

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE DER  
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES; HOMBURG (SAAR)  
UND  
LABOR PROF. G. ENDERS UND PARTNER & INSTITUT FÜR VIROLOGIE, INFEKTIOLOGIE  
UND EPIDEMIOLOGIE STUTTGART E.V.

Nachweis Parvovirus B19-spezifischer  
Immunglobulin G und Immunglobulin M  
Antikörper im Fetalblut in Gegenwart einer  
Parvovirus B19-induzierten fetalen Anämie  
oder eines Parvovirus B19-bedingten  
Hydrops fetalis

---

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes  
2011

**Vorgelegt von**

**Johannes Weiffenbach**

**geboren am 29.09.1984 in Stuttgart**

## Inhalt

1	Zusammenfassung.....	6
2	Summary .....	9
3	Einleitung.....	11
3.1	Virusbeschreibung Parvovirus B19 .....	11
3.2	Infektionswege und Verlauf der akuten Infektion .....	12
3.3	Tropismus .....	12
3.4	Pathogenese .....	13
3.5	Immunantwort .....	14
3.6	Parvovirus B19-assoziierte Krankheitsbilder .....	15
3.7	Parvovirus B19-Infektion in der Schwangerschaft.....	17
3.8	Epidemiologie.....	18
3.9	Diagnostik.....	19
3.9.1	Allgemeine Diagnostik.....	19
3.9.2	Diagnostik in der Schwangerschaft.....	19
3.10	Therapie Parvovirus B19-assoziiierter Erkrankungen .....	20
3.11	Transplazentarer Transport von Immunglobulinen .....	21
3.12	Fetale Immunantwort.....	22
3.13	Fragestellungen.....	23
4	Material und Methoden.....	24
4.1	Proben.....	24
4.1.1	Klinische Informationen zu den Müttern .....	25
4.1.2	Angaben zur Klinik der Feten .....	28
4.1.3	Weitere Seren .....	37
4.2	Material.....	37
4.2.1	Geräte .....	37
4.2.2	Verbrauchsmaterialien .....	38

4.2.3	Parvovirus B19-Testkits .....	38
4.2.4	Reagenzien .....	39
4.2.5	Herstellung von Dissoziationslösungen .....	40
4.2.6	Computerprogramme .....	41
4.3	Methoden .....	42
4.3.1	ELISA Immunglobulin G (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) .....	42
4.3.2	ELISA Immunglobulin M (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) .....	43
4.3.3	Line-Test .....	44
4.3.4	Bestimmung des Infektionszeitpunktes.....	45
4.3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	47
4.3.6	Dissoziation von Immunkomplexen.....	50
4.3.7	Antigen-ELISA .....	50
5	Resultate.....	52
5.1	Klinische Befunde .....	52
5.2	Parvovirus B19-Antikörper und Virämie .....	53
5.3	Line-Test.....	58
5.4	Gruppierung.....	60
5.5	Auswertung.....	64
5.6	Immunglobulin G in Immunkomplexen – Dissoziation .....	67
5.6.1	Fällungsreaktionen mit Polyethylenglycol.....	67
5.6.2	Säuredissoziationsmethoden .....	68
5.6.3	Methode nach Koraka mit unterschiedlichen Dissoziationszeiten.....	69
5.6.4	Einfluss der Reagenzien auf die Mikrotiterplatten.....	69
5.6.5	Erzeugung von Immunkomplexen .....	70
5.6.6	Kontrolle der Immunkomplexbildung.....	71
5.6.7	Immunkomplexdissoziation mit der Methode nach Koraka .....	72
5.6.8	Dissoziation von Immunkomplexen aus Wild-VP2.....	78

5.6.9	Optimierung der Dissoziationszeit .....	79
5.6.10	Dissoziation von Immunkomplexen bei Antigenüberschuss .....	80
5.6.11	Dissoziation von Immunkomplexen in fetalen Blutproben.....	81
5.7	Antigen-ELISA.....	82
5.7.1	Einfluss des Probenverdünnungspuffers auf IgG.....	83
5.7.2	Ermittlung des Messbereichs .....	83
5.7.3	Einfluss von IgG auf den Antigen-ELISA .....	84
5.7.4	Messung von Antigen in unterschiedlichen Proben .....	85
6	Diskussion.....	87
6.1	Mütterliche Proben .....	87
6.1.1	Virämie.....	87
6.1.2	Antikörper Immunglobulin M.....	88
6.1.3	Antikörper Immunglobulin G.....	89
6.1.4	Line-Test .....	90
6.2	Fetale Proben .....	90
6.2.1	Virämie.....	90
6.2.2	Antikörper Immunglobulin M.....	91
6.2.3	Antikörper Immunglobulin G.....	92
6.2.4	Dissoziation von Immunkomplexen.....	93
6.2.5	Verlaufspalten .....	96
6.3	Klinik .....	96
6.3.1	Klinische Präsentation.....	96
6.3.2	Einfluss von Untersuchungs- und Infektionszeitpunkten.....	97
6.3.3	Einfluss des Alters der Schwangeren .....	99
6.3.4	Schwangerschaftsverlauf.....	99
6.4	Schlussfolgerungen.....	100
7	Anhang.....	104

7.1	Tabelle 33: Ablauf der PCR .....	104
7.2	Abkürzungsverzeichnis: .....	105
8	Danksagungen.....	107
9	Publikationen .....	108
10	Literaturverzeichnis:.....	109

# 1 Zusammenfassung

„Nachweis Parvovirus B19-spezifischer Immunglobulin G und Immunglobulin M Antikörper im Fetalblut in Gegenwart einer Parvovirus B19-induzierten fetalen Anämie oder eines Parvovirus B19-bedingten Hydrops fetalis“

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Parvovirus B19-Infektionen in der Schwangerschaft. Parvovirus B19 verursacht unterschiedliche Krankheitsbilder, unter anderem Ringelröteln oder transiente aplastische Anämien. In der Schwangerschaft kommt Parvovirus B19-Infektionen besondere Bedeutung zu, da das Virus transplazentar auf den Feten übertragen werden kann und bei diesem zur fetalen Anämie, Hepatitis und Myokarditis bis zum Vollbild der Erkrankung, einem nicht-immunologisch bedingten Hydrops Fetalis und zum intrauterinen Fruchttod führen kann. Behandelt wird die fetale Anämie in der Regel durch intrauterine Transfusionen.

Diese Arbeit soll beleuchten, wie sich Parvovirus B19-DNS, Immunglobulin M und Immunglobulin G im Verlauf einer Parvovirus B19-Infektion bei Mutter und Fet entwickeln. Des Weiteren soll untersucht werden, ob sich aus diesen Informationen prognostische Hinweise und möglicherweise auch Empfehlungen zur Therapie Parvovirus B19-bedingter Erkrankungen in der Schwangerschaft ableiten lassen.

Hierzu wurden 48 Mutter-Fetus Paare bei Vorliegen von fetalen Höhlenergüssen, eines Hydrops fetalis und/oder einer fetalen Anämie im Kontext einer maternalen Parvovirus B19-Infektion auf Parvovirus B19-DNS, IgM und IgG im mütterlichen und fetalen Blut untersucht. Methodisch wurden ein etabliertes DNS-Nachweisverfahren (Polymerase Kettenreaktion) sowie ELISAs oder Immunoblots für IgM und IgG durchgeführt. Des Weiteren wurden zwei Testverfahren neu entwickelt, um das fetale Blut auf Immunkomplexe zu untersuchen, da der fehlende Nachweis von Immunglobulin G im fetalen Blut auf Immunkomplexe aus von der Mutter stammendem IgG und Viruspartikeln zurück zu führen sein könnte.

Bei allen Müttern war Parvovirus B19-IgG nachweisbar; 46/48 waren zudem positiv für Parvovirus B19-DNS und 44/48 hatten Parvovirus B19-IgM in ihrem Blut.

Eine diaplazentare Infektion wurde bei 41/48 Feten nachgewiesen. Bei 7 Feten hingegen konnte weder Parvovirus B19-DNS noch Parvovirus B19-IgM nachgewiesen werden. Bei diesen 7 wahrscheinlich nicht infizierten Feten kam es zum intrauterinen Tod eines Feten und zwei Schwangerschaften wurden abgebrochen, drei Kinder überlebten und zu einem Fall liegen keine Informationen vor. Alle nicht sicher infizierten Feten waren positiv für Parvovirus B19-IgG.

Bei den 41 nachweislich infizierten Feten konnten in allen Fällen höhere Viruslasten im fetalen Blut als bei den zugehörigen Müttern gefunden werden (Median der Differenz 87,4 Millionen Kopien/ml). Dabei war bei 11/41 Feten IgM nachweisbar. Interessanterweise war nur bei 12/41 Feten IgG nachweisbar.

Von den 29 infizierten Feten ohne Parvovirus B19-IgG wurden 17 auf Immunkomplexe untersucht. Bei keinem dieser 17 Feten konnten Immunkomplexe nachgewiesen werden. Vier der 41 infizierten Feten starben intrauterin, bei diesen vier Feten konnte kein IgG nachgewiesen werden. Zu 6 Fällen lagen keine Informationen zum Schwangerschaftsausgang vor.

Mütter von infizierten Feten mit IgG wurden signifikant später in der Schwangerschaft infiziert (Median 24. SSW) als Mütter von infizierten Feten ohne IgG (15. SSW), ( $p=0,002$ ).

Die Studie zeigt, dass Immunglobulin G bei vielen Parvovirus B19-infizierten Feten bei Vorliegen von Komplikationen nicht nachweisbar ist, obwohl die Mütter zur gleichen Zeit bereits hohe Antikörper-Konzentrationen im Blut haben. Des Weiteren konnten bei keinem dieser Feten Immunkomplexe als Erklärung für fehlendes maternales IgG nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass der transplazentare Transport von Immunglobulin G im Falle einer intrauterinen Parvovirus B19-Infektion in vielen Fällen unzureichend ist. Einen besonderen Risikofaktor hierfür stellt wahrscheinlich eine früh im Verlauf der Schwangerschaft eingetretene mütterliche Infektion dar. Der Transport scheint unabhängig davon zu sein, wie viel Immunglobulin G im mütterlichen Blut nachweisbar ist.

Symptomatische Feten, bei denen bei der ersten Blutentnahme Parvovirus B19-DNS nachgewiesen werden kann, bei denen jedoch kein Immunglobulin G nachzuweisen ist, haben eventuell eine schlechtere Prognose als Feten, bei denen Immunglobulin G nachgewiesen werden konnte.

Dies wirft die Frage auf, ob alle Feten in der Schwangerschaft mit einer Erythrozyten-Transfusion adäquat behandelt sind. Vielmehr legt diese Studie nahe, dass die zusätzliche intrauterine Gabe von Immunglobulin-Präparaten bei vielen betroffenen Feten sinnvoll sein könnte und deshalb in klinischen Studien untersucht werden sollte, während die Gabe von Immunglobulinen an die Mutter wenig Erfolg verspricht.



## 2 Summary

### „Detection of parvovirus B19-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies in fetal blood at the time of fetal hydrops or fetal anemia”

In this study, parvovirus B19-infections in pregnancy have been investigated.

Parvovirus B19 causes several diseases, i.e. fifth disease and transient aplastic anemia. Parvovirus B19 is of special interest during pregnancy since the virus may cross the placenta and cause fetal intricacies such as anemia, hepatitis and myocarditis. This may lead to non-immune fetal hydrops and even intrauterine fetal death. Fetal anemia is usually treated by intrauterine transfusions.

This dissertation is to analyze Parvovirus B19-DNA, immunoglobulin M and immunoglobulin G in the course of infection in both maternal and fetal blood. Furthermore it shall be investigated whether this information is of prognostic value and may perhaps offer recommendations on the treatment of Parvovirus B19 infection in pregnancy.

48 mother-fetus-pairs have been included in this study, all connected to maternal Parvovirus B19-infection in pregnancy and also showing symptoms like fetal anemia, fetal hydrops or effusions. All mother fetus pairs were tested for Parvovirus B19-DNA using PCR, and tested for immunoglobulin M and immunoglobulin G via ELISA and immunoblots. Also, two new tests were developed to test fetal blood for immune complexes with the aim of showing that a lack of immunoglobulin G in fetal blood might be due to sequestration of immunoglobulin G in immune complexes.

All mothers were tested positive for Parvovirus B19-IgG, 46/48 were positive for Parvovirus B19-DNA and 44/48 mothers showed Parvovirus B19-IgM.

Transplacental infection has been proven in 41/48 fetuses. However, in 7 fetuses neither Parvovirus B19-DNA nor Parvovirus B19-IgM were detected. Of these seven probably not infected fetuses, one died, two pregnancies were terminated and three children were born healthy while in one case no such information was available. All seven probably not infected fetuses were positive for Parvovirus B19-IgG.

All 41 fetuses with confirmed infection showed much higher viral loads than the corresponding mothers (median difference 87.4 million copies/ml). IgM was detected in 11/41 fetuses but only 12/41 fetuses did have IgG detectable in their blood.

Of the 29 fetuses without IgG, 17 underwent further investigation for immune complexes. None of these 17 fetuses showed immune complexes.

Four of the 41 fetuses died. All four fetuses belonged to the group of 29 fetuses in whose blood no IgG was found. For 6/41 cases no information on the outcome of pregnancy was available.

Maternal infection occurred significantly later in pregnancy ( $p=0,002$ ) in mothers of those fetuses with IgG (median 24. week of gestation) compared to mothers of the fetuses without IgG in their blood (median 15. week of gestation).

This study shows that immunoglobulin G is not detectable in a large proportion of fetal blood samples at the time of Parvovirus B19-associated fetal intricacies even though it is already detectable in maternal blood. Immune complex dissociation assays did not show immunoglobulin G in fetal blood samples. These results suggest that the transplacental transport of immunoglobulin G is often insufficient in the presence of Parvovirus B19-infection. Maternal infection early in pregnancy seems to constitute a special risk factor. It has to be assumed, that transplacental transport of immunoglobulin G does not depend on immunoglobulin G-levels in maternal blood.

Fetuses showing symptoms of Parvovirus B19-infection who have Parvovirus B19-DNA but don't have Parvovirus B19-IgG detectable in their blood may have a poorer prognosis than fetuses who do show immunoglobulin G at the time of initial blood sampling.

The question arises whether all fetuses are treated adequately via intrauterine transfusion of erythrocyte concentrates. This study suggests that the intrauterine application of immunoglobulin may be beneficial for affected fetuses and should therefore be evaluated in clinical trials. However, intravenous immunoglobulin administered to the mother is unlikely to prove successful.

## 3 Einleitung

### 3.1 Virusbeschreibung Parvovirus B19

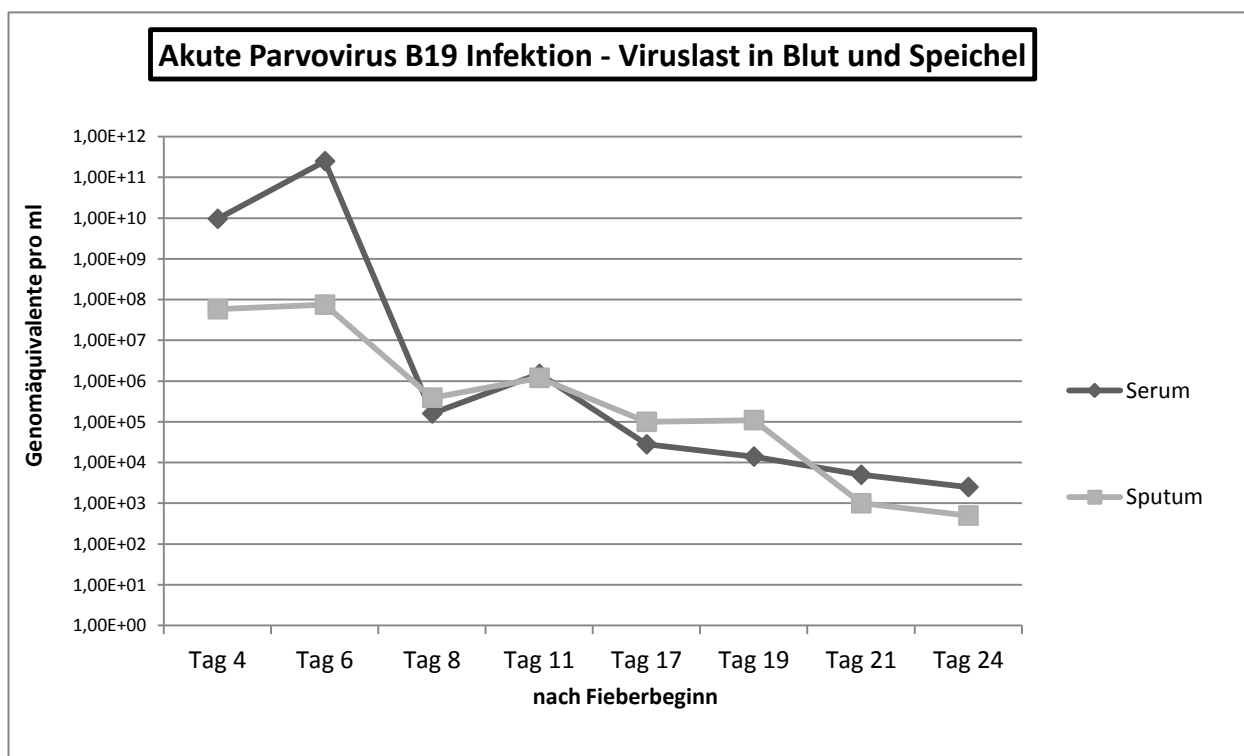
Parvovirus B19 (B19V) gehört zur Familie der *Parvoviridae*, Unterfamilie *Parvovirinae* und ist bislang der einzig sicher humanpathogene Vertreter der Gattung *Erythrovirus*. Die Bezeichnung „Parvovirus“ ist zurückzuführen auf die Größe des Virus, denn mit 20-25 nm Durchmesser (1) gehört B19V wie der lateinische Wortteil „parvus“ andeutet, zu den kleineren Viren. Entdeckt wurde Parvovirus B19 zufällig 1974 von Yvonne Cossart bei einem Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von Hepatitis B-Antigen. Von dieser Entdeckung leitet sich auch der zweite Teil des Namens, „B19“ ab, denn Yvonne Cossart entdeckte eine unerwartete Reaktion an Position B19 einer Untersuchungsplatte (2;3). B19V gehört zu den DNS-Viren (DNA-Viren) und besitzt ein Einzelstranggenom mit einer Länge von 5594 Nukleotiden (4-6). Isolate zeigen auffällig geringe Unterschiede in ihrer Nukleotidsequenz, jedoch können drei Genotypen unterschieden werden: Der Prototyp - B19V - entspricht dem Genotyp 1 mit den Stämmen Au und Wi, der Genotyp 2 enthält die Stämme A6 und LaLi, der Genotyp 3 die Stämme V9 und D91.1. Etwa 10 % des Genoms ist variabel, jedoch konnte zu diesen Sequenzunterschieden bisher kein klinisches Korrelat gefunden werden. (1;7;8) An beiden Enden der DNS finden sich palindromische Sequenzen mit 383 Nukleotiden Länge, welche eine wichtige Rolle bei der Replikation, der Transkription und der Virusverpackung spielen (4;5;8). Die DNS, die nur eine Promotorregion besitzt, kodiert für drei Hauptproteine: Ein Nichtstrukturprotein, NS1 genannt (77kD, 671 Aminosäuren), sowie zwei Kapsidproteine VP1 (84 kD, 781 Aminosäuren) und VP2 (58 kD, 554 Aminosäuren) (9). Die beiden Kapsidproteine entstehen durch alternatives Spleißen, wobei VP1 am aminoterminalen Ende im Vergleich zu VP2 227 zusätzliche Aminosäuren aufweist (sogenannte VP1-spezifische Region) (1). Es wurden weitere von B19V-DNS kodierte Proteine beschrieben, deren Funktion bislang nicht geklärt ist (10;11). Das nicht umhüllte Viruskapsid hat Ikosaederform und besteht aus 60 Kapsomeren, die wiederum zu 95 % aus VP2 und zu 5 % aus VP1 zusammengesetzt sind (12). Dem Nichtstrukturprotein NS1 (NS1) werden ein Einfluss auf die Virusreplikation und zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben, während die Kapsidproteine VP1 und VP2 in der Regel für die Bindung an

und die Aufnahme in die Zielzellen verantwortlich gemacht werden. Ob und inwiefern VP2 einen zytotoxischen Effekt hat, ist Gegenstand der Forschung (5;12-15).

### 3.2 Infektionswege und Verlauf der akuten Infektion

Eine Infektion mit B19V erfolgt in der Regel über respiratorische Sekrete als Tröpfchen- oder Schmierinfektion, selten durch virushaltige Blutprodukte oder Transplantation. Die diaplazentare Übertragung auf den Feten ist ebenfalls möglich. Virämie kann bei Aufnahme über den Respirationstrakt nach 6 Tagen erwartet werden und auch respiratorische Sekrete enthalten zu diesem Zeitpunkt hohe Viruslasten (1;16;17).

**Abbildung 1: Viruslast bei akuter B19V-Infektion (mit freundlicher Genehmigung von S.Modrow, B. Gärtner „Parvovirus B19-Infektion in der Schwangerschaft“ Deutsches Ärzteblatt, Jg.103, Heft 43, 27.Oktober 2006)**



### 3.3 Tropismus

B19V wird häufig auch als „Humanes Parvovirus B19“ bezeichnet. Dies zeigt bereits, dass B19V nur den Menschen betrifft. B19V bindet an das Blutgruppen P-Antigen (Globotetraosylceramid) und infiziert auf diese Weise Zellen, die dieses Antigen tragen (18).

Als Korezeptoren wurden das Ku80-Autoantigen und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin identifiziert (19;20). Menschen, die kein Blutgruppen P-Antigen besitzen, sind von Natur aus immun gegenüber einer Infektion durch B19V und zeigen auch keine Immunreaktion gegen das Virus (21). Blutgruppen P-Antigen findet sich auf Erythrozyten, Erythrozytenprogenitorzellen der CFU-E (colony forming unit erythroid) und BFU-E (burst forming unit erythroid), auf Megakariozyten, hematopoietischen Zellen in der fetalen Leber, Endothelzellen, im Nierenkortex, an der Plazenta und auf fetalen Herzmuskelzellen (17;22). Die Aufnahme der Viren in die Zellen geschieht durch rezeptorvermittelte Endozytose. Das Kapsidprotein VP1 besitzt in der VP1-spezifischen Region Phospholipaseaktivität (A2), welche vermutlich im Zusammenhang mit der Virusfreisetzung aus Endosomen in das Zytoplasma der Zelle steht (5).

Die Virusvermehrung mit Produktion von Strukturproteinen und DNS-Replikation ist nach heutigem Kenntnisstand nur in den sich schnell teilenden Zellen der Erythrozytenprogenitorzellen CFU-E sowie CFU-B und in den hepatopoietischen Zellen der fetalen Leber unter dem Einfluss von Erythropoietin (23) möglich und erfolgt lytisch. Die Transkription viraler DNS mit folgender Expression zumindest des NS1 hingegen kann in weiteren Zellen stattfinden (12;22;24).

### **3.4 Pathogenese**

Die Entstehung B19V-assoziiertes Erkrankungen hat nach heutigem Kenntnisstand mehrere potentielle Ursachen. Zunächst den direkten zellschädigenden Effekt durch das Virus selbst, im Besonderen durch NS1 und eventuell VP2, des Weiteren die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch NS1 und die Phospholipase A2-ähnliche Aktivität der VP1-spezifischen Region, die Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen sowie molekulares Mimikri mit folgender Induktion von Autoantikörpern (1;12;25). Dies erklärt auch den biphasischen Verlauf B19V-assoziiertes Erkrankungen.

Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Nichtstrukturprotein NS1 zytotoxische Wirkung hat. Die infizierten Zellen schlagen den Weg des programmierten Zelltods – der Apoptose – ein (14;26), nachdem NS1 zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase geführt hat oder bislang unbekannt Ursachen einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase herbeigeführt haben

(27;28). Von der Zytotoxizität scheinen auch Zellen betroffen zu sein, in denen sich B19V nicht vermehren kann, jedoch eine Transkription viraler DNS stattfindet (24).

### 3.5 Immunantwort

Auch mehr als 30 Jahre nach der Entdeckung von B19V bleiben einige Fragen bezüglich der Immunantwort auf eine Infektion mit B19V offen.

Über die Reaktion des angeborenen humoralen und zellulären, unter Anderem T-Zell gestützten, Immunsystems ist nach wie vor wenig bekannt. Jedoch gibt es einige neuere Forschungsberichte, die den Schluss zulassen, dass auch diese Komponenten des Immunsystems aktiv an der Immunantwort beteiligt sind. (29-31).

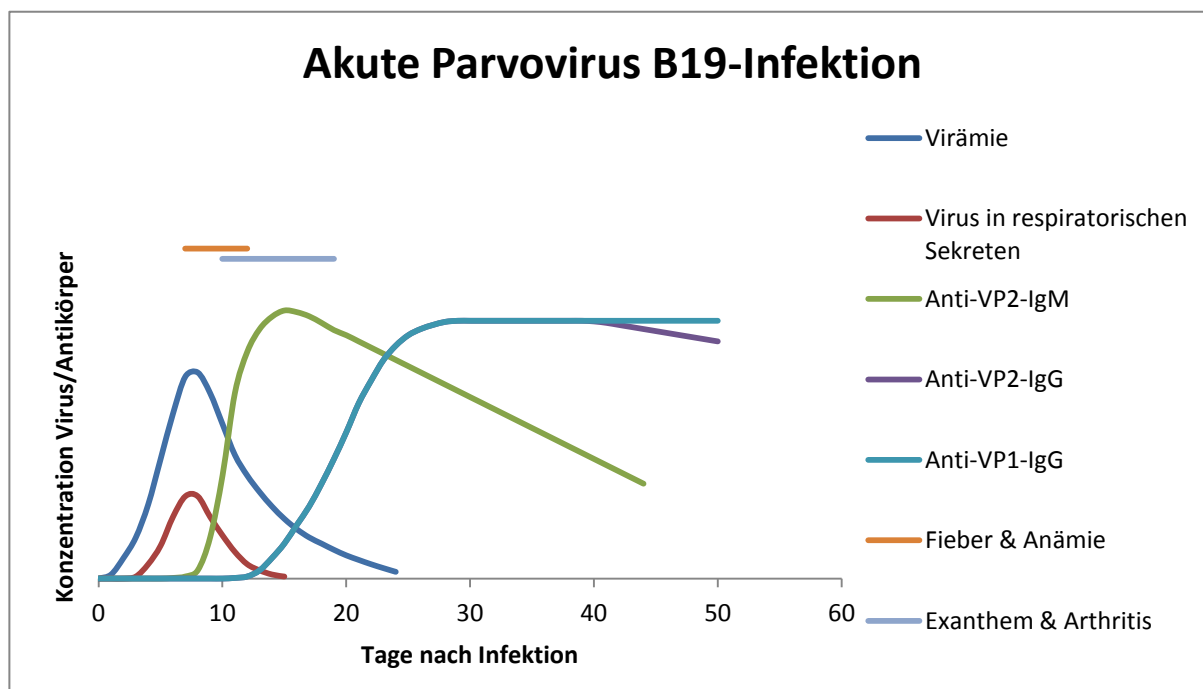
Seit längerem bekannt ist die wichtige Funktion der humoralen adaptiven Immunantwort in der Form von neutralisierenden Antikörpern (Immunglobulinen). Immunglobuline sind entscheidend an der Neutralisierung von B19V in der virämischen Phase der Infektion beteiligt (32). Frühestens eine Woche nach Infektion treten Immunglobuline der Klasse M (IgM) im Blut auf (16). Immunglobuline der Klasse G (IgG) sind in der dritten Woche nach Infektion nachweisbar. Auch Immunglobulin A und Immunglobulin E lassen sich finden (33;34). Die Immunglobuline der Klasse M sind vorwiegend gegen das Hauptkapsidprotein VP2 gerichtet und maximal bis zu mehrere Monate nach Infektion nachweisbar. Abbildung 2 stellt den typischen Verlauf einer B19V-Infektion vor.

Im Verlauf der Immunantwort werden IgG-Antikörper zunächst sowohl gegen lineare als auch konformelle (nicht lineare) Epitope von VP1 und VP2 gebildet. In der Regel handelt es sich hierbei um von außen zugängliche Epitope des Viruskapsids. Die Avidität der IgG-Antikörper nimmt mit der Zeit zu. Gegen die zunächst nicht an der Virusoberfläche liegenden Epitope, die Virusprotein 1-spezifische Region VP1S sowie das Nichtstrukturprotein NS1, werden erst mit zeitlicher Verzögerung Antikörper gebildet. Mittels recom-Line Test lassen sich anti-NS1 IgG Antikörper in der Regel nicht in den ersten 6-8 Wochen nach Infektion nachweisen. Die Immunantwort gegen B19V ist insofern epitop-spezifisch, als dass die gegen lineare Epitope von VP2 gerichteten IgG-Antikörper einige Wochen nach Erstinfektion unter die Nachweisgrenze abfallen (35;36).

IgG-Antikörper, welche gegen konformelle Epitope von VP2 und lineare Epitope von VP1 gerichtet sind, bleiben in der Regel Jahre – eventuell auch ein Leben lang - nachweisbar und tragen wesentlich zum Schutz vor einer symptomatischen Reinfektion bei (16;32;37).

Nach einer akuten Infektion bleibt B19V-DNS auch bei immunkompetenten Personen oft Wochen bis Monate (selten Jahre) in niedriger Kopienzahl im Blut nachweisbar (38).

**Abbildung 2: Serologie bei akuter B19V-Infektion (modifiziert mit freundlicher Genehmigung nach S.Modrow, B. Gärtner „Parvovirus B19-Infektion in der Schwangerschaft“ Deutsches Ärzteblatt, Jg.103, Heft 43, 27.Oktober 2006)**



### 3.6 Parvovirus B19-assoziierte Krankheitsbilder

#### - Asymptomatische Infektion und unspezifische Symptomatik:

In mindestens 30 % der Fälle verläuft eine Infektion durch B19V asymptomatisch (24). Während der virämischen Phase der Infektion können unspezifische Symptome wie zum Beispiel Fieber, Kopfschmerzen, allgemeines Krankheitsgefühl oder Arthralgien auftreten (1;16;39). Auch asymptomatisch Infizierte sind zu diesem Zeitpunkt potentielle Überträger, da auch bei ihnen das Virus in den respiratorischen Sekreten zu finden ist (16).

- **Erythema infectiosum**

Erythema infectiosum ist wohl die typischste Krankheitsmanifestation von B19V, im

**Abbildung 4: Erythema Infectiosum im Gesicht**



Englischen auch als „fifth disease“ und im Deutschen als „Ringelröteln“ bezeichnet.

Erythema infectiosum tritt als makulopapulöses Exanthem auf, zunächst im Gesicht (slapped cheek), dann am Stamm und den Streckseiten der Extremitäten (1;40). Das Exanthem entwickelt sich erst 15-17 Tage

**Abbildung 3: Erythema Infectiosum am Arm**



nach der Infektion, wenn auch B19V-spezifisches Immunglobulin G im Serum des Patienten zu finden ist (12;16). Erythema infectiosum verläuft bei Kindern eher mild und wird selten von Arthralgien begleitet. Bei Erwachsenen treten häufiger

unspezifische Symptome und solitäre Arthropathien auf. Die Gelenkbeschwerden können in seltenen Fällen mehrere Monate andauern (3).<sup>1</sup>

- **Transiente aplastische Krise und Anämie**

Die Transiente aplastische Krise (TAC, „transient aplastic crisis“) war die erste Erkrankung, die direkt auf eine Infektion mit B19V zurückgeführt wurde (41;42). B19V befällt die erythropoietischen Stammzellen der BFU-E (Burst forming Unit) und CFU-E (Colony forming unit) und vermehrt sich in diesen (12;17). Dies führt zum Abbruch der weiteren Ausdifferenzierung und folglich auch der Erythrozytenproduktion, typischerweise 7-10 Tage anhaltend, beginnend circa 7 Tage post infectionem (13;14;16). Bei Personen mit erhöhtem Erythrozytenumsatz führt dies zu einem starken Abfall der Hämoglobinwerte, der lebensbedrohlich werden kann (12;42;43). Bei Personen mit normalem Erythrozytenumsatz fällt der Hämoglobinwert nur in geringem Maße ab, obwohl auch bei ihnen zwischenzeitlich keine

<sup>1</sup> Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von S.Modrow, B.Gärtner „Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft“ Deutsches Ärzteblatt, Jg.103, Heft 43, 27.Oktober 2006



Retikulozyten im peripheren Blut nachweisbar sind (12;16). Gelegentlich wird auch eine Leuko- und Thrombozytopenie beobachtet (16;43). In der Regel normalisiert sich die Blutbildung nach überstandener Infektion wieder. Immunkompromittierte Patienten (z.B. nach HIV-Infektion) können jedoch bei Persistenz des Virus eine chronische aplastische Anämie entwickelt (32;44).

- **Weitere Krankheitsbilder:**

Verschiedene weitere Krankheitsbilder werden mit B19V in Verbindung gebracht. Unter Anderem Myokarditis (3;45), verschiedene neurologische Erkrankungen (46), Autoimmunerkrankungen (47;48), Vaskulitis (49) und Hepatitis (50), jedoch ist der kausale Zusammenhang zwischen einer Infektion mit B19V und diesen Krankheitsbildern zum Teil nicht ausreichend gesichert.

### **3.7 Parvovirus B19-Infektion in der Schwangerschaft**

Infektionen durch Parvovirus B 19 in der Schwangerschaft sind gefürchtet, da sich nicht nur die werdende Mutter mit dem Erreger auseinandersetzen muss, sondern auch eine diaplazentare Übertragung des Virus auf den Feten eintreten kann. Das vertikale Transmissionsrisiko beträgt im Hinblick auf die gesamte Schwangerschaft ca. 30-50% (12;51). Das Risiko, dass eine Schwangerschaft in einem ungewollten Abort endet liegt nach einer B19V-Infektion bei ca. 10 %, das Risiko ist besonders erhöht, wenn die mütterliche Infektion vor Ende der 20. Schwangerschaftswoche erfolgt (52-54). Der Mechanismus des Übertritts des Virus über die Plazenta zum Feten ist nicht im Detail geklärt, bekannt ist jedoch, dass das P-Blutgruppenantigen auch auf Trophoblastzellen und placentaren Endothelzellen exprimiert wird (55;56). Die Infektion des Feten kann ebenso wie bei der Mutter im Feten zu einer Unterbrechung der Erythrozytenproduktion und in der Folge zur fetalen Anämie führen. Dies ist besonders schwerwiegend, da die Lebenszeit fetaler Erythrozyten während der extramedullären Blutbildungsphase kürzer ist als bei Erwachsenen (27). Fetale Myokard-, Leber- und Endothelzellen exprimieren das Blutgruppen-P-Antigen, so dass eine Infektion fetaler Myokard-, Leber- und Endothelzellen möglich ist (27). Direkt und indirekt können somit die drei Faktoren Anämie (kardiales Vorwärtsversagen bei schwerer Anämie), Einschränkung der Lebersynthese- (Hypalbuminämie) und Herzmuskelleistung (Myokarditis) zu einer globalen Herzinsuffizienz und dem klinischen Bild des nicht-

immunologischen Hydrops fetalis führen (27;56;57). Klinisch definiert sich der nicht-immunologische Hydrops fetalis (im Folgenden nur noch kurz: Hydrops fetalis) als exzessive Flüssigkeitsansammlung im extravaskulären Kompartiment mit Ödemen (Haut- und Plazentaödem) und/oder Flüssigkeitsansammlungen in vorgeformten fetalen Körperhöhlen (Aszites, Pleuraerguß, Perikarderguß) ohne dass eine immunologische Blutgruppen-Inkompatibilität mit der Mutter vorliegt (58). Begünstigt wird dieses Geschehen eventuell noch durch eine generelle Permeabilitätsstörung des Endothels, hervorgerufen durch Vaskulitis, so dass man von einem multifaktoriellen Geschehen sprechen könnte (8). Zur Entwicklung eines Hydrops fetalis kommt es am Häufigsten, wenn die maternale Infektion zwischen der 13. und 20. SSW stattgefunden hat (52). Eine prospektive Studie an Schwangeren mit serologischer Evidenz für eine akute Parvovirus B19-Infektion hat gezeigt, dass das Risiko für die Entwicklung eines Hydrops fetalis nach einer mütterlichen Infektion bei circa 4% liegt (53). In anderen Studien wurde eine fetale Anämie (durch Ultraschallbefunde diagnostiziert) als zusätzliches Aufnahmekriterium genutzt und ein Risiko von 12-17% für die Entwicklung eines Hydrops fetalis beschrieben (59;60). Insbesondere vor der 17. SSW kann es auch zum intrauterinen Fruchttod ohne eindeutige Hydropszeichen kommen (25;52;53;61). Bislang existiert kein Hinweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen B19V-Infektionen in der Schwangerschaft und kindlichen Fehlbildungen(24;56).

### **3.8 Epidemiologie**

Die B19V-Genotypen 1-3 sind in unterschiedlichen Regionen der Erde bezogen auf den B19V-DNS-Nachweis unterschiedlich prävalent. Während der Genotyp 1 weltweit vorkommt, tritt Genotyp 3 vorwiegend in Westafrika und Brasilien auf. Der Genotyp 2 zirkuliert derzeit wenig. In Europa wird er häufig in Gewebeproben (Haut, Synovia, Leber, Herz) von Patienten nachgewiesen, die vor 1960 geboren sind. Das lässt darauf schließen, dass die B19V-DNS für viele Jahre nach Erstinfektion in Geweben persistieren kann und der Genotyp 2 in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts häufiger vorkam als heute (1).

In Ländern mit gemäßigter Klimazone treten Infektionen mit B19V saisonal gehäuft mit der höchsten Inzidenz zwischen Januar und Juli auf. Epidemien werden alle 4-6 Jahre beobachtet. Der Prozentsatz IgG-positiver Personen steigt mit zunehmendem Alter an. Beträgt er in Deutschland bei Kindern im Alter von 2 Jahren noch 12,0-20,4 %, steigt er bis zum Alter von 10 Jahren auf 50-70 %. In der Gruppe der schwangeren Frauen liegt die Prävalenz B19V-

spezifischer Immunglobuline G bei 69 %, generell bei Frauen im Alter von 18 bis 50 Jahren zwischen 66,4 und 74,1%. Das größte Infektionsrisiko besteht offenbar bei Haushaltskontakten oder bei beruflicher Arbeit mit Kindern unter 6 Jahren (62;63). Eine sichere Prophylaxe von B19V-Infektionen ist nahezu unmöglich, da spezifische Symptome erst nach der virämischen Phase, in der die Patienten hoch ansteckend sind, auftreten (16). Besonderes Augenmerk gilt dem Screening von Blutprodukten, da B19V durch die üblichen Verfahren zur Viruselimination in Blutprodukten nicht sicher inaktiviert wird (37;64).

## **3.9 Diagnostik**

### **3.9.1 Allgemeine Diagnostik**

Zum Nachweis von B19V stehen sowohl direkte als auch indirekte Methoden zur Verfügung, die im Zusammenspiel mit Anamnese und klinischer Untersuchung eine Diagnosestellung erlauben. B19V lässt sich mit Routinemethoden nicht anzüchten, daher ist die Zellkultur nicht für den Virusnachweis geeignet. Der Einsatz der Elektronenmikroskopie bleibt aufgrund der geringen Sensitivität und der apparativen Voraussetzungen speziellen Fragestellungen vorbehalten. Der Nachweis von Riesen-Pronormoblasten (sogenannte Lampionzellen, Durchmesser 25-32 µm) mit großen intranukleären eosinophilen Einschlusskörpern in Knochenmarksaspiraten oder -biopsien weist zwar auf eine B19V-Infektion hin, ist aber aufgrund der eingeschränkten Spezifität nicht beweisend. Standard für den direkten Erregernachweis ist heute der qualitative und/oder quantitative DNS-Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“, PCR). Techniken ohne DNS-Amplifikation (z.B. einfache DNS-Hybridisierung) haben im Vergleich zur PCR eine deutlich geringere Sensitivität. Die PCR kann als einfache in-house-Block-Cycler-, nested- oder Real-Time-PCR durchgeführt werden (1). Wird der Kontakt zu B19V-infizierten Personen vermutet, so sind initial negative Befunde für Immunglobulin G und Immunglobulin M nach zwei bis drei Wochen zu wiederholen um eine eventuell eingetretene Serokonversion nachzuweisen.

### **3.9.2 Diagnostik in der Schwangerschaft**

Die alleinige Anwendung serologischer Tests zum Nachweis einer kürzlich erfolgten B19V-Infektion ist in der Schwangerschaft in manchen Fällen unzureichend, da der Vergleich mit Vorwerten häufig nicht möglich ist oder negative Ergebnisse für Immunglobulin M bei der

Mutter eine fetale B19V-Infektion nicht sicher ausschließen (65). Die Alleinige Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion ist wiederum nur dann Richtungsweisend, wenn sie hoch positiv ausfällt, denn niedrige DNS-Kopienzahlen können häufig noch monatelang nach Infektion nachgewiesen werden (24).

Bei Infektion in der Schwangerschaft sollten in Abhängigkeit vom Gestationsalter wöchentliche Sonographie- und Dopplerkontrollen für mindestens 10 bis 12 Wochen erfolgen. Die Ultraschalluntersuchung dient hierbei der morphologischen Beurteilung des Feten, insbesondere der Erkennung von fetalen Höhlenergüssen und Ödemen. Die dopplersonografische Bestimmung der systolischen, maximalen Flussgeschwindigkeiten des fetalen Bluts in der Arteria Cerebri Media (folgend Vmax) gilt als Surrogatmarker für das Ausmaß einer fetalen Anämie (1;66-68). Eindeutig bestätigt werden kann eine fetale Anämie durch eine Chordozentese, die unter Transfusionsbereitschaft durchgeführt werden sollte, und in welcher der Hämoglobinwert, die absoluten Erythrozyten- und Retikulozytenzahlen sowie der Retikulozytenindex bestimmt werden. Der Hämoglobinwert dient hierbei der Abschätzung des Ausmaßes einer fetalen Anämie. Niedrige Erythrozytenzahlen zeigen entweder einen erhöhten Verbrauch an Erythrozyten (z.B. bei hämolytischen Anämien) oder eine unzureichende Erythropoiese an. Retikulozytenzahl und Retikulozytenindex geben Hinweise darauf, ob die Erythropoiese gesteigert oder vermindert ist. Hier gehen hohe Werte mit hoher Erythropoieseleistung einher, niedrige Werte mit niedriger Erythropoieseleistung. Perzentilenkurven dienen der Auswertung der Testergebnisse (67;68). Eine Abschätzung der Prognose B19V-infizierter Feten bleibt schwierig. Die Bestimmung von  $\alpha$ -Fetoprotein als prognostischer Marker wurde und wird diskutiert, eindeutige Evidenz für den Nutzen dieser Maßnahme liegt jedoch bislang nicht vor (60;69).

### **3.10 Therapie Parvovirus B19-assoziiertes Erkrankungen**

In den meisten Fällen von B19V-Infektion ist keine spezifische Therapie notwendig. Sollten Symptome auftreten, so wird oftmals nur symptomatisch therapiert, zum Beispiel bei Arthralgien mit Nichtsteroidalen Antirheumatika. Anders verhält es sich mit den potentiell lebensbedrohlichen Krankheiten, die durch B19V ausgelöst werden können. Kausale antivirale Chemotherapeutika gegen B19V sind nicht verfügbar, so dass die Behandlung durch Blutprodukte erfolgt. Die transiente aplastische Krise wird in der Regel durch Transfusion von Erythrozytenkonzentraten behandelt (70). Chronische Anämien bei

immunsupprimierten, beziehungsweise immunkompromittierten Personen, die durch B19V ausgelöst wurden, können auf unterschiedliche Weise behandelt werden. Wo immer dies therapeutisch möglich ist, kann eine Reduktion der Immunsuppression zu einer ausreichenden humoralen Immunantwort gegen B19V führen, bei HIV-Infektion kann eine effektive antiretrovirale Therapie eine ausreichende Immunantwort ermöglichen (12). Bei schwerer Anämie erfolgt die symptomatische Behandlung mit Erythrozytenkonzentraten. Darüber hinaus ist ein Therapieversuch mit Immunglobulinen möglich (32;44;70). Jedoch ist die Immunglobulin-Therapie nicht in allen Fällen kurativ. Speziell bei AIDS-Patienten kann es zwar zu einer Reduktion der Viruslast kommen, eine vollständige Elimination von B19V gelingt jedoch nicht immer (70). In der Schwangerschaft gilt die Hauptaufmerksamkeit dem Feten, der durch sein noch nicht vollständig ausgereiftes Immunsystem und die starke Blutbildung einem besonderen Risiko ausgesetzt ist (siehe unten). Die Behandlung der mütterlichen Beschwerden ist rein symptomatisch. Schwere Anämien sind bei Schwangeren eine Rarität. Schwere fetale Anämie und Hydrops fetalis werden in der Regel durch vorsichtige Gabe (Gefahr der Volumenüberlastung) von Erythrozytenkonzentraten im Rahmen einer Chordozentese behandelt. Ergebnisse verschiedener Beobachtungsstudien legen nahe, dass durch Anwendung dieser Technik die B19V-bedingte Mortalität bei Feten mit schwerer Anämie oder Hydrops fetalis deutlich gesenkt werden kann (1;52;71;72). Auch für Infektionen in der Schwangerschaft wird die Immunglobulin-Therapie diskutiert, entweder durch intravenöse Gabe des Immunglobulins an die Mutter (73) oder direkt an den Feten durch Injektion des Immunglobulinpräparats in die fetale Bauchhöhle (74). Kinder mit postnatal persistierender B19V-Infektion und daraus resultierender chronischer Anämie können von einer Immunglobulin-Therapie profitieren (75). Eine Impfung gegen B19V ist bis dato nicht verfügbar. Ein potentieller Impfstoff wurde in einer Phase 1-Studie erprobt, gelangte jedoch bislang nicht zur Marktreife (76).

### **3.11 Transplazentarer Transport von Immunglobulinen**

Feten und Neugeborene verlassen sich in einem großen Maße auf Antikörpervermittelte Leihimmunität, die sie von der Mutter bekommen. Im Vordergrund steht hierbei der transplazentare Transport maternaler Immunglobuline der Klasse G von der Mutter zum Feten. Obwohl noch nicht geklärt ist, ob bei diesem aktiven Transport Pinozytose oder

rezeptorvermittelte Endozytose die wichtigste Rolle spielen, vermutet man eine besondere Rolle von Fc-Rezeptoren auf Plazentazellen (77-79). Dabei scheint der Transport bevorzugt an den Stellen der Plazenta stattzufinden, an denen sich kein Zytotrophoblast mehr zwischen Synzytiotrophoblast und fetalen Kapillaren befindet (78). Dies erklärt eventuell, weshalb sich Immunglobulin G erst ab der 13. Schwangerschaftswoche im fetalen Blut nachweisen lässt (77;78). In der Folge kommt es bis zum Ende der Schwangerschaft zu einem linearen Anstieg des transplazentaren Immunglobulintransports, so dass die Immunglobulin G-Konzentration im Blut der Neugeborenen die Konzentration im mütterlichen Blut übersteigen kann (77).

### **3.12 Fetale Immunantwort**

Der Fetus ist in hohem Maße von der immunologischen Unterstützung durch die Mutter abhängig, doch auch sein eigenes Immunsystem bildet sich heran und ist in gewissen Grenzen bereit zu einer Reaktion. Die ersten makrophagenartigen Zellen erscheinen bereits in der 4. Schwangerschaftswoche, die ersten Monozyten in der 16. Schwangerschaftswoche im Blut. Die Zahl der Gewebsmakrophagen bleibt jedoch über die gesamte Schwangerschaft hinweg geringer als bei Erwachsenen. Auch die Zahl der Granulozyten ist im Vergleich zum Erwachsenen reduziert. Funktionell erreichen diese Zellen beim Feten nicht die Leistungsfähigkeit der entsprechenden Zellen beim Erwachsenen. Bestandteile des Komplementsystems werden nach der 8. Schwangerschaftswoche gebildet, die Konzentrationen im fetalen Blut bleiben jedoch gering (80). Daten zur adaptiven humoralen Immunantwort sind rar, speziell über das Auftreten von vom Feten gebildeten Immunglobulinen besteht Dissens. Immunglobulin M lässt sich im Verlauf des 2. Trimenons nachweisen (65), über den frühestmöglichen Zeitpunkt ist in der Literatur nichts beschrieben.

### 3.13 Fragestellungen

Die folgenden Fragestellungen sollen in dieser Arbeit analysiert werden:

- Sind zum Zeitpunkt der B19V-bedingten fetalen Anämie oder des B19V-bedingten Hydrops anti-B19V-Antikörper im Blut des Feten nachweisbar?
- Wie verhält sich die B19V-IgG-Konzentration des Feten im Verhältnis zur B19V-IgG-Konzentration im mütterlichen Blut?
- Liegen beim Feten möglicherweise B19V-IgG-Antikörper in Immunkomplexen vor?
- Lassen die im Blut von Mutter und Kind gemessenen B19V-Antikörper Rückschlüsse auf den transplazentaren Transport bzw. die B19V-spezifische humorale Immunantwort des Feten zu?
- Wie entwickelt sich die Virämie (bzw. DNSämie) bei Mutter und Fetus nach/bei akuter B19V-Infektion?
- Lassen sich aus den erhobenen Befunden Empfehlungen für eine eventuelle Therapie mit Immunglobulinen bei B19V-Infektion in der Schwangerschaft bzw. bei Vorliegen eines B19V-assoziierten Hydrops fetalis ableiten?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Mutter-Kind Paare bei Vorliegen von fetalen Höhlenergüssen, eines Hydrops fetalis und/oder einer fetalen Anämie im Kontext einer maternalen B19V-Infektion auf die folgenden virologischen/serologischen Parameter untersucht:

- a) B19V-IgG
- b) B19V-IgM
- c) B19V-Viruslast gemessen an den DNS-Kopienzahlen
- d) B19V-IgG nach Dissoziation möglicherweise vorliegender B19V-Immunkomplex

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Proben

Blutproben von 48 schwangeren Frauen und ihren Feten („Mutter-Kind-Paare“) wurden für diese Untersuchung ausgewählt. Die Blutentnahmen erfolgten zwischen Juni 2003 und Juli 2009 in verschiedenen pränatalmedizinischen Zentren in Deutschland im Rahmen der pränatalen Diagnostik bei Verdacht auf fetale Anämie, Vorliegen von fetalen Höhlenergüssen und/oder Vorliegen eines Hydrops fetalis. In allen Fällen wurde im Labor Enders eine Untersuchung auf B19V angefordert. Entweder gezielt oder als Teil einer mikrobiologischen Pränataldiagnostik. Nach Abschluss der serologischen und virologischen Routineuntersuchungen wurden die Restmaterialien bei  $-70^{\circ}$  ( $-20^{\circ}$ ) gelagert.

Alleinige Aufnahmekriterien der Fälle in diese Untersuchung war das Vorhandensein von möglichst zeitgleich von Mutter und Fetus entnommenen Blutproben sowie eine ausreichende Menge an Probenmaterial für die notwendigen Nachtestungen. In dem genannten Zeitraum wurden insgesamt 268 Feten im Labor Enders auf Parvovirus B19-Infektion getestet, durch die angelegten Kriterien konnten jedoch nur diese 48 Fälle für die vorliegende Untersuchung berücksichtigt werden.

In einem Teil der ausgewählten Fälle standen weitere maternale und fetale Blutproben, die im Verlauf der Schwangerschaft oder bei Entbindung entnommen worden waren, zur Verfügung. Informationen zur Anamnese, Klinik und Ultraschall- oder Dopplerbefunden und hämatologischen Befunden aus Fetalblut wurden von den zuweisenden Pränatalmediziner im Rahmen der Routinediagnostik übermittelt.

Sofern verfügbar sind die Angaben in den folgenden Tabellen aufgeführt. Referenzwerte zu der maximalen systolischen Flussgeschwindigkeit in der Arteria Cerebri Media sowie dem fetalen Hämoglobin-Wert wurden von Mari et al. (67;68) beschrieben. In den meisten Fällen wurden intrauterine Transfusionen (IUT) vorgenommen, welche ebenfalls aufgeführt sind.



#### 4.1.1 Klinische Informationen zu den Müttern

Tabelle 1

Fall-Nr.	SSW	Klinik	Kontakt	Vorbefunde	Alter (Jahre)
1	18	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	39
2	18	keine Angaben	nicht bekannt	in 11. SSW B19V-IgG und IgM negativ	32
3	13	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in 10. SSW IgM positiv, IgG positiv	30
4	24	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor bereits in 22. SSW hochavide Antikörper IgG und IgM gefunden, PCR positiv	32
5	26	keine Angaben; Verwandtenehe (2.Grades)	nicht bekannt	keine Angaben	21
6	25	keine Angaben	nicht bekannt	Keine Angaben	24
7	20	keine Angaben	Kinder der Patientin hatten im Kindergarten Kontakt zu Ringelröteln	In Fremdlabor in 18. SSW IgM sowie IgG positiv	39
8	21	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	37
9	20	grippaler Infekt in 14. SSW	nicht bekannt	Keine Angaben	25
10	17	in 15. SSW Arthralgien in kleinen Gelenken	Sohn erkrankt in 13. SSW	in Fremdlabor in 13.SSW seronegativ, in 15. SSW IgM und IgG positiv	36
11	20	keine Angaben	während 17. SSW Exanthem beim Sohn	in Fremdlabor in 18. SSW IgM positiv, IgG grenzwertig	30

Fall-Nr.	SSW	Klinik	Kontakt	Vorbefunde	Alter (Jahre)
12	26	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in 16. SSW IgM positiv, IgG negativ	37
13	21	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in 15. SSW IgM positiv, IgG negativ	22
14	24	Exanthem in 20. SSW	Sohn hatte Kontakt zu Ringelröteln im Kindergarten und „rote Pickel“ in SSW 20	in Fremdlabor in 20. SSW IgM positiv, IgG positiv	38
15	17	keine Angaben	Patientin hatte Kontakt zu erkranktem Kind	in Fremdlabor in 15. SSW IgM positiv, IgG negativ, DNA-Nachweis positiv	33
16	16	keine Angaben	Kontakt zu Ringelröteln	keine Angaben	30
17	21	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	24
18	24	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in 24. SSW IgM und IgG positiv	26
19	24	Exanthem in 22. SSW	nicht bekannt	keine Angaben	34
20	30	Exanthem in 29. SSW	nicht bekannt	vor der Schwangerschaft seronegativ	41
21	25	Exanthem in 17. SSW	Tochter hatte Kontakt zu Ringelröteln	keine Angaben	31
22	18	Exanthem und Arthralgien in 20. SSW	nicht bekannt	in Fremdlabor in 18. SSW IgM und IgG positiv	37
23	23	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	41
24	23	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	39
25	25	keine Angaben, Verwandtenehe	nicht bekannt	keine Angaben	31
26	32	in der 16. SSW grippaler Infekt	nicht bekannt	keine Angaben	26

<b>Fall-Nr.</b>	<b>SSW</b>	<b>Klinik</b>	<b>Kontakt</b>	<b>Vorbefunde</b>	<b>Alter (Jahre)</b>
27	21	keine Angaben	in 18. SSW Kind mit Ringelröteln	in Fremdlabor in 18. SSW IgM und IgG positiv	35
28	18	Exanthem in 13. SSW	nicht bekannt	in Fremdlabor in 13. SSW IgM und IgG positiv	35
29	16	Exanthem in 10. SSW	nicht bekannt	in Fremdlabor in 12. SSW IgM positiv, IgG negativ	29
30	19	Exanthem in 15. SSW	nicht bekannt	in Fremdlabor in 15. SSW IgM und IgG positiv	27
31	17	keine Angaben	als Erzieherin in 11. SSW Kontakt zu Ringelröteln	keine Angaben	23
32	16	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in der 9. SSW IgM positiv, IgG negativ	34
33	21	keine Symptome	nicht bekannt	keine Angaben	33
34	25	fiieberhafter Infekt in 7. SSW	nicht bekannt	in Fremdlabor in 9. SSW IgM positiv, IgG negativ	37
35	19	in 13. SSW Arthralgien in den Händen	nicht bekannt	keine Angaben	33
36	31	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	24
37	33	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	26
38	22	in 16. SSW Arthralgien	nicht bekannt	keine Angaben	27
39	35	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in 26. SSW DNA-Nachweis positiv	40
40	32	keine Angaben	nicht bekannt	in Fremdlabor in 30. SSW IgM positiv, IgG negativ	29

Fall-Nr.	SSW	Klinik	Kontakt	Vorbefunde	Alter (Jahre)
41	21	keine Angaben	retrospektiv bestätigt	keine Angaben	41
42	20	8.-10. SSW grippale Symptome	nicht bekannt	keine Angaben	39
43	39	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	25
44	21	keine Symptome	in 15. SSW Ehemann infiziert	keine Angaben	28
45	25	keine Angaben	in 23. SSW „Scharlach“ bei der Tochter ohne Abstrichnahme	keine Angaben	25
46	20	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	28
47	17	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	35
48	22	keine Angaben	nicht bekannt	keine Angaben	43

#### 4.1.2 Angaben zur Klinik der Feten

Tabelle 2: Zeitpunkt der Untersuchung des Feten und Angaben zu Ultraschall, Doppler, laborchemischen Befunden und Schwangerschaftsausgang:

Fall-Nr.	SSW	Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler	laborchemische Befunde	Intervention & Schwangerschaftsausgang
1	22	keine Anämie; keine Hydropszeichen; B19V-PCR im Fruchtwasser positiv; Vmax 24,2cm/s	Hb 10,5; Ery 2,3/dl; Retikulozyten absolut $0,63 \times 10^{12}/l$ ; Retikulozyten relativ 273,0‰	keine Intervention Geburt in 39. SSW
2	18	generalisierter Hydrops fetalis; Aszites; Hautödeme; Hydrothorax; AV-Klappeninsuffizienz; Myokarditis; Anämie; Vmax 33,4cm/s;	Hb 3,9 g/dl; Ery $0,55 \times 10^{12}/l$ ; Retikulozyten absolut $100.000/\mu l$ ; Retikulozyten relativ 182‰	1x IUT IUFT

<b>Fall-Nr.</b>	<b>SSW</b>	<b>Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler</b>	<b>laborchemische Befunde</b>	<b>Intervention &amp; Schwangerschaftsausgang</b>
<b>3</b>	17	White Spot linke Herzkammer; Vmax 34,9 cm/s	Hb 9,6; Ery 2,17x10e12; Retikulozyten absolut 450.000/µl; Retikulozyten relativ 208‰	1x IUT Spontangeburt in 35. SSW, Apgar-Score 9/10/10
<b>4</b>	24	Anämie; Vmax 54,3 cm/s	Hb 4,1; Ery 3,04x10e12; Retikulozyten absolut 96.000/µl; Retikulozyten relativ 109‰	2x IUT Spontangeburt in 42. SSW, Apgar-Score 9/9/10
<b>5</b>	26	Verwandtenehe; Hydrops fetalis; milder Perikarderguss; Kardiomegalie; Aszites, generalisierte Ödeme; Hautödeme; verdickte Plazenta; AV-Klappeninsuffizienzen; Oligohydramnion; Anämie; Vmax 96,6 cm/s;	Hb 1,9 g/dl;	
	28	Vmax 90,8 cm/s;	Hb 8,5 g/dl; Ery 2,3x10e12/l; Retikulozyten absolut 9800/µl	3x IUT Ausgang unbekannt
<b>6</b>	25	Hyperechogener Darm	Hb 9,5 g/dl; Ery 2,53x10e12/l; Retikulozyten absolut 240.000/µl	1x IUT Geburt in 39. SSW
<b>7</b>	20	Geminigravidität (dichorial-diamnial); Fet 2 bereits Spontanabort zum Diagnosezeitpunkt; Fet 1 mit: Polyhydramnion; Anämie; kein Hydrops, lebhafter Fet; Vmax 38,3 cm/s;	Fet 1: Hb 6,9 g/dl; Ery 1,56x10e12/l;	Fet 2: IUFT in 20. SSW Fet 1: Sectio in 36. SSW; Apgar-Score 9/9/9;
<b>8</b>	21	Hydrops fetalis; ausgeprägter Aszites; Anämie; geringe AV-Klappeninsuffizienz; Vmax 42,5 cm/s;	Hb 4,0 g/dl; Ery 0,8x10e12/l; Retikulozyten absolut 144.000/µl; Retikulozyten relativ 205‰	2x IUT Geburt in 40. SSW

Fall-Nr.	SSW	Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler	laborchemische Befunde	Intervention & Schwangerschaftsausgang
9	23	Hydrozephalus; V.a. Holoprosencephalie	Hb 9,5; Ery 2,6x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 408.000/ $\mu$ l; Retikulozyten relativ 200‰	Abruptio
10	17	Hydrops fetalis; Vmax 50,0 cm/s;	Hb 3,0 g/dl;	
	34	Vmax 76,2 cm/s;	Hb 10,9 g/dl; Ery 3,2x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 145 ‰	2x IUT Ausgang unbekannt
11	20	leichte Anämie	Hb 8,3 g/dl; Ery 2,04x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 193 ‰	1x IUT Spontangeburt 42. SSW; Apgar-Score 9/10/10
12	26	Hydrops fetalis; ausgeprägter Aszites; milder Hydrothorax beidseits; Trikuspidal- und Mitralinsuffizienz; Perikarderguss; Oligohydramnion; schwere Anämie; Vmax 67,4 cm/s;	Hb 2,9 g/dl; Ery 1,17x10 <sup>12</sup> /l;	6x IUT Spontangeburt in 40. SSW, Apgar-Score 9/10/10
13	21	Anämie, Vmax 38,0 cm/s	Hb 4,5 g/dl; Ery 1,31x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 75.000/ $\mu$ l	4x IUT Sectio in 35. SSW, Apgar-Score 6/8/9
14	25	Anämie, Vmax 53,0 cm/s	Hb 5,0 g/dl; Ery 2,43x10 <sup>12</sup> /l;	2x IUT Sectio in 39. SSW, Apgar-Score 10/10/10
15	17	schwere Anämie und Thrombozytopenie; Trikuspidalregurgitation; Oligohydramnion	Hb 3,7 g/dl; Ery 0,7x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 1‰;	

Fall-Nr.	SSW	Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler	laborchemische Befunde	Intervention & Schwangerschaftsausgang
	20		Hb 6,7 g/dl; Ery 1,9x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 180.000/ $\mu$ l; Retikulozyten relativ 10‰	
	26	Vmax 43,0 cm/s;	Hb 11,2 g/dl; Ery 2,92x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 334.000/ $\mu$ l; Retikulozyten relativ 130‰	3x IUT Spontangeburt in 41. SSW, Apgar-Score 9/10/10
<b>16</b>	16	Anämie; Trikuspidalinsuffizienz; Vmax 50,9 cm/s;	Hb 4,1 g/dl; Ery 0,72x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 76‰;	3x IUT
	24		Hb 13,3 g/dl; Retikulozyten relativ 197,0‰; vor 4.IUT	1x IUT Sectio in 38. SSW, Apgar-Score 7/7/8, Atemnotsyndrom, Neuroblastom linke Niere
<b>17</b>	22	Hydrops fetalis; Aszites; Klumpfuß beidseits; Wachstumsretardierung; Anämie; Vmax 36 cm/s;	Hb 3,0 g/dl; Ery 3,05x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 128.000/ $\mu$ l; Retikulozyten relativ 42,1‰	1x IUT Abruptio
<b>18</b>	24	Rhesus-Inkompatibilität; Hydrops fetalis; milder Perikarderguss; kraniales Hautödem; ausgeprägter Aszites; Anämie; Vmax 69,7 cm/s;	Hb 2,0 g/dl;	2x IUT, Ausgang unbekannt
<b>19</b>	25	Hydrops fetalis; Aszites, Kardiomegalie; kleiner Perikarderguss; Anämie; Vmax 45,5 cm/s;	Hb 7,9 g/dl; Ery 2,03x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 496.000/ $\mu$ l; Retikulozyten relativ 244,5‰	1x IUT Spontangeburt (Hausgeburt) in 41. SSW
<b>20</b>	32	Wachstumsretardierung; Vmax 59,0 cm/s;	Hb 12,1 g/dl; Ery 3,33x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 409.000/ $\mu$ l	1x IUT Spontangeburt in 41. SSW, Apgar-Score 9/10/10

Fall-Nr.	SSW	Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler	laborchemische Befunde	Intervention & Schwangerschaftsausgang
21	25	Vmax 40,0 cm/s;	Hb 11,1 g/dl; Ery 3,22x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 106,7‰	1x IUT Spontangeburt in 40. SSW; Apgar-Score 9/9/9
22	21	Hydrops fetalis; Trikuspidalinsuffizienz; Kardiomegalie; Aszites; verdickte Plazenta; Anämie; Vmax 47,4 cm/s; Hb 4,0 g/dl;	Hb 4,0 g/dl;	1x IUT Spontangeburt in 42. SSW; Apgar-Score 9/10/10
23	23	Vmax 40,9 cm/s;	Hb 10,2 g/dl;	1x IUT Notsectio in 40. SSW, Apgar-Score 8/9/9
24	23	Anämie; Vmax 47,6 cm/s;	Hb 1,7 g/dl	1x IUT Spontangeburt in 38. SSW, Apgar-Score 9/10/10
25	25	Geminigravidität (dichorial-diamnial); Fet 1 mit: Hydrops Fetalis; Aszites, Anämie; (Untersuchte Probe stammt von Fet 1) Fet 2 unauffällig	Hb 7,1 g/dl;	1x IUT Geburt in 39. SSW
26	30	massiver Hydrops fetalis; Aszites; dilatiertes Herz; hydropische Plazenta; Anämie; Vmax 53,9 cm/s;	Hb 6,5 g/dl; Ery 1,31x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 89‰	2x IUT Sectio in 32. SSW ; Apgar-Score 3/7/7
	32	Auffällig nach Geburt; Hämangiom, Atemnot bei Geburt;	Hb 11,4 g/dl; Ery 3,15x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 89‰	
		1 Monat postpartal:	Hb 10,7 g/dl	



Fall-Nr.	SSW	Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler	laborchemische Befunde	Intervention & Schwangerschaftsausgang
27	21	Anämie; Polyhydramnion; Vmax 51,5 cm/s;	Hb 4,0 g/dl; Ery 0,8x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 45.000/μl;	1x IUT Spontangeburt in 42. SSW; Apgar-Score 9/9/10, Ikterus Neonatorum, Hyperbilirubinämie
28	18	Hydrops fetalis; Hydrothorax, Aszites, Trikuspidalinsuffizienz; Polyhydramnion; Vmax 37 cm/s;	Hb 4,3 g/dl; Ery 0,8x10 <sup>12</sup> /l;	1x IUT Sectio in 36. SSW; Apgar-Score 9/10/10
29	16	Hydrops fetalis; Aszites; Perikarderguss; Polyhydramnion; verdickte Plazenta; Anämie; Vmax 40 cm/s;	Hb 4,7 g/dl; Ery 0,9x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 35.000/μl; Retikulozyten relativ 37,3‰	3x IUT Sectio in 42. SSW, Apgar-Score: 8/8/9; Polyglobulie
30	19	Hydrops fetalis; spärliche Kindsbewegungen; verdickte Plazenta; Polyhydramnion; Anämie; Vmax 42,0 cm/s;	Hb 4,8 g/dl; Ery 1,07x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 1,5‰	3x IUT Spontangeburt in 40. SSW; Apgar-Score 9/10/10
31	17	leichte Anämie; spärliche Kindsbewegungen; minimale ödematöse Einlagerungen; Vmax 32,8 cm/s;	Hb 8,2 g/dl; Ery 2,3x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 708.000/μl; Retikulozyten relativ 228,3‰;	1x IUT Spontangeburt in 40. SSW, Apgar-Score 7/8/8; leichte bis mäßige Asphyxie unter Geburt, Anpassungsstörung
32	17	Vmax 34 cm/s;	Hb 9,8 g/dl; Ery 2,26x10 <sup>12</sup> /l;	1x IUT Ausgang unbekannt
33	21	Hydrops fetalis; ausgeprägter Aszites; Stirnödem; vergrößertes Herz; Anämie; Vmax 51,8 cm/s;	Hb 2,5 g/dl; Ery 0,5x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 23,8 ‰;	2x IUT IUFT

<b>Fall-Nr.</b>	<b>SSW</b>	<b>Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler</b>	<b>laborchemische Befunde</b>	<b>Intervention &amp; Schwangerschaftsausgang</b>
<b>34</b>	21	Hydrops fetalis; Perikarderguss, echodichter Darm, V.a. Blackfan-Diamond Anämie; Vmax 35,5 cm/s;	Hb 4,8 g/dl;	4x IUT Geburt in der 38. SSW: Hb 11,5 g/dl; Hyperbilirubinämie trotz Fototherapie; unklare pränatale hämolytische Anämie
<b>35</b>	19	Hydrops fetalis; Aszites; Brachycephalus; Perikarderguss; generalisiertes Ödem; Wachstumsretardierung; Hydrothorax; Anämie; Vmax 39,1 cm/s;	Hb 4,5 g/dl; Ery 0,6x10 <sup>12</sup> ;	1x IUT IUFT nach IUT
<b>36</b>	31	massiver Hydrops fetalis; Mikrocephalie; Kardiomegalie; Verdacht auf Myokarditis;	Hb 11,5 g/dl;	Geburtseinleitung in 32. SSW, Totgeburt
<b>37</b>	33	Hydrops fetalis; AV-Insuffizienz; Polyhydramnion; V.a. Wiedemann-Beckwith-Syndrom;	Hb 11,9 g/dl; Ery 3,7x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 216.000/μl;	1x IUT Ausgang unbekannt
<b>38</b>	22	Hydrops fetalis; reduzierte Kindsbewegungen; Aszites, Hautödem; Perikarderguss; Kardiomegalie; AV-Insuffizienz; hydropische Plazenta; Anämie; Vmax 44,0 cm/s;	Hb 1,8 g/dl; Ery 0,37x10 <sup>12</sup> /l;	7x IUT Sectio in 25. SSW, Gewicht 780g Apgar-Score 1/2/3 Amnioninfektsyndrom vermutlich durch kontaminierte Blutkonserve, postpartal verstorben
<b>39</b>	35	Vmax 52,0;	Hb 13,8 g/dl; Ery 3,8x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 152.000/μl	keine Angaben Ausgang unbekannt

Fall-Nr.	SSW	Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler	laborchemische Befunde	Intervention & Schwangerschaftsausgang
40	32	Vmax 58 cm/s;	Hb 11,6 g/dl; Ery 3,17x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 258‰	keine Angaben Spontangeburt in 40. SSW, Apgar-Score 9/10/10
41	22	Hydrops fetalis; Stirnödem; Perikarderguss; Trikuspidalregurgitation; Kardiomegalie; Aszites; Anämie; Vmax 56 cm/s	Hb 3,5 g/dl; Ery 0,8x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 32.000/μl; Retikulozyten relativ 41,4‰	3x IUT
	23		Hb 10,2 g/dl; Ery 3,43x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 14.000/μl; Retikulozyten relativ 4,1‰	Spontangeburt in 38. SSW
42	21	Geminigravidität (dichorial); Fet 1 mit Hydrops fetalis; echoreicher Darm; Anämie; Herzdilatation; Polyhydramnion; Vmax 66,4 cm/s; Alle Proben stammen von Fet 1 Fet 2 unauffällig	Hb 2,7 g/dl; Retikulozyten absolut 92.000/μl	1x IUT 38. SSW Spontangeburt eines Feten mit Apgar-Score von 8/9/10; anderer Fet nach Notsectio Apgar-Score 9/10/10
43	39	Vmax 76,0 cm/s;	Hb 12,3 g/dl; Ery 3,57x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 470.000/μl; Retikulozyten relativ 132‰	keine IUT Spontangeburt in 38. SSW
44	20	Hydrops fetalis; Polyhydramnion; Trikuspidalinsuffizienz; Anämie; Vmax 47,9 cm/s;	Hb 4,6 g/dl; Ery 0,84x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 92.000/μl; Retikulozyten relativ 109‰;	2x IUT Sectio in 37. Woche; Apgar-Score 8/8/10
45	26	generalisierter Hydrops fetalis; Aszites; Hydrothorax; generalisierte Ödeme; Anämie; Vmax 46 cm/s;	Hb 5,7 g/dl; Ery 1,3x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 553‰	2x IUT
		Partus:	Hb 16,9 g/dl; Ery 4,94x10 <sup>12</sup> /l	Sectio wegen Mirror-Syndrom in 31. SSW

<b>Fall-Nr.</b>	<b>SSW</b>	<b>Klinik, Ultraschallbefunde und Doppler</b>	<b>laborchemische Befunde</b>	<b>Intervention &amp; Schwangerschaftsausgang</b>
<b>46</b>	20	Anämie; Vmax 43,0 cm/s;	Hb 4,4 g/dl; Ery 0,93x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 114‰	2x IUT
	21		Hb 11,0 g/dl; Ery 3,5x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 242‰	Geburt in 40. SSW; Hb bei Geburt 17,1; Apgar-Score 9/10/10
<b>47</b>	17	Anämie; Vmax 51,0 cm/s;	Hb 3,5 g/dl; Ery 0,63x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten absolut 20.000/μl; Retikulozyten relativ 35‰	1x IUT Ausgang unbekannt
<b>48</b>	22	Hydrops fetalis; kraniales Hautödem; Aszites, Perikarderguss; Anämie; Vmax 58,2 cm/s;	Hb 3,2 g/dl; Ery 0,67x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 20‰	2x IUT
	25	Kardiomegalie; Trikuspidalregurgitation;	Hb 12,1 g/dl; Ery 3,18x10 <sup>12</sup> /l; Retikulozyten relativ 222‰	Spontangeburt 41. SSW; Apgar-Score 9/10/10

### 4.1.3 Weitere Seren

Zusätzlich zu diesen, im Folgenden immer als „Fälle“ bezeichneten Proben, wurden für einige Testverfahren weitere Proben genutzt:

**Tabelle 3: Beschreibung der zusätzlich verwendeten Blutproben**

<b>Bezeichnung im Text</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>Pool 14 IU</b>	Gepooltes Serum mit der Eigenschaft, 14 IU Immunglobulin G pro Milliliter zu enthalten. Hergestellt aus mehreren im Labor Enders nicht mehr benötigten Proben.
<b>Pool 18 IU</b>	Gepooltes Serum mit der Eigenschaft, 18 IU Immunglobulin G pro Milliliter zu enthalten. Hergestellt aus mehreren im Labor Enders nicht mehr benötigten Proben
<b>Serum 1</b>	Länger zurückliegende Infektion mit B19V; 1600 DNS-Kopien/ml, IgG >50 IU/ml
<b>Serum 2</b>	Länger zurückliegende Infektion mit B19V; DNS-negativ, IgG 37 IU/ml
<b>Serum 3</b>	akute Infektion mit B19V; PCR > 87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 0,2
<b>Serum 4</b>	akute Infektion mit B19V; PCR > 87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM negativ
<b>Serum 5</b>	akute Infektion; PCR 1,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 8,9
<b>Serum 6</b>	akute Infektion; PCR 1 Million Kopien/ml, IgG negativ, IgM 6,9
<b>Serum 7</b>	akute Infektion; PCR > 87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 0,7
<b>Serum 8</b>	akute Infektion; PCR > 87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 1,2

Es wurde im Verlauf zwei Mal ein Pool angesetzt, da die Menge des ersten Pools im Verlauf nicht ausreichend war.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Geräte

- QIACube: QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
- Lightcycler: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Wärmeschrank: function line, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Zentrifuge: Heraeus Pico 17 Centrifuge, Thermo electron corporation, Karlsruhe, Deutschland

- Gekühlte Zentrifuge: Biofuge 22R, Thermo electron corporation, Karlsruhe, Deutschland
- Behring ELISA-Processor III: Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
- Vortex Genie 2TM: Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
- LC Carousel Centrifuge: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- pH-Meter: „Seven Easy“, Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
- Präzisionswaage: PE 360, Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
- Nephelometer: Roche-Hitachi Modular Core p800; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Pipetten:
  - Handdispenser: *Multipette® plus*; Eppendorf AG, Deutschland, Hamburg
  - *Reference®*; Eppendorf AG, Deutschland, Hamburg
  - DISCOVERY autoclavable; Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland

#### 4.2.2 Verbrauchsmaterialien

- Handdispenser-Spitzen: Combitips plus; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pipettenspitzen gestopft: nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
- ELISA-Prozessor-Waschlösung: Enzygnost®/TMB Waschlösung POD; Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
- LightCycler® Capillaries: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Eppendorf-Gefäße: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Laborglaswaren: Schott AG, Mainz, Deutschland

#### 4.2.3 Parvovirus B19-Testkits

- Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay: Biotrin International, Dublin, Irland
- Parvovirus B19 IgG Enzyme Immunoassay: Biotrin International, Dublin, Irland
- Parvovirus B19 Antigen-Capture EIA: Biotrin International, Dublin, Irland (dies ist kein kommerziell vertriebener Test):
  - Mikrotiterplatten beschichtet mit Anti-VP2-IgG, gewonnen aus Schafsserum
  - Probenverdünnungspuffer mit niedrigem pH-Wert
  - Waschpufferkonzentrat, nicht näher spezifiziert

- Konjugat, enthaltend von Hasen gewonnenes Anti-VP2-IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase
  - Substrat, enthaltend Tetramethylbenzidin
  - Stopplösung: 1N Schwefelsäure
- Alle Informationen entstammen (81).

- *recomLine* Parvovirus B19 IgG: Mikrogen molekularbiologische Entwicklungs-GmbH, Neuried, Deutschland
- QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit: QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

#### 4.2.4 Reagenzien

- HCl 2 mol/l: Merck KG, Darmstadt, Deutschland,
- NaOH 4 mol/l: Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Glycin: Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- VP2-Lösung: Biotrin, Dublin, Irland
- PEG 6000 & 8000: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- PBS: Inhouse, NaCl 8 g/l, Di-Natriumhydrogenphosphat 2,89g/l, Kaliumchlorid 0,2 g/l, Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l, HCl 0,05 ml/l
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- NaCl: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Natriumborat (Borax, di-Natriumtetraborat-Decahydrat): Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure: Merck KG, Darmstadt, Deutschland
- PCR-Substanzen:
  - DNS-Standardlösungen: NIBSC-Standard 99/800 (National Institute for Biological Standards and Control, UK)
  - Negativkontrolle: für die Molekularbiologie gereinigtes Wasser, DEPC-behandelt, Hersteller: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
  - LightCycler-Puffer: enthält 4 mMol/l MgCl<sub>2</sub> in für die Molekularbiologie gereinigtem Wasser, Hersteller: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

- Mastermix: LC FastStart DNS Master Hyb Probes, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- Maus-Inhibitionskontrolle: Maus-DNS isoliert aus Zelllinie P815, gelöst in für die Molekularbiologie gereinigtem Wasser
- Primer-Sonden-Mix:
  - 10 µl Primer (Konzentration 100 µM) für B19V-DNS (s.u. Hersteller TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland)
  - 10 µl Primer (Konzentration 100 µM) für Maus-Kontrolle (s.u. Hersteller TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland)
  - 4µl Donorsonde (Konzentration 50 µM) und 8 µl Akzeptorsonde (Konzentration 50µM) für B19V-DNS (s.u. Hersteller TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland)
  - 4µl Donorsonde (Konzentration 50 µM) und 8 µl Akzeptorsonde (Konzentration 50 µM) für Maus-Kontrolle (s.u. Hersteller TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland)
  - 356 µl für die Molekularbiologie gereinigtes Wasser
- Rinderalbumin (BSA): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## 4.2.5 Herstellung von Dissoziationslösungen

### 4.2.5.1 Methode nach Pokriefka et al. (82):

- 1,5 M Glycin mit pH 1,85: 11,26g Glycin mit deionisiertem Wasser auf 100ml aufgefüllt, unter Zugabe von HCl unter kontinuierlicher pH-Wert-Messung bei Raumtemperatur titriert bis pH 1,85. Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei +4° C.
- 1,5 M Tris-Puffer mit pH 9,0: 18,17g TRIS mit deionisiertem Wasser auf 100ml aufgefüllt, unter Zugabe von NaOH bei kontinuierlicher pH-Wert-Messung titriert auf pH 9,0 bei Raumtemperatur. Lagerung bei Raumtemperatur.

### 4.2.5.2 Methode nach Koraka et al. (83):

- 1,5 M Glycin-Lösung mit pH 2,8: 11,26g Glycin mit deionisiertem Wasser auf 100ml aufgefüllt, unter Zugabe von HCl unter kontinuierlicher pH-Wert-Messung bei Raumtemperatur titriert bis pH 2,8. Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei +4° C.



- 1,5 M Tris-Puffer mit pH 9,7: 18,17g TRIS mit deionisiertem Wasser auf 100ml aufgefüllt, unter Zugabe von NaOH bei kontinuierlicher pH-Wert-Messung titriert auf pH 9,7 bei Raumtemperatur. Lagerung bei Raumtemperatur.

#### **4.2.5.3 Methode nach Weber et al.: (84)**

- 0,5 N HCl: 25 ml HCl (2 mol/l) mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt
- 0,5 N NaOH: 12,5 ml NaOH (4 mol/l) mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt

#### **4.2.5.4 Methode nach Brunner et al.: (85)**

- 0,1M Natriumborat-Puffer, pH 8,4: 2,012 g Natriumborat (Borax) mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, bei Raumtemperatur unter Zugabe von HCl auf pH 8,4 titriert
- 7% PEG (8000), 0,44% NaCl in 0,1M Natriumborat-Puffer, pH 8,4: Lagerung bei Raumtemperatur
- 3,5% PEG (8000) 0,1M in Natriumborat-Puffer, pH 8,4: Lagerung bei Raumtemperatur
- 0,1 M Natriumborat-Puffer, pH 10,2: 2,012 g sodium borate (Borax) mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, bei Raumtemperatur unter Zugabe von HCl auf pH 10,2 titriert. Lagerung bei Raumtemperatur

#### **4.2.5.5 Methode nach Kestens et al.: (86)**

- 0,2 M EDTA pH 7,5: 5,84g EDTA wurden mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und mit NaOH unter kontinuierlicher pH-Wert-Messung auf pH 7,5 titriert. Lagerung bei Raumtemperatur
- 6 M Guanidin: 35,4g Guanidin wurden mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Lagerung im Kühlschrank bei 4° C.
- 12% PEG(6000): 12g PEG(6000) wurden in 88g deionisiertem Wasser gelöst. Lagerung bei Raumtemperatur.

#### **4.2.6 Computerprogramme**

- Zur Durchführung statistischer Tests wurde SPSS verwendet.
- Einige Abbildungen wurden mit „GraphPad Prism for Windows Version 5.02“ erstellt
- Das Literaturverzeichnis wurde mit „Reference Manager“ erstellt

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 ELISA Immunglobulin G (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Zur quantitativen Messung der B19V-IgG-Konzentrationen im mütterlichen und fetalen Serum wurde ein IgG Enzymimmunoassay (Sandwich-ELISA) der Firma Biotrin verwendet. In diesem Test dient rekombinant hergestelltes B19V-VP2 (Virus-Protein 2) als Antigen. Mit Meerrettichperoxidase markierte Kaninchenantikörper gegen humanes Immunglobulin G wurden zur Detektion der B19V-spezifischen Immunglobuline G im Patientenserum eingesetzt. Substrat für die Meerrettichperoxidase war Tetramethylbenzidin, die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Es wurden bei jeder Durchführung des Tests die Messungen einer Negativ-, einer Positivkontrolle sowie zweier cut-off-Kontrollen wie vom Hersteller geliefert, und einer Haus-internen Präzisionskontrolle durchgeführt. Zur Erstellung der Referenzkurve wurden 4 Standards mit 50 IU/ml, 25 IU/ml, 6 IU/ml und 2 IU/ml bei jedem Testansatz mit getestet. Diese Standards wurden im Labor Enders in Stuttgart anhand der WHO-Standards (NIBSC 93/724), wie von K.Searle (87) beschrieben, hergestellt. Für den ELISA wurde ein Behring ELISA Processor III eingesetzt. Der von Biotrin für diesen Test gelieferte Waschpuffer wurde nach einer Validierung im Labor Enders durch Behring ELISA Processor-Waschlösung POD ersetzt, da dies für den Routineeinsatz praktikabler war. Weitere Änderungen am Testablauf und den verwendeten Lösungen wurden nicht vorgenommen, so dass die entsprechenden Informationen dem Beiheft der Firma Biotrin zu entnehmen sind.

Rohwerte, Ergebnisse und die Standardkurve wurden am Behring ELISA Processor III ausgedruckt.

Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit einem berechneten Grenzwert (Cut-off-Wert).

Berechnung des Cut-off-Wertes = mittlere Extinktion des Kalibrators ( 2 Cut-off-Kontrollen)

Interpretation:

Proben mit einer Extinktion  $>$  Cut-off-Wert  $\times$  1,1 gelten als positiv

Proben mit einer Extinktion  $<$  Cut-off-Wert  $\times$  0,9 gelten als negativ

Proben mit einer Extinktion  $\geq$  Cut-off-Wert  $\times$  0,9 und  $\leq$  Cut-off-Wert  $\times$  1,1 gelten als nicht eindeutig.

Aus den vier mitgeführten Standards wurde eine Eichkurve erstellt und der Immunglobulin G-Gehalt der Probe direkt vom Behring ELISA Processor III berechnet. Die Eichkurve wurde entsprechend den 4 Standards für den Bereich zwischen 2 und 50 IU/ml erstellt. Werte  $<$ 3 IU/ml werden als negativ bewertet, Werte über 50 IU/ml werden als  $>$ 50 IU/ml angegeben.

Im Bereich  $>50$  IU/ml flacht die Messkurve deutlich ab, so dass kleine Unterschiede im Messergebnis (OD) zu deutlich differenten Messwerten (IU/ml) führen. Dies wiederum bedeutet, dass die einzelnen Messwerte nur bedingt reproduzierbar sind solange nicht verdünnt wird, wobei diese Maßnahme wiederum die Gefahr von Verfälschungen der Messwerte mit sich bringen würde.

Der ELISA für B19V-spezifisches Immunglobulin G gehört zu den Routinetestverfahren im Labor Enders, Stuttgart und wurde dort auch durchgeführt. Die ELISAs im Anschluss an die Dissoziationsversuche sowie notwendige Nachtestungen wurden vom Doktoranden selbst durchgeführt.

#### **4.3.2 ELISA Immunglobulin M (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**

Ein Enzym-Immunoassay der Firma Biotrin wurde zur Ermittlung der B19V-Immunglobulin M-Konzentrationen im fetalen und mütterlichen Serum angewandt. Dabei handelte es sich um einen  $\mu$ -capture Sandwich-Test. Die Mikrotiterplatten waren mit Kaninchenantikörpern gegen humanes Immunglobulin M beschichtet. Als Antigen für die B19V-Immunglobuline M wurde biotinyliertes rekombinantes B19V-Virusprotein 2 aus einem Baculo-Expressionssystem verwendet. Die Bindung des Antigens an die Immunglobuline wurde durch Umsetzung von Tetramethylbenzidin durch Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm. Es wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle sowie zwei Cut-Off-Kontrollen, die fertig vom Hersteller geliefert wurden, bei jedem Test durchgeführt. Zum Einsatz kam der Behring ELISA-Prozessor III. Der von Biotrin gelieferte Test wurde dahingehend modifiziert, dass nach entsprechender Validierung im Labor Enders statt des Biotrin-Waschpuffers die Behring ELISA Processor Waschlösung POD eingesetzt wurde, weil dies für den Routine-Betrieb praktikabler war. Weitere Abweichungen vom kommerziellen Test gab es keine, weshalb für Informationen zu benötigten Materialien und Programmablauf die Testanleitung der Firma Biotrin zu Rate gezogen werden kann.

Die **Auswertung** erfolgte anhand eines berechneten Grenzwertes (Cut-off-Wert).

Berechnung des Grenzwertes: Cut-off-Wert = mittlere Extinktion des Kalibrators (2 Cut-off-Kontrollen).

Die Indexwerte der getesteten Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Index} = \text{Extinktion der Probe} / \text{Cut-Off-Wert}$$

Interpretation (Indexberechnung):

Tabelle 4: Auswertungsschema des IgM-ELISAs

Proben-Ergebnis [Index]	Bewertung
$\geq 4,0$	hoch positiv
1,4 - 3,9	positiv
1,2-1,3	schwach positiv
0,9-1,1	grenzwertig
$< 0,9$	negativ

Anders als im ELISA für Immunglobulin G erfolgte im ELISA für Immunglobulin M keine Umrechnung der Extinktionswerte in IU/ml, da für Immunglobulin M kein internationaler Standard existiert (24).

Dieser Test wird in der täglichen Routine im Labor Enders durchgeführt. Für die Studie waren bei einigen Patienten Nachtestungen notwendig, die vom Doktoranden durchgeführt wurden.

### 4.3.3 Line-Test

Es wurde zur Identifikation unterschiedlicher Immunglobuline G im Blut der Schwangeren und im Blut der Feten ein *recomLine* Immunoassay der Firma Mikrogen eingesetzt. Die Teststreifen waren mit den viralen Antigenen VP-2p, VP-2r, VP-N, VP-C, VP-1S und NS1 beschichtet.

Erläuterungen zu den einzelnen Antigenen, entnommen den Herstellerangaben und Pfrepper et al. (35):

- VP-2p: VP-2p ist ein Konformationsepitop, das heißt es wird abhängig von seiner Tertiärstruktur von Antikörpern gebunden. Immunglobulin G gegen VP-2p ist in der Regel lebenslang und in der frühen Phase der Infektion nachweisbar.
- VP-2r: VP-2r ist ein lineares Epitop, welches unabhängig von seiner Tertiärstruktur nur anhand seiner Primär- und Sekundärstruktur von Antikörpern erkannt wird. Gegen VP-2r gerichtetes Immunglobulin G ist frühzeitig, aber in der Regel nur einige Monate, nachweisbar.
- VP-N: VP-N ist ein Konformationsepitop am N-terminalen Ende des Kapsidproteins Virusprotein 1 (Virusprotein 1-spezifische Region). Immunglobulin G gegen VP-N ist oft jahrelang vorhanden.

- VP-C: VP-C ist ein lineares Epitop am C-terminalen Ende der Kapsidproteine Virusprotein 1 und Virusprotein 2. Antikörpertests zeigen früh im Verlauf der B19V-Infektion Reaktivität, die Immunglobuline G persistieren jedoch in der Regel nur für sechs bis neun Monate.
- VP-1s: VP-1s ist ein spezifisches N-terminales Fragment des Virusproteins 1. Immunglobulin G gegen dieses Epitop persistiert in der Regel lange.
- NS-1: NS-1 ist das Epitop des Nichtstrukturproteins 1. Tests auf Immunglobulin G gegen NS-1 sind frühestens sechs bis acht Wochen nach Infektion bei mindestens 20 % der Erkrankten positiv. Eventuell dienlich als Hinweis auf Persistenz des Virus (35).

An Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper gegen humane Immunglobuline G aus Kaninchen ermöglichten die Erkennung von gebundenen spezifischen Immunglobulinen G, die in den Proben enthalten waren. Substrat der Meerrettichperoxidase war Tetramethylbenzidin. Eine integrierte Cut-off-Bande diente zur Kalibrierung.

Die *Auswertung* erfolgte mit Mikrogen *recomScan* v2.6 nach folgendem Schema:

**Tabelle 5: Auswertungsschema des Line-Tests**

<b>Auswertung der Bandenintensität mit Mikrogen recomScan v2.6</b>	
<b>Banden</b>	<b>Intensität</b>
Keine Reaktion	-
Sehr schwache Intensität (geringer als Grenzwert)	+/-
Schwache Intensität (entspricht Grenzwert)	+
Starke Intensität (stärker als Grenzwert)	++
Sehr starke Intensität	+++

Der Test galt dann als positiv, wenn mindestens 2 Banden mit schwacher Intensität dargestellt wurden oder wenn VP-2p mindestens schwache Intensität zeigte. In den Resultaten wird auf die Intensitäten Bezug genommen.

#### **4.3.4 Bestimmung des Infektionszeitpunktes**

Die im Line-Test gewonnenen Ergebnisse wurden in der Folge dazu eingesetzt, den Infektionszeitpunkt genauer zu bestimmen. Ergänzt wurde der Line-Test zu diesem Zweck durch die klinischen und anamnestischen Angaben, durch Testergebnisse aus Fremdlabors sowie durch die für diese Studie durchgeführten ELISA für Immunglobulin M und die PCR.

Zur Interpretation von IgG- und IgM-Werten und PCR-Ergebnissen, siehe auch Abbildung 2 unter „Immunantwort“ in der Einleitung. Das Vorgehen war dabei wie folgt:

- a) Zunächst wurden die anamnestischen Angaben ausgewertet. Ergaben die anamnestischen Angaben die Möglichkeit eines Kontakts zu Menschen mit B19V-spezifischen Symptomen, wurde dies als erster Hinweis gewertet.
- b) Ergaben die anamnestischen Angaben B19V-assoziierte Symptome, so wurden auch diese einbezogen und in zeitlichen Zusammenhang mit einer Infektion gebracht, je nachdem, zu welchen Zeitpunkten einer Infektion gewisse Symptome auftreten, z.B. Fieber oder Anämie 7 bis 12 Tage nach Infektion oder Exanthem oder Arthritis 10 bis 20 Tage nach Infektion (16).
- c) Vorbefunde, in welchen die Patientinnen negativ auf B19V-IgG und IgM getestet wurden, wurden so interpretiert, dass die Infektion maximal eine Woche vor diesen negativen Testergebnissen erfolgt sein konnte, da B19V-IgM ca. eine Woche nach Infektion nachweisbar ist (16).
- d) Vorbefunde (aus Fremdlabors), in welchen die Patientinnen positiv auf B19V-IgM oder IgG getestet wurden, wurden im Zusammenhang mit den eigenen Tests betrachtet, da speziell die IgM-Werte laborspezifisch sind und sich auch falsch positive Befunde ergeben können.
- e) Ergab sich aus der Anamnese kein Hinweis und lagen keine Vorbefunde vor, so wurde zunächst anhand von IgM, IgG und B19V-Genomkopienzahl der Infektionszeitpunkt eingegrenzt. Dabei sprachen eine hohe Viruslast und hohe IgM-Werte für eine kürzer zurückliegende Infektion, niedrige Viruslast, niedrige oder negative IgM-Werte und hohe IgG-Werte für eine länger zurückliegende Infektion.
- f) Zur Bestätigung wurde der Line-Test ausgewertet, berücksichtigt wurde die Reaktivität gegen die oben beschriebenen Epitope, insbesondere das Verhältnis von konformellen zu linearen Epitopen und das Auftreten von IgG gegen NS1.

Auch bei Anwendung aller dieser Verfahren zum Infektionszeitpunkt ergab sich nicht in allen Fällen ein klarer, eindeutiger Infektionszeitpunkt. Aus diesem Grund wurde der Infektionszeitpunkt immer in Form eines wahrscheinlichen Infektionszeitraums dokumentiert. Beispielhaft sei die Bestimmung des Infektionszeitraumes an einigen Fällen dargestellt:

- Fall 10: da in der 15. SSW Immunglobulin M und Immunglobulin G auftraten, diese in der 13. SSW jedoch noch nicht nachweisbar waren, musste die Infektion mindestens zwei

Wochen vor der 15. SSW erfolgt sein, jedoch nicht vor der 12. SSW, da sonst in der 13. SSW bereits Immunglobulin M hätte nachweisbar sein müssen.

- Fall 11: positives Immunglobulin M und grenzwertiges Immunglobulin G im Fremdlabor deuten darauf hin, dass die Infektion mindestens 7 Tage, aber maximal 3 Wochen zurückliegt und gerade der Immunglobulin-Klassenwechsel erfolgt.
- Fall 26: Die sehr starke Reaktivität im Line-Test für Immunglobulin G gerichtet gegen das Epitop NS1 macht es wahrscheinlich, dass die Infektion mindestens acht Wochen vor der Untersuchung geschehen war, also vor oder in der 24. SSW; PCR (5600 Kopien/ml) und Immunglobulin M (Index 2,1) lassen vermuten, dass die Infektion allerdings auch nicht deutlich vor der 24. SSW erfolgte weil in diesem Fall sowohl die Virämie als auch der IgM-Index stärker rückläufig sein dürfte.
- Fall 25: Da keine Angaben zu Klinik und Kontakt verfügbar waren, gab der Line-Test den Ausschlag. Geringe Reaktivität gegen VP-C und VP-2p und VP-2r machen es wahrscheinlich, dass die Infektion mindestens 6 Wochen zurückliegt, was einer Infektion in oder vor der 19. SSW entspricht.

#### **4.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Zur Erkennung von B19V-DNS im fetalen sowie mütterlichen Blut wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die B19V-DNS wurde unter Einsatz des QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit vollautomatisch im QIAcube extrahiert. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Die PCR wurde als Echt-Zeit-PCR in einem LightCycler® der Firma Roche durchgeführt. Wie von Schalasta et al. (88) beschrieben, ist der im Labor Enders durchgeführte PCR-Ansatz dazu geeignet, die unterschiedlichen Genotypen von B19V sowohl nachzuweisen als auch mit Hilfe einer Schmelzkurve zu differenzieren. Bei jeder PCR wurden zwei Positivkontrollen, hergestellt anhand des WHO-Standard für B19V (NIBSC-Standard 99/800 National Institute für Biological Standards and Control, UK), eine der Kontrollen mit 28000 Genom-Kopien/ml und eine der Kontrollen mit 1120 Kopien/ml, sowie eine Negativkontrolle (für die Molekularbiologie gereinigtes Wasser) mitgeführt. Des Weiteren wurde jeder Probe eine kleine Menge genomischer DNS der Maus mit entsprechenden Primern und Sonden als Amplifikationskontrolle beigefügt, um das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren zu kontrollieren beziehungsweise auszuschließen. Der amplifizierte Abschnitt Maus-DNS ist 192

Basenpaare lang. Mit dem Ziel, eventuell vorliegende Verunreinigung mit PCR-Produkten zu beseitigen, wurde Uracil-Stickstoff-Glycosidase (UNG) dem Ansatz hinzugefügt. Diese spaltet gezielt PCR-Produkte und nicht die zu amplifizierende DNS, da die PCR-Produkte Uracil enthalten. Erst im Anschluss daran wurde im sogenannten Hot-Start-Verfahren die Taq-Polymerase durch Hitze aktiviert und die Uracil-Stickstoff-Glycosidase inaktiviert, bevor die Amplifikation beginnen konnte. Zur Detektion der amplifizierten DNS-Abschnitte wurde das FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Verfahren mit zwei Sonden, die in „Head-to-Tail“-Konfiguration an die Zielsequenz binden, genutzt (89). Parvovirus-B19-Sonde und Maus-DNS-Sonde wurden durch unterschiedliche Farbstoffe markiert. Um zu Beginn der PCR eine unspezifische Bindung von Primern an DNS und damit die Entstehung unspezifischer Genprodukte, die dann wiederum als Matrizen dienen würden, zu vermeiden, wurde das sogenannte Touchdown-Verfahren eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird zunächst mit einer Primer-Hybridisierungstemperatur von 65° Celsius, bei der man davon ausgeht, dass nur spezifische Primer-Hybridisierungen stattfinden, begonnen, um schließlich im Verlauf von 10 Zyklen die normale Primer-Hybridisierungstemperatur von 55° C zu erreichen.

*Eingesetzte Primer:*

**Tabelle 6: Primer für die Polymerase Kettenreaktion**

Gen	Primer	Nukleotidsequenz 5'-3'	Lokalisation
VP1	VP1-A (Sinnstrang)	CATGGACAGTTATCTGACCAC	2693-2713
VP1	VP1-B (Gegenstrang)	CATGAATCCTTGCAGCAC	2886-2903

nach Schalasta et al. (88)

*Eingesetzte Sonden:*

**Tabelle 7: Sonden für die Polymerase Kettenreaktion**

Gen	Sonde	Nukleotidsequenz 5'-3'	Lokalisation
VP1	VP1-C (Akzeptorsonde)	CTTGCCCAGGCTTGTGTAAGTCTTC	2780-2804
VP1	VP1-D (Donorsonde)	TAGTTAGTACCGGGTAGTTGTACGCTA	2806-2832

nach Schalasta et al. (88)



Der Fluoreszenzfarbstoff der Donorsonde VP1-D war hierbei Fluorescein, derjenige der Akzeptorsonde VP1-C LightCycler® Red 640.

Inhibitionskontrolle mit Maus-DNS:

**Tabelle 8: Inhibitionskontrolle**

Nukleotidsequenz 5'-3'	
<b>Sinnstrang-Primer</b>	GAT GTG GTG TTC TTA CTT GAG CA
<b>Gegenstrang-Primer</b>	AAA TCC CTC CTA AGT TCT GAC AAA
<b>Akzeptorsonde</b>	GCA TTT GGT ATA TTA GTA GCT GTG TAC CGT
<b>Donorsonde</b>	GCT TCT TGT GGC TCT TGT AGG CA

Die Sonden für die DNS der Maus waren markiert mit den Farbstoffen Fluorescein und LightCycler® Red 705.

Für die PCR wurde je Probe in jeder Glaskapillare ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl angesetzt, bestehend aus 5 µl des nach dem oben beschriebenen Verfahren gewonnenen DNS-Eluats, sowie 15 µl eines Reaktionsgemisches enthaltend folgende Substanzen:

- LightCycler-Puffer (9 µl): enthält 4 mMol/l MgCl<sub>2</sub> in für die Molekularbiologie gereinigtem Wasser
- Der Mastermix (2 µl): gebrauchsfertige Lösung der Firma Roche (LC FastStart DNS Master Hyb Probes, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), enthält die Taq-Polymerase und die benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphate, sowie die Uracil-Stickstoff-Glycosidase.
- 4 µl Primer-Sonden-Mix:
- 0,5 µl Maus-DNS-Kontrolllösung.

Der PCR-Programmablauf, umgesetzt mit einem LightCycler® der Firma Roche, kann einer Tabelle im Anhang entnommen werden.

Die Quantifizierung der B19V-DNS wurde mit externen Standardkurven vorgenommen. Die Nachweisgrenze lag bei 600 Kopien/ml.

Falsch positive Ergebnisse sollten durch die Verwendung von Filter-Pipettenspitzen und die Arbeit in zwei getrennten Räumen für Nukleinsäureextraktion und Nukleinsäureamplifikation ausgeschlossen werden.

Der gesamte Testaufbau gehört zu den Routinemethoden des Labors Enders, Stuttgart. Für ca. 25 % der Proben waren Nachtestungen notwendig, die vom Doktoranden durchgeführt wurden.

#### 4.3.6 Dissoziation von Immunkomplexen

Der Nachweis von Immunglobulin G aus Immunkomplexen kann laut Literatur mit verschiedenen Methoden erfolgen. Prinzipiell sind zum Einen Methoden beschrieben, die intakte Immunkomplexe nachweisen, zum Anderen sind Methoden beschrieben, bei denen die Immunkomplexe zunächst dissoziiert werden, bevor der Nachweis erfolgt. Der Nachweis von kompletten Immunkomplexen wurde vornehmlich mithilfe von radioaktiv markiertem Komplementprotein C1q (90) oder mit Radio-Immuno-Assays durchgeführt. Im Falle von B19V wurde laut Literatur bisher nur der Nachweis von Immunglobulin M aus Immunkomplexen mit einem Radio-Immuno-Assay durchgeführt (16). Methoden, die mit Radioaktiven Materialien durchgeführt werden, waren im Labor Enders nicht realisierbar, weshalb nur verschiedene Methoden, die eine Dissoziation der Immunkomplexe vorsehen, durchgeführt wurden. Aus der Literatur waren hierzu wiederum unterschiedliche Herangehensweisen zu erkennen: Zum Einen die Möglichkeit, Säuren einzusetzen um die Immunkomplexe direkt zu dissoziieren, zum Anderen Methoden, die zunächst eine Fällung der Immunkomplexe mit anschließender Dissoziation vorsehen (82-86).

Keine der Methoden wurde bisher laut Literatur auf B19V angewandt, weshalb umfangreiche Vortestungen zur Etablierung einer funktionierenden Methode notwendig waren.

Erschwerend kam hinzu, dass in der Regel bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren im Anschluss an die Dissoziation nicht die Immunglobuline, sondern die Antigene gemessen wurden. Andererseits hatte die direkte Messung von Immunglobulinen nach der Dissoziation den Vorteil, dass die Ergebnisse unmittelbar vergleichbar mit den Routinetests im ELISA für Immunglobulin G waren und keine zusätzliche Quantifizierung notwendig wurde.

#### 4.3.7 Antigen-ELISA

Der B19V Antigen (Ag) ELISA wurde erstmalig von Corcoran et al. im Jahr 2007 beschrieben (81). Aktuell wurde der Ag-ELISA nach den Empfehlungen der Fa. Biotrin durchgeführt. Der Antigen-ELISA wurde freundlicherweise von der Firma Biotrin für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Inhouse-Verfahren, das kommerziell nicht vertrieben wird. Das Testprinzip entspricht einem Antigen-Capture-ELISA.

##### *Testablauf:*

Der Test wurde den Anweisungen der Firma Biotrin entsprechend durchgeführt, nur auf die Durchführung mit Doppelansätzen wurde verzichtet. Das mitgelieferte

Waschpufferkonzentrat wurde nach Anleitung 1:25 mit deionisiertem Wasser angesetzt und die Proben wurden 1:5 mit dem in der Studie beschriebenen Probenverdünnungsmittel mit niedrigem pH-Wert verdünnt (25 µl Probe + 100 µl Probenverdünnungsmittel) und anschließend auf dem Vortex gemischt. Je 100 µl dieser Verdünnung wurden in die entsprechende Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Der Test wurde auf einem Behring Elisa Processor III durchgeführt. Zunächst wurde die Mikrotiterplatte eine Stunde lang bei 37° C inkubiert, dann jede Vertiefung vier Mal mit 300 µl gewaschen, bevor 100 µl Konjugat zugefügt und weitere 30 Minuten bei 37° C inkubiert wurde. Nach erneutem viermaligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer wurde 100 µl Substrat zugefügt und erneut 30 Minuten bei 37° C inkubiert, bevor die Reaktion mit Stopplösung gestoppt wurde. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Zur Durchführung des Antigen-ELISAs wurde des weiteren von der Firma Biotrin rekombinant hergestelltes VP2-Antigen (in Baculo-Expressionssystem) bekannter Konzentration (251 µg/ml) zur Verfügung gestellt, mit dessen Hilfe die erzielten Ergebnisse quantifiziert werden konnten. Aus der Antigen-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe in Dezimalschritten erstellt, beginnend bei 10 µg/ml und endend bei 0,001 ng/ml um anhand der optischen Dichte eine Quantifizierung des Antigengehalts vornehmen zu können. Die Verdünnungsreihe der Antigen-Lösung wurde ebenso wie die Proben der Patienten 1:5 in dem mitgelieferten Probenverdünnungspuffer verdünnt und anschließend im ELISA eingesetzt.

## 5 Resultate

### 5.1 Klinische Befunde

Zusammengefasst ergaben sich folgende Fallzahlen für die klinischen Befunde, soweit die Angaben vorlagen:

**Tabelle 9: Additionen der klinischen Befunde**

<b>Klinisches Zeichen</b>	<b>Infizierte Feten (PCR positiv) (41)</b>	<b>Nicht sicher infizierte Feten (PCR negativ) (7)</b>	<b>p-Wert<sup>2</sup></b>	<b>Alle Feten (48)</b>
<b>fetale Anämie</b>	31 (75,6 %)	3 (42,9 %)	0,17	34 (70,8 %)
<b>Hydrops Fetalis</b>	22 (53,7 %)	3 (42,9 %)	0,69	25 (52,1 %)
<b>Perikarderguss</b>	9 (22 %)	1 (14,3 %)	1,0	10 (20,8 %)
<b>Aszites</b>	17 (41,5 %)	1 (14,3 %)	0,23	18 (37,5 %)
<b>Hautödeme</b>	7 (17,1 %)	0 (0,0 %)	0,57	7 (14,6 %)
<b>Hydrothorax</b>	6 (14,6 %)	0 (0,0 %)	0,57	6 (12,5 %)
<b>generalisierte Ödeme</b>	3 (7,3 %)	1 (14,3 %)	0,48	4 (8,3 %)
<b>verdickte oder hydropische Plazenta</b>	6 (14,6 %)	0 (0,0 %)	0,57	6 (12,5 %)
<b>Poly- oder Oligohydramnion</b>	9 (22 %)	0 (0,0 %)	0,32	9 (18,8 %)
<b>Spärliche Kindsbewegungen</b>	3 (7,3 %)	1 (14,3 %)	0,48	4 (8,3 %)
<b>Kardiomegalie</b>	9 (22 %)	1 (14,3 %)	1,0	10 (20,8 %)
<b>Herzklappeninsuffizienzen</b>	13 (31,7 %)	0 (0,0 %)	0,17	13 (27,1 %)

Aufgrund dieser Befunde wurde eine invasive Pränataldiagnostik durchgeführt.

Die mediane Schwangerschaftsdauer bei erstmaliger Blutentnahme zum Ausschluss einer Parvovirus B19-Infektion betrug 21+2 Wochen, das entsprechende arithmetische Mittel der Schwangerschaftsdauer bei erstmaliger invasiver Pränataldiagnostik betrug 22+2 Wochen, der

<sup>2</sup> Intergruppenvergleich Feten mit positiver versus Feten mit negativer PCR, exakter zweiseitiger Test nach Fischer.

Interquartilsabstand 6+0 Wochen (25%-Quantil 18+3, 75%-Quantil 24+3). Aus dem ersten Trimenon (1. bis 13. Schwangerschaftswoche) (Trimenon-Einteilung nach Pschyrembel, klinisches Wörterbuch (91)) stammte keine Probe, aus dem zweiten Trimenon (14. bis 26. Schwangerschaftswoche) 40 Proben (~83,3 %) und aus dem dritten Trimenon (27. bis 39./40. Schwangerschaftswoche) 8 Proben (~16,7 %). Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 31,4 Jahre, das mediane Alter 32,5 Jahre.

Es lagen drei Geminigraviditäten vor, bei denen jeweils der sonographisch auffällige Fet in die Studie eingeschlossen wurde.

Es wurden insgesamt mindestens 82 intrauterine Transfusionen vorgenommen, für die Fälle 39 und 40 lagen hierzu keine Angaben vor. Die erste Blutprobe jedes Feten, die für die Untersuchungen dieser Studie wesentlich ist, wurde jeweils vor der intrauterinen Transfusion gewonnen.

Es kam in fünf Fällen (Fälle 2, 7, 33, 35, 36) zum intrauterinen Fruchttod, in zwei Fällen (Fälle 9 & 17) wurde eine Abruption durchgeführt, in einem Fall verstarb das Neugeborene direkt postnatal (Fall 38), jedoch lagen nur zu 41 Fällen Informationen zum Ausgang der Schwangerschaft vor.

## **5.2 Parvovirus B19-Antikörper und Virämie**

Immunglobulin G wird als Zeichen der Immunität gegen B19V gewertet und ist deshalb von entscheidender Bedeutung für Mutter und Fet. Mit dem ELISA für Immunglobulin G wurden bei Müttern und Feten die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte ermittelt.

Immunglobulin M beweist eine vor kurzer Zeit eingetretene Reaktion des Immunsystems auf einen Erreger. Zeigt der Fet Immunglobulin M, so muss dies aus eigener Produktion kommen, da IgM nicht plazentagängig ist. Der ELISA für IgM zeigte die in der folgenden Tabelle aufgeführten Ergebnisse.

B19V-DNS im Blut gilt als direkter Virusnachweis und beweist damit eine Infektion mit B19V. Die Ergebnisse der Polymerase Kettenreaktion sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 10: Serologie- und PCR-Ergebnisse

Fall-Nr.	Mütterliche Proben				Fetale Proben			
	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)
1	18	25	7,1	10.300	22	>50	0,2	340.000
2	18	49	6,5	36.000	18	< 3	0,3	> 87,5 Millionen
3	13	38	4,1	4.700	17	16	0,2	negativ
					Partus	20	0,5	
4	24	30	3,8	1.800	24	< 3	0,6	> 87,5 Millionen
5	26	> 50	2,6	2.200	26	< 3	0,9	> 87,5 Millionen
					28	< 3	0,9	> 87,5 Millionen
6	25	24	4,0	81.500	25	8	3,6	> 87,5 Millionen
					Partus	25	0,3	
7	20	27	3,1	5.600	20	< 3	0,3	> 87,5 Millionen
8	21	41	1,9	5.900	21	< 3	0,4	> 87,5 Millionen
					Partus	18	0,3	600
9	20	23	1,4	2.100	23	> 50	0,2	negativ
10	17	17	3,9	25.400	17	< 3	0,3	> 87,5 Millionen
					34	50	0,2	190.000
11	20	25	4,5	13.500	20	< 3	2,0	> 87,5 Millionen
12	26	> 50	0,8	5.600	26	< 3	1,2	> 87,5 Millionen

Fall-Nr.	Mütterliche Proben				Fetale Proben			
	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)
13	21	> 50	3,1	156.000	21	< 3	0,3	> 87,5 Millionen
14	24	37	1,2	4.400	25	< 3	1,0	> 87,5 Millionen
15	17	24	6,8	23.600	17	< 3	0,3	> 87,5 Millionen
					20	< 3	0,3	
					26	30	0,2	5,96 Millionen
16	16	20	3,7	52.700	16	< 3	0,2	> 87,5 Millionen
					24	10	0,2	63 Millionen
					Partus	> 50	0,2	600
17	21	36	0,3	negativ	22	5	0,2	negativ
18	24	28	0,9	7.500	24	< 3	0,2	> 87,5 Millionen
19	24	25	1,3	10.600	25	4	5,9	>87,5 Millionen
20	30	3	6,6	15,6 Millionen	32	11	5,5	> 87,5 Millionen
21	25	38	6,3	28.000	25	26	0,4	2,6 Millionen
22	18	15	5,3	431.000	21	< 3	zu wenig Material	> 87,5 Millionen
23	23	7	6,9	5,3 Millionen	23	< 3	7,8	> 87,5 Millionen
24	23	38	3,7	4.700	23	6	< 1	> 87,5 Millionen
25	25	20	3,6	7.500	25	< 3	9,2	> 87,5 Millionen
					Partus	> 50	0,5	1120

Fall-Nr.	Mütterliche Proben				Fetale Proben			
	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)
26	32	> 50	2,1	5.600	30	< 3	0,8	> 87,5 Millionen
					Partus	14	0,3	4,8 Millionen
					1 Monat pp	7	0,6	700.000
					4 Monate pp	< 3	0,1	negativ
					7 Monate pp	16		5.600
27	21	> 50	4,1	140.000	21	< 3	1,6	> 87,5 Millionen
28	18	> 50	4,3	140.000	18	< 3	0,2	> 87,5 Millionen
29	16	22	7,5	140.000	16	< 3	< 1	> 87,5 Millionen
30	19	> 50	5,3	20.400	19	< 3	< 1	> 87,5 Millionen
					Partus	> 50	0,1	negativ
31	17	> 50	0,6	5.600	17	12	< 1	negativ
32	16	> 50	1,3	1.600	17	12	< 1	negativ
33	21	> 50	1,4	5.600	21	< 3	0,2	> 87,5 Millionen
34	25	> 50	< 1	negativ	21	19	< 1	negativ
					Partus	39	< 1	negativ
35	19	> 50	4,5	2.800	19	< 3	0,2	> 87,5 Millionen
36	31	> 50	2,1	28.000	31	23	< 1	negativ
37	33	36	6,3	2.300	33	23	< 1	22.000



Fall-Nr.	Mütterliche Proben				Fetale Proben			
	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)	SSW	IgG (IU/ml)	IgM (Index)	DNS (Kopien/ml)
38	22	> 50	4,3	11.900	22	< 3	zu wenig Material	> 87,5 Millionen
39	35	> 50	1,3	1.500	35	32	0,5	2.500
40	32	17	7,2	13.000	32	17	6,4	26,9 Millionen
41	21	32	3,2	3.900	22	< 3	3,2	> 87,5 Millionen
					Partus	29	< 1	3000
42	20	24	4,3	27.000	21	< 3	0,5	>87,5 Millionen
43	39	30	3,7	47.000	39	22	4,4	49.000
44	21	27	6,8	31.000	20	< 3	0,6	> 87,5 Millionen
45	25	26	2,2	9.200	26	13	0,5	> 87,5 Millionen
					Partus	> 50	0,6	
46	20	36	1,8	2600	20	< 3	0,6	> 87,5 Millionen
					21	5	1,0	> 87,5 Millionen
47	17	50	2,1	13.000	17	< 3	0,4	> 87,5 Millionen
48	22	> 50	2,2	5.600	22	< 3	0,5	> 87,5 Millionen
					25	38	0,3	

Alle mütterlichen Proben wurden positiv auf Immunglobulin G getestet. Im Gegensatz dazu waren nur 15 fetale Proben initial positiv für Immunglobulin G.

44 mütterliche Proben wurden positiv auf Immunglobulin M getestet. Nur 12 Feten zeigten ebenfalls die Bildung von Immunglobulin M. Zwei fetale Blutproben konnten nicht auf Immunglobulin M getestet werden, da nicht mehr genug Material vorhanden war.

46 mütterliche Proben wurden positiv auf Parvovirus B19-DNS getestet. 41 von 48 Feten waren positiv für Parvovirus B19-DNS, sieben Feten waren negativ.

### 5.3 Line-Test

Der Line-Test liefert Informationen darüber, wie lange eine Infektion zurück liegt. Dies ist besonders dann hilfreich, wenn es keine Angaben zu Symptomen bei der Mutter gibt oder wenn kein Kontakt zu B19V-infizierten Personen bekannt ist.

Die Auswertung der Line-Tests aus dem mütterlichen Blut ist der folgenden Tabelle zu entnehmen, es wurde immer die erste mütterliche Probe eingesetzt:

**Tabelle 11: Ergebnisse des Line-Tests**

Fall	SSW	VP-2P	VP-N	VP-1S	VP-2R	VP-C	NS-1	angenommener Infektionszeitpunkt
1	18	+++	+++	+++	+++	+++	+	vor 14.SSW
2	18	+++	+++	+++	+++	+++	+	11.-14. SSW
3	13	+++	+++	+++	+++	+	+	vor 8. SSW
4	24	+++	+++	+++	+++	+++	-	vor 19. SSW
5	26	+++	+++	+++	+++	+/-	-	vor/in 18. SSW
6	25	+++	+++	+++	+++	+/-	-	vor/in 21. SSW
7	20	++	+++	+++	+++	++	-	vor/in 15. SSW
8	21	++	+++	++	+++	-	-	vor/in 13. SSW
9	20	+++	+++	+++	+++	+/-	++	vor/in 12. SSW
10	17	++	+++	++	+++	+	+/-	~ 13. SSW

<b>Fall</b>	<b>SSW</b>	<b>VP-2P</b>	<b>VP-N</b>	<b>VP-1S</b>	<b>VP-2R</b>	<b>VP-C</b>	<b>NS-1</b>	<b>angenommener Infektionszeitpunkt</b>
<b>11</b>	20	+++	+++	+++	+++	+++	+/-	~ 16. SSW
<b>12</b>	26	++	+++	++	+++	+	-	~ 15. SSW
<b>13</b>	21	++	+++	+++	++	+/-	+++	~ 14. SSW
<b>14</b>	24	+++	+++	+++	+++	+++	++	~ 18. SSW
<b>15</b>	17	++	+++	++	++	+/-	-	~ 14. SSW
<b>16</b>	16	+++	+++	+++	+++	++	-	vor/in 12. SSW
<b>17</b>	21	++	+++	+++	+++	+	-	vor 4. SSW
<b>18</b>	24	++	+++	++	++	+	-	vor/in 18. SSW
<b>19</b>	24	++	+++	+++	+++	+++	-	evtl. 19.-20. SSW
<b>20</b>	30	++	+++	+++	+++	+	-	~ 28. SSW
<b>21</b>	25	++	+++	+++	+++	+++	-	~ 15. SSW
<b>22</b>	18	+++	+++	+++	+++	+++	-	vor/in 14. SSW
<b>23</b>	23	+++	+++	+++	+++	++	-	~ 21. SSW
<b>24</b>	23	+++	+++	+++	+++	+	+/-	vor/in 13. SSW
<b>25</b>	25	+	+++	+++	++	+	-	vor/in 19. SSW
<b>26</b>	32		+++	+++		+++	+++	vor/in 24. SSW
<b>27</b>	21	+++	+++	+++	+++	++	-	vor/in 16. SSW
<b>28</b>	18	+++	+++	+++	+++	+++	-	vor/in 11. SSW
<b>29</b>	16	++	+++	+++	+++	+/-		~ 9. SSW
<b>30</b>	19	++	+++	+++	+++	+/-		vor/in 13. SSW
<b>31</b>	17	+++	+++	+++	+++	++	+	vor/in 9. SSW
<b>32</b>	16	++	+++	+++	+++	+	-	~ 8. SSW
<b>33</b>	21	++	+++	+++	+++	+/-	-	vor/in 15. SSW
<b>34</b>	25	+++	+++	+++	+++	+/-	+	~ 7. SSW
<b>35</b>	19	++	+++	+++	+++	+	-	~ 11. SSW
<b>36</b>	31	+++	+++	+++	+++	+	+/-	vor/in 23. SSW
<b>37</b>	33		+++	+++		+++	-	vor/in 27. SSW
<b>38</b>	22	+++	+++	+++	+++	+++	-	~ 14. SSW
<b>39</b>	35		+++	+++		+++	++	vor/in 25. SSW

Fall	SSW	VP-2P	VP-N	VP-1S	VP-2R	VP-C	NS-1	angenommener Infektionszeitpunkt
40	32	+++	+++	+++	+++	+++	-	~ 28. SSW
41	21	+++	+++	+++	-	-	-	vor/in 17. SSW
42	20	+	+++	+++	++			vor/in 16. SSW
43	37	+++	+++	+++	+++	+		vor/in 31. SSW
44	21	+++	+++	+++	+++	+++	-	~ 15. SSW
45	25	+++	+++	+++	+++	+++	-	~ 23. SSW
46	20	+++	+++	+++	+++	+++	-	vor/in 16. SSW
47	17	+++	+++	+++	+++	+++	+	vor/in 11.SSW
48	22	++	+++	+++	+++	+/-	-	vor/in 16. SSW

## 5.4 Gruppierung

Anhand der Ergebnisse der Testungen der jeweiligen ersten Proben eines Mutter-Fetus-Paares auf B19V-DNS sowie B19V-spezifische Immunglobuline G und M wurde eine Zuordnung der Fälle zu verschiedenen Gruppen vorgenommen:

- Die Gruppe A bilden alle Mutter-Kind-Paare, für die kein Nachweis einer intrauterinen Infektion mit B19V zu erbringen war. Diese Feten waren negativ in der PCR und im ELISA für Immunglobulin M.
- Der Gruppe B werden alle Mutter-Kind-Paare zugeordnet, bei denen B19V-DNS sowie Immunglobulin G nachgewiesen werden konnte. Die Subgruppe B1 ist zusätzlich positiv auf Immunglobulin M getestet worden, die Subgruppe B2 ist negativ für Immunglobulin M.
- In der Gruppe C sind alle Mutter-Kind-Paare zusammengefasst, bei denen im Fetalblut zwar B19V-DNS, jedoch kein B19V-IgG nachgewiesen wurde. Soweit Immunglobulin M nachweisbar war, gehören die Feten zur Subgruppe C1, bei negativem Test auf Immunglobulin M zur Gruppe C2.

Tabelle 12: Gruppierung

Fall-Nr.	IgG Mutter (IU/ml)	IgM Mutter (Index)	PCR Mutter (Kopien/ml)	IgG Fet	IgM Fet	PCR Fet (Kopien/ml)	Gruppe
1	25	7,1	10.300	pos	neg	340.000	B2
2	49	6,5	36.000	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
3	38	4,1	4.700	pos	neg	negativ	A
4	30	3,8	1.800	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
5	> 50	2,6	2.200	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
6	24	4,0	81.500	pos	3,6pos	> 87,5 Millionen	B1
7	27	3,1	5.600	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
8	41	1,9	5.900	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
9	23	1,4	2.100	pos	neg	negativ	A
10	17	3,9	25.400	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
11	25	4,5	13.500	neg	pos	> 87,5 Millionen	C1
12	> 50	0,8	5.600	neg	pos	> 87,5 Millionen	C1
13	> 50	3,1	156.000	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
14	37	1,2	4.400	neg	grenz	> 87,5 Millionen	C1
15	24	6,8	23.600	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
16	20	3,7	52.700	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
17	36	0,3	negativ	pos	neg	negativ	A
18	28	0,9	7.500	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
19	25	1,3	10.600	neg	pos	>87,5 Millionen	C1
20	3	6,6	15,6 Millionen	pos	pos	> 87,5 Millionen	B1
21	38	6,3	28.000	pos	neg	2,6 Millionen	B2
22	15	5,3	431.000	neg	zwm	> 87,5 Millionen	C
23	7	6,9	5,3 Millionen	neg	pos	> 87,5 Millionen	C1
24	38	3,7	4.700	pos	neg	> 87,5 Millionen	B2
25	20	3,6	7.500	neg	pos	> 87,5 Millionen	C1
26	> 50	2,1	5.600	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
27	> 50	4,1	140.000	neg	pos	> 87,5 Millionen	C1

Fall-Nr.	IgG Mutter (IU/ml)	IgM Mutter (Index)	PCR Mutter (Kopien/ml)	IgG Fet	IgM Fet	PCR Fet (Kopien/ml)	Gruppe
28	> 50	4,3	140.000	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
29	22	7,5	140.000	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
30	> 50	5,3	20.400	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
31	> 50	0,6	5.600	pos	neg	negativ	A
32	> 50	1,3	1.600	pos	neg	negativ	A
33	> 50	1,4	5.600	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
34	> 50	< 1	negativ	pos	neg	negativ	A
35	> 50	4,5	2.800	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
36	> 50	2,1	28.000	pos	neg	negativ	A
37	36	6,3	2.300	pos	neg	22.000	B2
38	> 50	4,3	11.900	neg	zwm	> 87,5 Millionen	C
39	> 50	1,3	1.500	pos	neg	2.500	B2
40	17	7,2	13.000	pos	pos	26,9 Millionen	B1
41	32	3,2	3.900	neg	pos	> 87,5 Millionen	C2
42	24	4,3	27.000	neg	neg	>87,5 Millionen	C2
43	30	3,7	47.000	pos	pos	49.000	B1
44	27	6,8	31.000	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
45	26	2,2	9.200	pos	neg	> 87,5 Millionen	B2
46	36	1,8	2600	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
47	50	2,1	13.000	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2
48	> 50	2,2	5.600	neg	neg	> 87,5 Millionen	C2

**Für die Zuordnung der Proben zu den Gruppen ergab sich die folgende Verteilung:**

- **Gruppe A:** 7 Proben, entsprechend sieben Feten, für deren Infektion durch Parvovirus B19 kein Nachweis erbracht werden konnte, da die Ergebnisse der PCR und des IgM-ELISA negativ waren.
- **Gruppe B:** 10 Proben, entsprechend zehn Feten, die nachweislich Parvovirus B19-infiziert waren (Ergebnis der PCR positiv) und in deren Blut Immunglobulin G

nachweisbar war. 6 von 10 Feten waren negativ für Immunglobulin M, 4 Feten positiv.

- **Gruppe C:** 31 Proben, entsprechend 31 Feten, die nachweislich Parvovirus B19-infiziert (Ergebnis der PCR positiv) waren und in deren Blut kein Immunglobulin G nachweisbar war. Immunglobulin M war nur bei 7 von 31 Feten nachweisbar, zwei Feten konnten nicht auf Immunglobulin M getestet werden, da nicht genug Material vorhanden war.

## 5.5 Auswertung

Die folgende Tabelle fasst in komprimierter Form einige Eigenschaften der drei Gruppen zusammen:

Tabelle 13: Eigenschaften der Gruppen A, B und C

	Pränatale Parvovirus B19-Infektion		
	nicht nachgewiesen	bestätigt	
	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
<b><u>Anzahl</u></b>	7	41	
		10	31
<b><u>Mütterliches Alter</u></b> Median (Bereich)	25 (22-36)	33 (21-43)	
		30 (21-43)	33 (24-41)
<b><u>Gestationsalter (Wochen) zum Infektionszeitpunkt<sup>3</sup></u></b> Median (Bereich)	8 (4-23)	16 (9-31)	
		24 (13-31)	15 (9-24)
<b><u>Gestationsalter (Wochen) zum Untersuchungszeitpunkt</u></b> Median (Bereich)	21 (17-31)	21 (16-39)	
		27,5 (18-39)	21 (16-31)
<b><u>Zeitlicher Abstand der Infektion zur Untersuchung (Wochen)</u></b> Median (Bereich)	9 (5-18)	6 (2-11)	
		6 (2-10)	6 (2-11)
<b><u>Anzahl der B19V-IgG-positiven Feten</u></b>	7	10	
		10	0
<b><u>Anzahl der B19V-IgM-positiven Feten</u></b>	0	11	
		4	7

Die drei Gruppen A,B,C beziehungsweise die fünf Gruppen A,B1,B2,C1,C2 konnten mithilfe der gewonnenen Daten auf spezifische Eigenschaften untersucht werden. Die folgenden Diagramme dienen dem Vergleich dieser Eigenschaften zwischen den Gruppen.

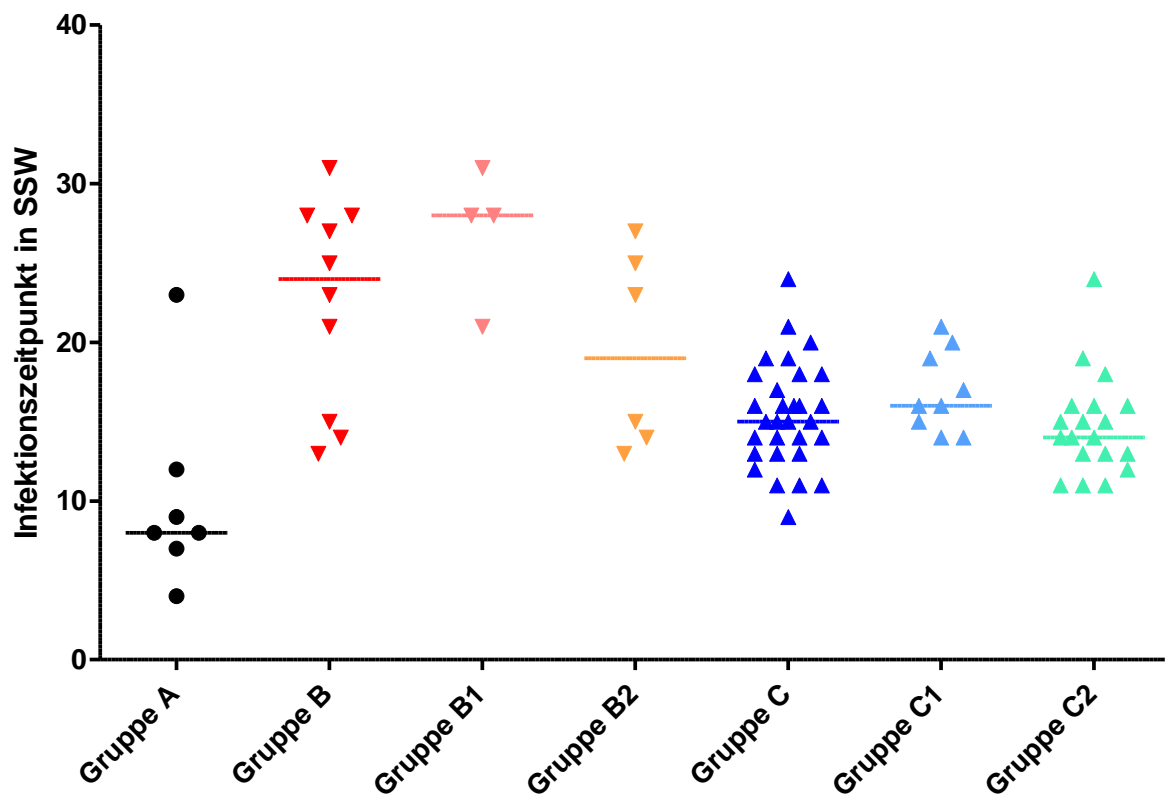
<sup>3</sup> Spätester möglicher Infektionszeitpunkt – ermittelt wie oben beschrieben.



### 1.Eigenschaft: Infektionszeitpunkt:

Das folgenden Diagramme stellt dar, wann die Mütter in den einzelnen Gruppen mit Parvovirus B19 infiziert wurden, bezogen auf den jeweils spätesten möglichen angenommenen Infektionszeitpunkt, angegeben in Schwangerschaftswochen. Zu jeder Gruppe ist zusätzlich der Median abgebildet.

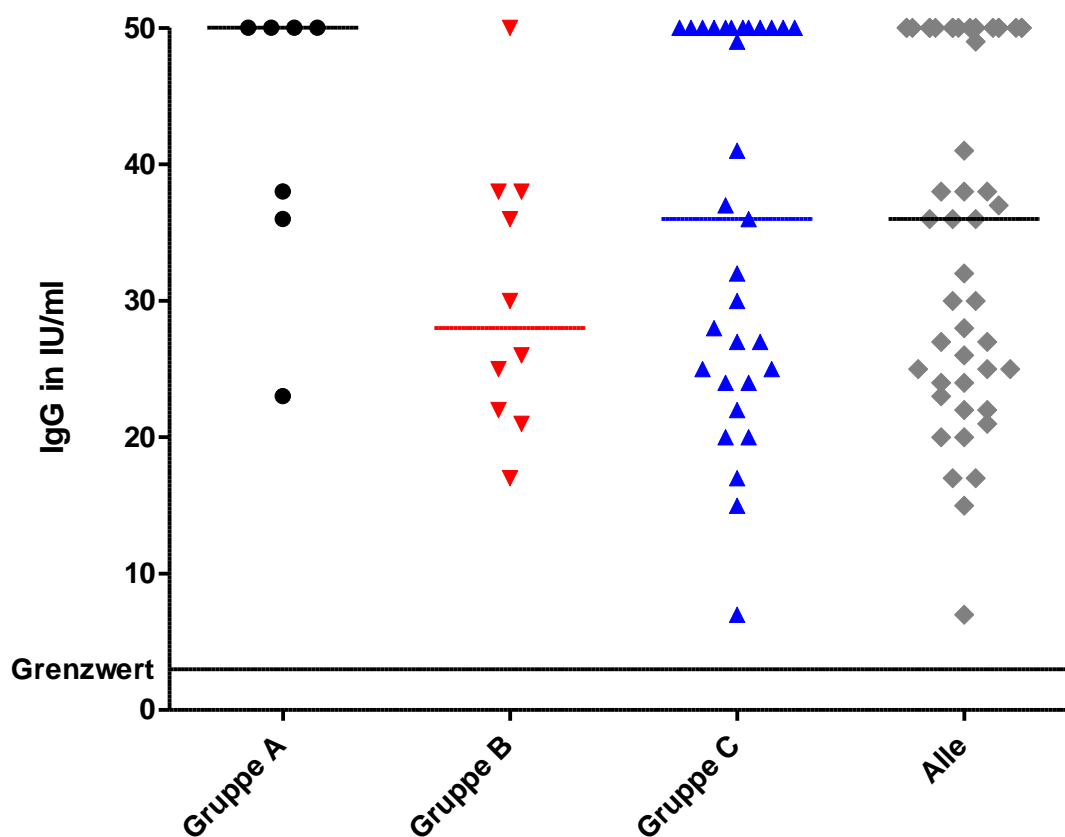
Abbildung 5: Infektionszeitpunkte der verschiedenen Gruppen



## 2. Eigenschaft: Maternales Immunglobulin G:

In den folgenden Diagrammen sind die absoluten Häufigkeiten dargestellt, mit welchen in maternalen Seren Parvovirus B19-spezifisches Immunglobulin G nachgewiesen wurde, bezogen auf die Immunglobulinkonzentration, angegeben in IU/ml. Proben, die mehr als 50 IU/ml Immunglobulin G enthielten, wurden als 50 IU/ml aufgetragen. Bei jeder Gruppe wurde zusätzlich der Median aufgetragen.

Abbildung 6: Maternales Immunglobulin G



## 5.6 Immunglobulin G in Immunkomplexen – Dissoziation

Um auszuschließen, dass sich eventuell im Fetalblut vorhandene B19V-spezifische IgG Antikörper aufgrund einer Immunkomplexbildung dem Nachweis mittels B19V IgG ELISA entziehen, wurden verschiedene Verfahren zur Immunkomplex-Dissoziation eingesetzt.

### 5.6.1 Fällungsreaktionen mit Polyethylenglycol

In einem ersten Schritt musste geklärt werden, mit welcher Immunkomplex-Dissoziationsmethode im Anschluss an eine Dissoziation Immunglobuline zu messen wären.

Zunächst wurden zwei unterschiedliche **Fällungsreaktionen mit Polyethylenglykol** getestet.

- a) Aus Kestens et al. 1991 (86) wurde die dort vorgestellte Methode 3 durchgeführt. In Kürze: 200 µl Serum eines Patienten mit akuter Parvovirus B19-Infektion, bei dem Immunkomplexe vorhanden sein könnten, wurde mit 200 µl 0,2M EDTA pH 7,5 gemischt und anschließend 100 µl 12%iger Polyethylenglykol-6000-Lösung hinzugefügt. Über Nacht wurde die Probe bei 4°C im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag wie angegeben mit 4000 Umdrehungen pro Minute für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss an die Fällungsreaktion war kein Pellet nachweisbar, so dass der Versuch an dieser Stelle abgebrochen wurde, da mit diesem Pellet der Versuch hätte fortgesetzt werden sollen.
- b) Aus Brunner et al. (85) wurde eine weitere Methode durchgeführt. Hierzu wurden künstlich erzeugte immunkomplexhaltige Seren eingesetzt, die durch Mischung von Immunglobulin G-positivem Serum und Virusprotein 2-Lösung hergestellt wurden (siehe unten). 50µl, beziehungsweise 100 µl dieses Ansatzes wurden mit der gleichen Menge Polyethylenglykol 8000-Lösung (7% PEG 8000 + 0,44% NaCl in 0,1M Boratpuffer, pH 8,4) gemischt und über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden diese Lösungen bei 4°C für 15 Minuten bei 8320 x g zentrifugiert. Tatsächlich ließ sich bei diesem Versuch ein Pellet erkennen. Dieses wurde, nachdem der Überstand abpipettiert war, 2x mit 100 µl respektive 200 µl 3,5% PEG 8000 (3,5 % PEG 8000 in 0,1M Boratpuffer, pH 8,4) gewaschen. Anschließend wurden 50 beziehungsweise 100 µl 0,1M Boratpuffer mit pH 10,2 hinzugefügt. Um eine Verdünnung der Proben auf die für den ELISA benötigte Konzentration zu erreichen, wurden diese Proben anschließend 1:50 mit Biotrin-Probenverdünnungspuffer verdünnt. Im durchgeführten ELISA war kein IgG nachweisbar. Da der Nachweis von IgG das Ziel des Tests war und dieses Ziel

eindeutig nicht erreicht wurde, wurde nach diesem Test das Prinzip der Fällungsreaktionen mit Polyethylenglykol nicht mehr weiter verfolgt.

### 5.6.2 Säuredissoziationsmethoden

Die Alternativen zu den Fällungsreaktionen waren, wie bereits in Material und Methoden angedeutet, Dissoziationsmethoden, bei denen **Säuren** zum Einsatz kommen, um die Immunkomplexe zu spalten.

Es wurde untersucht, wie Immunglobuline auf die Behandlung mit Säuren und Basen reagieren und wie dies eventuell den ELISA beeinträchtigt. Hierzu wurde Immunglobulin G-positives Serum einer abgelaufenen Infektion eingesetzt, in dem entsprechend keine Immunkomplexe zu erwarten waren.

Getestet wurden folgende Methoden:

- a) Nach Pokriefka et al. (82) Inkubation von 100 µl Serum mit 100 µl 1,5M Glycin pH 1,85 für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurden 100 µl 1,5M Tris-Puffer pH 9 hinzugegeben. 30 µl dieser Lösung wurden mit 970 µl Biotrin-Probenverdünnungspuffer verdünnt und der Immunglobulin G ELISA durchgeführt.
- b) Nach Weber et al. (84) 100 µl Serum wurden mit 50 µl 0,5N HCl gemischt, 60 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit 50 µl 0,5N NaOH neutralisiert. 20 µl dieser Lösung wurden für den ELISA mit 980 µl Biotrin-Probenverdünnungspuffer verdünnt.
- c) Nach Koraka et al. (83;84) 100 µl Serum und 100 µl 1,5M Glycin pH 2,8 wurden gemischt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. 100 µl 1,5M Tris-Puffer pH 9,7 dienten der Neutralisierung der Lösung. 30 µl dieser Mischung wurden mit 970 µl Biotrin-Probenverdünnungspuffer für den Immunglobulin G ELISA angesetzt.

*Ergebnisse der ersten Säuredissoziationen:*

**Tabelle 14: Säuredissoziationen nach Pokriefka, Weber und Koraka**

Eingesetzte Lösungen:	gemessener IgG-Gehalt in IU/ml:	Extinktionswerte (OD)
<b>undissoziiertes Serum</b>	>50	1,894
<b>Methode nach Pokriefka</b>	11	0,752
<b>Methode nach Weber</b>	3	0,324
<b>Methode nach Koraka</b>	35	1,495

Aus diesem Test ließ sich ableiten, dass die Methoden nach Pokriefka und Weber zur Dissoziation von Immunkomplexen mit anschließender Messung der Antikörper ungeeignet sind, da sie wahrscheinlich entweder die Antikörper zerstören oder mit dem ELISA interferieren. Die Methode nach Koraka hingegen wurde weiterverfolgt, da diese augenscheinlich die beste Möglichkeit bot, nach der Dissoziation von Immunkomplexen Antikörper zu messen.

### 5.6.3 Methode nach Koraka mit unterschiedlichen Dissoziationszeiten

Im nächsten Schritt wurde die Methode nach Koraka mit unterschiedlichen Dissoziationszeiten durchgeführt, um festzustellen, ob die Zerstörung von Antikörpern zeitabhängig ist. So konnte geschätzt werden, bei welcher Dissoziationsdauer die Messbarkeit von Immunglobulin G besser werden würde als bei den ersten Tests.

*Veränderung des Nachweises von IgG durch unterschiedliche Dissoziationszeiten:*

**Tabelle 15: Dissoziation nach Koraka mit unterschiedlichen Dissoziationszeiten**

<b>Dissoziationszeiten:</b>	<b>gemessener IgG-Gehalt in IU/ml</b>	<b>Extinktionswerte (OD)</b>
<b>15 Minuten</b>	>50	1,779
<b>30 Minuten</b>	49	1,719
<b>45 Minuten</b>	39	1,539
<b>60 Minuten</b>	35	1,495

Mit diesem Test konnte gezeigt werden, dass es für die Messung der Immunglobuline von Vorteil ist, wenn die Dissoziationszeiten möglichst kurz gehalten werden.

### 5.6.4 Einfluss der Reagenzien auf die Mikrotiterplatten

Um zu kontrollieren, ob eine der Substanzen, die zur Dissoziation eingesetzt wurden, die Beschichtung der Mikrotiterplatte angreift, wurden einzelne Vertiefungen der Mikrotiterplatte für 60 Minuten mit einer oder mehrerer der zur Dissoziation eingesetzten Substanzen (Glycinlösung, Tris-Puffer sowie Glycinlösung mit Tris-Puffer) im Verhältnis 1:100 mit Biotrin-Probenverdünnungspuffer inkubiert.

Im Anschluss wurden die Vertiefungen mit Biotrin-Probenverdünnungspuffer gewaschen, bevor eine unbehandelte Probe wie im normalen Immunglobulin G ELISA zugefügt wurde und der ELISA ausgeführt wurde.

Ergebnisse:

**Tabelle 16: Einfluss der Reagenzien auf den Nachweis von IgG**

<b>Eingesetzte Substanz</b>	<b>Gemessener IgG-Gehalt in IU/ml</b>	<b>Extinktionswerte (OD)</b>
<b>1,5M Glycin pH 2,8</b>	>50	1,940
<b>1,5M Tris pH 9,7</b>	48	1,701
<b>1,5M Glycin pH 2,8 + 1,5M Tris pH 9,7</b>	47	1,671

Dieser Test zeigte, dass durch die eingesetzten Substanzen ein Rückgang der Extinktion zu beobachten war, welche zu einer Beeinträchtigung der Messung der IgG-Konzentration im Serum führt.

Alle bisherigen Tests waren mit einem Serum durchgeführt worden, das von einer abgelaufenen Infektion mit Parvovirus B19 stammte, also Immunglobulin G-positiv und DNA- und Immunglobulin M-negativ war. In diesem Serum waren deshalb keine Immunkomplexe zu erwarten, die dissoziiert werden könnten. Der Nachweis der Dissoziation von Immunkomplexen durch die Methode nach Koraka stand folglich noch aus.

Aus mehreren Seren von Patienten mit abgelaufener Parvovirus B19-Infektion wurde ein Serumpool mit 14 IU/ml Immunglobulin G und ein Serumpool mit 18 IU/ml Immunglobulin G hergestellt. Beide Pools enthielten kein Immunglobulin M und keine Parvovirus B19-DNS in messbaren Mengen. Diese beiden Pools wurden fortan für die Dissoziationsversuche genutzt.

### **5.6.5 Erzeugung von Immunkomplexen**

Um Immunkomplexe zur Dissoziation zur Verfügung zu haben, wurden Immunkomplexe aus IgG-positivem Serum und VP2-Lösung hergestellt. Zur in vitro Herstellung von

Immunkomplexen wurden der oben beschriebene Pool mit 18 IU/ml mit VP2-Lösung der Firma Biotrin in verschiedenen Verdünnungsstufen verdünnt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit Biotrin-Probenverdünnungspuffer auf eine Endverdünnung des Serums von 1:100 verdünnt, wurde der ELISA durchgeführt.

**Tabelle 17: Erzeugung von Immunkomplexen unterschiedlicher Konzentrationen**

<b>Eingesetzte Lösung</b>	<b>IgG-Gehalt in IU/ml</b>	<b>Extinktionswerte (OD)</b>
<b>Gepooltes Serum</b>	18	1,016
<b>Serum + VP2 1:2</b>	6	0,508
<b>Serum + VP2 1:4</b>	<3	0,277
<b>Serum + VP2 1:6</b>	<3	0,208
<b>Serum + VP2 1:8</b>	<3	0,164
<b>Serum + VP2 1:10</b>	<3	0,128
<b>Serum + VP2 1:20</b>	<3	0,098
<b>Serum + VP2 1:30</b>	<3	0,086

Der Test zeigt deutlich die Abnahme des messbaren Immunglobulins G nach Inkubation mit VP2-Lösung.

### **5.6.6 Kontrolle der Immunkomplexbildung**

Um zu überprüfen, ob die nicht mehr messbaren Immunglobuline tatsächlich in spezifischen Immunkomplexen gebunden waren, wurde eine Kontrolle durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Proteingehalt der VP2-Lösung nephelometrisch bestimmt. Es ergab sich ein Gesamteiweißgehalt von 2g/dl.

Eine 3%ige BSA-Lösung (bovines Serumalbumin) mit ähnlichem Proteingehalt wie die VP2-Lösung wurde als Kontrolllösung eingesetzt um auszuschließen, dass bereits allein der hohe Proteingehalt der Immunkomplexlösung eine Veränderung der Ergebnisse im ELISA hervorruft.

Gepooltes Serum, enthaltend 14 IU/ml Immunglobulin G, wurde mit dieser Kontrolllösung an Stelle des VP2-Konzentrates auch 1:2 beziehungsweise 1:10 verdünnt und bei 37° C eine

Stunde lang inkubiert. Mit Biotrin-Probenverdünnungspuffer auf eine Endverdünnung von 1:100 verdünnt, wurde der ELISA durchgeführt.

**Tabelle 18: Kontrolle der Immunkomplexbildung**

<b>Eingesetzte Lösung</b>	<b>Immunglobulin G in IU/ml</b>	<b>Extinktionswerte (OD)</b>
<b>Serumpool unbehandelt</b>	14	0,816
<b>Serumpool + BSA 1:2</b>	13	0,796
<b>Serumpool + BSA 1:10</b>	14	0,813

Das mit BSA versetzte Serum zeigte keine signifikante Änderung der Extinktion im ELISA. Durch diese Kontrolle konnte folglich ausgeschlossen werden, dass die Abnahme des messbaren B19V-Immunglobulin G allein durch die Proteinkonzentration der Lösung bedingt ist.

### **5.6.7 Immunkomplexdissoziation mit der Methode nach Koraka**

Die Immunkomplexdissoziation mittels modifizierter Methode nach Koraka wurde anschließend folgendermaßen durchgeführt:

Wieder wurden aus dem Pool mit 14 IU/ml Immunglobulin G und der Virusprotein 2-Lösung Immunkomplexe wie oben beschrieben erzeugt. Als Kontrolle wurde erneut bovines Serumalbumin eingesetzt.

Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

Ansatz 1: Gepooltes Serum (Pool) unverändert zur Ermittlung des Ausgangswertes und als Referenz

Ansatz 2: Gepooltes Serum (Pool) mit Virusprotein 2-Lösung 1:2 gemischt

Ansatz 3: Gepooltes Serum (Pool) mit BSA-Lösung 1:2 gemischt als Kontrolle zu Ansatz 2

Ansatz 4: Gepooltes Serum (Pool) mit Virusprotein 2-Lösung 1:10 gemischt

Ansatz 5: Gepooltes Serum (Pool) mit BSA-Lösung 1:10 gemischt als Kontrolle zu Ansatz 4

Die genaue Durchführung ist den folgenden Tabellen zu entnehmen.



Legende zu diesen Tabellen: Pool = gepooltes Serum; BSA = Bovine Serumalbuminlösung 3%; Glycin = 1,5M Glycin pH 2,8; Tris = 1,5M Tris-Puffer pH 9,7; VP2= VP2-Lösung; IC = Immunkomplexe; ELISA-Puffer = Biotrin-Probenverdünnungspuffer; Alle Inkubationen erfolgten bei 37 °C

Tabelle 19: Immunkomplexdissoziationen Ansatz 1

<b>Ansatz</b>	<b>Schritt 1: Dissoziation</b>	<b>Schritt 2: Inkubation</b>	<b>Schritt 3: Neutralisation</b>	<b>Schritt 4: ELISA-Ansatz:</b>
<b>Pool ohne IC</b>	entfällt	keine	entfällt	10 µl Pool in 990 µl ELISA-Puffer
<b>Pool ohne IC</b>	10 µl Pool + 10 µl Glycin	15 min	+ 10 µl Tris	+ 970 µl ELISA-Puffer
<b>Pool ohne IC</b>	10 µl Pool + 10 µl Glycin	45 min	+ 10 µl Tris	+ 970 µl ELISA-Puffer

Tabelle 20: Immunkomplexdissoziationen Ansatz 2

<b>Ansatz</b>	<b>Schritt 1: Immunkomplexbildung</b>	<b>Schritt 2: Inkubation</b>	<b>Schritt 3: Dissoziation</b>	<b>Schritt 4: Inkubation</b>	<b>Schritt 5: Neutralisation</b>	<b>Schritt 6: ELISA-Ansatz</b>
<b>Pool mit VP2 1:2</b>	10 µl Pool + 10 µl VP2	60 min	keine	entfällt	entfällt	+ 980 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit VP2 1:2</b>	10 µl Pool + 10 µl VP2	60 min	+ 20 µl Glycin	15 min	+ 20 µl Tris	+ 940 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit VP2 1:2</b>	10 µl Pool + 10 µl VP2	60 min	+ 20 µl Glycin	45 min	+ 20 µl Tris	+ 940 µl ELISA-Puffer

Tabelle 21: Immunkomplexdissoziationen Ansatz 3

<b>Ansatz</b>	<b>Schritt 1: Immunkomplexbildung</b>	<b>Schritt 2: Inkubation</b>	<b>Schritt 3: Dissoziation</b>	<b>Schritt 4: Inkubation</b>	<b>Schritt 5: Neutralisation</b>	<b>Schritt 6: ELISA-Ansatz</b>
<b>Pool mit BSA 1:2</b>	10 µl Pool + 10 µl BSA	60 min	keine	entfällt	entfällt	+ 980 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit BSA 1:2</b>	10 µl Pool + 10 µl BSA	60 min	+ 20 µl Glycin	15 min	+ 20 µl Tris	+ 940 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit BSA 1:2</b>	10 µl Pool + 10 µl BSA	60 min	+ 20 µl Glycin	45 min	+ 20 µl Tris	+ 940 µl ELISA-Puffer

Tabelle 22: Immunkomplexdissoziationen Ansatz 4

<b>Ansatz</b>	<b>Schritt 1: Immunkomplexbildung</b>	<b>Schritt 2: Inkubation</b>	<b>Schritt 3: Dissoziation</b>	<b>Schritt 4: Inkubation</b>	<b>Schritt 5: Neutralisation</b>	<b>Schritt 6: ELISA-Ansatz</b>
<b>Pool mit VP2 1:10</b>	10 µl Pool + 90 µl VP2	60 min	keine	entfällt	entfällt	+ 900 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit VP2 1:10</b>	10 µl Pool + 90 µl VP2	60 min	+ 100 µl Glycin	15 min	+ 100 µl Tris	+ 700 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit VP2 1:10</b>	10 µl Pool + 90 µl VP2	60 min	+ 100 µl Glycin	45 min	+ 100 µl Tris	+ 700 µl ELISA-Puffer

Tabelle 23: Immunkomplexdissoziationen Ansatz 5

<b>Ansatz</b>	<b>Schritt 1: Immunkomplexbildung</b>	<b>Schritt 2: Inkubation</b>	<b>Schritt 3: Dissoziation</b>	<b>Schritt 4: Inkubation</b>	<b>Schritt 5: Neutralisation</b>	<b>Schritt 6: ELISA-Ansatz</b>
<b>Pool mit BSA 1:10</b>	10 µl Pool + 90 µl BSA	60 min	keine	entfällt	entfällt	+ 900 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit BSA 1:10</b>	10 µl Pool + 90 µl BSA	60 min	+ 100 µl Glycin	15 min	+ 100 µl Tris	+ 700 µl ELISA-Puffer
<b>Pool mit BSA 1:10</b>	10 µl Pool + 90 µl BSA	60 min	+ 100 µl Glycin	45 min	+ 100 µl Tris	+ 700 µl ELISA-Puffer

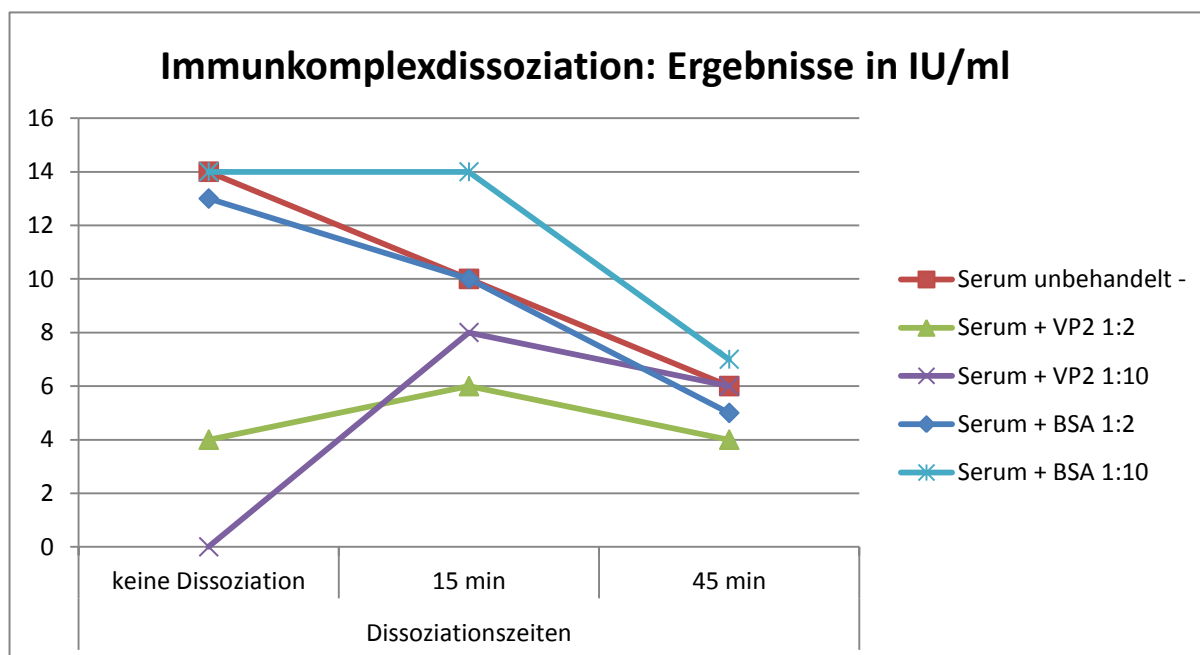
Als zusätzliche Negativkontrolle wurde in einem weiteren Ansatz 100 µl BSA-Lösung mit 900 µl ELISA-Probenverdünnungspuffer versetzt. In der folgenden Tabelle „BSA-Kontrolle“ genannt.

## Immunglobulin G-Messung im ELISA:

Tabelle 24: Ergebnisse der Immunkomplexdissoziationen Ansätze 1-5

Lösung	Dissoziationszeiten: Ergebnisse in IU/ml (Extinktionswert)		
	Keine Dissoziation	15 Minuten	45 Minuten
Serum unbehandelt (Ansatz 1)	14 (0,816)	10 (0,639)	6 (0,490)
Serum + VP2 1:2 (Ansatz 2)	4 (0,369)	6 (0,477)	4 (0,358)
Serum + VP2 1:10 (Ansatz 4)	<3 (0,101)	8 (0,561)	6 (0,463)
Serum + BSA 1:2 (Ansatz 3)	13 (0,796)	10 (0,662)	5 (0,414)
Serum + BSA 1:10 (Ansatz 5)	14 (0,813)	14 (0,814)	7 (0,512)
BSA-Kontrolle	<3 (0,049)	nd	nd

Abbildung 7: Immunkomplexdissoziationen Ansätze 1-5



Das unbehandelte Serum (ohne Antigen- oder BSA-Zusatz) und die Kontrollansätze mit BSA zeigen ohne Dissoziation die gleichen Antikörperkonzentrationen und zeigen über die unterschiedlichen Dissoziationszeiten hinweg eine Abnahme des messbaren IgG-Gehalts. Dies ist, wie bereits bei den ersten Versuchen zu sehen war, vermutlich durch eine gewisse Zerstörung der Immunglobuline bedingt.

Die Seren mit VP2, also mit Immunkomplexen, zeigen ohne Dissoziation niedrigen Immunglobulin G-Gehalt, mit Dissoziation steigt der Gehalt an messbarem Immunglobulin G stark an um nach einer Dissoziationszeit von 45 Minuten auf dem gleichen Niveau wie das unbehandelte Serum zu landen. Dies zeigt, dass durch die Dissoziation in der Tat Antikörper aus den Immunkomplexen gelöst werden können.

Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass eine zu lange Dissoziationszeit die Messung der B19V IgG Antikörper mittels ELISA beeinträchtigt.

Sowohl die Ergebnisse der Bildung von Immunkomplexen, als auch die Ergebnisse der Dissoziation der Immunkomplexe wurden in vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen bestätigt.

### 5.6.8 Dissoziation von Immunkomplexen aus Wild-VP2

Nach der Durchführung der ersten Tests mit dem Antigen-ELISA (siehe auch Ergebnisse des Antigen-ELISAs) konnten Antigen-haltige Seren identifiziert werden, mit deren Hilfe ohne die Nutzung von rekombinantem VP2 Immunkomplexe erzeugt werden konnten. Hierzu wurden 90 µl der antigenhaltigen Seren 3 und 8 (siehe Antigentest) verwendet und mit 10 µl des Antikörperhaltigen Pools mit 18 IU/ml Immunglobulin G gemischt. Die so erzeugten Immunkomplexe sollten anschließend mit der Methode nach Koraka dissoziiert werden. Folgende Ergebnisse wurden erzielt, dargestellt in IU/ml - Extinktionswerte in Klammern:

**Tabelle 25: Dissoziation von Immunkomplexen aus Wild-VP2**

<b>Eingesetzte Lösungen</b>	<b>Immunkomplexe ohne Dissoziation</b>	<b>Immunkomplexe mit Dissoziation 15 min</b>
<b>Serum 3</b>	< 3 (0,195)	6 (0,467)
<b>Serum 8</b>	3 (0,288)	10 (0,666)

Fazit: Die unter 4.6.7 und 4.6.8 beschriebenen Versuche zeigen, dass die Säuredissoziationsmethode nach Koraka dazu geeignet ist, Immunglobulin G aus Immunkomplexen freizusetzen und die Messung im ELISA zu ermöglichen. Die Dissoziation funktioniert sowohl mit rekombinanten Antigenen, als auch mit natürlichen Antigenen.

### **5.6.9 Optimierung der Dissoziationszeit**

Im wiederum nächsten Schritt wurden weitere Dissoziationszeiten getestet, um die optimale Dissoziationszeit zu finden. In einem der vorherigen Versuche war es möglich zu zeigen, dass längere Dissoziationszeiten zu einem Verlust an messbaren Antikörpern führen. Gleichzeitig war davon auszugehen, dass längere Dissoziationszeiten eine stärkere Freisetzung von Antikörpern ermöglichen würden. Es galt somit, den optimalen Zeitpunkt zu finden, bis zu dem die Freisetzung von Antikörpern aus den Immunkomplexen quantitativ die Zerstörung von Antikörpern durch die Dissoziation übersteigt. Wieder wurden aus einem Pool und VP2-Lösung nach der oben beschriebenen Methode Immunkomplexe erzeugt und diese anschließend mit verschiedenen Dissoziationszeiten mit der Methode nach Koraka in Schritten von 5 Minuten dissoziiert. Alle Ansätze entsprachen den im Kapitel „Immunkomplexdissoziationen mit der Methode nach Koraka“ eingesetzten Lösungen. Zur Kontrolle diente wieder das gepoolte Serum (14 IU/ml), das unbehandelt mit den Substanzen zur Dissoziation inkubiert wurde und damit als Zerstörungsindikator diente. Das Folgende Diagramm zeigt die Dissoziationskurven.

Abbildung 8: Zeitverlauf der Dissoziationen

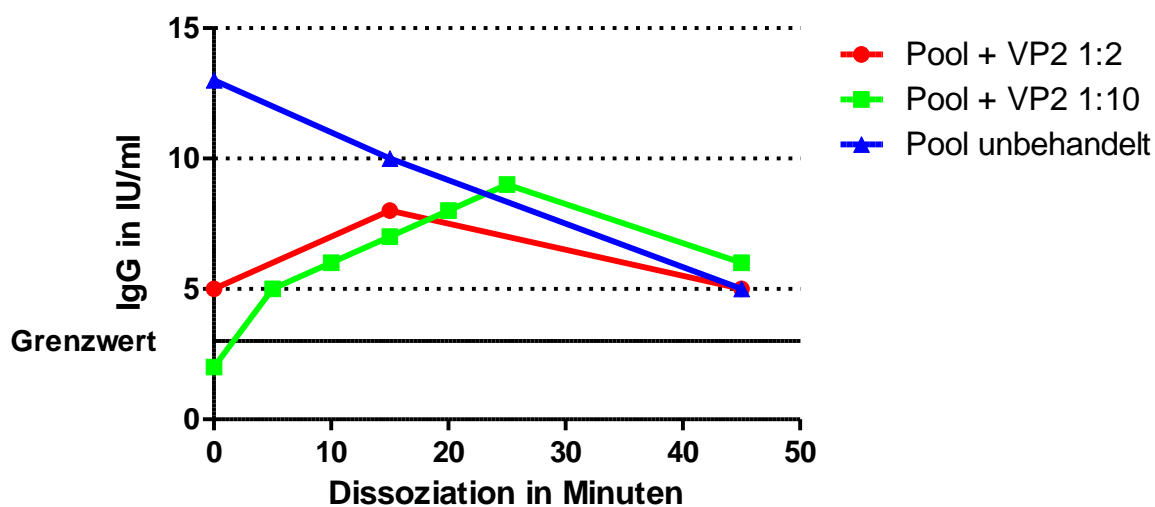


Tabelle 26: Extinktion nach unterschiedlichen Dissoziationszeiten

Dissoziationszeit	Optische Dichte nach Dissoziation, Pool + VP2 im Verhältnis 1:10 (IU/ml)
keine Dissoziation	0,115 (<3)
5 Minuten	0,434 (5)
10 Minuten	0,531 (6)
15 Minuten	0,554 (7)
20 Minuten	0,645 (8)
25 Minuten	0,692 (9)
45 Minuten	0,525 (6)

Der Test zeigt, dass die Messbarkeit von Immunglobulin G nach Freisetzung aus Immunkomplexen nach 25 Minuten besser ist als nach 45 Minuten. Aus diesem Grund wurden die weiteren Dissoziationen mit einer Dissoziationszeit von 25 Minuten durchgeführt.

### 5.6.10 Dissoziation von Immunkomplexen bei Antigenüberschuss

Die Untersuchung fetaler Seren im Antigentest ergab, dass zwei dieser Proben höhere VP2-Konzentrationen aufwiesen, als die VP2-Lösung welche für die Dissoziationstests verwendet



wurden. (z.B. die Fälle 13 und 18). Um auszuschließen, dass sehr hohe Antigenkonzentrationen die Freisetzung und Messung von Immunglobulin G aus Immunkomplexen beeinträchtigen, wurde ein weiterer Dissoziationstest nach Koraka durchgeführt. Für das VP2-Konzentrat wurde ein Antigengehalt von ca. 900 ng/ml ermittelt. Das fetale Serum mit der höchsten Antigenkonzentration enthielt ca. 10 µg/ml. Mit der Verdünnung des Pools von 1:10 mit der VP2-Lösung waren Antigenkonzentrationen von maximal 9 µg/ml zu erreichen. Aus diesem Grunde wurden die Verdünnungen von 1:20 und 1:30 nachgetestet. Hierzu wurden Immunkomplexe mit 10 µl Pool (18 IU/ml) und 190 µl beziehungsweise 290 µl VP2-Lösung erzeugt wie oben beschrieben. Mit 200 µl und 300 µl Glycin wurde bei 37° C 25 Minuten lang dissoziiert und mit 200 µl sowie 300 µl Tris-Puffer wurde neutralisiert. Anschließend wurden die Lösungen mit Biotrin-Probenverdünnungspuffer auf 1 ml aufgefüllt und der ELISA gestartet.

Ergebnisse:

**Tabelle 27: Dissoziation bei Antigenüberschuss**

<b>Verdünnung</b>	<b>Immunglobulin G undissoziiert in IU/ml (OD)</b>	<b>Immunglobulin G nach Dissoziation 25 Minuten in IU/ml (OD)</b>
<b>1:20</b>	<3 (0,098)	9 (0,639)
<b>1:30</b>	<3 (0,086)	8 (0,609)

Dieser Test zeigt, dass sich durch die Dissoziationsmethode nach Koraka auch bei höheren Antigenkonzentrationen Immunglobulin G aus Immunkomplexen freisetzen lässt.

### **5.6.11 Dissoziation von Immunkomplexen in fetalen Blutproben**

Nachdem die Vortests abgeschlossen waren, wurden die fetalen Blutproben, die initial negativ für Immunglobulin G im ELISA getestet worden waren, mit der Methode nach Koraka dissoziiert und anschließend der ELISA für Immunglobulin G durchgeführt. Es wurden aus der Gruppe C 17 Proben für diesen Test eingesetzt.

Tabelle 28: Dissoziationsergebnisse der fetalen Blutproben

Fall-Nr.	Extinktionswert vor Dissoziation	Extinktionswert nach Dissoziation	Immunglobulin G in IU/ml nach Dissoziation
2	0,070	0,086	<3
12	0,100	0,129	<3
13	nicht durchgeführt	0,227	<3
14	0,222	0,178	< 3
15	0,078	0,135	< 3
16	0,059	0,123	< 3
18	nicht durchgeführt	0,168	< 3
25	0,300	0,290	< 3
26	0,105	0,146	< 3
28	0,079	0,098	< 3
30	0,163	0,189	< 3
33	0,281	0,275	< 3
35	0,084	0,095	< 3
41	0,063	0,103	< 3
42	0,071	0,137	< 3
44	0,107	0,128	< 3
48	0,222	0,251	< 3

Bei keiner der fetalen Proben konnte durch Säuredissoziation in nennenswertem Umfang Immunglobulin G freigesetzt werden. Alle Proben blieben auch nach der Dissoziation negativ für Immunglobulin G im ELISA. Die Untersuchung wurde limitiert durch die geringe verfügbare Menge fetaler Seren.

## 5.7 Antigen-ELISA

Der Antigen-ELISA sollte dazu dienen, herauszufinden, wie hoch die Antigenlast im fetalen Blut bei akuter intrauteriner Parvovirus B19-Infektion ist und damit auch einen Hinweis dafür

liefern, ob IgG in großen Mengen von Antigenen gebunden werden könnte und dadurch dem Nachweis durch den IgG-ELISA entgeht.

### 5.7.1 Einfluss des Probenverdünnungspuffers auf IgG

Da die Informationen zu dem verfügbaren Antigentest auf die Informationen aus der bereits zitierten Publikation (81) begrenzt waren, wurden zunächst einige Vorabtestungen durchgeführt. Es wurden Immunglobulin G-positive und –negative Proben mit dem Probenverdünnungspuffer des Antigen-ELISAs angesetzt (Verdünnung 1:100) und im Anschluss ein ELISA für Immunglobulin G durchgeführt, mit dem Ziel, herauszufinden, wie Immunglobulin G auf den Probenverdünnungspuffer reagiert.

**Tabelle 29: IgG-ELISA mit Probenverdünnungspuffer des Antigentests**

Probe	Extinktionswert	IgG in IU/ml
<b>Serum 7</b>	0,154	<3
<b>Serum 8</b>	0,139	<3
<b>Pool 14 IU</b>	0,155	<3

Nicht nur zeigten hierbei die früher schon negativ für Immunglobulin G getesteten Proben ein negatives Ergebnis, auch die zuvor Immunglobulin-G-positiv getesteten Proben zeigten ein negatives Ergebnis. Dass kein Immunglobulin G mehr messbar war, könnte zwei Ursachen haben. Zum Einen wäre es möglich, dass der Probenverdünnungspuffer Immunglobulin G denaturierte, zum Anderen könnte die Beschichtung der Mikrotiterplatte durch den Probenverdünnungspuffer zerstört worden sein. Sollte die erste Möglichkeit zutreffend sein, würde dies bedeuten, dass eventuell Immunglobulin G so denaturiert würde, dass Immunkomplexe gespalten und Antigen freigesetzt werden könnten. Diese Theorie wurde auch überprüft, siehe Kapitel „Einfluss von IgG auf den Antigen-ELISA“.

### 5.7.2 Ermittlung des Messbereichs

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit dem VP2-Standard des Antigentests bekannter Konzentration (251 µg/ml) erstellt und im Antigen-ELISA eingesetzt. Verdünnt wurde mit dem mitgelieferten Probenverdünnungspuffer (zunächst mit 10µl VP2-Standard plus 241 µl

Probenverdünnungspuffer). Mit einer Negativkontrolle aus reinem Probenverdünnungspuffer wurde der Negativbereich definiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 30: Messbereichsbestimmung Antigen-ELISA**

<b>Verdünnung</b>	<b>Antigengehalt der Lösung</b>	<b>Optische Dichte</b>
<b>keine</b>	251 µg/ml	3,510
<b>1:25,1</b>	10 µg/ml	3,234
<b>1:251</b>	1 µg/ml	3,017
<b>1:2.510</b>	100 ng/ml	1,235
<b>1:25.100</b>	10 ng/ml	0,197
<b>1:251.000</b>	1 ng/ml	0,078
<b>1:2.510.000</b>	0,1 ng/ml	0,070
<b>1:25.100.000</b>	0,01 ng/ml	0,077
<b>1:251.000.000</b>	0,001 ng/ml	0,107

Negativkontrolle

Optische Dichte: 0,072

Diese Ergebnisse waren reproduzierbar. Die Nachweisgrenze wurde entsprechend der Ergebnisse auf 10 ng/ml festgelegt und alle Extinktionswerte unterhalb 0,197 als < 10 ng interpretiert. Auf die Erstellung einer Eichkurve wurde verzichtet, da anhand der vorliegenden Ergebnisse kein linearer Messbereich definierbar war.

### **5.7.3 Einfluss von IgG auf den Antigen-ELISA**

Die Ergebnisse von Versuch 1 (siehe 5.7.1) des Antigen-ELISA sprachen dafür, dass Immunglobulin G die Messbarkeit von B19V-VP2 im Antigen-ELISA nicht beeinträchtigt. Um dies zu bestätigen wurden Immunkomplexlösungen erzeugt und diese dann im Antigen-ELISA eingesetzt. Hierzu wurde die Antigen-Lösung bekannter Konzentration, die im Versuch 2 eingesetzt wurde, mit dem Immunglobulin G-haltigen Pool (14 IU/ml), bekannt von den Dissoziationsversuchen, verdünnt. Als Verdünnungsstufen wurden die gleichen Stufen genutzt wie in bei der Ermittlung des Messbereichs (s.o.), so dass ein direkter Vergleich möglich war. Die erste Verdünnungsstufe wurde mit 10 µl VP2-Standard und 241µl Pool erreicht. Die Kontrolle erfolgte mit Probenverdünnungspuffer wie im Versuch zur Ermittlung des Messbereichs. Die Verdünnungen wurden eine Stunde bei 37° C inkubiert.

Die Ergebnisse sind als Extinktionswerte der Tabelle zu entnehmen:

**Tabelle 31: Einfluss von IgG auf den Antigen-ELISA**

<b>Verdünnungsstufen</b>	<b>Antigen-Lösung mit Pool (OD)</b>	<b>Antigen-Lösung mit Probenverdünnungspuffer (OD)</b>
<b>1:25,1</b>	2,731	3,035
<b>1:251</b>	0,261	2,932
<b>1:2.510</b>	0,105	0,884
<b>1:25.100</b>	0,090	0,168
<b>1:251.000</b>	0,096	0,093
<b>1:2.510.000</b>	0,089	0,082

Die Ergebnisse der nun vorliegenden Versuchsreihen ergaben, dass evtl. vorhandenes IgG die Messbarkeit von VP2 im Antigen-ELISA beeinträchtigt und sich somit die Ergebnisse des ersten Versuchs nicht bestätigten.

#### **5.7.4 Messung von Antigen in unterschiedlichen Proben**

Die für die Dissoziationsversuche eingesetzte Antigenlösung wurde ebenso getestet wie verschiedene Patientenproben. Auch sieben der fetalen Seren aus der Studie wurden getestet.

Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

**Tabelle 32: Antigengehalt verschiedener Proben**

<b>Probe</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Optische Dichte</b>	<b>Antigengehalt</b>
<b>Antigenlösung der Dissoziations- versuche</b>	-	2,960	ca. 900 ng/ml
<b>Serum 1:</b>	PCR 1600 Kopien/ml, IgG >50	0,107	< 10 ng/ml
<b>Serum 2:</b>	PCR negativ, IgG 37	0,095	< 10 ng/ml
<b>Serum 3:</b>	akute Infektion: PCR >87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 0,2	2,936	ca. 900 ng/ml

<b>Probe</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Optische Dichte</b>	<b>Antigengehalt</b>
<b>Serum 4:</b>	akute Infektion: PCR >87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM negativ	0,097	<10 ng/ml
<b>Serum 5:</b>	akute Infektion: PCR 1,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 8,9	0,077	< 10 ng/ml
<b>Serum 6:</b>	akute Infektion: PCR 1 Million Kopien/ml, IgG negativ, IgM 6,9	0,073	<10 ng/ml
<b>Serum 7:</b>	akute Infektion: PCR >87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 0,7	0,331	ca. 40 ng/ml
<b>Serum 8:</b>	akute Infektion: PCR >87,5 Millionen Kopien/ml, IgG negativ, IgM 1,2	2,969	ca. 900 ng/ml
<b>Fall 2:</b>	akute Infektion, fetales Blut	0,411	ca. 50 ng/ml
<b>Fall 5:</b>	akute Infektion, fetales Blut	0,942	ca. 90 ng/ml
<b>Fall 6:</b>	akute Infektion, fetales Blut	0,088	< 10 ng/ml
<b>Fall 13:</b>	akute Infektion, fetales Blut	3,217	ca. 10 µg/ml
<b>Fall 18:</b>	akute Infektion, fetales Blut	3,245	ca. 10 µg/ml
<b>Fall 41:</b>	akute Infektion, fetales Blut	1,820	ca. 500 ng/ml
<b>Fall 42:</b>	akute Infektion, fetales Blut	2,069	ca. 600 ng/ml

Der Antigentest zeigte sehr unterschiedliche Antigenkonzentrationen im Blut Parvovirus B19-infizierter Patienten. Bei akuten fetalen Infektionen lagen die gemessenen Antigenmengen im Bereich zwischen < 10 ng/ml und 10 µg/ml.

## 6 Diskussion

### 6.1 Mütterliche Proben

#### 6.1.1 Virämie

Die Polymerase Kettenreaktion dient dem direkten Virusnachweis und damit auch dem Infektionsnachweis. Die Menge der gefundenen DNA liefert Hinweise auf den Infektionszeitpunkt und auf den Immunstatus.

Bei 46 von 48 Schwangeren konnte B19V-DNS nachgewiesen werden. Bei vermuteter Infektion entspricht dies den Erwartungen, wenn man davon ausgeht, dass B19V-DNS längere Zeit in geringen Konzentrationen im Blut nachweisbar ist, wie in einigen Arbeiten gezeigt wurde (92-94). Lediglich in den Fällen 17 und 34 fiel die Testung auf B19V-DNS negativ aus. Beide Fälle zeichnen sich durch einen großen zeitlichen Abstand von Infektionszeitpunkt zu Untersuchungszeitpunkt (mindestens 18 respektive 14 Wochen) aus. Dies könnte eine Erklärung für negative PCR-Ergebnisse sein, allerdings zeigt der Vergleich mit anderen Arbeiten (92-94), dass die vollständige Clearance von B19V-DNS innerhalb eines so kurzen Zeitraums selten ist. Für den Fall Nr. 34 muss sich folglich die Frage nach der Möglichkeit falsch negativer PCR-Ergebnisse stellen, denn die klinischen und serologischen Angaben bestätigen die B19V-Infektion in oder nahe der 7. Schwangerschaftswoche.

Die DNS-Kopienzahlen im Bereich zwischen 0 und 15,6 Millionen Kopien/ml zeigen, dass keine der Proben in der akuten virämischen Phase der Infektion, welche in der Regel mit dem Auftreten von Immunglobulin M im Blut endet, gewonnen wurde, da in der akuten virämischen Phase einer B19V-Infektion mit Werten jenseits von  $10^8$  Kopien pro ml zu rechnen ist (16;92). Dies entspricht der Beobachtung, dass fetale Komplikationen erst einige Zeit nach Infektion der Mutter zu erwarten sind (54) und deckt sich mit den Ergebnissen der durchgeführten ELISAs für Immunglobulin G (siehe unten), denn alle werdenden Mütter zeigten zum Zeitpunkt der invasiven Pränataldiagnostik Immunglobulin der Klasse G, welches erst im Anschluss an die hoch-virämische Phase zu erwarten ist und postinfektiös mit tendenziell niedrigen Genom-Kopienzahlen im Bereich von  $10^4$ - $10^5$  Kopien/ml einhergeht (16;93).

Die DNS-Kopien im Blut der werdenden Mütter mit Feten in Gruppe A (nicht infizierte Feten) sind signifikant niedriger als in den Gruppen B und C<sup>4</sup> (infizierte Feten). Allerdings ist die Überlappung so groß, dass die Viruslast im mütterlichen Blut nicht als Prädiktor für eine intrauterine Übertragung herangezogen werden kann. Der wesentliche Grund für die beobachtete Differenz dürfte der längere Abstand zwischen Infektionszeitpunkt und Untersuchungszeitpunkt in Gruppe A im Vergleich zu den Gruppen B und C sein.

Die maternalen DNS-Kopienzahlen der Gruppen B (infizierte Feten mit positivem IgG-Nachweis) und C (infizierte Feten mit negativem IgG-Nachweis) unterscheiden sich nicht signifikant<sup>5</sup>. Dies entspricht nur bedingt den Erwartungen, denn wenn man davon ausgeht, dass der Fetus nur eine Leihimmunität von der Mutter erhält, könnte erwartet werden, dass das Immunsystem der Mütter aus Gruppe B die Infektion erfolgreicher bekämpft als dasjenige der Mütter in Gruppe C. Andererseits entsprechen die maternalen DNS-Kopienzahlen beider Gruppen bezogen auf den Abstand von Infektions- und Untersuchungszeitpunkt dem Verlauf, welcher von den bereits oben zitierten Arbeiten (16;93) beschrieben wurde und der zeigt, dass die Viruslast bereits mit dem Auftreten von Antikörpern sinkt, auf einem niedrigen Niveau jedoch lange B19V-DNS nachweisbar bleibt.

### **6.1.2 Antikörper Immunglobulin M**

Postnatal wird der Nachweis spezifischer IgM Antikörper in der Regel als Hinweis auf eine akutes Infektionsgeschehen betrachtet. IgM Antikörper sind dann meist nur passager nachweisbar. In seltenen Fällen können sie über einen längeren Zeitraum persistieren. Außerdem können IgM Antikörper - in Abhängigkeit vom Erreger - bei Reinfektionen bzw. im Rahmen einer Reaktivierung bei chronischen Infektionen wieder auftreten.

In der vorliegenden Untersuchung waren 44 von 48 Schwangeren B19V IgM positiv. Da B19V IgM in der Regel nur für 6-10 Wochen (maximal 6 Monate) persistiert (34;92), wurde auf diesem Wege ein Beweis dafür erbracht, dass es sich nicht um länger zurückliegende Infektionen handelt. Der Anteil B19V IgM positiver Mütter in unserer Kohorte ist mit 91,7 % im Vergleich zu anderen publizierten Beobachtungen relativ hoch. In vergleichbaren Untersuchungen wurden maternale IgM-Positivraten zwischen 37,5 % und 81,3 % ermittelt (65). Es ist möglich, dass serologische Tests für Immunglobulin M falsch positiv ausfallen.

---

<sup>4</sup> p=0,005 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

<sup>5</sup> p=0,497 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test



Allerdings liegt die Spezifität des in dieser Untersuchung durchgeführten ELISA der Firma Biotrin zwischen 98 und 99% (95), so dass falsch positive Ergebnisse unwahrscheinlich sind. Die Erklärung des hohen Anteils IgM positiver Mütter ist wohl eher in der Selektion der Mutter-Kind Paare zu suchen.

Bei werdenden Müttern der Gruppe A (57%) konnte signifikant seltener IgM nachgewiesen werden<sup>6</sup> als in den Gruppen B (100%) und C (94%), welche sich in dieser Hinsicht nicht signifikant unterscheiden<sup>7</sup>. Wie im Bezug auf die B19V-DNS sind die Unterschiede in diesem Fall vermutlich auf die unterschiedlich lange Zeitspanne zwischen Infektion und Untersuchung zurückzuführen, welche für Gruppe A im Median 9 Wochen, in den Gruppen B und C hingegen nur 6 Wochen beträgt, da IgM unterschiedlich lange nachweisbar ist (92).

### 6.1.3 Antikörper Immunglobulin G

Immunglobulin G ist der typische Marker für die Immunitätslage des Patienten. Es persistiert mutmaßlich ein Leben lang und bietet in der Regel auch Schutz vor Reinfektionen (16;32;37). In der Schwangerschaft kommt dem mütterlichen IgG die besondere Aufgabe zu, den Feten passiv zu immunisieren, da IgG das einzige plazentagängige Immunglobulin ist.

Alle 48 werdenden Mütter wurden positiv für B19V-IgG getestet. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da der Zeitraum zwischen der maternalen Infektion und der Pränataldiagnostik in allen Fällen ausreichend lang für den Immunglobulin-Klassenwechsel war. Auch in einer in der Literatur beschriebenen Gruppe welche mit der hier vorliegenden vergleichbar ist, waren alle mütterlichen Proben positiv für B19V-spezifisches IgG (65).

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des IgG-Gehalts des mütterlichen Bluts zwischen den Müttern von nachweislich infizierten Feten und den Müttern der Feten, für die dieser Nachweis nicht erbracht werden konnte<sup>8</sup> oder innerhalb der Gruppe der infizierten Feten im Vergleich der Gruppen B und C<sup>9</sup>.

---

<sup>6</sup>  $p=0,008$  im exakten zweiseitigen Test nach Fisher

<sup>7</sup>  $p=1,00$  im exakten zweiseitigen Test nach Fisher

<sup>8</sup>  $p=0,225$  im exakten zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test

<sup>9</sup>  $p=0,144$  im exakten zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test

#### **6.1.4 Line-Test**

Der *recomLine*-Test, mit dem die mütterlichen Blutproben untersucht wurden, ergänzte die klinischen Angaben sowie die Ergebnisse der PCR und ELISAs zur Eingrenzung des Infektionszeitraumes.

Da bei allen Schwangeren Immunglobulin G im ELISA nachgewiesen wurde, ist es nicht verwunderlich, dass alle mütterlichen Proben eine positive Immunglobulin G-gestützte Reaktivität gegen B19V-Epitope im *recomLine*-Test zeigten. Auf diesem Wege wurden somit die Ergebnisse des ELISA für Immunglobulin G bestätigt.

Die Eingrenzung des Infektionszeitraumes bei Infektionen mit B19V wird häufig und auch in einigen Fällen dieser Studie dadurch erschwert, dass die Infektion asymptomatisch verläuft ein definitiver Kontakt nicht sicher erinnerlich ist. Durch die Anwendung des *recomLine* Tests wie im Methoden-Teil beschrieben, wurde in entsprechenden Fällen der Infektionszeitpunkt eingegrenzt. Exakte Infektionszeitpunkte kann der Line-Test jedoch nicht liefern und sollte somit immer nur als Ergänzung zu anderen serologischen und virologischen Tests betrachtet werden. Dies gilt besonders für den Fall 17. Der Line-Test ergibt einen Infektionszeitpunkt vor der 4. Schwangerschaftswoche. Die serologischen Befunde ermöglichen jedoch auch den Schluss, dass die Infektion vor der Konzeption erfolgte.

Auf die Aviditätstestung mittels *recom-Line* wurde bewusst verzichtet, da die Ergebnisse der Aviditätstestung (z.B. hohe IgG Avidität = Ausschluss einer akuten Infektion in den letzten 4 Wochen) in den meisten Fällen keine wesentliche Zusatzinformation liefert.

## **6.2 Fetale Proben**

### **6.2.1 Virämie**

Die Polymerase Kettenreaktion aus Fetalblut ist die Methode mit der höchsten Sensitivität zum Nachweis einer intrauterinen Parvovirus B19-Infektion.

Anhand der (Doppler-) sonographischen Befunde war in allen Fällen eine intrauterine Infektion mit B19V möglich. Bei 7 der 48 Feten (eingeschlossen der Fall 17, für welchen die mütterliche Infektion nicht eindeutig bestätigt werden konnte – siehe unten) wurde aber keine B19V-DNS nachgewiesen, so dass diese Feten als nicht-infiziert eingestuft wurden. Die Mehrzahl der infizierten Feten präsentierte sich mit hohen Viruslasten jenseits des mit der

PCR zuverlässig quantifizierbaren Bereichs von 600 bis 87,5 Millionen Kopien. Der Fall 39 in der Gruppe der infizierten Feten fiel durch eine im Vergleich mit allen anderen infizierten Feten sehr niedrige Viruslast von 2500 Kopien/ml auf, weshalb die PCR zur Kontrolle noch ein weiteres Mal durchgeführt wurde, mit gleichem Ergebnis. Erklärt werden kann dieser niedrige Wert eventuell dadurch, dass die Infektion zum Untersuchungszeitpunkt bereits mindestens 10 Wochen zurücklag und im Fetalblut 32 IU/ml IgG nachgewiesen werden konnten.

In der Gruppe C war die durchschnittliche DNS-Kopienzahl signifikant höher als in der Gruppe B<sup>10</sup> (84,6 Millionen zu 38 Millionen). Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, dass B19V-spezifisches IgG zu einer Reduktion der Viruslast führen müsste.

### **6.2.2 Antikörper Immunglobulin M**

Der Nachweis spezifischer IgM Antikörper beim Feten (oder Neugeborenen) wird grundsätzlich als Zeichen einer fetalen Immunantwort gewertet, da IgM die Plazentaschranke nicht überwinden kann. Es gilt als hochspezifisch, jedoch nicht als hochsensitiv für eine fetale Infektion, da das fetale Immunsystem auf ein Pathogen nicht in allen Fällen zu reagieren scheint (72). Im Gegensatz zu anderen häufigen Infektionserkrankungen in der Schwangerschaft wie zum Beispiel Röteln spielt IgM deshalb in der Routinediagnostik von fetalen B19V-Infektionen eine untergeordnete Rolle.

Von den untersuchten 41 Feten mit durch Polymerase-Kettenreaktion bestätigter intrauteriner Infektion (Gruppen B und C) zeigten 11 Feten (27%) Immunglobulin M im ELISA (Gruppen B1 und C1), bei 27 Feten konnte kein Immunglobulin M nachgewiesen werden (Gruppen B2 und C2), 2 fetale Blutproben waren nicht mehr in ausreichender Menge vorhanden. In der Literatur wird berichtet, dass Immunglobulin M bei ähnlicher Fallkonstellation wie in dieser Studie bei 0 % bis 62,5 % der intrauterin infizierten Feten zu finden ist (65). Immunglobulin M war bei keinem Feten zu finden, welcher vor der 20. Schwangerschaftswoche untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, die vermuten, dass vor diesem Zeitpunkt der Schwangerschaft das fetale Immunsystem noch nicht so weit ausgereift sei, dass es auf eine Infektion mit der Bildung von Immunglobulin M reagieren könne (65). Silver et al. (80) berichteten, dass Immunglobulin M nie vor dem 3. Trimenon nachzuweisen sei. Dieser Arbeit widersprechen die hier gezeigten

---

<sup>10</sup> p=0,001 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

Ergebnisse folglich, stehen jedoch im Einklang mit vergleichbaren Fällen intrauteriner Parvovirus B19-Infektionen, in welchen auch schon ab der 20. Schwangerschaftswoche Immunglobulin M nachgewiesen werden konnte (65).

Bezogen auf die Häufigkeit des Nachweises von IgM beim Feten unterscheiden sich die Gruppen B (4 von 10) und C (7 von 29) nicht signifikant<sup>11</sup>.

### 6.2.3 Antikörper Immunglobulin G

Immunglobulin G im fetalen Blut kann einerseits von der Mutter produziert und diaplazentar zum Feten transportiert worden sein, andererseits kann es jedoch auch vom Feten selbst produziert worden sein. In ersterem Falle gilt IgG als Träger der antikörpergestützten Leihimmunität des Feten.

In der Gruppe der nicht infizierten Feten wurden signifikant mehr<sup>12</sup> Immunglobulin G-positive Feten (6/7 positiv, entsprechend 86 %; 1/7 grenzwertig) als in der Gruppe der infizierten Feten (10/41, entsprechend 24 %) identifiziert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass IgG mit dazu beiträgt, die vertikale Transmissionsrate zu senken, indem der Fetus passiv immunisiert wird. Folglich sollte bei nicht infizierten Feten in einem höheren Prozentsatz Immunglobulin G nachweisbar sein. Allerdings ist die Plazenta in der hochvirämischen Phase immer B19V ausgesetzt ohne dass von der Mutter zu diesem Zeitpunkt B19V IgG Antikörper produziert werden – also ein passiver Schutz in der Frühphase der Infektion nicht vermittelt werden kann. Unklar ist nach wie vor, wie schnell B19V die Plazenta überwindet und ob die Transmission in der Frühschwangerschaft langsamer abläuft als in der Spätschwangerschaft. Dies hätte eventuell auch einen Einfluss darauf ob maternale IgG Antikörper das Transmissionsrisiko senken.

Zu Beachten ist, dass auch der Fall 17, bei welchem die mütterliche Infektion möglicherweise vor der Schwangerschaft lag, in der Gruppe A geführt wird.

Weitere Erklärungsansätze für den selteneren Nachweis von IgG in der Gruppe der infizierten Feten ist eine Beeinträchtigung des aktiven transplazentaren Transports von Immunglobulin G in der Folge einer intrauterinen Infektion mit Parvovirus B19 oder die Sequestrierung von Parvovirus B19-spezifischem Immunglobulin G in Immunkomplexen. Auf diese beiden Theorien wird im Teil „Dissoziation von Immunkomplexen“ näher eingegangen werden.

<sup>11</sup> p=0,694 im exakten zweiseitigen Test nach Fisher

<sup>12</sup> p=0,000 im exakten zweiseitigen Test nach Fisher

Die Frage, ob das bei den infizierten Feten gefundene IgG von der Mutter stammt oder vom Feten produziert wurde, muss offen bleiben, eventuell könnte dieser Frage in zukünftigen Studien durch eine IgG-Subklassen-Spezifizierung beantwortet werden.

Der Vergleich mit anderen Studien ist für B19V-spezifisches Immunglobulin G im fetalen Blut nicht möglich, da hierzu bislang keine Arbeiten publiziert wurden.

## **6.2.4 Dissoziation von Immunkomplexen**

### **6.2.4.1 Theoretische Grundlagen**

Nachdem die ersten maternalen und fetalen Blutproben auf B19V-spezifisches Immunglobulin M und Immunglobulin G sowie B19V-DNS getestet worden waren, ergab sich das Bild der Gruppen A, B und C. Dass ein Teil der Feten trotz maternaler Infektion nicht infiziert war, ist in der Literatur hinreichend beschrieben (12;51). Da der transplazentare Transfer mütterlicher IgG Antikörper bereits in der 13. SSW einsetzt und zwischen der 17. und 22. SSW die IgG Konzentration beim Feten bereits 10% der mütterlichen IgG Konzentration beträgt (79), hätte ein Großteil der hier untersuchten Feten (medianes Gestationsalter bei invasiver PD 21 SSW) B19V IgG positiv sein und folglich der Gruppe B angehören sollen.

Mit B19V infizierte Feten ohne Immunglobulin G im Blut (Gruppe C) dürfte es in der Theorie nur in zwei Situationen geben. 1. Wenn die Mutter selbst nicht genug Immunglobulin G produziert. 2. In der frühen Phase der mütterlichen Immunglobulin G-Immunantwort auf B19V, bevor Immunglobulin G über die Plazenta hinweg transportiert werden konnte. Beide Möglichkeiten treffen auf die 31 Feten der Gruppe C nicht zu. Zum Einen lag der Infektionszeitpunkt zum Untersuchungszeitpunkt im Minimum 3 Wochen und im Median 6 Wochen zurück. Wie bereits dargestellt ist zudem in diesem Punkt kein Unterschied zu den Feten der Gruppe B vorhanden, denn bei diesen liegt die Infektion im Median auch sechs Wochen zurück. Zum Anderen liegen die mütterlichen Werte für Immunglobulin G in der Gruppe C zwischen 7 IU/ml und >50 IU/ml eindeutig im positiven Bereich. Verglichen mit den Immunglobulin G-Werten der Gruppe B liegen Median und Mittelwert mit 36 IU/ml respektive 35,7 IU/ml in der Gruppe C deutlich über Median und Mittelwert der Gruppe B mit 28 IU/ml respektive 30,3 IU/ml, so dass beide Möglichkeiten ausgeschlossen werden konnten. In der Tat konnte keine Korrelation zwischen dem IgG-Level der Mutter und dem IgG-Level des Feten gefunden werden.

Folglich widerspricht die Gruppe C in der Tat der Annahme, dass hohe Immunglobulin G-Konzentrationen im mütterlichen Blut mit hohen Immunglobulin G-Konzentrationen im fetalen Blut vergesellschaftet sein müssten.

Zwei unterschiedliche Erklärungsansätze zu dieser Beobachtung sind denkbar: Zum Einen ein unzureichender Transport von Immunglobulin G über die Plazenta hinweg zum Feten, zum Anderen die Entfernung mütterlicher Immunglobuline aus dem fetalen Blut.

Beide Mechanismen sind in der Literatur für B19V bislang nicht beschrieben oder untersucht worden. Die Untersuchung des transplazentaren Transports von B19V-spezifischem Immunglobulin G mit Messung der Transportkapazität erscheint aus heutiger Sicht nicht realisierbar, da die Mechanismen des Immunglobulin G-Transports weitgehend ungeklärt sind (12;77-79) und für B19V kein Tiermodell existiert, an dem sich experimentell der Transport quantifizieren ließe.

Möglich ist jedoch, die Entfernung mütterlichen Immunglobulins G aus dem fetalen Blut zu untersuchen. Es ist denkbar, dass mütterliches Immunglobulin G gegen B19V durch einen Antigenüberschuss im Anschluss an den transplazentaren Transport in Immunkomplexen sequestriert wird und somit in serologischen Tests nicht mehr nachweisbar ist.

Dieser zuletzt genannte Mechanismus wurde im Rahmen dieser Studie untersucht.

#### **6.2.4.2 Dissoziationsverfahren mit Polyethylenglycol**

Zunächst wurden wie in den Resultaten beschrieben zwei Immunkomplex-Dissoziationsverfahren mit Polyethylenglycol (PEG) durchgeführt. Beide Verfahren waren nicht geeignet. Ob die verwendeten Reagenzien per se mit dem ELISA für IgG interferieren wurde nicht untersucht und lässt sich von daher nicht ausschließen. Abweichend von der in der Literatur beschriebenen Materialmenge von 100 bzw. 200µl Serum konnte in der aktuellen Untersuchung aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit nur 50-100µl Serum in die Reaktion eingesetzt werden. Spekuliert werden kann darüber, ob sich die B19V-Immunkomplexe strukturell von Immunkomplexen bei HIV oder Borreliose unterscheiden und die Methoden mit Polyethylenglycol aus diesem Grund bei B19V nicht geeignet waren.

#### **6.2.4.3 Säuredissoziationsverfahren**

Die Dissoziationsverfahren mit Polyethylenglycol waren bereits von den Erstbeschreibern mit der Messung von IgG verknüpft worden, wohingegen Säuredissoziationsverfahren nur mit Methoden zum Antigennachweis durchgeführt wurden, vor dem Hintergrund, dass Antigene

chemisch stabiler sind als Antikörper. Bei Dissoziationsverfahren unter Einsatz von Säuren wurde die Zerstörung von IgG befürchtet, weshalb zunächst dieser Aspekt mit drei verschiedenen Säure-Dissoziations-Methoden nach Weber et al. (84), Pokriefka et al. (82) und Koraka et al. (83) untersucht wurde. Wie vermutet wurde nach Durchführung der Dissoziation (ohne Vorliegen von Immunkomplexen) deutlich weniger IgG im ELISA gemessen als ohne Dissoziation. Aus diesem Grund wurde die schonendste Methode, die Methode nach Koraka et al. weiter verfolgt. Künstlich erzeugte Immunkomplexe, hergestellt aus humanem IgG-haltigem Serum und rekombinant hergestelltem B19V-VP2-Antigen wurden für die weiteren Tests verwendet und unspezifische Einflüsse hoher Proteinkonzentrationen der VP2-haltigen Lösung durch Kontrolle mit bovinem Serumalbumin ausgeschlossen. Mithilfe der künstlich erzeugten Immunkomplexe konnte die Wirksamkeit der Dissoziationsmethode gezeigt und durch Reduktion der Dissoziationszeit von einer Stunde auf 25 Minuten die Effektivität der Methode zur Dissoziation von Immunkomplexen optimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Dissoziation der Immunkomplexe auch bei Antigenüberschuss funktionierte. Die Funktionalität der Methode konnte mithilfe stark VP2-haltiger Seren anstelle des künstlich hergestellten Antigens überprüft werden. In der Folge wurden 17 von 31 (55 %) der zuvor als IgG-negativ identifizierten fetalen Proben mit dem modifizierten Verfahren nach Koraka et al. dissoziiert. Bei keiner der getesteten Proben konnte in nennenswertem Umfang IgG aus Immunkomplexen freigesetzt werden, wie der Vergleich der Extinktionswerte zeigt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass B19V-spezifisches IgG bei einem großen Teil der B19V-infizierten Feten nicht nachweisbar ist und dass dieses Fehlen von IgG nicht auf eine Sequestrierung von IgG in Immunkomplexen zurückzuführen ist.

Es gibt keine Literatur, in welcher beschrieben wird, wie schnell zirkulierende Immunkomplexe aus fetalem Blut eliminiert werden, allerdings wurden Immunkomplexe bereits verschiedentlich in Nabelschnurblut nachgewiesen (96), so dass davon ausgegangen werden kann, dass Immunkomplexe zu finden sein müssten, sollten diese gebildet werden. Allerdings besteht eine positive Korrelation zwischen Immunkomplexen in Nabelschnurblut und der Schwangerschaftsdauer (96). Ein weiterer Faktor spricht dagegen, dass bei Feten keine Immunkomplexe nachweisbar sein könnten: Die Elimination von zirkulierenden Immunkomplexen geschieht durch Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems und ist besonders abhängig von dem Komplementprotein C1q. Besagtes Komplementprotein C1q erreicht bei der Geburt nur ca. 68 % der durchschnittlichen

Serumwerte Erwachsener (97) und im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Immunkomplexe bei einem Mangel an C1q verlangsamt eliminiert werden (98). Somit kann davon ausgegangen werden, dass B19V-spezifische Immunkomplexe in fetalem Blut protrahiert zirkulieren müssten und folglich auch nachgewiesen werden könnten, wenn sie vorhanden wären.

### **6.2.5 Verlaufspuben**

Nur zu 11 von 48 Fällen lagen im weiteren Verlauf der Schwangerschaft zusätzliche fetale oder postpartal entnommene Proben vor. Die vorliegenden Proben zeigen, dass die Viruslast sinkt, wenn IgG nachweisbar ist und dass Feten, in deren Blut in der ersten Abnahme noch kein IgG nachweisbar war, im Verlauf auch IgG aufweisen, wenn die Schwangerschaft bis zu diesem späteren Untersuchungszeitpunkt noch intakt war. Von Enders et al. wurden fetale B19V-Infektionen zwischen der 9. und 20. Schwangerschaftswoche als besonders gefährlich eingeschätzt (53). Eine der möglichen Ursachen könnte darin zu suchen sein, dass IgG im fetalen Blut erst in einem späteren Stadium der Schwangerschaft nachweisbar wird, wie die vorliegende Studie zeigt, eine andere Ursache liegt jedoch auch in der zu diesem Zeitpunkt beschleunigten Blutbildung des Feten.

## **6.3 Klinik**

### **6.3.1 Klinische Präsentation**

In der Gruppe der B19V DNS negativen Feten konnte die Ursache der Ultraschallauffälligkeiten letztendlich nicht ermittelt werden. In 3 Fällen (Nr. 3, 31, 32) lag eine milde (grenzwertige) fetale Anämie vor, die sich bei 2 Feten bis zur Entbindung spontan regenerierte. Im 3. Fall (Nr 32) ist der Schwangerschaftsausgang unbekannt. In einem Fall (Nr 34) lag eine ausgeprägte Anämie mit Zeichen eines Hydrops fetalis vor. Die Anämie persistierte postnatal, das Kind wird bis heute in regelmäßigen Abständen unter der Diagnose dyserythropoietische Anämie unklarer Genese transfundiert. Ein Fall (Nr 36) endete mit einer Totgeburt, in 2 Fällen (Nr 9, 17) wurde die Schwangerschaft unterbrochen. In allen Fällen war die Chromosomenanalyse unauffällig. Auch bestand kein Hinweis auf einen kongenitalen Herzfehler. Leider liegen weitere Daten hierzu nicht vor, so dass keine weiteren Aussagen zu diesen Fällen zu machen sind. Es ist davon auszugehen, dass die Symptomatik der Feten und



die gleichzeitige Infektion der Mutter mit Parvovirus B19 in keinem bislang bekannten Kausalzusammenhang stehen. Zwischen den infizierten und nicht infizierten Feten lagen im Bezug auf die beobachteten Symptome keine signifikanten Unterschiede vor (siehe Tabelle 9). Dies ist zu erwarten, da eines der Selektionskriterien der auffällige Doppler-/Ultraschallbefund war. Die Studie erfasste nur Fälle mit virologisch gesicherter B19V Infektion der Mutter in der Schwangerschaft und auffälligen Doppler-/Ultraschallbefunden - abgesehen von Fall Nr. 17. Geht man von einer vertikalen Transmissionsrate für Parvovirus B19 von ca. 30-50 % aus, wird ersichtlich, dass die Studienpopulation in diesem Sinne stark selektiert wurde (d.h. asymptomatisch infizierte Feten und nicht-infizierte Feten sind unterrepräsentiert) und keinen typischen Querschnitt von Parvovirus B19-Infektionen in der Schwangerschaft darstellt (51).

### **6.3.2 Einfluss von Untersuchungs- und Infektionszeitpunkten**

Untersuchungs- und Infektionszeitpunkt haben eine besondere Bedeutung, weil die Entwicklung von Plazenta, fetalem Immunsystem und fetaler Erythropoiese maßgeblich das Risiko des Feten beeinflussen.

Wie bereits erwähnt ist die Bestimmung des Infektionszeitpunktes für B19V schwierig und häufig nicht exakt durchführbar. Erst durch die Kombination verschiedener Verfahren – wie oben ausgeführt – sind verlässliche Aussagen zu machen.

Vergleicht man die verschiedenen Gruppen in Bezug auf den Infektionszeitpunkt, so sieht man, dass sich die Gruppe der nicht infizierten Feten von der Gruppe der infizierten Feten signifikant unterscheidet<sup>13</sup>. Geht man immer vom angenommenen spätesten möglichen Infektionszeitpunkt aus, so ergibt sich für die Gruppe der nicht infizierten Feten ein medianer Infektionszeitpunkt in der 8. Schwangerschaftswoche, wohingegen in der Gruppe der infizierten Feten der mediane Infektionszeitpunkt in der 16. Schwangerschaftswoche liegt (arithmetisches Mittel 10. respektive 17. Schwangerschaftswoche). Diese Ergebnisse decken sich gut mit dem Teil der Literatur, welcher davon ausgeht, dass die vertikale Transmissionsrate für Parvovirus B19 in positiver Korrelation mit dem Gestationsalter steht (51;99). Die beiden zitierten Arbeiten widersprechen der Arbeit von Jordan et al., in welcher das Risiko einer vertikalen Transmission theoretisch mit dem Vorliegen von Blutgruppen-P-

---

<sup>13</sup> P=0,001 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

Antigen auf dem Synzytiotrophoblasten in Zusammenhang gebracht wurde, welches im Verlauf der Schwangerschaft in geringerem Maße exprimiert wird und als Rezeptor für die Bindung von Parvovirus B19 an die Zielzelle fungiert (55).

Mütterlicher Infektionszeitpunkt und Zeitpunkt der Pränataldiagnostik in der Gruppe der nicht infizierten Feten liegen signifikant weiter voneinander entfernt als in der Gruppe der infizierten Feten<sup>14</sup> (Median beider Gruppen 9 respektive 6 Wochen). Entsprechend stand diesen Feten ein längerer Zeitraum zum Erwerb von maternalem IgG zur Verfügung. Hier liegt somit ein weiterer Erklärungsansatz dafür, dass die nicht infizierten Feten tendenziell eher B19V-IgG besitzen als die infizierten Feten.

Die Gruppen B und C unterscheiden sich im Vergleich der angenommenen spätesten möglichen Infektionszeitpunkte der Mütter signifikant<sup>15</sup> (Median Gruppe B 24. SSW, Median Gruppe C 15. SSW), sie unterscheiden sich jedoch nicht signifikant bezogen auf die Zeitspanne zwischen dem angenommenen spätesten möglichen Infektionszeitpunkt der Mutter und dem Zeitpunkt der invasiven Diagnostik<sup>16</sup> (Mediane Zeitspanne beider Gruppen 6 Wochen). Daraus kann geschlossen werden, dass die Zeit, die für den Transport von Parvovirus B19-spezifischem Immunglobulin über die Plazenta hinweg zur Verfügung steht in dieser Gruppe nicht den entscheidenden Faktor für den Nachweis von IgG beim Feten darstellt.

Vergleicht man die Gruppen B und C noch weiter, so stellt man fest, dass 40% (4/10) der Feten in Gruppe B nicht nur IgG, sondern auch IgM (welches nicht plazentagängig ist) zeigten, wohingegen in der Gruppe C 24 von 31 Feten (77%) nicht nur B19V IgG sondern auch B19V IgM negativ waren. Dieser Unterschied ist aufgrund der geringen Fallzahlen in beiden Gruppen nicht signifikant, jedoch spricht die Beobachtung dafür, dass in Gruppe B die im Fetalblut nachgewiesenen B19V IgG Antikörper häufiger Ausdruck einer fetalen Immunantwort sind. Für diese Vermutung spricht des Weiteren, dass die in Gruppe B befindlichen Feten signifikant später in der Schwangerschaft infiziert wurden (siehe oben) als die Feten der Gruppe C und das fetale Immunsystem mit zunehmendem Gestationsalter besser in der Lage ist auf ein exogenes Antigen zu reagieren (65).

---

<sup>14</sup> P=0,000 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

<sup>15</sup> p=0,002 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

<sup>16</sup> p=0,21 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

### 6.3.3 Einfluss des Alters der Schwangeren

Das Alter der Schwangeren war keine primäre Zielgröße dieser Arbeit, jedoch zeigte sich bei einem durchgeführten statistischen Test ein signifikanter Altersunterschied zwischen den werdenden Müttern der infizierten Feten und den werdenden Müttern der nicht infizierten Feten<sup>17</sup>. Wie diese Ergebnisse einzuordnen sind, ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Der Frage des mütterlichen Alters als Risikofaktor für die vertikale Transmission von B19V ist bislang noch nicht nachgegangen worden. Die Gruppen B und C unterscheiden sich in dieser Frage nicht signifikant<sup>18</sup>.

### 6.3.4 Schwangerschaftsverlauf

Wie bereits im Resultate-Teil erwähnt, liegen nicht zu allen Fällen Informationen zum Schwangerschaftsausgang vor. Soweit die Daten vorhanden sind, zeigt es sich, dass es in der Gruppe der nicht infizierten Feten in 2 Fällen aufgrund der fetalen Symptome und der damit verbundenen schlechten Prognose eine Schwangerschaftsunterbrechung erfolgte. Eine Schwangerschaft endete mit einer Totgeburt. In den Gruppen B und C wurden insgesamt 4 Aborte beobachtet. Alle vier Fälle traten bei B19V IgG negativen Feten, also in Gruppe C, auf. Obwohl hier eine Tendenz abzulesen ist, waren insgesamt betrachtet B19V IgG negative Feten nicht signifikant häufiger von einem Abort betroffen als B19V IgG positive Feten<sup>19</sup>. Trotzdem muss man sich die Frage stellen, ob das initiale Fehlen B19V-spezifischer IgG Antikörper bei infizierten Feten einen wichtigen prognostischen Marker für den Ausgang der Schwangerschaft darstellt.

---

<sup>17</sup> p=0,03 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

<sup>18</sup> p=0,335 im exakten einseitigen Mann-Whitney-U-Test

<sup>19</sup> P=0,564 im exakten zweiseitigen Test nach Fisher

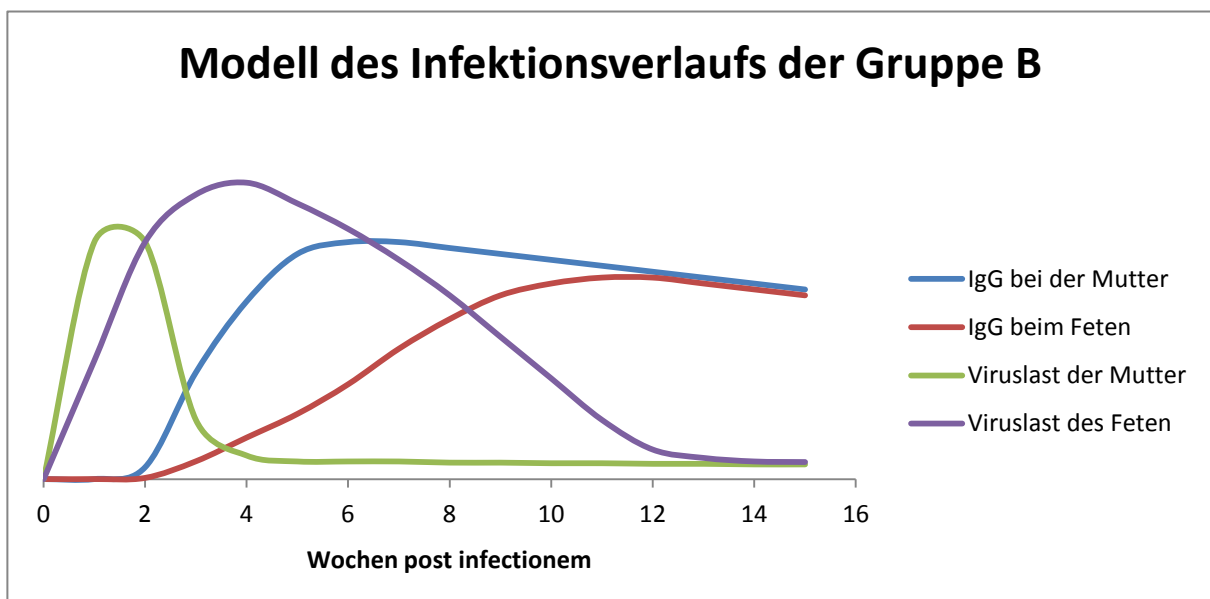
## 6.4 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt, dass eine fetale B19V-Infektion einen anderen Verlauf nimmt, als eine maternale Infektion. Zum Einen ist die Phase der Virämie/DNSämie im Vergleich zur maternalen Infektion deutlich verlängert, zum Anderen ist die fetale Immunantwort in vielen Fällen nicht stark ausgeprägt. Letzteres zeigt sich daran, dass Immunglobulin M nur bei einem Teil der Feten nachweisbar ist und bedingt wiederum, dass die DNSämie verlängert wird, da bei Erwachsenen in der Regel der Zeitpunkt des Auftretens von B19V-spezifischem IgM auch dem Ende der hoch virämischen Phase der B19V-Infektion entspricht..

Diese Arbeit zeigt, dass bei einem hohen Prozentsatz der symptomatisch Parvovirus B19-infizierten Feten zum Zeitpunkt des Auftretens von Komplikationen kein Immunglobulin G frei im Blut nachweisbar ist und dass der fehlende Nachweis von IgG nicht durch die Sequestrierung von IgG in Immunkomplexen bedingt ist. Dies wirft ein neues Licht auf die fetale Infektion mit Parvovirus B19. Hierbei sind grundsätzlich zwei Fallkonstellationen zu unterscheiden:

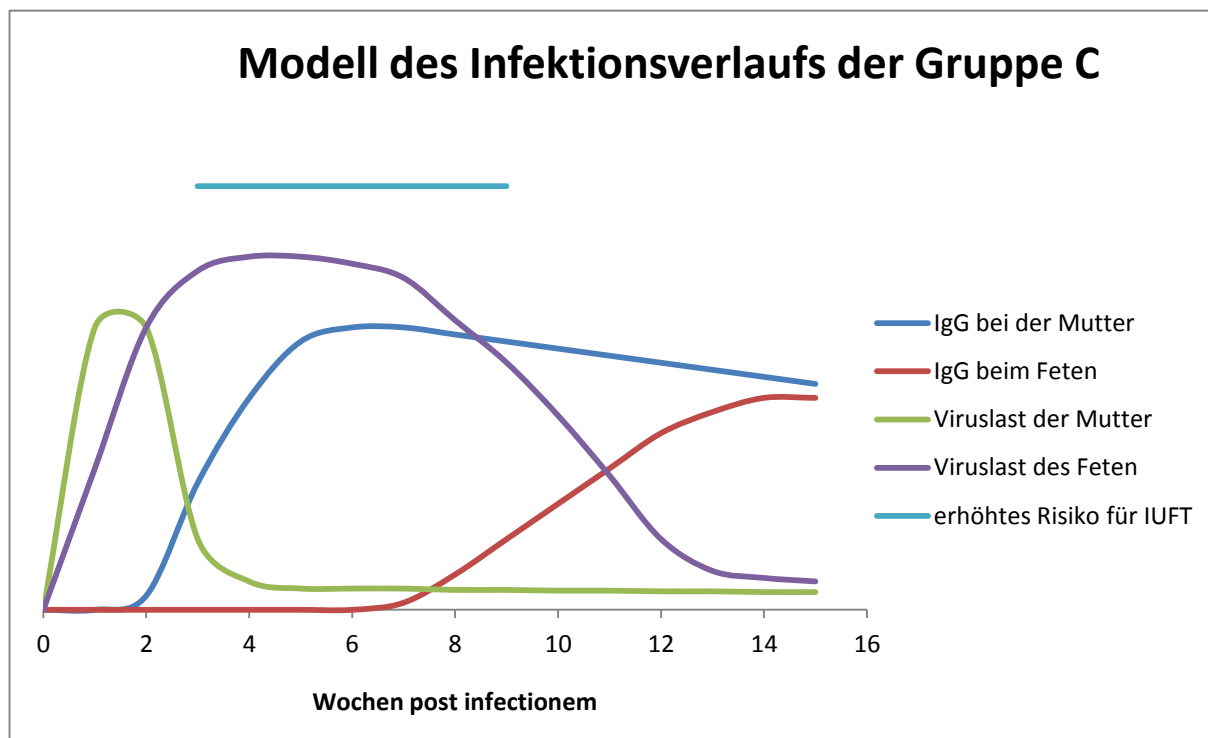
- a) Feten, die zum Zeitpunkt einer fetalen Anämie oder eines Hydrops fetalis Immunglobulin G in ihrem Blut nachweisbar aufweisen (Gruppe B). Das folgende Schaubild stellt den Verlauf der Erkrankung bei diesen Feten dar, wie er sich durch die Daten dieser Studie darstellt:

**Abbildung 9: Modell des Infektionsverlaufs bei der Gruppe B**



- b) Feten, in deren Blut sich zum Zeitpunkt einer fetalen Anämie oder eines Hydrops fetalis kein Immunglobulin G nachweisen lässt (Gruppe C). Das folgende Schaubild stellt den Verlauf der Erkrankung bei diesen Feten dar, wie er sich durch die Daten dieser Arbeit darstellt:

Abbildung 10: Modell des Infektionsverlaufs der Gruppe C



Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass die Wahrscheinlichkeit eines positiven Tests für Immunglobulin G beim Feten positiv mit der Schwangerschaftsdauer korreliert ist und dass der Nachweis von IgG beim Feten unabhängig von den bei den Schwangeren gemessenen IgG-Konzentrationen ist. So ist das Risiko des Feten dafür, kein B19V-spezifisches IgG zu besitzen, dann erhöht, wenn er vor der 21. Schwangerschaftswoche mit B19V infiziert wird – unabhängig davon ob bei der Mutter IgG in großen Mengen nachweisbar ist oder nicht. Dieser Zeitraum entspricht dem von Enders et al. identifizierten besonders kritischen Zeitraum für fetale Komplikationen (53).

Der Mangel an IgG bei vielen Feten ist folglich wahrscheinlich durch eine mangelnde Transportkapazität der Plazenta für B19V-spezifisches IgG im Falle einer fetalen Infektion mit B19V bedingt. Zusätzlich zu der bekannten geringen IgG-Transportkapazität der Plazenta kann diskutiert werden, dass eine fetale Infektion durch B19V zu einer Reduktion des Gesamt-IgGs beim Feten führt, bedingt durch eine zusätzliche placentare Insuffizienz für den

IgG-Transport bei Einbeziehung der Plazenta in den hydropischen Prozess. Dies würde bedeuten, dass bei den Feten, bei denen kein B19V-spezifisches IgG nachgewiesen werden konnte, auch IgG gegen andere Erreger reduziert wären. Dies wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht.

Ob das Fehlen von IgG beim Feten die Prognose für die Schwangerschaft negativ beeinflusst, sollte ein Gegenstand zukünftiger Forschung sein um eine risikoadaptierte, bestmögliche Therapie durchführen zu können. Hierzu wird es notwendig sein, bei einem größeren Patientenkollektiv IgG im Blut B19V-infizierter Feten mit schwerer fetaler Anämie oder Hydrops fetalis zu bestimmen und prospektiv zu untersuchen, ob diejenigen Feten ohne nachweisbares IgG eine schlechtere Prognose haben. Hierbei werden jedoch Daten einer wichtigen Kontrollgruppe (B19V infizierte Feten ohne Anämie oder Hydrops fetalis) nicht zur Verfügung stehen, da in der Regel bei asymptomatischem Verlauf eine Chordozentese nicht indiziert ist.

Die Daten dieser Arbeit zum transplazentaren Transport von IgG zeigen, dass keine Verbesserung der Prognose für die Schwangerschaft durch die Gabe von IgG an die Mutter zu erwarten ist, da die Immunglobuline den Feten nicht in ausreichendem Maße erreichen. In das mütterliche Blut gegebene Immunglobulinpräparate erhöhen auf der mütterlichen Seite der Plazenta die Konzentration von Immunglobulin G, jedoch scheint der Transport von Immunglobulin G zum Feten nicht primär von der Konzentration von IgG auf der mütterlichen Seite der Plazenta abzuhängen, denn es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die IgG-Konzentration im mütterlichen Blut kein Prädiktor für Immunglobulin G im fetalen Blut ist.

Im Rahmen von klinischen Studien sollte nach sorgfältiger Risikoabwägung überprüft werden, ob Immunglobuline, die dem Feten direkt zugeführt werden, die Prognose der Feten ohne B19V IgG-Antikörper in der ersten Probe günstig beeinflussen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die Immunglobuline wie Erythrozytenkonzentrate intravenös in die Nabelschnur gegeben werden sollten, oder ob zur Vermeidung einer Volumenbelastung des fetalen Kreislaufs die von Matsuda et al. (74) beschriebene Injektion der Immunglobulinpräparate in die Peritonealhöhle des Feten vorzuziehen ist. Beachtet werden muss hierbei, dass kommerziell verfügbare Immunglobulinpräparate meist keine definierte Menge Anti-B19V-Antikörper enthalten, so dass es sinnvoll erscheint, Immunglobulinpräparate vor der Applikation auf diese Eigenschaft zu untersuchen um zum

Einen den Feten nicht ein sicher unwirksames Präparat zu geben und um zum Anderen auch sicher nachvollziehen zu können, wie die Ergebnisse zu interpretieren sind.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabelle 33: Ablauf der PCR

Programm	Programmablauf	Primäre Zieltemperatur	Inkubationszeit	Temperatur-änderungsrate (°C / sec)	Sekundäre Zieltemperatur	Schrittgröße
	UNG-Wirkzeit	Raumtemperatur	5 min	0	-	-
	Taq-Polymerase-Aktivierung	94 °C	10 min	20	-	-
<b>V9-Touchdown-PCR (10 Zyklen)</b>	Denaturierung	95 °C	5 sec	20	-	-
	Primer-Hybridisierung	65 °C	20 sec	20	55 °C	1 °C
	Elongation	72 °C	15 sec	20	-	-
<b>V9-PCR (40 Zyklen)</b>	Denaturierung	95 °C	0 sec	20	-	-
	Primer-Hybridisierung	55 °C	20 sec	20	-	-
	Elongation	72 °C	20 sec	20	-	-
<b>Schmelzkurve</b>		95 °C	1 sec	20	-	-
		55 °C	30 sec	20	-	-
		45 °C	30 sec	20	-	-
		40 °C	2 sec	20	-	-
	Messung	85 °C	0 sec	0,25	-	-
<b>Ende</b>	Abkühlen	40 °C	20 sec	20	-	-



## 7.2 Abkürzungsverzeichnis:

---

<b>Ag</b>	Antigen
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
	Cut off value (Grenzwert)
<b>EIA</b>	Enzyme Immunoassay
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>Ery</b>	Absolute Erythrozytenzahl
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
<b>IC</b>	Immune Complexes = Immunkomplexe
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgM</b>	Immunglobulin M
<b>IU</b>	International Units (Internationale Einheiten)
<b>IUFT</b>	intrauteriner Fruchttod
<b>IUT</b>	intrauterine Transfusion
<b>NaOH</b>	Natronlauge
<b>nd</b>	Test nicht durchgeführt
<b>NS1</b>	Parvovirus B19 Nichtstrukturprotein 1
<b>NWG</b>	Ergebnis im Bereich der Nachweisgrenze
<b>OD</b>	Optical Density bzw. Optische Dichte,
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction bzw. Polymerase Kettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>Pool</b>	gepooltes Serum mit im entsprechenden Abschnitt definierten Eigenschaften
<b>pp</b>	post partum
<b>B19V</b>	Parvovirus B19
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>Tris-Puffer</b>	Tris(hydroxymethyl-aminomethan)-Puffer
<b>V.a.</b>	Verdacht auf
<b>Vmax</b>	Flussgeschwindigkeit in der Arteria Cerebri Media des Feten (Dopplerbefund)

---

<b>VP1</b>	Parvovirus B19 Virusprotein 1 (Kapsidprotein)
<b>VP2</b>	Parvovirus B19 Virusprotein 2 (Hauptkapsidprotein)
<b>zwm</b>	zu wenig Material zur Durchführung des Tests vorhanden

## 8 Danksagungen

Für exzellente Betreuung auch außerhalb normaler Bürozeiten, die Grundidee dieser Arbeit, Vorarbeiten, Finanzierung und Korrekturen, Herr **Dr. M. Enders**, Stuttgart. Sie haben es verstanden, immer wieder die richtigen Fragen zu stellen um die Arbeit ein gutes Stück weiterzubringen! Vielen Dank!

Frau **Prof. Dr. B. Gärtner**, Homburg ebenfalls für die Betreuung der Arbeit, hilfreiche Tipps zur Umsetzung und sehr zeitnahe Korrekturhinweise vielen Dank!

Frau **Prof. Dr. G. Enders**, Stuttgart: Vielen Dank, dass ich in ihrem Labor ihre Angestellten von der Arbeit abhalten durfte, weil sie endlose Fragen zu Methoden und Parvovirus B19 beantworten mussten.

Frau **A. Weidner**, Stuttgart: Vielen Dank für die Betreuung bei den Versuchen, die Datenbankanalysen, Hilfe bei der Erstellung des Literaturverzeichnisses und der Publikation!

Frau **C. Baisch**, Stuttgart: Vielen Dank für Erklärungen, Einführung ins Labor, Testbetreuung und die Schaffung eines netten Arbeitsumfelds!

Herr **Dr. G. Schalasta**, Stuttgart: Danke, dass ich die Molekularbiologie unsicher machen durfte!

Frau **A. Arents**, Stuttgart: Danke, dass Sie mich in der Molekularbiologie so gut betreut haben und alle meine Nachfragen geduldig ertragen haben!

Frau **B. Weber** und Herr **U. Bartelt**, Stuttgart: Die mich immer wieder ertragen mussten, wenn ich mal wieder irgendeine Frage hatte: Danke!

**Biotrin International**, Dublin, Irland, für die zur Verfügung gestellten Antigen-Testkits und die VP2-Lösung.

**Meinen Eltern**, die mir das Studium und damit diese Dissertation erst ermöglicht haben, gebührt der meiste Dank! Danke für Ermutigung, Interesse, Kost & Logis, Finanzierung – diese Liste kann beliebig fortgeführt werden!

## 9 Publikationen

**Poster:** präsentiert auf dem „International Congress of Parvoviruses“ Helsinki, Juni 2010

*„Detection of human parvovirus B19-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies in fetal and maternal blood at the time of B19-derived fetal anemia or hydrops“*

Rainer Bald, Karl-Philipp Gloning, Sabine Minderer, Johannes Weiffenbach, Barbara C. Gärtner, Andrea Weidner, Astrid Becker and Martin Enders

**Publikation:** angenommen zur Veröffentlichung im “Journal of Infectious Diseases”

*„Serological and biological analysis of maternal and fetal blood samples in prenatal human parvovirus B19 infection“*

Johannes Weiffenbach,<sup>1,2</sup> Rainer Bald,<sup>3</sup> Karl-Philipp Gloning,<sup>4</sup> Sabine Minderer,<sup>4</sup> Barbara C. Gärtner,<sup>2</sup> Andrea Weidner,<sup>1</sup> Monika Hanke<sup>3</sup> and Martin Enders<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Prof. G. Enders and Partners & Institute of Virology, Infectious Diseases and Epidemiology e.V., 70193 Stuttgart; Germany

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Hygiene, Saarland University, 66421 Homburg/Saar; Germany

<sup>3</sup>Prenatal Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics, Klinikum Leverkusen, 51375 Leverkusen; Germany

<sup>4</sup>Prenatal-Medicine Munich, 80639 Munich, Germany

## 10 Literaturverzeichnis:

1. Eis-Hübinger AM. Parvoviren. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P, editors. *Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. 2 ed. Thieme; 2009. p. 821-30.
2. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975;1(7898):72-3.
3. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol.Rev* 2002;15(3):485-505.
4. Cotmore SF, Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science* 1984;226(4679):1161-5.
5. Cotmore SF, Tattersall P. Structure and organization of the viral genome. In: Kerr J, Cotmore SF, Bloom M, Linden R, Parrish C, editors. *Parvoviruses*. Edward Arnold; 2006. p. 73-95.
6. Modrow S. Parvoviren. In: Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U, editors. *Molekulare Virologie*. 3 ed. Spektrum Akademischer Verlag; 2010. p. 635-58.
7. Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, Kantola K, Hedman L, Bonden H et al. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J Virol* 2007;81(13):6927-35.
8. Mori J, Beattie P, Melton DW, Cohen BJ, Clewley JP. Structure and mapping of the DNA of human parvovirus B19. *J Gen Virol* 1987;68 ( Pt 11):2797-806.
9. Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol* 1987;61(8):2627-30.
10. Luo W, Astell CR. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology* 1993;195(2):448-55.
11. St Amand J, Beard C, Humphries K, Astell CR. Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. *Virology* 1991;183(1):133-42.
12. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med* 2004;350(6):586-97.
13. Lindton B, Tolfvenstam T, Norbeck O, Markling L, Ringden O, Westgren M et al. Recombinant parvovirus B19 empty capsids inhibit fetal hematopoietic colony formation in vitro. *Fetal Diagn Ther* 2001;16(1):26-31.

14. Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* 1998;72(4):3018-28.
15. Ozawa K, Ayub J, Kajigaya S, Shimada T, Young N. The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J Virol* 1988;62(8):2884-9.
16. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM et al. Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 1985;152(2):257-65.
17. Erdman DD. Human Parvovirus B19: Laboratory Diagnosis. In: Anderson LJ, Young NS, editors. *Human Parvovirus B19*. Basel: Karger; 1997. p. 93-104.
18. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993;262(5130):114-7.
19. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Koder T, Ishii T et al. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 2005;106(10):3449-56.
20. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 2003;102(12):3927-33.
21. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P et al. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med* 1994;330(17):1192-6.
22. Takahashi T, Ozawa K, Takahashi K, Asano S, Takaku F. Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood* 1990;75(3):603-10.
23. Chen AY, Guan W, Lou S, Liu Z, Kleiboeker S, Qiu J. Role of Erythropoietin Receptor Signaling in Parvovirus B19 Replication in Human Erythroid Progenitor Cells. *J Virol* 2010.
24. Cohen B.J., Kumar S. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *Fetal and Maternal Medicine Review* 2005;16(2):123-50.
25. Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J Intern.Med* 2006;260(4):285-304.
26. Chisaka H, Morita E, Murata K, Ishii N, Yaegashi N, Okamura K et al. A transgenic mouse model for non-immune hydrops fetalis induced by the NS1 gene of human parvovirus B19. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 2):273-81.
27. Chisaka H, Morita E, Yaegashi N, Sugamura K. Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia. *Rev Med Virol* 2003;13(6):347-59.

28. Morita E, Nakashima A, Asao H, Sato H, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol* 2003;77(5):2915-21.
29. Franssila R, Auramo J, Modrow S, Mobs M, Oker-Blom C, Kapyla P et al. T helper cell-mediated interferon-gamma expression after human parvovirus B19 infection: persisting VP2-specific and transient VP1u-specific activity. *Clin Exp.Immunol* 2005;142(1):53-61.
30. Isa A, Kasprowicz V, Norbeck O, Loughry A, Jeffery K, Broliden K et al. Prolonged activation of virus-specific CD8+T cells after acute B19 infection. *PLoS.Med* 2005;2(12):e343.
31. von Poblitzki A, Gerdes C, Reischl U, Wolf H, Modrow S. Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J Virol* 1996;70(10):7327-30.
32. Kurtzman GJ, Cohen BJ, Field AM, Oseas R, Blaese RM, Young NS. Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J Clin Invest* 1989;84(4):1114-23.
33. Bluth MH, Norowitz KB, Chice S, Shah VN, Nowakowski M, Josephson AS et al. Detection of IgE anti-parvovirus B19 and increased CD23+ B cells in parvovirus B19 infection: relation to Th2 cytokines. *Clin Immunol* 2003;108(2):152-8.
34. Erdman DD, Usher MJ, Tsou C, Caul EO, Gary GW, Kajigaya S et al. Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J Med Virol* 1991;35(2):110-5.
35. Pfrepper KI, Enders M, Motz M. Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *J Vet.Med B Infect Dis Vet.Public Health* 2005;52(7-8):362-5.
36. Ros C, Gerber M, Kempf C. Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J Virol* 2006;80(24):12017-24.
37. Doyle S, Corcoran A. The immune response to parvovirus B19 exposure in previously seronegative and seropositive individuals. *J Infect Dis* 2006;194(2):154-8.
38. Söderlund-Venermo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol.Biol.(Paris)* 2002;50(5):307-16.
39. Shneerson JM, Mortimer PP, Vandervelde EM. Febrile illness due to a parvovirus. *Br.Med J* 1980;280(6231):1580.
40. Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CLR et al. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* 1983;i:1378.
41. Cossart Y. Parvovirus B19 finds a disease. *Lancet* 1981;2(8253):988-9.

42. Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE et al. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* 1981;2(8247):595-7.
43. Anderson MJ, Davis LR, Hodgson J, Jones SE, Murtaza L, Pattison JR et al. Occurrence of infection with a parvovirus-like agent in children with sickle cell anaemia during a two-year period. *J Clin Pathol.* 1982;35(7):744-9.
44. Frickhofen N, Abkowitz JL, Safford M, Berry JM, Antunez-de-Mayolo J, Astrow A et al. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann.Intern.Med* 1990;113(12):926-33.
45. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G et al. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006;114(15):1581-90.
46. Douvoyiannis M, Litman N, Goldman DL. Neurologic manifestations associated with parvovirus B19 infection. *Clin Infect Dis* 2009;48(12):1713-23.
47. Cope AP, Jones A, Brozovic M, Shafi MS, Maini RN. Possible induction of systemic lupus erythematosus by human parvovirus. *Ann.Rheum.Dis* 1992;51(6):803-4.
48. Kasuga A, Harada R, Saruta T. Insulin-dependent diabetes mellitus associated with parvovirus B19 infection. *Ann.Intern.Med* 1996;125(8):700-1.
49. Schwarz TF, Bruns R, Schroder C, Wiersbitzky S, Roggendorf M. Human parvovirus B19 infection associated with vascular purpura and vasculitis. *Infection* 1989;17(3):170-1.
50. Yoto Y, Kudoh T, Haseyama K, Suzuki N, Chiba S. Human parvovirus B19 infection associated with acute hepatitis. *Lancet* 1996;347(9005):868-9.
51. Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease. Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. *BMJ* 1990;300(6733):1166-70.
52. Enders M, Weidner A, Zoellner I, Searle K, Enders G. Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat Diagn* 2004;24(7):513-8.
53. Enders M, Klingel K, Weidner A, Baisch C, Kandolf R, Schalasta G et al. Risk of fetal hydrops and non-hydropic late intrauterine fetal death after gestational parvovirus B19 infection. *J Clin Virol* 2010;49(3):163-8.
54. Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Watanabe T, Uehara S, Okamura K et al. The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis. *J Infect* 1998;37(1):28-35.
55. Jordan JA, DeLoia JA. Globoside expression within the human placenta. *Placenta* 1999;20(1):103-8.



56. Tolfvenstam T, Oxenius A, Price DA, Shacklett BL, Spiegel HM, Hedman K et al. Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19. *J Virol* 2001;75(1):540-3.
57. Brown T, Anand A, Ritchie LD, Clewley JP, Reid TM. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet* 1984;2(8410):1033-4.
58. de Haan TR, Oepkes D, Beersma MFC, Walther FJ. Aetiology, diagnosis and treatment of Hydrops foetalis. *Current pediatric reviews* 2005;1(1):63-72.
59. Beigi RH, Wiesenfeld HC, Landers DV, Simhan HN. High rate of severe fetal outcomes associated with maternal parvovirus b19 infection in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008;2008:524601.
60. Simms RA, Liebling RE, Patel RR, Denbow ML, Abdel-Fattah SA, Soothill PW et al. Management and outcome of pregnancies with parvovirus B19 infection over seven years in a tertiary fetal medicine unit. *Fetal Diagn Ther* 2009;25(4):373-8.
61. Wright C, Hinchliffe SA, Taylor C. Fetal pathology in intrauterine death due to parvovirus B19 infection. *Br.J Obstet Gynaecol.* 1996;103(2):133-6.
62. Enders M, Weidner A, Enders G. Current epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection during pregnancy and childhood in the western part of Germany. *Epidemiol Infect* 2007;135(4):563-9.
63. Rohrer, C., Gartner, B., Sauerbrei, A., Bohm, S., Hottentrager, B., Raab, U., Thierfelder, W., Wutzler, P., and Modrow, S. Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol Infect* 136(11), 1564-1575. 2008.
64. Blumel J, Schmidt I, Effenberger W, Seitz H, Willkommen H, Brackmann HH et al. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion* 2002;42(11):1473-81.
65. Dieck D, Schild RL, Hansmann M, Eis-Hubinger AM. Prenatal diagnosis of congenital parvovirus B19 infection: value of serological and PCR techniques in maternal and fetal serum. *Prenat Diagn* 1999;19(12):1119-23.
66. Cosmi E, Mari G, Delle CL, Detti L, Akiyama M, Murphy J et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia resulting from parvovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(5):1290-3.
67. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, Jr. et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000;342(1):9-14.
68. Mari G. Middle cerebral artery peak systolic velocity for the diagnosis of fetal anemia: the untold story. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25(4):323-30.

69. Carrington D, Gilmore DH, Whittle MJ, Aitken D, Gibson AA, Patrick WJ et al. Maternal serum alpha-fetoprotein--a marker of fetal aplastic crisis during intrauterine human parvovirus infection. *Lancet* 1987;1(8530):433-5.
70. Young NS. Parvovirus infection and its treatment. *Clin Exp.Immunol* 1996;104 Suppl 1:26-30.
71. Fairley CK, Smoleniec JS, Caul OE, Miller E. Observational study of effect of intrauterine transfusions on outcome of fetal hydrops after parvovirus B19 infection. *Lancet* 1995;346(8986):1335-7.
72. Schild RL, Bald R, Plath H, Eis-Hubinger AM, Enders G, Hansmann M. Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13(3):161-6.
73. Selbing A, Josefsson A, Dahle LO, Lindgren R. Parvovirus B19 infection during pregnancy treated with high-dose intravenous gammaglobulin. *Lancet* 1995;345(8950):660-1.
74. Matsuda H, Sakaguchi K, Shibasaki T, Takahashi H, Kawakami Y, Furuya K. Intrauterine therapy for parvovirus B19 infected symptomatic fetus using B19 IgG-rich high titer gammaglobulin. *J Perinat Med* 2005;33(6):561-3.
75. Rugolotto S, Padovani EM, Sanna A, Chiaffoni GP, Marradi PL, Borgna-Pignatti C. Intrauterine anemia due to parvovirus B19: successful treatment with intravenous immunoglobulins. *Haematologica* 1999;84(7):668-9.
76. Ballou WR, Reed JL, Noble W, Young NS, Koenig S. Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J Infect Dis* 2003;187(4):675-8.
77. Kane SV, Acquah LA. Placental transport of immunoglobulins: a clinical review for gastroenterologists who prescribe therapeutic monoclonal antibodies to women during conception and pregnancy. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(1):228-33.
78. Simister NE, Story CM. Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod.Immunol* 1997;37(1):1-23.
79. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21(24):3365-9.
80. Silver R, PMA, DWB. *The Immunology of Pregnancy.* Creasy & Resnik`s Maternal-Fetal Medicine. 5th Edition ed. Saunders 5th Edition; 2003. p. 89.
81. Corcoran A, Kerr S, Elliott G, Koppelman M, Doyle S. Improved detection of acute parvovirus B19 infection by immunoglobulin M EIA in combination with a novel antigen EIA. *Vox Sang.* 2007;93(3):216-22.
82. Pokriefka RA, Manzor O, Markowitz NP, Saravolatz LD, Kvale P, Donovan RM. Increased detection of human immunodeficiency virus antigenemia after dissociation of immune complexes at low pH. *J Clin Microbiol.* 1993;31(6):1656-8.

83. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4154-9.
84. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol* 2001;64(3):312-9.
85. Brunner M, Sigal LH. Use of serum immune complexes in a new test that accurately confirms early Lyme disease and active infection with *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3213-21.
86. Kestens L, Hoofd G, Gigase PL, Deleys R, van der GG. HIV antigen detection in circulating immune complexes. *J Virol Methods* 1991;31(1):67-76.
87. Searle K, Guilliard C, Enders G. Parvovirus B19 diagnosis in pregnant women--quantification of IgG antibody levels (IU/ml) with reference to the international parvovirus B19 standard serum. *Infection* 1997;25(1):32-4.
88. Schalasta G, Schmid M, Lachmund T, Enders G. LightCycler consensus PCR for rapid and differential detection of human erythrovirus B19 and V9 isolates. *J Med Virol* 2004;73(1):54-9.
89. Schalasta G. Identifizierung von Mikroorganismen. In: Neumeister B, Braun R, Kimmig P, editors. *Mikrobiologische Diagnostik.* 2. ed. Stuttgart: Thieme Verlag; 2009.
90. Nydegger UE, Lambert PH, Gerber H, Miescher PA. Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. Quantitation by binding to radiolabeled C1q. *J Clin Invest* 1974;54(2):297-309.
91. Dornblüth O. *Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch.* 261ed. 2007.
92. Enders M, Schalasta G, Baisch C, Weidner A, Pukkila L, Kaikkonen L et al. Human parvovirus B19 infection during pregnancy--value of modern molecular and serological diagnostics. *J Clin Virol* 2006;35(4):400-6.
93. Lindblom A, Isa A, Norbeck O, Wolf S, Johansson B, Broliden K et al. Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection. *Clin Infect Dis* 2005;41(8):1201-3.
94. Musiani M, Zerbini M, Gentilomi G, Plazzi M, Gallinella G, Venturoli S. Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J Infect Dis* 1995;172(5):1360-3.
95. Enders M, Helbig S, Hunjet A, Pfister H, Reichhuber C, Motz M. Comparative evaluation of two commercial enzyme immunoassays for serodiagnosis of human parvovirus B19 infection. *J Virol Methods* 2007;146(1-2):409-13.
96. Farber CM, Cambiaso CL, Masson PL. Immune complexes in cord serum: influence of sex, gestational age, and Rh- blood group--possible predictive value of high levels for early postnatal infections. *Clin Exp. Immunol* 1981;44(2):426-32.

97. Yonemasu K, Kitajima H, Tanabe S, Ochi T, Shinkai H. Effect of age on C1q and C3 levels in human serum and their presence in colostrum. *Immunology* 1978;35(3):523-30.
98. Nash JT, Taylor PR, Botto M, Norsworthy PJ, Davies KA, Walport MJ. Immune complex processing in C1q-deficient mice. *Clin Exp.Immunol* 2001;123(2):196-202.
99. Miller E, Fairley CK, Cohen BJ, Seng C. Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br.J Obstet Gynaecol.* 1998;105(2):174-8.