

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Timm

**Untersuchungen zur Antikörperkinetik bei Patienten mit
schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefan Christian Michel
2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Ortwin Adams

Zweitgutachterin: Univ.- Prof. Dr. med. Antje Schuster

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Serum and mucosal antibodies fail as prognostic markers during critical Influenza A infection;

Sebastian Grund, Stefan Michel, Carmen Barthuber, Ortwin Adams;

Journal of Clinical Virology, Januar 2016, Band 74: 32-36

Abkürzungen

PCR	Polymerase-Chain-Reaktion
rRT-PCR	realtime Reverse Transkriptase PCR
IFT	Antigen-Immunfluoreszenztest
EIA	Enzymimmunoassay
MDCK	Madin Darby canine kidney
HAH	Hämagglutinationshemmtest
KBR	Komplementbindungsreaktion
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
CRP	C-reaktives Protein
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
WHO	World Health Organization
HA	Hämagglutinin
NA	Neuraminidase
RNA	Ribonucleic Acid
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
APACHE	Acute Physiology and Cronic Health Evaluation
r-ELISA	rekombinanter-ELISA
f-ELISA	fetuin-ELISA
NSTEMI	non-ST-segment elevation myocardial infarction
COPD	chronic obstructive pulmonal deseas
HIV	Human Immunodeficiency Virus
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
FKS	fetales Kälberserum

HAU	Hämagglutinin Units
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
TMB	Tetramethylbenzidin
AU	Arbiträre Units
MN	Mikroneutralisationstest
ROC	Receiver Operating Characteristic

1. Einleitung	1
1.1 Erkrankung	1
1.2 Diagnostik.....	2
1.2.1 Der Direktnachweis des Virus.....	2
1.2.2 Serologische Diagnostik	3
1.3 Therapie	4
1.4 Komplikationen	5
1.5 Prävention durch Immunisierung	6
1.6 Influenza-Epidemien und Influenza-Pandemien	6
1.7 Aufbau und Pathogenität des Influenzavirus	8
1.8 Prognostische Faktoren bei schweren Influenzavirus-Infektionen	9
1.9 Influenzaspezifische Antikörper als mögliche Prognosefaktoren	10
1.10 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation.....	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Patienten und Blutproben	12
2.2 Virus und Zellen.....	15
2.3 Methoden.....	15
2.3.1 Fetuin- ELISA (f-ELISA) zur Detektion von Antikörpern gegen natives Hämagglutinin.....	15
2.3.2 Rekombinanter ELISA (r-ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen rekombinantes Hämagglutinin	17
2.3.3 Hämagglutinationshemmtest (HAH) zur Detektion von Antikörpern gegen das Influenzavirus A/H1N1	19
2.3 Statistische Analyse	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Deskriptive Analyse der Antikörperkinetik im Hämagglutinationshemmtest (HAH)	20
3.2. Serumantikörper gegen das Influenza A/H1N1 Virus im Hämagglutinations- Hemmtest als Prognosemarker für einen letalen Ausgang der Influenza A/H1N1- Infektion	23
3.3 Deskriptive Analyse der Antikörperkinetik im fetuin-ELISA (f-ELISA) und rekombinanten-ELISA (r-ELISA) im Vergleich zum HAH.....	25
3.3 Korrelation von HAH, f-ELISA und r-ELISA	29
4. Diskussion.....	31
5. Zusammenfassung:.....	37
6. Quellenverzeichnis.....	38

1. Einleitung

1.1 Erkrankung

Die in der deutschen Sprache als "echte Grippe" bezeichnete Erkrankung ist eine durch Influenzaviren ausgelöste hoch kontagiöse Atemwegserkrankung. Sie wird durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen und tritt jährlich weltweit auf beiden Erdhemisphären mit Zeitversetzung auf. Auf der Nordhalbkugel der Erde findet sie in den Monaten von November bis April und auf der Südhalbkugel von Mai bis Oktober ihren saisonalen Höhepunkt. In Deutschland erkranken jährlich einige tausend Menschen an der Influenzagrippe. Die Letalität liegt im Schnitt bei etwa 0,1 %. Die Erkrankung ist bei direktem Nachweis von Influenzaviren gemäß IfSG §7 (Infektions-Schutzgesetz) namentlich meldepflichtig (1).

Die Inkubationszeit einer durch Influenzaviren verursachten Grippe beträgt ein bis fünf Tage. Das Virus dringt hierbei in die Epithelien des Atmungstraktes ein und vermehrt sich dort. Etwa zwei bis drei Tage nach der Infektion erreicht die Erkrankung ihren Höhepunkt. Charakteristisch für die Erkrankung ist das plötzliche Auftreten von Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, hohem Fieber (bis 41°C) sowie einer Rhinitis, einer Laryngo-Tracheo-Bronchitis mit trockenem Husten oder einer Pharyngitis (2). Häufig verbunden mit Übelkeit, Erbrechen und Appetitlosigkeit, besteht bei den Betroffenen ein ausgeprägtes Krankheitsgefühl. In aller Regel halten Rhinitis, Husten und ein allgemeines Schwächegefühl etwa sieben bis 14 Tage an, wobei das Fieber meist nur zwei bis drei Tage besteht. Damit hat eine durch Influenzaviren verursachte Grippe im Vergleich zu einem grippalen Infekt eine deutlich verlängerte Rekonvaleszenzzeit. Menschen ab dem 65. Lebensjahr, sowie Menschen mit schwerwiegenden Grunderkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Erkrankungen der Atemungswege, Stoffwechselerkrankungen oder Immundefekten, sind von schweren Krankheitsverläufen besonders häufig betroffen. Hierbei zeichnen sich schwere Verläufe meist durch eine primäre Influenzapneumonie oder durch eine kombinierte bakterielle Pneumonie aus (1). Aufgrund der ständigen Mutation des Virus kommt es zu einer kontinuierlichen Veränderung der Virusantigene. Deshalb bietet eine einmal durchgemachte Erkrankung keinen dauerhaften Schutz vor einer erneuten Influenza-

infektion. Auch der zur Verfügung stehende Influenzaimpfstoff muss jährlich an die saisonale Influenzagrippe angepasst werden (3).

1.2 Diagnostik

1.2.1 Der Direktnachweis des Virus

Der Direktnachweis des Virus gelingt am einfachsten aus einem Nasen- oder Rachen-Abstrich. Auch Flüssigkeit aus einer Bronchoalveolären Lavage kann zum Virusnachweis eingesetzt werden. Die hierdurch gewonnenen Epithelzellen aus dem Respirationstrakt enthalten das Virus. Da die Virusausscheidung in den ersten vier Krankheitstagen am größten ist und bereits einen Tag nach Infektion, bei Beginn der Symptomatik, nachzuweisen ist, sollte das Material für den Direktnachweis des Virus so früh wie möglich entnommen werden. Die Proben sollten in einem Virustransportmedium, bestehend aus einer gepufferten, pH-neutralen Salzlösung mit stabilisierenden Einheiten unter ständiger Kühlung (4 bis 10 °C) in das Labor gebracht werden. Bei längerer Lagerung müssen die Proben bei -70 °C aufbewahrt werden.

Methodisch steht zum direkten Virusnachweis in Deutschland mittlerweile an vielen Standorten eine molekulare Diagnostik mittels Reverser-Transkriptase-PCR (rRT-PCR) zur Verfügung. Ihre Spezifität und Sensitivität sind hoch und neben dem Nachweis kann hier auch eine Typisierung des Virus erfolgen. Dieses Verfahren hat sich als Methode der Wahl etabliert. Ein Nachweis gelingt innerhalb von ein bis zwei Stunden.

Ein ebenso schneller Nachweis kann mittels Antigen-Immunofluoreszenztest (IFT) erfolgen, wobei hier Sensitivität und Spezifität geringer sind. Bei dieser Methode werden virale Antigene in mit dem Virus infizierten Zellen mittels eines mit Farbstoff gekoppelten Antigen-Antikörpers sichtbar gemacht.

Ein viraler Antigennachweis gelingt ebenfalls in Enzymimmunoassays (EIA), die zwar eine hohe Spezifität aufweisen, jedoch im Vergleich zu den oben genannten Verfahren in ihrer Durchführung etwas aufwendiger und zeitintensiver sind. In diesem Verfahren werden Mikrotiterplatten mit monoklonalen Antikörpern beschichtet, an die

virusspezifische Antigene binden. Auch hier werden die Antigene mittels Enzymgekoppelten Antikörper sichtbar gemacht.

In der Praxis stehen heute sogenannte „Influenza-Schnelltests“ zur Verfügung. Das Verfahren ist vergleichbar mit IFT und EIA, wobei die Sensitivität hier lediglich ca. 70% betrifft.

Neben diesen Nachweismethoden spielt die Anzucht des Virus heute noch eine wichtige Rolle jenseits der Routinediagnostik. Hierüber können verschiedene Virusstämme differenziert werden und somit Aussagen bezüglich der in einer Influenzasaison vorkommenden Virusstämme getroffen werden. Dies ist nicht nur für epidemiologische Untersuchungen, sondern auch für Impfstoffzusammensetzungen von Bedeutung. Das Virus wird hierbei in MDCK-Zellen (*Madin Darby canine kidney cells*) angezüchtet. Der Virusnachweis und die Typisierung gelingen anschließend über den Hämagglutinationshemmtest (HAH) (1).

1.2.2 Serologische Diagnostik

Für die serologische Diagnostik kommen diagnostische Verfahren zum Einsatz, die spezifische Antikörper bestimmen. Es sind hierbei mindestens zwei Seren pro Patient notwendig. Dabei sollte eines aus der akuten Erkrankungsphase und ein weiteres Serum aus der Rekonvaleszenzphase stammen. Über einen Titeranstieg wird die Diagnose gesichert.

Der Hämagglutinationshemmtest (HAH) beruht auf dem Prinzip, dass die virusspezifischen Antikörper die Agglutination von Erythrozyten inhibieren. Er kann genutzt werden, um Antikörper bei akuten Erkrankungen zu messen. Somit können in einer akuten Pandemie Aussagen darüber getroffen werden, zu welchem Zeitpunkt die Bevölkerung bereits mit einem Virus in Kontakt getreten ist. Zudem können die Titer nach einer Influenzaimpfung über den HAH bestimmt werden. Ein Titer von 1:10 gilt dabei als Grenztiter. Ein Titer von $\geq 1:40$ gilt als schützend. Allerdings muss bei der Durchführung des HAH der Virusstamm bekannt sein. Ist der saisonale Virusstamm noch nicht bekannt, kann der HAH nicht durchgeführt werden. Der HAH hat eine hohe Sensitivität.

Eine deutlich geringere Sensitivität und Spezifität als der HAH bietet die Komplementbindungsreaktion (KBR). Hierbei werden virusspezifische IgM- und IgG-Antikörper nachgewiesen. Dazu werden mindestens zwei Patientenserum aus unterschiedlichen Phasen der Erkrankung (ein Serum aus der akuten Phase und ein weiteres Serum aus der Rekonvaleszenzphase, etwa 14 Tage später) untersucht und die dabei gemessenen Titer verglichen. Ein 4-facher Titeranstieg ist dabei beweisend für eine Influenzaerkrankung. Mit nur einem Serum kann der Nachweis nicht sicher erfolgen. Die KBR wird heutzutage nur noch in wenigen Laboren durchgeführt.

In der serologischen Diagnostik der Influenzagrippe stehen zudem ELISA-Methoden zur Verfügung. Hier erfolgt der Virusnachweis über spezifische Immunglobulin-Antikörper (1). Über ihre Durchführung und Bedeutung wird im weiteren Verlauf der Dissertation noch genauer eingegangen werden.

Bezüglich der weiteren laborchemischen Eigenschaften bei der Influenzagrippe lässt sich festhalten, dass es bei einem unkomplizierten Verlauf der Influenzagrippe zu keinem signifikanten Anstieg von Laborparametern im Routinelabor kommt. Eventuell kann der Serumeisenwert vermindert sein. Erst nach einer bakteriellen Superinfektion kommt es typischerweise zu einem Anstieg von C-reaktiven Protein (CRP) und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) sowie zu einer Leukozytose (2).

1.3 Therapie

Neben einer symptomatischen Therapie mit ausreichendem Flüssigkeitsersatz bei Fieber und medikamentöser Fiebersenkung kann eine Therapie mit Neuramidasehemmern eingeleitet werden. Durch die molekulare Blockade der Neuramidase wird hier das Ausschleusen des Virus aus seiner Wirtszelle blockiert. Eines der bekanntesten und klinisch am häufigsten eingesetzten Medikamente ist hierbei das Oseltamivir (Tamiflu®). In der Regel werden zwei Mal täglich 75 mg oral verabreicht. Die Behandlung sollte innerhalb von 48 Stunden nach Symptombeginn begonnen werden, da sie zu einem späteren Zeitpunkt ihre Wirksamkeit verliert. Die Dauer der Therapie beträgt bei unkomplizierten Fällen fünf Tage. Bei Patienten mit bestehender Niereninsuffizienz muss eine Dosisreduktion auf Grund von Nephrotoxizität des Präparates erfolgen. Zudem sollten die Nierenwerte (Kreatinin und Harnstoff) unter der Therapie in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden. Ein weiteres

bekanntes und häufig eingesetztes Medikament ist das Zanamivir (Relenza®). Hier werden zwei Mal täglich 10 mg als Pulver, ebenfalls über fünf Tage, verabreicht. Das Pulver wird aufgelöst und muss inhaliert werden. Auch hier sollte die Behandlung innerhalb von 48 Stunden nach Symptombeginn begonnen werden. Insgesamt sind Neuraminidasehemmer gut verträglich, weshalb sie im klinischen Alltag häufig zum Einsatz kommen. Sie können auch zur Chemoprophylaxe eingesetzt werden. Zudem sind sie sowohl bei Influenza-A- als auch bei Influenza-B-Viren wirksam (1, 2, 4).

Mit Amantadin und Rimantadin stehen für Influenza-A-Viren zwei weitere Medikamente aus der Gruppe der M2-Ionenkanal-Inhibitoren zur Verfügung. Sie bieten sowohl einen hohen prophylaktischen Schutz (von bis zu 90%) und können auch noch innerhalb der ersten 48 Stunden nach Krankheitsbeginn verabreicht werden. Allerdings kommt es nicht selten zu ausgeprägten Nebenwirkungen. Zudem wird zurzeit beobachtet, dass Influenza-A-Viren vor allem gegen Amantadin Resistenzen bilden bzw. eine primär intrinsische Resistenz aufweisen (1). Bei Verdacht auf bakterielle Superinfektionen mit beispielsweise Pneumokokken, meist gekennzeichnet durch einen zweiten Fieberanstieg im Verlauf der Erkrankung, sollte zusätzlich eine antibiotische Therapie, in der Regel mit Cephalosporinen der Gruppe 1 oder 2, eingeleitet werden (2).

1.4 Komplikationen

Komplikationen treten dann auf, wenn es zu bakteriellen Superinfektionen, meist verursacht durch Pneumokokken, *Hämophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*, kommt (1). Die Zellen des respiratorischen Traktes, welche durch ihre mukoziliäre Clearance eine physiologische Barriere für pathogene Keime darstellen, werden durch die Replikation des Virus beschädigt, was das Eindringen dieser pathogenen Bakterien erleichtert (4).

Im Rahmen einer schwer verlaufenden Influenzainfektion kann es zur bakteriellen Superinfektion der unteren Atemwege, aber auch zu der gefürchteten primären Influenzapneumonie kommen, die mit einer hohen Letalität einher geht (2, 4). Alte Menschen und Menschen mit chronischen und schwerwiegenden Grunderkrankungen sind von schweren Verläufen der Influenzagrippe mit letalem Verlauf deutlich häufiger betroffen, sodass hier nicht selten eine rechtzeitige intensivmedizinische

Betreuung des Patienten erforderlich wird. Seltener kommt es im Rahmen der Influenzainfektion zu Myokarditiden und Enzephalitiden (2).

1.5 Prävention durch Immunisierung

Als Präventionsmaßnahme steht zur Immunisierung gegen die Influenzagrippe flächendeckend ein Totimpfstoff zur Verfügung. Die Zusammensetzung der im Impfstoff enthaltenen Antigene muss jährlich den aktuellen Epidemiestämmen angepasst werden. Die Information über die saisonale Antigenkombination wird jährlich durch die „*World Health Organization*“ (WHO) an die Impfstoffhersteller übermittelt.

Impfen lassen sollten sich nach aktuellen Empfehlungen der WHO ältere Menschen jenseits des 60. Lebensjahres und Personen, die durch eine bestehende, chronische Grunderkrankung besonders gefährdet sind. Ebenfalls wird eine Impfung für immunsupprimierte Menschen und solchen mit beruflicher Exposition empfohlen (4). Die durch Impfung erreichte Schutzrate wird auf etwa 70 bis 90% bei Menschen unter 65 Jahren geschätzt. Bei älteren Personen liegt die Schutzrate niedriger.

Impfkomplikationen treten bei der Influenzaimpfung eher selten auf. Leichte grippeähnliche Symptome können kurz nach erfolgter Immunisierung entstehen. Für die ersten Tage nach der Impfung sollte, wie bei jeder Immunisierung, eine körperliche Schonung erfolgen. Bei Überempfindlichkeiten gegen Hühnereiweiß kann es zu allergischen Reaktionen im Rahmen einer Typ-I-Reaktion kommen. In diesem Fall darf nicht mehr geimpft werden oder es sollte ein Influenza-Impfstoff verwendet werden, der nicht aus der Anzucht in Hühnereiern stammt. In den vergangenen Jahren wurde, hauptsächlich in den USA, im Zusammenhang mit der Impfung gegen das pandemische Influenzavirus H1N1 2009 das gehäufte Auftreten des Guillain-Barré-Syndroms (Polyneuroradikulitis) nach Immunisierung beobachtet. Dieses Ereignis ist vor allem auf die Zusammensetzung und die Inhaltsstoffe der damals verwendeten Impfstoffe zurückzuführen (1).

1.6 Influenza-Epidemien und Influenza-Pandemien

Im Gegensatz zur Influenza-Epidemie, bei der etwa 10 – 20 % der Bevölkerung durch das Influenza-Virus infiziert ist, spricht man von einer Influenza-Pandemie,

wenn sich das Virus über den gesamten Globus hinweg verteilt. Saisonale Epidemien treten jährlich, Pandemien seltener auf.

Die erste große Influenza-Pandemie des 20. Jahrhunderts wurde durch den Subtyp A/H1N1 ausgelöst und ereignete sich im Jahr 1918/19. Sie wurde unter dem Namen „Spanische Grippe“ bekannt. Seinen Ausgangspunkt fand diese Influenzagrippe jedoch vermutlich im Frühjahr 1918 in den USA. Von hier aus breitete sich die Erkrankung innerhalb von 12 Monaten und in 3 Wellen über den gesamten Globus aus. Die Sterblichkeitsrate lag hier mit 3 % der Erkrankten deutlich über dem jährlichen Durchschnitt von 0,1 %. Die Zahl der Todesopfer wird auf etwa 50 Millionen geschätzt (1).

Im Jahr 1957 folgte die „Asiatische Grippe“, ausgelöst durch das A/H2N2-Virus mit etwa 1 Millionen Todesopfern. Ausgangspunkt dieser Pandemie war Süd-China. Von dort breitete sich das Virus über Nordamerika und Europa aus.

Im Jahr 1968/69 folgte die sogenannte „Hongkong-Grippe“, ausgelöst durch den Subtyp A/H3N2. Das Virus wurde erstmalig in Hongkong im Juli 1968 isoliert. Die Mortalität war bei diesem Virus vergleichsweise ähnlich gering wie in der „Asiatischen Grippe“(1).

Im Jahr 1977 folgte erneut eine durch den Virussubtyp A/H1N1 ausgelöste Influenzapandemie, die unter dem Namen „Russische Grippe“ bekannt wurde (1).

Im April 2009 verursachte eine neue Variante des Influenzavirus A/H1N1 die erste Influenzapandemie des 21. Jahrhunderts, die etwa 18.000 Todesopfer forderte. Die Sterblichkeit lag mit 0,3 % etwas über der Mortalität der saisonalen Influenza. Sie wurde unter dem Namen „Schweinegrippe“ bekannt, da die Ursache vermutlich in einem vom Schwein stammenden H1N1-Virus kam. Das Virus wurde erstmalig im Februar 2009 in Mexiko beobachtet und breitete sich binnen 9 Monate auf dem gesamten Globus aus. Obwohl dieses neue Virus zum gleichen Subtyp wie das saisonal vorkommende H1N1-Virus gehört, unterschieden sie sich jedoch in der Struktur ihres Hämagglutinins voneinander. Hierdurch konnte wie bei der Pandemie von 1977 nachgewiesen werden, dass eine neue Pandemie nicht notwendigerweise durch einen neuen Virussubtyp hervorgerufen werden muss (1).

1.7 Aufbau und Pathogenität des Influenzavirus

Das H1N1 Virus gehört zur Gruppe der Influenza-A-Viren. Diese besitzen im Vergleich zu den weiteren vorkommenden Influenzagruppen B und C die höchste Pathogenität.

Die Zugehörigkeit der Influenzaviren zur der Familie der Orthomyxoviren ist begründet durch den typischen Aufbau sowie die Struktur der Virusproteine.

Die Familie der Orthomyxoviren zeichnet sich durch sein segmentiertes Genom aus, wobei das Influenzavirus A 8 RNA-Moleküle besitzt. Dabei kodiert jedes der RNA-Moleküle für ein einzelnes virusspezifisches Protein. Anhand der Antigenität des Nucleoproteins erfolgt die Typisierung in Influenza-A-, B- und C-Viren. Umgeben ist das Virus von einer Lipidhülle, an dessen Außenseite die beiden Proteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) spikeförmig angeordnet sind (Abb.1), wobei diese beiden Proteine auf verschiedenen RNA-Molekülen kodiert sind. Daraus resultiert, dass diese bei Doppelinfektionen eines Wirtes mit verschiedenen Virustypen untereinander ausgetauscht werden können. Diesen Prozess bezeichnet man als *Reassortment*. Auf Grund der Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Hämagglutinin- und Neuraminidase-kodierenden RNA Molekülen bei Doppelinfektionen ergeben sich die verschiedenen Virussubtypen. Dabei ist zu beobachten, dass bei Influenza-A-Viren, wie dem H1N1 Virus, durch Reassortment besonders viele Varianten entstehen. Dieses Potential ist darauf zurück zu führen, dass bei diesem Virus neben dem Menschen auch Tiere und hierunter besonders Vögel als Wirt für das Virus dienen können, was das *Reassortment* begünstigt (4).

Als Antigen-*Shift* bezeichnet man die Neukombination von Hämagglutinin und Neuraminidase, welche durch *Reassortment* in ihrer Vielfalt begünstigt wird. Dieser Prozess wird für die alle 10-20 Jahre stattfindenden Grippepandemien, so auch für die im April 2009 neu aufgetretene Variante des Influenzavirus A/H1N1, verantwortlich gemacht.

Veränderungen in der Aminosäuresequenz der Hämagglutinin- und Neuraminidase-Antigene infolge von Replikationsfehlern führen zu Punktmutationen, also dem Austausch einzelner Aminosäuren im Hämagglutinin und/ oder in der Neuraminidase und

werden als *Antigen-Drift* bezeichnet. Dieser Prozess ist verantwortlich für kleinere Grippeepidemien, wie sie alle zwei bis drei Jahre in Wellen vorkommen (4).

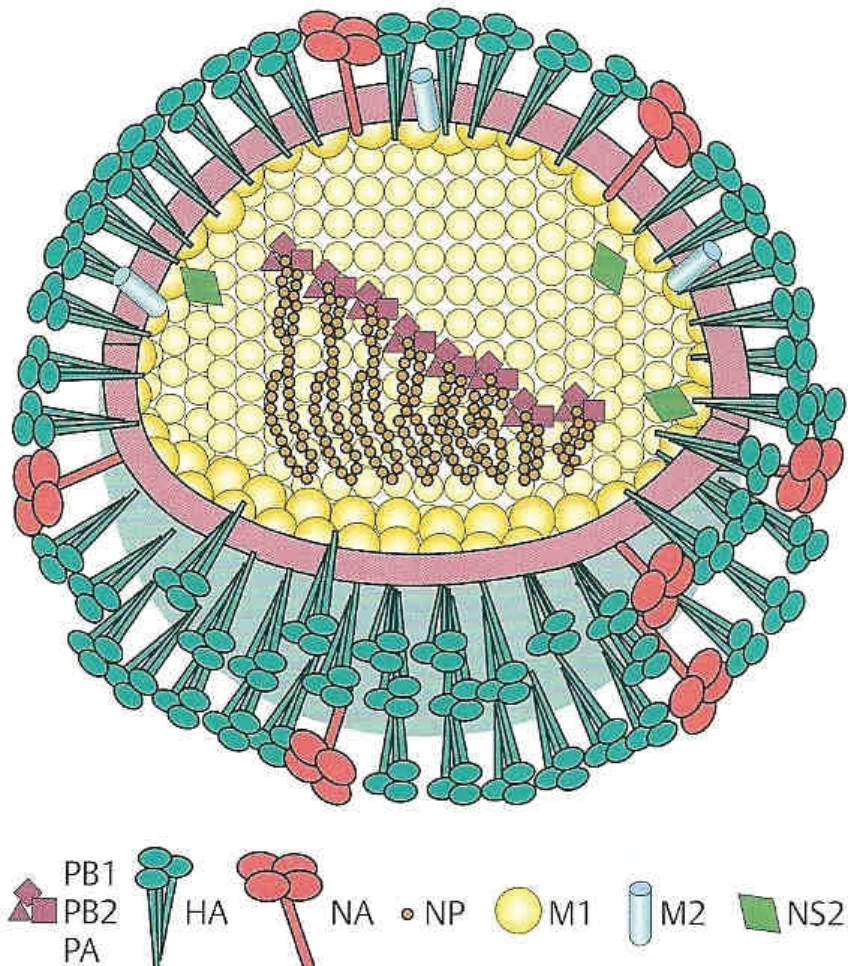


Abb.1: Darstellung des H1N1 Virus. An der Virushülle sind Hämagglutinin und Neuraminidas spikeförmig angeordnet. HA: Hämagglutinin, NA: Neuraminidase (übernommen aus (1))

1.8 Prognostische Faktoren bei schweren Influenzavirus-Infektionen

In der allgemeinen Bevölkerung gehen Influenzainfektionen mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität einher (5). Insbesondere Personen mit chronischen Grunderkrankungen gelten als Risikogruppe für schwer verlaufende Infektionen mit dem

Übergang in Pneumonien und in das so genannte „*acute respiratory distress syndrom*“ (ARDS), welches mit einer hohen Letalität einher geht (6-8).

Derzeit existiert noch kein prognostischer Marker, mit dem das individuelle Risiko, an der Influenzainfektion zu versterben, zu einem frühen Zeitpunkt nach Beginn der respiratorischen Symptomatik vorhergesagt werden kann. Gerade bei Patienten mit den oben genannten Risikofaktoren ließe sich aber mit Hilfe eines spezifischen Markers in einem frühen klinischen Stadium eine individuelle Therapie einleiten (z.B. Oseltamivir-Therapie), bzw. die medizinische Überwachung der Patienten intensivieren (9).

Im klinischen Alltag wird beispielsweise aktuell der „*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*“ (APACHE) II- bzw. III- Score zur Abschätzung des Krankheitsverlaufs verwendet. Dieser basiert auf klinischen und physiologischen Parametern des Patienten und ermittelt auf Grund dieser Werte die statistische Wahrscheinlichkeit, mit der der Patient die aktuelle Erkrankung überleben wird. Immunologische und virologische Daten werden hierbei nicht berücksichtigt. Es handelt sich somit um ein allgemeines intensivmedizinisches Prognosesystem, das den spezifischen Verlauf bei einer Influenzainfektion nicht berücksichtigt (9). Zudem kann ein letaler Infektionsverlauf mit diesen Scoring-Systemen erst dann vorhergesagt werden, wenn der Zustand des Patienten bereits als kritisch einzustufen ist. Beispielsweise wird der APACHE II Score zur Mortalitätsbeurteilung in den ersten 24 Stunden nach Aufnahme eines Patienten auf die Intensivstation verwendet (10).

1.9 Influenzaspezifische Antikörper als mögliche Prognosefaktoren

Ergebnisse einer kürzlich durchgeführten Studie von Guihot et al. an Patienten mit schweren Influenzainfektionen haben darauf hingedeutet, dass die Abwesenheit von Serumantikörpern gegen das Influenzavirus A/H1N1 am Tag 4 nach Beginn der respiratorischen Symptomatik, getestet mittels Hämagglutinationshemmtest (HAH), als Indikator für eine letal verlaufende Influenza-Erkrankung dienen könnten (11). Diese Hypothese beruht auf der Annahme, dass es bei schwer verlaufenden Influenzainfektionen zur Formation von Immunkomplexen in der Lunge kommt, wodurch die influenza-spezifischen Antikörper pulmonal gebunden und im Serum nicht mehr nachgewiesen werden können. In der Studie von Guihot et al. erfolgte die erste Serumun-

tersuchung allerdings erst im Mittel am Tag 9 nach Symptombeginn. Tatsächlich wurden hierbei die Antikörpertiter der ersten Tage nach Symptombeginn nicht experimentell bestimmt, sondern anhand späterer Messwerte durch Interpolation zurückgerechnet.

In Bezug auf die Influenzavirus-Antikörperkinetik liegt zudem eine Evidenzlücke vor, da eine virusspezifische Serologie methodisch anspruchsvoll ist. Dies beruht darauf, dass Influenzaviren aufgrund ihres kontinuierlichen Antigen-*Drifts* und den zu Pandemien führenden Antigen-*Shifts* einem fortlaufenden Wandel ihrer Oberflächen-Glykoproteine unterliegen, die von Antikörpern gebunden werden. Insbesondere die humorale Immunantwort nach Infektion mit dem Influenzavirus A/H1N1 (2009) wurde vergleichsweise wenig untersucht. Es ist nicht hinreichend geklärt, ab welchem Zeitpunkt nach dieser Infektion spezifische Antikörper im Serum nachweisbar sind, wie die Kinetik der Antikörperproduktion verläuft und mit welchem serologischen Verfahren die Antikörper am frühesten nachgewiesen werden können. Es ist bisher auch nicht abschließend geklärt, ob ELISA-Teste als leichter durchführbare alternative Methoden zu Goldstandardmethoden wie z.B. dem HAH zuverlässig eingesetzt werden können. Für das Management zukünftiger Influenzapandemien sind diese Fragestellungen wichtig, da bei der Planung von Impfprogrammen berücksichtigt werden muss, in welchem Ausmaß die Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt bereits mit dem neuen Virus in Kontakt gekommen ist (12).

1.10 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

Die vorliegende Dissertation verfolgte das Ziel, die humorale Immunantwort und ihre Kinetik bei Patienten mit schwer verlaufender Influenzavirus A/H1N1 (2009)-Infektion zu charakterisieren. Dabei sollte untersucht werden, ob das Fehlen von Serumantikörpern im Hämagglutinationshemmtest (HAH) am Tag vier nach Symptombeginn als Prognosemarker für einen letalen Verlauf der Influenzainfektion genutzt werden kann. Zudem sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt nach Infektion eine spezifische humorale Immunantwort nachweisbar ist. Hierbei sollte der HAH mit einem rekombinaten-ELISA (r-ELISA) und einem sogenannten fetuin-ELISA (f-ELISA) methodisch verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Blutproben

Im Universitätsklinikum Düsseldorf wurden in der Wintersaison 2010/11 12 schwer verlaufende Erkrankungsfälle mit dem Influenza A/H1N1 (2009) mittels PCR (rRT-PCR) durch das Institut für Virologie nachgewiesen und in der überwiegenden Zahl intensivmedizinisch betreut. Diese Patienten waren im Rahmen von chronischen Vorerkrankungen oder sonstigen Umständen (z.B. Schwangerschaft) prädisponiert für einen schweren Krankheitsverlauf.

Eine schwer verlaufende Influenzainfektion wurde hierbei durch das Auftreten einer schweren Dyspnoe definiert (Tabelle 1). Dabei litten die Patienten in der Regel entweder an einer Pneumonie oder an einem ARDS. Beide Erkrankungen stellen im klinischen Alltag gefürchtete Komplikationen der Influenzainfektion dar und sind somit als Indikator einer schwer verlaufenden Influenzainfektion zu sehen.

Bei den chronischen Vorerkrankungen (Tabelle 1) handelte es sich um eine akute myeloische Leukämie (Patient 1), um Zustand nach Nierentransplantation (Patienten 2 und 3), um ein Non-Hodgkin Lymphom (Patient 4), um eine Panzytopenie (Patient 5), um eine perinatale Asphyxie bei einem Neugeborenen (Patient 6), um einen Patienten mit Herzinfarkt (NSTEMI) und COPD (Patient 7), um eine HIV Infektion mit Schwangerschaft (Patient 8), um eine Hypertonie (Patient 9), um ein multiples Myelom (Patient 10), um eine Patientin in der Schwangerschaft (Patient 11) und um einen Patienten mit Primär biliärer Zirrhose (Patient 12). Diese Ausgangsfaktoren stellen insofern eine Prädisposition für einen schweren Infektionsverlauf der Influenzainfektion dar, als dass hier das Immunsystem entweder durch die Grunderkrankung des Patienten (z.B. Non-Hodgkin Lymphom, Multiples Myelom) oder durch eine iatrogene Immunsuppression (z.B. Nierentransplantation) geschwächt ist. Das Alter der Patienten ist mit einer Verteilung vom Neugeborenenalter bis zu 60 Jahren sehr heterogen. Das Patientenkollektiv besteht sowohl aus weiblichen als auch aus männlichen Patienten. Patient 1 erlag den Folgen der schweren Infektion. Alle anderen Patienten überlebten die Erkrankung (Tabelle 1).

Die bei diesen Patienten im Rahmen der klinischen Versorgung täglich entnommenen Serum- oder EDTA-Plasmaproben wurden bei -20°C gelagert. Die Proben-sammlung erfolgte im Vorfeld der vorliegenden Dissertation und stand daher zur Verfügung.

Die Proben wurden sofern möglich von Symptombeginn bis zur Rekonvaleszenz bzw. bis zum Tod des Patienten gesammelt. Bei den meisten Patienten war bereits am Tag des Syptombeginns ein erstes Serum generiert worden. Der Untersuchungszeitraum der Patienten während des klinischen Aufenthaltes am Universitätsklinikum Düsseldorf betrug zwischen 14 und 88 Tagen und lag im Durchschnitt bei 41 Tagen pro Patient.

Wenn der Beginn der Symptomatik nicht genau bekannt war, wurde der Tag der Hospitalisierung des Patienten als Tag 1 bzw. Tag des Symptombeginns angenommen. Wenn der Patient bereits außerhalb des Krankenhauses behandelt worden war, wurde der Tag des ersten positiven Influenza-PCR-Ergebnisses als Tag 1 gewertet. Diese sequentiellen Proben ermöglichen die Untersuchung der humoralen Immunantwort nach akuter Influenza H1N1-Infektion im zeitlichen Verlauf.

Die hier beschriebene Dissertation wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studennummer: 3670).

Patient Nr.	Baseline				Follow up		
	Alter	Geschlecht	Grunderkrankungen / Risikofaktoren	Pulmonale Erkrankung	Erstes Serum (Tag)	Anzahl der Tage	Outcome
1	42	F	Akute myeloische Leukämie	Pneumonie	6	14	verstorben
2	57	M	Nierentransplantiert	Pneumonie	1	88	lebt
3	58	M	Nierentransplantiert	Pneumonie	1	27	lebt
4	49	M	Non hodgkin Lymphom	Pneumonie	1	87	lebt
5	27	F	Panzytopenie	ARDS	1	22	lebt
6	0	F	Perinatale asphyxie	ARDS	4	31	lebt
7	53	M	NSTEMI, COPD	ARDS	9	30	lebt
8	22	F	HIV Infektion, Schwangerschaft	Pneumonie	1	41	lebt
9	60	F	Hypertonie	Dyspnoe	1	20	lebt
10	60	F	Multiples myelom	Pneumonie	1	74	lebt
11	40	F	Schwangerschaft	ARDS	5	41	lebt
12	59	F	Primäre biliäre Zirrhose	Pneumonie	2	30	lebt

Tabelle 1: Klinische Ausgangsdaten der Patienten Nr. 1-12 mit schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion

2.2 Virus und Zellen

Für die Durchführung des HAH, r-ELISAs und des f-ELISAs wurde der Referenzstamm des pandemischen Influenzavirus H1N1/California 7/2009 benutzt. Zu diesem Zweck wurde das Virus zunächst in MDCK Zellen (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgien) in *Dulbecco's Modified Essential Medium* (DMEM) angezüchtet, welches mit Penicillin, Streptomycin (jeweils in einer Konzentration von 500 U/ml) und 2% fetalem Kälberserum (FKS) versehen wurde. Dieser Prozess fand unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Temperatur von 34°C statt. Zur Bestimmung der Viruskonzentration im Zellkulturüberstand wurde standardmässig der HAH angewandt. Das Virus war bereits im Vorfeld der Untersuchungen in ausreichenden Mengen angezüchtet worden. Die Herstellung des Virusmaterials war somit nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

2.3 Methoden

Die für die wissenschaftliche Umsetzung dieser Dissertation erforderlichen Labormethoden (HAH, r-ELISA, f-ELISA) waren bereits vor Beginn der Untersuchungen im Institut für Virologie der Heinrich-Heine-Universität etabliert und sind in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für Influenzaviren am Robert-Koch-Institut in Berlin (Leiterin: Frau Dr. B. Schweiger) umfangreich validiert worden (13). In mehreren klinischen Studien sowohl an gesunden Probanden als auch an Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf (nierentransplantierte Patienten, Dialysepatienten und onkologisch erkrankte Kinder) konnte im Vorfeld schon umfangreich Erfahrung mit den hier verwendeten Labormethoden gesammelt werden (13-15). Die für die Durchführung der Methoden erforderlichen Materialien, sowie die Programme zur validen Auswertung der Methoden standen ebenfalls zur Verfügung.

2.3.1 Fetuin- ELISA (f-ELISA) zur Detektion von Antikörpern gegen natives Hämagglutinin

Um die IgG-Antikörper gegen das native Hämagglutinin (HA) untersuchen zu können, wurde die zuvor von Gulati et al. beschriebene ELISA Methode modifiziert (16).

Zunächst wurde die ELISA Platte (Immunoplate U96 Maxisorb, Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, Denmark, no. 449824) mit 0,02% Fetuin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, no. F3004) in Beschichtungspuffer (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , pH 9,6) beschichtet und anschließend über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Nach der Blockierung mit 20% FKS in PBS (phosphate buffered saline) und drei Waschschrritten mit PBS wurde das angezüchtete Virus California 7/2009 des Influenzavirus A/H1N1 (2009) in einer Konzentration von 4-8 HAU (Hämagglutinin *Units*) in die mit Fetuin beschichteten Wells pipettiert und für 16 bis 18 Stunden bei einer Temperatur von 4°C inkubiert (12).

Nach vier weiteren Waschschrritten der Platten mit PBS, einer Blockierung mit 20% FKS/PBS und drei weiteren Waschschrritten wurden die Seren in den Wells vierfach seriell verdünnt. Dabei wurde mit einer Konzentration von 1:80 begonnen. Anschließend erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Platten erneut mit PBS gewaschen. Daran anschließend wurde für einer Stunde ein an Peroxidase konjugiertes Anti-human IgG, welches aus dem Serum von Schafen gewonnen wurde (Sigma-Aldrich, no. A0293), hinzugegeben. Sowohl die Inkubation mit dem ersten Antikörper im Serum als auch die mit der Peroxidase konjugiertem Antikörper erfolgten in einer so genannten „feuchten Kammer“ (eine mit angefeuchtetem Zellstoff ausgelegte, verschlossene Inkubationsbox).

Nach erneutem Waschen wurde der ELISA mit dem Substrat 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) (BD Biosciences, San Jose, California, USA, no. 555214) für 20 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt und anschließend mit 0,5 M H_2SO_4 gestoppt.

Die Analyse erfolgte in einem ELISA-Reader (Sunrise Magellan Absorption Reader, Tecan, Crailsheim, Deutschland, REF 16039400) bei 450/620 nm. Die IgG-Antikörper wurden anhand einer Kalibrierungskurve, die jeweils auf der gleichen ELISA-Platte gemessen wurde, in AU (Arbiträre *Units*) quantifiziert. Die Kalibrationskurve wurde generiert, indem ein Pool aus Impfseren mit hohen Neutralisationstitem seriell verdünnt wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden eine negative, eine schwach-reaktive und eine hoch-reaktive Serumprobe bei jedem Lauf als Kontrollen mitgeführt. Eine Serokonversion im f-ELISA wurde definiert als vierfacher Titeranstieg gemessen in AU.

Eine schematische Darstellung des Prinzips des f-ELISA ist in Abb. 2 A dargestellt.

2.3.2 Rekombinanter ELISA (r-ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen rekombinantes Hämagglutinin

Zur Detektion der gegen das rekombinierte HA-Glykoprotein gerichteten Antikörperkonzentrationen wurde eine bereits beschriebene ELISA-Methode von Brokstad et al. 1995a und Stepanova et al., 2002 modifiziert (17, 18). Hierzu wurden ELISA-Platten (Immunoplate U96 Maxisorb, Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, Denmark, no. 449824) zunächst mit 0,25 µg/ml des vollständigen in Baculoviren exprimierten rekombinanten HA-Glykoprotein des pandemischen Virusstamm A/California 4/2009 (H1N1) oder des saisonalen Virusstamm A/Brisbane/59/2007 (H1N1) beschichtet (Protein Sciences Corp., Meriden, Connecticut, USA, no. 3006). Nach dem Beschichten der Platten erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Nach Blockierung der ELISA-Platten (5% FCS, 2% fetales Kälberserum in PBS) und drei Waschschritten (PBS, 0,5% Tween 20) wurde das Serum aufgetragen und vierfach-seriell austitriert. Dabei wurde mit einer Konzentration von 1:80 begonnen. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Platten erneut mit PBS gewaschen. Daran anschließend wurde für eine Stunde ein Peroxidase-konjugiertes Anti-human IgG (Sigma-Aldrich, no. A0293) hinzugegeben.

Sowohl die Inkubation mit dem ersten Antikörper im Serum als auch die mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper erfolgten in einer so genannten „feuchten Kammer“ (eine mit angefeuchtetem Zellstoff ausgelegte, verschlossene Inkubationsbox).

Nach einem letzten Waschschrift wurde der ELISA mit dem Substrat 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin (TMB) (BD Biosciences, San Jose, California, USA, no. 555214) für 20 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt und anschließend mit 0,5 M H₂SO₄ als Stopp-Lösung bearbeitet (Vgl. 13, 14). Die IgG-Antikörper wurden anhand einer Kalibrationskurve, die jeweils auf der gleichen ELISA-Platte gemessen wurde, in AU quantifiziert. Die Kalibrationskurve wurde generiert, indem ein Pool aus Impfsereen mit hohen Neutralisationstern seriell verdünnt wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden eine negative, eine schwach-reaktive und eine hoch-reaktive Serumprobe bei jedem Lauf als Kontrollen mitgeführt. Eine Serokon-

version im r-ELISA ist, analog zum f-ELISA, hier ebenfalls definiert als vierfacher Titeranstieg gemessen in AU.

Eine schematische Darstellung des Prinzips des f-ELISA ist in Abb. 2 B dargestellt.

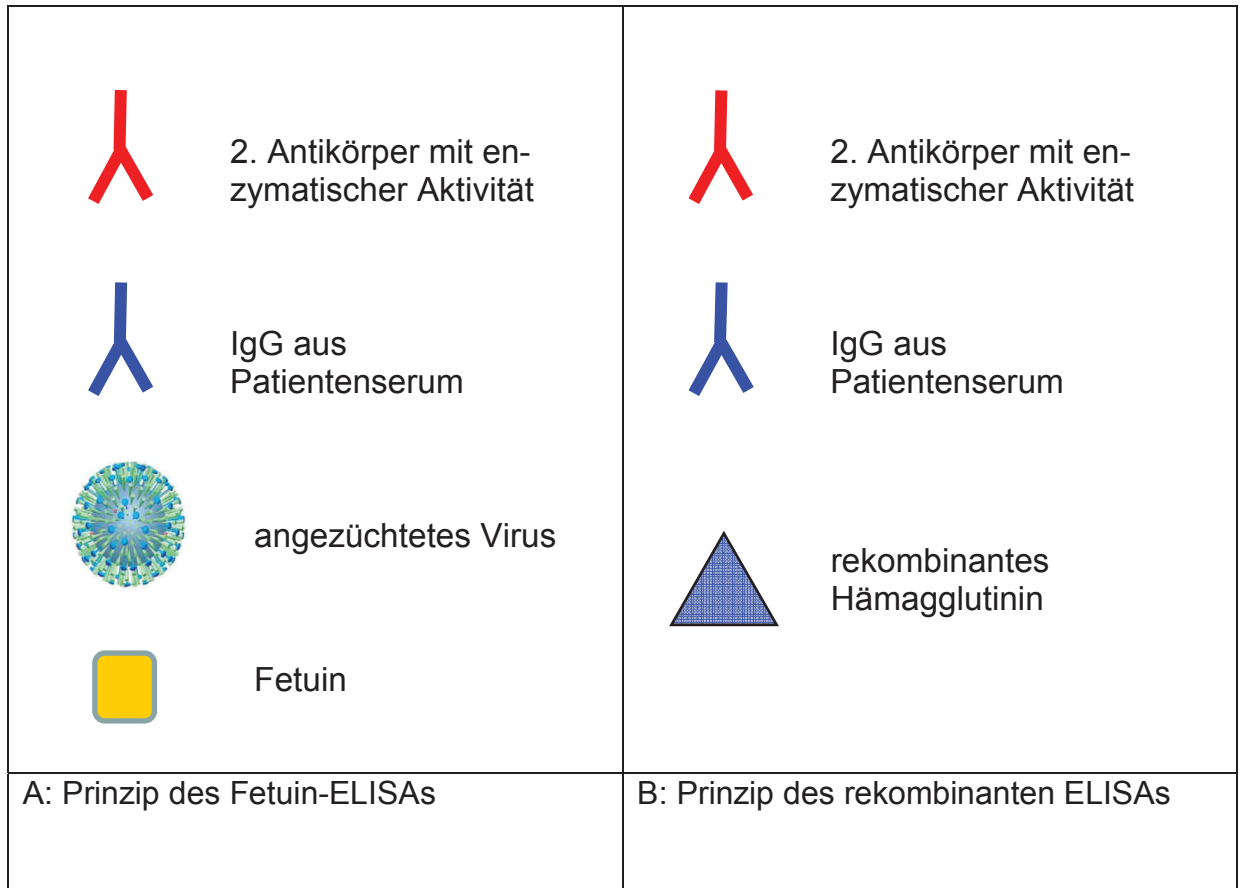


Abb. 2: Schematische Darstellung von Fetuin (f)-ELISA und rekombinatem (r)-ELISA. Die Zugabe der einzelnen Substanzen erfolgt in zeitlicher Reihenfolge von unten nach oben.

2.3.3 Hämagglutinationshemmtest (HAH) zur Detektion von Antikörpern gegen das Influenzavirus A/H1N1

Da die Durchführung des Hämagglutinationshemmtests nicht Teil der vorliegenden Dissertation war, sondern die Ergebnisse bzgl. der untersuchten Blutproben bereits vorlagen, wird hier lediglich auf die Literaturstellen verwiesen, die die Methodik beschreiben: (13, 19). Die Ergebnisse des HAH wurden aber mit den eigens erhobenen ELISA-Ergebnissen verglichen und statistisch ausgewertet.

Der niedrigste messbare HAH-Titer beträgt 1:10 (Grenztiter). Ab einem Antikörpertiter von $\geq 1:40$ ist von einem klinischen Schutz gegenüber dem spezifischen Influenzavirus-Stamm auszugehen (Seroprotektionsrate) (19, 20). Eine Serokonversion im HAH liegt dann vor, wenn ein Patient oder Impfling einen Titer von $\geq 1:40$ erreicht und hierbei einen mindestens vierfachen Titeranstieg im Vergleich zu einem Vorbefund aufweist (19).

2.3 Statistische Analyse

Die Korrelationsanalyse von f-ELISA, r-ELISA und HAH erfolgte mittels Pearson Produkt Moment Korrelation. Zusätzlich wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Für diese Statistiken und die grafischen Darstellungen (z.B. Verlaufskurven und Balkendiagramme) wurden das Computer-Programm SigmaPlot (Version 10.0) sowie Microsoft Excel 2010 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Deskriptive Analyse der Antikörperkinetik im Hämagglutinationshemmtest (HAH)

Der Hämagglutinationshemmtest (HAH) war bei 11 von 12 Patienten auswertbar (Tabelle 2). Patient 12 konnte aufgrund unspezifischer Hämagglutinationsreaktionen nicht im HAH untersucht werden. Eine Untersuchung gelingt jedoch in den ELISA Methoden (siehe Kapitel 3.3). Bei den 11 im HAH untersuchten Patienten wurde der Grenztiter von $\geq 1:10$ bei 5 von 11 Patienten (45%) innerhalb der ersten Woche erreicht (grau unterlegt in Tabelle 2; Abb. 3 und 4). In der zweiten und dritten Woche wurden bei 7 von 11 (64%) und ab der vierten Woche bei 8 von 11 Patienten (72%) ein HAH-Titer von $\geq 1:10$ erreicht (Tabelle 2; Abb. 3 und 4). Im Mittel ließ sich bei diesen Patienten nach 8,75 Tagen ein Grenztiter von $\geq 1:10$ im HAH nachweisen. Bei den Patienten 1 und 9 konnten keine spezifischen Serumantikörper im HAH nachgewiesen werden. Bei dem Patienten 8 wurde am achten Tag nach Symptombeginn einmalig ein HAH-Titer von 1:10 ermittelt, der sich jedoch in den Folgeproben nicht bestätigte, und daher insgesamt als negativ bzw. unspezifisch bewertet wurde.

Abweichend vom HA-Grenztiter, der als der geringster messbarer Wert im HAH definiert ist, ist ab einem HA-Titer von $\geq 1:40$ von einem Schutz im Sinne eines Seroprotektionstiters gegen das Influenzavirus auszugehen. In der ersten Woche erreichten 2 von 11 Patienten (18%) diesen Schutztiter im HAH (Tabelle 2; Abb. 3 und 5). Innerhalb der zweiten Woche (Tag 8-14) hatten 6 von 11 Patienten (55%), innerhalb der dritten Woche 7 von 11 Patienten (64%) und nach vier Wochen (Tag > 22) hatten 8 von 10 Patienten (73%) diesen HA-Titer erreicht und galten somit immunologisch als geschützt. (Tabelle 2; Abb. 3 und 5) Diese Patienten erreichten den Seroprotektionstiter im Mittel nach 11,6 Tagen, und es ließ sich bei allen von ihnen eine Serokonversion -definiert als Titer $\geq 1:40$ und vierfachem Titeranstieg- nachweisen. Im Mittel erfolgte die Serokonversion hierbei ebenfalls nach 11,6 Tagen.

Die maximal erreichten HAH-Titer sind in Abb. 3 dargestellt. Dabei erreichte Patient 2 den höchsten Titer.

Patient Nr.	Erstes Serum von Tag	Anzahl der Tage	Grunderkrankungen / Risikofaktoren	Outcome	HA Grenz-Titer $\geq 1:10$ an Tag	HA Schutz-Titer $\geq 1:40$ an Tag
1	6	14	Akute myeloische Leukämie	verstorben	nein	nein
2	1	88	Nierentransplantation	lebt	23	24
3	1	27	Nierentransplantation	lebt	7	12
4	1	87	Non Hodgkin Lymphom	lebt	7	16
5	1	22	Panzytopenie	lebt	6	8
6	4	31	Perinatale Asphyxie	lebt	9	11
7	9	30	NSTEMI, COPD	lebt	12	14
8	1	41	HIV Infektion, Schwangerschaft	lebt	8*	nein
9	1	20	Hypertonie	lebt	nein	nein
10	1	74	Multipl. Myelom	lebt	1	3
11	5	41	Schwangerschaft	lebt	5	5
12	2	30	Primär biliäre Zirrhose	lebt	n.a.*	n.a.*

*HA Titer 1:10 an Tag 8, jedoch negativ in Seren der darauf folgenden Tage

*n.a.: nicht auswertbar, da unspezifische Hämagglutinationsreaktionen

Tabelle 2 Klinische Charakteristika der Patienten Nr. 1-12, untersuchte Serumproben und nachgewiesene HAH-Grenztiter bzw. - Schutzfiter

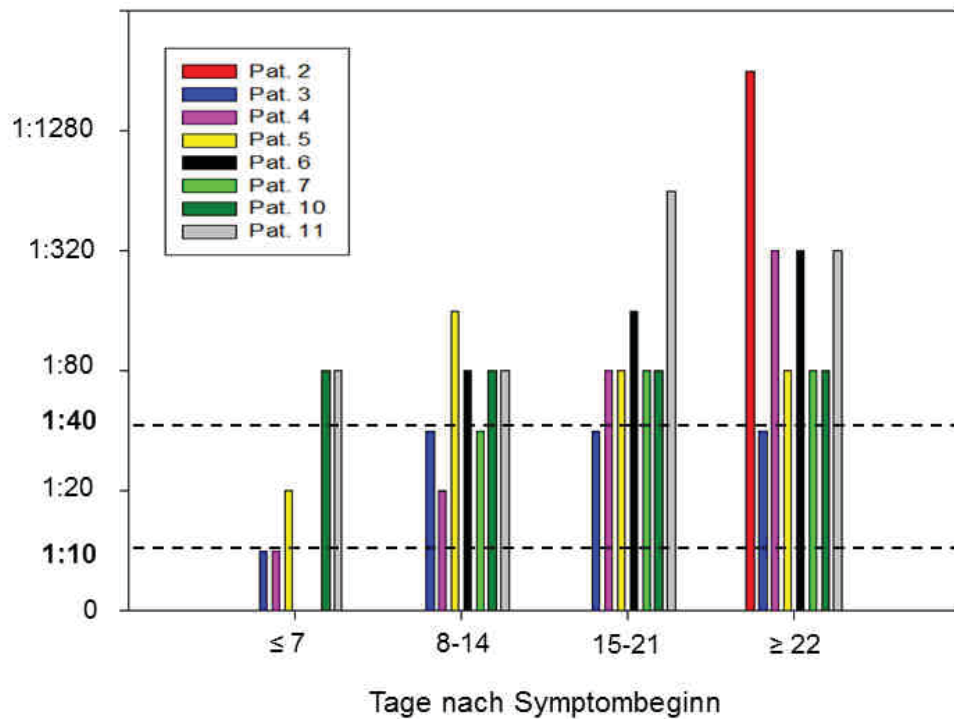


Abb. 3: Maximal erreichte Titer im Hämagglutinations-Hemmtest in den Wochen 1,2,3 und >3 nach Symptombeginn bei Patienten mit schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion. Die X-Achse stellt die Tage nach Symptombeginn wochenweise da. Auf der Y-Achse sind die HA-Titer aufgetragen. Die horizontalen gestrichelten Linien geben dabei den HA-Grenztiter ($\geq 1:10$) und den HA-Schutztiter ($\geq 1:40$) an.

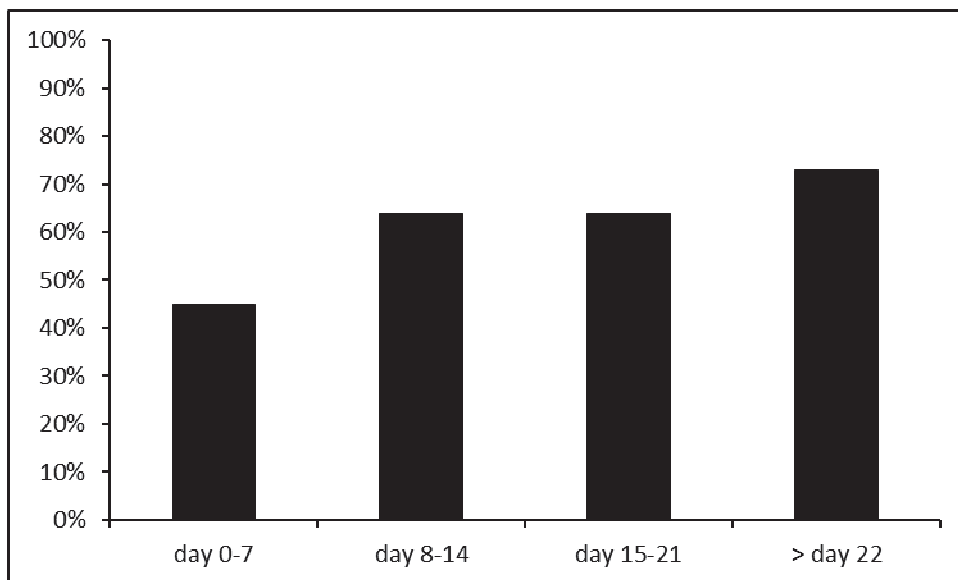


Abb. 4: Prozentualer Anteil der Patienten mit schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion, die den Grenztiter ($\geq 1:10$) im Hämagglutinations-Hemmtest erreichen in den Wochen 1,2,3 und >3 nach Symptombeginn.

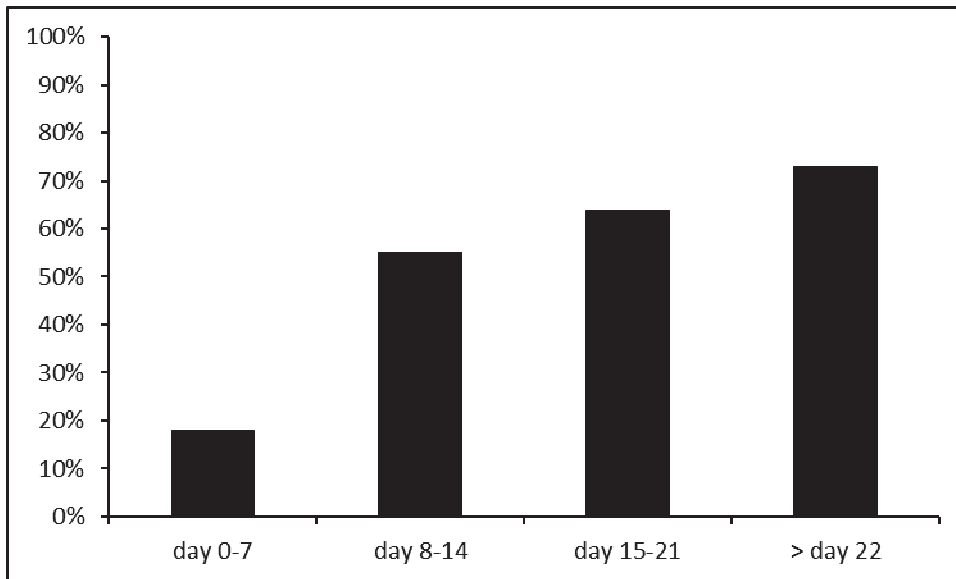


Abb. 5: Prozentualer Anteil der Patienten mit schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion, die einen seroprotektiven Titer von $\geq 1:40$ im Hämagglutinations-Hemmtest erreichen in den Wochen 1,2,3 und >3 nach Symptombeginn.

3.2. Serumantikörper gegen das Influenza A/H1N1 Virus im Hämagglutinations-Hemmtest als Prognosemarker für einen letalen Ausgang der Influenza A/H1N1-Infektion

In der aktuellen Studie verstarb Patient 1 an den Folgen seiner Influenzainfektion, und er entwickelte im Verlauf keine im HAH nachweisbaren HA-Titer gegen das Influenzavirus. Bei den Patienten 2 bis 7 nahm die Influenzainfektion keinen letalen Verlauf. Bei diesen Patienten waren jedoch bis zu Tag vier ebenfalls keine HA-Titer gegen das Influenzavirus im HAH nachweisbar (Tabelle 2, Abb. 6). Speziell bei Patient 2, bei dem der Krankheitsverlauf ebenfalls keinen letalen Ausgang nahm, ließen sich sogar bis einschließlich Tag 22 keine Serumantikörper gegen das Influenzavirus im HAH nachweisen (Abb. 6). Bei Patient 8 wurde am 8. Tag nach Symptombeginn ein Titer von $\geq 1:10$ gemessen, der jedoch in den Folgeproben nicht bestätigt wurde. Es ist daher am ehesten davon auszugehen, dass es sich hierbei um unspezifische Reaktionen im HAH handelte und sich kein HA-Titer messen ließ. Der Patient wurde im Folgenden daher auch als negativ (kein Titeranstieg) gewertet (Tabelle 2). Auch

bei diesem Patienten nahm die Influenzainfektion ebenfalls keinen letalen Verlauf. Bei Patient 9 waren über den gesamten Zeitraum des *Monitorings* (20 Tage) im HAH keine Serumantikörper nachweisbar. Trotzdem nahm auch hier die Influenzainfektion keinen letalen Verlauf (Tabelle 2). Patient 10 hatte bereits an Tag 1 nachweisbare Serumantikörper im HAH, allerdings litt diese Patientin bereits einige Tage an einem respiratorischen Infekt. Hier konnte der genaue Zeitpunkt des Symptombeginns nicht sicher angegeben werden und Tag 1 bezeichnet den Tag der stationären Aufnahme. Bei Patient 11 handelte es sich um eine immungesunde schwangere Frau. Sie wies bereits an Tag 5 einen protektiven Serumantikörpertiter im HAH auf. Bei ihm konnte allerdings mit beiden ELISA-Assays, die in dieser Dissertation durchgeführt wurden, eine Serokonversion am Tag 3 nach Symptombeginn nachgewiesen werden (Tabelle 3).

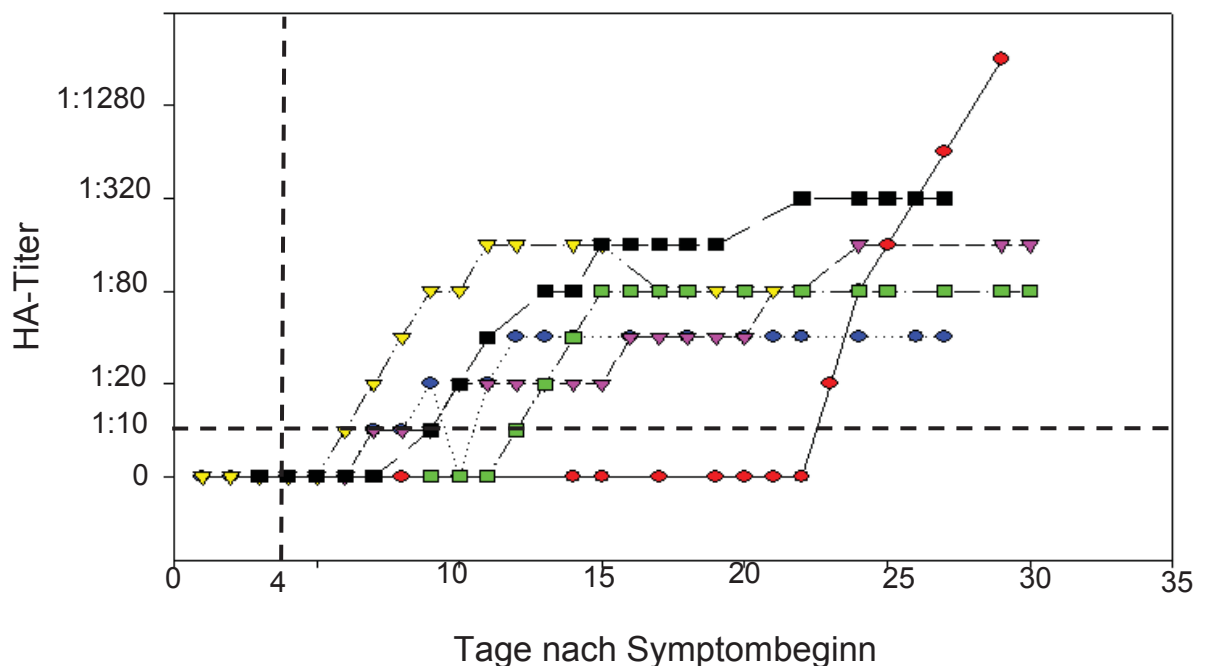


Abb. 6: Anti-Influenza A H1N1 Serum-Antikörpertiter (ermittelt im Hämagglutinationshemmtest) im zeitlichen Verlauf bei Patienten, die eine schwer verlaufende Influenzainfektion überlebt haben. Die horizontale Linie markiert die geringste messbare Antikörperkonzentration, die vertikale Linie markiert den Tag 4 nach Symptombeginn. Rote Punkte = Patient 2, blaue Punkte = Patient 3, pinke Dreiecke = Patient 4, gelbe Dreiecke = Patient 5, schwarze Quadrate = Patient 6, grüne Quadrate = Patient 7. Patientnummern entsprechend Tabelle 1 und 2.

3.3 Deskriptive Analyse der Antikörperkinetik im fetuin-ELISA (f-ELISA) und rekombinanten-ELISA (r-ELISA) im Vergleich zum HAH

Die sequentiell gesammelten Seren der 12 Patienten wurden im r-ELISA und im f-ELISA untersucht, und die Ergebnisse wurden mit den im HAH gemessenen Serumantikörpern verglichen (Tabelle 3). Bei beiden ELISA-Methoden wurden die Konzentrationen der Serumantikörper in AU dargestellt. Bei Patient 1 nahm die Influenzainfektion einen letalen Verlauf. Hier konnte weder im r- und f-ELISA, noch im HAH Serumantikörper nachgewiesen werden. Dieser Patient hatte zudem im Vergleich zu den anderen gemessenen Patienten erheblich niedrigere Spitzentiter in AU in beiden ELISA-Methoden (Tabelle 3). Patient 11 konnte bezüglich der Serokonversionsdauer nicht bewertet werden, da bei diesem Patienten die erste Serumprobe am Tag 5 nach Symptombeginn vorlag und zu diesem Zeitpunkt bereits ein HAH-Titer von 1:40 nachweisbar war. Im f-ELISA war bei den Patienten 2-10 und Patient 12 eine Serokonversion, definiert als mindestens vierfacher Titeranstieg, messbar (Tabelle 3). Im r-ELISA war bei den Patienten 2-8, 10 und 12 eine Serokonversion zu verzeichnen. Im HAH wurde zusätzlich zu Patient 1 bei 2 weiteren Patienten keine Serokonversion erreicht (Patienten Nr. 8 und 9, Tabelle 3). Bei Patient 9 konnte sowohl im HAH als auch im r-ELISA keine Serokonversion nachgewiesen werden (Tabelle 3). Somit war hier der f-ELISA die einzige Möglichkeit, eine Serokonversion bei diesem Patienten nachzuweisen (Tabelle 3). Bei Patient 8 war zwar im HAH keine Serokonversion messbar, jedoch konnte hier in beiden ELISA-Methoden eine Serokonversion ermittelt werden (Tabelle 3). Im f-ELISA und im r-ELISA erfolgte der Nachweis der Serokonversion im Median an Tag 6, wohingegen der Nachweis der Serokonversion im HAH im Median bei Tag 12 lag (Tabelle 3). Im Vergleich von r-ELISA und f-ELISA ist zudem festzustellen, dass der f-ELISA Serokonversionen tendenziell am frühesten zu erfassen vermag, wenn man nicht den Median, sondern den Mittelwert bis zum Eintritt der Serokonversion zugrunde legt (Tabelle 3).

Die Höhe der Antikörperlevel ist zwischen den drei verwendeten Methoden nur mit Einschränkungen miteinander vergleichbar (Kap 3.3 und Diskussion). Dennoch kann man bei dem von uns untersuchten Kollektiv folgende Ergebnisse festhalten (Tabelle 3 und Abb. 8, die die Messwerte der Patienten Nr. 4 beispielhaft darstellt):

Im HAH wurde der Spitzen-Messwert früher erreicht als im f-ELISA und r-ELISA. Im HAH wird bei den meisten Patienten nach ca. 2 Wochen (Mittelwert: 17,8 Tage, Median: 15 Tage) im Anschluss an den Spitzenwert ein Titerplateau erreicht. Sowohl im f-ELISA als auch im r-ELISA ist hingegen eine längere Anstiegsphase mit einem späteren Spitzenwert zu verzeichnen. Patient 4 erreichte seinen Spitzenwert im f-ELISA erst am Tag 83 und im r-ELISA am Tag 75, somit am spätesten von allen Patienten (Tabelle 3 und Abb. 8). Eine Serokonversion lässt sich jedoch lediglich im f-ELISA und r-ELISA verzeichnen (Tabelle 3). Der Mittelwert der Spitzenwerte war beim f-ELISA 28,7 Tage (Median: 20 Tage) und beim r-ELISA 29,1 Tage (Median 18 Tage). (Tabelle 3) Im f-ELISA wurden höhere Antikörperwerte und stärkere Antikörper-Anstiege erreicht als im r-ELISA und Hämagglutinations-Hemmtest (Tabelle 3), was methodisch bedingt zu sein scheint (siehe Diskussion). Der Abbildung 8 ist zudem der Abfall der Influenza A/H1N1-Viruslast im Respirationstrakt zu entnehmen, die mit dem Einsetzen der systemischen Immunreaktion zu korrelieren scheint. Bei diesen Abbildungen muss beachtet werden, dass die Skalierungen der Y-Achse so gewählt wurden, dass sich die Antikörperkinetiken eines Patienten in den 3 serologischen Methoden und in der Influenza-PCR simultan darstellen lassen. Tatsächlich liegt das Kurvenniveau beispielsweise des f-ELISA deutlich über dem des r-ELISA und dem des HAH.

Patient Nr.	Serokonversionsdauer (Tage)			Spitzen-Messwert (Tag)			Spitzen-Messwert			Anstiege (Spitzenwert / Ausgangswert)		
	HAH	f-ELISA	r-ELISA	HAH	f-ELISA	r-ELISA	HAH (Titer)	f-ELISA (AU)	r-ELISA (AU)	HAH	f-ELISA	r-ELISA
1	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	Keine	0	293	416	0	0	0
2	24	15	25	29	74	87	9	392241	18067	9	153	74
3	12	6	6	12	27	18	3	73154	18101	3	111	73
4	16	3	6	32	83	75	6	592445	19156	6	1948	146
5	8	3	5	11	14	11	5	82676	5314	5	449	84
6	11	6	7	22	26	27	6	96493	11694	5	4825	193
7	14	12	14	15	24	29	4	644383	28917	4	71	61
8	Keine	6	6	Keine	12	12	1	15592	3488	1	112	37
9	Keine	20	Keine	Keine	20	20	0	3650	2658	0	6	2
10	3	5	6	6	8	18	4	23058	2462	3	21	9
11	n.B.	n.B.	n.B.	15	16	16	7	455557	33895	4	19	14
12	n.B.	3	3	n.B.	12	7	n.B.	5997	3291	n.B.	67	82
Mittelwert	12,6	7,9	8,7	17,8	28,7	29,1	4,1	198795	12288	3,6	649	65
STD-Abw.												
Median	12	6	6	15	20	18	4	77915	8504	4	91	67

Tabelle 3: Patient Nr. 1-12: Darstellung von Serokonversionsdauer, Zeitpunkt des Spitzenmesswertes, Spitzenmesswertes und maximalem Titeranstieg in HAH, f-ELISA und r-ELISA.

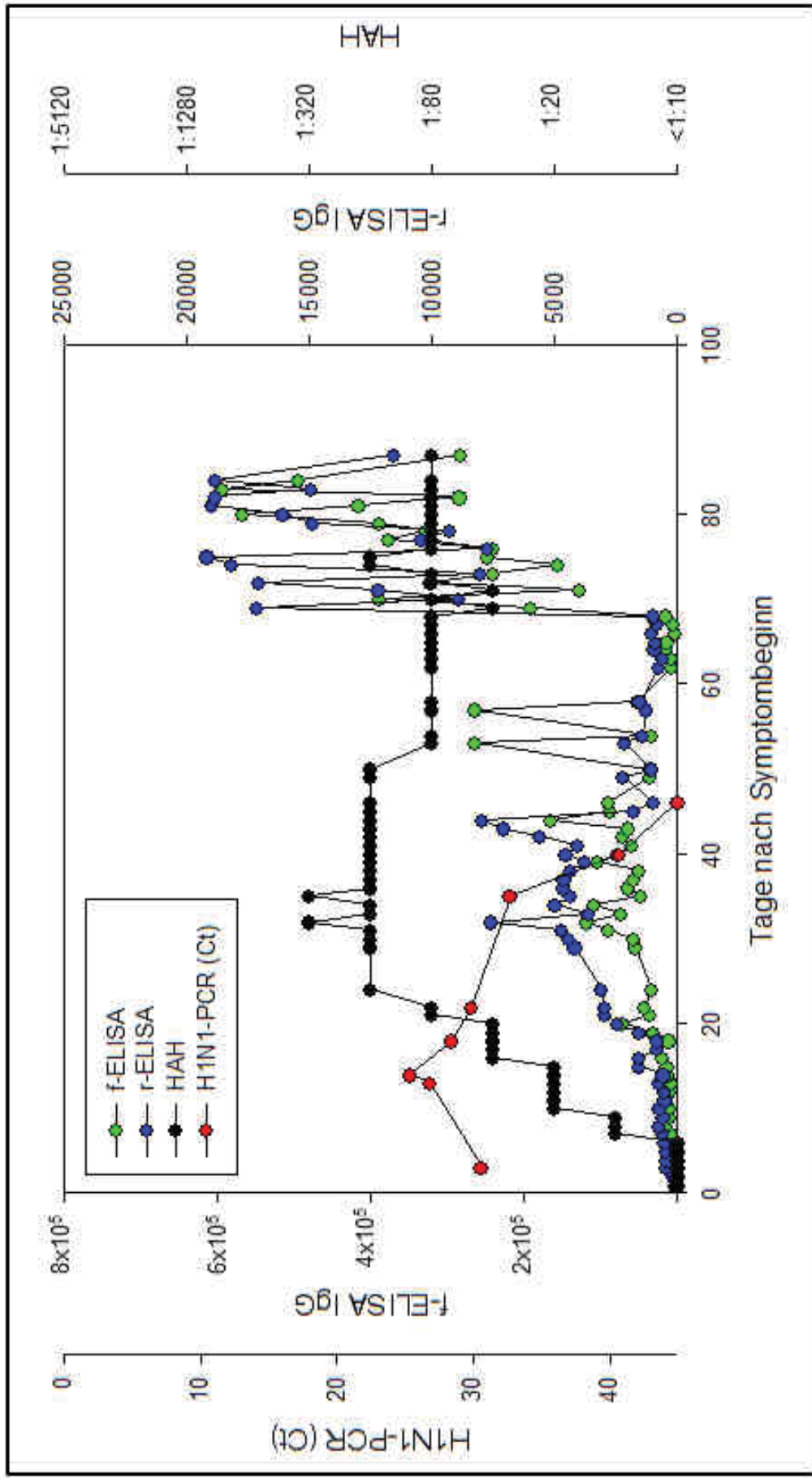


Abb. 8: Darstellung der Titerverläufe in den verschiedenen Assays am Beispiel von Patient 4 (Einheiten der y-Achsen: HAH: Titer, ELISAs: AU, PCR: Kopien/ml; x-Achse: Darstellung des Zeitpunktes nach Symptombeginn in Tagen)

3.3 Korrelation von HAH, f-ELISA und r-ELISA

Mittels Pearson-Korrelation aller Messwerte der Patientenseren wurde untersucht, wie der HAH, der r-ELISA und der f-ELISA jeweils miteinander korrelieren (Abb. 8). Wie zu erwarten korrelieren die drei Methoden signifikant positiv miteinander ($p < 0,05$). Somit ist eine signifikante positive Korrelation gegeben. Der Abbildung 9 A bis C ist jedoch zu entnehmen, dass die quantitativen Messwerte nur mäßig miteinander korrelieren (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,423 und 0,64). Erwartungsgemäß bestand die beste Korrelation zwischen den Messwerten der beiden ELISA-Methoden (Abb. 9 C).

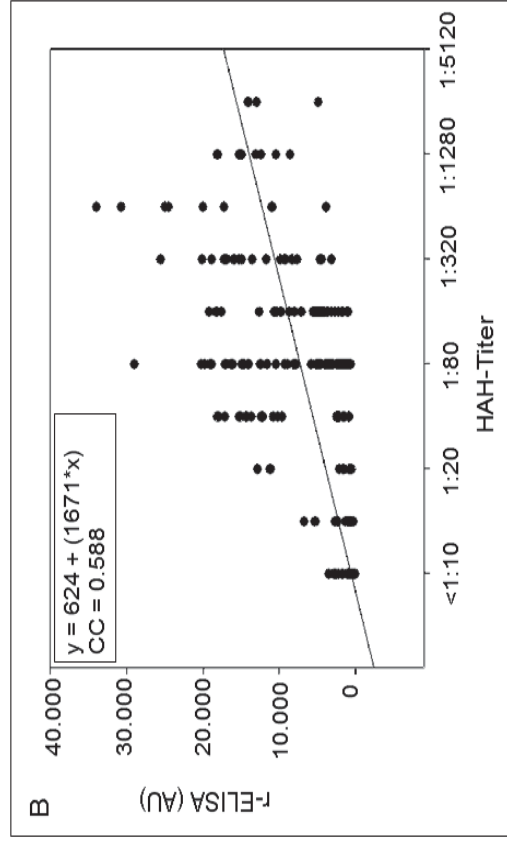
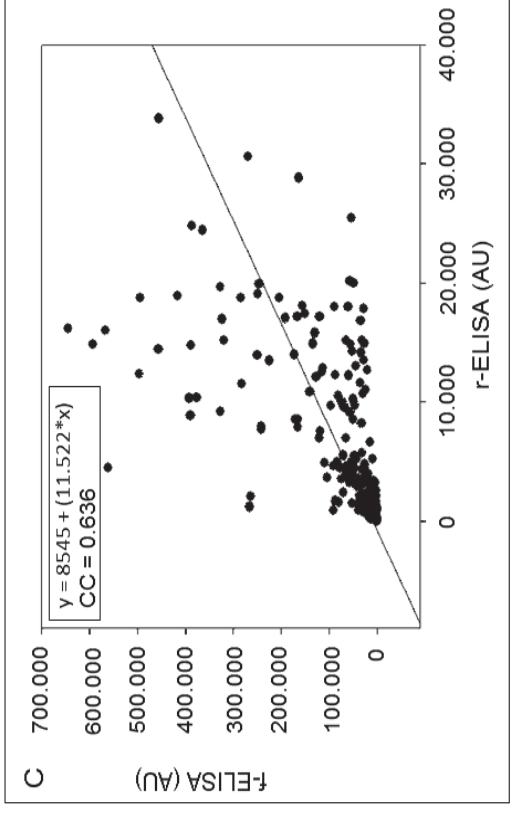
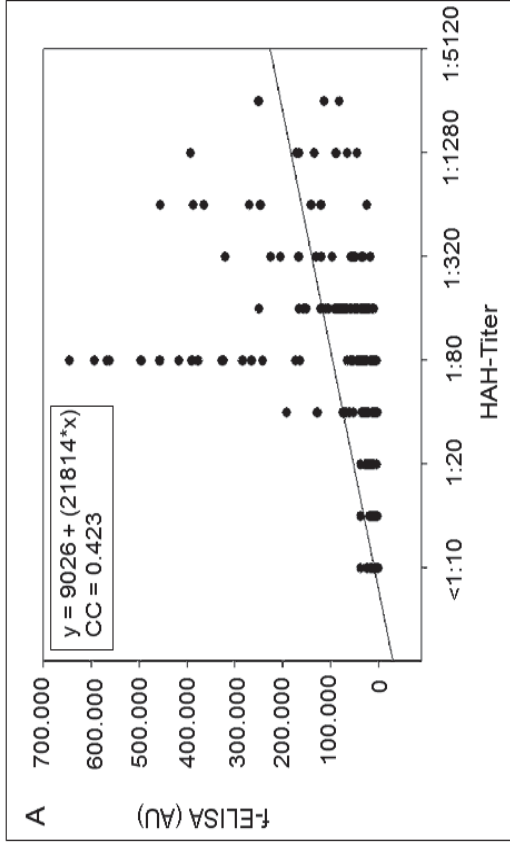


Abbildung 8: Regressionsanalysen

A: Korrelation zwischen HAH und f-ELISA

B: Korrelation zwischen HAH und r-ELISA

C: Korrelation zwischen r-ELISA und f-ELISA

4. Diskussion

Frühe Prognosemarker zu etablieren, die einen letalen Verlauf der Influenzainfektion anzeigen können, ist wie in vielen Bereichen der Medizin ein wünschenswertes Ziel. Vor allem Patienten mit Risikofaktoren wie immunkompromittierenden Erkrankungen oder immunsupprimierenden Medikamenten könnten hiervon durch eine früh eingeleitete antivirale Therapie und ein intensiviertes *Monitoring* profitieren (9). Es konnte gezeigt werden, dass die mittels RT-PCR gemessenen Viruslast des Influenzavirus in respiratorischen Proben nicht als Prognosemarker geeignet ist, da diese nicht zwangsläufig mit der Schwere der respiratorischen Symptomatik korreliert (21). Daher hat sich die Forschung der letzten Jahre unter anderem auf die Bedeutung der Influenza-Antikörper als Prognosemarker konzentriert (9, 11, 21).

Die Methodik der kürzlich durchgeführten Studie von Guihot et al. an Patienten mit schwerer Influenzainfektion, welche darauf hindeutet, dass die Abwesenheit von Serumantikörpern im HAH gegen das Influenza A/H1N1 Virus an Tag 4 nach Beginn der respiratorischen Symptomatik als Indikator für eine letal verlaufende Influenza-Erkrankung dienen kann, weist Schwächen auf. Die hier zu Grunde gelegte Hypothese geht davon aus, dass die influenza-spezifischen Antikörper in Antigen-Antikörper-Komplexen in der Lunge gebunden werden und folglich nicht mehr im Serum nachzuweisen sind (11). Guihot et al. haben allerdings in ihrer Studie Seren untersucht, die im Mittel von Tag 9 nach Symptombeginn stammen. Dies bedeutet, dass das Ergebnis der Studie aus mathematischen Berechnungen stammt (interpoliert wurde). Im Gegensatz zu unserer Studie wurden hier keine Seren aus der frühen Erkrankungsphase im Labor untersucht.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt war der Mangel an sequenziellen Serumproben aus einem Frühstadium der Erkrankung ein Nachteil von bisherigen oben genannten Studien. In der vorliegenden Dissertation wurden sequenziell gesammelte Serumproben von Patienten mit schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion untersucht, die im Institut für Virologie bei -20°C gelagert vorlagen. Wie es in den Tabelle 1 und 2 gezeigt wird, begann die Sammlung der Proben in einem frühen Erkrankungsstadium

und erfolgte über einen langen Zeitraum bis zum Tod des Patienten oder bis zur Rekonvaleszenz.

Ein Hauptergebnis der vorliegenden Dissertation ist, dass in der untersuchten Patientenkohorte ein negatives Ergebnis für Serumantikörper gegen das Influenzavirus A/H1N1 im HAH am vierten Tag nach Erkrankungsbeginn nicht mit einem letalen Verlauf der Influenza korreliert. Im Serum der Patientin, für die die Erkrankung einen letalen Verlauf nahm (Patientin 1), konnten im HAH keine Serumantikörper detektiert werden (Tabelle 3). Dennoch gab es unter den insgesamt 11 verbliebenen Patienten ohne letalen Ausgang zwei weitere Individuen, bei denen die Antikörper im HAH im Verlauf ebenfalls negativ blieben (*follow-up* 20 bzw. 41 Tage). Einer dieser Patienten war eine nicht-immunsupprimierte Patientin mit einer chronischen Hypertonie als einzige Begleiterkrankung. Eine Immunsuppression als Ursache für das Fehlen der spezifischen Antikörper lag bei dieser Patientin nicht vor und scheidet somit als mögliche Erklärung aus.

Bei sechs weiteren Patienten, die die schwere Influenzainfektion überlebt haben, wurden spezifische Antikörper gegen das Influenzavirus A/H1N1 erst zwischen Tag 6 und 23 nach Symptombeginn im HAH nachgewiesen (Abb. 6). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Studie von Guihot et al., bei der das Fehlen von Antikörpern gegen das Influenzavirus A/H1N1 an Tag vier nach Symptombeginn als Prognosemarker für einen letalen Verlauf der Influenzainfektion gewertet wurde (11). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten darin begründet sein, dass in unserer Studie Serumproben ab einer sehr frühen Phase der Influenzaerkrankung und in regelmäßigen und engen zeitlichen Abständen über einen langen Zeitraum untersucht wurden (siehe Tabellen 2 und 3). In der Untersuchung von Guihot et al. standen die ersten Serumproben erst ab einem späteren Stadium der Influenzaerkrankung zur Verfügung (im Mittel 9 Tage nach Symptombeginn) (11). Mit Hilfe einer mathematischen Berechnung wurden die Ergebnisse in dieser Studie interpoliert und somit auf die Höhe der HAH-Titer zu Beginn der Erkrankung zurückgerechnet. Die Ergebnisse unserer Studie wurden hingegen in frühen Serumproben direkt gemessen.

Die Ergebnisse der Dissertation sind zudem konkordant mit den Ergebnissen einer früheren Studie einer anderen Arbeitsgruppe, die gezeigt haben, dass 10% von immunologisch gesunden Influenzapatienten nur niedrige HAH-Titer (<1:40) nach der Influenzainfektion entwickeln (21). Aufgrund dieser Vordaten war eher zu erwarten,

dass das Fehlen bzw. die Ausbildung lediglich niedrig-positiver Influenza-Serumantikörper nicht als Prognosemarker für einen letalen Ausgang der Influenza dienen kann.

Neben der Untersuchung, ob der HAH-Titer als Prognosemarker bei schwer verlaufenden Influenzainfektionen dienen kann, wurden die Ergebnisse des HAH mit denen verglichen, die mit dem f-ELISA und dem r-ELISA gemessen wurden. Diese Vergleichstestung hatte den Hintergrund, dass serologische Untersuchungen bei Influenzaviren hauptsächlich mit dem Ziel durchgeführt werden, die Immunogenität von Influenza-Impfstoffen in Impfkohorten zu untersuchen (22, 23).

Des Weiteren wird im Falle von pandemischen Influenzajahren untersucht, zu welchen Zeitpunkten die Bevölkerung mit dem neuen pandemischen Virus bereits in Kontakt gekommen ist und so die „Seroprävalenz“ oder „Durchseuchung“ bestimmt (24, 25). Der HAH wird neben dem Mikroneutralisationstest (MN) hierbei als einer der „Goldstandard-Assays“ betrachtet (19, 20). Dies liegt im Wesentlichen daran, dass mit diesen Methoden nur ein kleiner, aber hochspezifischer Teil der Antikörper bestimmt wird, eben nur der Teil, der am neutralisierenden B-Zell-Epitop bindet (MN) bzw. die Hämagglutination von Erythrozyten hemmt (HAH).

Bei dem HAH und dem MN handelt es sich allerdings um Methoden, welche in ihrer Durchführung zeitintensiv sind. Zudem können sie häufig nicht in Routinelaboratorien durchgeführt werden, wenn mit einem pandemischen Influenzavirus gearbeitet wird, weil dies zumindest zu Beginn einer Pandemie nur unter Bedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 3 (BSL-3) möglich ist (26). ELISA-Methoden werden daher als mögliche Alternative zu den „Goldstandard-Assays“ gesehen. Hierbei wurden ELISA-Methoden, die Antikörper gegen rekombinantes Hämagglutinin (HA) (r-ELISA) detektieren, bereits in früheren Studien zur Untersuchung der Immunogenität von Influenzaimpfstoffen eingesetzt (17, 18, 27). Der methodische Nachteil eines rekombinanten ELISAs ist, dass mit dieser Methode nahezu ausschließlich Antikörper nachgewiesen werden, die an das (durch Bindung an die ELISA-Mikrotiterplatte) denaturierte („ungefaltete“) Hämagglutinin binden. Antikörper, die neutralisierende Epitope des nativen („gefalteten“) Hämagglutinin binden, werden somit nicht nachgewiesen (28, 29). Somit können Antikörper, die das nativ („gefaltete“) Hämagglutinin binden, nur dann mit einem ELISA nachgewiesen werden, wenn das Influenzavirus

auf vorher mit Fetuin beschichtete Mikrotiterplatten fixiert wird, wodurch die native Struktur des Hämagglutinins weitgehend erhalten bleibt (f-ELISA) (16).

Mit dem im Rahmen dieser Dissertation verwendeten f-ELISA wurden demnach überwiegend Antikörper gegen nativ-konfiguriertes Hämagglutinin bestimmt, wohingegen mit dem r-ELISA im Wesentlichen Antikörper gegen denaturiertes Hämagglutinin gemessen werden. Beides erfolgt allerdings in nicht genau zu definierenden Verhältnissen, da das Ausmaß der Denaturierung des Hämagglutinins bei beiden Assays nicht genau bekannt ist. Auch Vergleichsmessungen zwischen HAH als „Goldstandard“ und ELISA sind bisher in Influenza-Rekonvaleszenzseren kaum durchgeführt worden. Aus diesem Grund sollte in der aktuellen Patientenkohorte die Korrelation der Ergebnisse des f- und r-ELISA mit denen des HAH untersucht werden.

Mittels Regressionanalyse und Pearson-Korrelation wurde gezeigt, dass die drei Methoden signifikant positiv miteinander (jeweils $p < 0,05$) korrelieren, die Korrelation der quantitativen Messwerte aber nur mäßig gut ist (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,423 und 0,588) (Abb. 9). Erwartungsgemäß bestand die beste Korrelation zwischen den Messwerten der beiden ELISA-Methoden. Die weitere deskriptive Analyse ergab, dass eine Serokonversion zuerst im f-ELISA detektiert wird, gefolgt vom r-ELISA und zuletzt im HAH (Tabelle 3). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mit den ELISAs eine breitere (da auch nicht neutralisierende) Immunantwort nachgewiesen wird. Mit dem f-ELISA könnte dies am frühesten gelingen, da aufgrund der oben beschriebenen Methodik mit diesem Assay potentiell sowohl neutralisierende als auch nicht-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden.

Zudem lässt sich den Ergebnissen entnehmen, dass der HAH nicht alle Serokonversionen erfassen kann (Tabelle 3 und Vgl. 25). So ließ sich bei den Patienten 8 und 9 (Tabelle 3) im HAH keine Serokonversion feststellen, wohingegen jedoch im ELISA eine eindeutige Serokonversion als 4-facher Titeranstieg zu verzeichnen war. Bei Patient 9 wurde eine Serokonversion sogar lediglich im f-ELISA erfasst. In diesen Fällen stellte der ELISA somit eine alternative Methode dar, wodurch eine Aussage bezüglich der Serokonversion trotz gescheitertem HAH möglich war.

Allerdings lässt sich anhand der gemessenen Werte im ELISA keine Aussage bezüglich der Seroprotektion treffen, da es in den verwendeten ELISAs keinen definierten

Grenzwert (sog. „*cut-off*“) gibt, ab dem der Patient als „geschützt“ einzuordnen ist. Im HAH liegt im Gegensatz dazu die definierte Grenze, welche die Seroprotektion angibt, bei $\geq 1:40$ (19, 20). Auch dieser Grenzwert konnte in der vorliegenden Dissertation nicht ermittelt werden, beispielsweise mit einer „*receiver operator characteristics*“ (ROC)-Analyse, da die gemessene Kohorte sowohl zu klein als auch zu inhomogen war.

Der in der vorliegenden Studie nachgewiesene Schutztiter (HAH-Titer $\geq 1:40$), von 73% (Tabelle 3) ist konkordant mit Ergebnissen aus früheren Studien: Bei der Studie von Veguilla et al. lag der Schutztiter vier Wochen nach Symptombeginn bei 75%, bei Hung et al. bei 90% und in den Untersuchungen von Miller et al. bei 89% (21, 24, 30). Die Tatsache, dass in diesen Studien die Seroprotektionsrate vier Wochen nach Symptombeginn etwas höher war als in der vorliegenden Studie ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass in diesen Studien immungesunde Patienten untersucht wurden.

Bei Patient 12 war der HAH aufgrund einer unspezifischen Hämagglutination nicht anwendbar. Im rekombinanten ELISA und im fetuin-ELISA war jedoch eine Serokonversion nachweisbar. In diesem Fall stellte der ELISA somit eine sinnvolle alternative Methode zum HAH dar.

Es wurde in den letzten Jahren versucht, schwer verlaufende Influenzainfektionen nicht nur mit Neuraminidase-Inhibitoren (z.B. Oseltamivir, Zanamivir), sondern auch mit spezifischen Immunglobulin-Präparationen oder Rekonvaleszenzseren zu behandeln (31). Hierfür ist es wichtig, den Zeitpunkt zu kennen, an dem bei Patienten im Anschluss an eine Influenzainfektion typischerweise die höchsten influenza-spezifischen Antikörper-Konzentrationen vorliegen. Deshalb waren die in unserer Studie untersuchten Spitzenwerte im HAH und ELISA im zeitlichen Verlauf zusätzlich von Interesse (Tabelle 3). Hier konnte gezeigt werden, dass die Spitzentiter im HAH im Median zu Tag 15 und im ELISA zu Tag 20 (f-ELISA) bzw. zu Tag 18 (r-ELISA) erreicht wurden. Dem Ergebnis der HAH-Spitzentiter könnte hierbei die größte Bedeutung zukommen, da hiermit im Wesentlichen neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Diese Titer erreichen tendenziell früher ihr Plateau als die im ELISA gemessenen Werte, und die HAH-Titer bleiben im Verlauf hierbei in der Regel auf stabilem Niveau. Die im HAH ermittelte Antikörperkinetik ist konkordant zu den Ergebnissen früherer Studien (24, 25). Der länger verlaufende Anstieg der Antikörper-

Konzentrationen, die im ELISA nachgewiesen werden, deutet jedoch darauf hin, dass der ideale Zeitpunkt für die Blutabnahme tendenziell etwas später ist, nämlich ca. drei Wochen nach Beginn der respiratorischen Symptomatik. Zu diesem späteren Zeitpunkt liegt im Sinne einer immunologischen B-Zell-Reifung offensichtlich ein breiteres Spektrum spezifischer Antikörper vor, die neutralisierende und nicht neutralisierende Epitope im Influenza-Hämagglutinin binden.

Bei den in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Untersuchungen müssen Einschränkungen berücksichtigt werden: Da eine schwer verlaufende Influenzainfektion relativ selten auftritt, ist es schwierig, eine suffizient große Patientenkohorte zu erhalten. Die im Rahmen der Dissertation untersuchte Kohorte ist daher inhomogen bezüglich der vorliegenden Grunderkrankungen, dem Alter und dem Geschlecht der Patienten. Dennoch tritt auch im klinischen Alltag eine schwere Influenzainfektion bei den unterschiedlichsten Patienten auf, von Neugeborenen über schwangere Frauen bis hin zu immunsupprimierten Patienten. Die Inhomogenität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten spiegelt somit durchaus den klinischen Alltag wieder. Eine weitere Einschränkung ist darin zu sehen, dass in der untersuchten Kohorte lediglich ein Todesfall zu verzeichnen war. Dieser *Bias* beeinträchtigt aber nicht das Ergebnis, dass der HA-Titer an Tag 4 nicht als Prognosemarker für einen letalen Verlauf der Influenzainfektion fungieren kann, da bei Patienten ohne letal verlaufenden Infektionsverlauf an diesem Tag positive und negative HAH-Titer ohne klare Korrelation zum klinischen Ausgang nachgewiesen wurden. In Bezug auf die deskriptive Analyse der Antikörperkinetik in den drei verwendeten Assays muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Patientenkohorte nicht einem immunologisch gesunden Normalkollektiv entspricht. Um die Ergebnisse auf die Allgemeinbevölkerung zu übertragen, ist die Kohorte zudem zu klein.

Eine weitere Einschränkung der Dissertation liegt darin, dass in Bezug auf den f-ELISA und r-ELISA nicht ermittelt werden konnte, ab welchem Wert von einem Schutz gegen das Influenzavirus auszugehen ist. Für die Ermittlung eines solchen „cut-offs“, z.B. in einer ROC-Analyse, war die untersuchte Kohorte zu klein und zu inhomogen.

5. Zusammenfassung:

Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Patienten mit schwer verlaufender Influenza A/H1N1-Infektion das Fehlen virusspezifischer Serumantikörper am Tag 4 nach Symptombeginn, gemessen im Hämagglutinationshemmtest (HAH), nicht als prognostischer Marker für eine letal verlaufende Influenzainfektion verwendet werden kann. In der untersuchten Patientenkohorte fanden sich bei Patienten, die die Infektion überlebten, zu diesem Zeitpunkt sowohl positive als auch negative HAH-Titer ohne klare Korrelation zum klinischen Ausgang. Bei der Mehrzahl der Patienten waren die Antikörper gegen Ende der ersten Woche oder zu Beginn der zweiten Woche nach Erkrankungsbeginn nachweisbar. Ein überlebender Patient wurde sogar erst am Tag 23 im HAH positiv getestet.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass im fetuin-ELISA und im rekombinanten-ELISA eine Serokonversion früher nachgewiesen wird als im HAH (in beiden ELISAs im Median 6 Tage früher). Bei einigen Patienten war zudem eine Serokonversion nur mittels ELISA nachweisbar.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Falle einer Influenza-Pandemie, ELISA-Ergebnisse zusätzliche Informationen darüber liefern könnten, inwieweit die Bevölkerung bereits mit dem neuen Influenzavirus in Kontakt gekommen ist, was als Seroprävalenz bezeichnet wird.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Dissertation ist, dass die HAH-Titer früher ihre Spitzenwerte erreichen -im Median an Tag 15- als in den Influenza-ELISAs, bei denen der Median an Tag 18-20 erreicht wird. Für die Herstellung influenza-spezifischer Hyperimmunglobulin-Präparationen oder von Rekonvaleszenzseren deutet dies darauf hin, dass der ideale Zeitpunkt für die Blutabnahme bei Rekonvaleszenten ca. drei Wochen nach Beginn der respiratorischen Symptomatik ist. Zu diesem Zeitpunkt liegt im Sinne einer immunologischen B-Zell-Reifung offensichtlich ein breiteres Spektrum spezifischer Antikörper vor, die neutralisierende und nicht neutralisierende Epitope im Influenza-Hämagglutination binden.

6. Quellenverzeichnis

1. Doerr HW, Wolfram HG. Medizinische Virologie, 2. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 2010, 600-9
2. Herold G. Innere Medizin, 2012, 850-2
3. Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin, Nr. 40, Berlin, 2014
4. Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. 4. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 2009, 219-22
5. Epperson S, Blanton L, Kniss K, Mustaquim D, Steffens C, Wallis T, et al. Influenza activity - United States, 2013-14 season and composition of the 2014-15 influenza vaccines. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2014; 63(22): 483-90.
6. Dignani MC, Costantini P, Salgueira C, Jordan R, Guerrini G, Valledor A, et al. Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) virus infection in cancer and hematopoietic stem cell transplant recipients; a multicenter observational study. F1000Res. 2014; 3:221.
7. Grund S, Roggendorf M, Schweiger B. Outbreak of influenza virus A/H1N1 in a hospital ward for immunocompromised patients. Arch Virol. 2010; 155(11):1797-802.
8. Kumar D, Michaels MG, Morris MI, Green M, Avery RK, Liu C, et al. Outcomes from pandemic influenza A H1N1 infection in recipients of solid-organ transplants: a multicentre cohort study. Lancet Infect Dis. 2010. 10(8):521-6.
9. Radigan KA, Mutlu GM. Markers of prognosis specific to influenza infection: are we there yet? Am J Respir Crit Care Med. 2014; 189(10):1159-60.
10. Fresenius M, Heck M. Repetitorium Intensivmedizin, 3. Auflage, Berlin, 2007
11. Guihot A, Luyt CE, Parrot A, Rousset D, Cavaillon JM, Boutolleau D, et al. Low titers of serum antibodies inhibiting hemagglutination predict fatal fulminant influenza A(H1N1) 2009 infection. Am J Respir Crit Care Med. 2014. 189(10):1240-9.
12. von Kries R, Weiss S, Falkenhorst G, Wirth S, Kaiser P, Huppertz HI, et al. Post-pandemic seroprevalence of pandemic influenza A (H1N1) 2009 infection (swine flu) among children <18 years in Germany. PLoS One. 2011; 6(9):e23955.
13. Grund S, Adams O, Wahlisch S, Schweiger B. Comparison of hemagglutination inhibition assay, an ELISA-based micro-neutralization assay and colorimetric microneutralization assay to detect antibody responses to

- vaccination against influenza A H1N1 2009 virus. *J Virol Methods*. 2011; 171(2):369-73.
14. Hansen A, Grund S, Hetzel G, Ivens K, Summchen HA, Zgoura P, et al. Noncontrolled trial of monovalent AS03A-adjuvanted vaccine for 2009 pandemic influenza A(H1N1) in long-term dialysis patients and transplant recipients. *Am J Kidney Dis*. 2012; 59(3):471-3.
 15. Grund S, Pietzonka S, Michel S, Adams O. Serum antibodies against native and denaturated hemagglutinin glycoproteins detected by ELISA as correlates of protection after influenza vaccination in healthy vaccinees and in kidney transplant recipients. *J Virol Methods*. 2013; 193(2):558-64.
 16. Gulati U, Kumari K, Wu W, Keitel WA, Air GM. Amount and avidity of serum antibodies against native glycoproteins and denatured virus after repeated influenza whole-virus vaccination. *Vaccine*. 2005; 23(11):1414-25.
 17. Brokstad KA, Cox RJ, Major D, Wood JM, Haaheim LR. Cross-reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination. *Vaccine*. 1995; 13(16):1522-8.
 18. Stepanova L, Naykhin A, Kolmskog C, Jonson G, Barantceva I, Bichurina M, et al. The humoral response to live and inactivated influenza vaccines administered alone and in combination to young adults and elderly. *J Clin Virol*. 2002; 24(3):193-201.
 19. Lenette HI, Schmidt NJ. Influenza virus In: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 1979:585-609.
 20. Coudeville L, Bailleux F, Riche B, Megas F, Andre P, Ecochard R. Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: development and application of a bayesian random-effects model. *BMC Med Res Methodol*. 2010: 10:18
 21. Hung IF, To KK, Lee CK, Lin CK, Chan JF, Tse H, et al. Effect of clinical and virological parameters on the level of neutralizing antibody against pandemic influenza A virus H1N1 2009. *Clin Infect Dis*. 51(3):274-9.
 22. Manzoli L, De Vito C, Salanti G, D'Addario M, Villari P, Ioannidis JP. Meta-analysis of the immunogenicity and tolerability of pandemic influenza A 2009 (H1N1) vaccines. *PLoS One*. 2011;6(9):e24384.
 23. Zhu FC, Wang H, Fang HH, Yang JG, Lin XJ, Liang XF, et al. A novel influenza A (H1N1) vaccine in various age groups. *N Engl J Med*. 2009; 361(25):2414-23
 24. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet*. 2010; 375(9720):1100-8.

25. Chen MI, Barr IG, Koh GC, Lee VJ, Lee CP, Shaw R, et al. Serological response in RT-PCR confirmed H1N1-2009 influenza A by hemagglutination inhibition and virus neutralization assays: an observational study. *PLoS One*. 2010; 5(8):e12474.
26. Löwer. Pandemieimpfstoffe – Überlegungen zum Design im Vorfeld der Influenza-Pandemie 2009, *Bundesgesundheitsblatt* 12/2010: 1238-41
27. Remarque EJ, van Beek WC, Ligthart GJ, Borst RJ, Nagelkerken L, Palache AM, et al. Improvement of the immunoglobulin subclass response to influenza vaccine in elderly nursing-home residents by the use of high-dose vaccines. *Vaccine*. 1993; 11(6):649-54.
28. Feng J, Gulati U, Zhang X, Keitel WA, Thompson DM, James JA, et al. Antibody quantity versus quality after influenza vaccination. *Vaccine*. 2009; 27(45):6358-62.
29. Laver WG, Air GM, Webster RG, Smith-Gill SJ. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell*. 1990; 61(4):553-6.
30. Veguilla V, Hancock K, Schiffer J, Gargiullo P, Lu X, Aranio D, et al. Sensitivity and specificity of serologic assays for detection of human infection with 2009 pandemic H1N1 virus in U.S. populations. *J Clin Microbiol*. 49(6):2210-5.
31. Hung IF, To KK, Lee CK, Lee KL, Chan K, Yan WW, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(4):447-56

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

20.07.2016, Stefan Christian Michel

Unterschrift