

Immunologische Diagnostik der Zytomegalievirus (CMV)-Infektion*

H. W. Doerr, T. Holtz, Marlene Fraunhofer, R. Braun

Universitätskliniken Frankfurt und Heidelberg, Abteilung für Med. Virologie (im Zentrum der Hygiene)

Zusammenfassung:

Die Zytomegalie ist eine meist lebenslänglich latent bleibende vertikale und horizontale Herpesvirusinfektion mit gelegentlich schweren Krankheitsbildern, auch als Ursache oder Folge von Immunstörungen. Dem Virus wird ein onkogenes Potential zugeschrieben, zuletzt diskutiert bei AIDS und M. Kaposi. Für die Labordiagnose verfügen wir über die Mikroskopie (Zellkerneinschlüsse) und Elektronenmikroskopie, Nachweis der Virusinfektiosität auf Zellkulturen, DNA- und Polypeptidanalyse zur Virusstammidentifikation, direkte DNA- und Antigennachweise aus Patientenmaterial, immunhistologische Methoden (z. B. Immunperoxydase-Technik). Die Untersuchung der Immunzellen erfolgt bei der Zytomegalie quantitativ (T-Zell-Quotient) und qualitativ (Lymphozytenstimulierung, neuerdings auch mit Vollblut). Am leichtesten gelingt die Labordiagnose serologisch, d. h. über den Antikörpernachweis. Dafür sind eine Vielzahl „liquid“ und „solid phase“-Assays entwickelt worden. Am meisten haben sich heute neben der KBR (und PHA) Immunofluoreszenz und ELISA durchgesetzt, wobei einerseits unterschiedliche Antigene („early“, „late antigens“) und Antigenpräparationen (z. B. Viruskapsid, -envelope) zum Einsatz kommen, andererseits verschiedene Ig-Klassen und -Subklassen getestet werden, um die primäre und sekundäre Zytomegalie zu diagnostizieren und zu differenzieren. Speziell für den IgM-Nachweis wurden viele Testmodifikationen etabliert; Rheumafaktorinterferenz und IgG-Kompetition lassen sich am besten durch IgG-Präzipitation ausschalten. Die neuen Methoden haben nicht nur die Aufklärung vieler interessanter Krankheitsfälle, sondern auch exakte epidemiologische Studien bei Risikogruppen ermöglicht (Blutspender: 47[0], schwangere Frauen 56[13], Patienten mit Hämophilie: 69[0], nach NTPL: 90[24], nach Herz-OP: 87[1], Prostituierte: 90[1] % CMV-IgG[(IgM)-Antikörperträger].

Schlüsselwörter:

CMV-Isolierung – Antigen- und Nukleinsäurenachweis – Ig-(sub)klassen-spezifische Antikörperbestimmung – Risikogruppen sind: Schwangerschaft – Bluttransfusion – Organtransplantation – Prostituierte

Summary:

The human cytomegalovirus (HCMV), a member of the herpesvirus group, is horizontally and vertically transmitted and persists life-long as latent, sometimes reactivated infection. A disease, however, occurs preferentially only in immunocompromised hosts. The virus reveals an oncogenic potential, which has been recently discussed for AIDS and M. Kaposi. Laboratory diagnosis can be established by a variety of methods: microscopy (detection of characteristic nuclear inclusion bodies in giant cells, "cytomegalic inclusion disease"), electron microscopy, cytopathic effects in cell cultures, DNA and polypeptide analysis as a tool of virus strain identification, direct detection of DNA or antigens in patients' material, immunohistologic techniques. Immunologic methods of laboratory diagnosis comprise the investigation of T lymphocytes (ratio of helper/suppressor cells, lymphocyte stimulation by CMV antigens) and of B lymphocytes, i. e. of antibody kinetics. Serum antibodies to HCMV are determined by a lot of liquid and solid-phase assays, of which complement-fixation, indirect haemagglutination, immunofluorescence, and ELISA are most commonly applied. Those tests use various "early" and "late" antigens and differentiate between immunoglobulin classes and subclasses. Many modifications of IgM-specific antibody determination has been worked out for the diagnosis of an active CMV infection, especially dealing with techniques to avoid interference of rheumatoid factors and IgG competition, which is best accomplished by a preceding IgG precipitation or IgM solid-phase immunosorption ("μ-capture technique"). Those methods have been also successfully applied to seroepidemiologic studies in the normal population and in risk groups, which show great differences of CMV antibody incidence: Healthy blood donors reveal 47(0), pregnant women 56(13), haemophilic patients 69(0), renal transplant patients 90(24), cardiosurgery patients 87(1), prostitutes 90(1) % IgG(IgM)-specific CMV antibodies.

Keywords:

CMV isolation – detection of virus antigen and nucleic acid – Ig (sub)class-specific antibody determination – CMV risk groups are: pregnancy – blood transfusion – organ transplantation – prostitutes

* Nach einem Vortrag auf dem Symposium für Labordiagnostik, 10.-12. 5. 1984, Wiesbaden

Virus, Infektion, Krankheit

Das Zytomegalievirus (CMV) bildet gemeinsam mit dem Epstein-Barr (EBV)-, Herpes-simplex (HSV)- und dem Varizellen-Zoster-Virus (VZV) die Gruppe der humanen Herpesviren. Hervorstechende Eigenschaft dieser Viren ist ihre Fähigkeit zur „viruspartikelfreien“ Genomlatenz in den Wirtszellen mit unregelmäßiger Virusneusynthese und fakultativer Krankheitsexazerbation. Das CMV kann daneben auch in Form einer aktiven, subklinisch-chronischen Infektion mit oder ohne Virurie persistieren. Das hat seit langem (H. Ribbert, 1881) die histopathologische post-mortem-Analyse vieler epithelialer Organe ergeben (1, 2). Bei Säuglingen findet man die pathognomischen Riesenzellen (Zytomegalie) mit Zellkerneinschlußkörperchen („Eulenaugen“) besonders häufig in den Speicheldrüsen („Speicheldrüsenkrankheit“, „cytomegalic inclusion disease“) (Abb. 1). Elektronenoptisch lassen sich darin typische Herpesviruspartikel nachweisen (Abb. 2). In der virologischen Klassifikation sind die bei etwa 50 Tierspezies verbreiteten Herpesviren durch eine einheitliche morphologische Struktur gekennzeichnet. Sie besitzen eine zentrale doppelsträngige DNA (MG 150×10^6 Dalton bei CMV), eingeschlossen in ein ikosaederförmiges Kapsid mit 162 Kapsomeren. Nach außen ist das Nukleokapsid von einer lipidhaltigen Hülle (Envelope) umgeben. Das komplette infektionstüchtige Virion mißt 150–180 nm im Durchmesser. Von der infizierten Zelle kann ein Vielfaches (ca. $\times 10^3$) inkompletter Viruspartikel freigesetzt werden. Das CMV wurde erstmals 1956/57 aus Patientenmaterialien isoliert (3–5). Herpesvirusbefall mit CMV-analoger Infekthistologie und ähnlicher Molekularbiologie hat man auch bei Meerschweinchen, verschiedenen Nagetieren und bei Affen entdeckt. Heute weiß man, daß die „Zytomegalie“viren der einzelnen Tierspezies große Unterschiede und eine strenge Artsspezifität zeigen (6). Die humane Zytomegalie ist eine meist subklinisch erworbene und lebenslang latent bleibende, vertikale und horizontale Virusinfektion. Gelegentlich kann sie jedoch schwere Krankheitsbilder, z.T. als Ursache oder Folge von Immunstörungen, verursachen. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten CMV-bedingten Krankheiten und Schädigungen, die beginnend mit der Embryonalzeit, praktisch jedes Lebensalter und viele Organe betreffen. Primärinfektionen gelten als gefährlicher als Rezidive (7). Dem CMV wird auch ein onkogenes Potential zugeschrieben, zuletzt diskutiert bei AIDS und M. Kaposi (8, 9).



Abb. 1: Histologisches Präparat aus der Ohrspeicheldrüse eines 10 Monate alten Knaben mit Fallotscher Tetralogie (Vergrößerung 1:960). Typische Riesenzellen mit intranukleären Einschlüssen („Eulenaugen“) (1)

Tab. 1: Differentialdiagnose der Zytomegalie

- Infektiöse Mononukleose (Blutbildstörungen, LK+, Hepatopathie, Splenomegalie), oft schwierig von der EBV-Mononukleose (M. Pfeiffer) abzutrennen, jedoch ohne heterophile Ak, seltener mit Angina; z.T. isoliertes Auftreten der Symptome
- ZNS- und PNS-Befall (Meningitis, Enzephalitis, Guillain-Barré-Syndrom, Polyneuritis), Chorioretinitis
- kardialer (Myokarditis), pulmonaler (Pneumonie), gastrointestinaler (Magenulkus, ulceröse Colitis), exokriner und endokriner Befall; meist symptomfrei
- Befall der Niere und des Knochenmarkes (CMV-Übertragung durch Transplantat, Abstoßungskrise)
- akutes und länger anhaltendes Fieber (Sepsisbild)
- Fetopathien

Tab. 2: Prinzipielle Möglichkeiten der Virus-Laboridiagnostik

1. Virusnachweis
 - a) Virusisolierung in Zellkultur
 - b) Mikroskopische Untersuchung (Einschlußkörperchen) und Elektronenmikroskopie
 - c) Antigen-spezifische Immunoassays
 - d) Nachweis viraler DNA und RNA
2. Analyse der Immunantwort auf Virusinfektion
 - a) Humorale Immunantwort
 - b) Zelluläre Immunantwort
 - c) Unspezifisch: Interferon und durch Interferon induzierte Enzyme

Labordiagnose: Erregernachweis

Die Diagnose einer CMV-Infektion stützt sich heute wie bei fast allen Viruskrankheiten in erster Linie auf die Ergebnisse von Laboratoriumsuntersuchungen (10). Generell stehen die in Tab. 2 genannten Möglichkeiten zur Verfügung. Die bereits vorgestellte histologische bzw. zytologische Examinierung von Patientenmaterial war bis 1956 die einzige Nachweismethode der Krankheit, ist heute jedoch fast nur noch auf die post-mortem-Diagnostik in der Pathologie beschränkt. Eine erhebliche Ausweitung und Verbesserung brachte die Elektronenmikroskopie, mit der ohne weiteres die Gruppendiagnose „Herpesvirus“ möglich ist (1, 2).

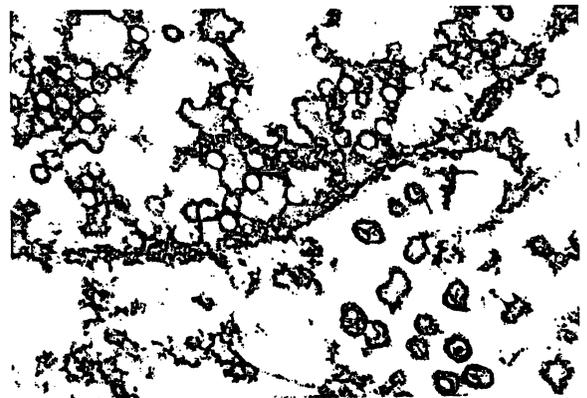


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnittes aus Abb. 1 (Vergrößerung ca. 1:38000). Kernareal links oben mit CMV-Nukleokapsiden (1)

Der Infektionsversuch zeigt sehr gute Resultate bei der Verwendung von Zellkulturen aus humanen Fibroblasten. Bei den meisten anderen bisher etablierten Zelllinien erzeugt das CMV keinen für die einfache Routinediagnostik notwendigen zytopathischen Effekt. Da die Infektiosität des CMV nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, ist für das Isolierungsergebnis eine ausreichende Konservierung (bei 4°C) oder ein schneller Transport des Untersuchungsmateriales für die sofortige Inokulation auf die Zellkultur entscheidend. Für längere Lagerungszeiten sind Temperaturen unter -60°C erforderlich. Das Ergebnis des Isolierungsversuches ist abhängig von der Immunlage und dem Alter des Patienten. Während er bei infizierten Neugeborenen aus Urinproben leicht gelingt, weisen ältere Personen (über 35 J.) nur noch selten eine Virurie auf. Das CMV läßt sich auch aus Speichel, Sperma und Cervikalabstrichen, weiterhin aus frischen, leukozytenhaltigen Blutproben (Transfusionszytomegalie) (10a) anzüchten.

Zur weiteren Charakterisierung des in Zellkultur befindlichen Virus setzt man neben serologischen auch molekularbiologische Methoden ein. Die gelelektrophoretische Auftrennung der mit sequenzspezifischen bakteriellen Endonukleasen gespaltenen DNA aus präparativ isolierten Viruspartikeln hat die exakte Virusstammidentifikation und Konstruktion von Infektketten ermöglicht (11) (Abb. 3).

Wesentlich einfacher, wenn auch nicht so prägnant, gelingt die Prüfung des isolierten Virus mit immunologischen Hilfsmitteln, sei es im klassischen Neutralisationsversuch mit einem spezifischen Antiserum oder modern

mit der Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidasetechnik. Die früher behauptete serologische CMV-Typeneinteilung hat sich molekularbiologisch (DNA-Analyse, Untersuchung der Polypeptide aus Virusstrukturproteinen) nicht bestätigt (12). Da die Virusisolierung zeit-, arbeits- und kostenintensiv ist, bemüht man sich seit einiger Zeit, Virusstrukturproteine im Patientenmaterial direkt nachzuweisen (13).

Dafür kommen auch monoklonale Antikörper zum Einsatz (13a). Neben Antigentests wird heute auch am CMV-DNA-Direktnachweis in Urinproben und Biopsiematerial gearbeitet (Filterhybridisierung) (14), in situ-Hybridisierung (14a).

Labordiagnose: Serologie

Am leichtesten gelingt die Diagnose der Zytomegalie serologisch, d. h. über den Antikörpernachweis. Dafür sind eine Vielzahl „liquid“ und „solid-phase“ Assays entwickelt worden (15). Am meisten haben sich heute neben der KBR und passiven Hämagglutination (PHA) die Immunfluoreszenz und der ELISA durchgesetzt (Tab. 3). Sensitivität, Spezifität und Antikörperkinetik hängen von der Art und Qualität des präparierten CMV-Antigens ab und dem Indikatorsystem, die Reaktion sichtbar zu machen (z. B. Fluoreszenz, Agglutination, Lysis, Enzymreaktion). Zunächst arbeitete man mit einfachen Extrakten lytisch infizierter Zellkulturen, die überwiegend im Infektionszyklus spät gebildete Virusantigene, darunter die Virusstrukturproteine, enthalten („late antigens“/LA). Diese werden auch über die Zell(kern)einschlußkörperchen in den klassischen, heute vielfach kommerziell erhältlichen indirekten Immunfluoreszenztests, beurteilt (16).

Unter Verwendung des alkalischen Glycinpufferextraktes CMV-infizierter Fibroblasten nach Krech (7) kann die KBR als sehr geeignet angesehen werden, bei rechtzeitiger Blutentnahme über einen signifikanten Antikörper-titeranstieg eine akute Zytomegalie zu erfassen. In der

Tab. 3: Methoden zum Serumantikörpernachweis bei CMV-Infektionen

1. Konventionelle Methoden
 - a) Neutralisationstest (NT)
 - b) Passive Hämagglutination (PHA)
 - c) Komplementbindungsreaktion (KBR)
2. Immunoassays
 - a) Immunfluoreszenztest (IFT)
 - b) Radioimmunoassay (RIA)
 - c) Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa)

Tab. 4: Titerverteilung bei gesunden und akut-infizierten Seropositiven. CMV-KBR. (Differentialdiagnostische Einsendungen im Hygiene-Institut Freiburg 1974.) (47)

Reziproker AK-Titer	Gesamtzahl	davon akut-infiziert (%) (= IgM positiv)	95%-Vertrauensbereich für die Inzidenz von akuten Infektionen in %
4	135	3 (2,2)	0,4- 6,2
8	189	3 (1,6)	0,3- 4,5
16	305	12 (4,0)	2,0- 7,0
32	304	22 (7,3)	4,6-11,0
64	203	40 (19,7)	14,7-26,2
128	121	54 (44,6)	36,5-55,1
256	9	5 (55,6)	21,0-86,0

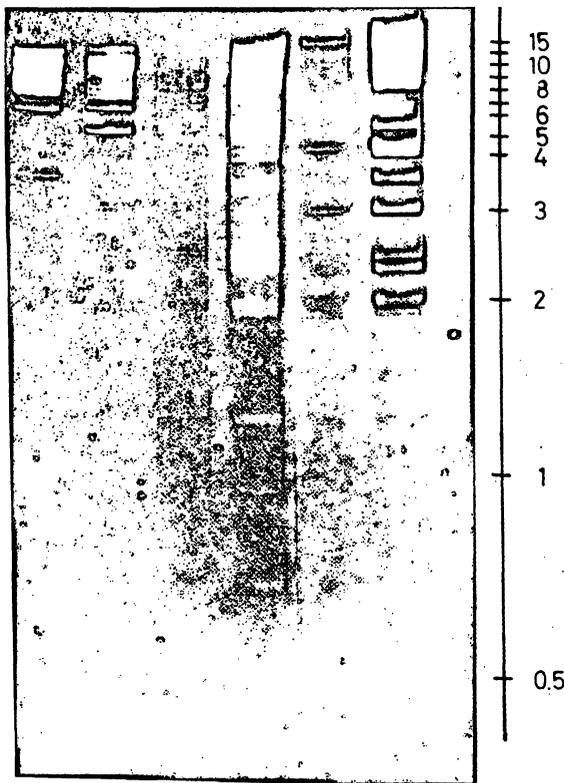


Abb. 3: DNA-Fragmentationsmuster von 6 CMV-Stämmen nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym Eco RI (von links nach rechts: Town 125, Davis, Rau-75, Fei-75, AD 169, Kul-73). Die Skala rechts gibt das Molekulargewicht in Dalton an ($\times 10^6$) (12)

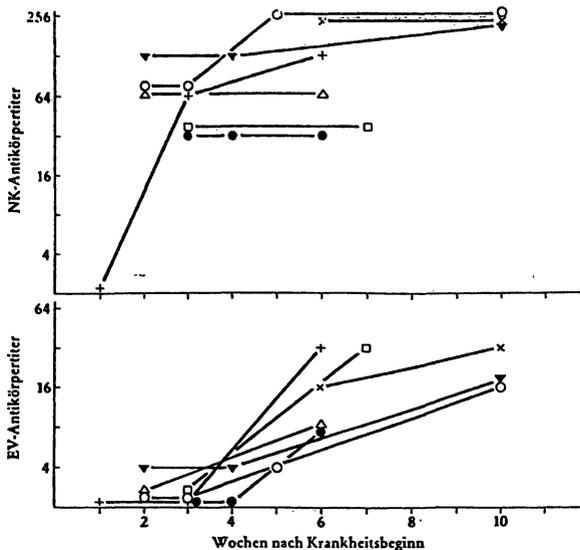


Abb. 4: Antikörperentwicklung gegen das Envelope (EV-Titer) und das Nukleokapsid (NK-Titer) des Zytomegalievirus bei sieben Patienten mit Zytomegalie (20)

Vergangenheit sind damit viele interessante Krankheitsfälle, u.a. neurologische Manifestationen (17), aufgeklärt worden. Nach der Primärinfektion persistieren die Antikörper lebenslang, wenn auch individuell mit langfristigen Schwankungen (18, 19). Die Titerhöhe erlaubt nur sehr bedingt einen Rückschluß auf den Aktivitätsgrad der Infektion (Tab. 4).

Bei Reinfektionen bzw. Exazerbationen kommt es häufig nicht mehr zu einem erneuten, kurzfristig diagnostisch verwertbaren, signifikanten Titeranstieg der Antikörper. Wird anstelle des Mischantigens eine Virusenvelopepräparation in die KBR eingesetzt, erfolgt die Antikörperbildung, die sonst praktisch unmittelbar nach Krankheitsbeginn (Inkubationszeit 30–40 Tage) meßbar ist, oft erheblich verzögert, so daß auf diesem Wege noch nachträglich

die Serodiagnose – insbesondere auch in Zusammenschau beider Tests – gestellt werden kann (Abb. 4) (20, 21). Dieser verzögerten Antikörperentwicklung gegen Envelopeantigen entspricht auch die Erfahrung mit Neutralisationstests, in denen ebenfalls Antikörper gegen die Virusaußenhülle gemessen werden. Gleichzeitig eröffnet sich damit eine Möglichkeit, zwischen Primär- und Rezi-divinfektion zu unterscheiden (22).

In den USA hat sich ein zweiter „liquid-phase“ Assay, die passive Hämagglutination, als einfache und schnelle „screening“ Methode zur Fahndung nach CMV-Antikörpern analog zum TPHA in der Luesserologie eingebürgert. Der Test erfaßt die Antikörper aller Immunglobulinklassen, insbesondere auch die im IgM (Tab. 5), während mit der KBR überwiegend nur die im IgG gut nachgewiesen werden, obwohl praktisch dieselbe Antigenpräparation benutzt wird. Auch wenn man heute mit stabilisierten, gut haltbaren Antigen-Erythrozyten-Präparaten arbeiten kann (23), hat sich der Test bei uns nicht durchgesetzt und kann nicht kommerziell bezogen werden.

Tab. 6: CMV-serologische und T-Zell-immunologische Untersuchung von Blutproben einer Patientin mit akuter Zytomegalie (36), T_H = T-Helferzellen, T_S = T-Suppressorzellen

Entnahme-datum	T_H/T_S -Quotient	CMV-AK Titer KBR	Bemerkung
14. 09. 82	0,64		Nierentransplantation
20. 09. 82	1,57	1: < 8	
30. 09. 82	1,25		
04. 10. 82	1,64	1: < 8	
08. 10. 82	1,78		
11. 10. 82	1,40	1: < 8	
14. 10. 82	1,42		
03. 11. 82	0,47	1: < 8	signifik. Titeranstieg
08. 11. 82	0,33	1:128	
			Abstoßungskrise, Kortison u. ATG i.v.
11. 11. 82	0,57		
18. 11. 82	0,72		

Tab. 5: Ergebnisse verschiedener IgM-anti-CMV Tests bei CMV-Erkrankten (reziproke Antikörpertiter) (23, 48)

Fall-nummer	Blutprobe (Tage nach Ausbruch der Erkrankung)	KBR	KBR nach IgG-Elimination	PHA mit der IgM-Fraktion	IgM-IFT	IgM-ELISA	Symptomatik	Alter
I	1. 7 Tage	2048	40	1536	4096	positiv	Kolitis	32 J.
	2. 15 Tage	2048	40	768	4096	positiv		
II	1. 3 Tage	8	negativ	12	32	n.d.	Hepatitis	18 J.
	2. 12 Tage	256	10	192	1024	positiv		
III	1. 17 Tage	128	negativ	negativ	negativ	negativ	Fieber, NTPL	30 J.
	2. 32 Tage	512	negativ	negativ	negativ	negativ		
IV	1. 27 Tage	64	negativ	24	64	positiv	Myokarditis	58 J.
	2. 37 Tage	128	negativ	n.d.	128	positiv		
	3. 45 Tage	128	negativ	48	256	positiv		
V	1. 14 Tage	16	negativ	negativ	16	negativ	Fieber	27 J.
	2. 20 Tage	256	negativ	24	64	positiv		
	3. 33 Tage	256	negativ	12	128	positiv		
VI	1. 3 Tage	128	negativ	n.d.	64	positiv	Neugeborenes ohne klinische Symptome	
	2. postpartum 15 Tage	128	negativ	n.d.	64	positiv		
	3. post partum 1 Monat	128	negativ	24	64	positiv		

Der Hauptgrund dafür liegt wahrscheinlich in der stürmischen Entwicklung und Verbreitung von Festphasenimmunoassays, die auf einfache Weise den Ig-Klassen-differenzierten Antikörpernachweis ermöglichen. Gegenwärtig ist der ELISA sehr sensitiv und dabei, die Technik der indirekten Immunfluoreszenz zu verdrängen.

Die indirekte Immunfluoreszenz hat den Vorteil, die Antikörperbildung des Patienten gegen verschiedene Antigene und Antigenlokalisationen in der infizierten Zelle beobachten zu können. Allerdings erfordert die Testableitung eine gewisse Erfahrung (24). Durch Abstopfung des Virusinfektionszyklus in der Zelle mit geeigneten Chemikalien oder Verwendung nicht permissiver Zelllinien lassen sich die sogenannten frühen Antigene („early antigens“/EA) darstellen. Sie sind in vivo vergleichsweise schwach immunogen, so daß die Antikörperentwicklung zumeist passager verläuft, ähnlich den LA-Antikörpern der Klasse IgM. Somit können sich konventionelle CMV-IgM-Tests und EA-Antikörpernachweise gegenseitig kontrollieren (21). Die Hoffnung, damit primäre und rezidivierende Zytomegalien zu differenzieren, hat sich jedoch nicht erfüllt. IFTs zum Antikörpernachweis gegen das sog. „immediate“ EA bleiben in ihrer Bedeutung noch abzuklären (25).

Auch bei den ELISAs hat man verschiedene Antigenpräparationen geprüft. Heute werden überwiegend aufgereinigte Viruspartikel verwendet. Insbesondere für IgM-Tests bestehen hohe Anforderungen, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden (26). Der CMV-IgM-Test wird heute konventionell, d. h. mit Träger-fixierten Antigenen, und mit der sog. Anti- μ -Technik („ μ -capture technique“) durchgeführt (27). Diese Methoden sind praktisch gleichwertig, seit man gelernt hat, die wichtigsten Störfaktoren, IgG-Kompetition und Rheumafaktorinterferenz (auto-IgM anti-IgG), mit Hilfe immobilisierter anti- γ -Antikörper wirkungsvoll auszuschalten (28), und sich äl-

teren Verfahren, die sich einer Serumproteinfraktionierung bedienen, überlegen erwiesen. Die Bedeutung des CMV-IgM-Tests besteht darin, eine aktive Zytomegalie mit der Untersuchung einer einzigen Blutprobe zu diagnostizieren (Tab. 5). Allerdings findet man nicht bei allen CMV-Rezidiven die Antikörper dieser Klasse, insbesondere bei Immunstörungen, obwohl eine Virurie besteht. Zur Unterscheidung gegenüber der primären Zytomegalie hat man daher auch vorgeschlagen, den IgM/IgG-Quotienten zu berechnen. Im klinisch relevanten Einzelfall wird man jedoch damit kaum eine zuverlässige Differentialdiagnose stellen können, weil große individuelle Unterschiede bei den Immunreaktionen beobachtet werden.

Nach einigen Erfahrungen im Röteln-System (29) haben wir mit einem erweiterten „sandwich“-Immunoassay unter Verwendung monospezifischer anti-human-IgG₁₋₄-Antikörper die CMV-IgG-Subklassen auf diese Fragestellung hin untersucht. Es deutet sich an, daß die Antikörper im IgG₃ neben IgG₁ bei der aktiven Zytomegalie stark stimuliert werden (Abb. 5, 6), während bei gesunden CMV-Antikörperträgern die Hauptaktivität nur im IgG₁ liegt (30). Schließlich wurde auch die Untersuchung der CMV-IgA-Antikörper als diagnostisch nützlich vorgeschlagen (31). Einsatz und Aussagekraft der besprochenen Methoden im Vergleich zu den anderen Herpesviren wurde bereits an anderer Stelle besprochen (32).

Neben der humoralen wurde auch die zellvermittelte Immunreaktion bei Zytomegalie intensiv untersucht. Die antigenspezifische Lymphozytenstimulierung ist vielfach durchgeführt worden, um dem Pathomechanismus der Exazerbation auf die Spur zu kommen. Für die Routinediagnostik hat man diese Tests bisher nicht eingesetzt, weil das Untersuchungsergebnis in der Regel erst eine Woche nach Materialeingang vorliegt, auch wenn neuerdings mit Vollblut anstatt der isolierten Fraktion mono-

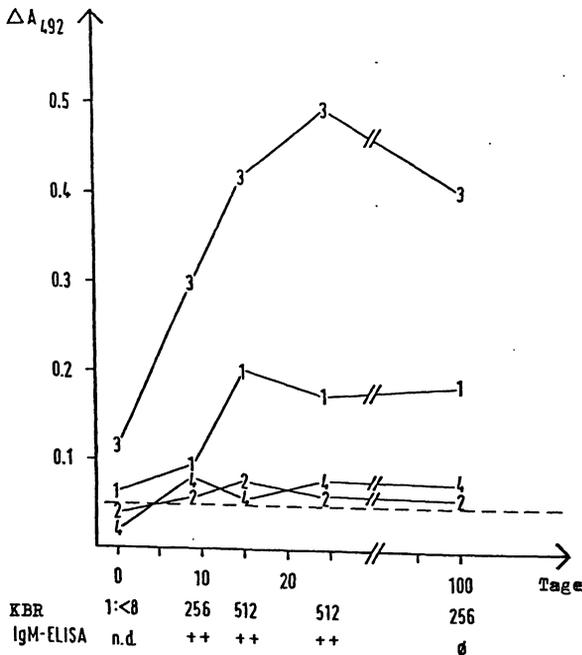


Abb. 5: Kinetik der IgG-Subklassen-spezifischen Antikörper nach CMV-Erstinfektion (K. E., 34 Jahre, nach Nierentransplantation). 1 = IgG₁, 2 = IgG₂, 3 = IgG₃, 4 = IgG₄; ----- = „cut-off-line“; ΔA^{492} = Extinktionsdifferenz bei $\lambda = 492$ nm zwischen Virus- und negativem Kontrollantigen

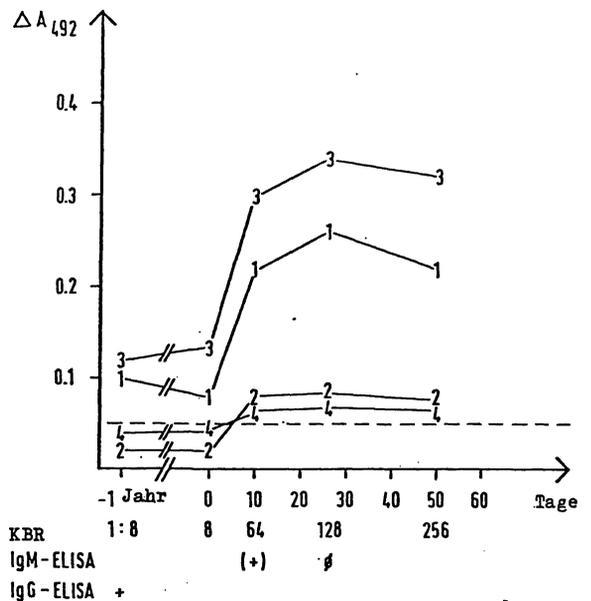


Abb. 6: Kinetik der IgG-Subklassen-spezifischen Antikörper nach CMV-Reaktivierung (G. K., 61 Jahre, nach Nierentransplantation). 1 = IgG₁, 2 = IgG₂, 3 = IgG₃, 4 = IgG₄; ----- = „cut-off-line“; ΔA^{492} = Extinktionsdifferenz bei $\lambda = 492$ nm zwischen Virus- und negativem Kontrollantigen

nukleärer Leukozyten gearbeitet wird (33). In der quantitativen Bestimmung der T-Helfer/Suppressor-Zellen hat man eine dem AIDS ähnliche, jedoch passagere, Inversion gefunden (34, 35). Im eigenen Untersuchungsgut konnten wir dies allerdings nur vereinzelt feststellen (Tab. 6), während bei anderen Fällen keine signifikante Veränderung auftrat (36).

Zytomegalie-Risikogruppen

Mit den geschilderten Methoden sind zur Aufklärung der Populationsdurchseuchung mit CMV umfangreiche seroepidemiologische Studien durchgeführt worden, die eine ubiquitäre Verteilung des Virus und eine rasche, in erster Linie juvenile Infektionsausbreitung in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status der Bevölkerung aufgezeigt haben (18). Ein zweiter Durchseuchungsanstieg erfolgt postpubertär. Ähnlich HSV und EBV ist auch für die CMV-Übertragung ein enger körperlicher Kontakt erforderlich, wie er zwischen Mutter-Kleinkind und in sexuellen Partnerschaften besteht. Zytomegalie kann auch durch Bluttransfusionen übertragen oder im Empfänger reaktiviert werden. Für die Testung des Immunstatus wenden wir heute den ELISA an.

Als besonders CMV-gefährdet gelten Personen, die aus physiologischer (Schwangerschaft, Neugeborene), pathologischer (Tumoren) oder iatrogenen (Steroidbehandlung) Ursache immunkompromittiert oder -supprimiert sind. Tab. 7 zeigt das Ergebnis von pro- und retrospektiv in den letzten Jahren untersuchten Stichproben solcher Risikogruppen. Unklar bleibt, inwieweit retrospektiv gefundene hohe Antikörperfrequenzen auch Folge einer durch eine länger währende Krankheit (z. B. Herzleiden) bedingte erhöhte Infektionsanfälligkeit darstellen. Im folgenden sollen zwei besonders intensiv untersuchte Gruppen besprochen werden.

In ausgedehnten Untersuchungsreihen, die vor allem in USA und Großbritannien durchgeführt worden sind, hat man die Zytomegalie als die häufigste prä- und perinatale Infektion erkannt (21). Im Unterschied zu Röteln kommt es jedoch selten zu Embryopathien, häufiger sind Fetopathien diagnostiziert worden; es sind nur $1/10$ der infizierten Neugeborenen geschädigt. Ein weiteres Zehntel soll allerdings später eine mentale Retardierung aufweisen (37–40). Die perinatale Zytomegalie kann gelegentlich eine interstitielle Pneumonie verursachen, zumeist vergesellschaftet mit einer Pneumocystis-carinii-Infektion. Insgesamt ist ein großes Spektrum von besonders auch die Hämatopoese betreffenden Krankheitsbilder beim immunologisch noch unreifen Säugling beschrieben worden (39). Dementsprechend finden wir im Laufe der Schwangerschaft recht häufig eine aktive Zytomegalie (exazerbation) mit einer zunehmenden Virusausscheidung im Cervikalsekret und Urin (41). Bereits in früheren Studien konnten wir eine erhöhte CMV-IgM-Prävalenz bei den werdenden Müttern feststellen, wobei nicht nur die primäre, sondern auch die reaktivierte Zytomegalie zur Vertikalinfektion führen kann. Der CMV-IgM-Test hat sich dabei als guter prognostischer Marker erwiesen (20). Kinder, die von der primär CMV-seropositiven Mutter plazentär Antikörper erhalten, sind zwar nicht geschützt, gelten jedoch im Hinblick auf den Krankheitsverlauf als weniger gefährdet (42).

Am häufigsten wird unsere CMV-Diagnostik fündig bei den fortlaufend kontrollierten, immunsuppressiv behandelten Patienten nach Nierentransplantation (32, 35, 36, 43). Bei NTPL wie bei Bluttransfusionen sind folgende

Faktoren für die Virusübertragung oder Reaktivierung maßgeblich (Tab. 8):

- Die Niere gehört zu den seit langem bekannten Organen, die CMV in den Zellen beherbergen;
- Virusübertragung durch Bluttransfusion, wie bereits erwähnt;
- Immunsuppressive Therapie.

b) und c) können auch zur Reaktivierung einer im Empfänger latent vorhandenen Zytomegalie führen, wenn keine exogene Infektion stattfindet. Obwohl nach unseren Erfahrungen 48 Std. gelagerte Blutkonserven kaum noch CMV-infektiös sind, wurde kürzlich empfohlen, Risikopersonen keine leukozytenhaltige Blutprodukte von seropositiven Spendern zu applizieren (Tab. 9). Das gilt natürlich besonders für Neugeborene, bei denen eine Austauschtransfusion mit frischen Blutkonserven durchgeführt wird (44). Die Ergebnisse einer retrospektiven Auswertung herpesserologischer Befunde bei 153 Patienten nach Nierentransplantation in unseren Kliniken zeigen die Tab. 10 und 11 (36). Wir fanden im Beobachtungszeitraum 1980–82 bei ca. $1/3$ der Patienten eine primäre oder sekundäre Herpesvirusinfektion, in einigen Fällen Doppel- und Dreifachinfektionen. Obwohl die sekundäre Zytomegalie ebenfalls Abstoßungskrisen bis hin zur TPL-

Tab. 7: CMV-Durchseuchung in Risikogruppen der Bevölkerung (Nordbaden): Antikörperfrequenzen in verschiedenen Testmethoden

KBR = Komplementbindungsreaktion
ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay
Alter \bar{x} = Durchschnittsalter

Gruppe	Alter \bar{x} (Bereich)	n	KBR pos.	ELISA positiv	
				IgG	IgM
1. Blutspender ¹ (1983)	28 (20–40)	90	22	42 (47%) (36,1–57,5%) ⁶	0
2. Schwangere ² (1980/81)	28 (19–36)	101	n. d.	57 (56%) (46,7–66,8%) ⁶	13
3. Hämophilie Patienten ¹ (1983)	31 (5–76)	88	45	61 (69%) (58,6–78,7%) ⁶	0
4. NTPL- Patienten ³ (1980–82)	38 (10–61)	153	125	138 (90%) (84,3–96,0%) ⁶	14
5. Patienten nach Herz- Operation ⁴ (1984)	54 (40–67)	24	13	21 (87%) (67,6–97,3%) ⁶	1
6. Dialyse- Patienten ⁵ (1983)	39 (9–62)	38	23	23 (61%) (43,4–75,9%) ⁶	0
7. Prostituierte ¹ (1983/84)	28 (17–61)	118	89	106 (90%) (82,9–94,6%) ⁶	2

¹ Eine Stichprobenuntersuchung

² Kumulativ nach je einer Untersuchung/Trimenon und post partum

³ Kumulativ nach 1–25 Verlaufuntersuchungen in Intervallen von 2 Tagen–10 Wochen.

⁴ Je eine Untersuchung 7–14 und 19–25 Tage nach Op.

⁵ Je eine Untersuchung vor und 1–4 Untersuchungen nach Dialyse in Intervallen von 1–3 Monaten.

⁶ 95% Vertrauensbereich.

Tab. 8: Maßgebliche Faktoren für die Auslösung eines CMV-Posttransfusionsyndromes

- CMV-Immunstatus
- Zahl und Art der Bluttransfusionen
- alters-, krankheits- oder therapiebedingte Immunbeeinträchtigung des Empfängers (Neugeborene, Traumen, Tumore, Immunsuppressiva etc.)

Tab. 9: Empfehlung des „Committee of Experts on Blood Transfusion and Immunohaematology“, Lissabon, 16.-19. Mai 1983, über die Applikation von Blut (produkten) CMV-Antikörper-freier Spender an folgende Risikogruppen:

- schwangere Frauen
- Neugeborene
- Kinder in Gefäß- und offenen Herzoperationen
- Nieren- und Knochenmark-Transplantat-Empfänger
- Kinder mit Leukämie

Tab. 10: Serologisch belegte Inzidenz von Infektionen (Rezidiven) der humanen Herpesviren bei Patienten (n = 153) nach Nierentransplantation (1980-82, Klinikum der Universität Heidelberg, Abteilung Urologie)

	CMV	HSV	VZV	EBV	Gesamt
signifikanter AK-Titeranstieg	17	11	7	n.d.	35
spez. IgM pos.	15	n.d.	n.d.	4	19
Gesamt	32 (21%)	11 (7%)	7 (5%)	4 (3%)	54

Tab. 11: Häufigkeit von Herpesvirusinfektionen (CMV-, HSV-, VZV-, EBV-Antikörperanstieg bzw. -IgM-Nachweis) bei Nierentransplantations-Patienten (n = 153). Anzahl und Stärke der Abstoßungsreaktionen im Zeitraum 1980-82

¹ = Primärinfektion, ² = Sekundärinfektion, ⁹ = Gesamtzahl der CMV-Infektionen

Virus	Fälle	Geschlecht		Alter	\bar{x}	Stärke der Abstoßungsreaktionen							chron. Abstoßung	TPL-Entfernung		
		w	m			n. erf.	keine (+)	+	+ / ++	++	++ / +++	+++				
CMV ¹	6	2	4	28-52	39	0	1	0	0	1	4	0	0	3	→	2
CMV ²	26	12	18	11-61	40	6	1	1	10	5	3	0	0	4	→	3
CMV ⁹	32	14	18	11-61	40	6	2	1	10	6	7	0	0	7	→	5
HSV	11	3	8	24-52	42	3	0	0	3	4	1	0	0	0	→	0
VZV	7	3	4	17-62	37	2	0	1	1	1	1	1	0	3	→	2
EBV	4	3	1	17-53	32	0	0	0	0	2	2	0	0	3	→	3
Gesamt	54	23	31	11-62	39	11	2	2	14	13	11	1	0	13	→	10

Entfernung verursacht, kommt es jedoch seltener vor als bei der primären Infektion. Von daher wird heute der Einsatz von CMV-Hyperimmunglobulin empfohlen (34, 35). Wichtiger erscheint uns die routinemäßige Untersuchung des Immunstatus von gefährdeten Personen bzw. Organ Spendern bzw. Frischblutspendern sowie die Weiterentwicklung von Labormethoden, die dem Kliniker rasche Entscheidungen ermöglichen (Absetzen oder Dosisreduktion von immunsuppressiven Medikamenten).

Ausblick

Die Zytomegalie ist eine seit über 100 Jahren mit Laboratoriumsuntersuchungen nachweisbare Infektionskrankheit des Menschen. Erst in neuerer Zeit ist jedoch ihre große klinische Bedeutung erkannt worden, die vor allem die Perinatal- und Transfusionsmedizin sowie Organtransplantationen betreffen. Die Fähigkeit der Herpesviren zur latenten Infektion mit unregelmäßigen Exazerbationen hat schon früh das wissenschaftliche Interesse der Virologen und Immunologen geweckt. Wie bei kaum einer anderen Viruserkrankung berechtigt und erforderlich, hat daher eine intensive Grundlagenforschung eingesetzt, die vor allem auch dem onkogenen Potential des Virus gewidmet ist (46).

Schrifttum:

1. DOERR, H. W.: Virologische Technik für den Sektionsaal. Pathologie 1, 220-229 (1980).
2. SEIFERT, G.: Die morphologische Diagnose der Zytomegalie. Münch. Med. Wschr. 103, 139-143 (1961).
3. ROWE, W. P., HARTLEY, J. W., WATERMAN, S., TURNER, A. C., HUEBNER, R. J.: Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 418-424 (1956).
4. SMITH, M. G.: Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland (SGV) disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 424-430 (1956).
5. WELLER, T. H., HANSHAW, J. B., SCOTT, D. E.: Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 4-12 (1957).
6. HUANG, E. S., PAGANO, J. S.: Human cytomegalovirus. II. Lack of relatedness to DNA of herpes simplex I and II, Epstein-Barr virus, and non-human strains of cytomegalovirus. J. Virol. 13, 642-645 (1974).

7. KRECH, U. H., JUNG, M., JUNG, F.: Cytomegalovirus infections of man. Karger-Verlag, Basel (1971).
8. SPECTOR, D. H., SPECTOR, S. A.: The oncogenic potential of human cytomegalovirus. Progr. in Med. Virol. 29, 45-76 (1984).
9. VOGT, M., BETTEX, J. D., LÜTHY, R.: Erworbenes Immundefektsyndrom (AIDS). Dtsch. Med. Wschr. 108, 1927-1933 (1983).
10. REYNOLDS, D. W., STAGNO, S., ALFORD, Ch. A.: Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. In: LENNETTE, E. H., SCHMIDT, N. J. (Ed.): Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Am. Publ. Hlth. Ass. Washington, D.C. (1979).
- 10a. ADLER, S. P.: Transfusion-associated cytomegalovirus infections. Rev. Infect. Dis. 5, 977-993 (1983).
11. HUANG, E. S., ALFORD, Ch. A., REYNOLDS, D. W., STAGNO, S., PASS, R. F.: Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections in women and their infants. N. Engl. J. Med. 303, 958-962 (1980).
12. DOERR, H. W., KÜNZLER, A., SCHMITZ, H.: Cytomegalovirus strain differentiation by DNA restriction analysis. Oncology 36, 245-247 (1979).
13. YOLKEN, R. H., STOPA, P.: Comparison of seven enzyme immunoassay systems for measurement of cytomegalovirus. J. Clin. Microbiol. 6, 543-551 (1980).
- 13a. DOERR, H. W., PETERS, M. C., SANN, G., SCHIENE, H., ZÖHLKE, F.: Monoklonale Antikörper in der Infektiologie. Diagnostik und Intensivmedizin 11, 12-20 (1984).
14. CHOU, S., MERIGAN, Th. C.: Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. N. Engl. J. Med. 308, 921-925 (1983).
- 14a. MYERSON, D., HACKMAN, R. C., MEYERS, J. D.: Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia by in situ hybridization. J. Infect. Dis. 150, 272-277 (1984).
15. HORODNICEANU, F., MICHELSON, S.: Assessment of human cytomegalovirus antibody detection techniques. Arch. Virol. 64, 287-301 (1980).
16. DOERR, H. W.: Ein einfacher Immunfluoreszenztest zum Nachweis Zytomegalievirus-spezifischer IgM Antikörper. Lab.med. 4, 206-207 (1980).
17. JANSSEN, E. J., DIEHM, D., GÖTZ, R., BERLIT, H., DOERR, H. W.: Polyradikulitis Guillain-Barré bei akuter Zytomegalie-Infektion. Innere Medizin 8, 65-69 (1981).
18. DOERR, H. W., LEHMAIR, H., SCHMITZ, H., KAMPA, D., LUTHARDT, Th.: Simple mathematical deductions in the seroepidemiology of viral infections. I Herpesvirus-group (herpesvirus hominis, varizellazoster-virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr-virus). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 238, 149-164 (1977).
19. WANER, J. L., WELLER, T., KEVY, S. V.: Patterns of cytomegaloviral complement-fixing antibody, a longitudinal study of blood donors. J. Infect. Dis. 127, 538-543 (1973).
20. SCHMITZ, H., DOERR, H. W., OBRIG, M.: Envelope and nucleocapsid antigens of cytomegalovirus (CMV). Med. Microbiol. Immunol. 161, 155-162 (1975).
21. DOERR, H. W., HAAS, R., MUNK, K.: Cytomegalie und Schwangerschaft. Med. in unserer Zeit 6, 185-193 (1978).
22. HAAS, R., DOERR, H. W., PETERSEN, E. E., SCHMITZ, H.: Über die Vergleichbarkeit virusseroologischer Befunde. Ein Beitrag zur Frage des Standardprinzips in der Virusdiagnostik. Bundesgesundheitsbl. 20, 289-294 (1977).
23. HUSCHKA, U., STRENGEL, H. H., SCHROETER, R., ROELCKE, D., DOERR, H. W.: Rapid detection of treponema pallidum and cytomegalovirus-specific IgM antibodies with the passive haemagglutination. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 253, 120-130 (1982).
24. SCHMITZ, H., HAAS, R.: Determination of different cytomegalovirus immunoglobulins (IgA, IgG, IgM) by immunofluorescence. Arch. ges. Virusforsch. 37, 332-339 (1972).
25. GÄRTNER, L., ØRSTAVIK, I.: Antibodies to cytomegalovirus-induced pre-early nuclear antigen in the anticomplement-immunofluorescent test in comparison to IgG

and IgM antibodies in the indirect and direct enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosing cytomegalovirus infections. *Arch. of Virol.* **80**, 305 (1984).

26. SCHMITZ, H., DOERR, H. W., KAMPA, D., VOGT, A.: Solid-phase enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **5**, 629-634 (1977).

27. SCHMITZ, H., DEIMLING, U., FLEHMING, B.: Detection of IgM antibodies to cytomegalovirus (CMV) using an enzyme-labelled antigen (ELA). *J. Gen. Virol.* **50**, 59-68 (1980).

28. GEISEN, H. P., FRANK, R., DOERR, H. W., ENDERS, G.: Simple method to detect virus-specific IgM antibodies in patients' serum samples after immunosorption of immunoglobulins G and A. *Med. Microbiol. Immunol.* **167**, 77-82 (1979).

29. DOERR, H. W., FLEISCHER, G., WIESMANN, M.: Nachweis von (sub-)klassenspezifischen IgG- und IgM-Rötelantikörpern mit dem Enzymimmunoassay (EIA). *Immun. Infekt.* **12**, 21-28 (1984).

30. LINDE, G. A., HAMMARSTRÖM, L., PERSSÖN, M. A. A., SMITH, E. C. I., SUNDQUIST, V.-A., WAHREN, B.: Virus-specific antibody activity of different subclasses of immunoglobulin G and A in cytomegalovirus infections. *Infect. Immun.* **42**, 237-244 (1983).

31. SAROV, I., SIQUEIRA-LINHAVES, M., CHARDONNET, Y., LEVY, E., AYMARD, M., BOSSHARD, S., NORD, E., REVILLARD, J. P.: Detection of specific IgA antibodies in serum of kidney transplant patients with recurrent cytomegalovirus infection. *Intervirology* **15**, 228-234 (1981).

32. HÖHNE-REICHEL, G., DOERR, H. W.: Die Komplementbindungsreaktion (KBR) in der Viroserologie: Vergleich mit den modernen Immunoassays an ausgewählten Fallbeispielen. *Ärztl. Lab.* **30**, 133-140 (1984).

33. LEROUX, M., BRAUN, R., DOERR, H. W., KIRCHNER, H.: Measuring of antiviral cellular immunity by a novel test system (Abstract). *Zbl. Bakt. Hyg. A* **257**, 149 (1984).

34. CONDIE, R. M., O'REILLY, R.: Prevention of cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients by prophylaxis with an intravenous, hyperimmune cytomegalovirus globulin. In: PLOTKIN, S. A., MICHELSON, S., PAGANO, J. S., RAPP, F.: *CMV: Pathogenesis and prevention of human infection. Birth defects: Original article series Vol. 20, No. 1*, pp. 327-344. Alan R. Liss, Inc., New York, 1984.

35. SIMMONS, R. L., MATAS, A. J., RATTAZZI, L. C., BALFOUR, H. H., HOWARD, R. J., NAJARIAN, J. S.: Clinical Cytomegalovirus infection following renal transplantation. *Surgery*, **82**, 538 (1977).

36. MAYER, J.: Zytomegalie und Nierentransplantation. Inaugural-Dissertation der Med. Gesamtfakultät der Universität Heidelberg, 1984.

37. HANSHAW, J. B.: Congenital cytomegalovirus infection: A fifteen year perspective. *J. Infect. Dis.* **123**, 555-561 (1971).

38. HANSHAW, J. B.: Cytomegalovirus. In: REMINGTON, J. S., KLEIN, J. O. (Ed.): *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. W. B. Saunders Co., Philadelphia-London-Toronto, pp. 107-155 (1976).

39. LUTHARDT, Th.: Cytomegalie. Bücherei des Pädiaters, Band 75. Enke Verlag, Stuttgart 1976.

40. PELLER, P., GOETZ, O.: Zerebralschäden und Zytomegalievirusinfektion. *Dtsch. Med. Wschr.* **103**, 265-267 (1978).

41. REYNOLDS, D. W., STAGNO, S., HOSTY, T. S., TILLER, M., ALFORD, C. A. jr.: Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *New Engl. J. Med.* **289**, 1-5 (1973).

42. SCHMITZ, H., KAMPA, D., DOERR, H. W., LUTHARDT, Th., HILLERMANN, H. G., WÜRTELE, A.: IgM antibodies to cytomegalovirus during pregnancy. *Arch. Virol.* **53**, 177-184 (1977).

43. PASS, R. F., GRIFFITH, P. D., AUGUST, A. M.: Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: Comparison of patients with primary and recurrent infections. *J. Infect. Dis.* **147**, 40-46 (1983).

44. YEAGER, A. S., GRUMET, F. C., HAFLEIGH, F. B., ARVIN, A. M., BRADLEY, J. S., PROBER, C. G.: Prevention of Tx-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J. Pediatr.* **98**, 281-287 (1981).

45. MEYERS, J. D.: Prevention and treatment of cytomegalovirus infections with interferons and immune globulin. *Infection* **12**, 143-150 (1984).

46. NELSON, J. A., FLECKENSTEIN, B., JAHN, G., GALLOWAY, D. A., McDOUGALL, J. K.: Structure of the transforming region of human cytomegalovirus AD 169. *J. Virol.* **49**, 109-115 (1984).

47. DOERR, H. W., DARAI, G.: Fluoreszenzserologischer Nachweis von Virusinfektionen. *Lab.med.* **2**, 209-214 (1978).

48. DOERR, H. W., FRETSCHEMER, R., GEISEN, H. P.: Virusspezifischer IgM-Nachweis mit Routinemethoden. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **246**, 158-166 (1980).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. med. H. W. Doerr
 Universitätskliniken Frankfurt
 Abteilung für Med. Virologie
 (im Zentrum der Hygiene)
 Paul-Ehrlich-Str. 40
 6000 Frankfurt/M.)

cand. med. Thomas Holtz
 cand. med. Marlene Fraunhoffer
 Dr. med. Rüdiger Braun
 Universitätskliniken Heidelberg
 Abteilung für Med. Virologie (im Hygiene-Institut)
 Im Neuenheimer Feld 324
 6900 Heidelberg

