Teste wurden nach den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt (Gebrauchsanweisung für das EBV ViraStripe IgG/IgM bzw. F&E EBV ViraStripe IgG/IgM Testkit der Fa. Viramed):

In die Rinnen der Inkubationswannen wurde mit Hilfe einer Kunststoffpinzette je ein Antigenstreifen entsprechend der jeweils zu untersuchenden Immunglobulinklasse eingelegt. Die Beschriftung der Teststreifen musste dabei nach oben weisen. Ohne die Teststreifen vorab zu benetzen, wurden je 20 µl unverdünntes Serum bzw. 100 µl Kontrollserum in die entsprechenden Rinnen pipettiert. Der Kontakt der Nitrozellulose-Streifen zum Serum wurde dabei vermieden. Pro Lauf wurde je ein gebrauchsfertiges Positiv-, Negativ- und schwach Positivkontrollserum der Fa. Viramed jeweils für die IgM- und IgG-Analyse mitgeführt. Die nachfolgend beschriebenen Schritte erfolgten in teilautomatisierter Abarbeitung auf dem Bee Blot 50 (Bee Robotics Ltd). Für die Probeninkubation wurde in jede einzelne Rinne der Inkubationsschale 1,5 ml Waschpuffer zugegeben. Ab jetzt wurde auf vollständige Benetzung der Teststreifen mit den Reagenzien geachtet.

Die Inkubationsansätze der Patienten- und Kontrollseren wurden für 35 Minuten auf den Schüttler gestellt. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig abgesaugt. Danach wurde insgesamt dreimal ein fünfminütiger Waschschrift pro Vertiefung mit 1,5 ml Waschpuffer durchgeführt. Die Flüssigkeit wurde nach jedem Waschschrift jeweils wieder vollständig abgesaugt. Nachfolgend wurde in die entsprechenden Rinnen je 1,5 ml frisch zubereitete IgM- bzw. IgG-Konjugatlösung zugegeben. Die Ansätze inkubierten für 15 Minuten auf dem Schüttler. Die Konjugatlösungen wurden nach abgeschlossener Inkubation wieder abgesaugt. Die Teststreifen wurden erneut nach obigem Schema dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von je 1,5 ml *Aqua dest.* mit anschließender einminütiger Inkubation unter schüttelnden Bewegungen. Für die folgende dritte Inkubation wurde je Vertiefung 1,5 ml gebrauchsfertige Chromogen/Substratlösung zugegeben. Die Entwicklung auf dem Schüttler dauerte 10 Minuten und wurde durch Absaugen der Flüssigkeit beendet.

Im Anschluss folgte ein dreimaliges Spülen mit je 1,5 ml *Aqua dest.* ohne Zwischeninkubation. Die Wanne wurde nach dem Testablauf aus dem Gerät genommen und auf Filterpapier ausgeklopft. Die Teststreifen blieben dabei am Wannensboden haften. Die restliche Flüssigkeit wurde mit einem Handabsaugsystem entfernt und die Inkubationswanne mit den Teststreifen zum Trocknen für kurze Zeit auf eine Warmhalteplatte gestellt.

2.2.8 Virasorb-RF-Absorbens

Durch die Vorbehandlung von Seren mit RF-Absorbens, einem hochkonzentrierten Anti-

human-IgG, wurde Gesamt-IgG komplex gebunden. Dieser Vorgang verhinderte zum einen, dass in Proben mit hohem erregerspezifischem IgG-Anteil bindungsschwächere IgM-Antikörper durch bindungsstärkere IgG-Antikörper verdrängt wurden. Falsch negative Resultate bei Nachweisverfahren von spezifischen IgM-Antikörpern wurden dadurch reduziert. Zum anderen konnten Rheumafaktoren, welche Autoantikörper vorwiegend der Klasse IgM sind und bevorzugt an den konstanten *Fragment crystallisable*-Teil von IgG-Antikörpern binden, durch die Immunkomplexbildung der IgG-Antikörper mit entfernt werden. Falsch positive Resultate durch Rheumafaktoren wurden so minimiert.

Die Vorbehandlung der Toxoplasmose- und CMV-Seren mit RF-Absorbens vor der Untersuchung im EBV ViraStripe IgM erfolgte durch Mitarbeiter der Fa. Viramed in deren Labor. Von den zu untersuchenden nativen Seren wurden jeweils 30 µl in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nachfolgend wurde in jedes Röhrchen 60 µl Virasorb-RF-Absorbens hinzugefügt und gut durchmischt. Das Gemisch inkubierte danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C). Der so gebildete Niederschlag konnte anschließend durch zehnminütige Zentrifugation bei 2000 rpm abgetrennt werden. Zur weiteren Analytik wurden jeweils 60 µl vom Überstand abgenommen. Danach wurden die so vorbehandelten Seren im EBV ViraStripe IgM in der Fa. Viramed untersucht.

2.2.9 Auswertung der Immunoblot-Teststreifen

2.2.9.1 Gültigkeit der Testläufe - Kontrollen

Der Testdurchlauf galt als gültig, wenn auf jedem Nitrozellulose-Streifen die Serumkontrolle und die jeweils untersuchte Immunglobulinklasse der Konjugatkontrolle, als auch auf den Viramed-Teststreifen die intern mitgeführte Cut off-Kontrolle gut sichtbar waren. Bei den Immunoblots der Fa. Virotech musste in jedem Lauf ein separater Teststreifen für die Cut off-Kontrolle der untersuchten Immunglobulinklasse mitgeführt werden. Die Cut off-Banden (siehe 2.2.9.3) auf den Teststreifen mussten jeweils eine schwache Färbung aufweisen. Pro Lauf wurden in allen Viramed-Testen zusätzlich ein Negativ-, ein Positiv- und ein schwach Positivkontrollserum mitgeführt. Bei Verwendung des Negativkontrollmaterials durften sich keine Banden auf den Blotstreifen entwickeln.

Erforderliche Nachuntersuchungen von Immunoblots aufgrund invalider Teste wurden sowohl im LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen als auch im Verantwortungsbereich der Fa. Viramed durchgeführt. Durch das Fachpersonal der Fa. Viramed wurden Seren als Randstreifenentwicklung ausgetestet, wodurch noch eine Nachtestung auf Immunoblotstreifen derselben Charge, wie in der Studie verwendet, erfolgen konnte.

2.2.9.2 Auswertung mit der Virascan Software

Unmittelbar nach Trocknung der entwickelten Immunoblots erfolgte die Testauswertung mit der Viracam und der Virascan Software 2.07 (Viramed). Es handelte sich um eine densitometrische Analyse von erzeugten Graustufenbildern. Mit Hilfe von vordefinierten Bandenpositionen wurden immunspezifische Bandenmuster auf jedem Patientenstreifen gemessen. Nach Subtraktion der Hintergrundaktivität wies die Software einen numerischen Wert aus. Die Cut off-Kontrolle wurde dabei auf 100% gesetzt und die anderen Banden daran prozentual gemessen.

Die Auswertung der Antigenstreifen der Fa. Virotech erfolgte entsprechend nach Herstellerangaben. Alle Banden auf diesen Immunoblots, die eine Intensität $\geq 100\%$ der Cut off-Kontrolle aufwiesen, wurden als positive Bande bewertet. Eine Cut off-nahe Bandenintensität ab $\geq 80\%$ aber $< 100\%$ der Cut off-Kontrolle wurde beim EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) als schwach positive Bande bewertet.

Die Bewertung der Immunoblots der Fa. Viramed erfolgte nach Kriterien, die der Routineanalytik im LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen entsprachen. Alle Banden, die eine Intensität von $\geq 80\%$ der Intensität der Cut off-Bande aufwiesen, wurden bei den Teststreifen der Fa. Viramed als positiv gewertet. Als schwach positive Bande wurde eine Intensität ab $\geq 60\%$ und $< 80\%$ der Cut off-Kontrolle bewertet.

2.2.9.3 Visuelle Auswertung

Nach der elektronischen Archivierung wurden alle Antigenstreifen auf die entsprechenden Auswertungsprotokolle aufgeklebt. Im Anschluss erfolgte ein visueller Abgleich der entwickelten Banden anhand der Cut off-Kontrollen mit den gemessenen Intensitäten. Stimmten die mittels Scansoftware ermittelten semiquantitativen Werte nicht mit der auf den Originalblotstreifen sichtbaren Stärke der Banden überein, wurden notwendige Anpassungen der Virascan-Ergebnisse manuell in der Excel-Tabelle vorgenommen. Aufgrund von Scanfehlern nicht erfasste als auch aufgrund von Verunreinigungen fälschlicherweise durch die Scantechnik erfasste Banden wurden korrigiert. Hierzu erfolgte eine Übernahme der Ergebnisse von Banden mit vergleichbarer Stärke aus dem jeweiligen Lauf bzw. ein Zurücksetzen der Intensität auf Null bei nicht vorhandenen Banden. Visuell wurde bei jedem Blot das Verhältnis der VCA p18- und VCA gp125-Antikörper zueinander für jeden Immunoblot beurteilt. Als größer oder kleiner wurde ein mit dem Auge deutlich wahrnehmbarer Unterschied der Bandenintensitäten gewertet.

Bandenbewertung laut Testanleitung der Firma Virotech

Als positiv zählte jede Bande die größer oder gleich stark war wie die der entsprechenden Cut off-Kontrolle. Banden mit schwächerer Intensität als die zugehörige Cut off-Kontrolle

sollen nach Herstellerangaben nicht in die Bewertung mit einbezogen werden. Als Cut off-Kontrolle zur Bandenbewertung diente jeweils zur IgG- und IgM-Auswertung die VCA p18-Bande auf dem Cut off-Kontroll-Teststreifen. Ausnahme bildete die negative IgM-Serologie. Hierbei wurde zur Beurteilung des EBNA1-IgG die EBNA1-Bande des Cut off-Kontroll-Teststreifens zu der Cut off-Kontrollbande.

Bandenbewertung laut Testanleitung der Firma Viramed

Als positiv wurde jede Bande gewertet, die größer oder gleich der streifeninternen Cut off-Kontrolle war. Eine schwache Bande hatte eine kleinere Intensität als die Cut off-Kontrollbande. Ganz schwach zu erkennende Banden gingen laut Hersteller nicht in die Bewertung ein.

Immunoblotbewertung nach Herstellerangaben

Die Auswertekriterien für die kommerziellen Immunoblots wurden nachfolgend in Tabelle 2.6 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2.6: Auswertekriterien der kommerziellen EBV (a) IgG- und (b) IgM-Immunoblots

a	IgG	Viramed	Virotech
	mind.1 Bande \geq Cut off (VCA gp125, VCA p18, EA-D, EBNA1)	positiv	positiv
	schwache Bande $<$ Cut off (VCA gp125, VCA p18, EA-D, EBNA1)	grenzwertig	negativ
	keine Bande	negativ	negativ

b	IgM	Viramed	Virotech
	mind.1 Bande \geq Cut off (VCA gp125, VCA p18)	positiv	positiv
	schwache Bande $<$ Cut off (VCA gp125)	grenzwertig	negativ
	EA-D isoliert \geq Cut off	positiv	negativ
	keine Bande oder schwache Bande (VCA p18, EA-D)	negativ	negativ

2.2.10 Statistik

Die gesamte Erfassung und Verwaltung der erhobenen Daten und z. T. die graphische Ergebnisdarstellung sowie die Berechnung von Bestimmtheitsmaßen (R^2) nach Pearson erfolgte mit Microsoft Excel Professional Plus 2010 (Version 14.0.7149.5000).

Die Box-Whisker-Plot-Diagramme zum Vergleich der mittels Virascan Software 2.07 der

Fa. Viramed gemessenen Intensitäten wurden mit dem Programm SigmaPlot für Windows Version 12.3 und CorelDraw X5 erstellt.

Für die statistische Analyse wurde beim Vergleich der Verteilung zweier nominaler Variablen der Exakte Fischer-Test auf Unabhängigkeit verwendet. Der Exakte Fischer-Test hat die Nullhypothese (H_0), dass kein Unterschied zwischen der Verteilung beider Variablen besteht. Wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % akzeptiert, ein allgemein üblicher Wert, so wird H_0 bei einem p-Wert $\leq 0,05$ verworfen, d. h. es wird davon ausgegangen, dass es einen Unterschied in der Verteilung gibt.

Für die Analyse einer möglichen Korrelation zweier nominaler Variablen wurde Cramérs V verwendet. Das Ergebnis von Cramérs V liegt zwischen 0 und 1; im Gegensatz zum Korrelationskoeffizienten nach Pearson sprechen hohe Werte bei Cramérs V sowohl für eine hohe positive als auch negative Korrelation. Die Korrelationsanalyse ordinaler Variablen erfolgte mit Kendalls Tau b (τ_b), der ähnlich wie Pearsons Korrelationskoeffizient Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Hier zeigt -1 eine starke inverse Korrelation, 0 eine fehlende Korrelation und +1 eine starke positive Korrelation an.

In der Arbeit wurden probenspezifische Bandenmuster auf Immunoblots verschiedener Hersteller miteinander verglichen. Hierbei wurde im gesamten Probenkollektiv bestimmt, mit welcher Anzahl Bandenmuster bei einem bestimmten Serostatus pro verwendetem Immunoblot auftreten. Dabei wurde jede untersuchte Probe jeweils einem Bandenmuster zugeordnet, d. h. das Bandenmuster wurde auf einer nominalen Skala erfasst und die Anzahl der Zuordnungen zwischen den verschiedenen Blots miteinander verglichen.

Die Signifikanz der Unterschiede wurde für jedes Bandenmuster durch einen separat durchgeführten Exakten Fischer-Test in einer Vier-Felder-Tafel untersucht. Dabei wurde in der Vier-Felder-Tafel in der ersten Dimension das dichotome Merkmal „Bandenmuster vorhanden“ oder „Bandenmuster nicht vorhanden“ und in der zweiten Dimension die nominale Variable „Testhersteller“ aufgetragen. Der berechnete p-Wert wurde nach der Methode von Holm (1979) korrigiert, um der Alphafehler-Kumulierung durch multiples Testen der verschiedenen Bandenmuster entgegenzuwirken [148]. Als signifikanter Unterschied zwischen den Bandenmustern verschiedener Hersteller wurde ein korrigierter p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Software R (Version 3.3.0) durchgeführt [149]. Dabei wurden folgende Zusatzpakete verwendet: vcd (Visualizing Categorical Data. R Paketversion 1.4-1), vcdExtra ('vcd' Extensions and Additions. R Paketversion 0.7-0) und DescTools R (Paketversion 0.99.16).

3 Ergebnisse

3.1 Prävalenz der EBV-Infektion im Patientenkollektiv

Tabelle 3.1 zeigt, dass die Durchseuchung mit EBV früh beginnt. Schon im Alter von 5 bis 9 Jahren hatten 50% der untersuchten Kinder einen stattgehabten Erregerkontakt mit EBV. In der Gruppe der 10- bis 19-Jährigen waren bereits ca. 71,9% der Patienten mit EBV durchseucht. Bei den älteren Erwachsenen stieg die Seroprävalenzrate weiter auf 98% an, sodass nahezu jeder Erwachsene über 50 Jahre seropositiv war. Die ermittelte altersabhängige Seropositivität entsprach der erwarteten Prävalenz. Die in der Studie erhobenen Ergebnisse haben daher Gültigkeit für die allgemeine EBV-Diagnostik in der Normalbevölkerung in Deutschland.

Tabelle 3.1: Erstbefunde der VCA-IgG-Antikörper (ELISA) im LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen, ermittelt im Zeitraum von Anfang Januar 2008 bis einschließlich April 2011, unterteilt in Altersgruppen beginnend ab dem 2. Lebensjahr und angegeben in Prozent bzw. absoluter Häufigkeit (n = 57.966). Der Prozentsatz der VCA-IgG-positiven Proben entspricht der EBV-Seroprävalenz der jeweiligen Altersgruppe.

Altersgruppe in Jahren	VCA-IgG				Gesamt- ergebnis
	positiv		negativ		
	%	Anzahl	%	Anzahl	
2 bis 4	36,8%	731	63,2%	1253	1984
5 bis 9	50,0%	2008	50,0%	2011	4019
10 bis 19	71,9%	11938	28,1%	4666	16604
20 bis 29	89,7%	10019	10,3%	1156	11175
30 bis 39	95,3%	8370	4,7%	411	8781
40 bis 49	96,8%	7466	3,2%	249	7715
50 bis 59	97,8%	4089	2,2%	93	4182
über 59	98,0%	3437	2,0%	69	3506
Gesamtergebnis	82,9%	48058	17,1%	9908	57966

3.2 Einfluss der Probenarchivierung bei -20°C auf das Testergebnis im EBV ViraStripe IgG/IgM

3.2.1 Probenstabilität nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C

Anhand von 11 Seren wurde die Wiederholbarkeit der Antikörpermessergebnisse im EBV ViraStripe IgG/IgM nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C im Vergleich zur direkten Messung aus der Routineuntersuchung der am Tag der Probenentnahme hergestellten Seren dokumentiert.

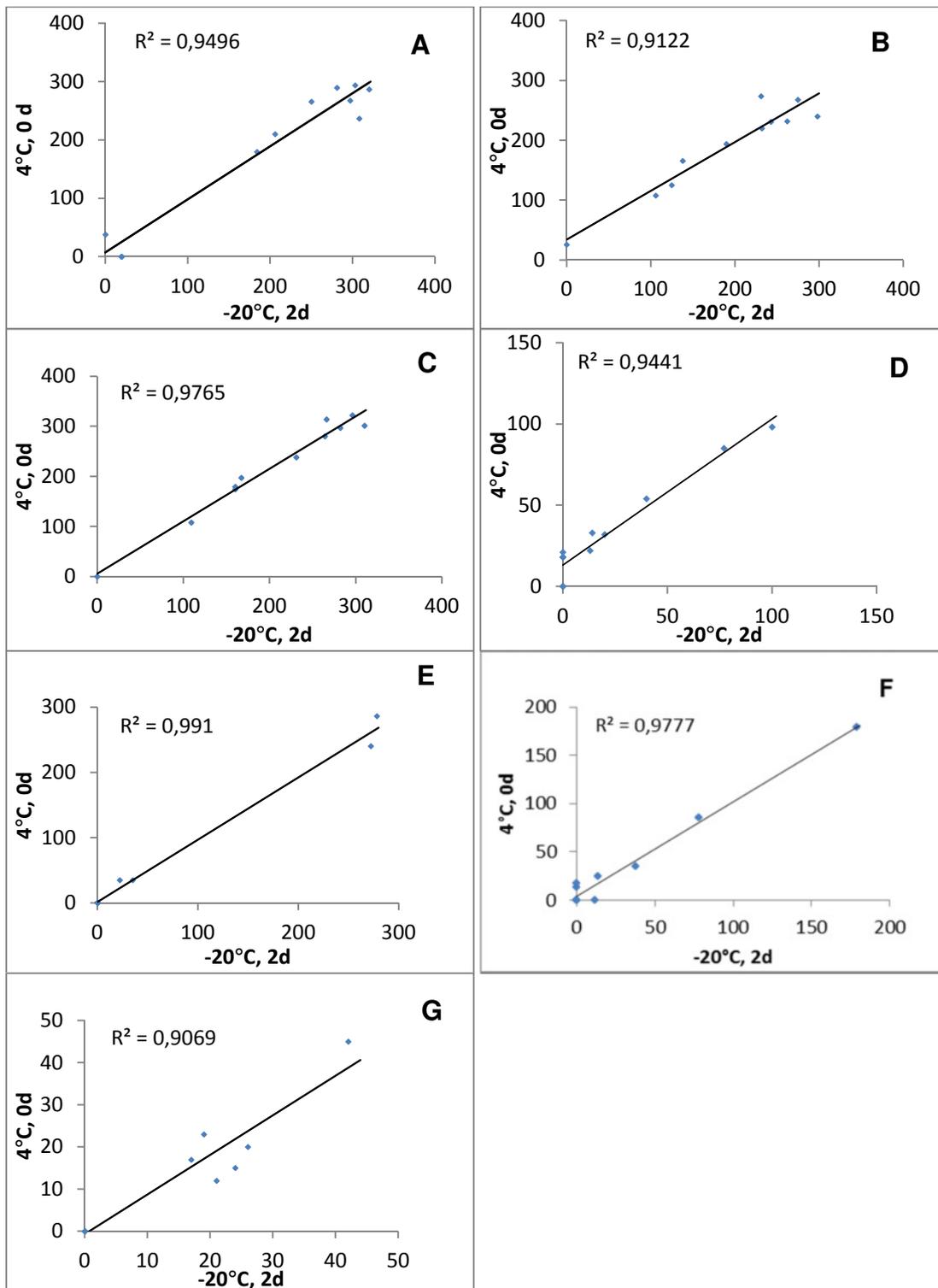


Abbildung 3.1: Einfluss einer 2-tägigen Lagerung der Seren bei -20°C auf die mittels Virascan-System gemessenen relativen Bandenintensitäten des EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed). Das Einfrieren der Seren hatte keinen Einfluss auf die gemessenen Intensitäten. 11 Seren wurden im Rahmen der Routinediagnostik (Lagerung bei 4°C , Messung am Tag 0) und nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C untersucht. Dargestellt ist die Korrelation der gemessenen Intensitäten der Banden für (A) EBNA1-IgG, (B) VCA gp125-IgG, (C) VCA p18-IgG, (D) EA-D p54-IgG, (E) VCA gp125-IgM, (F) VCA p18-IgM und (G) EA-D p54-IgM. Als Maß der Korrelation ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (R^2) angegeben.

Die mittels Viracam und Virascan Software 2.07 (Viramed) gemessenen Intensitäten der Assayläufe vor dem Einfrieren bei -20°C und nach dem Auftauen der Seren wurden für jedes Antigen gegeneinander in ein Koordinatensystem aufgetragen und als Punktwolken mit Regressionsgeraden dargestellt. Die gemessenen relativen Intensitäten gegen alle ausgetesteten Antigene zeigten nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C sehr gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen des Routinelauferes aus dem frischen Serum (siehe Abbildung 3.1). Alle in der Routine positiv detektierten Antikörper fanden sich visuell in gleicher Bandenstärke und mittels Virascan-Software in ähnlicher bis nahezu identischer relativer Intensität in der Analysenserie nach 2-tägiger Lagerung im Gefrierschrank wieder. In den Korrelationsgrafiken für die einzelnen auf dem EBV ViraStripe IgG/IgM verwendeten Antigene zeigte sich mit sehr hohen Bestimmtheitsmaßen (R^2), die zwischen 0,91 und 0,991 lagen, zwischen beiden Assayläufen eine sehr gute Korrelation der gemessenen Scanintensitäten. Ein Einfluss durch einmaliges Einfrieren und Auftauen der Seren auf die semi-quantitative Antikörpermessung mittels Virascan im EBV ViraStripe konnte somit zumindest nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C ausgeschlossen werden.

3.2.2 Probenstabilität nach 1-3-monatiger Lagerung bei -20°C

Bei 229 Serumproben, die bereits zuvor in der Laborroutine mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) untersucht waren, wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus dem Analysenlauf der Studie nach 1-3-monatiger Lagerung bei -20°C im Vergleich zum Routinelaufer des Labors mit den frischen Seren (Lagerung bei 4°C , am Tag 0 gemessen) mittels Korrelationsgrafiken für alle auf dem EBV ViraStripe IgG/IgM verwendeten Antigene überprüft. Die gemessenen relativen Intensitäten der beiden Assayläufe vor dem Einfrieren und nach einmaligem Auftauen der Seren nach bis zu 3-monatiger Lagerung bei -20°C wurden zum Ausschluss eines verändernden Einflusses gegeneinander in ein Koordinatensystem aufgetragen und als Korrelationsgrafiken in Abbildung 3.2 dargestellt. Ein hohes Bestimmtheitsmaß zeigten die Auswertungen für das EBNA1-IgG ($R^2 = 0,8466$) und für das EA-D p54-IgG ($R^2 = 0,821$). Etwas niedrigere Korrelationen wurden beim Vergleich der gemessenen Intensitäten für VCA gp125-IgG ($R^2 = 0,6601$) und EA-D p54-IgM ($R^2 = 0,6613$) gefunden. In dem Studienuntersuchungsgang wurden einige schwache EA-IgM-Intensitäten auf den Immunoblots angefärbt, die zuvor in der Routineuntersuchung vor dem Einfrieren der Seren nicht detektiert wurden, wobei diese Intensitäten zumeist unter dem Cut off von 80 lagen und somit auch negativ gewertet werden mussten.

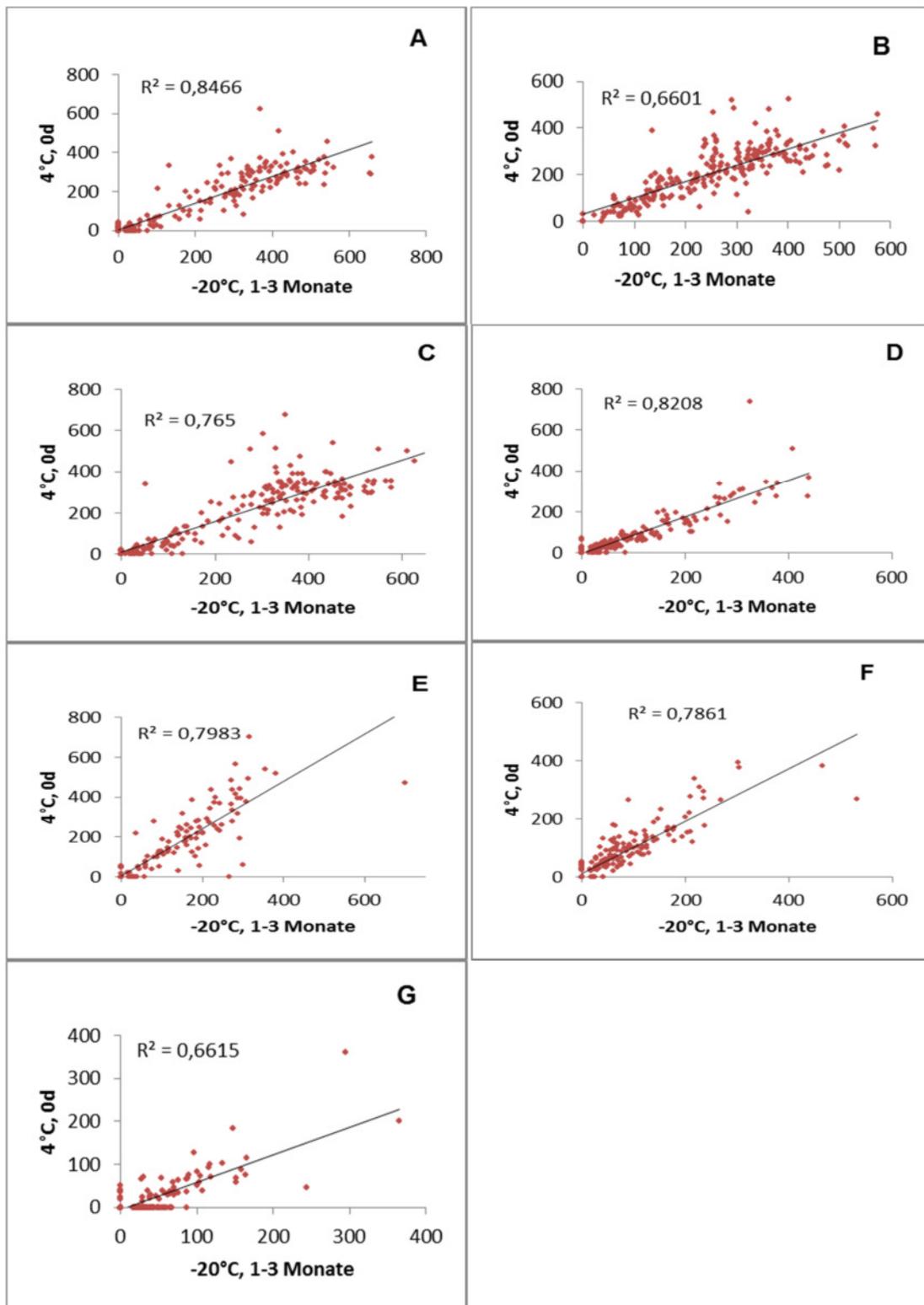


Abbildung 3.2: Einfluss einer 1-3-monatigen Lagerung der Seren bei -20°C auf die mittels Virascan-System gemessenen relativen Bandenintensitäten des EBV Virascope IgG/IgM (Viramed). Das Einfrieren der Seren hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die gemessenen Intensitäten. 229 Seren wurden im Rahmen der Routinediagnostik (Lagerung bei 4°C , Messung am Tag 0) und nach 1-3-monatiger Lagerung bei -20°C untersucht. Dargestellt ist die Korrelation der gemessenen Intensitäten der Banden für (A) EB-NA1-IgG, (B) VCA gp125-IgG, (C) VCA p18-IgG, (D) EA-D p54-IgG, (E) VCA gp125-IgM, (F) VCA p18-IgM und (G) EA-D p54-IgM. Als Maß der Korrelation ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten nach Person (R^2) angegeben.

Insgesamt betrachtet lagen alle Bestimmtheitsmaße zwar leicht unter den ermittelten Werten nach nur 2-tägiger Lagerung der Proben bei -20°C (siehe Abbildung 3.1), jedoch ließen die Regressionsgeraden für die semiquantitativen Antikörper-Messungen gegen alle verwendeten Antigene auch hier einen guten linearen Zusammenhang erkennen (siehe Abbildung 3.2). Die Archivierung der Seren bei -20°C hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die gemessenen Bandenintensitäten.

3.3 Vergleich der kommerziellen EBV Line Immunoblots

3.3.1 Serostatus

Nach der im Material- und Methodenteil unter Punkt 2.2.2.2 ausführlich beschriebenen Einstufung der 300 Proben in einen EBV-Serostatus wurden für den Methodenvergleich der beiden kommerziellen Immunoblots die Häufigkeiten der Serogruppen und ihrer Untergruppen ermittelt. Die Einteilung nach dem Interpretationsschema diente lediglich der besseren Vergleichbarkeit typischer Antikörperreaktionsmuster in der Immunoblotbewertung und entsprach nicht zwingend dem tatsächlichen Infektionsstatus des Patienten. Von den 300 getesteten EBV-Seren konnten elf Proben nicht in der Auswertung für den Methodenvergleich der kommerziellen EBV-Immunoblots berücksichtigt werden. Zwei IgM-Blots der Fa. Viramed wurden nicht korrekt entwickelt. Zusätzlich gab es bei neun Seren ein Entwicklungsproblem im IgM-Test der Fa. Virotech und bei einem Serum in dessen IgG-Immunoblot. Eine Probe konnte jeweils in beiden IgM-Testen aufgrund einer starken Hintergrundfärbung nicht bewertet werden. Die beschriebenen Proben wurden von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen, somit standen für den Methodenvergleich der beiden Immunoblots und für die Optimierung des EBV ViraStripe valide Ergebnisse von 289 Seren zur Verfügung.

Tabelle 3.2: Häufigkeiten der Serodiagnosen, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) und dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech)

Serostatus ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
frisch	85	29,4	88	30,4	1,0000	n.s.
zurückliegend	149	51,6	141	48,8	1,0000	n.s.
kürzlich	16	5,5	15	5,2	1,0000	n.s.
unklar	21	7,3	25	8,7	1,0000	n.s.
negativ	18	6,2	20	6,9	1,0000	n.s.
Summe	289	100,0	289	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert ($n = 5$).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

³ Der Serostatus ist definiert in Tabelle 2.2.

Die absoluten und prozentualen Häufigkeiten für jeden Serostatus wurden für die beiden kommerziellen EBV-Line-Blots in Tabelle 3.2 gegenübergestellt. In dieser Übersicht wurden ähnlich viele Seren in die serologischen Befundstufen „negativ“, „frisch“, „kürzlich“ und „zurückliegend“ für beide Teste eingeteilt. Es kam in beiden Testen zu ähnlich vielen „unklaren“ Ergebnissen. Dieses wurde in der statistischen Analyse bestätigt: der Exakte Fischer-Test für die gesamte Tabelle 3.2 zeigte einen p-Wert von 0.9444, d. h. es gab keinen signifikanten Unterschied bei der Anzahl der gestellten Serodiagnosen zwischen den beiden kommerziellen Immunoblots. Die Einteilung der Seren nach dem für die Studie entwickelten Interpretationsschema in einen Serostatus korrelierte gut zwischen den kommerziellen EBV-Immunoblots von Viramed und Virotech.

Um das Verhalten der beiden Blots für jedes einzelne Serum zu vergleichen, wurden anschließend die erhaltenen Serodiagnosen, eingeteilt mit den Viramed-Blots, denen des Vergleichstestes von Virotech in einer Kreuztabelle gegenübergestellt (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Vergleich der Serodiagnosen, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) und dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech)

		Viramed					Anzahl
		negativ	frisch	kürzlich	zurückliegend	unklar	
Virotech	negativ	17				3	20
	frisch		73	6		9	88
	kürzlich		5	7	2	1	15
	zurückliegend				141		141
	unklar	1	7	3	6	8	25
	Anzahl	18	85	16	149	21	289

Hierbei fiel auf, dass die meisten Seren von beiden Blots identisch eingeteilt wurden. Die Kontingenztafel zeigte, dass es keine Überschneidungen der Serodiagnosen „frisch“, „zurückliegend“ und „seronegativ“ gab. Diese gute Korrelation zeigte sich auch in der Korrelation nach Cramérs, die bei $V = 0,70$ lag. Auffallend war jedoch, dass 38 von 289 (13,1%) der Seren in einem der beiden oder in beiden Testen ein unklares Bandenmuster zeigten. Von diesen 38 unklaren Seren, waren allerdings 30 Seren nur in einem der beiden Teste unklar und zeigten in dem jeweils anderen Test ein eindeutiges Bandenmuster. Diese schlechte Korrelation wurde durch die Analyse einer Kreuztabelle bestätigt, bei der die Ergebnisse in die beiden Werte „klar“ und „unklar“ reklassifiziert wurden (ohne Tabelle), was zu einem Cramérs V von nur 0,29 führte. Der Unterschied zwischen den beiden kommerziellen Blots beschränkte sich offenbar vor allem auf die Seren mit unklarem Bandenmuster. Wurden alle unklaren Ergebnisse ausgeklammert (ohne Tabelle), so zeigte

sich eine noch bessere Korrelation zwischen den beiden Blot-Herstellern (Cramér's $V = 0,85$). Da bei dieser reduzierten Kreuztabelle die Blotergebnisse nun ordinal vorlagen (negativ < frisch < kürzlich < zurückliegend), konnte für die Korrelation zusätzlich ein Rangkorrelationskoeffizient nach Kandel's berechnet werden, der ebenfalls eine sehr gute positive Korrelation beider Teste zeigte ($\tau_b = 0,96$). Da es in der ordinalen Kreuztabelle nur Abweichungen zwischen den Testen in den benachbarten Klassen gab, wurde zusätzlich die Korrelation für die drei jeweils benachbarten Klassen berechnet. Hier zeigten die Teste eine exzellente Korrelation im Vergleich „negativ“ vs. „frisch“ ($\tau_b = 1,00$) und „kürzlich“ vs. „zurückliegend“ ($\tau_b = 0,88$), jedoch nur eine mäßige Korrelation zwischen „frisch“ vs. „kürzlich“ ($\tau_b = 0,49$).

3.3.2 Häufigkeitsverteilungen der Antikörperreaktionsmuster

Die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Antikörperreaktionsmuster wurden nacheinander für beide kommerzielle EBV Line Immunoblots (Fa. Viramed und Fa. Virotech) separat aufgeschlüsselt und auf Verschiedenheit ihrer Verteilung geprüft.

3.3.2.1 Serostatus „frisch“

Zwischen den beiden kommerziellen Immunoblots wurde ein signifikanter Unterschied bei den Häufigkeiten und der Verteilung der verschiedenen Bandenmuster des Serostatus „frisch“ mit dem Exakten Fischer-Test für die gesamte Tabelle 3.4 nachgewiesen ($p = 0,00063$). Bei der Auswertung des Serostatus „frisch“ zeigten sich mit 92,1% im EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) häufiger Antikörperreaktionsmuster mit isoliertem VCA gp125-IgG-Nachweis als auf dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) (71,7%). Die Auswertung mittels kommerziellem Immunoblot der Fa. Viramed erbrachte bei 24 von 85 Proben (Gruppe 3 und 4) bereits einen positiven VCA p18-IgG-Nachweis. Im Gegensatz dazu wurden mit dem Immunoblot der Fa. Virotech nur 7 von 88 Seren für VCA p18-IgG positiv detektiert (siehe Tabelle 3.4). Dieser signifikante Unterschied konnte mit einem korrigierten p-Wert von 0,00955 in der Gruppe 3 nachgewiesen werden. Das VCA p18 auf dem EBV ViraStripe IgG der Fa. Viramed reagierte bei den frischen Infektionen eher sensitiv als auf dem Vergleichstest der Fa. Virotech. In der IgM-Analyse hingegen fand sich mit dem EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) bereits bei 30,7% der Proben mit isoliertem VCA gp125-IgG-Nachweis ein führender VCA p18-Nachweis bei den VCA-IgM-Antikörpern. Mit dem Viramed-Test wurden dieser Gruppe 2 des Serostatus „frisch“ nur 12,9% der Proben zugeteilt. Die Signifikanz der Verschiedenheit der Verteilung der Antikörperreaktionsmuster der Gruppe 2 zwischen den beiden kommerziellen Immunoblots konnte mittels korrigierten p-Wert von 0,01728 festgestellt werden. Somit scheint das VCA p18-Antigen auf dem Virotech-IgM-Immunoblot bei den frischen Infektionen sensitiver eingestellt zu sein.

Tabelle 3.4: Häufigkeiten der Bandenmuster des Serostatus „frisch“, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) und dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech)

Bandenmuster des Serostatus „frisch“ ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
Gruppe 1 VCA gp125-IgG isoliert und VCA gp125-IgM führend	50	58,8	54	61,4	0,75805	n.s.
Gruppe 2 VCA gp125-IgG isoliert und VCA p18-IgM führend	11	12,9	27	30,7	0,01728	*
Gruppe 3 VCA gp125-IgG > VCA p18-IgG und VCA gp125-IgM führend	15	17,6	3	3,4	0,00955	**
Gruppe 4 VCA gp125-IgG > VCA p18-IgG und VCA p18-IgM führend	9	10,6	4	4,5	0,31423	n.s.
Summe	85	100,0	88	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 4).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

³ Der Serostatus „frisch“ ist in Tabelle 2.2 definiert.

3.3.2.2 Serostatus „kürzlich“

Die Konstellation mit überwiegender VCA p18-IgG-Antwort bei den Antikörpern gegen die Viruscapsid-Antigene fand sich sowohl bei den EBNA1-IgG-positiven (13,3% vs. 0%) als auch bei den EBNA1-IgG-negativen Proben (53,3% vs. 37,5%) des Serostatus „kürzlich“ beim EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) häufiger als auf dem EBV ViraStripe IgG (Viramed). Umgekehrt verhielt es sich bei dem Antikörperreaktionsmuster mit gleich starker VCA-IgG-Immuntantwort. Dieses Muster trat bei den EBNA1-IgG-negativen (43,8% vs. 33,3%) und bei den EBNA1-IgG-positiven Seren (18,8% vs. 0%) im Viramed-Test gehäuft auf. Mit den errechneten korrigierten p-Werten konnte jedoch in den verschiedenen Untergruppen des Serostatus „kürzlich“ zwischen den beiden kommerziellen EBV Line Immunoblots der Firmen Viramed und Virotech kein signifikanter Unterschied bei der Verteilung der IgG-Bandenmuster festgestellt werden (siehe Tabelle 3.5). Passend dazu wurde mit dem Exakten Fischer-Test für die gesamte Tabelle 3.5 ein p-Wert von 0,1581 berechnet.

Tabelle 3.5: Häufigkeiten der IgG-Bandenmuster des Serostatus „kürzlich“, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech)

IgG-Bandenmuster des Serostatus „kürzlich“ ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
Gruppe 10 EBNA1-IgG negativ und VCA p18-IgG = VCA gp125-IgG	7	43,8	5	33,3	0,95898	n.s.
Gruppe 11 EBNA1-IgG negativ und VCA p18-IgG führend	6	37,5	8	53,3	0,95898	n.s.
Gruppe 12 EBNA1-IgG positiv und VCA p18-IgG = VCA gp125-IgG	3	18,8	0	0	0,90323	n.s.
Gruppe 13 EBNA1-IgG positiv und VCA p18-IgG führend	0	0	2	13,3	0,90323	n.s.
Summe	16	100,0	15	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 4).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

³ Der Serostatus „kürzlich“ ist in Tabelle 2.2 definiert.

3.3.2.3 Serostatus „zurückliegend“

Bei dem Serostatus „zurückliegend“ zeigte sich bei der Bewertung der IgG-Bandenverteilung der EBNA1-IgG-positiven Seren mit 66% (93/141) ein Überwiegen der Konstellation mit führender VCA p18-IgG-Antwort gegenüber dem VCA gp125-IgG beim EBV IgG Line Immunoblot der Fa. Virotech (siehe Tabelle 3.6). In der IgG-Analyse des kommerziellen Viramed-Testes (EBV ViraStripe IgG) fand sich nur bei 57% der EBNA1-IgG-positiven Proben (85/149) ein Verteilungsmuster mit führender VCA p18-IgG-Antwort. Mit dem Exakten Fischer-Test korrigiert nach Holm wurde für diese Serogruppe ein p-Wert von 0,29506 berechnet, d. h. ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden kommerziellen Testen konnte mit diesen Daten nicht nachgewiesen werden. Der Anteil der EBNA1-IgG-negativen Seren mit überwiegender VCA p18-IgG-Reaktivität war mit 14,9% (21/141) bei dem Virotech-Immunoblot deutlich höher als beim EBV ViraStripe IgG (Viramed) mit 6,0% (9/149). Der Exakte Fischer-Test korrigiert nach Holm zeigte hier mit einem p-Wert von 0,05834 ein grenzwertiges, knapp nicht signifikantes Ergebnis. Betrachtete man den nicht korrigierten p-Wert von 0,01945 konnte die Tendenz zu einem Unterschied in dieser Gruppe festgestellt werden. Die prozentuale Häufigkeit bei den EBNA1-IgG-positiven Seren mit gleich starker Antwort der beiden VCA-Antikörper (VCA gp125 = VCA p18) war im Viramed-IgG-Test mit 26,8% auffällig höher als beim Test der Fa. Virotech (6,4%). Mit dem korrigierten p-Wert von 0,00001 konnte hier ein sehr signifikanter Unterschied belegt werden.

Zusammenfassend wurde mit dem p-Wert $< 0,00001$, ermittelt mit dem Exakten Fischer

Test, für die gesamte Tabelle 3.6 ein sehr signifikanter Unterschied der Verteilungsmuster der IgG-Banden zwischen den beiden verglichenen kommerziellen Immunoblots nachgewiesen. Die Anfangsvermutung, dass sich im EBV IgG Line Immunoblot der Fa. Virotech im Gegensatz zum EBV ViraStripe IgG (Viramed) deutlich mehr zurückliegende EBV-Infektionen mit einem Überwiegen der VCA p18-Antwort (Spätmarker) vs. VCA gp125 nachweisen lassen, konnte jedoch trotz höherer prozentualer Häufigkeit beim Virotech-Blot anhand dieser Daten statistisch nicht sicher mit einem signifikanten Unterschied belegt werden. Statistisch signifikant war lediglich der erhöhte Anteil der Antikörperkonstellation mit gleich starken Banden gegen beide Viruscapsid-Antigene im EBV ViraStripe IgG (Viramed).

Tabelle 3.6: Häufigkeiten der IgG-Bandenmuster des Serostatus „zurückliegend“, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech)

IgG-Bandenmuster des Serostatus „zurückliegend“ ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
Gruppe 5 EBNA1-IgG positiv und VCA p18-IgG führend	85	57,0	93	66,0	0,29506	n.s.
Gruppe 6 EBNA1-IgG positiv und VCA gp125-IgG = VCA p18-IgG	40	26,8	9	6,4	0,00001	****
Gruppe 8 EBNA1-IgG positiv und VCA gp125-IgG führend	15	10,1	18	12,8	0,57951	n.s.
Gruppe 7 EBNA1-IgG negativ und VCA p18-IgG führend	9	6,0	21	14,9	0,05834	n.s.
Summe	149	100,0	141	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 4).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001; ****, p ≤ 0,0001.

³ Der Serostatus „zurückliegend“ ist in Tabelle 2.2 definiert.

3.3.2.4 Bestätigung der Ergebnisse des Serostatus „zurückliegend“ anhand der EBNA1-IgG-positiven Seren

Die Anfangsvermutung, dass sich im EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) mehr zurückliegende Infektionen mit einem Überwiegen der VCA p18-IgG-Antwort als im EBV ViraStripe IgG (Viramed) finden, wurde zusätzlich anhand der in beiden kommerziellen Blots EBNA1-IgG-positiven Seren unabhängig von der Serostatus-einteilung überprüft.

Mit dem IgG-Immunoblot der Fa. Viramed wurde in 51,9% der analysierten Proben (150/289) eine EBNA1-Bande positiv detektiert. Mittels IgG-Test der Fa. Virotech ließen sich in nur 130 Seren EBNA1-IgG-Antikörper nachweisen. Der Viramed-Test schien sensibler für den EBNA1-IgG-Nachweis eingestellt zu sein, jedoch konnte mit den ermittelten

korrigierten p-Werten (siehe Tabelle 3.7) bei einer Fallzahl von 289 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden kommerziellen EBV-Immunooblots belegt werden ($p = 0,22744$). Im Vergleich dazu wurde im Screening-ELISA der Firma Diasorin lediglich bei 80 von 284 aus der Studie getesteten Seren (28,1%) ein positiver EBNA1-IgG-Nachweis detektiert.

Tabelle 3.7: EBNA1-IgG-Nachweise mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) nach Bewertung aller 289 validen Seren

EBNA1-IgG	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
positiv	150	51,9	130	45,0	0,22744	n.s.
negativ	139	48,1	159	55,0	0,22744	n.s.
Summe	289	100	289	100		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert ($n = 2$).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0,0001$.

Anhand von 125 Proben mit anscheinend sicher zurückliegenden Infektionen, welche gleichzeitig im Viramed- und Virotech-Test für EBNA1-IgG positiv waren, wurden dann beide kommerziellen Teste in der IgG- und IgM-Analyse hinsichtlich der Bandenverteilung miteinander verglichen (siehe Tabellen 3.8 und 3.10).

Tabelle 3.8: Häufigkeiten der IgG-Bandenmuster, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) und dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) der in beiden Testen EBNA1-IgG-positiven Seren

IgG-Bandenmuster EBNA1-IgG-positiver Seren ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
VCA p18 > VCA gp125	69	55,2	86	68,8	0,22096	n.s.
VCA p18	3	2,4	8	6,4	1,00000	n.s.
VCA p18 = VCA gp125	42	33,6	9	7,2	< 0,00001	****
VCA gp125 > VCA p18	8	6,4	13	10,4	1,00000	n.s.
VCA gp125	3	2,4	7	5,6	1,00000	n.s.
isoliert EA-D	0	0,0	1	0,8	1,00000	n.s.
isoliert EBNA1	0	0,0	1	0,8	1,00000	n.s.
Summe	125	100	125	100		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert ($n = 7$).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0,0001$.

³ EA-D-IgG wird analog des Interpretationsschemas in Tabelle 2.2 nur bei isoliertem, d.h. ohne gleichzeitigen Nachweis von VCA-IgG aufgeführt.

Der mit dem Exakten Fischer Test ermittelte p-Wert von < 0.00001 für die gesamte Tabelle 3.8 zeigte einen sehr signifikanten Unterschied hinsichtlich der IgG-Bandenverteilung für beide verglichenen Immunoblots auf. In der IgG-Analyse der EBNA1-reaktiven Seren ($n = 125$) fand sich im Virotech-Test zwar ein höherer Prozentsatz mit führender VCA p18-IgG-Antwort bei den VCA-Antikörpern sowie auch ein höherer prozentualer Anteil mit isoliertem VCA p18-Nachweis, jedoch war der Unterschied zum Viramed-Blot auch hier nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,00001$) konnte erneut lediglich bei dem deutlich höheren Prozentsatz (33,6%) von Seren mit gleich starker VCA-Antikörperreaktivität (VCA p18 = VCA gp125) in der IgG-Analyse bei dem Viramed-Test vs. 7,2% gegenüber dem Virotech-Test festgestellt werden.

Tabelle 3.9: Nachweisraten der IgG-Banden, ermittelt mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) anhand der 125 in beiden Testen EBNA1-IgG-positiven Seren

IgG-Banden EBNA1-IgG-positiver Seren	EBNA1	VCA gp125	VCA p18	EA-D
Viramed	125	122	122	36
Virotech	125	115	116	22

Die Sensitivität des VCA p18-IgG war mit einer Nachweisrate von 122/125 (siehe Tabelle 3.9) im EBV ViraStripe IgG (Viramed) etwas höher als beim EBV IgG Line Immunoblot der Fa. Virotech (116/125). Es scheint jedoch, dass das VCA p18-Antigen im Virotech-IgG-Test bei den zurückliegenden Infektionen mit einer gewünschten stärkeren Reaktivität des VCA p18 (siehe Tabelle 3.8) etwas spezifischer reagieren könnte als im Viramed-IgG-Test.

In der IgM-Analyse der in beiden kommerziellen Immunoblots EBNA1-IgG-positiven Seren fanden sich mittels Virotech-Test 27 positive und 3 schwach positive Nachweise (24%). Mit 9 positiven und 6 schwach positiven Banden wurden mit dem Viramed-Test deutlich weniger IgM-Reaktivitäten detektiert (12%). Der Unterschied für die gesamte Tabelle 3.10, berechnet mit dem Exakten Fischer-Test, war für die IgM-Nachweise und ihrer Bandenverteilung in dieser Gruppe mit einem p-Wert von 0,05472 knapp nicht signifikant. Auffällig war jedoch der mit 20,8% deutlich höhere Prozentsatz von isolierten VCA p18-IgM-Nachweisen mittels Virotech-Test im Gegensatz zum Viramed-Test (9,6%). Der korrigierte p-Wert von 0,08189 lag noch knapp über der Signifikanzmarke, sodass ein signifikanter Unterschied mit den Daten des Methodenvergleichs nicht belegt werden konnte. Der unkorrigierte p-Wert betrug 0,02111 und bestätigte die Tendenz zu einem Unterschied. Der gleiche korrigierte p-Wert (0,08189) fand sich beim Vergleich der negativen IgM-Nachweise. 110 Viramed-Blots vs. 95 Virotech-Blots wurden in der Gruppe der EBNA1-

IgG-positiven Seren für IgM negativ befundet. Die Auswertung der IgM-Analyse für beide kommerzielle EBV-Lineblots lässt vermuten, dass mit dem Virotech-Test aufgrund der erhöhten Nachweisrate für das VCA p18-IgM mehr unspezifische Reaktivitäten oder IgM-Antikörper-Persistenzen bei EBNA1-IgG-positiven Seren detektiert wurden.

Tabelle 3.10: Häufigkeiten der VCA-IgM-Bandenmuster, eingeteilt mit dem EBV Vira-Stripe IgM (Viramed) und dem EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) nach Auswertung der in beiden kommerziellen EBV-Immunoblots EBNA1-IgG-positiven Seren

VCA-IgM-Bandenmuster EBNA1-IgG-positiver Seren	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
VCA p18 > VCA gp125	2	1,6	2	1,6	1,00000	n.s.
VCA p18	12	9,6	26	20,8	0,08189	n.s.
VCA gp125	1	0,8	2	1,6	1,00000	n.s.
negativ	110	88	95	76	0,08189	n.s.
Summe	125	100,0	125	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 4).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001; ****, p ≤ 0,0001.

Die Nachweisrate von EA-D-IgM (ohne Tabelle) war im Virotech-Blot mit 20 Banden vs. 9 Nachweisen im Viramed-Blot ebenfalls deutlich höher. Hier fielen insbesondere die 12 isolierten EA-D-IgM-Nachweise auf dem Virotech-Blot im Gegensatz zu nur 5 isolierten Reaktivitäten auf dem EBV ViraStripe IgM (Viramed) auf. Im Unterschied zum EBV Vira-Stripe IgM (Viramed), wo eine starke EA-D-Bande als positiver Blot zu werten war, wird ein isolierter Nachweis von EA-D-IgM-Antikörpern unabhängig von der Bandenstärke auf dem EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) immer als negativer Test bewertet. Da mit dem EBV ViraStripe IgM (Viramed) bei den EBNA1-IgG-positiven Seren nur schwach reaktive EA-D-IgM-Banden detektiert wurden, waren diese ebenso wie alle isolierten EA-D-IgM-Nachweise auf dem EBV IgM Line Immunoblot als negativ zu werten und wurden daher nicht als gesondertes Bandenmuster aufgeführt. Auch hier scheint der Virotech-Blot, ungeachtet der Bewertungskriterien der Hersteller mehr unspezifische EA-D-IgM-Reaktivitäten oder Persistenzen zu detektieren.

3.3.2.5 Bestätigung der Ergebnisse des Serostaus „frisch“ anhand der EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis

In einem weiteren Schritt wurden die in den kommerziellen EBV Line Immunoblots der Hersteller Viramed und Virotech für EBNA1-IgG-negative Seren mit gleichzeitig reaktivem IgM-Nachweis (n = 101) unabhängig von ihrer Eingruppierung in einen bestimmten Serostatus bewertet. Bei Fehlen des Spätmarkers EBNA1-IgG und gleichzeitigem Nachweis von IgM-Banden handelt es sich überwiegend um Primärinfektionen.

Tabelle 3.11: Häufigkeiten der IgG-Bandenmuster, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) nach Auswertung der in beiden kommerziellen EBV-Immunoblots EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis

IgG-Bandenmuster EBNA1-IgG-negativer Seren ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifi- kantz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
VCA gp125	56	55,4	69	68,3	0,49094	n.s.
VCA gp125 > VCA p18	24	23,8	6	5,9	0,00402	**
VCA gp125 = VCA p18	6	5,9	5	5,0	1,00000	n.s.
VCA p18 > VCA gp125	7	6,9	5	5,0	1,00000	n.s.
VCA p18	1	1,0	2	2,0	1,00000	n.s.
isoliert EA-D	3	3,0	6	5,9	1,00000	n.s.
negativ	4	4,0	8	7,9	1,00000	n.s.
Summe	101	100,0	101	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 7).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

³ EA-D-IgG wird analog des Interpretationsschemas in Tabelle 2.2 nur bei isoliertem Nachweis aufgeführt. Alle 3 isolierten EA-D-Nachweise im IgG-Viramed-Blot lagen deutlich über dem Cut off und waren somit analog des Virotech-Testes als positiver Blot zu werten.

Der ermittelte p-Wert von 0,01099 für die gesamte Tabelle 3.11 zeigte, dass ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der IgG-Bandenverteilungsmuster für diese Seren zwischen den beiden kommerziellen Immunoblots bestand.

Bei der Auswertung der IgG-Analyse zeigte sich mittels EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) mit 68,3% ein höherer Prozentsatz von Seren mit isoliertem VCA gp125-Nachweis bei den VCA-Antikörpern. Mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) fand sich dieses Bandenmuster nur bei 55,4% der Seren. Dieser Unterschied war mit einem korrigierten p-Wert von 0,49094 statistisch jedoch nicht signifikant. 24 (23,8%) der 101 Proben hatten in der IgG-Auswertung des Viramed-Testes zusätzlich zu einer starken VCA gp125-Antwort auch eine schwächere VCA p18-Antwort. Dieses Antikörperreaktionsmuster wurde in dem Virotech-Blot in deutlich geringerer Anzahl 6/101 (5,9%) beobachtet. In der statistischen Analyse konnte ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung dieses Bandenmusters zwischen den beiden kommerziellen Immunoblots der Firmen Virotech und Viramed festgestellt werden (p-Wert = 0,00402).

In Tabelle 3.12 wird zusätzlich gezeigt, dass im Viramed-IgG-Blot mit 38 VCA p18-Banden deutlich mehr Nachweise als im Virotech-IgG-Blot (18/101) erbracht werden. Das VCA p18-Antigen scheint aufgrund einer erhöhten Nachweisrate im EBV ViraStripe IgG (Viramed) sensitiver bei den EBNA1-IgG-negativen Seren eingestellt zu sein. Damit bestätigten sich die Ergebnisse der Serogruppe „frisch“. Die übrigen Verteilungsmuster in Tabelle 3.11 zeigten bei den verglichenen Immunoblots keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3.12: Nachweisraten der IgG-Banden, ermittelt mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) anhand der 101 in beiden Testen EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis

IgG-Banden EBNA1-IgG-negativer Seren	VCA gp125	VCA p18	EA-D
Viramed	93	38	56
Virotech	85	18	65

Bei der Auswertung der IgM-Untersuchungen zeigte sich bei den EBNA1-IgG-negativen Seren jeweils für beide VCA-Antikörper eine leicht erhöhte Nachweisrate mittels Virotech-Blot (siehe Tabelle 3.14). Im gleichen Test wurde mit 80 Nachweisen eine deutlich höhere Bandenzahl für EA-D-IgM als im Viramed-Blot (34/101) detektiert. Die EA-D-IgM-Antikörper waren in dieser Gruppe nie isoliert, sondern immer in Kombination mit VCA-Antikörpern nachweisbar.

Die Verteilungsmuster der VCA-IgM-Antikörper sind in Tabelle 3.13 in absoluter und prozentualer Häufigkeit detailliert aufgeführt. Das Antikörperreaktionsmuster mit führender oder isolierter VCA gp125-IgM-Antwort findet sich mit dem Viramed-Test bei 67,4% und auf dem Virotech-Blot bei 50,5% der 101 EBNA1-negativen Seren. Der Unterschied zwischen diesen beiden Mustern auf den kommerziellen IgM-Immunoblots war statistisch nicht signifikant. Umgekehrt findet sich der etwas höhere Prozentsatz der Proben mit isolierter oder führender VCA p18-IgM-Antwort mit 34,6% versus 24,8% beim Virotech-Test. Das IgM-Bandenmuster VCA p18 > VCA gp125 wurde auf den Virotech-Teststreifen mehr als doppelt so häufig wie auf den Viramed-Blots nachgewiesen. Der korrigierte p-Wert lag mit 0,05955 nur knapp über der Signifikanzgrenze. Der unkorrigierte p-Wert von 0,01191 zeigte die Tendenz zur Signifikanz auf. Das VCA p18-Antigen auf dem EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) schien bei den EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis sensitiver eingestellt zu sein. Proben mit gleich starken VCA-IgM-Antikörpern (VCA gp125 = VCA p18) konnten in den Virotech-Immunoblots fast zweimal so häufig wie in den Viramed-Testen detektiert werden, rein statistisch war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant.

Zwar konnte beim Vergleich der einzelnen Bandenmuster bei einer Fallzahl von 101 in dieser Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden kommerziellen Immunoblots belegt werden, dafür zeigte sich jedoch mit dem Exakten Fischer-Test für die gesamte Tabelle 3.13 ($p = 0,02082$) ein Unterschied in der Verteilung bei den insgesamt ermittelten Bandenmustern. Vermutlich dürfte die unterschiedliche Verteilung des IgM-Bandenmusters „VCA p18 > VCA gp125“ in dieser Gruppe ursächlich dafür sein.

Tabelle 3.13: Häufigkeiten der VCA-IgM-Bandenmuster, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgM (Viramed) und dem EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) nach Auswertung der in beiden kommerziellen Immunoblots EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis

VCA-IgM-Bandenmuster EBNA1-IgG-negativer Seren	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
VCA gp125	15	14,9	10	9,9	0.71363	n.s.
VCA gp125 > VCA p18	53	52,5	41	40,6	0.48213	n.s.
VCA gp125 = VCA p18	8	7,9	15	14,9	0.54883	n.s.
VCA p18 > VCA gp125	12	11,9	27	26,7	0.05955	n.s.
VCA p18	13	12,9	8	7,9	0.71363	n.s.
Summe	101	100,0	101	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 5).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

Bereits bei 91 von 101 Seren, dargestellt in Tabelle 3.14, waren im EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) VCA p18-Antikörper nachweisbar. Im Vergleich dazu fanden sich auf dem EBV ViraStripe IgM (Viramed) 86 VCA p18-IgM-Banden. In beiden kommerziellen Immunoblots wurden lediglich jeweils 2 VCA gp125-IgM-Banden mehr als VCA p18-IgM-Nachweise detektiert. Das zeigte deutlich, dass VCA p18 in der IgM-Analyse ein Frühmarker bei den frischen EBV-Infektionen darstellt.

Tabelle 3.14: Nachweisraten der IgM-Banden, ermittelt mit dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) und dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) anhand der 101 in beiden Testen EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Nachweis

IgM-Banden EBNA1-IgG-negativer Seren	VCA gp125	VCA p18	EA-D
Viramed	88	86	34
Virotech	93	91	80

3.3.2.6 Negative Seren

Seronegatives Material wurde in nur geringer Anzahl in der Studie als Kontrolle bei den Untersuchungen mitgeführt, da es nicht Ziel war, die Spezifität der verwendeten Teste zu überprüfen. Mit dem EBV ViraStripe wurden 18 Proben als seronegativ befundet. Der Vergleichstest von der Fa. Virotech war bei 20 Seren negativ für EBV. 17 Seren wurden übereinstimmend in beiden Testen mit negativ bewertet. Von den 4 diskrepanten Seren hatte ein Serum im Virotech-Test eine isolierte EBNA1-IgG-Reaktivität ohne Nachweis eines Durchseuchungsmarkers (VCA-IgG). 2 Seren zeigten im IgG-Immunoblot von Viramed isolierte EA-D-Reaktivitäten. In einem weiteren Serum fand sich im EBV ViraStripe IgM eine isolierte VCA p18-Bande. Da es sich hier um eine Verlaufskon-

trolle handelte, konnte ein unspezifischer IgM-Befund diagnostiziert werden. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass es sich eher um unspezifische Reaktionen in den beiden Testen handelt, als um echte Diskrepanzen.

3.3.3 Auswertung diskrepanter und unklarer Serodiagnosen

Die differenzierte vollständige Darstellung und Auswertung, der in der Kontingenztafel (siehe Tabelle 3.3, Seite 42) sichtbar gemachten Überschneidungen einzelner Serodiagnosen und insbesondere die Betrachtung der „unklaren“ Seren, erfolgte ausführlich als Einzelfallbeschreibungen im Anhang (siehe Seiten 108-119).

3.3.3.1 Fazit zu Diskrepanzen des Serostatus „zurückliegend“

Die Antikörperreaktionsmuster auf den kommerziellen Immunoblots der Fa. Viramed ließen bei 149 Seren die eindeutige Serodiagnose einer zurückliegenden Infektion zu. Mit den Testen der Fa. Virotech wurden mit den für die Studie festgelegten Interpretationskriterien zunächst 141 dieser 149 Proben als Serostatus „zurückliegend“, 2 als „kürzlich“ und 6 als „unklar“ bewertet. Nach Einzelfallbetrachtung zeigten die Testergebnisse des EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) zumindest bei 2 dieser Seren einen unklaren Befundstatus. 6 der diskrepanter Seren wären auch nach der Virotech-Arbeitsanweisung [150] aufgrund der VCA p18-IgG-Bande bei negativem IgM-Befund bzw. Nachweis von EBNA1-IgG als zurückliegende Infektion zu bewerten gewesen. Einschränkend fehlte jedoch bei 2 Proben zur sicheren Diagnose der Nachweis des Durchseuchungsmarkers (VCA-IgG), sodass eine unspezifische Reaktion nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen war. Die Auswertungen legten die Annahme nahe, dass ein Überwiegen der VCA p18-IgG-Antwort gegenüber der VCA gp125-IgG-Bande auch bei positivem IgM-Ergebnis entgegen der gültigen Auswertekriterien des Herstellers Virotech eine frische EBV-Infektion ausschließen könnte und eine abgelaufene Infektion vermutet werden kann.

3.3.3.2 Fazit zu Diskrepanzen des Serostatus „unklar“

Mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) wurden 21 der getesteten Seren dem Serostatus „unklar“ zugeordnet, mit dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) 25 Proben (siehe Tabelle 3.15). Bei jeweils 9 Seren war mittels beider kommerzieller Immunoblots eine frische Infektion nicht sicher auszuschließen. In den Untersuchungen mit den kommerziellen Viramed-Immunoblots bestand bei 7 Proben der Verdacht auf eine frische Infektion mit einem atypisch frühen bzw. unspezifischem EBNA1-IgG-Nachweis. Das gleiche Antikörperreaktionsmuster fand sich lediglich bei 4 Proben durch Austestung mit den Virotech-Immunoblots. Umgekehrt bestand bei 4 Seren mit negativem IgM-Nachweis mit dem Viramed-Test der Verdacht auf eine zurückliegende Infektion ohne EBNA1-IgG-

Nachweis und bei dem Virotech-Test bei 7 Proben. Bei 3 Seren war mittels Virotech-Immunoblotbewertung ein unspezifischer EBNA1-IgG-Nachweis bei fehlender VCA-IgG-Reaktivität nicht von einer zurückliegenden Infektion zu differenzieren. 1 Probe konnte mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) keiner definierten Serogruppe zugeteilt werden. Ohne Eingruppierung in einen Serostatus durch den EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) blieben 2 Seren aufgrund seltener Antikörperreaktionsmuster.

Tabelle 3.15: Häufigkeiten der verschiedenen Gruppen des Serostatus „unklar“, eingeteilt mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) und dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech)

Gruppen des Serostatus „unklar“ ³	Viramed		Virotech		Korr. p-Wert ¹	Signifikanz ²
	Anzahl	%	Anzahl	%		
Gruppe 14 frisch nicht auszuschließen	9	42,9	9	36,0	1,00000	n.s.
Gruppe 15 V.a. frisch mit atypisch frühem EBNA1-IgG	7	33,3	4	16,0	1,00000	n.s.
Gruppe 16 vermutlich zurückliegend ohne EBNA1-IgG	4	19,0	7	28,0	1,00000	n.s.
Gruppe 17 zurückliegend oder unspezifisches EBNA1-IgG	0	0,0	3	12,0	1,00000	n.s.
ohne	1	4,8	2	8,0	1,00000	n.s.
Summe	21	100,0	25	100,0		

¹ Die p-Werte wurden mit dem Exakten Fischer-Test für jede Zeile einzeln berechnet, wie im Material und Methodenteil beschrieben, und mit der Methode von Holm für multiples Testen korrigiert (n = 5).

² Als signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert ≤ 0.05 angenommen. n. s., nicht signifikant; *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01; ***, p ≤ 0,001; ****, p ≤ 0,0001.

³ Der Serostatus „unklar“ ist in Tabelle 2.2 definiert.

Eine schematisierte Testinterpretation serologischer Befunde ist grundsätzlich problematisch. Entscheidend für die Befundinterpretation darf nie ein einzelnes Ergebnis, sondern immer die Bewertung aller Befunde im Kontext mit der klinischen Fragestellung sein. Daher erfolgte mit dem für die Studie festgelegten Interpretationsschema eine vorsichtige, eher zurückhaltende Zuordnung kritischer bzw. seltener Konstellationen eher zugunsten des Serostatus „unklar“. Mit dieser Zuordnung zu einem Serostatus gab es in der Studie keine Überschneidungen zwischen der wichtigen Differenzierung zwischen seronegativ, frischer und zurückliegender Infektion. Die exemplarische Betrachtung der Einzelfälle mit diskrepanten Bewertungen aufgrund der Ergebnisse beider kommerzieller Immunoblots und die Auswertung der „unklaren“ Seren macht deutlich, dass die Antikörperreaktionsmuster testabhängig aufgrund der jeweiligen Antigenzusammensetzung stark variieren können. Zudem hätten schon aufgrund der sich unterscheidenden Interpretationskriterien der Arbeitsanweisungen beider Testhersteller die Teste unterschiedlich bewertet werden können.

2 Ergebnisse sollten besondere Beachtung finden. Zum einen müssen EBNA1-IgG-Banden in Kombination mit Nachweisen von Frühmarkern VCA gp125- und EA-D-IgG in Abwesenheit von VCA p18-IgG bei deutlich positivem IgM-Befund kritisch hinterfragt werden, da es sich um atypisch früh bzw. unspezifisch auftretende EBNA1-IgG-Antikörper bei Primärinfektion handeln könnte. Zum anderen sind auch Primärinfektionen bei isoliertem VCA p18-Nachweis im IgG- und IgM-Immunoblot möglich. Ein Nachweis einer VCA p18-IgG-Reaktivität (Spätmarker) war daher nicht in jedem Fall mit einem länger zurückliegenden Infektionszeitpunkt gleichzusetzen. Die Verläufe zeigten auch, dass die Ausbildung der EBNA1-IgG-Antikörper häufig mehrere Monate in Anspruch nehmen kann, aber zwischenzeitlich das Bandenverhältnis der beiden VCA-IgG-Antikörper zueinander ein wichtiger Hinweis für einen bereits etwas zurückliegenden Infektionszeitpunkt sein kann.

3.4 Zuordnung des EBV-Infektionsstatus

Um eine klinische Einschätzung der Testergebnisse zu ermöglichen, erfolgte die Zuordnung der vorselektierten EBV-Seren zu einem bestimmten Infektionsstatus. Hierzu wurden die Ergebnisse aller untersuchten Immunoblots in Zusammenschau mit den ELISA- bzw. CLIA-Testen, dem Patientenalter und soweit vorhanden Voruntersuchungen, Transaminasen, dem CMV-Status, typischen Blutbildveränderungen sowie der Testung auf heterophile Antikörper berücksichtigt. So konnten Seren mit zunächst nicht klassischer Antikörperkonstellation in den Immunoblots einer Firma (z. B. atypisch früher EBNA1-IgG-Nachweis bei Primärinfektion in einem Immunoblot) noch eindeutig einem Infektionsstatus zugeordnet werden (siehe Tabelle 3.16). Maßgeblich für die Zuordnung zum Infektionsstatus war die Stimmigkeit der ermittelten quantitativen immunenzymatischen Bestimmungen der spezifischen IgM- und IgG-Antikörper in den Suchtesten mit den Antikörperkonstellationen in den Immunoblots.

Tabelle 3.16: Einteilung der 289 validen Seren in einen EBV-Infektionsstatus

Infektionsstatus	Anzahl
Seronegativ	18
Frische Infektion	80
Länger zurückliegende Infektion	150
Kürzliche Infektion	21
Unklare Konstellationen:	20
– scheinbar zurückliegende Infektion	4
– Verdacht auf frische Infektion	10
– frische Infektion nicht auszuschließen	6
Summe	289

Um den EBV ViraStripe IgG/IgM zu optimieren, wurden nach der Klassifikation der Seren

in einen Infektionsstatus im ersten Schritt die sicher frischen EBV-Primärinfektionen betrachtet. Das Durchschnittsalter der 80 Patienten in dieser Gruppe betrug 15,7 Jahre. Der jüngste Patient war 1 Jahr und die älteste Patientin 30 Jahre alt. Nachfolgend wurden dann für die Methodenoptimierung die Ergebnisse der kommerziellen Teste und der F&E EBV ViraStripes IgG/IgM von der Fa. Viramed für die zurückliegenden Infektionen ausgewertet. Das Durchschnittsalter der 289 Patienten, die in der Studie für den Methodenvergleich in den EBV Line Immunoblots valide getestet wurden, lag bei 26 Jahren.

3.5 Optimierung des EBV ViraStripe IgG/IgM der Fa. Viramed

3.5.1 Untersuchung frischer EBV-Infektionen

3.5.1.1 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgM

Bei allen 80 Seren mit frischer EBV-Infektion wurden im EBV ViraStripe IgM Antikörper detektiert, wobei 1 Serum nur eine fragliche Reaktivität zeigte. Die Proben, die eine positive Bande im IgM-Immunoblot gegen das Early Antigen aufwiesen, hatten gleichzeitig auch mindestens 1 Bande gegen die Viruscapsid-Antigene nachweisbar. Aufgrund des fehlenden Zugewinns wurde daher nachfolgend auf die zusätzliche Beschreibung und Darstellung der EA-IgM-Antikörper aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit verzichtet, zumal im F&E EBV ViraStripe IgG/IgM keine Optimierung des Early Antigens vorgesehen war.

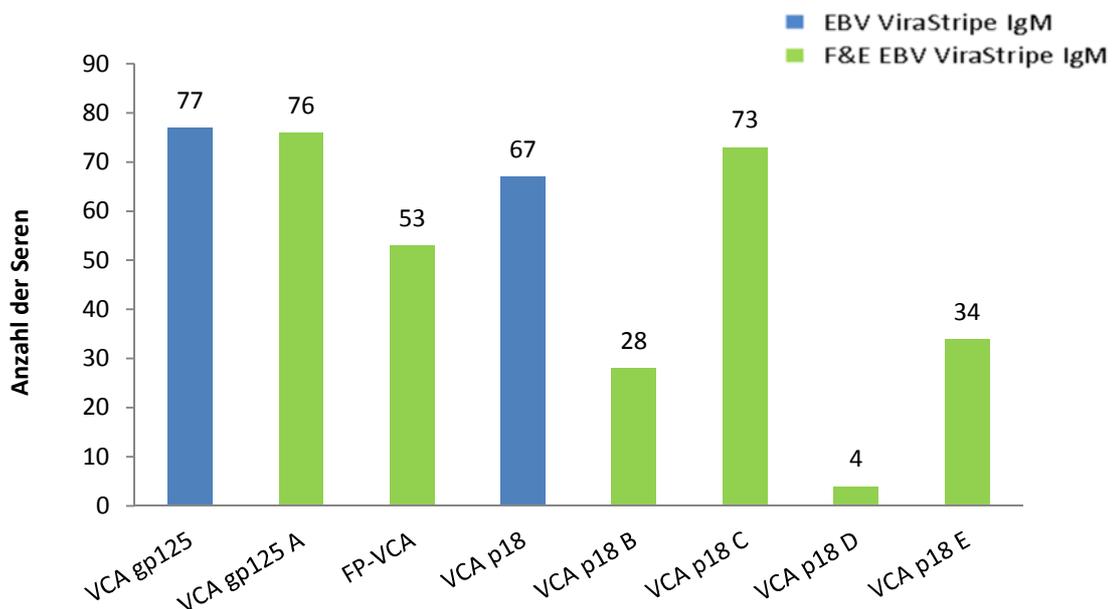


Abbildung 3.3: Anzahl positiver VCA-Banden auf dem EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum F&E EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion

Die Abbildung 3.3 zeigt die Anzahl positiver VCA-Banden auf dem EBV ViraStripe IgM im

Vergleich zum F&E EBV ViraStripe IgM nach Bewertung der 80 Seren mit frischer EBV-Infektion. Mittels EBV ViraStripe IgM konnten in 77 Proben VCA gp125-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Zu einem hohen Anteil von 83,8% (67/80) waren in der Gruppe der frischen Infektionen bereits IgM-Antikörper gegen das Antigen VCA p18 auf dem EBV ViraStripe IgM vorhanden.

13 Proben (16,25%) hatten im kommerziellen IgM-Test von Viramed aufgrund des isolierten Nachweises von VCA gp125-Antikörpern und 3 Proben bei isoliertem VCA p18-Nachweis ein reaktives Ergebnis. In Abbildung 3.4 sind die Häufigkeiten der verschiedenen VCA-Bandenverteilungsmuster im EBV ViraStripe IgM vollständig dargestellt. Bei 76,25% (61/80) der Seren fand sich auf den EBV ViraStripe IgM-Teststreifen der Fa. Viramed ein Antikörperreaktionsmuster mit isolierter bzw. stärkerer Intensität der VCA gp125-Bande gegenüber der VCA p18-Bande. Da 23,75% (19/80) der Proben auf den EBV ViraStripe IgM-Blots eine gleich starke bzw. führende oder isolierte VCA p18-Antwort aufwiesen, konnte man nicht aufgrund eines bestimmten Antikörperreaktionsmusters im IgM-Immunoblot auf eine akute Infektion schließen. Es zeigte sich, dass Antikörper der Klasse IgM gegen das VCA p18 zu einem hohen Prozentsatz bereits in der frühen Phase einer EBV-Infektion auftreten können und somit zusätzlich zum VCA gp125-IgM eine hohe Sensitivität als Frühmarker besitzen.

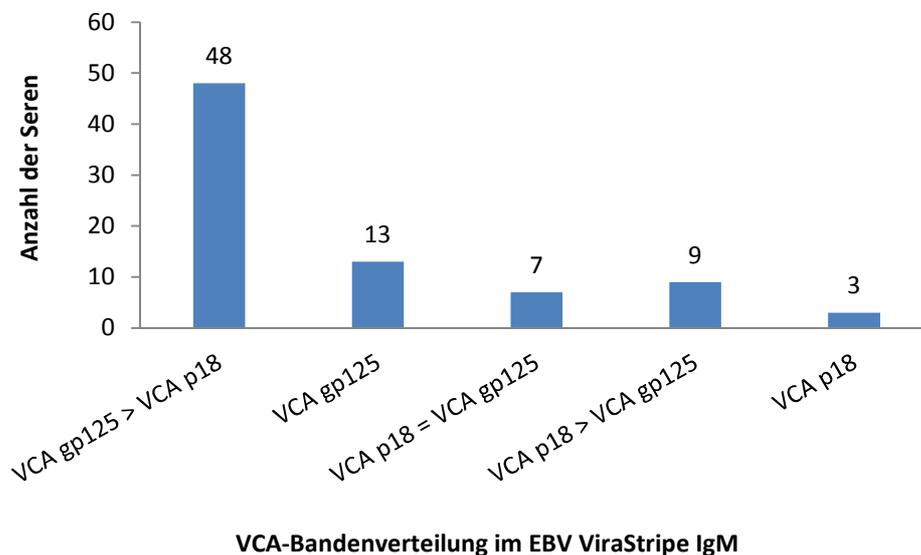


Abbildung 3.4: Häufigkeiten der VCA-Bandenverteilungsmuster im EBV ViraStripe IgM (Viramed) nach Untersuchung von 80 Seren mit einer frischen EBV-Infektion.

Die Antigenlösung von VCA gp125 fand auf dem F&E EBV ViraStripe IgM (VCA gp125 A) ausschließlich in gleicher Konzentration wie auf dem kommerziellen Streifen Verwendung. Erwartungsgemäß fand sich daher eine vergleichbare Anzahl von 76 (95%) positiven

VCA gp125-Banden auf dem F&E EBV ViraStripe IgM versus 77 (96,3%) Banden auf dem EBV ViraStripe IgM bei den 80 Seren mit frischer EBV-Infektion (siehe Abbildung 3.3). Beim kommerziellen IgM-Blot der Fa. Viramed wurden 67 (83,8%) Banden bei Verwendung des VCA p18 (trunkiertes Antigen) in Standardkonzentration positiv getestet. Mittels des gleichen aufgesprühten Antigens in 0,75-facher Konzentration des VCA p18 konnten nur noch 28 (35%) positive Banden (VCA p18 B) auf dem IgM-Forschungsblot gefunden werden. Lediglich 4 (5%) Antikörperreaktivitäten gegen VCA p18 D wurden am Applikationsort der 0,67-fachen Konzentration von VCA p18 B auf dem F&E EBV ViraStripe IgM nachgewiesen. Da bei einer geringen Anzahl der Patienten mit EBV-Primärinfektion isoliert Antikörper gegen VCA p18 in der IgM-Analyse detektiert wurden (siehe Abbildung 3.4), würde bei einer Verwendung des VCA p18 B und VCA p18 D zu viel an Sensitivität eingebüßt werden. Mit 73 (91,3%) positiven Nachweisen zeigt lediglich das Volllängenprotein (VCA p18 C) auf dem F&E EBV ViraStripe IgM eine vergleichbare bzw. sogar eine leicht verbesserte Sensitivität gegenüber dem VCA p18 ($n = 67$; 83,8%) des EBV ViraStripe IgM (siehe Abbildung 3.3). Mit dem Volllängenprotein in 0,33-facher Konzentration von VCA p18 C konnten nur noch 34 (42,5%) Banden auf dem IgM-Forschungsblot nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein (FP) aus trunkierten Antigenen von VCA p18 und VCA gp125, welches besonders gut in der frühen Phase der Infektion reagieren sollte, lieferte mit nur 53 (66,3%) positiven Banden in der Gruppe der frischen Infektionen ein ebenso enttäuschendes Ergebnis auf dem F&E EBV ViraStripe IgM. Auch dieses Antigen war aufgrund seiner geringen Sensitivität bei den frühen EBV-Primärinfektionen ungeeignet zur Verwendung in der IgM-Analyse.

Mittels Viracam und der Virascan Software 2.07 der Fa. Viramed konnten die Antikörperreaktivitäten der analysierten Antigene semiquantitativ erfasst werden. Um einen Eindruck zu bekommen, in welchem Bereich die gemessenen relativen Intensitäten auf dem F&E EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum EBV ViraStripe IgM lagen, wurden Box-Whisker-Plots für alle Antigene angefertigt. Die Grafiken ermöglichten eine Überprüfung der Verteilung aller gemessenen Intensitäten der auf den Immunoblots aufgetragenen Antigene. Betrachtet wurden im Kollektiv der frischen Infektionen zunächst identische Antigene, welche in gleicher Konzentration (EA-D p54; VCA gp125) auf beiden IgM-Teststreifen aufgebracht waren, da hier identische Verteilmuster erwartet wurden (siehe Abbildungen 3.5 und 3.6).

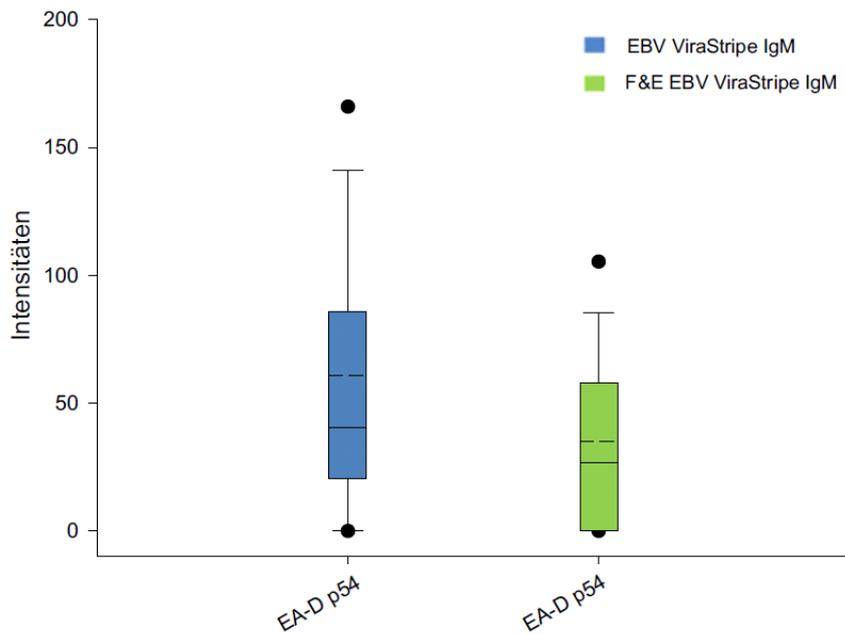


Abbildung 3.5: Box-Whisker-Plots der gemessenen Intensitäten der EA-D p54-Antikörper auf dem EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum F&E EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Das EA-D p54-IgM ist für beide Teste mit einer etwa gleich großen Box und ähnlichem Median dargestellt, d.h. die Streuung der Daten und die Mitte der Verteilung lagen hier in etwa gleich. Die Lage der Boxen und ihr Mean-Wert zeigten jedoch tendenziell niedrigere relative Intensitäten beim F&E EBV ViraStripe IgM, was zur geringeren Positivrate durch Verschiebung von Messwerten unter den Cut off führte. Abschließend ließ sich feststellen, dass aufgrund niedriger gemessener relativer Intensitäten im F&E EBV ViraStripe IgM weniger Antikörper gegen EA-D p54 bei Verwendung des gleichen Antigens in unveränderter Konzentration im Vergleich zum Routineblot detektiert werden konnten.

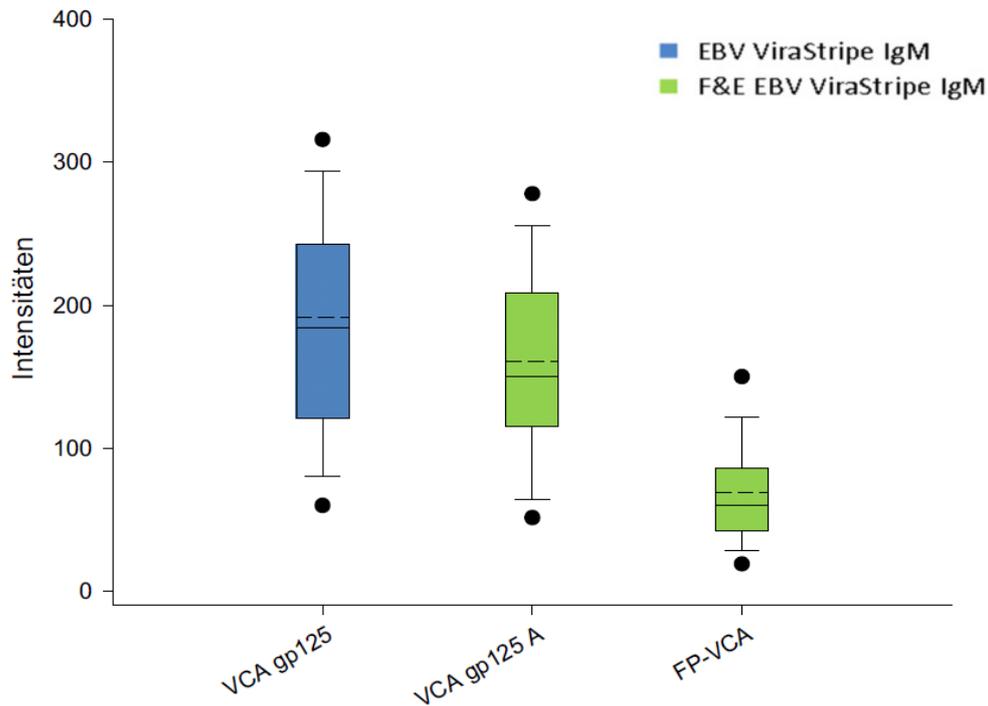


Abbildung 3.6: Box-Whisker-Plots der gemessenen Intensitäten der VCA gp125- und FP-VCA-Antikörper auf dem F&E EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Der Median der Box für die VCA gp125-Antikörper der Klasse IgM wurde wiederum niedriger im F&E EBV ViraStripe IgM (VCA gp125 A-IgM) als im kommerziellen Blot (VCA gp125-IgM) der Fa. Viramed berechnet. Die unteren Begrenzungen beider Boxen lagen deutlich über dem Cut off auf fast identischer Höhe, wodurch sich die gleichen Positivraten erklären. Hingegen stellte sich die obere Begrenzung der Box im kommerziellen Blot deutlich höher dar, sodass auch für die Antikörper gegen das VCA gp125 in Standardkonzentration im F&E EBV ViraStripe IgM geringere relative Intensitäten analysiert wurden.

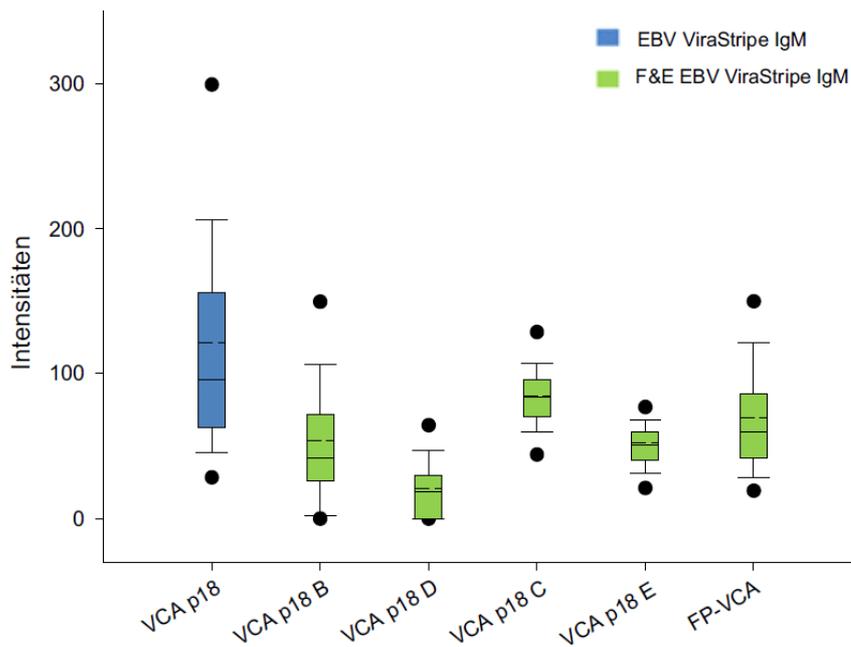


Abbildung 3.7: Box-Whisker-Plots der gemessenen Intensitäten für die Antikörper gegen die verschiedenen Antigene des VCA p18 in unterschiedlichen Konzentrationen und gegen das FP-VCA auf dem F&E EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Weiterhin wurden die in unterschiedlichen Konzentrationen aufgebracht bzw. auch als Volllängenprotein verwendeten Antigene des VCA p18 und das Fusionsprotein hinsichtlich der Verteilung der gemessenen Scanintensitäten in beiden Viramed-Testen miteinander verglichen. Die Abbildung 3.7 macht deutlich, dass lediglich der Median-Wert für das VCA p18 C-IgM (Volllängenprotein) auf dem F&E EBV ViraStripe IgM in vergleichbarer Höhe mit dem VCA p18-IgM auf dem EBV ViraStripe IgM bestimmt wurde. Alle anderen Antikörper lagen mit ihren Medianen deutlich darunter. Die Box des VCA p18 C-IgM war kleiner und wies somit eine geringere Streuung der Werte als die des im Routineblot verwendeten VCA p18-IgM auf. Da sich die unteren Boxbegrenzungen bei etwa der gleichen relativen Intensität darstellten, zeigten die beiden Antigene bei den frischen Infektionen eine fast identische Sensitivität auf.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es lediglich bei Verwendung des VCA p18 C (Volllängenprotein) auf dem F&E EBV ViraStripe IgM zu keinem Sensitivitätsverlust im Vergleich zum kommerziellen Immunoblot der Fa. Viramed bei den frischen EBV-Infektionen kam.

3.5.1.2 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgG

In 79 (98,8%) der vorselektierten Proben mit frischer Infektion waren EBV-spezifische IgG-Antikörper auf den EBV ViraStripes nachweisbar, wobei 2 Streifen nur fraglich reaktiv gewertet werden konnten. Die Abbildung 3.8 zeigt eine Übersicht zu den ermittelten positiven VCA- und EBNA1-IgG-Banden in den Viramed-Testen. Mittels EBV ViraStripe IgG wurden 77 (96,3%) VCA gp125-IgG-positive und 18 (22,5%) VCA p18-IgG-positive Seren gefunden. Auf den kommerziellen IgG-Immunooblots der Fa. Viramed waren sechsmal atypisch früh nachweisbare EBNA1-IgG-Antikörper nachweisbar. Insgesamt dominierte der isolierte Nachweis des Frühmarkers VCA gp125-IgG bei den frischen Infektionen, sodass bei positiver IgM-Reaktivität und fehlendem EBNA1-IgG-Nachweis eine isolierte Bande gegen VCA gp125 auf dem IgG-Immuno blot als Bestätigung einer frischen Infektion zu werten ist. Da es ein Ziel war, das Bandenverhältnis der VCA-Antikörper zueinander bei den zurückliegenden Infektionen zu optimieren, erfolgte die Untersuchung der vorselektierten frischen Infektionen zur Sicherstellung, dass keine dieser Infektionen mit anderen Antigenen bzw. Konzentrationen verloren gehen würden.

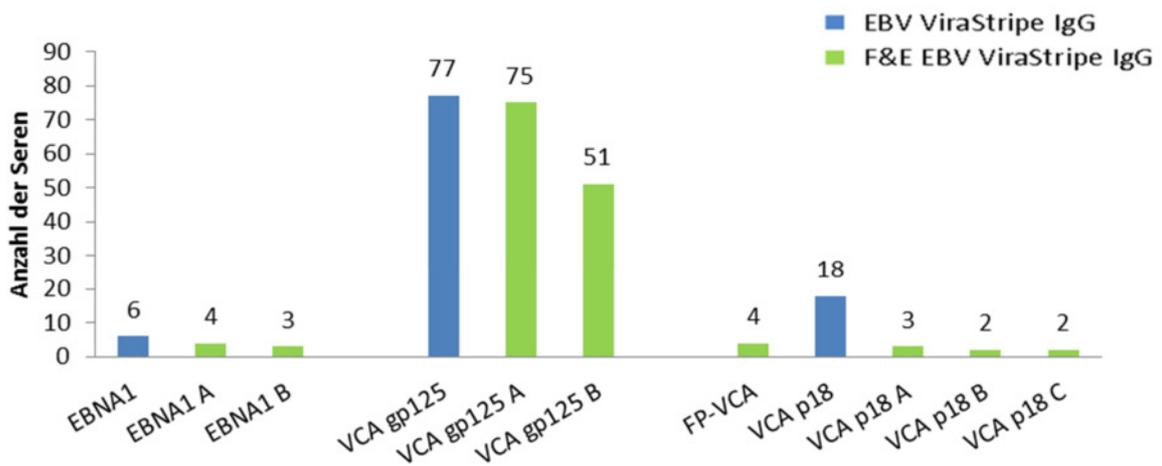


Abbildung 3.8: Anzahl positiver EBNA1- und VCA-Banden auf dem EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum F&E EBV ViraStripe IgG nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion.

Die kommerziell verwendete Antigenlösung des VCA p125 wurde auf dem F&E EBV ViraStripe IgG zusätzlich in einer niedrigeren Konzentration VCA gp125 B (0,5-fach von VCA gp125 A) aufgesprüht. Mit dem Antigen VCA gp125 A in Standardkonzentration konnten 75 (93,8%) Banden auf dem Forschungsblot positiv bestimmt werden. Diese Zahl war vergleichbar mit der Messung von 77 (96,3%) Reaktivitäten auf dem kommerziellen Blot der Fa. Viramed. Bei Verwendung der halben Konzentration des Antigen VCA gp125 A auf den Teststreifen (VCA gp125 B) wurden lediglich noch 51 (63,8%) posi-

tive Reaktivitäten messbar. Die deutliche Sensitivitätseinbuße beim Nachweis der akuten Infektionen mit dem IgG-Teststreifen zeigte, dass eine niedrigere VCA gp125-Konzentration zur Verbesserung des Bandenverhältnisses der VCA-IgG-Antikörper zueinander nicht geeignet war.

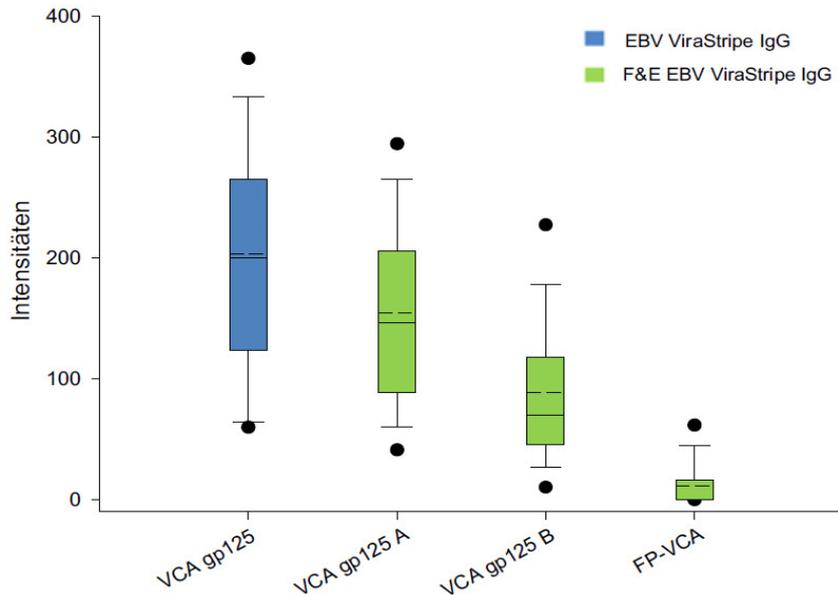


Abbildung 3.9: Box-Whisker-Plots der gemessenen Intensitäten für die Antikörper gegen VCA gp125, aufgetragen in verschiedenen Konzentrationen und gegen FP-VCA auf dem F&E EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum EBV ViraStripe IgG nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Die Lage der Boxen und der zugehörigen Medianwerte in der Kastengrafik verschob sich für die gemessenen Intensitäten gegen das Antigen VCA gp125 in Standardkonzentration in Richtung niedrigere relative Intensitäten beim F&E EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum EBV ViraStripe IgG (siehe Abbildung 3.9). Da jedoch die untere Begrenzung der Box für die Intensitäten gegen das Antigen VCA gp125 A im Diagramm noch knapp oberhalb der Cut off-Grenze lag, war die Positivrate noch annähernd gleich wie auf den EBV ViraStripe IgG-Blots. Der untere Rand der Box für die 0,5-fache Konzentration von VCA gp125 verlagerte sich jedoch deutlich unter den Cut off, sodass mit dieser Konzentration (VCA gp125 B) nicht mehr alle frischen Infektionen detektiert werden konnten. Mittels EBV ViraStripe IgG der Fa. Viramed wurden sechs atypisch frühe EBNA1-Reaktivitäten gemessen. Bei Verwendung des gleichen Antigens in Standardkonzentration wurden auf den F&E EBV ViraStripes vier Reaktionen gegen EBNA1 A-IgG positiv befundet. Wurde das gleiche Antigen in 0,5-facher Konzentration von EBNA1 A verwendet, konnte

die Anzahl der atypisch frühen EBNA1-IgG-Reaktivitäten auf drei reduziert werden. Entscheidend zur abschließenden Beurteilung und Eignung der ausgetesteten EBNA1-Konzentrationen war jedoch die Performance in der Gruppe der länger zurückliegenden Infektionen (siehe 3.5.2.1).

Eine Verwendung des Fusionsproteins in der IgG-Analyse zur Detektion von frischen Infektionen als Frühmarker konnte aufgrund einer sehr geringen Positivrate von 5% (4/80 Proben) bei der Auswertung dieses Kollektivs ausgeschlossen werden. Die niedrigen positiven Nachweisraten der verschiedenen Antigene gegen VCA p18 in unterschiedlichen Konzentrationen sind in der Abbildung 3.8 dargestellt. Eine Bewertung dieses Spätmarkers erfolgte erst bei der Auswertung der zurückliegenden Infektionen, zumal es in der Gruppe der frischen Infektionen keinen isolierten VCA p18-IgG-Nachweis gab und aufgrund niedrigerer Nachweisraten im IgG-Immunoblot durch Verwendung anderer Antigene somit keine der frühen Infektionen unentdeckt geblieben wären.

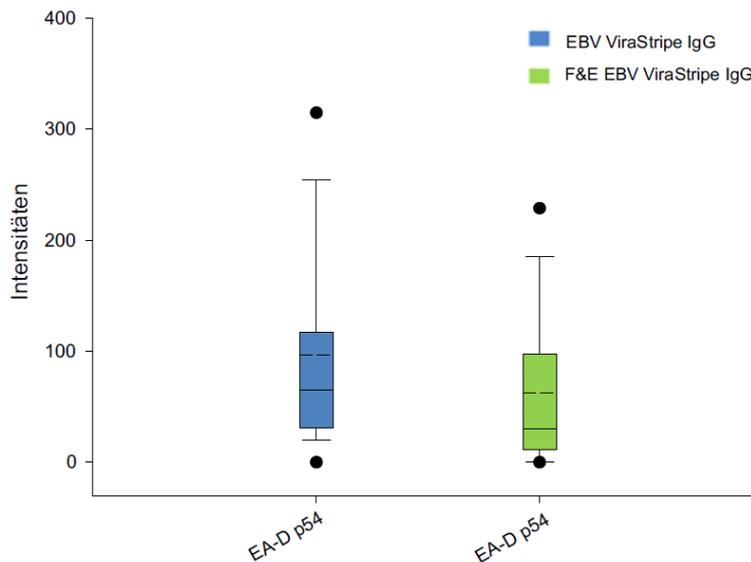


Abbildung 3.10: Box-Whisker-Plots der gemessenen Intensitäten der EA-D p54-Antikörper auf dem EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum F&E EBV ViraStripe IgG nach Untersuchung von 80 Seren mit frischer EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Das Antigen EA-D p54 reagierte im F&E EBV ViraStripe IgG ähnlich wie in der IgM-Analyse (siehe Abbildung 3.10). In der Kastengrafik stellten sich die Intensitäten gegen das EA-D p54 für beide Viramed-Teste wiederum mit einer etwa gleich großen Box dar, jedoch lag der Median des Forschungsblots bei einer deutlich niedrigeren relativen Intensi-

tät. Die untere Begrenzung der Box für diesen Test verlagerte sich aufgrund der niedrigen Messwerte weiter nach unten. Mittels F&E EBV ViraStripe IgG wurden bei Verwendung identischer Antigene in gleicher Konzentration im Vergleich zum EBV ViraStripe IgG deutlich weniger IgG-Antikörper gegen EA-D p54 detektiert.

Abschließend konnte bereits nach Auswertung der frischen EBV-Primärinfektionen festgestellt werden, dass mit einer Erniedrigung der Konzentration für das Antigen VCA gp125 aufgrund des Sensitivitätsverlustes in dieser Gruppe keine Optimierung des Bandenverhältnisses der VCA-Antikörper zueinander auf dem EBV ViraStripe IgG zu erreichen war.

3.5.2 Untersuchung zurückliegender EBV-Infektionen

3.5.2.1 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgG

Den größten Anteil der für die Studie untersuchten Proben machten 150 Seren mit länger zurückliegenden Infektionen aus. Gemeinsam war allen vorselektierten Seren mit zurückliegender Infektion der Nachweis zumindest eines Spätmarkers (EBNA1-IgG, VCA p18-IgG) auf einem kommerziellen EBV-IgG-Immunoblot sowie die Stimmigkeit der quantitativen Nachweise in den Suchtesten zu den Ergebnissen der Immunoblots. Da bereits nach der Auswertung der frischen Infektionen die Verwendung einer niedrigeren Konzentration für das Antigen VCA gp125 und eine Verwendung des Fusionsproteins aufgrund des Sensitivitätsverlustes in dieser Gruppe ausgeschlossen war, erübrigte sich bei den länger zurückliegenden Infektionen die Betrachtung dieser Antigene, um eine Verbesserung der Bandenverteilung der VCA-Antikörper zu erreichen. Die nachfolgende Auswertung zur Optimierung des EBV ViraStripe IgG reduzierte sich daher auf die Auswertung des EBNA1-IgG und der Antikörper gegen die verschiedenen Antigene des VCA p18.

142 (95%) EBNA1-IgG-positive Seren und 146 (97%) positive Nachweise für VCA p18-IgG konnten mit dem kommerziellen Test detektiert werden (siehe Abbildung 3.11). Bei der Betrachtung der nachgewiesenen IgG-Antikörper gegen das Antigen EBNA1 im F&E EBV ViraStripe IgG mit Auftragung in der Standardkonzentration war die Anzahl der detektierten Banden mit 141 (94%) Reaktivitäten im Vergleich zum kommerziellen Viramed-Test lediglich um eine Bande reduziert.

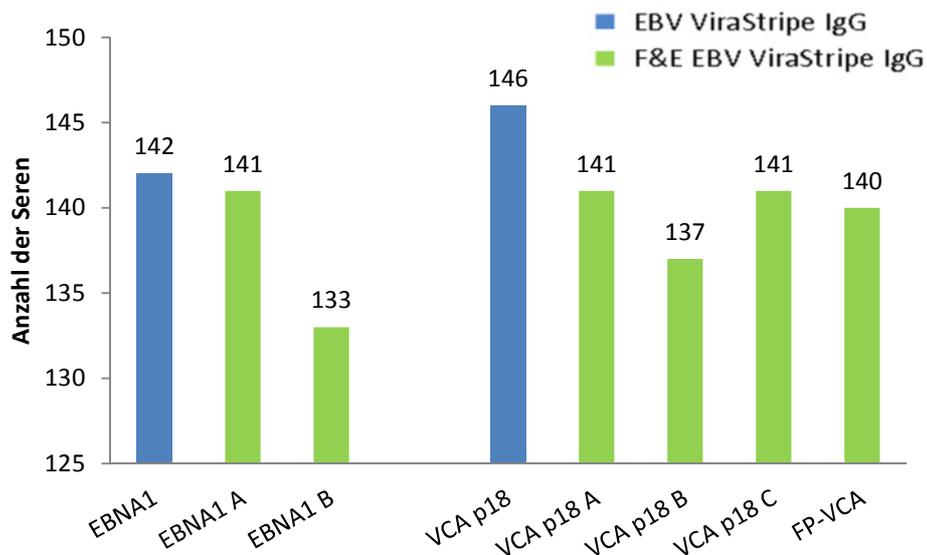


Abbildung 3.11: Anzahl positiver EBNA1-, VCA p18- und FP-VCA-Banden auf dem F&E EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum EBV ViraStripe IgG nach Untersuchung von 150 Seren mit zurückliegender EBV-Infektion.

Die auf den EBV ViraStripes IgG und F&E EBV ViraStripes IgG gemessenen relativen Intensitäten der EBNA1-IgG-Konzentrationen wurden in Box-Whisker-Plots in Abbildung 3.12 dargestellt. Durch die Lage der Boxen und der zugehörigen Mean-Werte konnte veranschaulicht werden, dass kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Positivrate für EBNA1-IgG bei Verwendung der Standardkonzentration auf beiden Immunoblots der Fa. Viramed bestand, jedoch unterschieden sich die gemessenen relativen Intensitäten deutlich voneinander. Auf dem Forschungsimmunoblot wurden für das Antigen EBNA1 A in der Konzentration, in welcher es auch auf dem kommerziellen Test verwendet wird, niedrigere Werte quantifiziert. Beim Vergleich der Positivraten der EBNA1-Reaktivitäten auf dem F&E EBV ViraStripe IgG wurde ein Sensitivitätsverlust bei der Verwendung der halben Standardkonzentration (EBNA1 B) sichtbar. Mit der 0,5-fachen Konzentration konnten nur noch 133 (89%) EBNA1-IgG-Banden positiv bewertet werden. Ziel der Ajustierung der niedrigen EBNA1-Konzentration war es, eine Reduktion von atypisch frühen bzw. unspezifisch reagierenden Banden bei den frischen Infektionen zu erhalten. Die Untersuchungsergebnisse der Seren mit zurückliegender EBV-Infektion schlossen den Einsatz der niedrigeren EBNA1-Konzentration aufgrund der Minderung der Sensitivität jedoch aus.

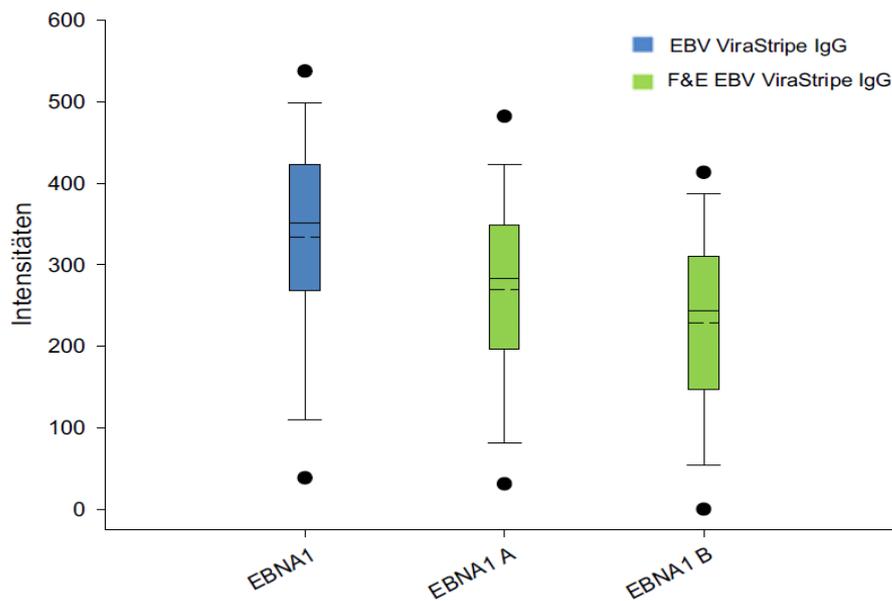


Abbildung 3.12: Box-Whisker-Plots für die gemessenen Intensitäten der Antikörper gegen EBNA1, aufgetragen in verschiedenen Konzentrationen auf dem F&E EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum EBV ViraStripe IgG nach Untersuchung von 150 Seren mit zurückliegender EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Im Anschluss wurden die Positivraten auf den IgG-Immunoblots gegen die verschiedenen VCA p18-Antigene und das Fusionsprotein ermittelt und in Abbildung 3.11 dargestellt. Mit der Standardkonzentration des VCA p18 des kommerziellen Viramed-Blots konnten auf dem F&E EBV ViraStripe IgG nur 141 (94%) von ursprünglich 146 (97%) Banden positiv detektiert werden. Vergleich man nachfolgend die Anzahl der positiven Reaktivitäten gegen die verschiedenen Antigene und Konzentrationen des VCA p18, konnten mit dem trunkierten Antigen VCA p18 A und dem Volllängenprotein VCA p18 C identische Bandenanzahlen auf dem Forschungsblot positiv befundet werden. Mittels des Fusionsprotein (FP) aus VCA p18 und VCA gp125 wurde eine Bande weniger nachgewiesen. Erwartungsgemäß war die Detektionsrate bei Verwendung des trunkierten Antigens VCA p18 B in 0,75-facher Konzentration von VCA p18 A mit 137 (91%) Banden geringer ausgefallen. Bei Betrachtung der qualitativen Nachweisraten konnte eine vergleichbare Sensitivität vom trunkierten VCA p18 A und dem Volllängenprotein (VCA p18 C) festgestellt werden.

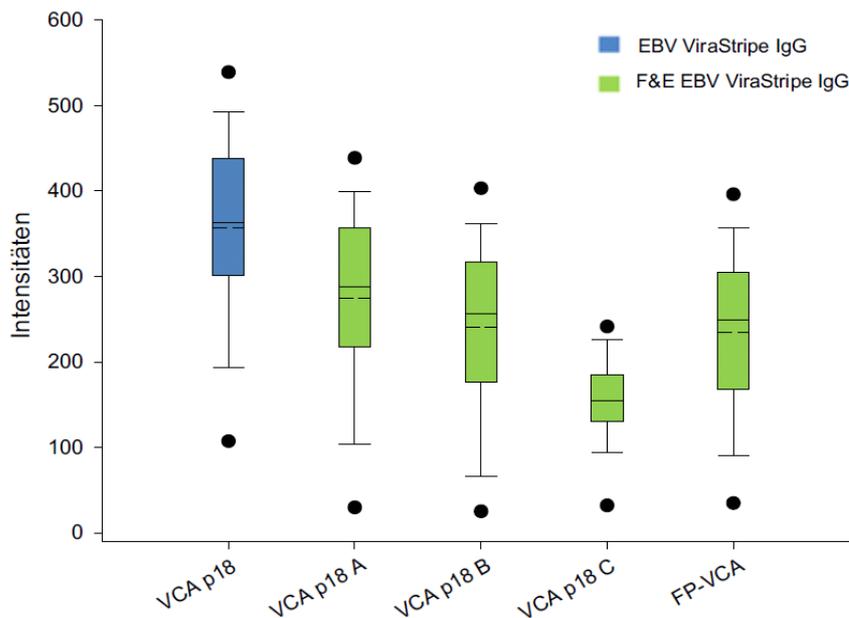


Abbildung 3.13: Box-Whisker-Plots der gemessenen Intensitäten für die Antikörper gegen die verschiedenen Antigene des VCA p18 in unterschiedlichen Konzentrationen und gegen das FP-VCA auf dem F&E EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum EBV ViraStripe IgG nach Untersuchung von 150 Seren mit zurückliegender EBV-Infektion. Die Box wird durch das 25%- und 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist als durchgehende waagerechte Linie im Kasten dargestellt, der Mean-Wert (arithmetisches Mittel) als gestrichelte Linie. 10%-Quantil und 90%-Quantil sind außerhalb der Box als waagerechte Linien eingezeichnet. Das 5%- und 95%-Quantil sind als Punkte dargestellt. Der Cut off für eine positive Bande lag bei einer Scanintensität von 80.

Alle gemessenen relativen Bandenintensitäten gegen die verschiedenen Antigene des VCA p18 und des Fusionsproteins wurden im Box-Whisker-Plot in Abbildung 3.13 miteinander verglichen. In dieser Grafik stellten sich für das Volllängenprotein VCA p18 C deutlich niedrigere Messwerte der relativen Intensitäten gegenüber dem auf dem EBV ViraStripe IgG verwendeten Antigen VCA p18 dar. Demzufolge würde eine Verwendung des Volllängenantigens auf dem EBV ViraStripe IgG zu einer geringeren Rate der gewünschten Antikörperkonstellation mit stärkerer VCA p18-Bande bei den VCA-Antikörper-Nachweisen nach zurückliegender Infektion führen.

Zusammenfassend konnte der EBV ViraStripe IgG aufgrund der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse nicht optimiert werden. Das primäre Ziel, vermehrt Antikörperreaktionsmuster mit Überwiegen der VCA p18-IgG-Antwort gegenüber der VCA gp125-IgG-Reaktivität bei den zurückliegenden Infektionen zu erzielen, konnte mit der durchgeführten Untersuchungsreihe weder mit der Erniedrigung von Antikörperkonzentrationen noch durch die Verwendung anderer Antigene mittels Austestung des F&E EBV ViraStripe IgG erreicht werden.

3.5.2.2 Methodenoptimierung mittels F&E EBV ViraStripe IgM

Nachdem in der Auswertung der Studienergebnisse der Gruppe mit den frischen Infektionen lediglich für das VCA p18 C eine vergleichbare Sensitivität zu dem im EBV ViraStripe IgM verwendeten Antigen des VCA p18 nachgewiesen werden konnte, kam nach bisheriger Prüfung der Ergebnisse eine Verwendung anderer ausgetesteter Antigene bzw. Antigenkonzentrationen in der IgM-Analyse nicht mehr in Frage. Auf den EBV ViraStripes IgM der Fa. Viramed fanden sich unter den 150 getesteten zurückliegenden Infektionen 16 Proben (siehe Abbildung 3.14) mit einem positiven VCA p18-Nachweis. Auf dem F&E EBV ViraStripe IgM waren neben dem Fusionsprotein (FP-VCA) aus trunkierten Antigenen von VCA p18 und VCA gp125 einmal das VCA p18 als Volllängenprotein (VCA p18 C) und zum anderen als trunkiertes Antigen in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Aufgrund der Performance der Antigene in der Gruppe der frischen Infektionen mit lediglich vergleichbarer Sensitivität des VCA p18 Volllängenprotein (VCA p18 C) in der IgM-Analyse wurde dieses Protein anschließend für die älteren Infektionen bewertet.

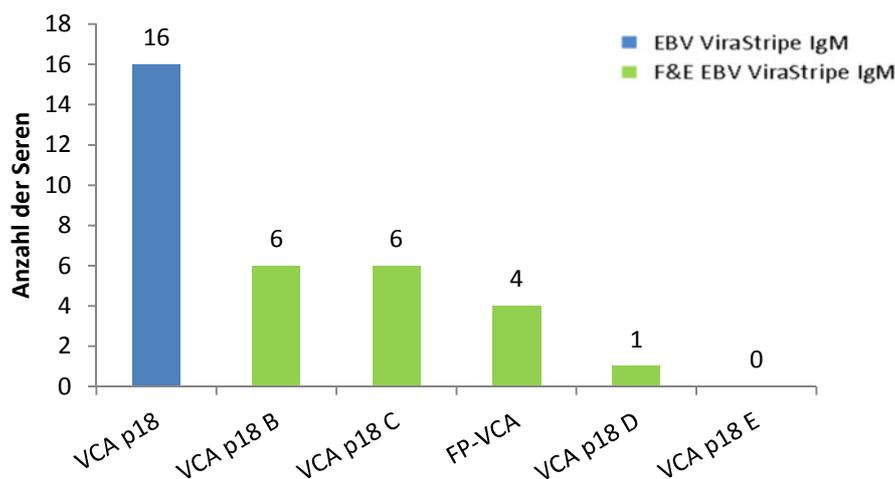


Abbildung 3.14: Anzahl der positiven VCA p18- und FP-VCA-Banden auf dem F&E EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 150 Seren mit zurückliegender EBV-Infektion

Ein direkter Vergleich der Seropositivitäten vom trunkierten Antigen VCA p18 in Standardkonzentration gegenüber dem Volllängenprotein VCA p18 C war nicht möglich, da Erstes nicht auf dem F&E EBV ViraStripe IgM ausgetestet wurde. Mit dem Volllängenprotein VCA p18 C wurden in den untersuchten Patientenseren mit zurückliegender EBV-Infektion nur 6 positive Banden nachgewiesen, sodass eine Reduktion unspezifischer bzw. persistierender IgM-Nachweise durch Verwendung des Volllängenproteins VCA p18 C in der IgM-Analyse nach zurückliegender EBV-Infektion möglich schien.

3.6 Spezifitätsverbesserung mittels F&E EBV ViraStripe IgM

3.6.1 Keine unspezifischen VCA-IgM-Antikörper bei frischer Toxoplasmose

Um den Ansatz einer Spezifitätsverbesserung durch Verwendung des Antigens VCA p18 C in der IgM-Analytik nachzuweisen, wurden 11 Seren von Patienten mit einer frischen Toxoplasmose im EBV ViraStripe IgM jeweils mit und ohne Vorbehandlung durch Virasorb als auch im F&E EBV ViraStripe IgM ausgetestet.

Unter Verwendung der kommerziellen Antigenlösung des VCA p18 auf dem EBV ViraStripe IgM zeigten sich 7 IgM-Reaktivitäten, wobei ein Nachweis davon lediglich grenzwertig am Cut off war (siehe Abbildung 3.15). Nach Vorbehandlung der Seren durch Virasorb wurden im gleichen Immunoblot 9 positive und 2 um den Cut off liegende VCA p18-Banden detektiert. VCA gp125-Antikörper ließen sich in keiner Probe in der IgM-Analyse der beiden Viramed-Teste nachweisen. In allen Seren waren hochtitrig VCA-IgG- und/oder EBNA1-IgG-Antikörper vorhanden.

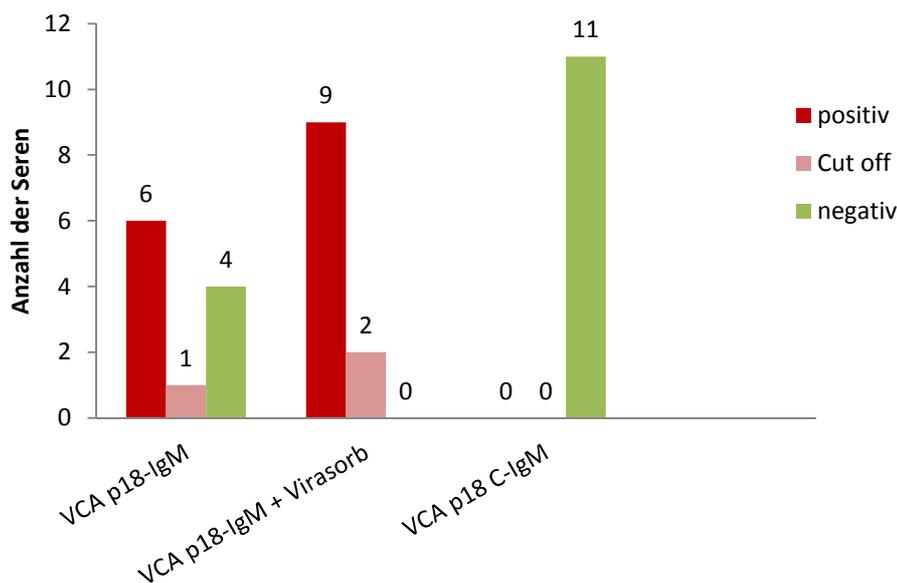


Abbildung 3.15: VCA p18-Reaktivität auf dem EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum VCA p18 C-Nachweis (Volllängenprotein) auf dem F&E EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 11 Seren mit frischer Toxoplasmose. Zusätzlich dargestellt ist der VCA p18-IgM-Nachweis auf dem EBV ViraStripe IgM nach Vorbehandlung der Seren mit Virasorb.

Die Auswertung aller 11 Proben für Antikörper gegen das VCA p18 C mittels F&E EBV ViraStripe IgM fiel negativ aus. Die erhobenen Daten lassen zusammenfassend feststellen, dass unter Verwendung des Volllängenproteins VCA p18 C auf dem

F&E EBV ViraStripe IgM zumindest in dem ausgewählten Kollektiv keine unspezifischen IgM-Reaktivitäten bei frischer Toxoplasmose detektiert wurden.

3.6.2 Reduktion kreuzreagierender VCA-IgM-Antikörper bei CMV-Primärinfektion

32 Seren von Patienten mit frischer bzw. kürzlicher CMV-Primärinfektion wurden zur weiteren Überprüfung des Spezifitätsverhaltens des Antigens VCA p18 C (Volllängenprotein) in der IgM-Analyse parallel in einem Lauf im EBV ViraStripe IgM jeweils mit und ohne Vorbehandlung durch Virasorb als auch im F&E EBV ViraStripe IgM der Fa. Viramed untersucht. Die parallele Austestung ergab in der IgM-Analyse des EBV ViraStripe ohne Verwendung von Virasorb 21 positive und 4 grenzwertige, um den Cut off liegende Reaktivitäten gegen das trunkierte Antigen VCA p18 (siehe Abbildung 3.16). Insgesamt waren somit 78,1% der Proben auf dem kommerziellen IgM-Test ohne Zusatz von Virasorb reaktiv. Bei den mit Virasorb vorbehandelten Seren zeigte sich mit 84,4% ein etwas höherer Prozentsatz an reaktiven Nachweisen auf dem EBV ViraStripe IgM. Hier wurden 25 positive und 2 grenzwertige VCA p18-Banden detektiert. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in 28 Proben höhertitrig EBNA1- und/oder VCA-IgG-Antikörper in den ELISA-Suchtesten gemessen wurden. Im Vergleich dazu entwickelten sich auf den F&E EBV ViraStripes IgM unter Verwendung des VCA p18 C (Volllängenprotein) signifikant weniger Banden. Es wurden lediglich 5 positive und 7 Cut off-nahe Banden nachgewiesen.

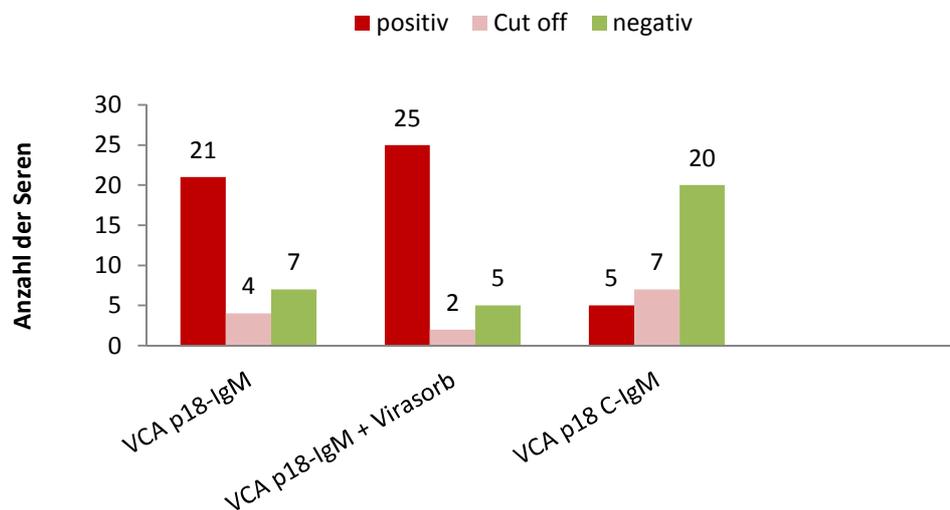


Abbildung 3.16: VCA p18-Reaktivität auf dem EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum VCA p18 C-Nachweis (Volllängenprotein) auf dem F&E EBV ViraStripe IgM nach Untersuchung von 32 Seren mit frischer bzw. kürzlicher CMV-Primärinfektion. Zusätzlich dargestellt ist der VCA p18-IgM-Nachweis auf dem EBV ViraStripe IgM nach Vorbehandlung der Seren mit Virasorb.

Die Ergebnisse der EBV-IgM-Analyse der Patientenseren mit CMV-Primärinfektion sind in Abbildung 3.16 grafisch dargestellt und legen eine Spezifitätsverbesserung durch Verwendung des Volllängenproteins VCA p18 C nahe. Mit dem auf dem F&E EBV Vira-Stripe IgM verwendeten VCA p18 C konnten in diesen Untersuchungen deutlich weniger kreuzreagierende IgM-Antikörper im Rahmen einer CMV-Primärinfektion bzw. persistierende VCA-IgM-Antikörper nach zurückliegender Infektion nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Eine Vielzahl verfügbarer Teste unterschiedlicher Methoden werden für die EBV-Diagnostik routinemäßig verwendet, wobei sich diese stark in ihrer Leistung auch in Abhängigkeit der verwendeten Antigene oder deren Aufbereitung voneinander unterscheiden [113, 125, 127, 132, 151]. Bei der hohen Durchseuchungsrate von weltweit mehr als 90% in der erwachsenen Bevölkerung und des sich in den Industrieländern verlagerten Erstinfektionszeitpunktes von der Kindheit bis ins Erwachsenenalter, der damit verbundenen meist ausgeprägten klinischen Symptomatik mit Überlappungen zu vielen anderen Krankheiten, kommt der sicheren serologischen Einordnung eine große Bedeutung zu [152]. Da anhand der Klinik differentialdiagnostisch die Vielzahl der in Frage kommenden Erreger nicht unterschieden werden können, muss eine harmlose EBV-Infektion von schwerwiegenden Erkrankungen, wie z. B. einer HIV-Infektion oder einem Lymphom, aufgrund unterschiedlicher therapeutischer Konsequenzen serologisch sicher abgegrenzt werden [110, 153].

Mit den zur rationellen EBV-Diagnostik beim Immungesunden häufig eingesetzten ELISA- oder CLIA-Test-Profilen zum Nachweis von EBV-spezifischen Antikörpern (VCA-IgG, VCA-IgM, EBNA1-IgG, EA-D-IgG) können in der Laborroutine anhand eindeutiger serologischer Konstellationen ca. 80% der anfallenden Proben sicher einem EBV-Infektionsstatus wie Primärinfektion, zurückliegende Infektion oder Seronegativität zugeordnet werden [108, 129, 130]. Da die serologische Antwort auf eine EBV-Infektion individuell sehr variabel ausfallen kann [132, 136], ist zur Abklärung nicht klassischer oder mehrdeutiger Ergebniskonstellationen eine Kombination verschiedener Testverfahren für die Zuordnung zu einem Infektionsstatus erforderlich. Mit dem EBV Line Immunoblot kann durch Verwendung von mehreren Antigenen, die vom Virus in verschiedenen Infektionsphasen exprimiert werden, auf einem Teststreifen durch den Nachweis der zeitlich versetzt auftretenden spezifischen Antikörper im Blut, in den meisten Fällen eine eindeutige Zuordnung zu einem Infektionsstatus erfolgen [146]. Auf den in dieser Arbeit untersuchten IgG-Teststreifen fanden die frühen Antigene (VCA gp125 und EA-D) und 2 Spätmarker (VCA p18 und EBNA1) Verwendung.

Aufgrund eines Testwechsels von den EBV Line Immunoblots der Fa. Virotech zur Fa. Viramed in der Routineanalytik des LADR Zentrallabors und den dadurch vermuteten testspezifischen Änderungen der erhaltenen Bandenkonstellationen in den Immunoblot-Ergebnissen, wurde mit der Fa. Viramed die vorliegende Studie zur Austestung eines Forschungs- und Entwicklungsimmunoblots sowie ein Methodenvergleich der beiden kommerziellen EBV Lineblots initiiert. Der Methodenvergleich sollte die Frage klären, ob die Vermutung aus der Routineanalytik, dass sich im Blot der Fa. Virotech häufiger ein

VCA-IgG-Bandenverhältnis mit Überwiegen der VCA p18- gegenüber der VCA gp125-Reaktivität bei den zurückliegenden Infektionen findet als im Vergleichstest der Fa. Viramed, bestätigt werden kann.

Das Hauptziel der Arbeit war, mittels Austestung des F&E EBV ViraStripe IgG eindeutiger EBV-Antikörperreaktionsmuster mit einer stärkeren Reaktivität des VCA p18-IgG gegenüber VCA gp125-IgG bei den länger zurückliegenden Infektionen zu erhalten. Zusätzlich sollte herausgefunden werden, ob die Anzahl unspezifischer bzw. atypisch früh auftretender EBNA1-IgG-Reaktivitäten bei EBV-Primärinfektionen mittels F&E EBV ViraStripe IgG zu reduzieren war. Studienziel der Austestung des F&E EBV ViraStripe IgM war es, unspezifische, kreuzreagierende oder lang persistierende IgM-Nachweise durch Verwendung anderer Antigene bzw. anderer Antigenkonzentrationen zu reduzieren. Dazu sollten zusätzlich Patientenseren mit frischer Toxoplasmose bzw. CMV-Primärinfektion untersucht werden.

4.1 Seroprävalenz

Da in der Studie vorklassifizierte, ausgewählte Seren verwendet wurden, sollte zunächst ein Überblick zur Durchseuchung im Patientenkollektiv erhalten werden. Zur Bestimmung der EBV-Seroprävalenzraten im Einsenderkollektiv des LADR Zentrallabors wurden retrospektiv alle Ergebnisse der Erstbefunde von VCA-IgG-Antikörpern mittels ELISA, gemessen im Zeitraum Anfang Januar 2008 bis einschließlich April 2011, aus dem LIS herausgefiltert. Wegen möglicher maternaler Leih-Antikörper wurde die Altersgruppe unter einem Jahr nicht in der Statistik berücksichtigt. Die in der Literatur publizierten Daten, dass ca. 90% der Bevölkerung der Industriestaaten mit 20 Jahren bereits Kontakt zum Epstein-Barr-Virus hatten, stimmten mit der im Labor ermittelten EBV-Durchseuchungsrate von 89,7% in der Gruppe der 20-29-Jährigen überein [122]. In den Publikationen von Hess und Sener werden Prävalenzen von 95% und höher für ältere Menschen angegeben [49, 154]. Übereinstimmend wurde nach Auswertung von 57.966 Erstuntersuchungen auf VCA-IgG-Antikörper in der Altersgruppe über 59 Jahre eine Durchseuchung von 98% ermittelt. Die berechnete Seroprävalenz von 50% im Alter zwischen 5-9 Jahren korrelierte gut mit den von Huzly und Sener publizierten Daten, wonach in den Industrieländern noch 50% der 10-Jährigen naiv für EBV sind [32, 154]. Die ermittelten Durchseuchungsraten deckten sich mit den Literaturdaten zur EBV-Prävalenz der Industriestaaten und zeigten insgesamt einen guten repräsentativen Schnitt des Patientenkollektivs zur Normalbevölkerung.

4.2 Einfluss der Probenarchivierung bei -20°C

Die Ergebnisse der mittels Virascan-Software gemessenen relativen Intensitäten, der auf

den EBV ViraStripes (Fa. Viramed) entwickelten Banden am Tag des Probeneinganges, verglichen mit denen nach 2-tägiger Lagerung bei -20°C , zeigten bei allen 11 aus der Routineanalytik des Labors getesteten Seren eine sehr gute Korrelation mit nahezu identisch gemessenen relativen Scanintensitäten in den beiden Assayläufen. Passend zu den Aufbewahrungsempfehlungen für serologische Proben in der Literatur [155] konnten die sehr hohen Bestimmtheitsmaße (R^2) mit Werten zwischen 0,91 und 0,991 einen Einfluss durch einmaliges Einfrieren und Auftauen der Seren auf die semiquantitative Antikörpermessung mittels Virascan, gemessen auf den EBV ViraStripes, nach Kurzzeitlagerung bei -20°C ausschließen.

Die Reproduzierbarkeit, der auf den EBV ViraStripes berechneten Scanintensitäten nach 1-3-monatiger Lagerung der Seren bei -20°C gegenüber der Untersuchung am Probeneingangstag während der Routineanalytik des Labors wurde anhand von 229 Proben überprüft. Der Vergleich der festgestellten relativen Intensitäten, für alle auf dem EBV ViraStripe verwendeten Antigene, zeigte nach bis zu 3-monatiger Archivierung der Proben insgesamt einen guten linearen Zusammenhang mit den Ausgangswerten der frischen Seren am Probeneingangstag. Im Vergleich zu den Ergebnissen nach der Kurzzeitlagerung bei -20°C lagen jedoch alle ermittelten Bestimmtheitsmaße nach bis zu 3-monatiger Lagerung niedriger. Während für das EBNA1-IgG ($R^2 = 0,8466$) und das EA-D p54-IgG ($R^2 = 0,821$) noch sehr hohe Bestimmtheitsmaße errechnet wurden, zeigten die Auswertungen für VCA gp125-IgG ($R^2 = 0,6601$) und EA-D p54-IgM ($R^2 = 0,6613$) etwas niedrigere Korrelationen beim Vergleich der gemessenen Intensitäten. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Reproduzierbarkeit, der mittels Virascan-Software gemessenen relativen Intensitäten, könnte im Versuch der Quantifizierung einer semiquantitativen Methode selbst liegen. Bei der Ermittlung der quantitativen Ergebnisse fließen 2 variable Größen in die Messung ein, zum einen die streifeninterne Cut off-Kontroll-Bande, an der alle entwickelten Banden prozentual gemessen werden und zum anderen die zu messende spezifische Antikörperbande selbst. Zusätzlich muss bei der densitometrischen Analyse der erzeugten Graustufenbilder immer die Hintergrundaktivität vom System gemessen und subtrahiert werden.

Die gemessenen relativen Scanintensitäten, der in jedem Studienlauf mitgeführten, zeitlich nicht eingefrosten Positiv- und schwach Positivkontrollseren derselben Charge mit definierten Antikörper-Konzentrationen, unterlagen auch Schwankungen. Exemplarisch erwähnt sei hier die Standardabweichung von 189 bei einem berechneten Mittelwert der relativen Intensitäten von 379 für das VCA p18-IgG aller Studienläufe mit dem EBV ViraStripe IgG. In der IgM-Analyse fielen die Standardabweichungen vom Mittelwert mit 48 (VCA gp125) und 27 (VCA p18) deutlich geringer aus (Daten im Ergebnis-

teil nicht gezeigt). Die unterschiedlichen Messwerte der definierten Kontrollseren unter Studienbedingungen zeigten, die Ergebnisse bei einem semiquantitativen Verfahren können nie vollständig reproduzierbar sein.

Durch das „Drucken“ von hochgereinigten Antigenen mit standardisierter Konzentration an definierter Stelle auf die Nitrozellulosemembran werden in der Regel Banden mit gleichmäßiger Intensität über die gesamte Breite des Streifens angefärbt, jedoch kann es auch hier in seltenen Fällen durch äußere Einflüsse zu ungleichmäßiger Färbung über die Streifenbreite kommen, welche zu abweichenden Messwerten führen kann.

Da es sich nicht um Parallelansätze handelte, könnten auch Raumtemperaturunterschiede in den Abarbeitungszeiträumen einen möglichen Einfluss auf die unterschiedlichen Scanintensitäten gehabt haben. Weiter ist zu berücksichtigen, dass im Rahmen der Routineanalytik die Abarbeitung der Teste von unterschiedlichen Labormitarbeitern unter Routine- und nicht unter Studienbedingungen erfolgte. Es könnten also eine Vielzahl von kleinsten Abweichungen bei der Abarbeitung, aber auch geringe Chargenschwankungen im Sinne einer größeren Interassay-Varianz zwischen der Routineanalytik und dem Studienuntersuchungsgang einen Einfluss gehabt haben.

Auf die erhobenen Daten im Rahmen der Studie hatten die geringen Differenzen keinen Einfluss, da alle Immunoblots für den Methodenvergleich und die Methodenoptimierung jeweils im Parallelansatz unter identischen Bedingungen nach dem Auftauen der Seren getestet wurden.

4.3 Methodenvergleich der kommerziellen EBV Line Immunoblots

Das zentrale Ziel in der EBV-Diagnostik ist es, serologisch sicher zwischen akuter Primärinfektion, zurückliegender Infektion und Seronegativität zu unterscheiden [127]. Eine Vielzahl von Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass die meisten Seren z. B. mittels ELISA, ELFA, CLIA oder Bead-basierter Multiplexanalytik einem eindeutigen EBV-Serostatus gut vergleichbar untereinander bzw. mit den Leistungen des früheren Goldstandards IFT zugeordnet werden können und daher zum Screening geeignet sind [113, 125, 127, 131, 139, 145, 156, 157].

Beim EBV-Screening finden, wie auch in dieser Studie, in der Routineanalytik Teste zum Nachweis von EBNA1-IgG, VCA-IgG und -IgM sowie oftmals zusätzlich auf EA-D-IgG Verwendung. Die Auflösung nichtklassischer oder mehrdeutiger serologischer Muster, wie ein isolierter Nachweis einer der genannten EBV-Antikörper [130, 136, 141, 143, 144], die gleichzeitige Detektion von EBNA1-IgG, VCA-IgG und -IgM [130] als auch die Möglichkeit, dass 5% der Infizierten niemals EBNA1-IgG bilden und unter Immunsuppression EBNA1-

IgG sekundär negativ werden kann [109, 132], erfordert, wie in zahlreichen Publikationen beschrieben, in der Regel eine weitere differenzierte Abklärung [118]. Um eine eindeutige serologische Einordnung mittels Erstbefund zu erlangen, haben sich in den letzten Jahren der ergänzende Einsatz von Line-Immunooblots [116, 130, 132, 146] und die Aviditätsmessung bewährt [118, 158, 159]. Frühere Arbeiten bewerteten bei Verwendung der Immunoblotverfahren vor allem die Nachweise von EBNA1-IgG und des zweiten Spätmarkers VCA p18-IgG in Kombination mit der Aviditätsmessung [116, 132, 134, 160].

Eine kinetische Studie demonstrierte, dass eine starke EBNA1-IgG-Immunantwort (Bandenstärke größer als +), welche auf eine zurückliegende Infektion hinweist, nicht vor 20 Tagen nach Ausbruch der Krankheit mittels Immunoblot nachweisbar wurde [132]. In der gleichen Arbeit wird hervorgehoben, dass durch die Verwendung von zwei Spätmarkern (EBNA1 und VCA p18) auf den IgG-Lineoblots, insbesondere der in den Screening-Testen EBNA1-IgG-negativen Seren mit positivem VCA-IgG-Nachweis, eine Differenzierung zwischen akuter und zurückliegender Infektion nicht nur über die EBNA1-IgG-Bande, sondern auch über die starke VCA p18-IgG-Bande vorgenommen werden kann. Beide Spätmarker sollen bei einer akuten Infektion in der Regel nicht nachweisbar oder nur eine schwache Immunantwort (weniger als ++) auf den IgG-Teststreifen zeigen [132]. Ein fehlender oder lediglich schwacher VCA p18-Nachweis auf dem IgG-Immunoblot konnte gewöhnlich auch in der Laborroutine bei frischer EBV-Primärinfektion festgestellt werden. Hingegen findet sich bei einer länger zurückliegenden EBV-Infektion eine starke VCA p18-IgG-Bande auf dem Immunoblot [116, 132].

Die Kinetik der VCA p18-IgG-Antikörper im Infektionsverlauf einer EBV-Infektion fand besondere Berücksichtigung in dem für den Methodenvergleich entwickelten Interpretationsschema zur Serostatus-Einteilung. In der vorliegenden Studie sollten nun erstmals nach Testung vorselektierter nicht klinisch definierter Seren, die mittels kommerzieller EBV Line Immunoblots der Firmen Viramed und Virotech erhaltenen Antikörperreaktionsmuster, insbesondere hinsichtlich der Bandenverteilung der VCA p18- zu den VCA gp125-IgG-Antikörpern, zueinander verglichen werden.

4.3.1 EBV-Serostatus-Einteilung

Zur besseren Vergleichbarkeit des EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) mit dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) wurden im ersten Schritt die validen Ergebnisse von 289 für die Studie aus der EBV-Routineanalytik des Zentrallabors ausgewählten Seren nach dem zuvor in Tabelle 2.2 definiertem Interpretationsschema hinsichtlich ihrer Antikörperreaktionsmuster auf den Teststreifen in verschiedene Serogruppen eingeteilt.

Der Vergleich der mit beiden kommerziellen EBV-Immunooblots in der Studie erhaltenen

serologischen Befundstufen „frisch“, „zurückliegend“, „seronegativ“, „kürzlich“ und „unklar“ ergab mit dem Exakten Fischer-Test (p -Wert 0,9444) keinen signifikanten Unterschied und zeigte eine gute Korrelation der beiden Teste hinsichtlich der Einteilung in einen Serostatus. In der Gegenüberstellung der erhaltenen Serodiagnosen für jedes einzelne Serum, ermittelt mit beiden kommerziellen Immunoblots, in einer Kreuztabelle (siehe Tabelle 3.3) wurden keine Überschneidungen der wichtigen Serodiagnosen „frisch“, „zurückliegend“ und „seronegativ“ gefunden. Der relativ hohe Anteil von 38 Seren (13,1%) mit unklaren oder mehrdeutigen Befundmustern ist der Auswahl von Seren mit nicht eindeutigen oder untypischen Bandenmustern aus der Routineanalytik für die Studie und einer vorsichtigen, eher zurückhaltenden Zuordnung kritischer oder seltener Konstellationen nach langjähriger Erfahrung in der EBV-Diagnostik geschuldet.

Von den 38 „unklaren“ Seren (25 im Virotech- und 21 im Viramed-Test), zeigte sich jeweils bei 30 Seren ein unklares Befundmuster in nur einem der beiden kommerziellen Immunoblots, während mit dem anderen Test jedoch eine eindeutige Zuordnung zu einem Serostatus möglich war. Daher scheint ein großer Teil der unklaren Ergebnisse weniger durch serumspezifische Faktoren als durch testspezifische Faktoren zustande zu kommen. In der Praxis könnte man sich dieses zu Nutze machen und einen unklaren Immunoblot noch einmal mit dem Immunoblot des anderen Herstellers testen. Wobei allerdings aktuell ungeklärt ist, welches Ergebnis am ehesten der tatsächlichen Klinik entspricht. Diese Abklärung muss Ziel einer Folgestudie an klinisch definierten Seren bleiben. Beim Vergleich der Abweichungen der benachbarten Seroklassen in der Kreuztabelle zeigten sich nach Ausklammern der „unklaren“ Seren mittels Rangkorrelationskoeffizient nach Kandells starke Korrelationen zwischen dem Serostatus „frisch“ und „seronegativ“ ($\tau_b = 1,00$) als auch zwischen der Serogruppe „zurückliegend“ und „kürzlich“ ($\tau_b = 0,88$). Die nur mäßige Korrelation von $\tau_b = 0,49$ zwischen „frisch“ und „kürzlich“ bedeutete für die Praxis, dass eine serologische Unterteilung in diese beiden Gruppen stark vom verwendeten Blot abhängt und damit klinisch eher zurückhaltend interpretiert werden sollte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Berth und Bosmans im prospektiven Teil ihrer Studie beim Vergleich der Ergebnisse von 3 automatisierten EBV-Immunoassays. Lediglich bei einer von 11 Proben gab es in allen 3 Testsystemen einen Konsens für eine kürzliche EBV-Infektion [139].

4.3.2 Vergleich der erhaltenen Antikörperreaktionsmuster

Zum Vergleich der verschiedenen serologischen Befundstufen („frisch“, „kürzlich“, „zurückliegend“, „seronegativ“ und „unklar“) wurde eine Unterteilung der erhaltenen typischen Antikörperreaktionsmuster nach dem Interpretationsschema (siehe Tabelle 2.2) vorgenommen. Für die Zuordnung zu einer bestimmten Subgruppe waren insbesondere das

EBNA1-IgG als auch das Verhältnis der VCA-IgG-Antikörper (VCA p18 und VCA gp125) zueinander entscheidend, denn auch ohne EBNA1-IgG-Nachweis kann bei starker IgG-Reaktivität gegen das VCA p18-Antigen in der Regel eine frische Infektion ausgeschlossen werden [132].

Der Vergleich beider kommerzieller EBV Line Immunoblots hinsichtlich der Häufigkeit und Verteilung der verschiedenen Bandenmuster ergab nach Einteilung der getesteten Seren für den Serostatus „frisch“ einen signifikanten Unterschied im Exakten Fischer-Test ($p=0,00063$) für die gesamte Tabelle 3.4. Im Einzelnen betrachtet, zeigte sich mit dem EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) mit 92,1% häufiger ein isolierter VCA gp125-Nachweis bei den VCA-Antikörpern als mit 71,7% auf dem EBV ViraStripe IgG (Viramed). Mit dem Viramed-Test wurden in 24 von 85 Seren eine positive VCA p18-Bande detektiert, während mit dem Blot der Fa. Virotech in nur 7 von 88 Proben VCA p18-IgG nachgewiesen wurde. Der signifikante Unterschied für den VCA p18-IgG-Nachweis wurde in Gruppe 3 mit einem p-Wert von 0,00955 belegt. Für die Praxis bedeutet es, dass VCA p18 auf dem EBV ViraStripe IgG (Viramed) bei den frischen Infektionen vermutlich eher als auf dem Vergleichstest der Fa. Virotech reagiert.

Im Vergleich der IgM-Analysen beider kommerzieller Immunoblots scheint hingegen das VCA p18 auf dem Teststreifen der Fa. Virotech sensitiver bei den frischen EBV-Primärinfektionen zu reagieren, da sich in der Gruppe 2 auf dem IgM-Blot der Fa. Virotech bei 30,7% ein starker VCA p18-IgM-Nachweis findet, während mit dem Viramed-Blot nur 12,9% der Seren des Serostatus „frisch“ in diese Gruppe eingeteilt wurden. Die Verschiedenheit der Verteilung der IgM-Antikörperreaktionsmuster konnte mit einem korrigierten p-Wert von 0,01728 in der Gruppe 2 festgestellt werden (siehe Tabelle 3.4). Diese signifikanten Unterschiede zwischen beiden Immunoblots für den Serostatus „frisch“ konnten anhand von 101 in beiden kommerziellen Blots für EBNA1-IgG-negativ getesteten Seren mit reaktivem IgM-Nachweis bestätigt werden. Von den 101 Seren, bei denen es sich überwiegend um Primärinfektionen handelte, wurden mit dem EBV IgG Line Immunoblot 18 VCA p18-IgG-Banden detektiert. Im Vergleich dazu wurden mittels EBV ViraStripe IgG (Viramed) mehr als doppelt so viele VCA p18-IgG-Banden (38/101) nachgewiesen. Das VCA-IgM-Antikörpermuster mit stärkerer VCA p18-Reaktivität gegenüber dem VCA gp125-IgM konnte auf den Virotech-Immunoblots (27/101) bei den EBNA1-IgG-negativen Seren mit reaktivem IgM-Befund mehr als doppelt so häufig wie auf den Viramed-Teststreifen (12/101) detektiert werden. Bei der untersuchten Fallzahl lag zwar der korrigierte p-Wert mit 0,05955 noch knapp unter der Signifikanzmarke, dennoch zeigte der unkorrigierte p-Wert als auch der Exakte Fischer-Test für die gesamte Tabelle 3.13 einen signifikanten Unterschied auf.

Beim Vergleich der Nachweise für VCA p18-IgM, unabhängig von den Bandenverhältnissen der VCA-IgM-Antikörper zueinander betrachtet, wurden übereinstimmend mit beiden kommerziellen IgM-Immunooblots bei den 101 Seren mit fehlendem EBNA1-IgG-Nachweis hohe VCA p18-IgM-Nachweisraten gefunden (86/101 Viramed vs. 91/101 Virotech). Zwar werden bei EBV-Primärinfektionen häufig als erstes Anti-VCA gp125 und Anti-EA-D auf dem IgM-Immunooblot nachweisbar, jedoch wird auch VCA p18-IgM, wie diese Arbeit zeigt, bereits im frühen Stadium der Infektion detektiert. Das deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von van Grunsven et al., in der 95% von 67 Proben mit Primärinfektion positiv für VCA p18-IgM im ELISA waren [138], weshalb aufgrund der ausreichend guten Sensitivität VCA p18 häufig in den IgM-Screening-Testen Verwendung findet. Für die Praxis bedeutet das, dass anhand der verschiedenen Verteilmuster der VCA-IgM-Antikörper zueinander aufgrund des frühen Nachweises von VCA p18-IgM keine zeitliche Einordnung des Infektionszeitpunktes vorgenommen werden kann.

Der Vergleich, der mittels beider kommerzieller EBV-Immunooblots erhaltenen Antikörperreaktionsmuster des Serostatus „zurückliegend“, zeigte zwar in der statistischen Analyse für die gesamte Tabelle 3.6 einen signifikanten Unterschied der Verteilungsmuster der IgG-Banden, jedoch konnte die Arbeitshypothese mit einer vermuteten höheren Anzahl von Bandenmustern mit einer stärkeren VCA p18-IgG-Reaktivität gegenüber des VCA gp125-IgG-Nachweises beim Virotech-Test nur partiell bestätigt werden. Trotz einer nachgewiesenen höheren prozentualen Häufigkeit dieses Bandenmusters beim Virotech-Blot von 66% vs. 57% beim Viramed-Test für die EBNA1-IgG-positiven Seren der Gruppe 5, ließ sich statistisch jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,29506$) belegen. Statistisch mit Signifikanz zu belegen war der Unterschied der Verteilung der Häufigkeit des Bandenmusters mit gleich starken Reaktivitäten der VCA-IgG-Antikörper ($p = 0,00001$) in der Gruppe 6. Dieses Muster wurde gehäuft mit dem Viramed-IgG-Blot gefunden. Auffallend war weiterhin ein erhöhter Anteil an EBNA1-IgG-negativen Seren mit führender VCA p18-Reaktivität der VCA-IgG-Antikörper, ermittelt mit dem Virotech-Test gegenüber dem Viramed-Blot, jedoch war der Unterschied mit einem grenzwertigen p-Wert von 0,05834 auch hier nur knapp statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse des Methodenvergleichs der beiden kommerziellen EBV Line Immunooblots für die Serogruppe „zurückliegend“ wurden anhand der in beiden Immunooblots für EBNA1-IgG-positiv getesteten Seren ($n = 125$) der anscheinend „sicher“ zurückliegenden EBV-Infektionen hinsichtlich des IgG-Bandenmusters überprüft und bestätigt (siehe Tabelle 3.8).

Auch wenn die Gesamtergebnisse der serologischen Befundstufen für die 289 Seren, ermittelt mit den beiden kommerziellen Immunooblots, ähnlich waren, zeigten sich im Detail, wie zum Beispiel beim EBNA1-IgG-Nachweis, deutliche Unterschiede. Der Viramed-

Test war mit 150 EBNA1-IgG-Nachweisen gegenüber 130 positiven EBNA1-IgG-Banden auf dem Virotech-Blot deutlich sensitiver eingestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte mit dem angewandten Exakten Fischer-Test anhand der untersuchten Fallzahl nicht belegt werden. Im Vergleich dazu waren in den vorselektierten Seren mit dem Screening-ELISA nur 80 der 284 getesteten Seren für EBNA1-IgG reaktiv. Die unterschiedlichen Nachweisraten sind auf die höhere Sensitivität des EBNA1-IgG-Nachweises mittels des Line-Immunoblotverfahrens gegenüber z. B. dem ELISA und IFT zurückzuführen [160]. Während z. B. bei Anwendung des IFT und ELISA in der Regel die eingesetzten Antigenmengen aufgrund der Technik beschränkt sind, können auf dem Line-Immunoblot optimale Antigenkonzentrationen lokal angeboten werden, sodass die positiven Reaktionen nur noch von der Antikörperkonzentration abhängen [109]. Insbesondere niedrigere EBNA1-IgG-Konzentrationen können so zusätzlich detektiert werden. Der Einsatz eines Immunoblots ist daher eine sinnvolle ergänzende Untersuchung für die in den Screening-Testen EBNA1-IgG-negativen Seren mit nicht eindeutiger serologischer Konstellation einer EBV-Primärinfektion.

Der Vergleich der Ergebnisse des EBV ViraStripe IgM (Viramed) mit denen des EBV IgM Line Immunoblot (Virotech) für die 125 „sicher“ zurückliegenden Infektionen mit in beiden kommerziellen EBV-Immunoblots positivem EBNA1-IgG-Nachweis ergab einen signifikanten Unterschied. Mit dem Virotech-Test wurden signifikant mehr VCA p18-IgM-Nachweise als im Vergleichstest von Viramed detektiert, sodass mit Ersterem vermutlich mehr unspezifische Reaktivitäten erfasst werden bzw. VCA p18-IgM-Antikörper länger persistierend nach zurückliegender Infektion nachweisbar bleiben.

Eine frische Primärinfektion kann bei Nichtbildung von EBNA1-IgG-Antikörpern oder sekundärem Verlust unter Immunsuppression über den starken Nachweis einer VCA p18-IgG-Bande (2. Spätmarker) ausgeschlossen werden [116]. Da die Intensität der VCA p18-IgG-Bande mit zunehmender Infektionsdauer an Stärke gewinnt und in unterschiedlicher Intensität lebenslang nachweisbar bleibt, während VCA gp125-IgG häufig im Verlauf der Infektion wieder an Reaktivität abnimmt und nicht selten wieder negativ wird, kann das Bandenverhältnis der VCA-IgG-Antikörper zueinander eine weitere Entscheidungshilfe zur zeitlichen Einordnung einer EBV-Infektion sein. Dennoch gibt es unterschiedliche Ergebnisse der nachweisbaren Immunantworten bei Verwendung von Line-Immunoblots verschiedener Hersteller. Während der EBV ViraStripe IgG (Viramed) mehr zurückliegende Infektionen anhand des EBNA1-IgG-Nachweises detektierte, gelang es im Vergleichstest von Virotech im Rahmen dieser Studie häufiger über eine sehr starke VCA p18-IgG-Bande.

Die Ergebnisse dieses Methodenvergleichs zeigen übereinstimmend mit den Ergebnissen

der Studie von Lupo et al., dass die Immunantworten nicht nur individuell, sondern je nach verwendeten Antigenen bzw. deren Aufbereitungen auch in der gleichen Testmethode stark variieren können [131]. Entscheidend bleibt jedoch, dass mit beiden kommerziellen Testen eine ähnliche Anzahl der wichtigen Serodiagnosen „frisch“, „seronegativ“ und „zurückliegend“ gestellt wurde.

4.3.2 Fazit aus Einzelfallbetrachtungen des Serostatus „unklar“

Die gesonderte Bewertung der nicht klassischen oder mehrdeutigen „unklaren“ serologischen Konstellationen in mindestens einem der kommerziellen EBV-Immunoblots, zeigt einmal mehr, wie komplex die EBV-Diagnostik ist und dass eine schematisierte Testinterpretation zu Fehldiagnosen führen würde.

Der Infektionszeitpunkt bei Probe 222 lag beispielsweise aufgrund von Vorbefunden mit nachgewiesener Serokonversion der IgG-Antikörper ca. 3 Monate zurück. Der Viramed-Test zeigte ein Bandenmuster mit stärkerer VCA p18-IgG-Reaktivität gegenüber dem VCA gp125-IgG bei unter dem Cut off liegender EBNA1-IgG-Bande und negativem IgM-Befund. Mit dem IgM-Immunoblot der Fa. Virotech wurden positive VCA gp125- und EA-D-IgM-Banden detektiert. Im dazugehörigen IgG-Test fand sich zwar kein EBNA1-IgG, jedoch ein VCA p18-IgG mit einer stärkeren Bandenintensität als beim VCA gp125-IgG. Diese Verlaufsbeobachtung lässt vermuten, dass entgegen der gültigen Auswertekriterien des Herstellers Virotech [150] bei einer stärkeren VCA p18-IgG-Antwort gegenüber VCA gp125-IgG auch bei positivem IgM-Befund eine frische Primärinfektion auszuschließen ist und ein eher etwas zurückliegender Infektionszeitpunkt anzunehmen ist.

Isoliert EBV-IgM-positive Seren wurden nach dem Interpretationsschema für die Studie als „unklar“ bewertet, da es sich bei fehlendem IgG-Nachweis auch um unspezifische oder kreuzreagierende IgM-Antikörper handeln könnte [48, 110]. In Probe 103 wurden beispielsweise mittels beider kommerzieller EBV-Immunoblots jeweils nur isoliert positiv VCA p18-IgM-Antikörper detektiert. Die im EBV IgG Line Immunoblot (Virotech) knapp unter dem Cut off sichtbare VCA gp125-IgG-Bande erhärtete hier jedoch den Verdacht auf eine EBV-Primärinfektion. In der Probe 122 einer 3-jährigen Patientin mit einer Lymphknotenvergrößerung zeigten sich grenzwertige VCA-IgM- und EA-D-IgG-Antikörper-Konzentrationen bei Abwesenheit von EBNA1-IgG und VCA-IgG im ELISA-Screening. Mit den Virotech-Immunoblots fand sich lediglich ein isoliert positiver IgM-Befund mit Nachweis beider VCA-IgM-Antikörper. Die Vergleichsteste der Fa. Viramed detektierten in der IgM-Analyse nur eine isoliert positive VCA p18-Bande bei gleichzeitigem Nachweis von EA-D-IgG und VCA p18-IgG auf dem EBV ViraStripe IgG. In einer 9 Monate zuvor eingesandten Probe war die Patientin noch seronegativ für EBV. Eine EBV-

Primärinfektion schien hier sehr wahrscheinlich. Eine klärende Verlaufsprobe wurde nicht eingesandt. Ungewöhnlich früh wurde in der Verlaufsbetrachtung der Probe 70 einer zuvor seronegativ für EBV getesteten 29-jährigen Patientin im EBV ViraStripe IgG das VCA p18-IgG in Kombination mit EA-D-IgG bereits nach 8 Tagen detektiert.

Diese Einzelfallbetrachtungen zeigen, dass auch Primärinfektionen mit isoliertem VCA p18-Nachweis der VCA-Antikörper im IgG- und IgM-Immunoblot möglich sind. Entgegen der Empfehlungen aus der Literatur für den IgG-Lineassay von Mikrogen [116] und der IgG-Interpretationskriterien des EBV ViraStripe IgG [161], kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht bei jedem isoliert starkem Nachweis einer VCA p18-IgG-Reaktivität (Spätmarker) im Immunoblot ein länger zurückliegender Infektionszeitpunkt angenommen werden.

Die Bewertung der Serumprobe 51 eines 11-jährigen Patienten zeigt, dass im Gegensatz zu einigen empfohlenen EBV-Diagnostikablaufschemen [127, 129-131] ein Screening unter Einbezug von EA-D-IgG sehr wohl sinnvoll sein kann. In der Probe waren die ELISA-Suchteste für VCA-IgG- und -IgM als auch für EBNA1-IgG negativ. Lediglich der Nachweis von EA-D-IgG im Screening wies auf eine Primärinfektion hin. Wäre im ELISA-Testprofil auf die Untersuchung des EA-D-IgG verzichtet worden, wäre diese frische EBV-Primärinfektion in der ersten Untersuchung unentdeckt geblieben. Insgesamt hatten im Rahmen der Studie 9 von 289 Proben einen isolierten EA-D-IgG-Nachweis in den Suchtesten, wobei die Folgediagnostik auf eine EBV-Primärinfektion hinwies. Das deckt sich mit den Empfehlungen von Pottgiesser et al., EA-D-IgG bei sonst negativen EBV-Antikörpern zur Differenzierung einer Akutinfektion, aber nicht als Marker für eine klinische Reaktivierung nach zurückliegender Infektion zu verwenden, da EA-D-IgG auch bei Gesunden nachgewiesen wurden [160].

In der Probe 51 zeigte sich in den Viramed-Immunoblots in der IgM- als auch in der IgG-Analyse das klassische Bild einer frischen EBV-Primärinfektion mit Nachweis von VCA gp125- und EA-D-Antikörpern. Im Gegensatz dazu ergaben die Ergebnisse des EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) ein unklares Bild. Während der IgM-Immunoblot mit allen 3 entwickelten Banden deutlich positiv war, wurde im dazugehörigen IgG-Immunoblot neben den Frühmarkern VCA gp125- und EA-D-IgG auch eine deutlich oberhalb des Cut off liegende EBNA1-IgG-Bande detektiert. Laut Gebrauchsanweisung der Fa. Virotech ist der Nachweis von EBNA1-IgG als zentraler Marker für eine zurückliegende Infektion zu werten [150].

In dem Methodenvergleich zeigten sich sowohl mit dem Viramed- als auch mit dem Virotech-IgG-Immunoblot unspezifische bzw. atypisch frühe EBNA1-IgG-Nachweise im Rah-

men von frischen EBV-Infektionen (Proben 29, 31, 41, 46, 49, 101, 131, 238). Die Untersuchungen zeigten, dass EBNA1-IgG-Nachweise in Kombination mit den Frühmarkern VCA gp125- und EA-D-IgG bei nicht nachweisbarem VCA p18-IgG und deutlich positivem IgM-Immunoblot zurückhaltend bewertet werden sollten, da es sich hier um Primärinfektionen handeln könnte. Klärung kann hier eine Verlaufsuntersuchung bringen.

Das Problem des sehr sensitiven EBNA1-IgG-Nachweises scheint dem Hersteller Viramed bekannt zu sein, denn es gibt in der Testanleitung gesonderte Auswertekriterien für schwache EBNA1-IgG-Banden [161]. So soll bei gleichzeitig vorliegender starker VCA p18-IgG-Bande eine abgelaufene Infektion oder bei gleichzeitigem Nachweis von VCA gp125-IgM eine Primärinfektion wahrscheinlich sein. Erschwerend kam jedoch hinzu, dass es auch Proben (z. B. Nr. 49) gibt, die sowohl für VCA gp125-IgM und VCA p18-IgG zusätzlich zum schwachen EBNA1-IgG positiv sind, sodass hier keine Zuordnung getroffen werden konnte. Zum anderen gab es auch starke EBNA1-IgG-Nachweise im EBV ViraStripe IgG bei ansonsten klassischer Bandenkonstellation einer Primärinfektion (Proben 31 und 131).

Der von einigen Autoren [48, 110, 122] angegebene Algorithmus, mit EBNA1-IgG zu screenen und bei Positivität eine EBV-Primärinfektion auszuschließen, ist kritisch zu bewerten, da zu einem geringen Prozentsatz atypisch frühe bzw. unspezifische EBNA1-IgG-Nachweise sowohl in den Suchtesten als auch in beiden kommerziellen Immunoblots bei sonst typischer Konstellation für eine Primärinfektion auftreten. Übereinstimmend berichteten Lupo et al. in einer Vergleichsstudie 2012 über unterschiedliche Spezifitäten des EBNA1-IgG-Nachweises. So lag diese für den LIAISON EBNA1-IgG-Assay mit 74,2% mit mehr falsch positiven EBNA1-IgG-Nachweisen bei den EBV-Primärinfektionen signifikant niedriger als beim VIDAS EBNA1-IgG-Assays mit 96,5% [131].

Mit einem EBNA1-IgG-Screening könnten so fälschlicherweise abgelaufene Infektionen diagnostiziert und Primärinfektionen übersehen werden, was in der Regel umfangreiche unnötige Folgediagnostik nach sich zieht.

Zusammenfassend kann nach Bewertung der unklaren Seren mittels der beiden kommerziellen Immunoblots festgestellt werden:

Eine EBNA1-IgG-Bande in Kombination mit Nachweisen von den Frühmarkern VCA gp125- und EA-D-IgG in Abwesenheit von VCA p18-IgG und deutlich positivem IgM-Befund sollte nicht als Nachweis für eine zurückliegende Infektion gewertet werden. Da es Primärinfektionen mit isoliertem VCA p18-Nachweis im IgG- und/ oder IgM-Immunoblot gibt, kann ein isolierter Nachweis einer VCA p18-IgG-Reaktivität (Spätmarker) nicht in jedem Fall mit einem zurückliegenden Infektionszeitpunkt gleichgesetzt werden. Serologi-

sche Verläufe zeigten, dass die Ausbildung von EBNA1-IgG mehrere Monate in Anspruch nehmen kann, aber zwischendurch das Bandenverhältnis der beiden VCA-IgG-Antikörper zueinander hilfreich zur Einordnung des Infektionsstatus sein kann.

Allgemein lässt sich aus den erhobenen Daten des Methodenvergleichs schlussfolgern, dass eine schematisierte Testinterpretation der EBV-Serologie, wie von manchen Autoren empfohlen, problematisch ist [110]. Weder die benutzten Screening- noch die Bestätigungsteste wären, isoliert verwendet ideal, für die alleinige EBV-Diagnostik geeignet. Die Studie zeigt, dass die Immunantworten nicht nur individuell, sondern je nach verwendeten Antigenen oder deren Aufbereitungen in verschiedenen Testen stark variieren können. Testergebnisse sollten immer nur unter Kenntnis der Testcharakteristika (Stärken bzw. Schwächen) und des Testverhaltens im Infektionsverlauf mit typischen Titerhöhen oder Scannintensitäten optimal in Zusammenschau mit Klinik, Patientenalter, Transaminasen, typischen Blutbildveränderungen und, wenn möglich, mit dem CMV-Status, wie schon die Studienergebnisse von Guerrero-Ramos et al. zeigten, bewertet werden [110].

4.4 Optimierung des EBV ViraStripe IgG/IgM der Fa. Viramed

Der zweite Teil der Arbeit bewertete anhand von 80 Seren mit frischer und 150 Seren mit zurückliegender EBV-Infektion, die mit dem F&E EBV ViraStripe unter Verwendung niedrigerer Antigen-Konzentrationen und zusätzlicher Antigene erhaltenen Ergebnisse, um folgende Fragen zu klären:

1. Sind eindeutigere EBV-Antikörperreaktionsmuster mit einer stärkeren Reaktivität des VCA p18-IgG gegenüber VCA gp125-IgG bei den länger zurückliegenden Infektionen zu erhalten?
2. Kann die Anzahl atypisch früher bzw. unspezifischer EBNA1-IgG-Reaktivitäten bei den frischen Infektionen minimiert werden?
3. Können unspezifische, kreuzreagierende oder lang persistierende EBV-IgM-Nachweise reduziert werden?

Bei den frischen EBV-Infektionen fanden sich in 83,8% der Proben VCA p18-IgM-Antikörper auf den kommerziellen EBV ViraStripe IgM-Blots, unter diesen auch drei isolierte VCA p18-IgM-Nachweise. Dies korrespondiert mit den Angaben in der Literatur, dass VCA p18 in der IgM-Analyse sehr sensitiv in der frühen Phase einer Infektion zusätzlich zum VCA gp125 als Frühmarker reagiert [138]. Auf den IgM-Forschungsblots der Fa. Viramed fand sich unter Einsatz des im Routineblot verwendeten trunkierten Antigens VCA p18 in 0,75-facher Konzentration (VCA p18 B) nur noch bei 35% der Proben mit frischer EBV-Infektion ein positiver VCA p18-IgM-Nachweis. Bei Verwendung der 0,67-fachen Konzentration von VCA p18 B wurde dann lediglich noch bei 5% der Proben eine

positive Bande detektiert. Aufgrund einer zu geringen Sensitivität ebenso ungeeignet zur Verwendung in der EBV-IgM-Analyse war das Fusionsprotein aus den trunkierten Antigenen des VCA p18 und VCA gp125 mit nur 66,3% positiven Nachweisen bei den frischen EBV-Infektionen.

Lediglich das Volllängenprotein VCA p18 C zeigte mit einer Nachweisrate von 91,3% bei den Seren mit frischer EBV-Infektion eine vergleichbare, sogar etwas höhere Sensitivität im Vergleich zum kommerziellen IgM-Immunoblot der Fa. Viramed.

Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass unter Verwendung identischer Antigene in gleicher Konzentration auf dem F&E EBV ViraStripe IgM im Vergleich zum kommerziellen Test etwas geringere Scanintensitäten gemessen wurden. Sichtbar wurde dies in den angefertigten Box-Whisker-Plots. Dieser Unterschied konnte im Kollektiv der frischen Infektionen anhand der Antigene EA-D p54 und VCA gp125 (siehe Abbildungen 3.5 und 3.6) festgestellt werden, welche auf beiden IgM-Teststreifen in identischen Konzentrationen eingesetzt wurden. Während beim EA-D p54-IgM-Nachweis sich auch Messwerte unter den Cut off verschoben, die zu einer geringeren Positivrate führten, lagen die unteren Begrenzungen der Boxen für VCA gp125-IgM über dem Cut off auf fast identischer Höhe. Das erklärte hier die ähnlichen Nachweisraten für VCA gp125-IgM mit dem Forschungsblot als auch mit dem kommerziellen Test. Die obere Boxbegrenzung für den kommerziellen VCA gp125-IgM-Nachweis lag jedoch auch hier höher, sodass festgestellt werden konnte, dass mittels des Forschungsblots unter Verwendung des identischen Antigens niedrigere Scanintensitäten gemessen wurden. Der Unterschied in der Herstellung der F&E EBV ViraStripes zum kommerziellen Test lag darin, dass die verschiedenen kommerziellen Antigenlösungen zwar in identischer Konzentration, jedoch in niedrigeren Volumina auf die Line-Teststreifen „gedruckt“ wurden, um die Vielzahl der getesteten Antigene auf einen Blotstreifen zu bekommen. Bei Betrachtung der gemessenen relativen Intensitäten gegen die verschiedenen Antigene und Konzentrationen des VCA p18 und des Fusionsproteins zeigte die Abbildung 3.7, dass nur der Median-Wert des VCA p18 C-IgM (Volllängenprotein) in fast identischer Höhe zum VCA p18-IgM des kommerziellen Viramed-Testes lag. Da lediglich bei diesen beiden Antigenen auch die unteren Boxbegrenzungen bei ähnlichen Scanintensitäten festgestellt werden konnten, kam es hier zu keinem Sensitivitätsverlust bei Verwendung des VCA p18 C für den IgM-Nachweis bei den frischen Infektionen.

Die erhobenen Daten im Rahmen dieser Arbeit sind aufgrund der bei der Herstellung der Forschungsblots verwendeten niedrigeren Volumina für die Antigenlösungen von begrenzter Aussagekraft und müssen, um statistisch valide Aussagen treffen zu können, in einer weiteren Studie unter komplett identischen Produktionsbedingungen, wie sie für den

Routineblot gelten, überprüft werden.

Der Vergleich der VCA gp125-Nachweisraten in der IgG-Analyse zwischen dem Routine- (96,3%) und dem Forschungsblot (63,8%) der Fa. Viramed zeigte eine deutliche Sensitivitätseinbuße bei der Entdeckung frischer Infektionen unter Verwendung der halben Konzentration des VCA gp125 A (VCA gp125 B). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte bereits an dieser Stelle der Einsatz von VCA gp125 B mit dem Ziel, in der IgG-Analyse eine Optimierung des Bandenverhältnisses zugunsten einer stärkeren VCA p18-IgG-Reaktivität bei den zurückliegenden Infektionen zu erhalten, ausgeschlossen werden. Einschränkend sollte berücksichtigt werden, dass in den Kastengrafiken (siehe Abbildungen 3.9 und 3.10) auch hier eine Verschiebung der Lage der Boxen in Richtung niedrigerer Scanintensitäten beim F&E EBV ViraStripe IgG im Vergleich zum kommerziellen EBV ViraStripe IgG festgestellt wurde. Das Fusionsprotein war aufgrund der niedrigen Positivraten weder in der IgG- noch in der IgM-Analyse als Frühmarker zur Detektion frischer Infektionen geeignet.

Atypisch frühe bzw. unspezifische EBNA1-IgG-Banden wurden in 6 der 80 Seren mit EBV-Primärinfektion mittels EBV ViraStripe IgG detektiert. Mit dem gleichen Antigen in identischer Konzentration (EBNA1 A) wurden mit dem F&E EBV ViraStripe IgG nur 4 EBNA1-IgG-Banden nachgewiesen und mit der 0,5-fachen Konzentration (EBNA1 B) ließen sich die EBNA1-Reaktivitäten auf 2 Nachweise reduzieren. Die Performance des EBNA1 B im Vergleich zum EBNA1 A in Standardkonzentration nach Untersuchung der 150 Seren mit zurückliegender Infektion zeigte eine Sensitivitätseinbuße (89% vs. 94%) und schloss dessen Einsatz zumindest nach dieser Studie aus.

Die mit identischer Konzentration des gleichen Antigens von EBNA1 auf dem IgG-Forschungsblot detektierten niedrigeren Nachweisraten bieten Anlass weitere Studien unter identischen Herstellungsbedingungen mit gleicher Volumenapplikation für die Antigenlösungen durchzuführen.

Die Auswertung der Ergebnisse von 150 mittels F&E EBV ViraStripe IgG untersuchten Seren mit zurückliegender Infektion ergab, dass eine Optimierung des EBV ViraStripe IgG bei lediglich übereinstimmender qualitativer Positivrate des Volllängenproteins VCA p18 C mit dem in Standardkonzentration auf dem F&E EBV ViraStripe IgG verwendeten VCA p18 A, nur noch mit dem VCA p18 C im Rahmen dieser Studie zu erreichen war. Beim anschließenden Vergleich der gemessenen relativen Scanintensitäten der Standardkonzentration des kommerziellen VCA p18 A mit dem Volllängenprotein (VCA p18 C), dargestellt in Abbildung 3.13 im Box-Whisker-Plot, wurde jedoch ein deutlicher Unterschied festgestellt. Mit dem VCA p18 C wurden deutlich niedrigere Scanintensi-

täten auf dem F&E EBV ViraStripe IgG gemessen, sodass eine Verwendung des Volllänge-proteins VCA p18 C auf dem EBV ViraStripe IgG zu weniger EBV-Antikörperreaktionsmustern mit einer stärkeren Reaktivität des VCA p18-IgG gegenüber VCA gp125-IgG bei den länger zurückliegenden Infektionen führen würde und dessen Einsatz zur Optimierung des EBV ViraStripe IgG zumindest nach den erhobenen Daten dieser Studie ausschlossen.

Im Vergleich, der auf dem IgM-Routineblot ausgetesteten Antigene mit den Antigenen des IgM-Forschungsblots, ließ sich lediglich für das VCA p18 C kein Sensitivitätsverlust zum kommerziell verwendeten VCA p18 nach Untersuchung der 80 Seren mit frischer Infektion in dieser Studie feststellen.

Der Vergleich dieser beiden Antigene in der IgM-Analyse nach Bewertung der Seren mit zurückliegender Infektion zeigte einen deutlichen Unterschied in der Seropositivrate. Während mit dem VCA p18 auf dem IgM-Routineblot bei 16 Seren eine positive Bande detektiert wurde, reduzierte sich die Anzahl unter Verwendung des VCA p18 C auf dem IgM-Forschungsblot auf 6 Nachweise. Auch wenn ein direkter Vergleich des VCA p18 A mit dem VCA p18 C auf dem Forschungsblot nicht möglich war, da Ersteres nicht auf dem F&E EBV ViraStripe IgM ausgetestet wurde, schien eine Spezifitätsverbesserung in der IgM-Analyse im Sinne einer Reduktion unspezifischer bzw. persistierender IgM-Nachweise, eine häufige Problematik nach zurückliegender EBV-Infektion [147], sehr wahrscheinlich. Passend dazu der Nachweis von 6 positiven VCA p18-IgM-Banden mit der 0,75-fachen Standardkonzentration (VCA p18 B). Es stellt sich allerdings die Frage, ob sich diese Ergebnisse unter exakt den gleichen Herstellungsbedingungen des Forschungsblots, wie sie für den Routineblot gelten, in einer weiteren Studie bestätigen lassen.

4.5 Spezifitätsverbesserung mittels F&E EBV ViraStripe IgM

Auf der Grundlage oben genannter Ergebnisse wurde der Ansatz der Spezifitätsverbesserung zur Reduktion unspezifischer bzw. kreuzreagierender IgM-Nachweise in einem dritten Schritt anhand von 11 Seren mit frischer Toxoplasmose und 32 Proben mit frischer bzw. kürzlicher CMV-Primärinfektion überprüft, zumal eine akute CMV-Infektion am häufigsten die serologische EBV-Diagnostik mit meist deutlich erhöhten VCA-IgM-Nachweisen stört [110, 139]. In den gleichen Studien fanden sich deutlich weniger falsch positive VCA-IgM-Nachweise im Rahmen von akuten Parvovirus B19- und HIV1-Infektionen.

Bei den getesteten Toxoplasmose- und CMV-Seren war bei bis auf 2 Proben im Vorfeld zusätzlich eine zurückliegende EBV-Infektion mit positivem EBNA1-IgG-Nachweis diagnostiziert worden. Die 2 Ausnahmen hatten lediglich einen isoliert positiven IgM-Nachweis

in der EBV-Serologie. Positive VCA-IgM-Antikörper als Hinweis auf eine Primärinfektion oder Reaktivierung sollten stets vorsichtig interpretiert werden, denn nicht selten kommen kreuzreagierende oder unspezifische IgM-Nachweise, insbesondere im Rahmen der akuten CMV-Primärinfektion, Toxoplasmose oder Parvovirus B19-Infektion vor [48, 110, 140, 141]. Es erschweren nicht nur isoliert auftretende VCA-IgM-Antikörper, sondern auch das gleichzeitige Auftreten von EBNA1-IgG, VCA-IgG und -IgM die Diagnostik [131, 134, 137, 143]. Differentialdiagnostisch muss hier zwischen einer akuten Infektion mit atypisch frühem oder unspezifischem EBNA1-IgG-Nachweis, einer kürzlichen Infektion mit schon nachweisbarem EBNA1-IgG, einem IgM-Nachweis bei Reaktivierung oder kreuzreagierenden/unspezifischen IgM-Antikörpern im Rahmen anderer akuter Infektionen (z. B. CMV, Toxoplasmose, HIV, Parvovirus B19, Hepatitis) oder persistierenden IgM-Antikörpern nach zurückliegender EBV-Infektion unterschieden werden. Nystad und Myrmel zeigten in ihrer Studie, dass zur Differenzierung zwischen später EBV-Primärinfektion und subklinischer Reaktivierung der Nachweis von heterophilen Antikörpern hilfreich sein kann [134]. Dieser Ansatz konnte aufgrund von nur selten durchgeführter Untersuchung auf heterophile Antikörper (29/289) im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht valide überprüft werden.

Während mit dem Routineblot 7 reaktive VCA p18-IgM-Banden bei den 11 Proben mit frischer Toxoplasmose nachgewiesen wurden, fielen die dazugehörigen IgM-Forschungsblots der Fa. Viramed alle negativ aus. Nach Vorbehandlung der 11 Toxoplasmose-Seren mit Virasorb wurden auf dem EBV ViraStripe IgM bei allen Seren IgM-Antikörper im Routineblot detektiert. Da es sich hier ausschließlich um Proben mit hohem erregerspezifischem IgG-Anteil handelte (EBNA1- oder VCA-IgG), scheinen in den Untersuchungen ohne Virasorb zuvor in einigen Seren bindungsschwächere IgM-Antikörper durch die bindungsstarken IgG-Antikörper verdrängt worden zu sein. Nicht unerwähnt sollte bleiben, dass in keinem der beiden Viramed-Teste VCA gp125-IgM-Antikörper im Rahmen einer frischen Toxoplasmose nachgewiesen wurden. Der Vergleich ließ die Feststellung zu, dass unter Verwendung des Volllängenproteins VCA p18 C auf dem F&E EBV ViraStripe IgM möglicherweise keine unspezifischen VCA p18-IgM-Reaktivitäten bei frischer Toxoplasmose auftreten würden.

Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Guerrero et al. als auch von Berth und Bosmans fanden sich auch in der vorliegenden Arbeit besonders viele falsch positive EBV-IgM-Ergebnisse in den Screeningtesten und im EBV ViraStripe aufgrund von Kreuzreaktivität bei CMV-Primärinfektion [110, 139]. Nach Untersuchung von 32 Seren mit frischer bzw. kürzlicher CMV-Primärinfektion im EBV ViraStripe IgM waren mit 21 positiven und 4 grenzwertigen VCA p18-Nachweisen (trunkiertes Antigen) 78,1% der Teste reaktiv.

Nach Vorbehandlung der Seren mit Virasorb fand sich ein noch etwas höherer Prozentsatz von 84,4% reaktiver Teste mit VCA p18-Banden mittels EBV ViraStripe IgM. Die Erhöhung der Nachweisrate war wiederum mit den höhertitrigen EBNA1- und/oder VCA-IgG-Antikörpern in den Suchtesten von 28 Proben zu erklären, die vermutlich ohne Vorbehandlung mit Virasorb bindungsschwächere IgM-Antikörper verdrängt haben. Die Auswertung der Ergebnisse des F&E EBV ViraStripe IgM zeigte mit 5 positiven und 7 grenzwertigen Reaktivitäten deutlich weniger Nachweise bei Verwendung des VCA p18 C, so dass eine Spezifitätsverbesserung in der IgM-Analyse des EBV ViraStripe durch Verwendung des Volllängenprotein VCA p18 C möglich schien. Einschränkend muss auch hier erwähnt werden, dass ein direkter Vergleich der Positivraten unter Verwendung der im kommerziellen Routineblot verwendeten VCA p18-IgM-Antigenlösung mit der des VCA p18 C (Volllängenprotein) nicht möglich war, da Erstere nicht auf dem Forschungsblot aufgebracht war. Da jedoch auf dem Forschungsblot mit 37,5% deutlich weniger VCA p18 C-IgM-Banden detektiert wurden, scheint unter dessen Verwendung eine Reduktion kreuzreagierender IgM-Antikörper im Rahmen einer CMV-Primärinfektion bzw. persistierender VCA p18-IgM-Antikörper wahrscheinlich.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie lassen die Verwendung des Volllängenproteins (VCA p18 C) anstelle des trunkierten VCA p18 in der IgM-Analyse auf dem EBV ViraStripe sinnvoll erscheinen. Nach dem Vergleich der Ergebnisse des Routine- mit dem Forschungsblot der Fa. Viramed wäre es denkbar, durch Einsatz von VCA p18 C falsch positiv detektierte IgM-Nachweise, die zu Fehldiagnosen führen können, zu minimieren. Eine Reduktion unspezifischer oder kreuzreagierender VCA-IgM-Antikörper im Rahmen anderer akuter Infektionen, wie hier an Seren mit frischer Toxoplasmose und CMV-Primärinfektion untersucht wurde, als auch die Reduktion persistierender IgM-Nachweise nach zurückliegender EBV-Infektion würde aufgrund einer Spezifitätsverbesserung die Anzahl unklarer serologischer EBV-Befunde und die sich anschließende Folgediagnostik reduzieren. Die Studienergebnissen weisen unter Verwendung des VCA p18 C (Volllängenprotein) auf eine vergleichbare Sensitivität zum im IgM-Routineblot verwendeten trunkierten VCA p18 bei Erhöhung der Spezifität in der EBV-IgM-Analyse hin.

Eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit war durch Verwendung geringerer Volumina zur Herstellung der F&E EBV ViraStripes im Vergleich zum Routineblot gegeben. Es musste im wesentlich kleineren Maßstab gearbeitet werden, um möglichst viele Antigenlösungen auf die F&E-Teststreifen aufzubringen. Insofern müssten die Ergebnisse der F&E EBV ViraStripes der Fa. Viramed unter exakt den gleichen Herstellungsbedingungen wie sie für den Routineblot gelten in einer weiteren Studie an klinisch definierten Seren

reproduziert werden, um statistisch valide Aussagen zu treffen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben maßgeblich zur Verwendung des Volllängenproteins (VCA p18 C) in dem kürzlich auf den Markt gebrachten EBV ViraChip IgM Test Kit der Fa. Viramed beigetragen. Hierbei handelt es sich um einen Chip-Immuno blot, einem Immuno blot auf Basis eines Enzym-Immunoassays im Microarray-Format zum qualitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen spezifische Epstein-Barr-Virus-Antigene in humanem Serum. Der EBV ViraChip IgM detektiert somit vermutlich weniger unspezifische/ kreuzreagierende oder persistierende VCA-IgM-Antikörper im Vergleich zum EBV Vira-Stripe IgM (Viramed) und EBV IgM Line Immunoblot (Virotech). Es können mit dem neuen IgM-Test anscheinend mehr eindeutige EBV-Antikörperreaktionsmuster bereits in der Erstuntersuchung nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigte aufgrund von isoliertem Auftreten von EA-D-IgG bei einigen EBV-Primärinfektionen in der Erstuntersuchung, dass auch der Einsatz von EA-D-IgG zusätzlich zum EBNA1-IgG, VCA-IgG und -IgM in den Screening-Testen sinnvoll ist. Wenngleich in der Literatur verschiedene diagnostische Wege in der EBV-Diagnostik vorgeschlagen werden, wie z. B. Screening mit EBNA1-IgG [110], Screening mit EBNA1-IgG, VCA-IgG- und -IgM oder aber die Untersuchung mittels IgG-Immuno blot [146, 147], zeigte diese Arbeit, dass jeder dieser Ansätze seine Schwächen hat. Somit wären weder die in dieser Studie benutzten Screening- noch die Bestätigungsteste, isoliert verwendet, ideal für die alleinige EBV-Diagnostik geeignet. Die nachgewiesenen Immunantworten variieren stark in Abhängigkeit der verwendeten Antigene bzw. deren Aufbereitungen. Eine Stufen diagnostik ist sinnvoll. Die Mehrzahl der Befunde kann sicher durch die z. B. häufig im Hochdurchsatzlabor verwendeten ELISA- oder CLIA-Screeningteste in der Erstuntersuchung einem EBV-Infektionsstatus zugeordnet werden. Die wenigen nicht eindeutigen Konstellationen können meist mit der Untersuchung im EBV-Line-Immuno blot abgeklärt werden.

Auch bei großem diagnostischem Aufwand wird es immer in geringer Anzahl Unsicherheiten geben, die keine eindeutige serologische Bewertung mittels Erstbefund zulassen und eine Verlaufskontrolle oder eine IgG-Aviditätsmessung erfordern. Eine Standardisierung von serologischen Assays für den Nachweis der EBV-Infektion ist wünschenswert [151]. Sener et al. beschreiben treffend, die Diagnose einer EBV-Infektion beruht nicht auf einem einzigen Antikörper-Test, sondern auch auf dem Muster der erhaltenen Ergebnisse und dem klinischen Bild [154].

5 Zusammenfassung

Eine differenzierte serologische EBV-Diagnostik ist aufgrund der Vielzahl differentialdiagnostisch in Frage kommender Erkrankungen (CMV, Röteln, HIV, Toxoplasmose, Leukämie, Lymphom, Hepatitis u.a.) bei hoher Prävalenzrate in der Bevölkerung sehr wichtig. Da mehr als 5% der EBV-Infizierten niemals EBNA1-IgG-Antikörper bilden und persistierende, unspezifische oder kreuzreagierende IgM-Antikörper nicht selten vorkommen, ist die sichere serologische Beurteilung mittels des zweiten zuverlässigen Spätmarkers (VCA p18-IgG) zum Ausschluss einer akuten Infektion von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Studie wurde anhand von 289 validen, in der Routineanalytik des LADR Zentrallabors Dr. Kramer & Kollegen auf EBV vorklassifizierte Seren ein Methodenvergleich der EBV-Lineblots von den Herstellern Virotech und Viramed durchgeführt. Um den EBV ViraStripe (Viramed) bezüglich der Antigenauswahl und Antigenkonzentration zu optimieren, wurden alle Proben parallel zusätzlich in dem eigens von der Fa. Viramed für diese Studie hergestellten Entwicklungsimmunoblots (F&E EBV ViraStripe) ausgetestet. Vornehmlich wurden Proben mit abgelaufenen EBV-Infektionen untersucht, da ein Ziel der Arbeit darin bestand, ein eindeutigeres Bandenverteilungsmuster der VCA-IgG-Antikörper mit Überwiegen der VCA p18-Intensität bei den zurückliegenden Infektionen zu erhalten. Um die Spezifität der IgM-Testung zu verbessern, wurden in einer zweiten Untersuchungsreihe 11 Seren mit frischer Toxoplasmose und 32 Seren mit CMV-Primärinfektion im EBV ViraStripe IgM und im F&E EBV ViraStripe IgM parallel analysiert.

Die Vermutung aus der Routineanalytik, dass sich im EBV-Lineblot der Fa. Virotech im Gegensatz zum EBV ViraStripe der Fa. Viramed häufiger das klassische Grundmuster der VCA-IgG-Antikörper zueinander mit Überwiegen der VCA p18-Reaktivität (VCA gp125 < VCA p18) bei den zurückliegenden Infektion findet, deckten sich mit den Ergebnissen im untersuchten Kollektiv. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der Auswertung der 80 Seren mit EBV-Primärinfektion zeigte sich im F&E EBV ViraStripe IgG, dass mit der 0,5-fachen Konzentration von VCA gp125 A frische Infektionen in diesem Kollektiv unentdeckt blieben. Die Bewertung der Antigene des VCA p18 und des Fusionsproteins auf dem F&E EBV ViraStripe IgG bei den zurückliegenden Infektionen ergab lediglich bei Verwendung des VCA p18 C eine unverminderte qualitative Nachweisrate, jedoch wurden auch für dieses Antigen deutlich niedrigere Intensitäten gegenüber dem herkömmlichen Viramed-Immunoblot verwendeten trunkierten Antigen VCA p18 A gemessen.

Das primäre Ziel, eine Erhöhung der Antikörperreaktionsmuster mit Überwiegen der VCA p18-IgG-Antwort bei den zurückliegenden Infektionen zu erhalten, konnte somit in

der vorliegenden Arbeit weder durch die Erniedrigung der Antigenkonzentrationen noch durch die zusätzlich ausgetesteten Antigene erreicht werden.

In der IgM-Analyse zeigte sich im Kollektiv der zurückliegenden EBV-Infektionen ein signifikanter Abfall unspezifischer oder persistierender IgM-Nachweise bei Verwendung des Volllängenproteins VCA p18 C auf dem F&E EBV ViraStripe IgM im Gegensatz zu den beiden kommerziellen EBV-Lineblots. In einer weiteren Untersuchungsreihe wurden gegen das VCA p18 C auf dem F&E EBV ViraStripe IgM bei den Seren mit frischer Toxoplasmosis keine und bei den CMV-Primärinfektionen signifikant weniger unspezifische IgM-Banden im Vergleich zum EBV ViraStripe IgM nachgewiesen. Aufgrund der Ergebnisse erscheint die Annahme zulässig, dass ein Wechsel auf das VCA p18 C (Volllängenprotein) im kommerziellen EBV ViraStripe IgM unspezifische, persistierende bzw. kreuzreagierende IgM-Reaktivitäten deutlich minimieren würde und damit eine Verbesserung hinsichtlich seiner Spezifität bei vergleichbarer Sensitivität möglich ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Kieff E, Rickinson A (2007) Epstein-Barr virus and its replication, In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. (Hrsg.): Fields virology, 5. Aufl., 2603-2654, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA
2. Rickinson AB, Kieff E (2007) Epstein-Barr virus. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (Hrsg): Fields virology. 5. Aufl., 2603-2700, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA
3. Akashi K, Mizuno S (2000) Epstein-Barr virus-infected natural killer cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 40, 57-66
4. Tugizov S, Herrera R, Veluppillai P, Greenspan J, Greenspan D, Palefsky JM (2007) Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. *J Virol* 81, 5484-5496
5. Grywalska E, Rolinski J (2015) Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Semin Oncol* 42, 291-303
6. Khammissa RA, Fourie J, Chandran R, Lemmer J, Feller L (2016) Epstein-Barr virus and its association with oral hairy leukoplakia: A Short Review. *Int J Dent* 2016, 4941783
7. Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1, 702-703
8. Henle G, Henle W (1966) Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 91, 1248-1256
9. Henle G, Henle W, Diehl V (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-Type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 59, 94-101
10. Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E (1984) U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 7632-7636
11. Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, Kieff E (1990) Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 64, 4084-4092
12. Sample J, Kieff EF, Kieff ED (1994) Epstein-Barr virus types 1 and 2 have nearly identical LMP-1 transforming genes. *J Gen Viro* 75, 2741-2746
13. Frank D, Cesarman E, Liu YF, Michler RE, Knowles DM (1995) Post-transplantation lymphoproliferative disorders frequently contain type A and not type B Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 1396-1403
14. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH (2011) Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev*

- 24, 193-209
15. Young LS, Yao QY, Rooney CM, Sculley TB, Moos DJ, Rupani H, Laux G, Bornkamm GW, Rickinson AB (1987) New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Viro* 68: 2853-2862
 16. Niller HH, Wolf H (1993) Epstein-Barr virus. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 194, 118-125
 17. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C, Tuffnell PS, Barrell BG (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207-211
 18. Hammerschmidt W, Gärtner B, Müller-Lantzsch N (2009) Herpesviren: Epstein-Barr-Virus (EBV). In: Doerr HW, Gerlich WH (Hrsg.): *Medizinische Virologie*. 2. Aufl., 677-688, Thieme, Stuttgart
 19. Roizman B (1996) The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11307-11312
 20. Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW (2015) The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 235, 323-333
 21. Nemerow GR, Cooper NR (1984) Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. The internalization process. *Virology* 132, 186-198
 22. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 4510-4514
 23. Nemerow GR, Wolfert R, McNaughton ME, Cooper NR (1985) Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 55, 347-351
 24. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E (1987) Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203-213
 25. Cohen JI (2000) Epstein-Barr virus infection. *NEJM* 343, 481-492
 26. Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature reviews. Cancer* 4, 757-768
 27. Ogembo JG, Kannan L, Ghiran I, Nicholson-Weller A, Finberg RW, Tsokos GC (2013) Human complement receptor type 1/CD35 is an Epstein-Barr virus receptor. *Cell reports* 3, 371-385
 28. Shannon-Lowe C, Rowe M (2011) Epstein-Barr virus infection of polarized epi-

- thelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS pathog* 7, e1001338
29. Shannon-Lowe C, Rowe M (2014) Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation. *Curr Opin Virol* 4, 78-84
 30. Hutt-Fletcher LM (2007) Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 81, 7825-7832
 31. Walther LE, Ilgner J, Oehme A, Schmidt A, Sellhaus B, Gudziol H, Beleites E, Westhofen M (2005) Die infektiöse Mononukleose. *HNO* 53, 383-92
 32. Huzly D, Hess RD (2007) Möglichkeiten und Grenzen der serologischen Epstein-Barr-Virus-Diagnostik. *Dtsch Med Wochenschr* 132, 151-154
 33. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688
 34. Wagner HJ, Hornef M, Middeldorp J, Kirchner H (1995) Characteristics of viral protein expression by Epstein-Barr virus-infected B cells in peripheral blood of patients with infectious mononucleosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 696-699
 35. Callan M, Tan L, Annels N, Ogg G, Wilson J, O'Callaghan C, Steven N, MCMichael A, Rickinson A (1998) Direct visualization of antigen-specific CD8+T Cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus in vivo. *J Exp Med* 187, 1395-1402
 36. Rickinson AB, Moss DJ (1997) Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15, 405-431
 37. Longnecker R, Miller CL, Miao XQ, Marchini A, Kieff E (1992) The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *J Virol* 66, 6461-6469
 38. Miller CL, Lee JH, Kieff E, Longnecker R (1994) An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 772-776
 39. Fries KL, Miller WE, Raab-Traub N (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 70, 8653-8659
 40. Longnecker R, Merchant M, Brown ME, Fruehling S, Bickford JO, Ikeda M, Harty RN (2000) WW- and SH3-domain interactions with Epstein-Barr virus LMP2A. *Exp Cell Res* 257, 332-340
 41. Amon W, Farrell PJ (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15, 149-156
 42. Yates JL, Warren N, Sugden B (1985) Stable replication of plasmids derived from

- Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-815
43. Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12616-12621
 44. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB (2007) Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25, 587-617
 45. Kelly G, Bell A, Rickinson A (2002) Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med* 8, 1098-1104
 46. Macsween KF, Crawford DH (2003) Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 3, 131-140
 47. Geige S (1995) Infektionskrankheiten. In: Sitzmann FC (Hrsg.): Pädiatrie. 647-651, Hippokrates, Stuttgart
 48. Karrer U, Nadal D (2014) Epstein-Barr-Virus und infektiöse Mononukleose. *Schweiz Med Forum* 14, 226-232
 49. Hess RD (2004) Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 42, 3381-3387
 50. Walther LE (2010) Ist es Pfeiffersches Drüsenfieber? Ohne Serologie ist die Abklärung nicht komplett. *MMW Fortschr. Med* 152, 42-45
 51. Bauer G (1995) Rationale und rationelle Epstein-Barr-Virus-Diagnostik. *Clin Lab* 41, 623-634
 52. Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, Biggar RJ (1979) Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States. Clinical and Serologic Observations. *J Infect Dis* 139, 553-558
 53. Gulley ML, Tang W (2008) Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 10, 279-292
 54. Balfour HH, Dunmire SK, Hogquist KA (2015) Infectious mononucleosis. *Clin Trans Immunol* 4, e33
 55. Bauer G (1994) Epstein-Barr-Virus - Bedeutung und Möglichkeiten der Labordiagnostik. *Ther Umsch* 51, 558-562
 56. Schuster V, Kreth HW (1992) Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. *Eur J Pediatr* 151, 718-725
 57. Fust G (2011) The role of the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of some autoimmune disorders - Similarities and differences. *Eur J Microbiol Immunol* 1, 267-278

58. Ruprecht K (2013) Multiple Sklerose und Epstein-Barr-Virus. Eine aktuelle Übersicht. *Akt Neurol* 40, 400-407
59. Rasmussen NS, Draborg AH, Nielsen CT, Jacobsen S, Houen G (2015) Antibodies to early EBV, CMV, and HHV6 antigens in systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Rheumatol* 44, 143-149
60. Cho J, Kang MS, Kim KM (2016) Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and specific features of the accompanying immune response. *J Gastric Cancer* 16, 1-7
61. Epstein JB, Sherlock CH, Greenspan JS (1991) Hairy leukoplakia-like lesions following bone-marrow transplantation. *AIDS* 5, 101-102
62. Purtilo DT, Yang JP, Cassel CK, Harper R, Stephenson SR, Landing BH, Vawter GF (1975) X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 305, 935-941
63. Schuster V, Kreth HW (2000) X-linked lymphoproliferative disease is caused by deficiency of a novel SH2 domain-containing signal transduction adaptor protein. *Immunol Rev* 178, 21-28
64. Brady G, MacArthur GJ, Farrell PJ (2007) Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 60, 1397-1402
65. Wilmes E, Wolf H (1989) Epstein-Barr Virus Infektionen. Neue Aspekte zur Pathogenese und Klinik. *Laryngo Rhino Otol* 68, 36-43
66. Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ (2003) Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 45, 1-36
67. Lenoir GM, Philip T, Sohier R (1984) Burkitt-type lymphoma: EBV association and cytogenetic markers in cases from various geographic locations. *Progress in cancer research and therapy* 27, 283-295
68. Fuchs R, Staib P, Brümmerdorf T (2013) *Manual Hämatologie*, 23. Auflage, S. 511-512. Nora-Verlag-GmbH, Stolberg
69. Magrath I (1990) The Pathogenesis of Burkitt's lymphoma. In: Vande Woude GF, Klein G (Hrsg.) *Advances in cancer research*. Band 55, 133-270 Academic Press, San Diego
70. Prang N, Schwarzmann F (1997) Aktuelle Perspektiven in der Diagnostik Epstein-Barr-virus assoziierter Erkrankungen. *Immun Infekt* 4, 144-151
71. Zeng Y, Jan MG, Zhang Q, Zhang LG, Li HY, Wu YC, Wang YS, Su GR (1982) Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in wuzhou city, china. *Int J Cancer* 29, 139-141
72. Marks JE, Phillips JL, Menck HR (1998) The national cancer data base report on

- the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 83, 582-588
73. Raab-Traub N (2002) Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol* 12, 431-441
 74. Henderson BE, Louie E, SooHoo Jing J, Buell P, Gardner MB (1976) Risk factors associated with nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 295, 1101-1106
 75. Simons MJ, Wee GB, Goh EH, Chan SH, Shanmugaratnam K, Day NE, de-Thé G (1976) Immunogenetic aspects of nasopharyngeal carcinoma. IV. Increased risk in Chinese of nasopharyngeal carcinoma associated with a Chinese-related HLA profile (A2, Singapore 2). *J Natl Cancer Inst* 57, 977-980
 76. Yu MC, Yuan JM (2002) Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12, 421-429
 77. Friberg JT, Yuan JM, Wang R, Koh WP, Lee HP, Yu MC (2007) A prospective study of tobacco and alcohol use as risk factors for pharyngeal carcinomas in Singapore Chinese. *Cancer* 109, 1183-1191
 78. Feng BJ, Khyatti M, Ben-Ayoub W, Dahmoul S, Ayad M, Maachi F, Bedadra W, Abdoun M, Mesli S, Bakkali H, Jalbout M, Hamdi-Cherif M, Boualga K, Bouaouina N, Chouchane L, Benider A, Ben-Ayed F, Goldgar E, Corbex M (2009) Cannabis, tobacco and domestic fumes intake are associated with nasopharyngeal carcinoma in North Africa. *Br J Cancer* 101,1207-1212
 79. Ji X, Zhang W, Xie C, Wang B, Zhang G, Zhou F (2011) Nasopharyngeal carcinoma risk by histologic type in central China: impact of smoking, alcohol and family history. *Int J Cancer* 129, 724-732
 80. Polesel J, Franceschi S, Talamini R, Negri E, Barzan L, Montella M, Libra M, Vaccher E, Franchin G, La Vecchia C, Serraino D (2011) Tobacco smoking, alcohol drinking, and the risk of different histological types of nasopharyngeal cancer in a low-risk population. *Oral Oncol* 47, 541-545
 81. Fachiroh J, Sangrajang S, Johansson M, Renard H, Gaborieau, Chabrier A, Chindavijak S, Brennan P, McKay JD (2012) Tobacco consumption and genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma (NPC) in Thailand. *Cancer Causes Control* 23, 1995-2002
 82. Chien YC, Chen JY, Liu MY, Yang HI, Hsu MM, Chen CJ, Yang CS (2001) Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med* 345, 1877-1882
 83. Ji MF, Wang DK, Yu YL, Guo YQ, Liang JS, Cheng WM, Zong YS, Chan KH, Ng SP, Wei WI, Chua DT, Sham JS, Ng MH (2007) Sustained elevation of Epstein-Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma.

- Br J Cancer 96, 623-630
84. Cao SM, Liu Z, Jia WH, Huang QH, Liu Q, Guo X, Huang TB, Ye W, Hong MH (2011) Fluctuations of Epstein-Barr virus serological antibodies and risk for nasopharyngeal carcinoma: a prospective screening study with a 20-year follow-up. *PLoS one* 6, e19100
 85. Coghill AE, Hsu WL, Pfeiffer RM, Juwana H, Yu KJ, Lou PJ, Wang CP, Chen JY, Chen CJ, Middeldorp JM, Hildesheim A (2014) Epstein-Barr virus serology as a potential screening marker for nasopharyngeal carcinoma among high-risk individuals from multiplex families in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 23, 1213-1219
 86. Oberender H, Nowak R, Donner A, Brichacek E, Vonka V, Teterin W, Kunkel M (1989) EBV-spezifische Antikörper bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom (NPC) und Tonsillarkarzinom (TC) *Laryngo Rhino Otol* 68, 181-185
 87. Khanna R, Burrows SR, Moss DJ (1995) Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol Reviews* 59, 387-405
 88. Drexler HG (1992) Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma* 8, 283-313
 89. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkr E, Warnke RA (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392
 90. Gutensohn N, Cole P (1980) Epidemiology of Hodgkin's disease. *Semin Oncol* 7, 92-102
 91. Hodgkin T (1973) Excerpts from. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Cancer J Clin* 23, 54-60
 92. Keegan TH, Glaser SL, Clarke CA, Gulley ML, Craig FE, DiGiuseppe JA, Dorfman RF, Mann RB, Ambinder RF (2005) Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 23, 7604-7613
 93. Muñoz N, Davidson RJ, Witthoff B, Ericsson JE, De-Thé G (1978) Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 22, 10-13
 94. Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS, Madsen M, Rosdahl N, Konradsen HB, Storm HH, Melbye M (2003) Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 349 1324-1332
 95. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, Pallesen G,

- Gulley ML, Khan G, O`Grady J, Hummel M, Preciado MV, Knecht H, Chan JK, Claviez A (1997) Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 70, 375-382
96. Thompson MP, Kurzrock R (2004) Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 10, 803-821
97. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simocini L, Sarasini A, Comoli P, Maccario R, Fiocchi R, Gerna G (2000) High Levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 38, 613-619
98. Gaeta A, Nazzari C, Verzaro S, Latte MC, Fabri G, Scateni S, Raggi C, Lubrano R, Mancini C (2006) Early evidence of lymphoproliferative disorder: post-transplant monitoring of Epstein-Barr infection in adult and pediatric patients. *New Microbiol* 29, 231-241
99. Green M, Michaels MG (2013) Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* 13, 41-54
100. Trappe R, Oertel S, Riess H (2006) Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie transplantationsassoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen. *Dtsch Arztebl* 103, A 3259-3267
101. Krasuska-Slawinska E, Minko-Chojnowska I, Pawlowska J, Dembowska-Baginska B, Pronicki M, Olczak-Kowalczyk D (2015) Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) manifesting in the oral cavity of a 13-year-old liver transplant recipient (LTx). *Ann Transplan* 20, 478-482
102. Ho M, Jaffe R, Miller G, Breining MK, Dummer JS, Makowka L, Atchison RW, Karrer F, Nalesik MA, Starzl TE (1988) The Frequency of Epstein-Barr Virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestations in children. *Transplantation* 45, 719-727
103. Loren AW, Porter DL, Stadtmauer EA, Tsai DE (2003) Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 31, 145-155
104. Haque T, Thomas JA, Falk KI, Parratt R, Hunt BJ, Yacoub M, Crawford DH (1996) Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *J Gen Virol* 77, 1169-1172
105. Hopwood P, Crawford DH (2000) The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *J Clin Pathol* 53, 248-254
106. <http://emedicine.medscape.com/article/1013758-overview> (Tag des Zugriffs: 24.01.2017)
107. Ojha J, Islam N, Cohen DM, Marshal D, Reavis MR, Bhattacharyya I (2008) Post-

- transplant lymphoproliferative disorders of oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105, 589-596
108. Bauer G (2005) Einfacher ist besser: Neue Wege der EBV-Diagnostik. Mikrogen GmbH, Neuried
109. Bauer G (2009) Epstein-Barr-Virus-Diagnostik: Herausforderung an Test und Befunder. Sonderdruck aus: Aktuelle Diagnostik von Infektions- und Autoimmunerkrankungen. 7. Mikrogen Frühjahrssymposium (15.05.2009). Mikrogen GmbH, Neuried
110. Guerrero-Ramos A, Patel M, Kadakia K, Haque T (2014) Performance of the architect EBV antibody panel for determination of Epstein-Barr virus infection stage in immunocompetent adolescents and young adults with clinical suspicion of infectious mononucleosis. *Clin Vaccine Immunol* 21, 817-823.
111. Taylor GH (2003) Cytomegalovirus. *Am Fam Physician* 67, 519-524
112. Wang X, Yang K, Wei C, Huang Y, Zhao D (2010) Coinfection with EBV/CMV and other respiratory agents in children with suspected infectious mononucleosis. *Viol J* 7, 247
113. De Ory F, Guisasola ME, Sanz JC, Garcia-Bermejo I (2011) Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein-Barr virus primary infections. *Clin Vaccine Immunol* 18, 444-448
114. Zenda T, Itoh Y, Takayama Y, Masunaga T, Asaka S, Oiwake H, Shinozaki K, Takeda R (2004) Significant liver injury with dual positive IgM antibody to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus as a puzzling initial manifestation of infectious mononucleosis. *Intern Med* 43, 340-343
115. Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada JI, Maruyama K, Yagasaki H, Kojima S, Kimura H (2009) Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illnesses. *J Med Virol* 81, 1399-1402
116. Pottgiesser T, Bauer G (2014) Epstein-Barr-Virus-Infektionen. *Dtsch Z Sportmed* 64, 337-341
117. Lennette ET (1995) Epstein-Barr virus (EBV). In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET (Hrsg.): Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 299-312, American Public Health Association, Washington
118. De Paschale M, Clerici P (2012) Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol* 1, 31-43
119. <http://emedicine.medscape.com/article/963894-workup#c6> (Tag des Zugriffs 24.01.2017)
120. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Goldfarb M, Kubic P, Gehrtz RC, Balfour HH, Fleisher GR, Krivit W (1981) Clinical and laboratory evaluation of infants and

- children with Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis: report of 32 patients (aged 10-48 months). *Blood*. 57, 933-938
121. Vidrih JA, Walensky RP, Sax PE, Freedberg KA (2001) Positive Epstein-Barr virus heterophile antibody tests in patients with primary human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 111, 192-194
122. Gärtner B, Müller-Lantsch N (2009) Epstein-Barr-Virus. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.) *Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie*. 2. Aufl., 775-780, Thieme, Stuttgart
123. Kocoglu ME, Tas T, Mengeloglu FZ, Ozsoy S, Bucak O (2014) Evaluation of 4 methods for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection using an immunofluorescence assay as the reference method. *Turk J Med Sci* 44, 914-919
124. Bauer G (1996) IgM – ein variabler und mehrdeutiger diagnostischer Marker. *Mikrobiologie* 6, 44-51
125. Färber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P (2001) Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection by novel ELISAs based on recombinant capsid antigens p23 and p18. *J Med Virol* 63, 271-276
126. Kreuzer C, Nabeck KU, Levy HR, Daghofer E (2013) Reliability of the Siemens Enzygnost and Novagnost Epstein-Barr Virus assays for routine laboratory diagnosis: agreement with clinical diagnosis and comparison with the Merifluor Epstein-Barr Virus immunofluorescence assay. *BMC Infect Dis* 13, 260
127. Gärtner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K, Müller-Lantsch N (2003) Evaluation of Four Commercially Available Epstein-Barr Virus Enzyme Immunoassays with an Immunofluorescence Assay as the Reference Method. *Clin Vaccine Immunol* 10, 78-82
128. Feng Z, Li Z, Sui B, Xu G, Xia T (2005) Serological diagnosis of infectious mononucleosis by chemiluminescent immunoassay using capsid antigen p18 of Epstein-Barr virus. *Clin Chim Acta* 354, 77-82
129. Middeldorp JM, Herbrink P (1988) Epstein-Barr virus specific marker molecules for early diagnosis of infectious mononucleosis. *J Virol Methods* 21, 133-146
130. De Paschale M, Cagnin D, Cerulli T, Manco MT, Agrappi C, Mirri P, Gatti A, Rescaldani C, Clerici P (2010) Search for anti-EA(D) antibodies in subjects with an "isolated VCA IgG" Pattern. *Int J Microbiol* 2010, 695104
131. Lupo J, Germi R, Semenova T, Buisson M, Seigneurin JM, Morand P (2012) Performance of two commercially available automated immunoassays for the determination of Epstein-Barr virus serological status. *Clin Vaccine Immunol* 19, 929-934

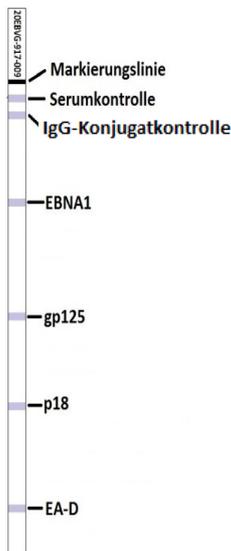
132. Bauer G (2001) Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clin Lab* 47, 223-230
133. Pottgiesser T, Schumacher YO, Wolfarth B, Schmidt-Trucksass A, Bauer G (2012) Longitudinal observation of Epstein-Barr virus antibodies in athletes during a competitive season. *J Med Virol* 84, 1415-1422
134. Nystad TW, Myrmel H (2007) Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 38, 292-297
135. Gärtner BC, Kortmann K, Schäfer M, Mueller-Lantzsch N (2000) No Correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. *J Clin Microbiol* 38, 2458
136. Schillinger M, Kampmann M, Murray G, Hanselmann I, Bauer G (1993) Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr virus (EBV) infection: evaluation of the significance of serological markers. *Med Microbiol Lett* 2, 296-303
137. Klutts JS, Ford BA, Perez NR, Gronowski AM (2009) Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. *J Clin Microbiol* 47, 3204-3210
138. Van Grunsven WM, Spaan WJ, Middeldorp JM (1994) Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-Encoded Epstein-Barr virus capsid protein. *J Infect Dis* 170, 13-19
139. Berth M, Bosmans E (2010) Comparison of three automated immunoassay methods for the determination of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M. *Clin Vaccine Immunol* 17, 559-563
140. Tranchand-Bunel D, Gras-Masse H, Bourez B, Dedecker L, Auriault C (1999) Evaluation of an Epstein-Barr virus (EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using a synthetic convergent peptide library, or mixotope, for diagnosis of primary EBV infection. *J Clin Microbiol* 37, 2366-2368
141. Berth M, Bosmans E (2009) Acute parvovirus B19 infection frequently causes false-positive results in Epstein-Barr virus- and herpes simplex virus-specific immunoglobulin M determinations done on the Liaison platform. *Clin Vaccine Immunol* 16, 372-375
142. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JS (2001) Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J Clin Microbiol* 39, 4152-4154
143. De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, Mirri P, Vigano EF, Clerici P (2009) Seroepidemiology of EBV and interpretation of the "isolated VCA IgG" pattern. *J Med Virol* 81, 325-331

144. De Paschale M, Cagnin D, Manco MT, Clerici P (2009) Significance of the “isolated EBNA-1 IgG” pattern in past EBV infection. *Microbiol Med* 24, 50-52
145. Corrales I, Giménez E, Navarro D (2014) Evaluation of the Architect Epstein-Barr virus (EBV) viral capsid antigen (VCA) IgG, VCA IgM, and EBV nuclear antigen 1 IgG chemiluminescent immunoassays for detection of EBV antibodies and categorization of EBV infection status using immunofluorescence assays as the reference method. *Clin Vaccine Immunol* 21, 684-688
146. De Ory F, Guisasola E, Tarrago D, Sanz JC (2015) Application of a commercial immunoblot to define EBV IgG seroprofiles. *J Clin Lab Anal* 29, 47-51
147. Pottgiesser T, Schumacher YO, Wolfarth B, Bauer G (2008) Epstein-Barr-Virus Infektionen. *Diagnostik und Serologie. Dtsch Z Sportmed* 59, 126-127
148. Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 6, 65-70
149. R Core Team (2016) R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
150. Gebrauchsanweisung für das EBV IgG/IgM Line Immunoblot Testkit (Februar 2011) Rüsselsheim, Genenzyme Virotech GmbH
151. Altuglu I, Bozkurt H, Samlioglu P, Zeytinoglu A (2007) Evaluation of three different assays for the assessment of Epstein Barr virus immunological status. *New Microbiol* 30, 393-398
152. Hatton OL, Harris-Arnold A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM (2014) The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res* 58, 268-276
153. Zeytinoglu A, Altuglu I, Karatas E, Yazan Sertoz R (2008) Comparison of immunofluorescence assay and multiplexed microparticle-based immunoassay for detecting Epstein-Barr virus viral capsid antigen antibodies. *J Virol Methods* 148, 300-302
154. Sener AG, Afsar I, Pinar E (2009) Evaluation of Epstein-Barr virus antibodies, anti-VCA avidity by immunofluorescence and immunoblot assays for assessment of Epstein-Barr virus immunologic state. *J Virol Methods* 159, 300-302
155. Thomas L (2012) Labororganisation - Präanalytische Phase. In: Thomas L (Hrsg.): *Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 8. Aufl., Band 2, S. 2276-2283, Th-Books Verl.-Ges, Frankfurt/Main
156. Bruu AL, Hjetland R, Holter E, Mortensen L, Natås O, Petterson W, Skar AG, Skarpaas T, Tjade T, Åsjø B (2000) Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies. *Clin Vaccine Im-*

- munol 7, 451-456
157. Klutts JS, Liao RS, Dunne WM, JR, Gronowski AM (2004) Evaluation of a multiplexed bead assay for assessment of Epstein-Barr virus immunologic status. *J Clin Microbiol* 42, 4996-5000
158. Andersson A, Vetter V, Kreutzer L, Bauer G (1994) Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen. Useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J Med Virol* 43, 238-244
159. Robertson P, Beynon S, Whybin R, Brennan C, Vollmer-Conna U (2003) Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol* 70, 617-623
160. Pottgiesser T, Wolfarth B, Schumacher YO, Bauer G (2006) Epstein-Barr virus serostatus: no difference despite aberrant patterns in athletes and control group. *Med Sci Sports Exerc* 38, 1782-1791
161. Gebrauchsanweisung für das EBV ViraStripe IgG,IgM Testkit (März 2011) Planegg, Viramed Biotech AG

7 Anhang

EBV IgG Line Immunoblot



EBV IgM Line Immunoblot

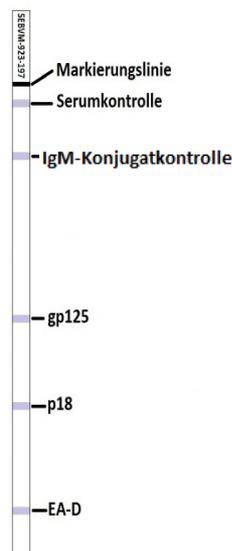
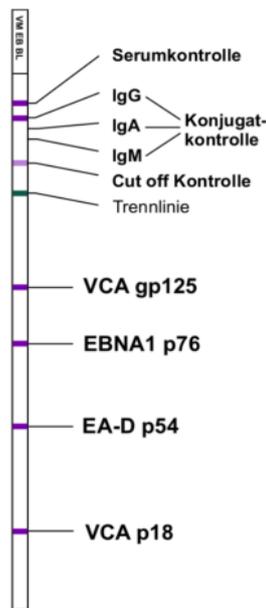


Abbildung 7.1: Schematische Abbildung der EBV IgG/IgM Line Immunoblot-Teststreifen der Fa. Virotech. Im oberen Abschnitt befindet sich jeweils die entsprechende Konjugat- und eine Serumkontrollbande, um die Validität des Testes zu überprüfen. Die darunter befindlichen Banden gehören zum Analytabschnitt und werden sichtbar, wenn die virus-spezifischen Antigene mit den entsprechenden Antikörpern im Serum reagieren.

EBV ViraStripe IgG



EBV ViraStripe IgM

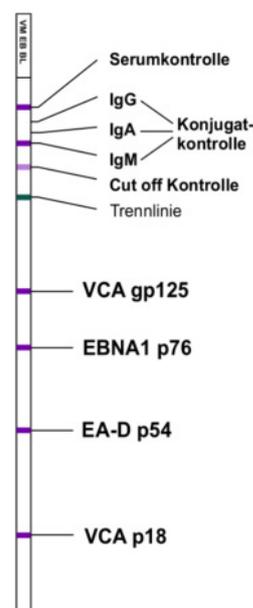
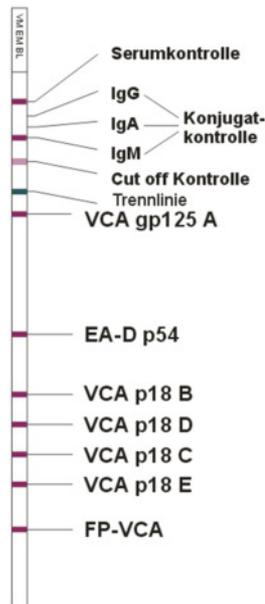


Abbildung 7.2: EBV ViraStripe IgG/IgM-Teststreifen (aus: Arbeitsanleitung, Fa. Viramed). Oberhalb der grünen Trennlinie befinden sich die 3 Kontrollbanden, um die Validität der Teste zu beurteilen. Die unteren 4 Banden gehören zum Analytabschnitt und werden sichtbar, wenn die virusspezifischen Antigene mit den entsprechenden Antikörpern im Serum reagieren.

F&E EBV ViraStripe IgM



F&E EBV ViraStripe IgG

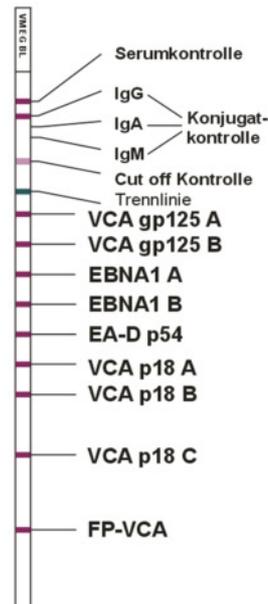


Abbildung 7.3: F&E EBV ViraStripe IgG/IgM-Teststreifen (aus: Arbeitsanleitung der Fa. Viramed). Oberhalb der grünen Trennlinie befinden sich die 3 Kontrollbanden, um die Validität der Tests zu beurteilen. Die Banden unterhalb der Trennlinie gehören zum Analyt- abschnitt und werden sichtbar, wenn die virusspezifischen Antigene mit den entsprechenden Antikörpern im Serum reagieren.

Anhang zu 3.3.3: Vergleich der kommerziellen EBV Line Immunoblots - Einzelfall- beschreibungen der diskrepanten und unklaren Serodiagnosen

Diskrepanzen: Serostatus „zurückliegend“

Mit den für die Studie festgelegten Interpretationskriterien ließen sich 149 Seren mit den Viramed-Testen und 141 Proben mit den Virotech-Testen einer zurückliegenden Infektion zuordnen. Bei den 8 diskrepanten Antikörperreaktionsmustern erfolgte mit den Viramed-Testen in 7 Fällen (siehe Tabelle 7.1) über den EBNA1-IgG-Nachweis und bei dem EBNA1-IgG-negativen Serum (Nr. 222) über die starke VCA p18-IgG-Reaktivität eine eindeutige Zuordnung zu einer abgelaufenen Infektion. Bei allen 8 Proben war der zugehörige IgM-Test negativ. 2 Seren wurden aufgrund der erhaltenen Antikörperreaktionsmuster auf den Immunoblots der Fa. Virotech in den Serostatus „kürzlich“ und 6 zu den unklaren Konstellationen eingeordnet.

Tabelle 7.1: Übersicht zu den Ergebnissen des ELISA-Suchprofils (DiaSorin) und der beiden kommerziellen EBV-Immunooblots mit Angabe der relativen Scanintensitäten von 8 Seren, welche nur mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM dem Serostatus „zurückliegend“ zugeordnet wurden.

Proben Nr.	Alter in Jahren	Vorbefund	VCA-IgG (< 20 AU/ml)	VCA-IgM (< 20 AU/ml)	EA-IgG (< 20 AU/ml)	EBNA-IgG (< 20 AU/ml)	Firma	IgG-Blot	EBNA1-IgG	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgG	EBNA1-IgG	VCA gp125-IgG	VCA p18-IgG	EA-IgG	IgM-Blot	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgM	VCA gp125-IgM	VCA p18-IgM	EA-IgM	Gruppe	
127	73		55	neg	neg	neg	Viramed	pos	pos	125	pos	90	350	45	95	neg			0	0	0	0	8
							Virotech	pos		125		0	540	45	20	neg							0
137	21		28	neg	neg	neg	Viramed	pos	pos	125>18	pos	214	332	111	114	neg		pos	0	46	62	8	
							Virotech	pos		125>18		0	410	160	0	neg							
146	18		neg	neg	22	>200	Viramed	pos	pos	125	pos	654	104	50	213	neg			0	0	0	8	
							Virotech	pos				856	20	0	106	neg							0
156	37		29	neg	neg	neg	Viramed	pos	pos	125=18		251	283	248	55	neg			0	0	44	6	
							Virotech	pos		125=18		20	418	400	0	neg							0
213	33		>170	neg	neg	neg	Viramed	pos	pos	18>125		489	393	471	0	neg			0	0	0	5	
							Virotech	pos		18>125		122	411	716	0	pos	125		113	0	0	13	
222	16	x	>170	neg	98	neg	Viramed	pos		18>125	pos	56	511	628	289	neg			0	0	0	7	
							Virotech	pos		18>125	pos	0	366	619	438	pos	125	pos	80	0	102	11	
239	15		27	neg	neg	neg	Viramed	pos	pos	125>18		130	448	122	0	neg			0	0	0	8	
							Virotech	pos		125>18		0	542	180	0	neg						0	0
270	28		neg	neg	neg	neg	Viramed	pos	pos	18>125	pos	397	70	105	124	neg			0	0	0	5	
							Virotech	pos				683	0	33	5	neg						0	0

Im Fall eines 73-jährigen Patienten (Probe 127) war aufgrund einer isoliert nachgewiesenen starken VCA gp125-IgG-Bande im Virotech-Test bei negativem IgM-Befund keine eindeutige Beurteilung des Immunooblots möglich. Eine Unterscheidung zwischen einer Primärinfektion und einer abgelaufenen Infektion ist anhand der VCA gp125-IgG-Reaktivität allein nicht möglich. Im ELISA-Testprofil von DiaSorin konnte bei dieser Probe lediglich eine schwach positive Reaktivität des VCA-IgG bei ansonsten negativen Nachweisen für VCA-IgM, EA-D-IgG und EBNA1-IgG detektiert werden.

In drei weiteren Fällen (Probe 137, 156, 239) hätte bereits die positive VCA p18-Bande unabhängig von ihrer Stärke im Virotech-IgG-Immuno blot bei fehlendem Hinweis auf eine Primärinfektion im IgM-Test und Abwesenheit von EBNA1-IgG laut Bewertungskriterien des Herstellers als eine abgelaufene Infektion bewertet werden können [150]. Bei allen 3 Seren war die VCA gp125-IgG-Reaktivität stärker oder zumindest noch gleich stark wie die VCA p18-IgG-Bande, wie es häufiger bei kürzlich zurückliegendem Infektionszeitpunkt vorkommt. In den zugehörigen ELISA-Testprofilen der Firma DiaSorin wurden lediglich VCA-IgG-Antikörper im Grenzwertbereich bei ansonsten negativen Nachweisen detektiert.

Bei den Seren 146 und 270 konnte mit den Line-Immunooblots von Virotech aufgrund einer jeweils in sehr starker Intensität gefundenen EBNA1-IgG-Bande zumindest eine Primärinfektion ausgeschlossen werden. In beiden Proben waren jedoch die IgG-Antikörper gegen VCA als Durchseuchungsmarker nicht nachweisbar, sodass eine unspezifische Reaktivität nicht mit Sicherheit auszuschließen war. Es erfolgte daher eine Zuordnung zu den unklaren Seren. Im EBV ViraStripe IgG konnten schwach positive Reaktivitäten gegen VCA-IgG festgestellt werden. In Probe 146 konnte zumindest noch zusätzlich eine schwa-

che EA-IgG-Bande im Virotech-Immunoblot abgelesen werden. Mit dem VCA-IgG-ELISA (DiaSorin) wurde in beiden Fällen kein Nachweis erbracht. Der bei Probe 270 zusätzlich durchgeführte CLIA-Test (DiaSorin) hatte eine grenzwertige VCA-IgG-Reaktivität gemessen. Die IgM-Teste beider Seren waren negativ.

Laut Bewertungskriterien der Fa. Virotech, wäre die Probe 213 eines 33-jährigen Patienten aufgrund der positiven EBNA1-IgG-Bande auch bei positiver VCA gp125-IgM-Reaktivität als abgelaufene EBV-Infektion zu bewerten [150]. Passend dazu fanden sich sowohl im CLIA als auch im ELISA hochpositive VCA-IgG-Nachweise, wie sie nach länger zurückliegender Infektion beobachtet werden. Bei Nachweis des Frühmarkers VCA gp125-IgM erfolgte jedoch im Rahmen der Studie die Zuordnung zum Serostatus „kürzlich“.

Das Serum 222 von einem 16-jährigen Patienten war allein aufgrund der Ergebnisse mittels Virotech-Immunoblot keinem sicheren EBV-Infektionsstatus zuzuordnen. Im Viramed-Test lag die EBNA1-IgG-Bande knapp unter dem Cut off, eine Zuordnung zu den abgelaufenen Infektionen konnte hier jedoch über die starke VCA p18-IgG-Bande vorgenommen werden. Da im Virotech-Immunoblot eine positive VCA gp125-IgM- und EA-D-IgM-Bande nachweisbar war, kann bei fehlender EBNA1-IgG-Reaktivität über den starken Nachweis der VCA p18-Bande laut Interpretationskriterien keine abgelaufene Infektion diagnostiziert werden [150]. Bei dem Patienten handelte es sich um eine Verlaufsuntersuchung. Eine erste, fast 3 Monate zuvor untersuchte Probe hatte lediglich eine nachweisbare VCA-IgG-Reaktivität im ELISA bei negativen Immunoblots. Die Verlaufskontrolle 14 Tage später konnte eine Serokonversion nachweisen. Der Infektionszeitpunkt lag daher offensichtlich ca. 3 Monate zurück. Dieser Fall lässt vermuten, dass auch mit dem Virotech-Blot durch eine überwiegende VCA p18-IgG-Antwort bei den VCA-IgG-Antikörpern bei positivem IgM-Ergebnis eine frische EBV-Infektion ausgeschlossen und eine abgelaufene Infektion angenommen werden kann.

Diskrepanzen: Serostatus „unklar“

Betrachtet wurden zunächst 25 Seren, welche mit den Virotech-Testen in der Studie die Bewertung „unklar“ erhielten. 8 von den 25 Seren wurden jeweils mit beiden kommerziellen Immunoblots der gleichen Gruppe des Serostatus „unklar“ zugeordnet (siehe Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2: Übersicht zu den Ergebnissen des ELISA-Suchprofils (DiaSorin) und der beiden kommerziellen EBV-Immunooblots mit Angabe der relativen Scanintensitäten von 8 Seren, welche jeweils dem Serostatus „unklar“ zugeordnet wurden.

Proben Nr.	Alter in Jahren	Vorbefund	Kontrollbefund	VCA-IgG (< 20 AU/ml)	VCA-IgM (< 20 AU/ml)	EA-IgG (< 20 AU/ml)	EBNA1-IgG (< 20 AU/ml)	Firma	IgG-Blot	EBNA1-IgG	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgG	EBNA1-IgG	VCA gp125-IgG	VCA p18-IgG	EA-IgG	IgM-Blot	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgM	VCA gp125-IgM	VCA p18-IgM	EA-IgM	Gruppe
10	3			neg	neg	52	neg	Viramed	neg			39	45	0	0	fraglich	125=18		60	69	0		14
								Virotech	neg			0	30	0	20	pos	125>18		152	85	57		
53	15		x	neg	46	53	neg	Viramed	neg			0	49	0	35	pos	125	pos	129	41	61		14
								Virotech	neg			0	0	0	0	pos	125>18	pos	184	136	360		
103	20			neg	72	21	neg	Viramed	neg			0	21	29	44	pos	18		21	91	21		14
								Virotech	neg			0	78	0	0	pos	18		68	163	0		
121	18	x	x	136	neg	76	neg	Viramed	pos	125=18	pos	0	291	302	147	neg			0	0	0		16
								Virotech	pos	125=18	pos	0	155	140	80	neg			20	20	0		
122	29	x	x	neg	26	32	neg	Viramed	pos	18	pos	0	35	174	243	pos	18		0	125	0		14
								Virotech	neg			0	40	0	60	pos	18>125		86	209	50		
128	25			110	neg	neg	neg	Viramed	pos	125>18		0	216	142	24	neg			0	27	23		16
								Virotech	pos	125>18		0	405	150	20	neg		pos	0	40	245		
135	11			38	neg	neg	neg	Viramed	pos	125>18		0	266	228	0	neg			0	18	18		16
								Virotech	pos	125>18		0	365	160	0	neg			0	0	54		
138	29			83	neg	neg	neg	Viramed	pos	125>18		0	343	305	0	neg			0	39	0		16
								Virotech	pos	125>18		0	505	395	0	neg			0	45	0		

Bei den Proben 10, 53, 103 und 122 bestand jeweils der Verdacht auf eine frische EBV-Infektion bzw. diese war nicht auszuschließen (Gruppe 14). Im Fall 10 eines 3-jährigen Patienten und Fall 53 eines 15-jährigen Jungen waren jeweils die IgG-Immunooblots beider Hersteller negativ. Im IgM-Test waren deutlich VCA gp125-Antikörper und bis auf den Viramed-Blot bei Probe 53 auch VCA p18-IgM-Antikörper nachweisbar. Das ELISA-Testprofil (DiaSorin) erbrachte bei beiden Proben einen niedrigtitrigen EA-D-IgG-Nachweis, sowie im Serum 53 auch zusätzlich VCA-IgM-Antikörper auf niedrigem Titerniveau. Im Fall 53 erhärtete eine Lymphozytose von 67% der Gesamtleukozyten und eine Verdopplung der Transaminasen den Verdacht einer Primärinfektion. 3 Wochen später konnte die frische Infektion durch den Nachweis der IgG-Serokonversion im ELISA (DiaSorin) bestätigt werden. Nach weiteren 4 Monaten konnten im Verlauf EBNA1-IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

Die Proben 103 und 122 waren nicht so eindeutig. Im Fall 103 waren die IgG-Nachweise sowohl im Viramed- als auch im Virotech-Test negativ. In den IgM-Blots waren jeweils nur VCA p18-Antikörper nachweisbar. Das ELISA-Profil zeigte mitteltitrixe VCA-IgM- und grenzwertige EA-D-IgG-Antikörper bei gleichzeitig negativem VCA- und EBNA1-IgG-Nachweis. In den Virotech-Immunooblots waren in der IgG- als auch in der IgM-Analyse die VCA gp125-Banden knapp unter dem Cut off sichtbar, welche den Verdacht auf eine frische Infektion erhärteten. Bei Auswertung der Probe 122 lieferten die Immunooblots beider Hersteller eine unterschiedliche Performance. Es handelte sich um eine 3 Jahre junge Patientin mit einer Lymphknotenvergrößerung, die 9 Monate zuvor für EBV seronegativ getestet wurde. Die grenzwertig in den ELISA-Suchtesten nachweisbaren VCA-IgM- als

auch EA-D-IgG-Antikörper konnten bei Abwesenheit von VCA-IgG und EBNA1-IgG als ein Indiz für eine Primärinfektion gewertet werden. Der Virotech-IgG-Immunoblot war negativ und in der zugehörigen IgM-Analyse zeigte sich die VCA p18-Bande in einer stärkeren Intensität als die VCA gp125-Bande. Es bestand somit v. a. eine Primärinfektion. Anders das Bild im Vergleichstest von Viramed. In der IgM-Analyse zeigte sich hier lediglich ein VCA p18-Nachweis. Im EBV ViraStripe IgG konnten eine starke VCA p18- und eine EA-D-Bande detektiert werden. Laut Bewertungskriterien der Fa. Viramed wäre der Nachweis einer starken VCA p18-IgG-Bande bereits als Hinweis auf eine abgelaufene Infektion zu werten [161]. Ein Verlaufsserum, das hätte Klärung bringen können, wurde nicht eingesandt. Da Verlaufsuntersuchungen bei Fällen mit dieser Konstellation in der Routinediagnostik des Labors Primärinfektionen bestätigt haben, wurden die Seren mit isoliert starken VCA p18-IgG-Nachweisen (EA-D-IgG unberücksichtigt) und positivem VCA p18-IgM-Befund immer den unklaren Konstellationen zugeordnet.

4 weitere Proben (Fall 121, 128, 135, 138) wurden aufgrund der Antikörperreaktionsmuster in beiden kommerziellen Immunoblots der Gruppe 16 mit Verdacht auf eine zurückliegende Infektion zugeordnet. Das Patientenalter lag hier zwischen 11 und 29 Jahren. Alle diese Seren waren in den IgM-Testen negativ. 3 Proben hatten in beiden IgG-Immunoblots ein positives Testergebnis mit Überwiegen der VCA gp125-Antwort bei den VCA-Antikörpern. In einem Fall waren die Banden der VCA p18- und VCA gp125-IgG-Antikörper gleich stark. In den ELISA-Suchtesten fanden sich grenzwertige bis mitteltitrige VCA-IgG-Antikörper. EBNA1-IgG- und VCA-IgM-Antikörper waren nicht reaktiv. Bei Probe 121 konnten zusätzlich mitteltitrig EA-D-IgG-Antikörper detektiert werden. Die Probe 128 wurde nach 6 Monaten nochmals im EBV ViraStripe (Viramed) untersucht. EBNA1-IgG-Antikörper konnten erneut nicht nachgewiesen werden. Dafür gab es einen Switch beim Bandenverhältnis der VCA-IgG-Antikörper zueinander. Es lag nun ein Überwiegen der VCA p18-IgG-Antwort vor, welche man gewöhnlich bei länger zurückliegenden Infektionen findet. Zu dem Serum 121 der Studie gab es im LIS einen Monat zuvor bereits eine Voruntersuchung auf EBV mit fast identischen Titern in den Suchtesten der VCA- und EA-D-IgG-Antikörper. EBNA1-IgG- und VCA-IgM-Antikörper waren negativ. Passend zu den gleich starken Banden der VCA-IgG-Antikörper (VCA gp125 = VCA p18) lag die Infektion aufgrund des Vorbefundes mindestens einige Wochen zurück. Nach mehr als 7 Monaten wurde nochmals ein Kontrollserum von der 18-jährigen Patientin eingesandt, in dem EBNA1-IgG-Antikörper im EBV ViraStripe (Viramed) nachgewiesen werden konnten.

7 von den 25 Seren, die mittels Virotech-Test zunächst als unklar eingruppiert wurden, konnten mit dem Viramed-Test nach dem festgelegten Interpretationsschema klar den frischen Infektionen zugeordnet werden (siehe Tabelle 7.3). Die differenzierte Betrachtung

zeigte, dass die Einteilung in die Gruppe 14 mit Verdacht auf eine frische Infektion der Proben 6, 43, 50 und 107 aufgrund der Virotechbewertung sich von der Viramedbeurteilung (Gruppe 1) lediglich aufgrund des IgG-Nachweises unterschied. Der IgG-Immunoblot der Fa. Virotech fiel bei allen 4 Proben negativ aus, während im Viramed-Test bereits VCA gp125-IgG oder im Fall 107 zumindest EA-D-IgG detektiert wurde und damit ein unspezifischer oder kreuzreagierender IgM-Nachweis ausgeschlossen werden konnte. Die IgM-Immunoblots waren bei beiden Herstellern deutlich positiv. Es wurden in allen 4 Proben VCA gp125-IgM-Antikörper entweder isoliert oder in Kombination mit VCA p18-IgM- und oder EA-D-IgM-Antikörpern nachgewiesen. Im Fall 6 konnte der Verdacht auf eine Primärinfektion durch eine Lymphozytose von 59% der Gesamtleukozyten und eine deutliche Transaminasenerhöhung gestützt werden. In einer Verlaufskontrolle nach 2 Wochen bestätigte sich bei Probe 107 die frische EBV-Infektion durch den Nachweis der IgG- und IgM-Serokonversion in den ELISA-Testen. In der Vorprobe war in den Suchtesten lediglich eine EA-D-IgG-Reaktivität aufgezeigt worden.

Im Fall 51 eines 11-jährigen Patienten zeigten die Viramed-Teste mit Reaktivität gegen VCA gp125 und EA-D (Frühmarker) im IgG- als auch im IgM-Immunoblot eindeutig das Bild einer frischen EBV-Infektion. Die ELISA-Suchteste ergaben negative Resultate für VCA-IgG/IgM und EBNA1-IgG. Lediglich der Nachweis von EA-D-IgG im Screeningtest, welcher häufig in Diagnostikablaufschemen nicht mehr als Suchtest empfohlen wird, wies auf eine mögliche Primärinfektion hin. Während der EBV IgM Line Immunoblot der Fa. Virotech mit deutlichen Banden gegen VCA gp125, VCA p18 und auch EA-D bei Probe 51 das Bild einer Primärinfektion zeigte, erbrachte der zugehörige IgG-Test ein unklares Bild. In der IgG-Analyse fand sich zusätzlich zu den Frühmarkern VCA gp125- und EA-D-IgG eine EBNA1-IgG-Bande, die mit einer Intensität eindeutig über dem Cut off als positiv zu bewerten war. Laut Arbeitsanleitung des EBV IgG Line Immunoblot der Fa. Virotech, gilt der Nachweis von EBNA1-IgG als zentraler Marker für eine abgelaufene Infektion [150], dadurch könnte hier fälschlicherweise eine zurückliegende Infektion angenommen werden. Im Rahmen der Studie wurden Seren mit EBNA1-IgG-Reaktivität im Immunoblot, aber sonst typischer Bandenkonstellation einer frischen EBV-Infektion, immer den unklaren Seren zugeordnet. Hier müsste in der Praxis bei nicht eindeutiger Klinik die Untersuchung der Titerkinetik in einer Verlaufskontrolle den Verdacht bestätigen.

Das Serum 238 einer 34-jährigen Patientin bereitete ähnliche Probleme. Im ELISA-Testprofil wurden niedrigtitrig VCA-IgM und VCA-IgG, sowie höhertitrig EA-D-IgG und oberhalb der Messgrenze EBNA1-IgG nachgewiesen. Der durchgeführte Test auf heterophile Antikörper ergab einen positiven Befund. Deutlich erhöhte Werte wiesen auch die Transaminasen und die Laktat-Dehydrogenase auf. Mittels EBV ViraStripe der

Fa. Viramed zeigte sich sowohl in der IgG-Analyse mit Nachweis der Frühmarker VCA gp125-IgG und EA-D-IgG, als auch im IgM-Test durch den Nachweis beider VCA-Antikörper, das klassische Bild einer EBV-Primärinfektion. In den Virotech-Blots wurde zusätzlich zu den eben genannten Banden eine starke EBNA1-IgG-Bande detektiert. Eine CMV-Primärinfektion konnte durch Nachweis hochtitriger IgG-Antikörper bei negativem IgM-Befund ausgeschlossen werden. In Zusammenschau der Befunde ist bei Probe 238 eine atypisch frühe Mitreaktion der EBNA1-IgG-Antikörper sowohl im ELISA (DiaSorin) als auch im IgG-Immunoblot der Fa. Virotech bei EBV-Primärinfektion zu vermuten.

Im Fall 57 einer 14-jährigen Patientin mit Transaminasenerhöhung, einer Lymphozytose von 72% der Gesamtleukozyten und einer erhöhten Laktat-Dehydrogenase fanden sich in den ELISA-Suchtesten hochtitrig VCA-IgM, höhertitrig VCA-IgG und in mittlerer Titerhöhe EA-D-IgG bei negativem EBNA1-IgG-Test. In beiden kommerziellen Immunoblots ließen sich in der IgM-Analyse positive Banden gegen VCA p18 und EA-D feststellen. In den IgG-Testen zeigten sich Reaktivitäten gegen VCA p18, VCA gp125 und EA-D. Im EBV ViraStripe IgG lag ein Überwiegen der VCA gp125- gegenüber VCA p18-Antwort vor. Das Serum wurde daher zum Serostatus „frisch“ in die Gruppe 4 eingeordnet. Das Virotech-Ergebnis mit stärkerer VCA p18-IgG-Reaktivität gegenüber dem VCA gp125-IgG und oben genanntem IgM-Befund gehörte zu den seltenen Konstellationen, für die in der Studie keine extra Einteilung in eine Serogruppe vorgenommen wurde. Da der IgM-Befund deutlich positiv ausfiel, musste nach den Interpretationskriterien der Fa. Virotech auch mit diesem Test der Verdacht auf eine Primärinfektion ausgesprochen werden [150], auch wenn hier eine stärkere VCA p18-IgG-Bande einen möglicherweise bereits etwas zurückliegenden Zeitpunkt vermuten lassen könnte. Eine Kontrolluntersuchung wurde nicht eingeschickt.

Bei der Probe 82 zeigten beide kommerzielle Immunoblots ein fast einheitliches Bild einer vermutlich kürzlichen EBV-Primärinfektion mit schon schwachem EBNA1-IgG-Nachweis. Im Viramed-IgG-Test waren die VCA-IgG-Banden gleich stark, sodass eine Zuordnung zur Serogruppe 12 erfolgte. Im Virotech-IgG-Test lag ein Überwiegen der VCA gp125-Reaktivität vor, während im IgM-Test die Intensität der VCA p18-Bande größer als die gegen VCA gp125 war. Diese Konstellation trat selten auf, sodass in der Studie keine Einteilung in eine separate Serogruppe erfolgte. Der schwache EBNA1-IgG-Nachweis in Kombination mit VCA p18-IgG lässt hier am ehesten einen erst kürzlich zurückliegenden Infektionszeitpunkt vermuten. Insgesamt reagierten beide Teste in diesem Fall ähnlich.

Die Probe 155 wurde zwar mit dem Interpretationsschema der Studie mittels der Virotech-Teste zunächst zu der Serogruppe 15 zugeordnet, in welcher aufgrund der überwiegen- den VCA gp125-IgG-Antwort bei im IgM-Immunoblot auch typischer Konstellation einer

frischen Infektion, eine atypisch frühe EBNA1-IgG-Reaktivität nicht ausgeschlossen schien. In dem ELISA- und CLIA-Testprofil zeigten sich lediglich eine positive Reaktivität der VCA-IgG-Antikörper als auch ein grenzwertiges EBNA1-IgG-Ergebnis. Da im für die IgM-Analyse sehr sensitiv eingestellten CLIA kein VCA-IgM-Nachweis erfolgte und die Intensitäten der EBNA1- als auch der VCA-Antikörper im IgG-Test sehr stark waren, würde dieses Serum mittels Virotech-Immunoblot eher als kürzlich zurückliegende Infektion, wie auch mit dem Viramed-Test erfolgt, eingeordnet werden.

Tabelle 7.3: Übersicht zu den Ergebnissen des ELISA-Suchprofils (DiaSorin) und der beiden kommerziellen EBV-Immunoblots mit Angabe der relativen Scanintensitäten von 11 Seren, welche nur mit dem EBV IgG/IgM Line Immunoblot (Virotech) dem Serostatus „unklar“ zugeordnet wurden.

Proben Nr.	Alter in Jahren	Vorbefund	Kontrollbefund	VCA-IgG (< 20 AU/ml)	VCA-IgM (< 20 AU/ml)	EA-IgG (< 20 AU/ml)	EBNA1-IgG (< 20 AU/ml)	Firma	IgG-Blot	EBNA1-IgG	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgG	EBNA1-IgG	VCA gp125-IgG	VCA p18-IgG	EA-IgG	IgM-Blot	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgM	VCA gp125-IgM	VCA p18-IgM	EA-IgM	Gruppe
6	16			neg	64	72	neg	Viramed	pos	125	pos	0	151	0	77	pos	125>18	pos	160	121	65	1	
								Virotech	neg			0	0	0	0	pos	125>18	pos	152	109	195	14	
39	21			35	25	86	52	Viramed	pos	125=18	pos	0	158	113	163	pos	125>18	pos	221	68	148	10	
								Virotech	pos	pos	125	pos	316	112	20	254	pos	125>18	pos	635	370	647	15
43	16			24	neg	21	neg	Viramed	fraglich	125		24	60	0	0	pos	125	pos	316	46	116	1	
								Virotech	neg			0	20	0	0	pos	125	pos	416	0	208	14	
50	18			neg	neg	50	neg	Viramed	pos	125		21	97	0	25	pos	125		103	37	25	1	
								Virotech	neg			0	20	0	0	pos	18>125	pos	132	156	112	14	
51	11			neg	neg	88	neg	Viramed	pos	125	pos	35	172	0	159	pos	125	pos	137	45	86	1	
								Virotech	pos	pos	125	pos	131	168	0	236	pos	125=18	pos	100	116	128	15
57	14			152	>140	77	neg	Viramed	pos	125>18	pos	31	162	129	107	pos	18	pos	0	179	60	4	
								Virotech	pos	pos	18>125	pos	0	157	347	605	pos	18	pos	36	504	492	ohne
82	29			135	132	86	37	Viramed	pos	pos	125=18	pos	109	325	312	209	pos	18>125	pos	138	169	105	12
								Virotech	pos	pos	125>18	pos	100	320	160	440	pos	18>125	pos	330	510	760	ohne
107	21		x	neg	neg	57	neg	Viramed	pos		pos	0	39	0	85	pos	125>18	pos	152	82	67	1	
								Virotech	neg			0	0	0	0	pos	125		395	36	45	14	
155	8			77	neg	neg	33	Viramed	pos	pos	125=18		468	453	434	34	pos	125		140	32	36	12
								Virotech	pos	pos	125>18		531	681	512	0	pos	125	pos	100	20	100	15
238	34			26	43	107	>200	Viramed	pos		125	pos	0	567	0	343	pos	125>18		292	177	54	1
								Virotech	pos	pos	125	pos	452	257	0	338	pos	125=18	pos	155	168	71	15
243	42			neg	neg	neg	neg	Viramed	neg			0	0	0	22	neg			0	0	0	9	
								Virotech	pos	pos			177	0	0	0	neg			0	0	0	17

Das Serum 243 eines 42-jährigen Patienten wurde im EBV ViraStripe IgG und -IgM negativ für EBV getestet. Das ELISA-Suchprofil ergab für alle 4 getesteten Antikörper ein negatives Ergebnis. Während der EBV Line Immunoblot von der Fa. Virotech für die IgM-Analyse ebenfalls negativ ausfiel, färbte sich im zugehörigen IgG-Test eine starke EBNA1-IgG-Bande an. Da die VCA-Antikörper der Klasse IgG als Durchseuchungsmarker nicht nachweisbar waren, lag in Zusammenschau aller Befunde eine unspezifische EBNA1-IgG-Reaktivität im Virotech-Test nahe.

6 Seren (Nr. 127, 137, 146, 156, 239 und 270), die mit den Viramed-Testen als „zurückliegend“ eingeordnet und mit dem Vergleichstest zunächst als „unklar“, wurden bereits im vorherigen Abschnitt der Diskrepanzen des Serostatus „zurückliegend“ beschrieben (sie-

he Tabelle 7.1, Seite 109).

Weiter erfolgte die differenzierte Betrachtung der 21 Seren, welche mit dem EBV Vira-Stripe IgG/IgM (Viramed) zunächst in den Serostatus „unklar“ eingeordnet wurden (siehe Tabelle 7.4). Die 8 Fälle, welche in beiden kommerziellen Testen den Serostatus „unklar“ erhielten, sind bereits zuvor ausführlich besprochen worden (siehe Tabelle 7.2).

3 Seren (Nr. 104, 134, 136) erhielten im Gegensatz zum negativen Ergebnis mittels der Virotech-Teste eine unklare Bewertung im Vergleichstest von Viramed. Die Seren Nr. 104 und Nr. 134 wiesen im Vergleich zu den negativen Virotech-Testen, lediglich eine EA-D-Bande im IgG-Immunoblot der Fa. Viramed auf. Passend dazu fand sich jeweils ein grenzwertiger EA-D-Nachweis im Suchtest. Bei fehlendem Nachweis von VCA-Antikörpern war eine unspezifische Reaktivität nicht auszuschließen. Im Fall 136 wurde lediglich eine fragliche VCA p18-IgM-Bande in der Viramed-Analyse bei auch reaktivem VCA-IgM im ELISA detektiert. Zu diesem Serum gab es im LIS einen Monat zuvor einen Vorbefund mit ebenfalls isoliertem IgM-Nachweis. Es handelte sich hier um eine unspezifische Reaktion.

Tabelle 7.4: Übersicht zu den Ergebnissen des ELISA-Suchprofils (DiaSorin) und der beiden kommerziellen EBV-Immunoblots mit Angabe der relativen Scanintensitäten von 13 Seren, welche nur mit dem EBV ViraStripe IgG/IgM (Viramed) dem Serostatus „unklar“ zugeordnet wurden.

Proben Nr.	Alter in Jahren	Vorbefund	Kontrollbefund	VCA-IgG (< 20 AU/ml)	VCA-IgM (< 20 AU/ml)	EA-IgG (< 20 AU/ml)	EBNA-IgG (< 20 AU/ml)	Firma	IgG-Blot	EBNA1-IgG	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgG	EBNA1-IgG	VCA gp125-IgG	VCA p18-IgG	EA-IgG	IgM-Blot	VCA gp125 : VCA p18	EA-IgM	VCA gp125-IgM	VCA p18-IgM	EA-IgM	Gruppe	
29	16			111	81	117	neg	Viramed	pos	pos	125	pos	70	331	48	187	pos	125=18	pos	200	177	67	15	
								Virotech	pos	pos	125	pos	0	275	0	387	pos	125=18	pos	391	466	408	1	
31	10			68	69	105	neg	Viramed	pos	pos	125	pos	308	217	0	111	pos	125>18	pos	209	90	142	15	
								Virotech	pos	pos	125	pos	0	125	0	366	pos	125>18	pos	488	376	429	1	
41	14			29	51	73	neg	Viramed	pos	pos	125	pos	76	325	17	80	pos	125>18	pos	283	72	97	15	
								Virotech	pos	pos	125	pos	0	594	0	463	pos	125=18	pos	364	312	308	1	
46	13	x		>170	102	82	neg	Viramed	pos	pos	125>18	pos	82	335	210	202	pos	125=18	pos	144	165	41	15	
								Virotech	pos	pos	125>18	pos	0	352	289	168	pos	18>125	pos	232	456	452	4	
49	17			139	82	94	neg	Viramed	pos	pos	125>18	pos	91	252	186	267	pos	125>18	pos	171	65	28	15	
								Virotech	pos	pos	18>125	pos	0	226	368	605	pos	125=18	pos	200	240	312	11	
56	7			107	20	49	neg	Viramed	pos	pos	125	pos	0	255	0	81	neg		pos	0	41	0	14	
								Virotech	pos	pos	125	pos	0	289	0	273	pos	18	pos	20	228	144	2	
70	29		x	90	320	87	neg	Viramed	pos	pos	18>125	pos	0	95	130	276	pos	18	pos	38	228	57	ohne	
								Virotech	pos	pos	125	pos	0	100	40	80	pos	18	pos	20	384	416	2	
89	17		x	neg	35	53	neg	Viramed	neg				0	30	26	52	pos	125>18	pos	279	93	62	14	
								Virotech	pos	pos		pos	0	0	0	330	pos	125>18	pos	650	130	660	1	
101	15			50	neg	84	neg	Viramed	pos	pos	125	pos	102	261	0	36	pos	125>18	pos	171	63	0	15	
								Virotech	pos	pos	125	pos	0	336	0	168	pos	18>125	pos	80	395	395	2	
104	19			15	neg	27	neg	Viramed	fraglich			pos	17	0	0	78	neg		pos	0	0	0	14	
								Virotech	neg				0	0	0	0	neg		pos	0	0	0	9	
131	22			34	68	neg	neg	Viramed	pos	pos	125		148	406	41	48	pos	125>18		242	195	50	15	
								Virotech	pos	pos	125		0	345	0	0	pos	18>125		313	404	0	2	
134	20			neg	neg	25	neg	Viramed	pos			pos	0	0	30	141	neg		pos	0	0	18	14	
								Virotech	neg				0	0	0	0	neg		pos	0	0	181	9	
136	1		x	neg	30	neg	neg	Viramed	neg				0	0	0	14	fraglich	18		0	77	0	14	
								Virotech	neg				0	0	0	0	neg		pos	40	54	0	9	

Der Fall 49 wurde aufgrund des festgelegten Interpretationsschemas anhand der Virotech-Ergebnisse der Serogruppe 11 einer kürzlichen bzw. kürzlich zurückliegenden Infektion zugeteilt. Es zeigte sich in diesem Test eine EBNA1-IgG-negative Probe mit deut-

lichen Banden gegen VCA p18, VCA gp125 und EA-D im IgG- und IgM-Immunoblot. In der IgG-Analyse überwog die VCA p18-Reaktivität gegenüber der von VCA gp125, sodass man den Eindruck erhielt, die Infektion ist nicht im ganz frühen Stadium erfasst worden. Laut Interpretationskriterien der Fa. Virotech soll VCA p18-IgG nicht als Spätmarker bewertet werden, wenn in der IgM-Analyse der Hinweis auf eine Primärinfektion besteht [150]. In den Screeningtesten der Routinediagnostik ließen sich bei dem 17-jährigen Patienten höhertitrig VCA-IgM, VCA-IgG und EA-D-IgG bei negativem Ergebnis für EBNA1-IgG nachweisen. Im Vergleichstest von Viramed fand sich in der IgG-Analyse neben starken Banden der VCA-Antikörper mit Überwiegen der VCA gp125-Antwort, einer starken EA-D-Bande auch eine schwache, aber über dem Cut off liegende EBNA1-Bande. Im IgM-Blot zeigte sich in diesem Test das Bild einer Primärinfektion. Die Gebrauchsanweisung des Viramed-Testes weist bei einer schwachen EBNA1-IgG-Bande darauf hin, dass eine zusätzliche starke VCA p18-IgG-Bande auf eine abgelaufene Infektion hinweist, in Kombination mit VCA gp125-IgM jedoch eine Primärinfektion wahrscheinlich ist [161]. In diesem Fall war beides vorhanden, sodass eine sichere Zuordnung nicht erfolgte. Eine Verlaufskontrolle, die hätte Klärung bringen können, wurde nicht eingesandt. Vermutlich handelte es sich um eine nicht mehr ganz frische Primärinfektion.

9 Proben (Nr. 29, 31, 41, 46, 56, 70, 89, 101, 131), die mit den EBV Line-Immunoblots von Virotech klar dem Serostatus „frisch“ zugeordnet werden konnten, wurden im Einzelnen betrachtet. Auffällig war hier der hohe Anteil von 6 Seren mit dem Verdacht auf ein atypisch früh nachweisbares EBNA1-IgG bei frischer EBV-Infektion in der Viramed-IgG-Analyse. Wie zuvor beschrieben, gibt es in der Testanleitung der Fa. Viramed lediglich gesonderte Auswertekriterien für schwache EBNA1-IgG-Banden. Die Seren 29, 41, 46 und 101 stammten von Patienten im Alter zwischen 13 und 16 Jahren. Alle Patienten konnten mit den Immunoblots der Fa. Virotech aufgrund des Nachweises des Frühmarkers VCA gp125 im IgG-Test und deutlich positivem IgM-Befund (VCA gp125 und VCA p18) als frische EBV-Infektion befundet werden. Zusätzliche EA-D-Nachweise werden an dieser Stelle nicht beschrieben, da sie in den vorliegenden Fällen nicht weiter ausschlaggebend zur Befundeinordnung waren. In allen 4 Proben wurden zu den zuvor beschriebenen Banden mit dem EBV ViraStripe IgG zusätzlich schwache EBNA1-Banden detektiert. Da in keinem Fall VCA p18-IgG nachweisbar war, wurden diese Proben der Gruppe 15 mit Verdacht auf atypisch frühem EBNA1-Nachweis bei EBV-Primärinfektion zugordnet. Im ELISA-Testprofil (DiaSorin) fand sich kein reaktives Ergebnis für EBNA1-IgG, während die Konstellationen der übrigen Suchteste jeweils mit einer Primärinfektion vereinbar waren. Bei den Seren 41 und 29 waren die Transaminasen erhöht. Eine Lymphozytose von 63% der Gesamtleukozyten konnte in Probe 41 als zusätzlicher Hinweis auf eine Primärinfektion dienen. Zum Fall 46 sind 3 Verlaufskontrollen ins Labor einge-

sandt worden. Nach 3 Wochen war eine rückläufige Tendenz der VCA-IgM- und EA-D-IgG-Antikörper in den ELISA-Testen zu erkennen, EBNA1-IgG wurde noch nicht nachgewiesen. Knappe 2 Monate nach der Erstuntersuchung waren dann erstmals schwach EBNA1-IgG-Antikörper im Suchtest als Bestätigung einer kürzlich zurückliegenden Primärinfektion nachweisbar. Fast 3 Jahre später wurde nochmals ein Serum für eine EBV-Untersuchung eingeschickt, der EBNA1-IgG-Antikörper-Titer lag nun oberhalb des Messbereiches. In 2 weiteren Proben (Nr. 31 und 131) wurden mit den EBV IgG/IgM Line Immunoblots (Virotech) klassische Antikörperreaktionsmuster einer frischen EBV-Infektion detektiert. In der IgM-Analyse fanden sich starke Banden beider VCA-Antikörper und in Probe 31 auch zusätzlich EA-D-IgM. Im IgG-Immunoblot wurde in diesem Test jeweils nur der Frühmarker VCA gp125-IgG und im Fall 31 auch EA-D-IgG nachgewiesen. In den Analysen der Viramed-Teste wurden zusätzlich zu den genannten Banden in der Probe 31 eine sehr starke EBNA1-IgG-Bande (3-fach über Cut off) und im Serum 131 eine starke Reaktivität gegen EBNA1-IgG im EBV ViraStripe IgG (Viramed) sichtbar. Im Serum 131 waren die Transaminasen deutlich erhöht. Die Ergebnisse dieser beider Seren zeigten, dass trotz Nachweises einer starken EBNA1-IgG-Bande im EBV ViraStripe IgG Primärinfektionen vorliegen können.

Die Probe 89 reagierte in beiden kommerziellen Testen ähnlich. Es handelte sich hier um den Nachweis einer Serokonversion einer 10 Tage zuvor noch seronegativen Probe. Der EBV ViraStripe IgG wurde mit negativ bewertet, weil sich lediglich dezente Banden weit unter dem Cut off anfärbten. Die IgM-Analyse war in beiden kommerziellen Immunoblots mit Nachweis von 3 Banden deutlich reaktiv. Mittels Virotech-IgG-Immunoblot konnte bereits EA-D-IgG detektiert werden, sodass eine Zuordnung zum Serostatus „frisch“ in Gruppe 1 erfolgte. Bei isoliert positivem IgM-Blot der Fa. Viramed bestand auch hier der Verdacht auf eine Primärinfektion (Gruppe 14). Bei der Probe 56 einer 7-jährigen Patientin waren in beiden kommerziellen IgG-Immunoblots die VCA gp125- und EA-D-Banden positiv. Der IgM-Test von Viramed erhielt eine negative Bewertung. Hingegen konnte mit dem Virotech-Test ein positiver IgM-Befund mit einer VCA p18- und einer EA-D-Reaktivität erhoben werden. Es erfolgte daraufhin die Zuordnung zum Serostatus „frisch“. Bei isolierter VCA gp125-IgG-Reaktivität im Vergleichstest von Viramed konnte lediglich der Verdacht auf eine frische Infektion ausgesprochen werden.

Die Probe 70 wurde als eine Verlaufskontrolle ins Labor gesandt. Gute 2 Monate zuvor war die 29-jährige Patientin noch seronegativ für EBV getestet. 8 Tage später kam eine erste Kontrollprobe ins Labor. Im ELISA-Suchprofil konnten grenzwertig VCA-IgG- und -IgM-Antikörper als auch hochtitrig EA-D-IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Die Transaminasen waren weit über das 10-fache der Normwerte erhöht und es lag eine

Lymphozytose von 66% der Gesamtleukozyten vor. Im EBV ViraStripe IgG fand sich eine untypische Bandenkonstellation mit VCA p18- und EA-D-IgG. Der Frühmarker VCA gp125-IgG war nicht nachweisbar. Im IgM-Befund waren beide VCA-Antikörper positiv. Das im Rahmen der Studie einen Monat später eingeschickte Kontrollserum zeigte im Viramed-Test in der IgG-Analyse ein Überwiegen der VCA p18-Antwort gegenüber VCA gp125, als auch eine positive EA-D-Bande. Im EBV ViraStripe IgM war lediglich noch VCA p18-IgM nachweisbar. In dem IgG-Line Assay von der Fa. Virotech zeigte sich in dem Serum einen Monat nach der Serokonversion noch ein Bild einer frischen Primärfektion mit einer VCA gp125- und EA-D-IgG-Bande. VCA p18-IgG war hier noch nicht nachweisbar. Im IgM-Test ergab der Nachweis einer VCA p18- und EA-D-Bande einen positiven Befund. Im ELISA-Suchprofil wurden höhertitrig VCA- und EA-D-IgG-Antikörper als auch hochtitrig VCA-IgM-Antikörper detektiert. Ungewöhnlich früh in diesem Verlauf war der VCA p18-IgG-Nachweis auf dem EBV ViraStripe bereits 8 Tage nach Nachweis einer Serokonversion.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jan Kramer für die Überlassung des spannenden Themas, die hervorragende wissenschaftliche und sehr engagierte Betreuung der Arbeit sowie für die Korrektur des Manuskripts.

Ein herzlicher Dank richtet sich an Herrn Dr. Detlef Kramer für die Möglichkeit, im LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen unter hervorragenden Rahmenbedingungen die wissenschaftlichen Untersuchungen durchführen zu können, und für sein Interesse an dem Fortgang der Arbeit. Herrn Dr. Olaf Bätz danke ich für die Unterstützung und Förderung während der Arbeit an meiner Dissertation, für seine mich voranbringenden Anregungen sowie seine Diskussionsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön gebührt Frau Dr. Bettina Becker, die mir mit ihrer großen Erfahrung auf dem Gebiet der EBV-Serologie stets beratend zur Seite stand und aufgrund ihrer Beobachtungen in der Laborroutine, maßgeblich an der Initiierung dieses Projektes beteiligt war. Bei meinem Kollegen Herrn Dr. Benno Wölk bedanke ich mich ganz herzlich für die Unterstützung in allen statistischen Fragen sowie für die angeregte und konstruktive Diskussion, die das Projekt vorangebracht hat.

Danken möchte ich den Mitarbeiterinnen der Immunoblotabteilung des LADR Zentrallabor Dr. Kramer & Kollegen und Frau Alexandra Tiedtke für ihre technische Unterstützung. Schließlich möchte ich Herrn Dr. Martin Kintrup (Fa. Viramed) und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Immunoblot-Testkits, die hilfreiche Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit danken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Frau Dr. Annelie Weichsel und Frau Ines Zacher für das zügige und sorgfältige Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit aussprechen.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Ehemann Tobias für die ständige Hilfsbereitschaft, sein Verständnis und die Geduld, die er mir bei der Fertigung dieser Arbeit entgegengebracht hat.

9 Lebenslauf

Name

Ines Pfeil



Persönliche Daten

geboren am 21.03.1969
in Boizenburg
verheiratet, 2 Kinder,
geboren 1997 und 2001

Ausbildung

1987	Abitur
1987 - 1988	Vorpraktikum im Krankenhaus Boizenburg
1988 - 1994	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
1993 - 1994	Praktisches Jahr im Diakonissen- und Krankenhaus Stift Bethlehem Ludwigslust (Innere Medizin, Chirurgie, Anästhesie und Intensivmedizin)
seit 05/2011	Promotion an der Universität zu Lübeck

Beruflicher Werdegang

1994 - 1996	Ärztin im Praktikum im Diakonissen- und Krankenhaus Stift Bethlehem Ludwigslust (Innere Medizin)
1996 - 1997	Assistenzärztin im Diakonissen- und Krankenhaus Stift Bethlehem Ludwigslust in den Abteilungen Innere Medizin, Chirurgie, Pädiatrie und Anästhesie/Intensiv- medizin
1999 - 2000	Assistenzärztin im Integrativen Gesundheitszentrum Boizenburg GmbH (Innere Medizin)
2003 - 2011	Assistenzärztin im LADR GmbH MVZ Dr. Kramer & Kollegen in Geesthacht
seit 04/2011	Fachärztin für Laboratoriumsmedizin im LADR GmbH MVZ Dr. Kramer & Kollegen in Geesthacht (Bereich der Infektiologie und Mutterschaftsvorsorge)

Zusätzliche Qualifikationen

28.11.1998	Fachkunde Ultraschalldiagnostik: Abdomen, Retroperi- toneum (einschl. Nieren), Schilddrüse
13.04.2000	Fachkunde Rettungsdienst