

Typenspezifische Herpes simplex Virus-Antikörper: Vergleich verschiedener ELISA-Testsysteme und eines Western blot

Type-specific Herpes Simplex Virus Antibodies: Comparison of Different ELISA Systems and a Western Blot

Christiane Schieferstein^{1,2}

Zusammenfassung: Acht kommerzielle Enzymimmunoassay (ELISA)-Testsysteme und ein in house-HSV-1- und HSV-2-Western blot wurden anhand von 176 mittels Virusisolierung und -typisierung aus korrespondierenden Abstrichen gut charakterisierten Seren auf ihre Eignung zum Nachweis typenspezifischer Antikörper gegen Herpes simplex-Virus (HSV) Typ 1 und Typ 2 untersucht. Es zeigte sich, daß die auf Vollvirus-Antigenen basierenden ELISAs eine sehr unterschiedliche Sensitivität (85–100% für HSV-1, 35–100% für HSV-2) bei meist nur unzureichender Spezifität (57–93% für HSV-1, 48–91% für HSV-2) erreichen. Hingegen verbindet der einzige ELISA, der das als typspezifisch bekannte HSV-2-Glykoprotein gG-2 als Antigen verwendet, maximale Spezifität (100%) mit mangelnder Sensitivität (52%), wobei insbesondere HSV-1/-2-Koinfektionen nicht erkannt werden. Modifikationen der cut off-Werte konnten die Leistungscharakteristika nicht wesentlich verbessern. Im Western blot ließ sich kein einzelnes HSV-1- bzw. HSV-2-Antigen als optimaler Marker identifizieren, jedoch war bei allen Seren eine eindeutige Zuordnung aufgrund der Reaktivitäts-(Banden-)Muster möglich. Bei Untersuchung von potentiell falsch-positiven „tricky sera“ konnte eine ausreichende Spezifität der acht getesteten IgM-ELISAs lediglich durch Vorbehandlung mit Rheumafaktor-Absorbens erreicht werden. Die Auswertung von 3527 im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten Testungen auf Antikörper gegen HSV-1 und HSV-2 ergab Seroprävalenzraten von durchschnittlich 76,4% für anti-HSV-1 und 12,1% für anti-HSV-2 bei jeweils deutlichem Anstieg mit zunehmendem Alter.

Schlüsselwörter: Herpesvirus 1, Humanes; Herpesvirus 2, Humanes; Serodiagnose; ELISA; Blot, Western.

¹ Institut für Medizinische Virologie (Leiter: Prof. Dr. med. H. W. Doerr), Abteilung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität am Zentrum der Hygiene, Frankfurt am Main

² Korrespondenzadresse: C. Schieferstein, Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Zentrum der Hygiene, Paul-Ehrlich-Straße 40, D-60596 Frankfurt am Main. Fax: +49-69-6301-6477.

Eingegangen: 15. November 1995/Angenommen: 24. Oktober 1996

Summary: Eight commercial enzyme immunoassay (ELISA) systems and an in-house Western blot were investigated for their ability to distinguish between antibodies to Herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2. For the investigation 176 sera were used that were well characterized by virus isolation and typing from corresponding swab samples. The ELISA tests based on whole viral antigens reach a high sensitivity (85–100% for HSV-1, 35–100% for HSV-2) but only insufficient specificity (57–93% for HSV-1, 48–91% for HSV-2). The only ELISA using HSV-2 glycoprotein gG-2 as antigen which is known to be type-specific showed maximum specificity (100%) but a lack of sensitivity (52%), missing predominantly cases of HSV-1/-2 co-infection. Modifications of cut-off values could not significantly improve the test performances. On Western blot no single HSV-1 or HSV-2 antigen could be identified as optimal marker; for each serum, however, the reactivity (band) pattern allowed a definite classification. When testing potentially false-positive “tricky” sera only pre-treatment with rheumatoid factor absorbent could safeguard a sufficient specificity of the eight IgM ELISAs evaluated. Evaluation of 3527 HSV-1 and HSV-2 antibody test results performed for routine diagnosis showed seroprevalence rates of 76.4% for anti-HSV-1 and 12.1% for anti-HSV-2 on average, with marked rises with increasing age.

Keywords: Herpesvirus 1, Human; Herpesvirus 2, Human; Serodiagnosis; Sensitivity and Specificity; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Blot, western.

Schon in der Antike wurden typische orolabiale und genitale Herpes simplex-Virus (HSV)-Infektionen beschrieben, doch erkannten erst *Schneeweis* und *Brandis* 1961 [1], daß HSV in zwei Typen vorkommt, HSV-1 und HSV-2. Beide persistieren nach erfolgter Primärinfektion lebenslang im Organismus und vermögen aus einer Phase der Latenz heraus zu reaktivieren [2]. HSV-1 und -2 sind weltweit verbreitet; sie gehören zur Unterfamilie α -Herpesvirinae in der Familie Herpesviridae mit bislang insgesamt acht humanpathogenen Vertretern; das achte humane Herpes-

virus (HHV-8 oder KSHV), welches mit dem Kaposi-Sarkom assoziiert wird, wurde erst kürzlich beschrieben [3]. Sowohl Erst- als auch reaktivierte Infektionen mit Herpes simplex-Viren sind offenbar meist inapparent; daneben kommt es aber auch zu verschiedenartigen Krankheitsbildern, deren Spektrum von häufig und schmerzhaft – z. B. Herpes labialis (hauptsächlich verursacht durch HSV-1) und Herpes genitalis (hauptsächlich verursacht durch HSV-2) – bis relativ selten, aber lebensbedrohlich – z. B. Herpes simplex-Enzephalitis (häufiger durch HSV-1 als HSV-2 verursacht) und Herpes neonatorum (häufiger durch HSV-2 als durch HSV-1) – reicht.

Diagnostischer Goldstandard einer floriden Herpes simplex-Infektion ist die Virusisolierung aus Abstrichmaterial in Zellkultur mit anschließender Typisierung [4,5,6,7]; bei Herpes simplex-Enzephalitis ist es der Nachweis HSV-spezifischer Genomsequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus dem Liquor cerebrospinalis [8,9,10,11]. Bei akuten HSV-bedingten Erkrankungen kann so eine rasche Diagnostik mit der Konsequenz einer unverzüglichen antiviralen Chemotherapie erfolgen – Mittel der Wahl ist bei Infektionen mit HSV-1 wie mit HSV-2 Acyclovir (Zovirax®) [12,13].

Während die Antikörperdiagnostik bei der Differentialdiagnostik eines HSV-verdächtigen Krankheitsbildes erst in zweiter Linie von Bedeutung ist, hat sie ihren Platz bei der Feststellung einer Durchseuchung [14,7], d. h. einer früher stattgehabten Primärinfektion mit anschließender Phase der Viruslatenz, einhergehend mit der Möglichkeit einer Reaktivierung.

Virusreaktivierungen sind nicht nur für die überwiegende Mehrzahl der klinischen HSV-Erkrankungsepisoden verantwortlich; zudem stellen klinische wie auch asymptomatische Reaktivierungen die Hauptquelle für Neuinfektionen empfänglicher Kontaktpersonen dar.

Reaktivierungen latenter HSV-1-Infektionen liegen z. B. etwa 50% der Fälle von HS-Enzephalitis zugrunde [15]. Bei reaktivierender genitaler HSV-2-Infektion der Mutter kann sich das Neugeborene sub partu bei der Passage durch den Geburtskanal infizieren [16,14], wobei allerdings das Risiko eines Herpes neonatorum geringer ist als bei Infektion im Rahmen einer maternalen genitalen Erstinfektion [17].

Bei einem durch HSV-2-Infektion verursachten Herpes genitalis ist sowohl die Rezidivneigung höher [18,19] als auch der Verlauf schwerer und die Ansprechrate auf antivirale Chemotherapie niedriger als bei einer HSV-1-Infektion an gleicher Lokalisation [20]. Ist eine Läsion im Abheilen begriffen und ein Virusnachweis daher nicht mehr möglich, kann über eine serologische Differenzierung eine HSV-2-Infektion eventuell ausgeschlossen werden. Außerdem er-

laubt die HSV-typenspezifische Antikörperserologie die Diagnose der häufigen klinisch nicht erkannten Infektionen [21].

Neben der dargestellten klinischen Bedeutung für den individuellen Patienten ist die typenspezifische Antikörperserologie zusätzlich auch von großem Wert für die Infektionsepidemiologie. Epidemiologisch ist die Situation in den entwickelten Ländern derart, daß über 90% der Erwachsenen mit HSV-1 durchseucht sind, während man die Prävalenz der HSV-2-Infektion mit etwa 20% angibt [22]. Dabei gibt es große Unterschiede zwischen verschiedenen Risikogruppen; z. B. führen niedrigerer sozioökonomischer Status und häufig wechselnder Geschlechtsverkehr zu einer weit höheren HSV-2-Seroprävalenz [23,24,25,26]. Insgesamt läßt sich in Deutschland eine in den letzten Jahrzehnten allmählich zunehmende HSV-2-Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung bisher nicht feststellen [27].

Einer serologischen Differenzierung zwischen Antikörpern gegen HSV-1 und gegen HSV-2 steht die ausgeprägte Kreuzreaktivität gegen die meisten Antigene der beiden HSV-Typen entgegen [28,29]. Die meisten der bislang routinemäßig eingesetzten Antikörpertests können deswegen keine Typenunterscheidung treffen, was aber aus oben aufgeführten Gründen sowohl für die Beurteilung individueller Patienten als auch für epidemiologische Untersuchungen von Bedeutung wäre [30].

Für die vorliegende Arbeit wurden acht kommerzielle ELISA-Testsysteme zur Differenzierung von HSV-1- und HSV-2-spezifischen Antikörpern der Klasse IgG sowie ein „in house“-Western blot auf ihre Eignung zur serologischen Unterscheidung zwischen HSV-1- und HSV-2-Infektionen evaluiert. Zusätzlich wurden sieben typenspezifische und ein nicht-typenspezifischer ELISA zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen HSV erprobt. Schließlich wurde eine seroepidemiologische Auswertung von im Rahmen der Routinediagnostik auf typenspezifische HSV-Antikörper untersuchten Patientenproben unter Kenntnis der Leistungscharakteristika des verwendeten ELISA vorgenommen.

Material und Methoden

Untersucht wurden zur Testevaluierung 176 Serumproben von 151 Patienten im Alter zwischen zwei und 79, im Durchschnitt 38,7 Jahren. Die Proben stammten aus der serologischen Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Virologie in Frankfurt am Main und waren bis zur Testung bei –20 °C gelagert worden.

Bei 36 der untersuchten Patienten lag eine iatrogene oder krankheitsbedingte Immunsuppression vor: 21 Patienten befanden sich in fortgeschrittenen Stadien der HIV-Infektion, acht waren nieren-, herz- oder lebertransplantiert und zwei litten an einer Leukämie, davon war einer knochenmarkstransplantiert.

Bei neun Patienten wurde aufgrund der Klinik und eines positiven Virusnachweises im Abstrich bei

Nicht standardisierte Abkürzungen: ATCC, American type culture collection; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HSV, Herpes simplex Virus; MW, molecular weight; SDS, sodium dodecyl sulfate.

Tabelle 1 Charakteristika der evaluierten ELISA-Antikörper-Testsysteme

Test Nr.	Hersteller	Typ	Antigen	Probenverdünnung	Konjugat/Substrat	Rheumafaktor Absorption (IgM)
1	BAG	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	G (ATCC) MS (ATCC)	1:101	anti-human IgG/M (Schaf):POD /TMB	BAG IgM-SEP-System (rekombinantes Protein G)
2	Fresenius	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	McIntyre (ATCC) St. Jeor (ATCC)	1:21	anti-human IgG/M (Ziege):AP/ p-NPP	(kein RF-Absorbens)
3	Sorin	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	F (ATCC) G (ATCC)	1:101	anti-human IgG/M (Ziege):POD/ TMB	(kein RF-Absorbens)
4	Novum	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	McIntyre (ATCC) MS (ATCC)	1:101	anti-human IgG/M (Kaninchen): HRPO/ TMB	(kein RF-Absorbens)
5	Biermann (Genoclin)	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	5821 1 (ATCC) keine Angabe	1:101	anti-human IgG/M (Schaf):HRPO/ TMB	RF-beschichtete Absorbensröhrchen
6	Virotech	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	2LP D316	Serum: 1:101 Liquor: 1:2	anti-human IgG/M (Schaf): POD/ TMB	RF-Sorbotech (anti-human-IgG (Ziege))
7	in vitro	HSV-1 HSV-2 IgG/IgM	McIntyre (ATCC) MS (ATCC)	1:100	anti-human IgG/M (Ziege):HRPO/ TMB	anti-human-IgG-Fc (Schaf) (Behring)
8	Radim	HSV-1 HSV-2 IgG	McIntyre (ATCC) Glykoprotein gG-2	1:300	anti-human IgG (Ziege):HRPO/ TMB	(kein IgM-Test)
9	Behring	HSV IgM	McIntyre (ATCC) (nur HSV-1)	1:42	anti-human IgM (μ -Ketten-spezif.; Ziege):POD / TMB	anti-human-IgG-Fc (Schaf)

gleichzeitiger typspezifischer anti-HSV-Serokonversion die Diagnose einer primären HSV-Infektion gestellt; in sechs Fällen handelte es sich um HSV-1, in dreien um HSV-2, wobei serologisch kein Hinweis auf eine vorbestehende Infektion mit dem jeweils anderen HSV-Typ bestand.

Ferner wurden 19 Liquor cerebrospinalis- und Serumproben von sechs Patienten mit klinischem Verdacht auf Herpes simplex-Enzephalitis untersucht; in dreien dieser Fälle war die Diagnose durch den Nachweis HSV-spezifischer Genomsequenzen im Liquor mittels Polymerase-Kettenreaktion gesichert.

Unter den 176 getesteten Seren befanden sich 48 sogenannte „tricky sera“ mit zu erwartender falsch positiver Reaktivität insbesondere in den IgM-Tests ohne klinischen Anhalt für eine floride Infektion mit HSV-1 oder HSV-2. Zehn Seren stammten von Patienten mit hochtitrigen Rheumafaktoren (Titer höher als 1:320, zusätzlich in den meisten Fällen antinukleäre Antikörper), 38 von Patienten im akuten Stadium einer Infektion mit den folgenden Erregern und positiven Nachweisen von entsprechenden IgM-Antikörpern: Hepatitis A- (2 Patienten), Hepatitis B- (3 Pat.) und Hepatitis C-Virus (1 Pat.), Cytomegalievirus (5 Pat.), Parvovirus B19 (3 Pat.), Epstein-Barr-Virus (5 Pat.), Varizella-Zoster-Virus (14 Pat.), Humanes Herpesvirus-6 (1 Pat.), Masernvirus (1 Pat.), Mumpsvirus (1 Pat.) und Rötelnvirus (2 Pat.).

Aus den Abstrichproben wurde HSV in Zellkultur (Vero-Zellen-Monolayer) isoliert; wenn ein zytopathischer Effekt (CPE) bei etwa 50% der Zellen sichtbar wurde, erfolgte die Typisierung unter Verwendung des Syva Mikro Trak[®] HSV1/HSV2 Culture Identification/Typing-Test (Syva Company, CA, USA): Dabei wurden die fixierten Vero-Zellen jeweils mit Fluorescein-Isothiocyanat-markierten monoklonalen Antikörpern (anti-HSV-1: anti-glycoprotein C complex, MW = 80–120 kDa; anti-HSV-2: anti-HSV-2-specific induced protein (Ribonukleotid-Reduktase), MW = 140 kDa, anti-HSV-2 glycoprotein gB, MW = 120–130 kDa) inkubiert und nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Markerantikörper fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, wobei positive Zellen eine grün fluoreszierende zytoplasmatische Färbung aufwiesen gegenüber einer roten Gegenfärbung nicht-infizierter Zellen.

Eine Übersicht über die untersuchten kommerziellen ELISA-Testsysteme, die darin verwendeten Antigene, Konjugate und Substrate enthält Tabelle 1. Bis auf einen Test (Radim HSV-2), der auf dem aufgereinigten HSV-2-Glykoprotein gG-2 basiert, verwenden alle ELISA-Tests Vollvirus-Antigene verschiedener Stämme (siehe Tabelle 1).

Der Western blot wurde präpariert wie von Rabenau et al: beschrieben [19]. In kurzer Zusammenfassung: Referenzstämme von HSV-1 (McIntyre, ATCC) und

HSV-2 (MS, ATCC) wurden auf Vero-Zell-Kulturen mit Hank's Minimum Essential Medium plus 1% fötalem Kälberserum angezüchtet, bis ca. 90% der Zellen einen zytopathogenen Effekt (CPE) zeigten. Nach Lyse der Zellen durch dreimaligen Gefrier-Tau-Zyklus (-70 °C) wurden die Viruspartikel durch Zentrifugation des Zellkultur-Überstandes bei 4 °C und 2400 g über 10 Minuten und Ultrazentrifugation des Überstandes bei 4 °C und 40.000 g über 12 Stunden gereinigt und konzentriert. Die Präparation der Zellkontrollen erfolgte in analoger Weise unter Verwendung uninifizierter Zellen. Anschließend wurde das Vollvirusantigen durch Inkubation mit Natriumdodecylsulfat (SDS)-Probenpuffer (0,01 mmol Tris-HCl, pH 8,0, 0,001 mol/l EDTA, 1% Mercaptoäthanol, 2% SDS) bei 100 °C über 5 Minuten denaturiert. Die Elektrophorese der Strukturproteine erfolgte unter Verwendung des PhastSystem™ (Pharmacia, Schweden) auf 8–25% Phast-Gradientengelen, wobei Markerproteine (Pharmacia, Schweden) mitliefern und nach Silbernitrat-Färbung die Identifizierung der Virusproteine nach ungefährem Molekulargewicht erlaubten. Der Western blot wurde entsprechend der von Braun und Abraham [31] beschriebenen Methode durchgeführt. Das Gel wurde über Nacht auf eine PVDF-Membran (Imobilon™, Porengröße 0,45 µm) positioniert. Die so entstandenen Western blot-Streifen wurden bei -70 °C gelagert oder direkt verwendet.

Nach 30minütiger Inkubation mit Blocking-Lösung (bovines Serumalbumin 2%, Ziegen Serum 5%, NaCl 0,2 mmol/l, Thimerosal 0,01%, Tris 0,02 mmol/l, Tween 20 0,2%, pH 7,45) wurden die Western blot-Streifen über Nacht bei 4 °C mit den zu untersuchenden Seren in einer Verdünnung von 1:40 inkubiert. Nach drei Waschsritten wurden sie mit murinem monoklonalem Anti-Human-IgG-Antikörper (Dianova) inkubiert, anschließend wieder dreimal gewaschen und mit biotinyliertem monoklonalem Anti-Maus-IgG-Antikörper von der Ziege (Dianova) und nach erneutem dreimaligen Waschen mit Streptavidin-Peroxydase inkubiert, jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur. Wiederum nach einem Waschsritt wurde Aminoethyl-carbazol plus 0,1% H₂O₂ als Substrat zugegeben.

Zur Ermittlung der Seroprävalenzraten wurden die 3527 im Zeitraum April 1994 bis September 1995 an unserem Institut im Rahmen der virusdiagnostischen

Routine durchgeführten Erstuntersuchungen auf anti-HSV-1- und anti-HSV-2-Antikörper in Serumproben ausgewertet. In der Routinediagnostik wurde der HSV-Antikörper-ELISA der Firma Radim verwendet.

Ergebnisse

Auf der Grundlage von HSV-Nachweisen und -Typisierungen aus Abstrichmaterial (bezüglich der Positivität) und der unten ausgeführten Western blot-Ergebnisse aus Serumproben (bezüglich der Seronegativität) erfolgte die Einteilung von 130 der untersuchten Sera entsprechend der HSV-Infektionskonstellation:

- isoliert HSV-1-positiv (d. h. HSV-1 isoliert aus Abstrich, keine anti-HSV-2-Reaktivität im Western blot): 54 Seren;
- isoliert HSV-2-positiv (d. h. HSV-2 isoliert aus Abstrich, keine anti-HSV-1-Reaktivität im Western blot): 5 Seren;
- HSV-1-positiv und HSV-2-positiv (d. h. HSV-1 und HSV-2 isoliert aus verschiedenen Abstrichen): 48 Seren;
- weder HSV-1-positiv noch HSV-2-positiv (weder anti-HSV-1- noch anti-HSV-2-Reaktivität im Western blot, keine positive Abstrichuntersuchung): 23 Seren.

Sensitivität und Spezifität der acht untersuchten ELISA-IgG-Testsysteme unter Zugrundelegung der oben aufgeführten Serenkollektive zeigt Tabelle 2. Für anti-HSV-1 IgG lag die Sensitivität aller Tests bei mindestens 85%, sechs erreichten 100%. Die Spezifität lag zwischen 57% und 100%. Generell zeigt sich bei den auf Vollvirusantigen basierenden anti-HSV-2 IgG-ELISA-Tests eine mehr oder minder hohe Rate von kreuzreagierenden Seren für anti-HSV-1 IgG; die Spezifität der verschiedenen Tests liegt zwischen 48% und 91%. Umgekehrt werden so gut wie alle Seren, bei denen aufgrund positiver Abstrichergebnisse Antikörperaktivitäten gegen HSV-2 zu erwarten sind, von den auf Vollvirusantigen beruhenden Testkits erkannt, die Sensitivitäten von nahezu 100% erreichen (bis auf einen Test mit 83% und einen mit sogar nur 35%). Der auf HSV-2-Glykoprotein gG-2 basierende Radim-Test weist eine gegenüber den übrigen Tests deutliche bessere Spezifität (100%) bei gleichzeitig jedoch sehr niedriger Sensitivität von nur 52% auf. Allein dieser Test vermag in nahezu allen untersuchten Fällen zwi-

Tabelle 2 Sensitivität und Spezifität der anti-HSV-1- und anti-HSV-2-IgG-ELISA Testsysteme

Hersteller	BAG	Fresenius Sorin	Novum	Biermann Virotech	in vitro	Radim
anti-HSV-1-IgG-ELISA-Tests						
Sensitivität in %	100	100	100	85	100	86
Spezifität in %	93	74	67	76	93	57
anti-HSV-2-IgG-ELISA-Tests						
Sensitivität in %	83 *	100	100	98	98	100
Spezifität in %	91	50	48	58	61	58
						82
						100

Tabelle 3 Schema der Bandenreaktivitäten der verschiedenen Serenkollektive im HSV-1- und HSV-2-Western blot

	kDa	anti-HSV-1 positiv	anti-HSV-1/-2 positiv	anti-HSV-2 positiv	anti-HSV-1/-2 negativ
HSV-1 Western blot	30-45	x x x x x	x x x x x x x x x x x x x x		(x)
	48	x x x x x x x x x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x x x x x x x x x		
	45-66	x x x x x x x x x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x x x x x x x x x		
	45-66		x		(x)
	70	x	x x x x x		(x)
	88	x			
	94	x x x x x x x x x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x x x x x x x x x		(x)
	94-116	x x x x		x	
HSV-2 Western blot	30-45		x x x x x		
	30-45		x x		x
	30-45		x x x x x x x x x		x x x x x
	45-66	(x)	x x x x x x x x x x x x x x		x x
	45-66		x x x x x x x x x		
	45-66		x x x x x		
	45-66		x x x x		x x x x
	66		x x x x x x x x		x x x x x
	92	(x) (x) (x)	x x x x x x x x x x x x x x x x x x		x x x x x
	100	(x) (x)	x x x x x x x x		
	110				x

Tabelle 4 Prozentuale Häufigkeit der Bandenreaktivitäten der verschiedenen Serenkollektive im HSV-1- und HSV-2-Western blot

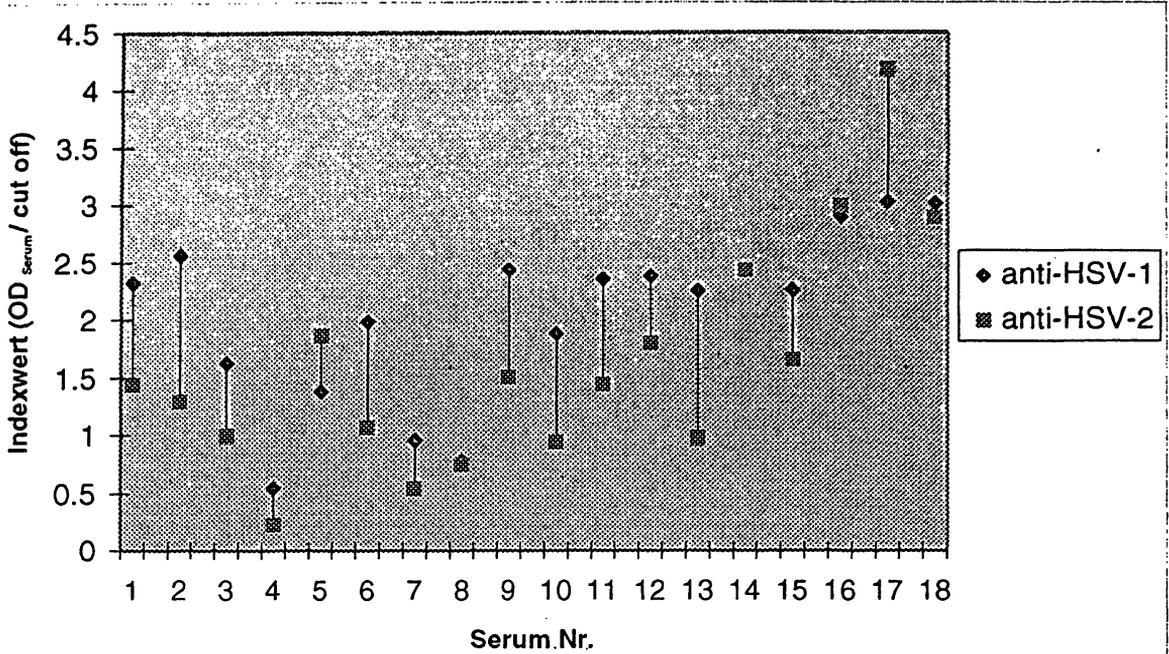
Molekulargewicht/kDa	anti-HSV-1 positiv n = 14	anti-HSV-1/-2 positiv n = 18	anti-HSV-2 positiv n = 5	anti-HSV-1/-2 negativ n = 5
anti-HSV-1 Western blot				
30-45	36%	72%	20%	0%
48	93%	100%	0%	0%
45-66	0%	72%	0%	0%
45-66	100%	6%	20%	0%
70	7%	17%	20%	0%
88	7%	100%	0%	0%
94	100%	100%	20%	0%
94-116	29%	0%	20%	0%
anti-HSV-2 Western blot				
30-45	0%	28%	0%	0%
30-45	0%	11%	20%	0%
30-45	0%	44%	100%	0%
45-66	7%	67%	40%	0%
45-66	0%	22%	0%	0%
45-66	0%	22%	0%	0%
45-66	0%	17%	80%	0%
66	0%	39%	100%	0%
92	21%	100%	100%	0%
100	14%	33%	0%	0%
110	0%	0%	20%	0%

schen einer Infektion nur mit HSV-1 und nur mit HSV-2 zu differenzieren; er zeigt allerdings bei HSV-1/-2-Koinfektionen einen hohen Anteil falsch-negativer anti-HSV-2-Ergebnisse.

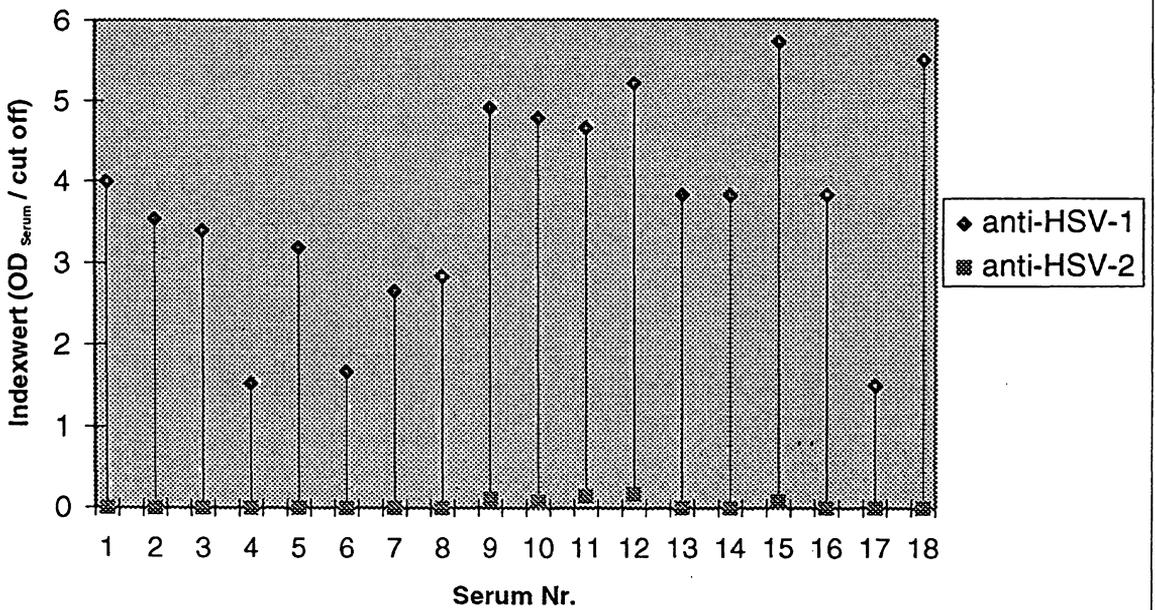
In den Abbildungen 1 bis 3 sind die Indexwerte, d. h. die Quotienten aus den Extinktionswerten der Proben und dem jeweiligen cut off-Wert, für jeweils

einige nur anti-HSV-1-positive (Abb. 1), nur anti-HSV-2-positive (Abb.2) und anti-HSV-1- und -2-positive (Abb. 3) Seren in den verschiedenen ELISA-IgG-Testen graphisch dargestellt.

Die Ergebnisse der im Western blot untersuchten Seren sind in Tabellen 3 und 4 aufgeführt. Tabelle 3 zeigt die Western blot-Bandenreaktivität der verschie-

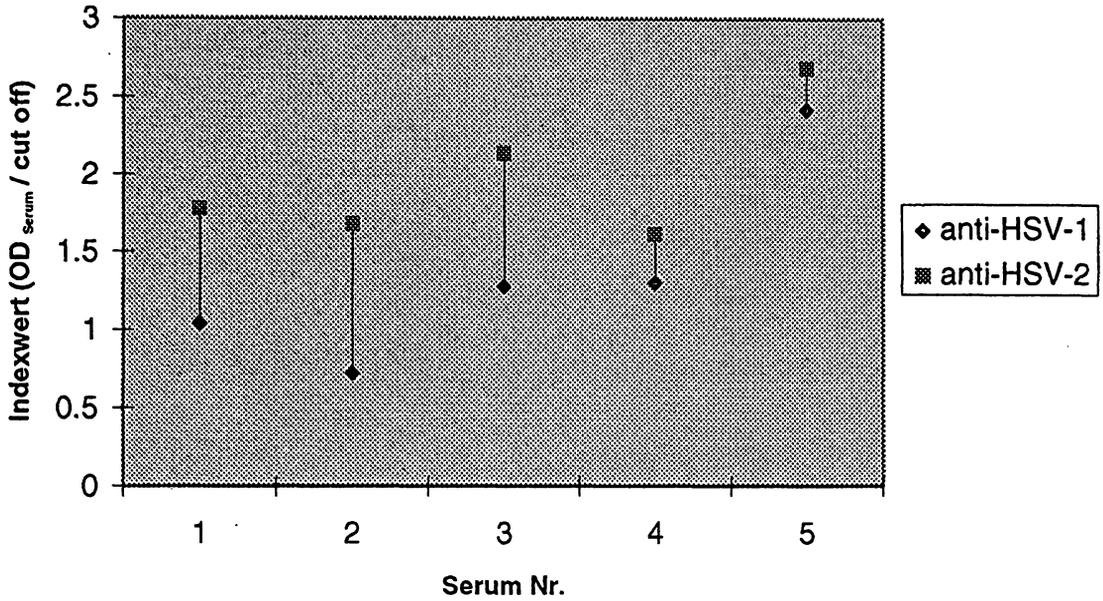


ELISA mit Vollvirusantigenen für HSV-1 und HSV-2 (Biermann)

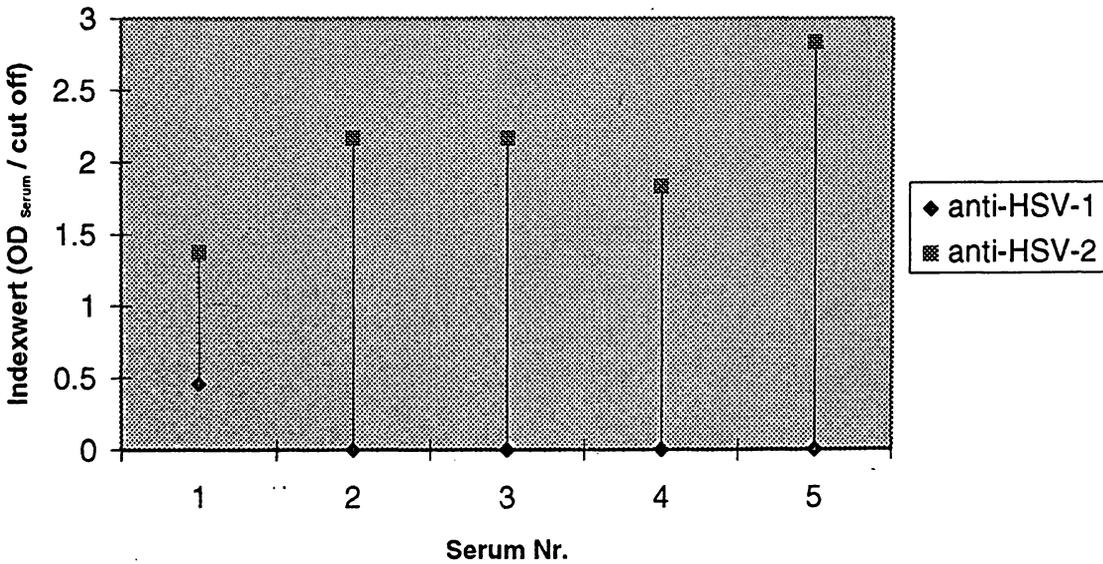


ELISA mit gereinigtem gG-2 als Antigen für HSV-2 (Radim)

Abbildung 1 Ergebnisse der typenspezifischen ELISAs: HSV-1-positive und HSV-2-negative Seren

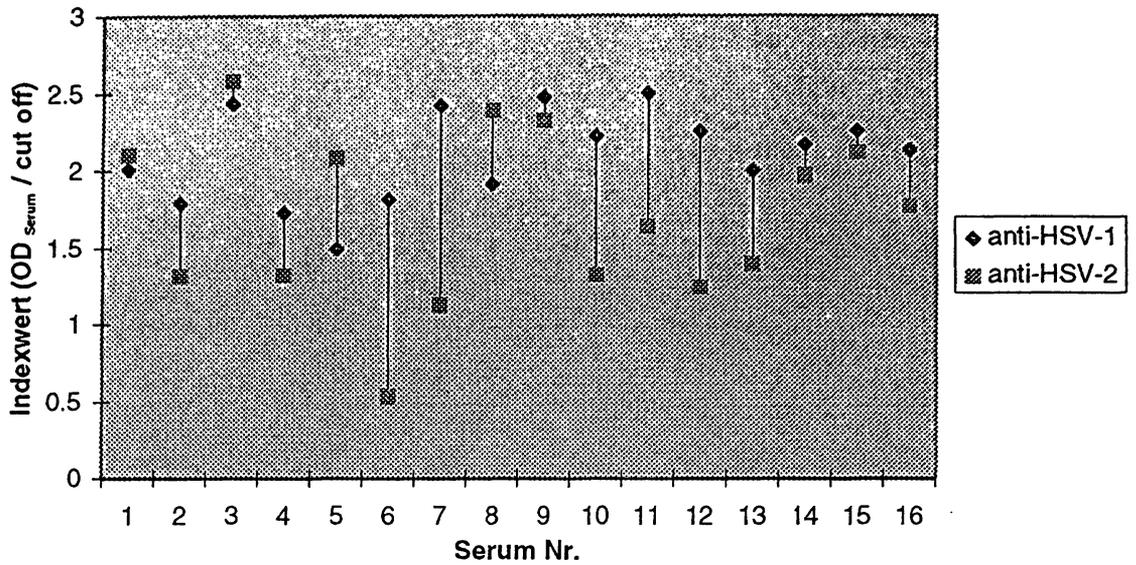


ELISA mit Vollvirusantigenen für HSV-1 und HSV-2 (Biermann)

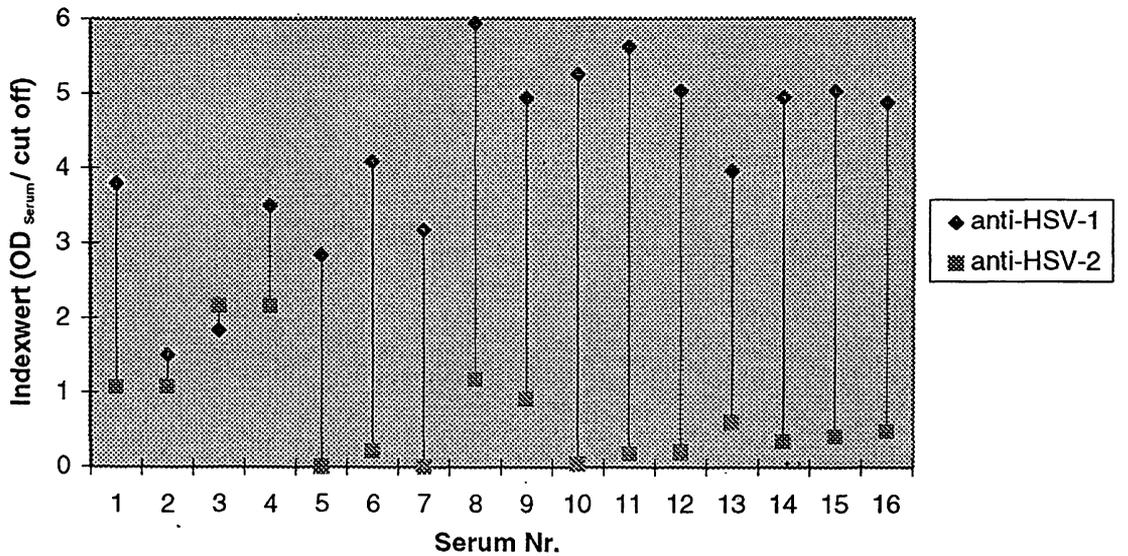


ELISA mit gereinigtem gG-2 als Antigen für HSV-2 (Radim)

Abbildung 2 Ergebnisse der typenspezifischen ELISAs: HSV-1-negative und HSV-2-positive Seren



ELISA mit Vollvirusantigen für HSV-1 und HSV-2 (Biermann)



ELISA mit gereinigtem gG-2 als Antigen für HSV-2 (Radim)

Abbildung 3 Ergebnisse der typenspezifischen ELISAs: HSV-1-positive und HSV-2-positive Seren

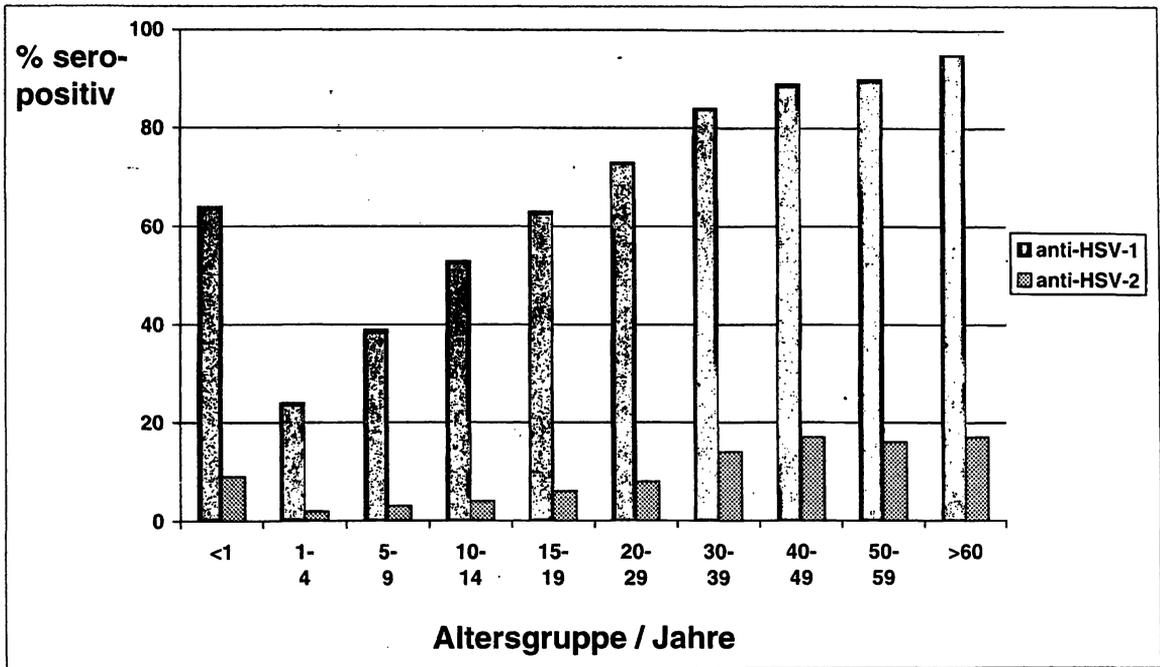


Abbildung 4 Anti-HSV-1- und anti-HSV-2-Antikörper-Seroprävalenz nach Altersgruppen bei n = 3527 Patienten des Universitätsklinikums Frankfurt a. M. 1994/95

denen Serenkollektive schematisch, Tabelle 4 die prozentuale Aufgliederung der Western blot-Bandenreaktivitäten. Bei erwartungsgemäß vorhandener Kreuzreaktivität läßt sich dennoch eine klare Unterscheidung treffen zwischen den nur anti-HSV-1-, den nur anti-HSV-2- und den sowohl anti-HSV-1- als auch anti-HSV-2-positiven Seren.

Bei den 36 immunsupprimierten Patienten fand sich kein Hinweis auf fehlende Seroreaktivität. Bei HSV-Infektionen (dies gilt vor allem für HSV-1) kann man aufgrund der Epidemiologie davon ausgehen, daß die Infektion und damit die Antikörperantwort in den allermeisten Fällen vor der Immunsuppression stattgefunden hat.

Bei Serumproben, die in engem zeitlichem Abstand zu einem positiven HSV-Nachweis aus einem Abstrich entnommen wurden, ließ sich in keinem Fall eine IgM-Reaktivität feststellen. Es handelte sich demnach um rekurrende Infektionen [32]. Bei neun Primärinfektionen (erste Serumprobe Antikörper-negativ, zweite Serumprobe nach positivem Virusnachweis im Abstrich positiv) war hingegen anti-HSV-IgM nachweisbar.

Ein wechselnder Anteil der „tricky sera“ war positiv in den HSV-1-IgM-ELISAs im Sinne einer unspezifischen oder Kreuzreaktivität; bei den HSV-2-IgM-ELISAs lag der Anteil der positiven „tricky sera“ jeweils deutlich niedriger, möglicherweise erklärlich durch die niedrigere Prävalenz von HSV-2- gegenüber HSV-1-IgG-Antikörpern in diesem Kollektiv (siehe Tabelle 5) [33].

Bei den sechs Patienten mit klinischem Verdacht auf Herpesenzephalitis waren in sämtlichen Seren Antikörper gegen HSV-1 nachweisbar. In drei Fällen wurde aufgrund des positiven Nachweises HSV-spezifischer Genomsequenzen im Liquor mittels HSV-PCR die Diagnose einer Herpes-Enzephalitis gesichert [11]. Der Antikörper-ELISA der Firma Virotech war stets positiv für HSV-Antikörper. Dieser Test setzt Liquor in einer fünfzigmal niedrigeren Verdünnung ein als Serum (1:101 für Serum, 1:2 für Liquor), die anderen Tests verwenden dagegen Liquor in der gleichen Verdünnung wie Serum. Der anti-HSV-ELISA von Radim wies in drei von sechs Fällen ein positives Ergebnis auf, alle anderen nur in zwei Fällen.

Die in der Routinediagnostik am Institut für Medizinische Virologie im Zeitraum von April 1994 bis August 1995 bei 3527 Patienten durchgeführten Erstuntersuchungen auf anti-HSV-1 und anti-HSV-2 mit dem ELISA der Firma Radim ergaben eine Seroprävalenz für HSV-1-Antikörper von 76,4% ohne Altersgruppierung. Die Altersverteilung zeigt typischerweise eine hohe Seroprävalenz bei Neugeborenen und Säuglingen unter einem Jahr durch diaplazentär übertragene Antikörper der Mutter (63,7%). Die Seroprävalenz für anti-HSV-1 nimmt danach mit dem Alter zu, von 24,4% bei Kleinkindern zwischen 1 und 4 Jahren bis auf 94,3% bei Erwachsenen über 60 Jahren (siehe Abbildung 4).

Für Antikörper gegen HSV-2 liegt die Seroprävalenz bei diesem Kollektiv bei 12,1% ohne Altersgruppierung. Die Altersverteilung zeigt auch hier einen An-

Tabelle 5 Ergebnisse der HSV-1- und HSV-2-IgM-Testungen der 48 „tricky sera“

Hersteller	anti-HSV-1-IgM			anti-HSV-2-IgM		
	+	±	-	+	±	-
BAG	30%	10%	60%	8%	0%	92%
Fresenius	23%	6%	71%	15%	8%	77%
Sorin	34%	4%	62%	25%	0%	75%
Novum	29%	6%	65%	15%	4%	81%
Biermann	17%	4%	79%	8%	4%	88%
Virotech	35%	29%	35%	2%	13%	85%
anti-HSV-IgM (nicht typenspezifisch)						
Behring	+	±	-			
	4%	4%	92%			

stieg der Seroprävalenzrate mit dem Alter, insbesondere postpubertär. Zwischen dem 1. und dem 14. Lebensjahr liegt die Seroprävalenz zwischen 0,8 und 4,0%. Danach steigt sie an bis zu 18,1% bei den über 60jährigen. Die Seroprävalenz der Neugeborenen und Säuglinge (0-11 Monate) liegt durch die IgG-Antikörper der Mutter bei 9,5% (siehe Abbildung 4). Diese Prävalenzraten für anti-HSV-2 muß man nach den oben genannten Ergebnissen über die Sensitivität des anti-HSV-2-Tests der Firma Radim vorsichtig bewerten, da dieser Test einen hohen Anteil (etwa 50%) falsch negativer Ergebnisse aufweist. Die Prävalenzrate für HSV-2-Antikörper in der Bevölkerung ist also in Wirklichkeit höher anzunehmen. Diese Ergebnisse sind allerdings als nicht repräsentativ für die deutsche Bevölkerung zu bewerten, da die Einsendungen des Instituts für Medizinische Virologie das Patientengut der Universitätsklinik Frankfurt a. M. mit einem überproportional hohen Anteil von Risikogruppen-Zugehörigen widerspiegeln (HIV-Infizierte, Immunsupprimierte, chronisch Kranke etc.).

Diskussion

Das bekannte Problem der ausgeprägten Kreuzreaktivität zwischen anti-HSV-1- und anti-HSV-2-Antikörpern aufgrund der hochgradigen Antigenverwandtschaft zwischen den beiden HSV-Typen tritt in den verwendeten Testsystemen klar zutage. Eine sichere antikörperserologische Typendifferenzierung ist mit den auf der Grundlage von Vollvirusantigenen arbeitenden ELISA-Tests nicht möglich, da die Rate der kreuzreaktiven (falsch positiven) Testergebnisse bis zu 52% erreicht, d. h. nur 48% der positiv reagierenden Seren weisen wirklich eine Infektion mit dem entsprechenden HSV-Typ auf. Andererseits wird bei Sensitivitätsraten (mit einer Ausnahme) zwischen 83% und 100% nur selten eine über Antigentypisierung bewiesene Infektion nicht erkannt. Wie aus der Darstellung der Indexwerte ersichtlich, ist auch bei einer Verschiebung des cut off-Wertes keine Verbesserung der Spezifität bei gleichbleibender Sensitivität möglich.

Im Gegensatz dazu ist die Spezifität des auf gereinigtem HSV-2-Glykoprotein gG-2 basierenden Radim-Tests maximal, was jedoch auf Kosten der Sensitivität geht; diese erreicht nur 52%, d. h. die knappe Hälfte der HSV-2-Infektionen werden antikörperserologisch nicht erfaßt, insbesondere bei gleichzeitiger anti-HSV-1-Antikörperreaktivität. Eine mögliche Ursache könnte in der beschriebenen Reduktion der Antikörperbildung bei vorbestehender Infektion mit HSV-1 liegen [34]. Hier ist durch eine Anpassung des cut off-Wertes eine Erhöhung der Sensitivität ebenfalls nicht zu erreichen (Abb. 1, 2, 3).

Der Western blot hingegen scheint trotz vorhandener Kreuzreaktivitäten eine Typendiagnose in den meisten Fällen zu ermöglichen; die Abgrenzung einzelner reaktiver Antigenbanden ist im Einzelfalle zwar schwierig, doch zeigt die schematische (Tab. 3) wie prozentuale (Tab. 4) Aufstellung der Bandenreaktivitäten, daß die sichere Zuordnung eines Serenkollektivs möglich ist [35,36,37,38,39, 40,15,29,41,42].

Letztlich wird die Entscheidung für einen der auf dem Markt erhältlichen HSV-typenspezifischen Antikörper-ELISA-Tests davon abhängen, ob man sich auf Kosten der Spezifität einer maximalen Sensitivität versichern will oder ob eine hohe Spezifität gewünscht ist, wofür eine niedrigere Sensitivität in Kauf genommen wird.

Wie aufgrund einer Reihe von Publikationen zu erwarten, hat der Nachweis von HSV-spezifischen Antikörpern der Klasse IgM nur im Rahmen einer akuten Erstinfektion eine Bedeutung, während der IgM-Nachweis bei Reaktivierungen meist nicht gelingt. Im Rahmen einer Herpes simplex-Enzephalitis trägt – neben der Testung auf HSV-spezifisches IgG im Liquor cerebrospinalis zum Nachweis einer autochthonen Antikörperproduktion – auch der Nachweis von intrathekalem HSV-IgM und -IgG zur Diagnosestellung bei; allerdings ist sein Stellenwert nach Verfügbarkeit der HSV-PCR, welche eine praktisch sofortige Diagnosestellung erlaubt, nur mehr reduziert [32].

Eine befriedigende Spezifität läßt sich bei Testung eines Kollektivs problematischer, d. h. in hohem Maße zu unspezifisch positiven IgM-Ergebnissen neigender Seren nur durch vorherige Absorption von Rheu-

mafaktoren ermöglichen, wie auch in vorliegender Studie wieder deutlich wurde. Insgesamt ist jedoch der Wert typenspezifischer IgM-ELISA-Tests kritisch zu betrachten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der ideale HSV-typenspezifische ELISA noch nicht verfügbar ist und je nach hauptsächlichem Einsatzzweck zwischen einer möglichst hohen Sensitivität oder einer möglichst hohen Spezifität gewählt werden muß. Für die HSV-IgM-Diagnostik halten wir die Verwendung eines nicht-typenspezifischen ELISA für empfehlenswert, denn hierbei sind eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität von ausschlaggebender Bedeutung für eine sinnvolle Diagnostik, während die Typdifferenzierung mittels IgG-ELISA uns vollkommen ausreichend erscheint.

Danksagung

Ich danke Herrn *Matthias Besel* für seine fachkundige Hilfe bei der Durchführung der Western blots sowie Herrn *Wolfgang Preiser* für die wertvolle fachliche Beratung.

Literatur

- Schneeweis KE, Brandis H. Typendifferenzierung beim Herpes simplex Virus. Zentralbl Bakteriologie Parasitologie Infektionskrankheiten 1961;183:556-8.
- Cleator GM und Klapper PE. Herpes simplex. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, editors. Principles and Practice of Clinical Virology. Third Edition. Chichester (UK): J. Wiley & Sons, 1995:7-36.
- Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. N Engl J Med 1995;332:1181-5.
- Doerr HW, Rau M, Schmitz H. Typing of Herpesvirus simplex hominis 1 and 2 by Indirect Immunofluorescence. Med Microbiol Immunol 1974;159:137-40.
- Kühn J, Biber M, Doerr HW, Braun R. Diagnostik der Herpes-Simplex-Virus (HSV)-Infektion. Ärztl Lab 1986;32:91-8.
- Wutzler P. Herpes-Simplex-Virus. In: Porstmann T (Hrsg.): Diagnostische Bibliothek, Nr. 8 und Nr. 9. Berlin (DE):Blackwell-Verlag, 1992.
- Cohen PR. Tests for Detecting Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus Infections. Derm Clin 1994;12:51-68.
- Puchhammer-Stöckl E, Popow-Kraupp T, Heinz FX, Mandl CW, Kunz C. Establishment of PCR for the Early Diagnosis of Herpes Simplex Encephalitis. J Med Virol 1990;32:77-82.
- Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. Lancet 1991;337:189-92.
- Pohl-Koppe A, Dahm C, Elgas M, Kühn JE, Braun RW, ter Meulen V. The Diagnostic Significance of the Polymerase Chain Reaction and Isoelectric Focusing in Herpes Simplex Virus Encephalitis. J Med Virol 1992;36:147-54.
- Sakrauski A, Weber B, Kessler HH, Pierer K, Doerr HW. Comparison of two hybridization assays for the rapid detection of PCR amplified HSV genome sequences from cerebrospinal fluid. J Virol Meth 1994;50:175-84.
- Doerr HW, Preiser W, Weber B. Neue Entwicklungen in der antiviralen Chemotherapie. Immun Infekt 1993;21:170-6.
- Preiser W, Weber B, Klös G, Fischer PA, Doerr HW. Unusual course of herpes simplex virus encephalitis after acyclovir therapy. Infection 1996 (im Druck).
- Mertz GJ. Epidemiology of Genital Herpes Infections. Infect Dis Clin North Am 7 1993;7:825-39.
- Ashley RL, Corey L. Herpes simplex viruses. In: Schmitt NJ, Emmons RW, editors. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 6. ed. Washington (USA): American Public Health Association, 1989:265-317.
- Enderes G. Virusinfektionen. In: Thomas L, editor. Labor und Diagnose, 4. Auflage. Marburg (DE):Medizinische Verlagsgesellschaft, 1992:1545-1630.
- Ashley RL, Dalessio J, Burchett S, Brown Z, Berry S, Mohan K, Corey L. Herpes simplex virus-2 (HSV-2) type-specific antibody correlates of protection in infants exposed to HSV-2 at birth. J Clin Invest 1992;90:511-4.
- Landry ML, Zibello TA. Ability of Herpes Simplex Virus (HSV) Types 1 and 2 To Induce Clinical Disease and Establish Latency Following Previous Genital Infection with the Heterologous HSV Type. J Inf Dis 1988;158:1220-6.
- Rabenu H, Eibner J, Weber B, Bahrndt B, Doerr HW. Detection of herpes simplex virus (HSV) type specific antibodies by a microtechnique Western blot assay. Lab med 1992;16:327-31.
- Reeves WC, Corey L, Adams HG, Vontour LA, Holmes KK. Risk of Recurrence After Episodes of Genital Herpes. Relations to HSV Type and Antibody Response. N Engl J Med 1981;5: 315-9.
- Koutsky LA, Ashley RL, Holmes KK, Stevens CE, Critchlow CW, Kiviat N, Lipinski CM, Wolner-Hanssen P, Corey L. The frequency of unrecognized type 2 herpes simplex infection among women. Implications for the control of genital herpes. Sex Transm Dis 1990;17:90-4.
- Doerr HW, Lehmail H, Schmitz H, Kampa D, Luthardt T. Simple mathematical deductions in the seroepidemiology of viral infections. I. Herpesvirus group (Herpesvirus hominis, Varicella-Zoster-Virus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr-Virus). Zbl Bakt. I. Abt Orig A 1977;238:149-64.
- Johnson RE, Nahmias AJ, Magder LS, Lee FK, Brooks C, Snowden CB. A Seroepidemiologic Survey of the Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in the United States. N Engl J Med 1989;321:7-12.
- Bahrndt B, Rabenu H, Weber B, Eibner J, Doerr HW. Prävalenz Herpes-simplex-Virus-Typ-2-spezifischer Antikörper bei Personen mit unterschiedlichem Infektionsrisiko. Z Hautkr 1992; 67:56-8.
- Cunningham AL, Lee FK, Ho DWT, Field PR, Law CLH, Packham DR, McCrossin D, Sjögren-Jansson E, Jeansson S, Nahmias A. Herpes simplex virus type 2 antibody in patients attending antenatal and STD clinics. Med J Aust 1993;158:525-8.
- Nahmias AJ, Lee FK, Beckmann-Nahmias S. Sero-epidemiological and -sociological Patterns of Herpes Simplex Virus Infection in the World. Scand J Infect Dis Suppl 1991;69:19-36.
- Dannenmaier B, Alle W, Hoferer EW, Lorenz D, Oertel P-J, Doerr HW. Incidences of antibodies to hepatitis B, herpes simplex and cytomegalovirus in prostitutes. Zbl Bakt Hyg A 1985; 259:275-83.
- Doerr HW, Schmitz H, Petersen EE. Antikörperbildung gegen das Nukleokapsid und das Envelope des Herpes simplex Virus hominis. Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig A 1974;227:348-54.
- Ashley RL, Militoni J, Lee F, Nahmias A, Corey L. Comparison of Western Blot (immunoblot) and Glycoprotein G-Specific Immunodot Enzyme Assay for Detecting Antibodies to Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in Human Sera. J Clin Microbiol 1988;26:662-67.
- Field PR, Ho DWT, Irving WL, Isaacs D, Cunningham AL. The reliability of serological tests for the diagnosis of genital Herpes: A critique. Pathology 1993;25:175-9.
- Braun W, Abraham R. Modified diffusion blotting for rapid and efficient protein transfer with PhastSystem. Electrophoresis 1989; 10:249-53.
- Doerr HW, Gross G, Schmitz H. Neutralizing Serum IgM Antibodies in Infections with Herpes simplex Virus Hominis. Med Microbiol Immunol 1976;162:183-92.
- Juto P, Settergren B. Specific serum IgA, IgG and IgM antibody determination by a modified indirect ELISA-technique in primary and recurrent herpes simplex virus infection. J Virol Meth 1988;20:45-56.
- McClung H, Seth P, Rawls WE. Relative concentrations in human sera of antibodies to cross-reacting and specific antigens of Herpes simplex virus types 1 and 2. Am J Epidemiol 1976; 104:192-201.
- Norrild B. Immunochemistry of Herpes Simplex Virus Glycoproteins. Curr Top Microbiol Immunol 1980;90:67-106.

36. Eberle R, Courtney RJ. Assay of Type-Specific and Type-Common Antibodies to Herpes simplex Virus Types 1 and 2 in Human Sera. *Infection and Immunity* 1981;31:1062-70.
37. Pereira L, Klassen T, Baringer JR. Type-Common and Type-Specific Monoclonal Antibody to Herpes Simplex Virus Type 1. *Infect Immun* 1980;29:724-32.
38. Pereira L, Dondero DV, Gallo D, Devlin V, Woodie J. Serological Analysis of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 with Monoclonal Antibodies. *Inf Immun* 1981;35:363-67.
39. Ashley RL, Benedetti J, Corey L. Humoral Immune Response to HSV-1 and HSV-2 Viral Proteins in Patients With Primary Genital Herpes. *J Med Virol* 1985;17:153-66.
40. Simmonds P, Smith IW, Peutherer JF. Detection of Antibody to Viral Proteins Following Primary Infection With Herpes Simplex Virus. *J Med Virol* 1987;23:191-205.
41. Rabie-Finger H, Valentine-Thon J, Steinmann J, Nehrkom A. Serological responses to Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) analysed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot (WB). *Acta Virol* 199;135:113-26.
42. Ho DWT, Field PR, Irving WL, Packham DR, Cunningham AL. Detection of Immunoglobulin M Antibodies to Glycoprotein G-2 by Western blot (Immunoblot) for Diagnosis of Initial Herpes Simplex Virus Type 2 Genital Infections. *J Clin Microbiol* 1993; 31:3157-64.