

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten

**HCMV-spezifische Antikörper im Fruchtwasser-
Einfluss der maternalen Hyperimmunglobulin-Therapie auf
die Virustransmission und angiogene Faktoren
(sFLT1/PIGF-Quotient)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Lukas Edgar Maximilian Penka

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. Hamprecht
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Hoopmann
3. Berichterstatter: Professor Dr. U. Gembruch

Tag der Disputation: 02.12.2022

Meiner Familie

-

Und dem Andenken an Klaus Hamprecht

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Das Humane Zytomegalievirus	1
1.1.1 Genomik	2
1.1.2 Replikationszyklus.....	3
1.2 Maternale und Kongenitale HCMV-Infektion	4
1.2.1 Epidemiologie.....	4
1.2.2 Transmission.....	6
1.2.3 Kongenitale Infektion	8
1.2.4 Labordiagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion	9
1.2.5 Präventive Ansätze zur Vorbeugung kongenitaler HCMV-Infektionen	11
1.3 Therapie	16
1.3.1 Pränatale Therapieansätze -HIG	16
1.3.2 Pränatale Therapieansätze - Valaciclovir	17
1.3.3 Postnatale antivirale Therapie	18
1.4 Die Plazentaschranke im Kontext der HCMV-Infektion.....	19
1.4.1 Entwicklung & Aufgaben der Plazenta	19
1.4.2 HCMV-Plazentitis	20
1.4.3 sFlt1, PlGF & Präeklampsie	21
1.5 Zielsetzung:	22
2 Material & Methoden	23
2.1 Patientenkollektiv	23

2.2	Klinische Virusisolate	24
2.3	Targetzellen.....	24
2.4	Seren und Fruchtwasser	24
2.5	Reagenzien	26
2.5.1	Zellkultur	26
2.5.2	Neutralisationstests.....	26
2.5.3	Testsysteme für Antikörper-, Antigen- und Nukleinsäurenachweise.....	27
2.5.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	28
2.6	Neutralisationstests	29
2.6.1	Zellkultur	29
2.6.2	Poolen von Proben und Komplementinaktivierung.....	30
2.6.3	Neutralisation & Inokulation.....	31
2.6.4	Färbung & Bestimmung probenspezifischer Neutralisationskapazitäten	33
2.6.5	TCID-50 %-Bestimmung	34
2.7	Bestimmung der HCMV-spezifischen Antikörperprofile	35
2.7.1	Rekombinante Immunoassays	35
2.7.2	HCMV-Immunglobulin Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassays	36
2.8	Direkte Virusnachweisverfahren.....	37
2.8.1	Real-time PCR.....	37
2.8.2	Kurzzeit (18h-) Mikrokultur.....	38
2.9	Evaluation potenzieller Biomarker	39
2.9.1	Bestimmung von sFlt1 & PlGF aus Blut- & Fruchtwasserproben	39
2.9.2	Identifikation potenzieller Biomarker mittels Multiplex-Assay.....	40
2.10	Statistische Auswertung.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Neutralisationsassays	42

3.1.1	Kalibrierung an Einzelproben.....	42
3.1.2	Kalibrierung an kleinen Pools	45
3.1.3	Neutralisationsassays an gepoolten Proben.....	46
3.1.4	Neutralisation von Einzelproben unter definierten Verdünnungen.....	58
3.2	Serologische Einflussfaktoren der Neutralisationskapazität.....	62
3.2.1	Anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität.....	62
3.2.2	Anti-recgB2-Reaktivität	66
3.3	HCMV-Quantifizierung	73
3.4	Evaluation von sFlt1 und PLGF als potenzielle Biomarker.....	80
3.5	Multiplex-Assay	87
4	Diskussion.....	93
4.1	Kohortenbildung	93
4.2	Neutralisationsassays	95
4.2.1	Einflüsse auf die Ergebnisse der Neutralisationstestungen	99
4.3	Serologische Einflussfaktoren der Neutralisation.....	103
4.4	HCMV-Quantifikation im Fruchtwasser	106
4.5	PLGF & sFlt1 als Biomarker der Transmission	108
4.6	Multiplex-Assay Analyse	110
4.6.1	Ergebnisinterpretation	110
4.6.2	Auffällige Proteine	111
4.6.3	Proinflammatorischer Zustand nach Transmission	114
4.6.4	Proteine unterhalb des Detektionslimits	114
4.6.5	Vor- und Nachteile eines Multiplex-Assay	115
4.6.6	IgG negativer Pool.....	116
5	Zusammenfassung und Ausblick	118
6	Quellenangaben.....	121

7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	141
8	Veröffentlichungen	142
9	Danksagung	143
10	Lebenslauf.....	144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytomegalie-Virion – Schematischer Aufbau; eigene Abbildung.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des HCMV; eigene Abbildung, nach [19].	3
Abbildung 3: Seroprävalenz - Geographische Verteilung von Anti – HCMV Antikörpern in der Bevölkerung im reproduktiven Alter [29–33].	5
Abbildung 4: Geographische Verteilung der kongenitalen HCMV - Infektion bei Neugeborenen [35–49].	5
Abbildung 5: Übersicht über die Kohortenbildung aus der Gesamtkohorte unter Verwendung kryokonservierter Probenpaare gewonnen bei Amniozentese (AC).	23
Abbildung 6: Ablauf eines Plaque-Reduktions-Neutralisationstests zur Messung neutralisierender Antikörper; HIG: Hyperimmunglobulin; IgG: Immunglobulin G; HCMV-IE1: immediate early 1 – humanes Zytomegalievirus-Protein.	32
Abbildung 7: Plaquebildung (rote Kreise) nach fünftägiger HCMV-Kultivierung auf humanen Vorhautfibroblasten (links) und ARPE-19 Zellen (rechts). Einzelne IE1-positiv gefärbte Zellkernen oder Haufen <5 werden nicht als Plaque gewertet (100x).	33
Abbildung 8: Testprinzip des HCMV-Line blot mit Serum und Fruchtwasser (Abbildung 14 zeigt entsprechende Immunoblots mit dem Expressionsmuster einer früher Infektion und der fortgeschrittenen Infektion).	35
Abbildung 9 Schematische Darstellung des Testprinzips eines Elektrochemilumineszenz-Assay; HIG: Hyperimmunglobulin; HCMV: humanes Zytomegalievirus; IgG: Immunglobulin.	36
Abbildung 10: Vorversuch auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF) mit Serumproben einer nicht-HCMV-transmittierenden Schwangeren (H2537-15) die Hyperimmunglobulin (Cytotect) appliziert bekam, verglichen mit HIG; Abgebildet ist die Kapazität zur Neutralisation (NT-Kapazität) eines Virusisolats relativ zur Viruskontrolle.	42
Abbildung 11: Vorversuch zur Neutralisation auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF) mit Serumproben einer HCMV-transmittierenden, Hyperimmunglobulin (HIG) - behandelten Schwangeren, verglichen mit HIG; Abgebildet ist die Kapazität zur Neutralisation (NT-Kapazität) eines Virusisolats relativ zur Viruskontrolle.	43

Abbildung 12: Vorversuch zur Neutralisation auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF) mit Fruchtwasserproben einer nicht-HCMV-transmittierenden (oben) und einer transmittierenden Schwangeren die Hyperimmunglobuline appliziert bekamen. Abgebildet ist die Kapazität zur Neutralisation (NT-Kapazität) eines Virusisolats relativ zur Viruskontrolle. 44

Abbildung 13: Plaque-Reduktions-Neutralisationstest an kleinen Pools von Hyperimmunglobulin (HIG) - naiven Transmitterinnen & HIG-behandelten Non-Transmitterinnen auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF). Die NT% wird relativ zu einem HCMV-IgG negativen Serum und Fruchtwasserpool ausgegeben..... 45

Abbildung 14: Ergebnisse von Immunoblots von gepoolten Serumproben nach HCMV-Transmissionsstatus und HIG-Vorbehandlung; NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, Avi: Aviditätsmessung, SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin; siehe auch Kagan et al 2019 [102]), IgM+: frühe HCMV-Primärinfektion mit noch hohem IgM Index, niedriger Avidität, rec-gB2 negativ..... 48

Abbildung 15: Ergebnisse von Immunoblots von gepoolten Fruchtwasserproben nach HCMV-Transmissionsstatus und HIG-Vorbehandlung; NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, Avi: Aviditätsmessung, SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); siehe auch Kagan et al 2019 [102]), IgM+: frühe HCMV-Primärinfektion mit noch hohem IgM Index, niedriger Avidität, rec-gB2 negativ..... 49

Abbildung 16: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen und drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten Serumproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen; HFF: Humane Vorhautfibroblasten. 50

Abbildung 17: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen, drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten maternalen Serumproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen,

HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen, ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen.	51
Abbildung 18: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen und drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten Fruchtwasserproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen, HFF: Humane Vorhautfibroblasten.	52
Abbildung 19: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen und drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten Fruchtwasserproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen, ARPE-19: Adulte Retinapigmentepithelzellen.	53
Abbildung 20: Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Fibroblasten (HFF) gepoolter Serumproben der sechs Kohorten (1-6). Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.	54
Abbildung 21: Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19) gepoolter Serumproben der sechs Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.	55
Abbildung 22: Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Fibroblasten (HFF) gepoolter Fruchtwasserproben der sechs Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.	56
Abbildung 23 Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19) gepoolter Fruchtwasserproben der sechs Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%:	

Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.....	56
Abbildung 24: Neutralisationskapazitäten von 5 Kohorten nach Einzelneutralisationen von Serumproben gegen zwei Target-Zellsysteme; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; HFF: humane Vorhautfibroblasten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen.....	59
Abbildung 25: Neutralisationskapazität von 5 Kohorten nach Einzelneutralisation von Fruchtwasserproben gegen zwei Target-Zellsysteme; FW: Fruchtwasser; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; HFF: humane Vorhautfibroblasten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen.....	61
Abbildung 26: Anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität im Serum in den Kohorten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV-Transmitterinnen.....	62
Abbildung 27: Anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität im Fruchtwasser in den Kohorten; FW: Fruchtwasser; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen.....	63
Abbildung 28: Streudiagramm der Serum-HCMV-IgG und Neutralisationskapazität nach HCMV-Transmissionsstatus; ARPE-19: Adulte Retinapigmentepithelzellen.....	64
Abbildung 29: Streudiagramm der Serum-HCMV-IgG-Avidität und Neutralisationskapazität nach HCMV-Transmissionsstatus; HFF: Humane Vorhautfibroblasten.....	66
Abbildung 30: Relativer Anteil von gB2-reaktiven und nicht-gB2-reaktiven Proben an 5 Gesamtkohorten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen.....	67
Abbildung 31: Relativer Anteil der Reaktivitätsmuster der Kohorten nach Transmissionsstatus in Serum (links) und Fruchtwasser (rechts) im Immunoblot gegenüber den rekombinanten Antigenen IE1, CM2, p65, p150 und gB1.....	68
Abbildung 32: Neutralisationskapazität in Abhängigkeit von der Reaktivität gegenüber recgB2; Reaktivität von + bis +++ gemäß dem Auswertungsschema der Fa. Mikrogen.....	69
Abbildung 33: Assoziation der Reaktivität gegenüber einzelnen rekombinanten Antigenen des rekombinanten Immunoblots und der Neutralisationskapazität auf ARPE-	

19 und HFF-Zellen in Serum- und Fruchtwassereinzelpuben (Reaktivität von + bis +++ gemäß dem Auswertungsschema der Fa. Mikrogen).	72
Abbildung 34: Korrelation von qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur aus Fruchtwasser HIG-negativer Schwangerer; qPCR: quantitative PCR; Daten bereits publiziert [138].	74
Abbildung 35: Korrelation von qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur aus Fruchtwasser HIG-behandelter Schwangerer; qPCR: quantitative PCR; Daten bereits publiziert [138].	74
Abbildung 36: Korrelationen von qPCR beziehungsweise 18h-Kurzzeit-Mikrokultur und dem Schwangerschaftsalter in Abhängigkeit zur Vortherapie mit oder ohne HIG (Hyperimmunglobulin); qPCR: quantitative PCR.....	75
Abbildung 37: Anzahl der HCMV-IE1-Antigen gefärbten Kerne in der Kurzzeit-18h-Mikrokultur in den drei Subkohorten der HIG-Behandlung; HIG: Hyperimmunglobulin; kgKG: Kilogramm Körpergewicht; daten bereits publiziert [138].	76
Abbildung 38: Kopienzahl HCMV-DNA in der qPCR in den drei Subkohorten der HIG-Behandlung; qPCR: quantitative PCR; HIG: Hyperimmunglobulin; kgKG: Kilogramm Körpergewicht; Daten bereits publiziert [138]......	77
Abbildung 39: Serum sFlt1 und PlGF, abgetragen nach den vier Kohorten, die Gerade mit der Gleichung $f(x)=x/38$ entspricht dem von Zeisler et al. gesetzten Grenzwert von 38; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].	81
Abbildung 40: sFLT1/PLGF-Quotient aus Serum von Frauen nach HCMV-Primärinfektion, unterteilt nach Transmissionsstatus und Vortherapie; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen	81
Abbildung 41: sFlt1- & PlGF-Serumkonzentrationen in den Kohorten und latent HCMV-infizierten Kontrollen; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].	82
Abbildung 42: sFlt1- & PlGF- Fruchtwasserkonzentrationen in den Kohorten und latent HCMV-infizierten Kontrollen; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T:	

HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].	83
Abbildung 43: Streudiagramm zur Assoziation der beiden Protein-Konzentrationen (sFlt1 und PlGF) in Fruchtwasser (AF); PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV - Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV - Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].	83
Abbildung 44: Expressionsmuster von sFlt1 & PlGF in je einem Fall von Non-Transmission & Transmission; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; MoM: Multiple des Median	84
Abbildung 45: 11 Konzentrationsverläufe von sFlt1 als Multiple des Median in der Schwangerschaft nach maternaler HCMV-Primärinfektion G: Gravida; P: Para; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen	85
Abbildung 46: sFlt1- & PlGF- Serumkonzentrationen nach Transmissionsstatus und Ultraschallbefund; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; NT: HCMV – Non Transmitterinnen; TUU: Transmitterinnen, Ultraschall unauffällig; TUA: Transmitterinnen, Ultraschall auffällig; Daten bereits publiziert [140].	86
Abbildung 47: empirische Grenzwerte für longitudinale MoM-Werte (links) und Querschnittsdaten (rechts) mit Gruppenverteilung; MoM: Multiple des Median; sFlt1: soluble-Flt; PlGF: placental growth factor; Daten bereits publiziert [140].	87
Abbildung 48: Heatmap zu den Expressionsmustern von 79 Proteinen in Fruchtwasserpools (rot: Konzentration höher als die mittlere Konzentration über alle Subkohorten; blau: Konzentration geringer als die mittlere Konzentration über alle Subkohorten).	89
Abbildung 49: Abweichungen vom Protein-individuellen Mittelwert von mehr als einer Verdoppelung; NT: HCMV – Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); IgM: Kohorte mit früher Infektion und noch hohem IgM; T: HCMV - Transmitterinnen	90
Abbildung 50: Abweichungen vom Protein-individuellen Mittelwert von mehr als einer Halbierung; NT: HCMV – Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; SG:	

Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); IgM: Kohorte mit früher Infektion und noch hohem IgM; T: HCMV - Transmitterinnen	91
Abbildung 51: Errechnete NT50%-Werte für Fruchtwasserproben in der Neutralisation auf HFF für drei Versuchswiederholungen mit den dazugehörigen 95%-KI für den errechneten Wert nach nicht-linearer Regression.....	101
Abbildung 52: Kalibrierungskurve des C-C motif chemokine 25 (CCL25) zwischen Konzentration und log2-skaliertes Einheit [162].....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ultraschallbefunde, assoziiert mit der kongenitalen HCMV-Infektion; nach [65].....	8
Tabelle 2: Befunde des Neugeborenen, assoziiert mit der kongenitalen HCMV-Infektion; nach [66].....	9
Tabelle 3: Studien zur Hyperimmunglobulin (HIG)-Prävention der materno-fetalen Transmission von humanen Zytomegalieviren (HCMV) nach maternaler Primärinfektion (PI).....	15
Tabelle 4: Studien zur pränatalen Behandlung von infizierten Feten mit Hyperimmunglobulin (HIG).....	17
Tabelle 5: 50% Neutralisationskapazität (NT50%-Werte) für Plaque-Reduktions-Neutralisationstest aus kleinen Pools.	46
Tabelle 6: Maternale und serologische Charakteristika der für Neutralisationsassays gepoolten Proben.....	47
Tabelle 7: NT50%-Werte mit 95% Konfidenzintervall für 3 Versuchsreihen an 6 Kohorten auf Fibroblasten (HFF) und Epithelzellen (ARPE-19) mit Fruchtwasser- und Serumpools.....	57
Tabelle 8: Mittlere Neutralisationskapazitäten (NT%) und Spannweite der Neutralisation mit Serum- und Fruchtwasser (FW)-Einzelproben.	58
Tabelle 9: Maternale und serologische Charakteristika der Proben für Neutralisationen mit Einzelproben.....	59
Tabelle 10: Korrelation von anti-HCMV-IgG beziehungsweise anti-HCMV-IgG-Avidität mit Neutralisationskapazitäten (NT%), jeweils aus Serumproben und Fruchtwasserproben (FW).	65
Tabelle 11: Von der Analyse der Viruslast, differenziert nach Vorbehandlung, ausgeschlossene Fruchtwasserproben mit Ausschlusskriterium.	73
Tabelle 12: Angaben zum maternalen Alter, Gestationsalter (GA) bei Primärinfektion und Amniozentese (AC) zum Gruppenvergleich der Viruslast in qPCR und Kurzzeitkultur bei HCMV-transmittierenden Schwangeren.	76
Tabelle 13: Fälle von HCMV-Transmission mit intrauterinem Fruchttod oder Termination und Viruslast; Daten bereits publiziert [138].....	78

Tabelle 14: Fälle kongenitaler Transmission mit virologischen Daten aus Fruchtwasser, Biometrie, Körperflüssigkeiten und klinischen und labormedizinischen Infektionszeichen [138].....	79
Tabelle 15: Maternale Kennzahlen der vier Kohorten vor Evaluation der Konzentrationen von PlGF und sFlt1.....	80
Tabelle 16: Aus ROC-Analyse abgeleitete Grenzwertoptimierungsanalyse für sFlt1, PlGF und deren Kombinationen.....	87
Tabelle 17: Durch das Olink-Inflammation Panel quantifizierbare Proteine.....	88
Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse von NT50%-Werten generiert aus Plaque-Reduktions-Neutralisationstest und NT% aus Einzelverdünnung von 4 Proben.....	102
Tabelle 19: Ergebnisse einer strukturierten Literaturrecherche zu 16 Proteinen mit auffälligen Konzentrations-unterschieden im Multiplex-Assay; T: HCMV – Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin.....	112
Tabelle 20: Proteine, deren Konzentrationen im gepoolten Fruchtwasser unterhalb der Nachweisgrenze (limit of detection in pg/ml – LOD) nicht nachgewiesen wurden. ...	115

Abkürzungsverzeichnis

AC	Amniozentese (engl. amniocentesis)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
ARPE-19	Retinapigmentepithelzellen eines 19-jährigen Spenders
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
FKS	Fötales Kälberserum
GA	Gestationsalter (Wochen + Tage)
HCMV	Humanes Zytomegalievirus (engl. human cytomegalovirus)
HHF	Humane Vorhautfibroblasten (engl.: human foreskin fibroblasts)
HIG	Hyperimmunglobulin
IE	Immediate Early-Gene (HCMV-Genprodukte)
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M
IQR	Interquartilenabstand (engl.: interquartile range)
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
MoM	Multiple des Medians (engl.: multiples of the median)
NPX	Normalized Protein eXpression (virtuelle Einheit)
NT	HCMV-Non-Transmitterinnen
Nt%	Neutralisationskapazität in Prozent
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PEA	Proximity Extension Assay
PI	Primärinfektion
PIGF	Plazentarer Wachstumsfaktor (engl.: placental growth factor)
PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisationstest
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie (engl.: randomized controlled trial)
sFlt1	soluble fms-like Tyrosinkinase 1
SSW	Schwangerschaftswoche
T	HCMV-Transmitterinnen
qPCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
U	Units (Einheiten – Bezogen auf Immunglobulinpräparate)

ValACV	Valaciclovir
ValGCV	Valganciclovir
VEGF	Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor)

1 Einleitung

1.1 Das Humane Zytomegalievirus

1954 berichtete Haymaker über ein Neugeborenes mit periventrikulären Verkalkungen und zytomegaler Einschlusskörperkrankheit [1]. Im selben Jahr wurde ein Fallbericht über ein unreif geborenes Kind veröffentlicht, welches peripartal unter anderem durch Ikterus, Hepato-Splenomegalie, Thrombopenie mit Petechien und Krampfanfälle sowie Mikrozephalie auffiel. In dessen Urinsediment wurden zytomegale Zellen gefunden und dem „Speicheldrüsenvirus“ zugeordnet. Der Artikel konstatiert, dass „die Infektion anscheinend während des intrauterinen Lebens auftritt“ [2]. 1964 wurde die Beteiligung der Plazenta an dieser Infektion beschrieben [3], das Zytomegalievirus den Herpesviren zugeordnet und in humanen embryonalen Lungenfibroblasten kultiviert [4].

Heute, am Anfang des 21. Jahrhunderts ist bekannt, dass durch diese Infektion jedes Jahr nach 100 000 Schwangerschaften etwa 1000 kongenital infizierte Kinder geboren werden. Das geschieht unabhängig von der maternalen Infektionsprävalenz. Deutlich über 10 % dieser Kinder werden permanente Folgeschäden davontragen [5].

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) zählt in Folge der Wirtsspezifität, des Zelltropismus und des langsamen Replikationszyklus in vitro zur Subfamilie der Betaherpesvirinae [6, 7]. HCMV ist mit einem Durchmesser von etwa 200 nm und einem etwa 230 000 Basenpaar umfassenden Genom das größte humanpathogene Herpesvirus [8]. Das virale Nukleokapsid umschließt doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) und wird von proteinhaltigem Tegument umgeben. Die viralen Tegumentproteine sind überwiegend phosphoryliert, wobei das Phosphoprotein *pp150* im inneren Teil eine netzartige Struktur formt. Das häufigste Tegumentprotein *pp65* ist bedeutend für den Viruszusammenbau und bietet sich wegen seiner hohen Konzentration als Ziel für antigenbasierte Nachweisverfahren an [9]. Außen besitzt das Virion eine Doppelmembran aus von der Wirtszelle stammenden Lipiden und eingelagerten viralen Glykoproteinen [6]. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung.

HCMV kann nach Inkorporation eine große Anzahl verschiedener Zellen infizieren. Es repliziert hauptsächlich in Epithelzellen, Fibroblasten und Leiomyozyten. Epithelzellen

stellen die Grundlage für Übertragungen und Infektion dar. Endothelzellen und Zellen der Hämatopoese begründen die Dissemination im Wirtsorganismus [10].

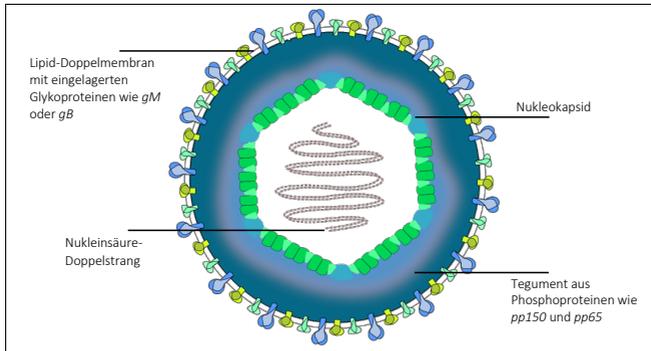


Abbildung 1: Zytomegalie-Virion – Schematischer Aufbau; eigene Abbildung.

1.1.1 Genomik

Durch Kultivierung von HCMV und repetitives Passagieren *in vitro* entstehen Mutationen, welche, analog der Replikation *in vivo*, Virusstämme begründen [11]. Es werden definierte Niederpassagestämme wie Merlin aus Urin von kongenital infizierten Neugeborenen von Hochpassagestämmen wie AD 169 unterschieden [7]. Das 1990 sequenzierte Genom von AD 169 besteht aus den kovalent verknüpften Segmenten S und L (short und long), wobei jedes Segment über eine Unique-Region (UL und US) verfügt und von terminalen und inverted repeats (TRL/IRL und TRS/IRS) umschlossen wird [11]. Die Bezeichnung viraler Genprodukte erfolgt mittels Präfix, der sich vom zugrundeliegenden Segmentabschnitt des Ursprungsgens ableitet, und einer fortlaufenden Nummerierung [12]. Beim Stamm Merlin werden 170 Protein-codierende Regionen beschrieben, von welchen ein Drittel Splice-Stellen aufweist. Auch können überlappende offene Leserahmen bei der Expression bisher unbekannter Proteine eine Rolle spielen [13]. In der Datenbank des National Center for Biotechnology Information werden für den Referenzstamm Merlin 173 Gene und 169 Proteinen angegeben. (Referenzsequenz: NC_006273.2). Es konnten weit über 200 offene Leserahmen identifiziert werden, welche das HCMV-Genom zu einem der größten Genome der bekannten Viren machen [14].

1.1.2 Replikationszyklus

Virion-Zell-Interaktionen initiieren den Zelleintritt, wobei die viralen Glykoproteine *gB* und *gL* die Anheftung und Fusion des Virions mit der Wirtszellmembran vermitteln. Verschiedene Glykoproteine formieren Komplexe, welche zur Interaktion mit definierten zellulären Strukturen essenziell sind [15]; Der Pentamerkomplex aus *gL*, *pUL128*, *pUL130* und *pUL131A* spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Infektion von Endothelzellen [16]. Unterschiede im Zelltropismus verschiedener HCMV-Stämme werden unter anderem in Mutationen im UL128 - 131 Genlocus begründet [17]. Der Trimärkomplex aus *gL*, *gL* und *gO* vermittelt die Infektion von Fibroblasten [18].

Nach der Fusion beider Lipiddoppelmembranen und Freisetzen des viralen Tegument und Kapsid in das Zytosol organisieren Tegumentproteine den Transport des HCMV-Kapsid entlang des Zytoskeletts in Richtung Nucleus [19]. Schematisch zeigt Abbildung 2 Grundzüge des HCMV-Replikationszyklus:

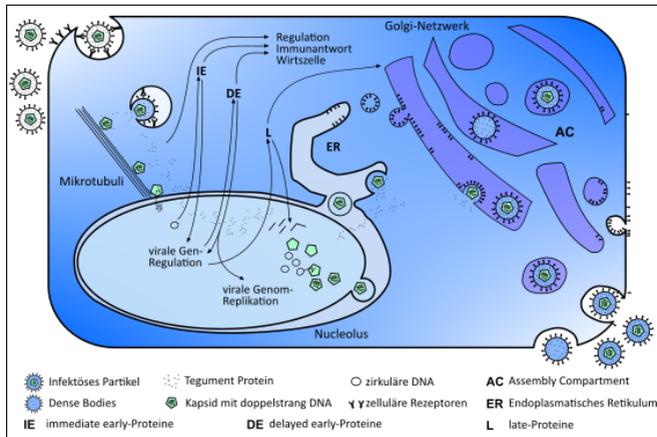


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des HCMV; eigene Abbildung, nach [19].

Die HCMV-Genexpression durch die zelluläre Proteinsynthesemaschinerie lässt sich in drei Phasen gliedern. Es werden „immediate-early“ (*IE*)-, „(delayed)-early“- und „late“-Proteine unterschieden, wobei der Nachweis von Immediate Early-Genexpression den erfolgreichen Translokation freier viraler DNA aus dem Zytoplasma in den Nucleus

nachweist [20]. Der Replikationszyklus kann lytisch verlaufen oder das HCMV etabliert eine Latenz, wobei in geringem Umfang *IE* - Genprodukte exprimiert werden und die Replikation danach stoppt. Die neuerliche Expression von *IE*-Proteinen steht in Verbindung mit der HCMV-Reaktivierung. Die *IE* - Genprodukte sind Voraussetzung für die Expression von delayed-early- und late-Proteinen [21]. Delayed-early-Proteine initiieren die Replikation viraler DNA durch die virale Polymerase und late-Proteine sind für den Zusammenbau des HCMV-Kapsids von Bedeutung [19]. Das Verpacken der Nukleinsäure in präformierte Kapside wird durch den Terminase-Komplex organisiert [22, 23].

Der Austritt des HCMV-Kapsids aus der Kernmembran geschieht durch Formation des Nukleären-Egress-Komplex. Dabei sind auch zelluläre Protein, wie die Proteinkinase C und die Cyclin-abhängige Kinase 1 assoziiert [24]. Der im Zytoplasma stattfindende Zusammenbau der Virionen erfolgt am Assembly-Kompartiment, welches aus veränderten Bestandteilen des zellulären Sekretionsapparat besteht [25].

Der Transfer von viralen Glykoproteinen aus dem endoplasmatischen Retikulum wird unter anderem durch *gL* oder den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor vermittelt [26]. An der äußeren Membran des endoplasmatischen Retikulums reifen die Virionen weiter und erhalten Tegument-Proteine. Über das Golgi-Netzwerk erfolgt das Re-Envelopment und der Zellegress ab etwa 72 Stunden nach der Infektion [6].

1.2 Maternale und Kongenitale HCMV-Infektion

1.2.1 Epidemiologie

Die HCMV-Infektion ist mit Prävalenzraten in Deutschland von 0,01 % bis 0,1 % die häufigste schwangerschaftsbezogene Viruserkrankung und die häufigste Viruserkrankung des Neugeborenen [27, 28]. Die Prävalenz der HCMV-Infektion bei Geburt variiert global und ist in Industrienationen geringer als in weniger entwickelten Ländern. Dabei korreliert sie mit der Seroprävalenz der latenten HCMV-Infektion [5]. Die globale HCMV-Immunglobulin G (IgG)-Seroprävalenz im reproduktiven Alter zeigt Abbildung 3 [29–33].

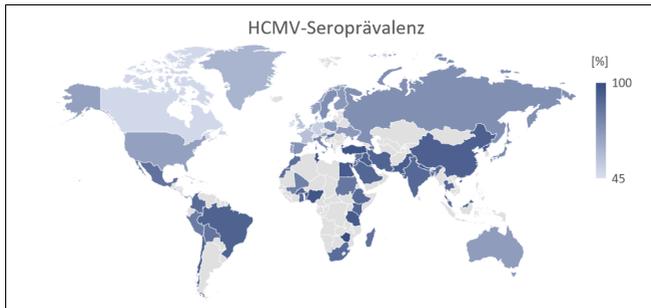


Abbildung 3: Seroprävalenz - Geographische Verteilung von Anti - HCMV Antikörpern in der Bevölkerung im reproduktiven Alter [29-33].

Für Deutschland werden Prävalenzraten zwischen 0,51 und 0,62 für Männer und Frauen angegeben. Die Seroprävalenz steigt mit dem Lebensalter und ist zudem assoziiert mit der Anzahl an Personen im gleichen Haushalt, dem Raucherstatus und dem Bildungshintergrund [34]. Prävalenzen der kongenitalen HCMV-Infektion zeigt Abbildung 4. Die Grundlagen der Datenerhebung wie beispielsweise die Zeiträume der Probengewinnung und das untersuchte Probenmaterial unterscheiden sich. Es sind Länder erfasst, die neben einer hohen HCMV-Seroprävalenz auch eine hohe HIV-Durchseuchung und hohe Raten von Malariaprävalenzen aufweisen. Beides könnte einen Einfluss auf die Pathogenese der kongenitalen HCMV-Infektion haben [35-49].

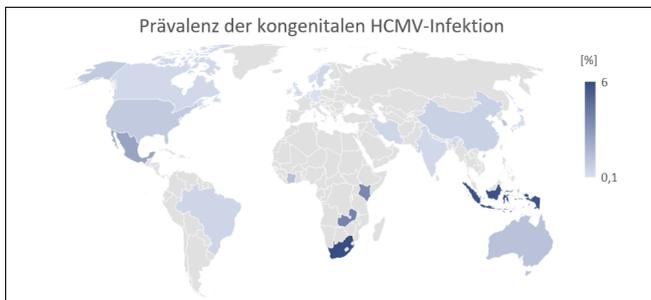


Abbildung 4: Geographische Verteilung der kongenitalen HCMV - Infektion bei Neugeborenen [35-49].

Generell scheint ein niederer sozioökonomischer Status der Schwangeren mit einem erhöhten Risiko, ein kongenital HCMV-infiziertes Kind zu gebären, assoziiert zu sein [50]. Da ein generelles Screening aller Neugeborenen in Deutschland nicht etabliert ist, können populationsbezogene Zahlen nur extrapoliert werden. In den Vereinigten Staaten von Amerika werden geschätzt 40 000 kongenital mit HCMV infizierte Kinder pro Jahr geboren. Damit sind davon mehr Kinder betroffen als beispielsweise vom Fetalen Alkoholsyndrom oder der Trisomie 21 [51]. Für eine Studienkohorte einer neonatologischen Intensivstation werden 0,12 % als Prävalenz angegeben [47].

Das Risiko einer pränatalen diaplazentaren HCMV-Übertragung besteht sowohl bei HCMV-IgG - negativen als auch bei - positiven Schwangeren. Die Wahrscheinlichkeit der Virusübertragung auf den Feten unterscheidet sich aber mit etwa 30 % nach Primärinfektion (PI) deutlich von etwa 3 % nach Nicht-PI im Sinne einer Reaktivierung oder Infektion mit einem zweiten Stamm [50, 52].

Bei PI einer vormals HCMV-IgG negativen Schwangeren verhalten sich diaplazentare Übertragungswahrscheinlichkeit und zu erwartende Schwere der kindlichen Symptome im Schwangerschaftsverlauf gegenläufig. So konnte in einer französischen Studie an 238 Schwangeren mit HCMV-PI und einer Übertragungsrate von 25 % auf die 241 Feten und Neugeborenen (60/241) nach postpartum Evaluation gezeigt werden, dass die Transmissionsrate von etwa 9 % bei HCMV-PI in der präkonzeptionellen Phase (2 Monate bis 3 Wochen vor der Konzeption) auf 40 % bei PI im dritten Trimester ansteigt. Umgekehrt konnte an 60 Feten im pränatalen Ultraschall gezeigt werden, wie Auffälligkeiten nach späteren Infektionszeitpunkten unwahrscheinlicher werden [53].

Symptome einer maternalen HCMV-PI werden in etwa 10 % bis 20 % der evaluierten Fälle angegeben und sind dann unspezifisch, da sie einem grippalen Infekt mit Fieber, Rhinitis und Myalgien gleichen [50, 53]. Daher erfolgt die Diagnose der HCMV-PI in der Schwangerschaft häufig zufällig, durch Erfassen einer Serokonversion in sequenziell abgenommenen Proben oder bei gezielter Diagnostik (vgl. 1.2.4 Labordiagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion) nach Auffälligkeiten im pränatalen Ultraschall [53].

1.2.2 Transmission

HCMV wird durch Aufnahme von virionhaltigen Körpersekreten übertragen. Potenziell kontagiös sind insbesondere Muttermilch, Speichel und Urin aber auch Vaginal- oder

Zervikalflüssigkeit und Ejakulat [54, 55]. Eine besondere Rolle nimmt dabei die Mutter-Kind-Übertragung durch das Stillen als Folge der endogenen HCMV-Reaktivierung in der laktierenden Brustdrüse, bereits wenige Tage postpartum, ein. Insbesondere für Frühgeborene mit geringem und sehr geringem Geburtsgewicht stellt dies ein Gesundheitsrisiko dar [56]. Dabei kann von Reaktivierungsraten weit über 90 % ausgegangen werden, wenn die HCMV-DNALaktie herangezogen wird [57]. Die laktationsbedingte vertikale Virustransmission stellt die vermutlich bedeutendste HCMV-Transmissionsroute dar. Durch langanhaltende Virusausscheidung des infizierten Säuglings, auch über Jahre, wird eine effiziente Virion-Verteilung in dessen Umwelt, im Sinne einer horizontalen Transmission, gewährleistet. Der Einfluss der HCMV-Transmission über infizierte Säuglinge, auch auf die Frequenz der kongenitalen Infektion wird deutlich, wenn man das erhöhte Risiko für maternale Serokonversion bei Besuch einer Kindertagesstätte des eigenen Kindes beachtet [58]. Auch Gruppentreffen im Rahmen des Prager-Eltern-Kinder-Programms konnten als Infektionsquelle beschrieben werden. Wobei die Infektionskette vom Index-Patienten, einem 9 Monate alten Säugling einer seronegativen Mutter, über die Mutter und beide Großmütter aufgedeckt wurde [59]. Eine deutsche Studie konnte 2016 den Zusammenhang zwischen der Arbeit in einer Kindertagesstätte und dem Risiko der HCMV-PI nicht zeigen [60]. Eine großangelegte Kohortenstudie aus Kanada zeigte aber eine Assoziation zwischen positiver HCMV-Serologie und sowohl der Arbeit in der Kinderbetreuung als auch eigenen Kindern [61]. Basierend auf serologischen Daten von Wöchnerinnen aus einer süddeutschen Universitätsklinik kann von einer HCMV-Seroprävalenz von 50 % unter den Frauen im gebärfähigen Alter ausgegangen werden [27].

Als mögliche Transmissionswege können daher Mutter-Kind Kontakte nach Infektion des Kindes in der Kinderbetreuung, die diaplazentare oder laktogene Infektion des Kindes und die Infektion durch Geschlechtsverkehr beschrieben werden. Dazu kommt als Sonderform der HCMV-Transmission die iatrogene Übertragung bei Transplantation solider Organe oder von Stammzellen, wenn der Spender HCMV-IgG positiv und der Rezipient HCMV-IgG negativ getestet wurde [62].

1.2.3 Kongenitale Infektion

Bei der kongenitalen HCMV-Infektion ist der Virusnachweis pränatal aus Fruchtwasser oder fetalem Blut sowie postpartum aus Nabelschnurblut und bis zu 14 bis 21 Tagen auch aus Urin oder Speichel möglich [27]. Die laktogene Infektion des Neugeborenen kann innerhalb der ersten Lebenswochen mit denselben virologischen Befunden auffallen wie die kongenitale Infektion. Daher ist der frühe Nachweis von HCMV aus kindlichen Proben essenziell, da sich postpartale und kongenitale Infektion stark im Hinblick auf Infektionsverlauf, Endorganbefall und Patienten-Outcome unterscheiden. Um bei späteren auffälligen Befunden zwischen kongenitaler und postnataler Infektion zu unterscheiden kann die Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Blut aus Trockenblutkarten des Stoffwechselscreenings hilfreich sein [63, 64].

Bei kongenital infizierten Neugeborenen muss zwischen asymptomatischen und symptomatischen Kindern unterschieden werden. Ebenso können pränatal diagnostizierte Feten bereits Auffälligkeiten im Organultraschall zeigen oder sich dort unauffällig präsentieren.

Die HCMV-assoziierten Ultraschallbefunde können in zerebrale und extrazerebrale Befunde unterteilt werden, wobei die zerebralen Befunde je nach ihrer Schwere mit einem schlechten Outcome für den Fetus assoziiert sind [65].

Tabelle 1: Ultraschallbefunde, assoziiert mit der kongenitalen HCMV-Infektion; nach [65].

Schwere zerebrale Ultraschall-Auffälligkeiten	milde zerebrale Ultraschall-Auffälligkeiten	Extrazerebrale Ultraschallauffälligkeiten
Ventrikulomegalie >15mm Hydrozephalus, Cisterna magna >8mm, Mikrozephalie Agnesie des Balkens, Vermis-Hypoplasie Porenzephalie, Lissenzephalie Periventrikuläre Hyperechogenität oder zystische Läsionen	Milde Ventrikulomegalie, lentigo-striatale Verkalkungen, Kalzifikationen, Adhäsionen, Zysten (subependymal, am Plexus choroideus)	Hyperechogener Darm, Hepatomegalie, hepatische Kalzifikationen, Splenomegalie, IUGR-Wachstum, Oligo- oder Polyhydramnion, Fetaler Aszites, Pleuraergüsse

IUGR = intrauterine growth restriction

Bei Neugeborenen imponiert die kongenitale HCMV-Infektion mit Symptomen in der klinischen Untersuchung, auffälligen Laborbefunden oder auffälligen Befunden in der apparativen Diagnostik wie der zerebralen Bildgebung, Ophthalmoskopie oder der Hirnstammaudiometrie [66].

Tabelle 2: Befunde des Neugeborenen, assoziiert mit der kongenitalen HCMV-Infektion; nach [66].

Untersuchungsbefunde	Laborbefunde	Apparative Diagnostik
Petechien Hepato-; Splenomegalie Mikrozephalie Wachstumsverzögerung	Thrombozytopenie, ↑ Aminotransferasen/ Bilirubin Auffällige Liquorindices HCMV-Nachweis in Liquor	Intrakranielle Kalzifikationen Chorioretinitis Sensorineuronaler Hörverlust

Die frühe, HCMV-gerichtete Diagnostik des bei Geburt mit in Tabelle 2 genannten Symptomen auffallenden Neugeborenen ist relevant, da eine zielgerichtete, antivirale Therapie (Absatz 1.3.3) einen Einfluss auf das spätere Outcome haben kann [66].

Dies ist von Bedeutung, da die kongenitale HCMV-Infektion eine bedeutsame Ursache für Schwerhörigkeit und Ertaubung im Kindesalter darstellt. Hörbeeinträchtigungen können auch bei initial asymptomatischen Neugeborenen im späteren Leben auftreten. Es kann davon ausgegangen werden, dass Fälle von bei Geburt asymptomatisch infizierten Kindern nicht erkannt werden, weswegen in Publikationen immer wieder ein universelles Neugeborenen-screening auf HCMV, ähnlich dem Hörscreening oder dem Stoffwechselscreening, gefordert wird [67, 68]. Zudem scheint es auch unter den Schwangeren einen hohen Grad an Akzeptanz für die Bestimmung des HCMV-Serostatus zu geben [68].

1.2.4 Labordiagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion

In der Labordiagnostik von HCMV kann zwischen dem Antikörpernachweis und dem Virusnachweis in Zellkultur oder durch Nukleinsäureamplifikation unterschieden werden.

In der Schwangerschaft stellt die HCMV-Serologie eine Möglichkeit dar, Frauen mit dem Risiko einer HCMV-PI zu identifizieren. Im natürlichen Infektionsverlauf zeigt der initiale Nachweis von Immunglobulinen der Klasse M (IgM) und der kurz darauffolgende Anstieg der IgG mit noch niedriger Avidität und sequenziellem Abfall von IgM die HCMV-PI. Zudem ist die IgG-Aviditätsmaturation ein wichtiger Hinweis auf das Vorliegen der PI [27, 69, 70]. Da selektive Antikörper gegen spezifische HCMV-Glykoproteine frühestens 3 Monate nach PI nachgewiesen werden können, eignet sich deren Nachweis zur Eingrenzung des Infektionszeitpunktes [27, 71]. Die aktuelle Leitlinie zur Diagnostik schwangerschaftsrelevanter Viruserkrankungen empfiehlt, bei Verdacht auf Vorliegen einer HCMV-PI eine Serologie-basierte Stufendiagnostik. Zum

Antikörpernachweis stehen Ligandenassays, Immunblots und Neutralisationsassays zur Verfügung. Letztere werden eher in Ausnahmefällen in der Routinediagnostik verwendet [72]. Da in Deutschland kein generelles Screening auf HCMV-IgG in den Mutterschaftsrichtlinien des gemeinsamen Bundesausschuss vorgesehen ist und die Messung von HCMV-IgG als individuelle Gesundheitsleistung von der Schwangeren selbst bezahlt werden muss, werden die meisten PIs zufällig diagnostiziert [73].

Kommt es durch diaplazentare Virustransmission zur fetalen Infektion, gelingt der Nachweis der kongenitalen HCMV-Infektion pränatal durch den Nukleinsäurenachweis und Virusisolierung aus Amnionflüssigkeit [74].

Die Diagnose der akuten HCMV-PI der Schwangeren ist Grundlage der Untersuchung des Fruchtwassers zum Nachweis einer fetalen Infektion. Der frühere diagnostische Goldstandard basiert auf der Generierung eines HCMV-typischen zytopathischen Effekts und der immunhistochemischen Färbung viraler *IE1*-Expression in 18h-Mikrokultur aus Fruchtwasser. Methoden zum Nukleinsäurenachweis, wie die qualitative PCR oder quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR), sind mittlerweile die am häufigsten verwendeten Methoden in der Diagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion aus Fruchtwasserproben [75–77].

Der direkte Virusnachweis durch Mikrokultur oder PCR-Methoden ist vergleichbar in Sensitivität und positivem Vorhersagewert [78]. Bei der Untersuchung von Fruchtwasserproben nach Amniozentese (AC) ist der Zeitraum zwischen Infektionszeitpunkt und Probenentnahme entscheidend für die Sensitivität der Diagnostik, die Bewertung des Ergebnisses und folglich der Risikoeinschätzung der maternofetalen Transmission [79]. Liesnard et al. postulierten die höchste Sensitivität und Spezifität für PCR-Untersuchungen nach der 21. Schwangerschaftswoche (SSW) [80]. Diese Schwelle wurde ergänzt um einem Zeitraum von mindestens 6 Wochen zwischen Diagnose der PI und AC [81]. Enders et al. zeigten, dass eine Ausweitung dieses Zeitraums auf 8 Wochen dazu führt, dass die Sensitivität der PCR aus Fruchtwasser, das nach 17 Wochen gewonnen wurde, vergleichbar mit dem Ergebnis von Untersuchungen nach 21 Wochen ist [82].

Die gezielte retrospektive Diagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion bei symptomatischen Neugeborenen kann aus Speichel in Form eines Rachenabstrich, Urin

oder in Fällen in denen die Zeitspanne zur klaren Abgrenzung von einer postnatalen laktogenen HCMV-Infektion überschritten ist, auch aus dem Blut der Trockenblutkarte unternommen werden [64].

1.2.5 Präventive Ansätze zur Vorbeugung kongenitaler HCMV-Infektionen

Effiziente Infektionsprävention setzt die Kenntnis von Übertragungswegen und Risikoverhalten sowohl bei Ärzten und Hebammen als auch bei den Patientinnen voraus. Einen grundlegenden Ansatz zur Prävention der cHCMV stellt die Prävention der maternalen PI dar.

1.2.5.1 *Hygieneberatung*

Eine australische Studie demonstrierte, basierend auf Email-Fragebögen, dass sowohl Hebammen als auch Fachärzte überwiegend unsicher in der Informationsübermittlung bezüglich HCMV sind [83]. Diese Beratung der Schwangeren zielt auf Kontaminationsvermeidung durch Maßnahmen wie Händewaschen nach Kontakt mit Körperausscheidungen des älteren Geschwisterkinds und Vermeiden von Küssen auf den Mund oder Teilen von Essbesteck mit dem Geschwisterkind ab. Die ausführliche Information über dieses Risikoverhalten und Hygieneberatung sowie die Risiken einer HCMV-PI bei HCMV-seronegativen Schwangeren stellt ein moderates Mittel dar, um eine Verhaltensänderung herbeizuführen [84]. Beratung kann bei schwangeren, HCMV-negativen Frauen mit einem Geschwisterkind, das HCMV ausscheidet, die Serokonversionsrate verringern [85]. Eine französische Studie untersuchte die Rate von Serokonversionen nach der 12. SSW nach erfolgter Hygieneberatung und einem HCMV-Screening. Hier wurde eine Infektionsrate von 0,19 % erreicht [86]. Sinnvolle Hygieneberatung setzt die Bestimmung des HCMV-Serostatus als Teil des Studiendesigns voraus [87]. Daher bleibt oft unklar, welchen Einfluss die Kenntnis des eigenen Infektionsrisikos auf die konsequente Anwendung der Hygienemaßnahmen hat. Bemerkenswerterweise konnte in verschiedenen Studien eine hohe Therapieadhärenz der Schwangeren gegenüber den empfohlenen Präventionsmaßnahmen festgestellt werden. Hughes et al. sprechen in diesem Zusammenhang von einem Ceiling-Effekt, der sich, basierend auf einer bei Schwangeren grundsätzlich hohen Adhärenz bezüglich Verhaltensregeln effektlimitierend auswirken könnte [84].

1.2.5.2 *Aktive Immunisierung*

Einen weiteren, prinzipiell möglichen Ansatz der Primärprävention der kongenitale HCMV stellt die aktive Impfung dar, um das maternale Immunsystem zur Kontrolle der HCMV-PI zu befähigen, bevor die Plazenta und der Fetus infiziert werden können. Dabei werden in einer Übersichtsarbeit gewisse Schwierigkeiten aufgezeigt, die den jahrzehntelangen Versuch der Entwicklung eines effizienten HCMV-Impfstoffes geprägt haben: Exzellente Immun-Evasionsmechanismen des HCMV; bestehende Unklarheit über die konkreten Immunkorrelate, welche die Infektion unter Kontrolle halten; fehlende Tiermodelle und der transiente und komplexe Charakter der Plazenta als schützenswertes Organ [88].

Es sind bereits viele verschiedene Ansätze der Impfstoffentwicklung gegen HCMV in Phasen klinischer Studien gelangt. Darunter Impfstoffe basierend auf rekombinanten *gB*-Untereinheiten, umhüllte virusähnliche Partikel die beispielsweise zur Expression eines HCMV-*gB*/vesicular stomatitis virus G-Protein-Fusionsproteins führen, Vector-basierte Impfstoffe, Nukleinsäure-basierte Ansätze und attenuierte Lebendimpfstoffe [89].

Die meisten Fortschritte in klinischen Studien erzielten die *gB*-basierten Ansätze, wobei in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase-2-Studie an 464 HCMV-seronegativen Frauen, im ersten Jahr nach Geburt eines Kindes 18 Infektionen in der Impfgruppe 31 Infektionen in der Placebogruppe gegenüber standen [90]. Eine vergleichbare Studie an 402 seronegativen Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren die ebenfalls 20 µg rekombinantes *gB* und Adjuvans oder Placebo in 3 Dosen erhalten hatten, endete mit 48 HCMV-PI (21 in der Impfgruppe und 27 in der Placebogruppe) ohne einen signifikanten Unterschied zu zeigen [91]. Die Serokonversionsraten unter Prävention durch Impfung sind bislang nicht besser als die Prävention durch Hygieneberatung und Hygienemaßnahmen [27].

1.2.5.3 *Präventive Behandlung nach maternaler PI*

Passive Immunisierung

Neben den Ansätzen zur Prävention der maternalen HCMV-PI wird kontrovers diskutiert, ob bei erfolgter maternaler Infektion in oder kurz vor Eintritt der Schwangerschaft, eine prophylaktische passive Immunisierung der Schwangeren mit HCMV spezifischen Immunglobulin-Präparaten (Hyperimmunglobulin: HIG) oder auch Standard-

immunglobulinen die Rate der diaplazentaren Virustransmissionen verringert [63, 92]. Die Anfänge dieses Prinzips basieren auf Einzelfallberichten der Symptomreduktion bei bereits infizierten Feten durch maternale oder fetal-intraperitoneale Applikation von HIG [93, 94]. Daran anschließend wurden mehrere prospektive Studien und retrospektive Fallserien der maternalen HIG-Applikation veröffentlicht, die zu verschiedenen Ergebnissen gekommen sind.

Nigro et al. verglichen in einem Studienarm zur Prävention der Infektion der Plazenta die Wirkung von monatlichen Infusionen von 100 Einheiten/Kilogramm Körpergewicht (U/kgKG) HIG an 37 Schwangeren mit einer unbehandelten Kontrollgruppe von 65 Schwangeren. Das mediane Schwangerschaftsalter bei angenommener PI lag in der Gruppe der Frauen, die HIG zu Prävention erhalten hatten, in der 14. SSW und in der Kontrollgruppe in der 20. SSW. HIG wurde im Median in der 19. SSW das erste Mal appliziert. In der Studiengruppe wurden 6/37 mit 19/47 kongenital HMCV-infizierten Kindern der Kontrollgruppe verglichen ($p = 0,02$). Der Kontrollarm wurde, bedingt durch 18 Aborte, von 65 auf 47 Fälle dezimiert [95].

Eine deutsche, retrospektive Beobachtungsstudie an 42 Schwangeren untersuchte die Wirkung von HIG in unterschiedlichen Dosierungen (\bar{x} : 200 U/kgKG) auf die Inzidenz der kongenitalen HCMV-Infektion. Wobei nur in sechs Fällen die AC zur Diagnosestellung aus Fruchtwasser durchgeführt wurde. Vier HMCV-positive Fruchtwasserproben wurden in eine Behandlungsgruppe aufgenommen. Wären diese Proben nicht vor Gruppeneinschluss untersucht beziehungsweise wäre die Auswertung nach dem Intention-to-treat-Prinzip durchgeführt worden, läge die kumulierte Transmissionsrate bei 30,2 % statt der angegebenen 23,1 %. Der Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Therapieindikation wird nicht angegeben, kann aber anhand der Angaben nachgerechnet werden und liegt im Median bei 13,5 Tagen. Die cHMCV-Raten wurden für den vermuteten Zeitpunkt der maternalen PI, getrennt in perikonzeptionell/erstes Trimester und zweites Trimester angegeben mit 20,8 % beziehungsweise 26,6 % [96]. Um zu einem Vergleich mit Transmissionsraten unbehandelter Schwangerer zu gelangen wurden zwei Studien bemüht, die die Transmissionsrate nach PI in verschiedenen Schwangerschaftsphasen mit 34,5 % und

44,1 % beziehungsweise 30,1 % und 38,2 % für PI im ersten und zweiten Trimester angeben [97, 98].

2014 veröffentlichte Ergebnisse einer randomisiert-kontrollierten Studie (RCT) von Revello et al. mit 124 Schwangeren nach diagnostizierter HCMV-PI zwischen der 5. und 26. SSW, die die HCMV-Übertragungsfrequenz nach maternalen HIG-Behandlung zur Prävention der diaplazentaren Virustransmission als primären Endpunkt mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglich, schließen damit, dass es durch die Behandlung zu keiner signifikanten Reduktion der Übertragungsfrequenz kommt. Die relative Transmissionshäufigkeit konnte durch HIG um 14 bzw. 32 Prozentpunkte reduziert werden (44 % in der Kontrollgruppe und 30 % in der Behandlungsgruppe) [99].

Unter der Annahme, dass das von Nigro und Revello eingesetzte vierwöchige HIG-Infusionsintervall nach pharmakokinetischen Kriterien zu lange sein könnte, um effektiv der diaplazentaren HCMV-Transmission vorzubeugen, wurden auch andere, zweiwöchige Schemata vorgestellt, bei denen zudem eine höhere Dosierung gewählt wurde [100]. Zudem wurde der Revello-Studie eine relative Risikoreduktion von 60 % einer früheren Beobachtungsstudie zugrunde gelegt [95], was in der Folge eine als zu hoch eingeschätzte Power der Studie vermuten lässt [101]. In der HIG-Behandlungsgruppe wurden mehr ernste Komplikationen wie Frühgeburtlichkeit, Präeklampsie und fetale Wachstumsverzögerung beschrieben als in der Placebo-Gruppe. Diese Effekte wurden von späteren Publikationen so nicht wiedergegeben: In drei Studien mit 40, 42 und 50 HIG-behandelten Schwangeren mit 152, 115 beziehungsweise 141 Einzeldosen mit jeweils 200 U/kgKG HIG intravenös kam es jeweils explizit nicht zu den genannten ersten Komplikationen [96, 102, 103].

2011 wurde eine RCT vorgestellt, bei der ebenfalls monatlich HCMV-HIG (100 U/kgKG intravenös, Cytogam) gegen Placebo in der Prävention der diaplazentaren Übertragung untersucht werden sollte. Die Gesamtkohorte sollte 800 Teilnehmerinnen umfassen [104]. Eine Zwischenauswertung von 394 Datensätzen ergab fetale Infektionsraten von 22,4 % in der HIG-Gruppe und 19,4 % in der Kontrollgruppe, woraufhin die Studie gestoppt wurde [105].

Eine aktuelle Studie von Kagan et al. greift das bekannte Problem der unterschiedlichen Dosierungsintervalle und HIG-Konzentrationen auf und beschreibt im prospektiven

Ansatz die Wirkung von HIG auf die Transmissionsrate. Bei 40 Schwangeren mit PI, deren erste HIG-Dosis vor der 15. SSW appliziert wurde, kam es in lediglich drei Fällen zur Transmission [102]. Tabelle 3 zeigt relevante Studien zum Effekt von HIG auf die HCMV-Transmissionsfrequenz nach PI.

Tabelle 3: Studien zur Hyperimmunglobulin (HIG)-Prävention der materno-fetalen Transmission von humanen Zytomegalieviren (HCMV) nach maternaler Primärinfektion (PI).

Studie (Publikationsjahr)	Zeit raum	Typ	n	Einschluss	Endpunkt (i.d.R. Transmission)
Nigro et al. (2005) [95]	1995-2003	Prospektiv, 100U/kgKG, 4-wöchentlich	37	PI in Schwangerschaft oder perikonzeptionell, erste HIG-Dosis (\bar{x}): 19. SSW	6/37 HIG+ (16%); 19/47 HIG- (40%)
Revello et al. (2011) [99]	2009-2011	RCT, 100U/kgKG, 4-wöchentlich	61	PI, zwischen 5. & 26. SSW, bis 6 Wochen nach PI, erste HIG-Dosis (\bar{x}): 17. SSW	18/61 HIG+ (29%); 27/62 Placebo (44%)
Buxmann et al. (2012) [96]	2006-2010	Retrospektiv 200U/kgKG, \bar{x} : 2 Gaben	39	PI-Diagnose in Trimenon 1 (63%) oder 2 (37%)	9/39 HIG+ (23%)
Hughes et al. (2019) [104, 106]	2012-2018	RCT, 100U/kgKG, 4-wöchentlich	206	PI-Diagnose <24.SSW, erste HIG-Dosis (\bar{x}): 16. SSW	46/206 HIG+ (22%); 37/193 Placebo (19%)
Kagan et al. (2019) [102]	2013-2017	Prospektiv, 200U/kgKG, 2-wöchentlich	40	PI-Diagnose <15. SSW, erste HIG-Dosis (\bar{x}): 10. SSW	3/40 HIG+ (7,5%)
Delle-Chiaie et al. (2018) [103]	2007-2016	Retrospektiv, 200U/kgKG, 2-3 wöchentl.	50	PI-Diagnose in Trimenon 1 bei 20, 2 bei 23 und 3 bei 7 Frauen, erste HIG-Dosis (\bar{x}): 13. SSW	15/49 HIG+ (31%)
Blázquez-Gamero et al. (2019) [107]	2009-2015	Retrospektiv, 100U/kgKG, 4-wöchentlich	17	PI-Diagnose vor HCMV-positiver Amniozentese	7/17 HIG+ (40%)

kgKG: Kilogramm Körpergewicht; RCT: randomisierte kontrollierte Studie; SSW: Schwangerschaftswoche.

Die in der Tabelle genannten Studien sind inhomogen bezüglich der Einschlusskriterien und der Therapieschemata. Zudem sind Studien aufgeführt, bei denen Prävention und Behandlung der HCMV-Transmission gleichermaßen untersucht werden und lediglich das Ergebnis einer eventuell durchgeführten AC in Bezug auf HCMV-Transmission eine Zuteilung zum einen oder anderen Arm bedingt. Generell werden in den Studien Transmissionsraten von 7,5 % bis 40 % unter HIG beschrieben. Dem gegenüber stehen Raten von 19 % bis 44 % ohne HIG oder mit Placebo.

Insbesondere sind die beiden RCTs im Design vergleichbar. Auch die zentralen Tendenzen der ersten HIG-Gaben liegen im Schwangerschaftsverlauf eng beieinander. Aus den veröffentlichten Ergebnissen lässt sich aber schwer erklären, weshalb die Transmissionsrate (Placebogruppe) der multizentrischen Studie des Eunice Kennedy

Shriver National Institute of Child Health and Human Development mit 19 % so deutlich unter jener in Italien erhobenen liegt [99, 105].

Virostatika

Einen alternativen Ansatz zur Gabe von Anti-HCMV-IgG stellt die Gabe des Prodrugs Valaciclovir (ValACV) zur Behandlung der maternalen PI dar. Ein Fallbericht schildert die effektive Reduktion der maternalen Virämie durch Gabe von 8 g ValACV nach PI im 2. Trimenon. Nach einer negativ ausgefallenen AC wurde die antivirale Therapie in 24 + 5 SSW unter Fortführen eines Monitorings auf HCMV-Virämie beendet [108].

2019 wurden die Ergebnisse einer RCT vorgestellt, bei der die Wirksamkeit von 8 g ValACV pro Tag, verglichen mit Placebo bei Frauen mit HCMV-PI in der Prävention der vertikalen Virustransmission untersucht werden sollte. Den primären Endpunkt stellte die virologische Untersuchung des Fruchtwassers frühestens in der 21. SSW dar. Sekundär wurde die Frequenz symptomatischer HCMV-Infektionen im Zeitraum bis eine Woche nach Geburt evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass in 4/45 Fällen in der ValACV verglichen mit 14/45 Fällen in der Placebogruppe HCMV diaplazentar übertragen wurde [109].

1.3 Therapie

Die Therapie der kongenitalen HCMV-Infektion kann in pränatale und postnatale Ansätze unterteilt werden.

1.3.1 Pränatale Therapieansätze -HIG

Die Therapie der in-utero symptomatischen kongenitalen HCMV-Infektion wurde 1999 von Nigro in einem Fallbericht einer Zwillingsschwangerschaft beschrieben. Nach dreimaliger maternaler Infusion von 200 U/kgKG HIG an drei Tagen und einmaliger intraamniotischer HIG-Applikation von 400 U bildete sich ein bestehendes placentares Ödem zurück. Einer der Feten war zuvor mit einem Wachstumsstillstand aufgefallen. In der Amnionflüssigkeit konnte HCMV nachgewiesen werden [93]. Weitere Studien an symptomatisch HCMV-infizierten Feten zeigten eine Reduktion der Frequenz postnatal symptomatischer HCMV-Infektionen: Eine prospektive Studie verglich 31, nach HCMV-Nachweis aus Fruchtwasser mit HIG-behandelte Schwangere, mit 14 unbehandelten Schwangeren. Nur ein symptomatisches Kind wurde für den Behandlungsarm berichtet

und stand sieben symptomatischen Neugeborenen in der Vergleichsgruppe gegenüber [95]. Buxmann et al. berichteten von vier Feten, bei denen vor HIG-Applikation bereits HCMV im Fruchtwasser detektiert werden konnte. Drei davon waren bei Geburt asymptomatisch. Eines fiel mit symptomatischer postpartaler HCMV-Infektion auf [96]. Einen Überblick zur Studienlage der pränatalen Behandlung mit HIG bietet Tabelle 4.

Tabelle 4: Studien zur pränatalen Behandlung von infizierten Feten mit Hyperimmunglobulin (HIG).

Studie (Jahr)	Zeit raum	Typ	n	Einschluss	Ergebnis
Nigro et al. (2005) [95]	1995-2003	Prospektiv, 200U/kgKG, 2-6 wöchentlich, variabel intraamnial	31	HCMV-positiv in AC	1/31: CMV-Krankheit nach 2 Lebensjahren
Nigro et al. (2012) [110]	2004-2012	Prospektiv, 200U/kgKG, 4-wöchentlich; 8 unbehandelte Feten als Kontrollgruppe (7 schwer betroffen, 1 verstorben)	9	Hyperechogener Darm	1/9 symptomatisch nach Geburt; follow-up zwischen 3. & 8. Lebensjahr
Nigro et al. (2012) [111]	2004-2009	Retrospektiv, 200U/kgKG 2-4-wöchentlich, Fall-Kontrollstudie, abhängige Variable: Symptomausprägung	31	Maternale HCMV-PI, <20. SSW	4/31 symptomatisch HIG+; 27/31 asymptomatisch
Yamada et al. (2012) [112]	2005-2010	Prospektiv, variable Dosierung	12	Symptomatische fetale Infektion	9/12 symptomatisch bei Geburt
Buxmann et al. (2012) [96]	2006-2010	Retrospektiv, Observation, 200U/kgKG, zwischen 500 & 1000U intraamnial & intraumbilikal	4	HCMV-positiv in AC	1/4: symptomatisch bei Geburt
Visentin et al. (2012) [113]	2007-2011	Prospektiv, einmalig 200U/kgKG; 37 unbehandelte Kontrollen, 16/37 schlechtes Outcome nach einem Jahr	31	HCMV-positiv in AC	4/31 „schlechtes“ Outcome nach einem Jahr
Blázquez-Gamero et al. (2019) [107]	2009-2015	Retrospektiv, Observation, 200U/kgKG, 8/19 Feten im Ultraschall auffällig, 3 „lost to follow-up“	19	HCMV-positiv in AC	8/16: symptomatisch bei Geburt

AC: Amniozentese; PI: Primärinfektion; SSW: Schwangerschaftswoche.

Dabei fällt auf, dass zum einen die Studiendesigns sowohl im methodologischen Ansatz als auch in Dosierungsschemata inhomogen sind. Des Weiteren handelt es sich stets um kleine Behandlungsgruppen zwischen vier und 31 Feten. Die kontrollierten, prospektiven Studien zeigen in den HIG-Behandlungsgruppen signifikant weniger symptomatische Neugeborene oder Kinder mit Folgeschäden (3 % bis 13%) verglichen mit unbehandelten maternalen Kontrollgruppen (43 % bis 100 %) [114].

1.3.2 Pränatale Therapieansätze - Valaciclovir

Der passiven Immunisierung steht die antivirale Therapie gegenüber. Nach einer ersten Beobachtungsstudie an 20 Schwangeren und 21 Feten nach gesicherter diaplazentarer HCMV-Transmission konnte unter maternaler Einnahme von 8 g ValACV täglich gezeigt

werden, dass therapeutisch wirksame Konzentrationen von Aciclovir im maternalen und fetalen Kompartiment erreicht werden [115]. Eine daran angeschlossene Phase-II-Studie mit medianem Therapiebeginn in der 25. SSW zeigt die Effektivität von hoch dosiertem ValACV in der Reduktion der Symptomschwere bei moderat symptomatisch infizierten Feten. Verglichen mit einer historischen Kontrolle wird der Anteil der bei Geburt asymptomatisch HCMV-infizierten Neugeborenen von 43 % auf 82 % angehoben [116]. In einer italienischen Fallserie an 12 Schwangeren konnte mit 8 g ValACV täglich zwischen Diagnose der PI und AC und fortgeführter Therapie im Fall einer diaplazentaren HCMV-Übertragung einer Übertragungsrate von 12 % (bis AC) bzw. 42 % (bis Geburt) beobachtet werden. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang der präventive Ansatz der ValACV-Gabe vor AC und die mögliche wiederkehrende maternale Virämie nach Absetzen von ValACV [117].

1.3.3 Postnatale antivirale Therapie

Postnatale Therapieoptionen für symptomatisch kongenital HCMV-infizierte Neugeborene stellen aktuell die Gabe von intravenösem Ganciclovir und oralem Valganciclovir (ValGCV) dar. Eine randomisiert - kontrollierte Untersuchung, in der die sechswöchige Gabe von Ganciclovir mit einer rein symptomatischen Therapie verglichen wurde, zeigte bei Neugeborenen mit Beteiligung des zentralen Nervensystems eine Überlegenheit der antiviralen Therapie mit Bezug auf die Hörfähigkeit (weniger Verschlechterung im Ergebnis der Hirnstammaudiometrie). Gleichzeitig trat während der Behandlung signifikant häufiger eine ausgeprägte Neutropenie auf [118]. Darauf aufbauend wurde in einer Placebo-kontrollierten Studie an 96 Neugeborenen eine sechsmonatige mit einer sechswöchigen Gabe von ValGCV oder Placebo verglichen. Als primärer Endpunkt wurde die Veränderung des Ausgangswerts des Hörens auf dem besseren Ohr zum Wert nach sechs Monaten analysiert. Die neurologische Entwicklung stellte einen sekundären Endpunkt dar. Während bei der Evaluation des primären Endpunktes kein Unterschied festgestellt werden konnte, beeinflusste die längere Einnahme von ValGCV allerdings die neurologische Entwicklung signifikant. Die Gabe von ValGCV ist mit einer Neutropenie assoziiert, wobei diese auch in der Kontrollgruppe unter Placebogabe auftrat [66].

Mit verschiedenen ärztlichen Interventionsmöglichkeiten, angefangen bei der Hygieneberatung der Schwangeren mit einem Risiko für den Erwerb einer HCMV-PI, über eine pränatale Behandlung mit nebenwirkungsarmen Medikamenten bis hin zur postnatalen Therapie, steht eine Vielzahl von Optionen zur Verfügung. Grundlage eines effektiven Managements der HCMV-PI ist allerdings immer die Kenntnis über das individuelle Risiko der Schwangeren.

1.4 Die Plazentaschranke im Kontext der HCMV-Infektion

1.4.1 Entwicklung & Aufgaben der Plazenta

Nach der Fertilisation der gesprungenen Eizelle durchwandert die Zygote mehrere Entwicklungsstadien, bevor sich die aus Embryoblast und Trophoblast bestehende Blastozyste dem Uterusepithel annähert. Zur Implantation stellt der Trophoblast die mit dem Uterus in Kontakt tretende Zellschicht dar. Es können Anteile mit einkernigen Zellen (Zytotrophoblast) von vielkernigen Anteilen (Synzytiotrophoblast) unterschieden werden. Die Implantation erfolgt in dezidual vorbereitetes Endometrium von welchem synzytiotrophoblastäre Zellen zunächst das uterine Bindegewebe invadieren und dann das kapilläre Gefäßbett arrodieren und Lakunen mit maternalem Blut füllen. In diese blutgefüllten Sinusoide wachsen vom Zytotrophoblasten ausgehende Primärzotten ein und entwickeln sich durch Bindegewebsproliferation und Kapillarisation zu funktionsfähigen Tertiärzotten an denen der Stoffaustausch zwischen maternalem Blutpol und kindlichen Kapillaren stattfindet [119, 120]. Während der endovaskulären Invasion ändern zytotrophoblastäre Zellen ihre membranäre Rezeptorausstattung und exprimieren angiogene Faktoren wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und den plazentaren Wachstumsfaktor (PlGF). Dies wird unter anderem einem sich verändernden Sauerstoffpartialdruck zwischen Uterushöhle und maternalem Kapillarnetz zugeschrieben [121]. Die Plazentaschranke, die den maternalen vom fetalen Blutkreislauf trennt, besteht aus Synzytiotrophoblast und den Endothelzellen des kindlichen Kapillarnetzes. Neben Sauerstoff und Nährstoffen werden auch IgG über diese Barriere transportiert. Synzytiotrophoblastär exprimierte, kindliche Fc-Rezeptoren oder der Fc-gamma Rezeptor 2b, welche IgG binden können, scheinen in diesem Kontext eine Rolle zu spielen. Durch Transzytose gelangt dabei IgG an das Endothel [122, 123]. Dabei werden vermehrt IgG der Subklasse 1 transportiert und die fetalen IgG-Spiegel nehmen zum Ende

der Schwangerschaft zu, während die maternalen IgG Spiegel auf etwa 60 % bis 70 % des Wertes im ersten Trimenon abfallen [124].

1.4.2 HCMV-Plazentitis

Kongenitale Infektionen können zum einen durch eine den Genitaltrakt affektierende Infektion oder ascendierende Erreger bedingt sein. Zum anderen stellt der hämatogene Weg eine relevante Infektionsquelle dar. Häufig wird die in-utero Infektion mit HCMV als von den Dezidualzellen des Uterus ausgehend beschrieben [125].

Der immunhistochemische Nachweis von HCMV IE-Antigen in infizierten Placenten gelingt insbesondere im Bindegewebe der Villi. In infiziertem Plazentagewebe können schwere, chronische Schäden in den Villi nachgewiesen werden [126].

Ein Fallbericht aus dem Jahr 2011 verband die Befunde eines generalisierten fetalen und plazentaren Ödems und maternalen Symptomen einer Präeklampsie (siehe Absatz 1.4.3) mit dem Befund einer akuten HCMV-Infektion in der 26. SSW. Bei der postpartalen Aufarbeitung des Plazentagewebes zeigten sich sowohl eine chronische Villitis mit Infiltration von lymphoplasmozytären Zellen und Ödemen, Fibrindeposition als auch disseminiert zytomegale Riesenzellen, ein vaskulitisches Bild und Kalzifikationen [127]. Diese Befunde decken sich mit einem zuvor veröffentlichten Fall einer Schwangeren, die sich mit dem Bild einer schweren Präeklampsie vorstellte. Bei der fetalen Autopsie zeigt sich das Bild einer massiven, disseminierten HCMV-Infektion [128].

In histopathologischen Vergleichsstudien von HCMV-infizierten und nicht-infizierten Plazenten konnte gezeigt werden, dass das vaskulär-pathologische Bild sich auch in der zellständigen Rezeptorexpression des Endothels widerspiegelt. An 18 unbehandelten, HCMV-infizierten Plazenten, drei Plazenten nach HIG-Behandlung und fünf Kontrollen, konnten relevante Unterschiede in der Expression von VEGF und dessen Rezeptor fms-like Tyrosinkinase 1 (Flt1) zwischen infizierten Proben und Kontrollen gezeigt werden. Bei Bestimmung der löslichen Komponenten PlGF und dem soluble-Flt1 (sFlt1) aus Fruchtwasserproben zeigt sich im Mittel eine sFlt1-Erhöhung zusammen mit einer PlGF-Erniedrigung verglichen mit den Kontrollen. Das resultiert in einer Erhöhung des sFlt1/PlGF-Quotienten. Dieser spiegelt, so die Autoren, eine Dysregulation der plazentaren Angiogenese und damit verbundenen Hypoxie wieder [129].

1.4.3 sFlt1, PlGF & Präeklampsie

Die beiden Proteine sFlt1 und PlGF werden aktuell insbesondere in der Risikostratifizierung von Patientinnen mit vermuteter Präeklampsie angewendet. Die Präeklampsie wurde als starke inflammatorische Reaktion und endotheliale Dysfunktion in uterinen Gefäßen beschrieben, welche auch bei asymptomatischen Schwangeren vorkommt, dort aber besser kontrolliert wird [130]. Klinisch erfassbar und relevant wird sie durch eine neue maternale Hypertonie, Proteinurie und Ödeme bei 5 % bis 7 % aller Schwangeren nach der 20. SSW. Immunologisch ist ein Anstieg der CD4⁺ T-Zellen und inflammatorischer Zytokine zusammen mit reaktiven Sauerstoffspezies und sFlt1 beobachtet worden [131]. sFlt1 vermag PlGF zu binden und damit proangiogene Signale zu reduzieren. Das steht im Zusammenhang mit einer insuffizienten Remodellierung von Spiralarterien, weshalb erhöhte Konzentrationen von sFlt1, verbunden mit erniedrigten Konzentrationen von PlGF Indikatoren für pathophysiologische Prozesse der Präeklampsie darstellen [132].

In einer prospektiven, multizentrischen Beobachtungsstudie an 1050 Schwangeren konnte für eine sFlt1/PlGF-Ratio < 39 ein negativer Vorhersagewert von 99,3 % für eine Präeklampsie in den nächsten sieben Tagen evaluiert werden. Wobei der positive Vorhersagewert für vier Wochen lediglich bei 36,7 % lag [132].

1.5 Zielsetzung:

In dieser Arbeit werden Untersuchungen an maternalen Serum- und Fruchtwasserproben beschrieben. Es werden viruskulturelle Verfahren, PCR, Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (ECLIA), Immunoblots, Mikroneutralisationstests und proximity extension assays (PEA) verwendet, um folgenden Fragen nachzugehen:

1. Welche Auswirkungen haben eine maternale Behandlung mit HIG oder der HCMV-Transmissionsstatus auf neutralisierende Antikörper oder die Antikörperprofile im Fruchtwasser und Serum zum Zeitpunkt der AC?
2. Gibt es einen Unterschied oder Zusammenhang zwischen der Viruslast im Fruchtwasser, gemessen mittels quantitativer PCR beziehungsweise quantitativer Kurzzeitkultur, und der maternalen Behandlung mit HIG?
3. Lassen sich Unterschiede in der Konzentration der beiden Proteine sFlt1 und PlGF im Serum und Fruchtwasser zwischen maternalen HCMV-Transmitterinnen und Non-Transmitterinnen bei AC nachweisen? Gibt es Hinweise auf einen Einfluss der HIG-Behandlung? Könnten sich quantitative Spiegel dieser pro- und antiangiogenen Proteine als Biomarker für eine vertikale HCMV-Transmission eignen?
4. Lassen sich in gepoolten Fruchtwasserproben, selektiert nach Transmissions- und Behandlungsstatus unterschiedlicher Kohorten, mittels proximity extension Multiplex-Assay unterschiedliche Muster von inflammatorischen Zyto- und Chemokinen identifizieren?

2 Material & Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Eingeschlossen wurden Schwangere, bei denen eine HCMV-PI diagnostiziert worden war. Grundlage dieser Diagnose waren eine auffällige Zusammenschau serologischer Voruntersuchungen nach den Kriterien der S2K-Leitlinie oder selten auch Ultraschallveränderungen, die mit einer HCMV-Infektion assoziiert sein können. Der Untersuchungseinschluss geschah vor dem Hintergrund einer, bei manchen Frauen durchgeführten Behandlung mit HIG. Abbildung 5 zeigt die Kohortenbildung für die einzelnen Untersuchungen:

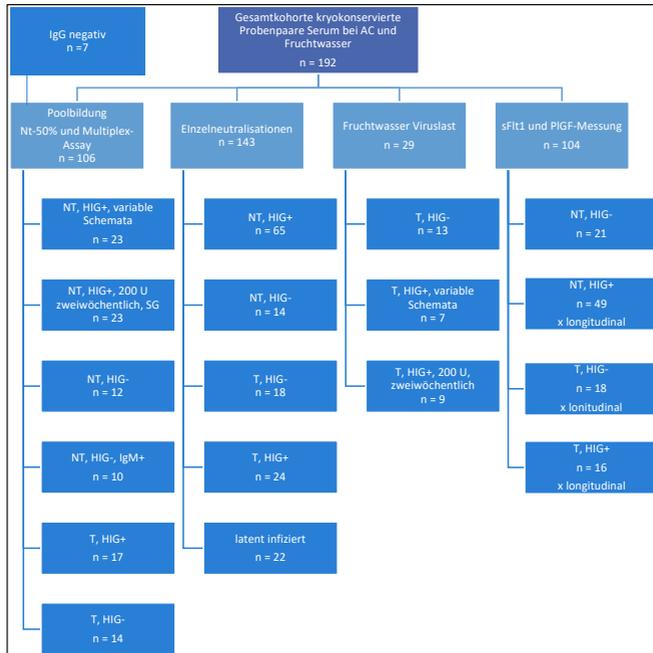


Abbildung 5: Übersicht über die Kohortenbildung aus der Gesamtkohorte unter Verwendung kryokonservierter Probenpaare gewonnen bei Amniozentese (AC).

2.2 Klinische Virusisolate

Für die Neutralisationstests wurde ein klinisches HCMV-Isolat aus Amnionflüssigkeit nach einem Fetozid mit hoher HCMV-Viruslast verwendet, welches die laborinterne Identifikations- und Dokumentationsnummer H2497-11 trägt. Dieses klinische Isolat wurde sowohl in HFF als auch ARPE-19-Zellkultur primär, ohne jeweilige Adaptation auf andere Zellkulturen, isoliert [134].

2.3 Targetzellen

Für die Virusvermehrung als Grundlage von Neutralisationstests sind susceptible Zellsysteme nötig. Die Zellkulturen wurden bei einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

Humane Vorhautfibroblasten (HFF): Fibroblasten wachsen adhärent in DMEM. Der Wechsel des Mediums erfolgte alle sieben Tage unter der Sterilbank. Dieses Zellsystem wurde gewählt, da sich Fibroblasten leicht mit HCMV infizieren lassen. Die Zellkulturen wurden etwa bis Passage 28 verwendet. Wenn das mikroskopisch kontrollierte Wachstumsverhalten sich schon vorher reduziert zeigte, der Zellrasen nicht mehr dicht bedeckt war oder morphologische Auffälligkeiten zeigte, wurden die jeweiligen Zellkulturen bereits vorher verworfen.

Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19): Die Zellen stammen von einem männlichen, 19-jährigen Spender. Verglichen mit den größeren HFF finden sich mehr Zellen pro Fläche. Es resultiert ein höherer Stoffumsatz, weswegen das Nährmedium DMEM-F12 in einem kleineren Intervall, zweimal pro Woche, ausgetauscht wurde. Die Zellen wurden etwa bis Passage 27 verwendet.

2.4 Seren und Fruchtwasser

Es wurden Serum- und Fruchtwasserproben untersucht, welche den Schwangeren um die 20. SSW entnommen wurden. Wenn zu entsprechenden Fruchtwasserproben mehrere Serumproben verschiedener Zeitpunkte der Schwangerschaft vorlagen, wurde für Querschnittuntersuchungen zum Zeitpunkt der AC jene Blutprobe verwendet, die am nächsten am Zeitpunkt der AC entnommen wurde. Im Idealfall wurden beide Materialien am selben Tag gewonnen. Die Proben wurden vornehmlich in der pränatalmedizinischen Abteilung der Universitäts-Frauenklinik Tübingen entnommen. Ein geringer Teil der

Proben wurden dem Referenzlabor für HCMV-Infektionen in der Schwangerschaft von externen Frauenärzten und Kliniken zugesandt. Dabei wurden die Einsender auf die Notwendigkeit des raschen Postversandes für den zellkulturellen Virusnachweis aufmerksam gemacht.

Die Gesamtkohorte der kryokonservierten Proben umfasste zum Erhebungszeitraum Material von 177 Schwangerschaften mit einer Zwillingschwangerschaft. Die Proben wurden in einem Zeitraum zwischen 2007 und 2019 gesammelt. In 16 Schwangerschaften wurde häufiger als einmal eine Fruchtwasserprobe gewonnen. Daher werden 192 Datensätze zur Gesamtkohorte zusammengefasst, die die Grundlage für die Analyse einzelner Parameter in Subkohorten bilden. Serologische Parameter fließen in 182 Datensätze ein. 10 Datensätze beinhalten lediglich Informationen zu PLGF- und sFlt1-Konzentrationen und dem Transmissionsstatus, da die serologische Diagnostik in diesen Fällen in externen Labors durchgeführt wurde. In 151 Fällen konnten sowohl Fruchtwasser als auch Serum am selben Tag gewonnen werden. In 31 Fällen wurde das Serum vor dem Fruchtwasser gewonnen und in 10 Fällen nach der AC. Die mittlere Abweichung der Serum- von Fruchtwasserentnahme betrug 1,5 Tage (SD: 7,9 Tage). Das mediane Gestationsalter zum Zeitpunkt der AC lag bei 21 Wochen (IQR: 2).

Die HCMV-Quantifikation erfolgte unmittelbar nach Eingang im Labor. Sowohl Blut- als auch Fruchtwasserproben wurden für die spätere synchronisierte Aufarbeitung der Konzentrationen von Biomarkern und Antikörpern nach dem Eingang im Labor aliquotiert, archiviert und bei -20 °C beziehungsweise -80 °C kryokonserviert und digital mit Lagerungsort erfasst. Vor der Verwendung wurden die Aliquoten der Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, schüttelgemischt und im Anschluss durch farbliche Markierung auf dem Probengefäß gekennzeichnet, um im Fall der Wiederholung eines Versuchs auf Aliquote zurückgreifen zu können, die noch nicht einem mehrmaligen Gefrier- und Auftauzyklen unterzogen worden sind.

Für die Analyse der diagnostischen Patientenproben im Rahmen der Tübinger HCMV-Forschung besteht ein positives Ethikvotum (Aktuelle Projektnummer 237/2019BO2).

2.5 Reagenzien

2.5.1 Zellkultur

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (4,5g/l Glucose)	Thermo Fisher Scientific
DMEM: Ham's Nutrient Mixture F-12, 1:1	ATCC
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific
Humane Vorhautfibroblasten (HFF)	ATCC
Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)	ATCC
Fötales Kälberserum (FKS) – Fetal Bovine Serum Gold	Thermo Fisher Scientific
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific
Trypanblau-Lösung	Sigma

2.5.2 Neutralisationstests

Klinisches HCMV-Isolat H2497-11	S. Preisetanz/ K. Schweinzer
HCMV-HIG (Cytotect) - 1:3,6 \cong 41,2 U/ml [133]	Biotest
Primärer muriner monoklonaler anti-HCMV IgG E13-Klon, Zielstruktur IE1 (UL122) anti-pp72	BioMérieux
Sekundärer monoklonaler Meerrettich-Peroxidase-anti-Maus- Fc-IgG	Agilent Technologies
Methanol (technisch)	Merck
Gebrauchsfertige AEC-Lösung	
10 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) werden in	Sigma
2,5 ml N, N-Dimethylformamid gelöst und 1:20 mit	Sigma
0,1 M Natriumacetatpuffer verdünnt, sterilfiltriert.	
Vor Gebrauch 1:1000 Zugabe von 33% H ₂ O ₂	Merck
Tris-gepufferte Saline (TBS): Stammlösung (10x)	
60,57 g Tris-Base und	Sigma
87g Natriumchlorid gelöst in	Merck
800 ml Aqua (Ampuwa) mit	Fresenius Kabi
2 N Salzsäure auf pH 7,6 eingestellt	Merck
und mit Aqua auf 1000 ml aufgefüllt, sterilfiltriert	

Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua + 2 ml Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat (TWEEN 20)	Merck
Natriumacetatpuffer:	
Stammlösung (10x)	
82,5 g Natriumacetat und	Merck
28,88 ml Essigsäure 100% mit	Merck
900 ml Aqua (Ampuwa) aufgefüllt und mit	Fresenius Kabi
2 N Salzsäure auf pH 4,9 eingestellt	Merck
und mit Aqua auf 1000 ml aufgefüllt, sterilfiltriert	
Gebrauchslösung: 100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua	

2.5.3 Testsysteme für Antikörper-, Antigen- und Nukleinsäurenachweise

Rekombinanter HCMV-Immunoblot <i>recomLine</i> CMV-Kit (IgG, IgM, IgG Avidität)	Mikrogen
ECLIA-Kit Elecsys CMV IgG-Kit (auch IgG-Avidität)	Roche
ECLIA-Kit Elecsys CMV IgM-Kit	Roche
ECLIA-Kit Elecsys PIGF-Kit	Roche
ECLIA-Kit Elecsys sFLt1-Kit	Roche
real-time PCR-Kit CMV R-gene	Biomérieux
HCMV-WHO Standard (5x10 ⁶ International Units/ml)	NIBCS
Proximity Extension Assay - Inflammatory Panel	Olink

2.5.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sterilbank LaminAir	Heraeus
Thermocycler LightCycler 2.0	Roche
QIAcube – Nukleinsäureextraktor mit QIAmp mini Kit	Quiagen
Cobas e 601 – Analysator	Roche
Inkubator BBD 6220	Heraeus
Inkubator C200	Labotect
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hereus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Inversmikroskop Axiovert 25/100 mit	Zeiss
Fotodokumentation mittels AxioVison	Zeiss
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Pipetten Stripetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Corning Incorporate
Heizblock	Eppendorf
Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge Biofuge	Stratos
Zentrifugenröhrchen BD Falcon 15 ml, 50 ml	Becton-Dickinson
Kunststoffpipetten Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporate
96-Kammern Mikrotiterplatten	Greiner bio-one
Mikroreaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner bio-one
Zellstrainer 70 µm	Greiner bio-one
Neubauer-Zählkammer C-Chip	Digital Bio
Pipettenspitzen TipOne 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab

2.6 Neutralisationstests

Neutralisationsassays dienen dem semiquantitativen Nachweis von HCMV-spezifischen, neutralisierenden Antikörpern in den zu testenden Proben. Dabei macht man sich die gezielte Neutralisation eines definierten Virusisolates vor Infektion eines suszeptiblen Zellsystems zunutze.

2.6.1 Zellkultur

Die Zellkulturmedien enthalten Indikatorlösungen, die durch einen Farbwechsel eine pH-Wert-Veränderung durch Glykolyseendprodukte (Laktat) anzeigen und damit den Hinweis geben, dass das Medium gewechselt werden sollte. Zudem wurden den Zellkulturmedien 1 % Penicillin/Streptomycin und jeweils 10 % FKS zugegeben. Alle Medien, Zusätze und Zellkulturreagenzien wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Zum Wechsel der entsprechenden Medien von HFF- und ARPE-19-Zellen wurde die verbrauchte Nährlösung aspiriert und 5 ml, 12 ml oder 25 ml frisches Medium, je nach Oberfläche der Kulturflasche (25 cm², 75 cm², 175 cm²), zugegeben.

Zur Passagierung der Zellkulturen von HFF und ARPE-19-Zellen bei etwa 90 % konfluiertem Zellrasen wurde das Medium abgenommen und der Monolayer durch einmaliges Spülen mit PBS von etwaigen Rückständen befreit. Zudem wurden dadurch lysierte, nicht mehr adhärente Zellen und Zellreste abgespült und entfernt. Die Zellen wurden mittels Trypsin vereinzelt und abgelöst. Dazu wurden je nach Größe der Zellkulturflasche 1 ml, 3 ml oder 5 ml Trypsin über den Zellrasen pipettiert. Das Ablösen erfolgte binnen etwa sechs Minuten im Inkubator und wurde im Inversmikroskop unter Klopfen kontrolliert. Die Enzymeinwirkung wurde durch Zugabe von mindestens der doppelten Menge frischem Zellkulturmedium unterbrochen. Durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren wurde die Suspension der Zellen erreicht. Die Zelllösung wurde auf frische Kulturflaschen verteilt und die noch fehlende Menge Medium aufgefüllt. Nach wenigen Stunden waren die Zellen wieder adhärent.

Zur Bestimmung der Fähigkeit zur HCMV-Neutralisation der zu untersuchenden Pools und Einzelproben aus Probenmaterial sind standardisierte Monolayer des Zellsystems nötig. Zu Herstellung wurde äquivalent zum Passagieren der Zellkulturen verfahren. Um sicherzustellen, dass nach dem Trypsinieren keine Zellklumpen in das Testsystem gelangen, wurde die Zellsuspension stets durch ein Zellsieb mit 70 µm großen Poren in

ein 50 ml- konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Identifizierung avitaler Zellen erfolgte die Trypanblau-Färbung durch Mischen von 100 µl Zellsuspension mit gleichem Volumen einer 1:2 mit PBS verdünnten und sterilfiltrierten Trypanblaulösung in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup. Trypanblau kann die Zellmembran toter Zellen überwinden und färbt diese intensiv blau. 10 µl der gefärbten Suspension wurden in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Durch Auszählen der nicht-blaugefärbten Zellen der vier Großquadrate ergab sich die Anzahl Zellen pro ml Medium nach der folgenden Formel:

$$\text{Anzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Zellzahl}}{4 \text{ Großquadrate}} \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

Pro Well sollten 2×10^4 Zellen in 100 µl Medium ausgesät werden. Daher wurde die Zellsuspension auf 2×10^5 Zellen pro ml verdünnt. Die Zellen wurden mittels Mehrkanalpipette in 96-Well-Platten überführt. Diese Platten wurden vor Gebrauch nochmals mindestens 18 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.6.2 Poolen von Proben und Komplementinaktivierung

Die Durchführung von Neutralisationstests zur Quantifizierung von HCMV-spezifischen, neutralisierenden Immunglobulinen kann mit singulären Serum- und Fruchtwasserproben geschehen. Ebenfalls möglich ist das Testen gepoolter Proben. Dies bietet den Vorteil, mit einem Test eine Aussage über eine größere Fallzahl treffen zu können. Zudem wird der Einfluss von unspezifischen Effekten einzelner Proben minimiert.

Zur Herstellung von Blut- und Serumpools wurden zunächst, nach serologischem und infektiologischem Vorbefund vergleichbare Proben identifiziert. Dabei konnte in Transmitterinnen (T) und Non-Transmitterinnen (NT) mit oder ohne zuvor durchgeführte Behandlung mit HIG unterschieden werden. Die Behandlung mit HIG wurde weiterhin unterteilt in ein strenges Regime mit strikt zweiwöchentlicher Applikation von 200 Einheiten (U) HIG/ kgKG (NT, HIG+, Studiengruppe analog - SG) und andere Regime ohne diese Dosierung oder dieses Intervall. Zudem wurde eine Kohorte mit erhöhtem IgM (> 1,0 IgM - „cut-off“-Index: NT, HIG-, IgM+ (\bar{x} = 3,71 „cut-off“ Index) zum Zeitpunkt der AC gepoolt. Als Negativkontrolle für die Neutralisationstests erfolgte das Poolen von Blut- und Fruchtwasserproben von HCMV-IgG negativen Schwangeren. Es wurden für jeden Serum- /Fruchtwasserpool jeweils äquivalente Mengen der kryokonservierten Proben nach dem Auftauen in je ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und „gevertort“. Die

Volumina wurden auf mehrere Eppendorf-Gefäße verteilt und bis zur Verwendung wieder bei -80 °C kryokonserviert.

Folgende Pools wurden erstellt:

- *HCMV-IgG negativ* (n = 7)
- *NT, HIG+* (in variabler Dosierung oder Intervall; n = 23)
- *NT, HIG+, SG* (zweiwöchentlich 200 U/kgKG; n = 23)
- *NT, HIG-* (n = 12)
- *NT, HIG-, IgM+* (frühe Infektion bei AC; n = 10)
- *T, HIG+* (n = 17)
- *T, HIG-* (n = 14)

Für die Neutralisationstests aus gepooltem Probenmaterial wurde vor der Kryokonservierung eine Komplementinaktivierung bei 56 °C im Heizblock für 30 min mit anschließender Zentrifugation (1360 g, 5min) und abpipettieren von Zelldebris durchgeführt. Für die Untersuchung von Fruchtwasserpools mittels PEA-Multiplex-Assay wurden Proben verwendet, die zuvor nicht komplementinaktiviert wurden.

2.6.3 Neutralisation & Inokulation

Die Serum- und Fruchtwasserproben sowie die gepoolten Proben wurden im ersten Ansatz als Verdünnungsreihe über vier bis fünf Verdünnungsstufen zur Neutralisation mit dem zellfreien Virusisolat vermischt. Die Verdünnung des Virusisolates wurde anhand der Vorwerte der 50 % tissue culture infective dose (TCID-50 %) -Bestimmung so gewählt, dass in der mitgeführten Viruskontrolle der entsprechenden 96-well Platte etwa 100 HCMV-Plaques gebildet werden.

Zur Verdünnung der zu untersuchenden Probe wurden jeweils Volumina der Probe mit Volumina der dem Zellsystem entsprechenden Medien ohne Zusätze pipettiert, anschließend schüttelgemischt und überführt.

In verschiedenen Ansätzen wurden je nach Zellsystem verschiedene Verdünnungsreihen angelegt und unterschiedliche Volumina des Primärmaterials beziehungsweise dessen Verdünnungen pipettiert. Dazu wurden Vorversuche durchgeführt. Die eingesetzten Verdünnungsstufen können den jeweiligen Ergebnissen entnommen werden.

Abbildung 6 zeigt den Ablauf eines Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT).

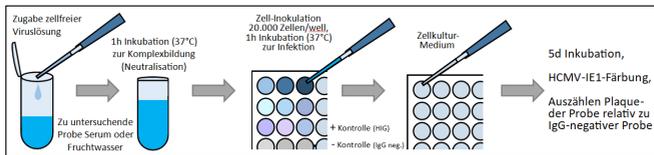


Abbildung 6: Ablauf eines Plaque-Reduktions-Neutralisationstests zur Messung neutralisierender Antikörper; HIG: Hyperimmunglobulin; IgG: Immunglobulin G; HCMV-IE1: immediate early 1 – humanes Zytomegalievirus-Protein.

Durch das Vermischen von zellfreien HCMV-Isolaten mit dem Probenmaterial kommen potenziell darin befindliche HCMV-spezifische Immunglobuline in Kontakt mit einer definierten Menge Virionen. Diese können die spezifischen Immunglobuline in Form eines Antigen/polyvalenten Antikörper-Immunkomplex binden. Findet dies zum Beispiel an viralen Hüllproteinen statt, die nötig sind, um die eingesetzten Zielzellen zu infizieren, erfolgt eine Neutralisation der enthaltenen Virionen relativ zur Viruskontrolle, also einer Viruslösung mit äquivalenter Viruskonzentration ohne neutralisierende Agenzien.

Nach einstündiger Vorinkubation der zellfreien Viruslösung mit dem Probenmaterial bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit zur Immunkomplexbildung erfolgte die Inokulation von jeweils 2 x 10⁴ der unter Abschnitt 2.6.1 beschriebenen Zellen mit jeweils 100 µl verdünnter Virion-Serum- beziehungsweise Virion-Fruchtwasser-Mischung. In jedem Ansatz wurden pro Verdünnungsstufe Triplikate angefertigt. Zudem wurde pro 96-well Platte eine Zellkontrolle mitgeführt, bei der entsprechendes Zellkulturmedium ohne Probenmaterial und Viruslösung vorgelegt wurde. Ebenfalls wurde in jedem Ansatz eine äquivalente Verdünnungsreihe mit HIG, eingestellt auf die mittlere IgG-Konzentration von latent HCMV-infizierten Schwangeren [92] als Plausibilitätskontrolle und eine Verdünnungsreihe eines HCMV-IgG Negativpools mitgeführt.

Zur Intensivierung der Inokulation wurden die beschickten 96-well Platten für 30 min bei 112 g zentrifugiert und anschließend für weitere 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert, bevor der Überstand von Virion-Suspension/Proben-Gemisch wieder abgesaugt wurde. Nach Vorlage von frischem Medium mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin wurden die infizierten Zellkulturen weitere fünf Tage inkubiert.

2.6.4 Färbung & Bestimmung probenspezifischer Neutralisationskapazitäten

Die inkubierten Zellkulturen wurden mittels HCMV-IE1-Antigenfärbung unter Verwendung von primären Anti-HCMV-IE1-IgG und sekundären Meerrettich-Peroxidase-konjugierten anti-Human-Fc-IgG gefärbt. Zur Fixierung der Zellkulturen wurde nach Absaugen des Mediums ein 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton für 90 Sekunden auf dem Monolayer belassen. Nach Absaugen der Fixierlösung und Waschen mit 200 µl TBS, versetzt mit 0,2 % TWEEN, wurden 100 µl einer 1:800 mit PBS und 0,5 % FKS verdünnten Lösung des primären Antikörpers zu den Zellen pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert. Dieser Schritt wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS + 0,2 % TWEEN, zur Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte mit 100 µl des 1:400 mit PBS und 0,5 % FKS verdünnten, sekundären Antikörpers wiederholt. Im Anschluss wurde wieder dreimal mit TBS + 0,2 % TWEEN gewaschen. Die Braunfärbung der antikörpermarkierten HCMV-IE1-Proteine in infizierten Zellkernen wurde durch Zugabe von 100 µl/well einer mit 0,1 % H₂O₂ versetzten gebrauchsfertigen AEC-Lösung nach 30-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte generiert. Unter dem Lichtmikroskop können die HCMV-IE1 positiven Zellen erkannt und infektiöse Plaques ausgezählt werden. Als Plaque wurden Ansammlungen von mehr als fünf eindeutig gefärbten Zellkernen gewertet. Abbildung 7 zeigt exemplarische Bildausschnitte aus 96-Well-Mikrotiterplatten nach Zellinokulation, wie sie relativ zur Viruskontrolle oder relativ zur HCMV-IgG-Negativkontrolle evaluiert wurden.

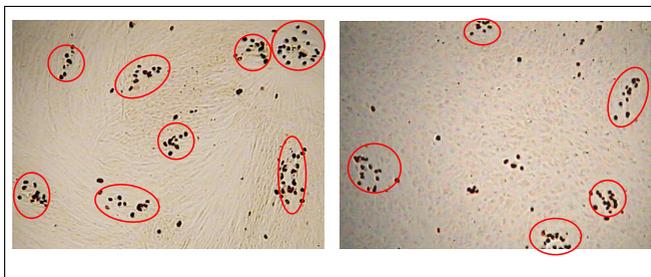


Abbildung 7: Plaquebildung (rote Kreise) nach fünftägiger HCMV-Kultivierung auf humanen Vorhautfibroblasten (links) und ARPE-19 Zellen (rechts). Einzelne IE1-positiv gefärbte Zellkernen oder Haufen <5 werden nicht als Plaque gewertet (100x).

Zur Berechnung der probenspezifischen Neutralisationskapazität (NT %) in der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde die Plaquezahl in Relation zur Plaquezahl der IgG-Negativkontrollen gesetzt:

$$NT \% = \frac{1 - \bar{x}_{Probe}}{\bar{x}_{IgG\ negativ}}$$

Zur Berechnung der 50 % Neutralisationskapazität (NT-50 %) kommt ein Näherungsverfahren unter Berücksichtigung der ermittelten Neutralisationskapazitäten der Verdünnungsstufen zum Einsatz (siehe auch 2.10).

2.6.5 TCID-50 %-Bestimmung

Zur Quantifizierung der Viruskonzentration einer kryokonservierten Viruslösung H2497-11 wurde die 50 %-Zellkultur-Infektionsdosis TCID-50 % pro 100 µl bestimmt. Nach Anfertigen einer Verdünnungsreihe der aufgetauten Virusstammlösung von 1⁻¹ bis 1⁻⁷ durch sechsmaliges Überführen von 50 µl Stammlösung beziehungsweise verdünnter Lösung in 450 µl Zellkulturmedium und anschließendem Schüttelmischen erfolgte die Inokulation suszeptibler Zellen in einer 96-well Platte mit jeweils 100 µl der verdünnten Viruslösung in Triplikaten.

Das weitere Vorgehen zur Inokulation erfolgte analog dem der Neutralisationstestungen (siehe 2.6.3); ebenso die IE 1-Antigenfärbung zur Bestimmung des Infektionsstatus des Zellrasens (siehe 2.6.4).

Nach fünfägiger Inkubation und anschließender IE 1-Antigenfärbung finden sich in der Verdünnungsreihe mit zunehmender Wahrscheinlichkeit weniger infizierte Zellen, je höher die Verdünnung der kryokonservierten Stammlösung des HCMV-Isolates ist. Beachtet wird nicht die Anzahl der infizierten Zellen pro well sondern das Verhältnis von wells mit mindestens einer positiven Zelle zur Gesamtzahl der wells (zwischen 0 % und 100 % infizierte wells).

Zur Ermittlung der TCID-50 % sei der Exponent jener Verdünnungsreihe, bei der zuletzt noch alle wells infizierte Zellkerne aufweisen (100 % infizierte wells) *a* und die Quersumme der relativen Anzahl infizierter wells (< 100 % infizierte wells) pro Verdünnungsstufe sei *b*. Die TCID-50 % berechnet sich somit nach der Formel:

$$TCID-50 \% = 10^{a-(b-0,5)}$$

2.7 Bestimmung der HCMV-spezifischen Antikörperprofile

Zur Bestimmung der HCMV-spezifischen Antikörpermuster wurden rekombinante Immunoblot-Assays aus Serum- und Fruchtwasserproben durchgeführt. Zur Quantifizierung der HCMV-spezifischen Antikörperspiegel wurden ECLIA-Messungen durchgeführt.

2.7.1 Rekombinante Immunoassays

Das rekombinante Immunoassay *recomLine CMV* (Mikrogen) dient dem Nachweis von HCMV-spezifischem IgG aus Serum- und Fruchtwasserproben. Der Lineblot basiert auf den rekombinanten HCMV-Antigenen (*recIE1*, *recCM2*, *recp150*, *recp65*, *recgB1* und *recgB2*), immobilisiert auf einer Nitrozellulosemembran (Abbildung 8).

Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt [135]. Durch einstündige Inkubation der Teststreifen in einer Lösung aus Waschpuffer und der zu untersuchenden Probe binden die enthaltenen IgGs an die Antigene. Die anschließende Zugabe von Meerrettichperoxidase-markierten Maus-anti-Human-Immunglobulinen ermöglichte nach der Substratreaktion das Ablesen eines Bandenmusters.

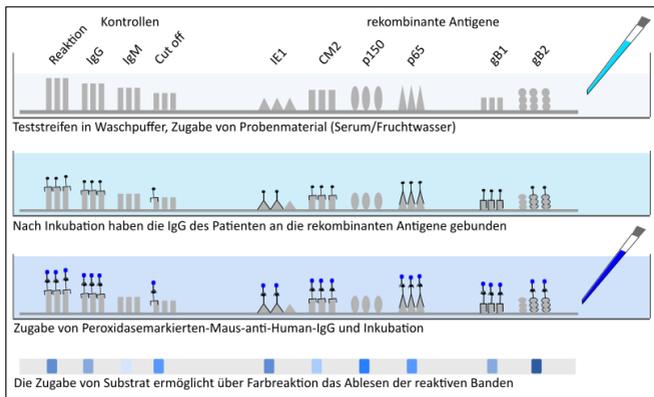


Abbildung 8: Testprinzip des HCMV-Lineblot mit Serum und Fruchtwasser (Abbildung 14 zeigt entsprechende Immunoblots mit dem Expressionsmuster einer früher Infektion und der fortgeschrittenen Infektion).

Die Intensität der Banden musste zur Auswertung des Tests in Relation zur Intensität der „Cut-Off“-Bande des betreffenden Streifens gesetzt werden. Eine Bande von geringerer

Intensität als die „Cut-Off“-Bande wurde als negatives Ergebnis gewertet. Eine vergleichbare oder stärkere Intensität der Färbung wurde semiquantitativ mit einem Punktwert zwischen eins und drei bewertet.

Anhand der Präsenz spezifischer Antikörper kann grob auf das Alter der Infektion zurückgeschlossen werden. Dies gilt nur für Proben, die nicht nach der Behandlung mit HIG gewonnen wurden. HIG enthält selbst gegen alle sechs messbaren rekombinanten Antigene hoch-avide Antikörper in ausreichend hoher Menge, um jeweils eine Intensität, die mit dem Punktwert drei zu bewerten wäre, zu erreichen.

Die semiquantitative Bestimmung der Avidität der gesuchten Antikörper erfolgte durch Verwendung von Harnstoff als chaotrope Verbindung in einem parallelen, zweiten Ansatz und Vergleich der Bandenintensität mit dem IgG-Teststreifen. Dies wurde ebenfalls mit Punktwerten von eins bis drei entsprechend der Intensität dokumentiert. Vom Hersteller der Lineblots werden die Antigene *recIE1*, *recCM2*, *recp150* und *recgB2* zur Evaluation der Avidität empfohlen [135].

2.7.2 HCMV-Immunglobulin Elektro-Chemilumineszenz-Immunoassays

Die *in vitro* Messung von anti-HCMV-IgG/IgM-Konzentrationen basiert auf einem Doppel-Antigen-Sandwich-System. Es werden biotinylierte und rutheniierte HCMV-Proteine (*pp150*, *pp28*, *p52* und *p38*) von den zu messenden Patientinnen-anti-HCMV-IgG gebunden. Streptavidin-beschichtete, paramagnetische Mikropartikel binden über Biotin-Streptavidin-Komplexbildung. In einer Durchflussmesszelle erfolgt eine magnetische, selektive Fixierung der anti-HCMV-IgG. Ungebundene Partikel werden entfernt. Das Anlegen einer Spannung an der Elektrode führt zur Induktion messbarer Lumineszenz, die proportional zur Menge spezifischer, gebundener Antikörper in der Probe ist [136]. Abbildung 9 zeigt dies schematisch.

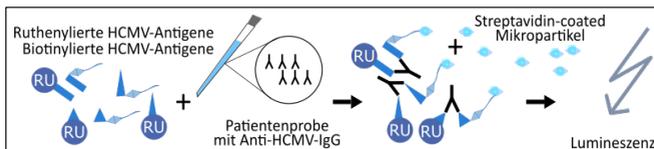


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Testprinzips eines Elektrochemilumineszenz-Assays; HIG: Hyperimmunglobulin; HCMV: humanes Zytomegalievirus; IgG: Immunglobulin.

Die Analysen wurden vollautomatisch auf einem Cobas 6000 - Analysator mit den Elecsys CMV IgG- und IgM-Tests der Firma Roche ausgeführt, nachdem zuvor die Proben manuell in Probengefäße vorgelegt wurden. Zur Ermittlung der Avidität der gemessenen Immunglobuline wurde im Messprozess zu einem Ansatz von 50 µl Probenmaterial jeweils 50 µl einer Guanidinhydrochlorid-basierten Lösung als chaotropes Agens pipettiert. Zur Berechnung der IgG-Avidität wurde das Ergebnis beider Messungen mit und ohne chaotropes Agens in Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis wird als relativer Aviditätsindex (%) angegeben.

Die verwendeten Testsysteme sind in der klinischen Routine insbesondere zur IgG und IgM Messung aus Serum etabliert. Die Quantifizierung von HCMV-IgG aus Fruchtwasser ist nicht akkreditiert. Sie wurde aber entsprechend dem für Serumproben etablierten Protokoll durchgeführt. Vom Hersteller werden für die HCMV-IgG Konzentrationen von < 0,5 U/ml als negativ, zwischen 0,5 und 1 U/ml als grenzwertig und > 1 U/ml als reaktiv angegeben. Für IgM werden Ergebnisse unter 0,7 des „cut-off“-Index als negativ gewertet, ein „cut-off“-Index zwischen 0,7 und 1 ist grenzwertig und über 1 wird die Probe als IgM-positiv bewertet. Relative Aviditätsindices < 45 % werden vom Hersteller als niedrige Avidität klassifiziert. Proben zwischen 45 % und 54,9 % gelten als intermediär avide und ≥ 55 % als hoch avide [137].

2.8 Direkte Virusnachweisverfahren

Zur Diagnostik der diaplazentaren HCMV-Transmission eingesetzte quantitative Methoden bestehen aus dem Nachweis von HCMV-Nukleinsäure auf Basis einer PCR und dem Nachweis von HCMV-IE1-Antigenexpression in vitro auf HFF-basierter Zellkultur. Vergleichende Daten zur Viruslast wurden bereits veröffentlicht [138].

2.8.1 Real-time PCR

Die DNA-Extraktion aus Serum und Fruchtwasser wurde mittels eines vollautomatischen Extraktors und dem dazugehörigen, kommerziell erhältlichen Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Quantifizierung der HCMV-DNA in Fruchtwasserproben wurde ein kommerzielles real-time PCR-Kit auf einem Lightcycler 2.0 verwendet. Als Zielstruktur dient dabei eine

283 Basenpaare lange Fraktion des *ppUL83*-Gen. Das 95 % - Detektionslimit wurde vom Hersteller mit 555 Kopien/ml angegeben.

Die ausgegebenen Kopien HCMV-DNA pro ml wurden in Internationale Einheiten (IU) konvertiert. Dazu wurde der WHO-Standard verwendet. Durch Amplifikation des WHO-Standards an drei Tagen wurde unter den gleichen Bedingungen auf dem verwendeten Lightcycler ein Konversionsfaktor berechnet, um von den ausgegebenen Kopien HCMV-DNA pro ml Probenmaterial auf Internationale Einheiten umrechnen zu können.

2.8.2 Kurzzeit (18h-) Mikrokultur

Zur Durchführung der Kurzzeitkultur aus Fruchtwasser wurden jeweils 1 ml der Proben zunächst zur Aufkonzentrierung potenziell enthaltener HCMV-Virionen für eine Stunde bei 50 000 g und 4 °C hochgeschwindigkeitszentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes und der Resuspension des Pellet in 200 µl Zellkulturmedium ist die HCMV-Konzentration verglichen zur Ausgangsprobe fünffach erhöht. Jeweils 2 x 10⁴ adhärenente HFF pro well einer 96-well-Platte wurden mit je 50 µl der Virionsuspension inokuliert. Nach 18-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte erfolgte die IE-1-Antigenfärbung wie unter 2.6.4 beschrieben.

Für die Auswertung der Viruslast je nach Vortherapie mittels Kurzzeit (18h-) Mikrokultur und qPCR wurden Proben ausgeschlossen, bei denen das Ergebnis durch externe Einflüsse beeinflusst sein könnte. Dazu zählen insbesondere lange Transportzeiten der Probe vom Entnahmeort in das Labor (> 24 Stunden) oder direkte intraamniale HIG-Applikation vor der AC. Darüber hinaus sind Temperatur über 30 °C beim Transport kritisch für die reliable, semiquantitative Mikrokultur-Auswertung.

Für die Korrelation der Ergebnisse der qPCR und der Mikrokultur mussten beide Untersuchungen mit dem Probenmaterial der Patientinnen durchgeführt worden sein. Sequenzielle Proben wurden nicht ausgewertet, wenn der dokumentierte Zeitraum zwischen zwei HIG-Applikationen eine Zeitspanne von 7 Tagen unterschritt.

Um den variablen Therapieregimen mit HIG im 10-jährigen Untersuchungszeitraum gerecht zu werden, wurden 3 Subkohorten verglichen:

- *HIG-naiv (n = 13)*
- *variable HIG-Behandlung (intraamnial/intracordal/maternal intravenös. <200 IU HIG/kgKG und Intervalle >3 Wochen zwischen zwei Applikationen; n = 7)*
- *maternal mindestens 2x intravenös 200IU HIG/kgKG, zweiwöchentlich (n = 9)*

Im Fall mehrmaliger AC wurde, die im Schwangerschaftsverlauf zuerst gewonnene Fruchtwasserprobe für die Gruppenvergleiche verwendet.

2.9 Evaluation potenzieller Biomarker

2.9.1 Bestimmung von sFlt1 & PlGF aus Blut- & Fruchtwasserproben

Die Konzentrationen der beiden pro- und antiangiogenen Proteine sFlt1 und PlGF wurde ebenfalls mittels ECLIA auf einem Cobas 6000 – Analysator aus maternalem Primärmaterial (Serum- und Fruchtwasser) automatisiert bestimmt. In Abweichung zum unter 2.7.2 beschriebenen Verfahren, bei welchem biotinylierte und ruthenylierte HCMV-Antigene eingesetzt werden, basiert der sFlt1- und PlGF-Nachweis auf Inkubation der zu testenden Probe mit biotinylierten und ruthenylierten monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen die beiden Proteine. Zudem erfolgte die Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln, analog dem Nachweis von HCMV-spezifischen Immunglobulinen nach neun Minuten und das Ergebnis wurde in pg/ml vollautomatisch ausgegeben.

Für die Analyse der sFlt1 und PlGF-Konzentrationen wurden vier Kohorten gebildet. Die Auswertung der Proteinkonzentrationen erfolgt je nach Vortherapie mit HIG vor der AC und abhängig vom Transmissionsstatus in vier Gruppen:

- *NT, HIG- (n = 21)*
- *NT, HIG+ (n = 49)*
- *T, HIG- (n = 18)*
- *T, HIG+ (n = 16)*

Eine Normierung auf Multiple des Medians (MoM) wurde für longitudinale Werte anhand publizierter Werte für gesunde Kontrollen vorgenommen [139].

In einem weiteren Auswertungsansatz zur Analyse der Konzentrationen von sFlt1 und PlGF wurden, neben dem Transmissionsstatus, in der Patientinnenakte dokumentierte HCMV-assoziierte Ultraschallbefunde zur Kohortenbildung benutzt (siehe Tabelle 1):

- *NT* ($n = 70$)
- *T, unauffälliger Ultraschall (TUU; n = 22)*
- *T, Ultraschall assoziiert mit HCMV-Infektion (TUA; n = 12)*

Die aus den Messreihen zu PIGF und sFlt1 generierte Daten wurden teilweise bereits veröffentlicht [140].

2.9.2 Identifikation potenzieller Biomarker mittels Multiplex-Assay

Um weitere potenzielle Proteine zu identifizieren, deren Konzentrationen im Fruchtwasser von Transmitterinnen verglichen mit Non-Transmitterinnen erhöht sind, wurde aus gepoolten Fruchtwasserproben ein Multiplex-Assay der Firma Olink (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein proximity extension assay:

Antikörperpaare, gerichtet gegen die zu messenden Proteine, sind selbst an ein Oligonukleotid gebunden. Nach Bindung an das Zielprotein können die beiden Oligonukleotide aufgrund der räumlichen Nähe hybridisieren. Nach Zugabe einer DNA-Polymerase und Elongation kann durch eine real-time PCR und DNA-Quantifizierung auf die ursprüngliche Proteinmenge in der Probe zurückgeschlossen werden. Die Firma Olink bietet auf dieser Basis Panels für 96 Proteine pro Ansatz an, wobei für die Fruchtwasserproben ein Panel mit dem Fokus auf inflammatorische Proteine gewählt wurde. Der Tabelle 17 in Abschnitt 3.5 kann eine Liste der Proteine des Panels entnommen werden.

Die gepoolten Proben wurden, in Kohorten wie unter 2.6.2 angegeben, in eine 96-well PCR-Platte überführt, auf Trockeneis konserviert und zur Prozessierung an Olink verschickt. Vom Dienstleister wurden die quantifizierten Daten in Rohfassung zur Verfügung gestellt. Die Ausgabe der Daten erfolgt firmenseitig in NPX (Normalized Protein eXpression), einer \log_2 skalierten Einheit. Statistisch aufbereitet und analysiert wurden die Abweichungen der einzelnen Kohorten von den Gruppenmittelwerten über die HCMV-Kohorten für jedes einzelne Protein. Dazu wurden die NPX delogarithmiert (2^{NPX}).

2.10 Statistische Auswertung

Die erhobenen Messwerte wurden mit der Software SPSS (Version 25, IBM) ausgewertet. Dabei wurde vor der Durchführung schließender Testverfahren für die zu untersuchenden Parameter eine deskriptive Statistik durchgeführt. Die Annahme einer Normalverteilung wurde auf Basis von Schiefe und Kurtosis der einzelnen Variablen getroffen. Für Merkmale deren Ausprägung in der Stichprobe einer Normalverteilung folgt wurde üblicherweise der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) als Wert der zentralen Tendenz angegeben. Als Streuungsmaß wurde in diesen Fällen die Standardabweichung (σ) verwendet. Für nicht-normalverteilte Merkmalsausprägungen fanden entsprechend der Median (\tilde{x}) und der Interquartilenabstand (IQR) Anwendung. Sollten Unterschiede in der Ausprägung linear skalierten Merkmale auf ihre Überschreitungswahrscheinlichkeit hin überprüft werden, wurden in Abhängigkeit von der Verteilung der Stichprobe der Exakte Test nach Fischer oder der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dem Fishers Exakt-Test wurde ein Test auf Gleichheit der Varianzen vorgeschaltet. Unter den gleichen Voraussetzungen, aber bei einem Variablenumfang >2 , wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) oder der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Neben der Berechnung der NT % in einzelnen Verdünnungsstufen wurde eine Regression auf Basis des generalisierten linearen Modells (Probit-Regression) zur näherungsweisen Angabe der Probenverdünnung bei Neutralisation von 50 % der definierten Viruslösung (NT-50 %) auf Basis der Ergebnisse der Verdünnungsreihen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Neutralisationsassays

Es wurden PRNT und Neutralisationen an Einzelverdünnungen von 143 Serum- und Fruchtwasserproben durchgeführt.

3.1.1 Kalibrierung an Einzelproben

Zur Kalibrierung des PRNT wurden Vorversuche an Serum- und Fruchtwassereinzelpuben durchgeführt. Dazu wurden von einer Patientin nach wiederholter HIG-Gabe und Ausschluss der HCMV-Transmission, eine Serum- (H2537-15) und eine Fruchtwasserprobe (H2649-15) zur Neutralisation der Infektion von HFF- und ARPE-19-Zellen eingesetzt. Ebenso wurde mit einer Serum- (H1220-16) und Fruchtwasserprobe (H1218-16) einer HIG-vorbehandelten HCMV-Transmitterin verfahren. Die TCID₅₀/100µl wurde für die verwendete Viruslösung des klinischen Isolates H2497-11 bestimmt mit 10^{4,5} für HFF und ARPE-19. Daraus wurden jeweils die verwendeten Verdünnungsstufen des Virusisolates mit 1:1000 abgeleitet.

Serum

Abbildung 10 zeigt Verdünnungen einer Patientenprobe und HIG auf zwei Zellreihen:

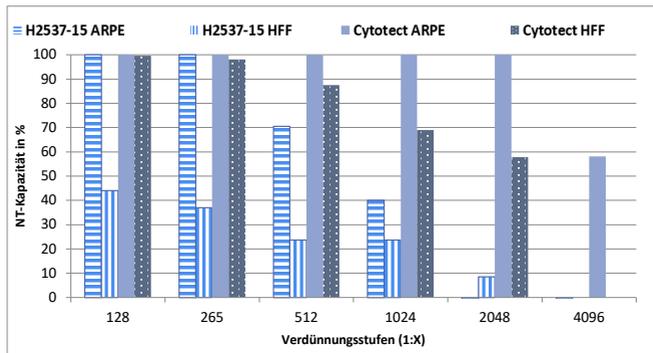


Abbildung 10: Vorversuch auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF) mit Serumproben einer nicht-HCMV-transmittierenden Schwangeren (H2537-15) die Hyperimmunglobulin (Cytotect) appliziert bekam, verglichen mit HIG; Abgebildet ist die Kapazität zur Neutralisation (NT-Kapazität) eines Virusisolates relativ zur Viruskontrolle.

Die Verdünnungsreihen für Serum H2537-15 (NT, HIG+) auf APRE-19 und HFF von 1:128 bis 1:4096 bildet hier nicht optimal die Bereiche von 100% Neutralisation zu 0% Neutralisation der definierten Viruslösung (1:1000) ab. Insbesondere die erste Verdünnungsstufe von 1:128 ist bereits zu hoch gewählt um bei der Serumprobe im HFF-Ansatz einen Bereich hoher Neutralisationskapazität >50% abzubilden. Die HIG-Verdünnung zeigt hingegen auf HFF als Zellsystem bis zur Verdünnungsstufe 1:2048 ordentliche Neutralisationseffekte, im Ansatz mit ARPE-19 Zellen bis 1:4096.

Abbildung 11 zeigt die Verdünnungsreihen für das Serum H1220 (T, HIG+). Die weiter gefassten Verdünnungsreihen von 1:64 bis 1:8192 bilden für die Proben auf HFF die nötigen Bereiche der Neutralisation ab. Ebenso ist im Vergleich der beiden Neutralisationsreihen in Abbildung 10 und Abbildung 11 erkennbar, dass das Serum der HCMV-transmittierenden Schwangeren das Virusisolat deutlich besser neutralisiert als das Serum der nicht-transmittierenden Schwangeren.

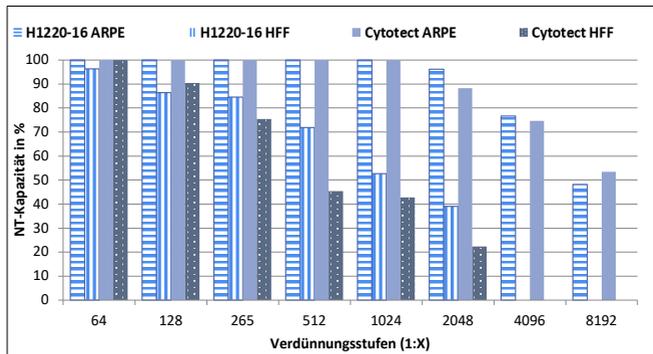


Abbildung 11: Vorversuch zur Neutralisation auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF) mit Serumproben einer HCMV-transmittierenden, Hyperimmunglobulin (HIG) - behandelten Schwangeren, verglichen mit HIG; Abgebildet ist die Kapazität zur Neutralisation (NT-Kapazität) eines Virusisolats relativ zur Viruskontrolle.

Fruchtwasser

Die gewählte Verdünnungsreihe von Fruchtwasser H2649-15 (NT, HIG +) von 1:2 bis 1:32 bildet für HFF als Target-Zellsystem sowohl Bereiche nahezu vollständiger Neutralisation sowie Verdünnungsstufen ohne nachweisbare Neutralisation ab. Für ARPE-19 als Zellsystem ist diese Verdünnungsreihe jedoch zu hoch konzentriert, da der

Endpunkt ohne bedeutende Neutralisation nicht erreicht wird. Bei einer Verdünnung des Fruchtwassers von 1:32 neutralisiert die Probe immer noch 54 % der infektiösen Virionen relativ zu einer 1:1000 Lösung des eingesetzten HCMV-Isolates (Abbildung 12, oben).

Das Fruchtwasser H1218-16 (T, HIG+) hingegen zeigt erst ab einer Verdünnung 1:128 keinen neutralisierenden Effekt auf HFF mehr. Werden ARPE-19 Zellen verwendet, führt dies bei einer Verdünnung von 1:512 immer noch zu 40 % Plaquebildung verglichen mit der unbehandelten Verdünnung eines HCMV-Isolates (Abbildung 12, unten).

Im Vergleich der Fruchtwasserproben NT, HIG+ mit T, HIG+ fällt, analog zum Neutralisationsverhalten von Serum der beiden Schwangeren auf, dass die Probe der Transmitterin HCMV in vitro besser neutralisiert.

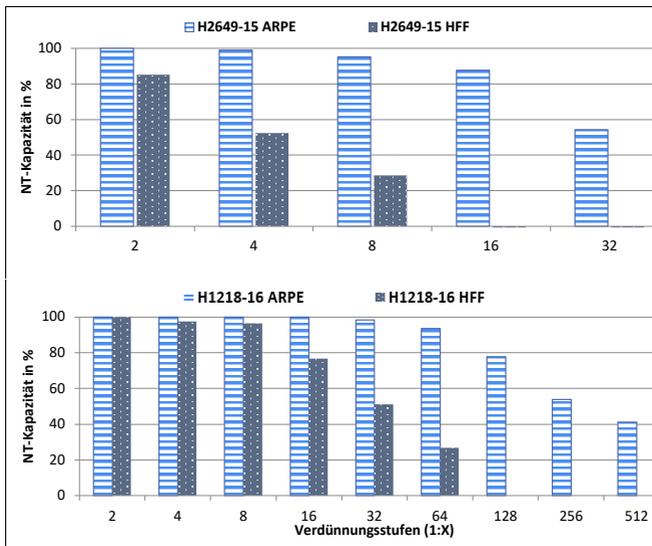


Abbildung 12: Vorversuch zur Neutralisation auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF) mit Fruchtwasserproben einer nicht-HCMV-transmittierenden (oben) und einer transmittierenden Schwangeren die Hyperimmunglobuline appliziert bekamen. Abgebildet ist die Kapazität zur Neutralisation (NT-Kapazität) eines Virusisolats relativ zur Viruskontrolle.

3.1.2 Kalibrierung an kleinen Pools

Bisher wurde die NT% relativ zur Plaquezahl der Virusverdünnung ermittelt. In einem weiteren Schritt soll die Verwendung von HCMV-IgG negativem Primärmaterial als Kontrolle für unspezifische neutralisierende Effekte dienen. An vier kleinen Pools aus Serum und Fruchtwasser von HCMV-IgG-positiven und zwei Pools (Serum/AF) von IgG-negativen Proben wurden die Verdünnungsreihen für gepoolte Proben relativ zu IgG-negativen Kontrollen geprüft. Getestet wurde zudem die Anwendbarkeit von Verdünnungsreihen für ARPE-19-Zellen von 1:500 bis 1:8000 und für HFF von 1:64 bis 1:4096 für Serum und 1:16 bis 1:1024 (ARPE-19) sowie 1:3 bis 1:96 (HFF) für Fruchtwasser unter den Bedingungen: HCMV-IgG negativ (n=2); IgG+, NT, HIG+ (n=3) und IgG+, T, HIG- (n=2). Die entsprechenden Ergebnisse der Verdünnungsreihen zeigt Abbildung 13:

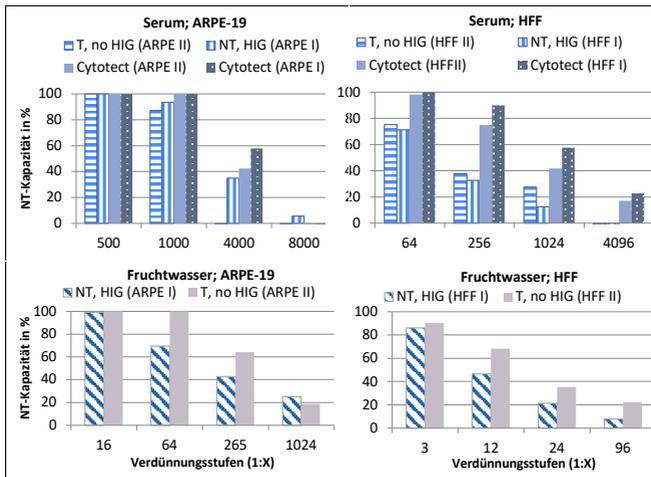


Abbildung 13: Plaque-Reduktions-Neutralisationstest an kleinen Pools von Hyperimmunglobulin (HIG) - naiven Transmitterinnen & HIG-behandelten Non-Transmitterinnen auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19)/Fibroblasten (HFF). Die NT% wird relativ zu einem HCMV-IgG negativen Serum und Fruchtwasserpool ausgegeben.

Dabei zeigt sich, dass in der Neutralisation auf ARPE-19 Zielzellen bei der niedrigsten Serum-Verdünnungsstufe (1:500) zunächst alle eingesetzten Proben vollständig HCMV neutralisieren. Bei der Verdünnungsstufe 1:4000 neutralisiert der Pool T, HIG - nicht

mehr, während der Pool NT, HIG + noch etwa 35 % der zugegebenen infektiösen HCMV zu neutralisieren vermag. Auf HFF als Zielzellen fällt die Neutralisationskapazität der beiden Serumpools regelrecht ab. Im Vergleich dazu ist das HIG deutlich potenter. Die Neutralisation von Fruchtwasser auf beiden Zielzellen zeigt gleiche Effekte der Neutralisation, wobei der kleine Pool NT, HIG + jeweils etwas besser neutralisiert als T, HIG -. Insgesamt sind die Unterschiede jedoch nicht deutlich ausgeprägt.

Aus den Versuchen mit kleinen Pools von Serum und Fruchtwasser in zwei verschiedenen Zellsystemen mit Verwendung eines IgG-negativen Kontrollpools als Referenz zur Kompensation unspezifischer Neutralisationseffekte können nach Probit-Analyse folgende NT50%-Werte angegeben werden (Tabelle 5):

Tabelle 5: 50% Neutralisationskapazität (NT50%-Werte) für Plaque-Reduktions-Neutralisationstest aus kleinen Pools.

Kohorte	Serum NT50%		Fruchtwasser NT50%		HIG NT50% (I)		(II)	
	HFF	ARPE-19	HFF	ARPE-19	HFF	ARPE-19	HFF	ARPE-19
NT, HIG+	1:149	1:3360	1:11	1:283	1:1437	1:4569	1:885	1:3754
T, HIG-	1:209	1:1998	1:21	1:382				

HIG: Hyperimmunglobulin; HFF: Humane Vorhautfibroblasten; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; NT: HCMV – Non Transmitterinnen; T: HCMV – Transmitterinnen.

Die NT50%-Werte des HIG sind jeweils deutlich höher als die der Patientinnenproben. In der Versuchsreihe auf ARPE-19 Zellen mit Serum ergeben sich höhere Neutralisationswerte in der Kohorte NT, HIG+ verglichen mit T, HIG-. In allen anderen Tests zeigt die Kohorte T, HIG- die höheren NT50%-Werte und davon ableitbar eine höhere Konzentration HCMV-neutralisierender Antikörper.

3.1.3 Neutralisationsassays an gepoolten Proben

Die Ergebnisse der Kalibrierungsversuche bilden die Grundlage für das Poolen mehrerer Proben für PRNTs. Das Poolen erfolgte je nach Vorbehandlung mit HIG und nach Transmissionsstatus im Fruchtwasser zum Zeitpunkt der AC. Für den Vergleich der Neutralisationskapazitäten wurden die unter 2.6.2 angegebenen Pools verwendet.

3.1.3.1 Maternale Charakteristika und IgG-Konzentrationen in Serum und Fruchtwasser

Der Tabelle 6 können die maternalen und serologischen Charakteristika der Serum- und Fruchtwasserpools entnommen werden.

Tabelle 6: Maternale und serologische Charakteristika der für Neutralisationsassays gepoolten Proben

	HCMV-IgG negativ.	NT, HIG+	NT, HIG+, SG	NT, HIG-	NT, HIG-, IgM+	T, HIG-	T, HIG+	
n	7	23	23	12	10	14	17	
$\bar{x}_{\text{Serum IgG}}$ (IQR) [U/ml]	- (-)	143 (91)	138 (100)	295 (212)	3 (9)	149 (199)	136 (89)	$p < 0,0001$
$\bar{x}_{\text{FW IgG}}$ (IQR) [U/ml]	- (-)	4 (2)	4 (3)	7 (9)	0 (0)	4 (6)	6 (5)	$p < 0,0001$
\bar{x}_{SSW} (IQR) [Wochen]	21 (2)	20 (1)	21 (4)	20 (1)	22 (5)	23 (5)	25 (5)	$p < 0,0001$
\bar{x}_{Alter} (σ) [Jahre]	32 (5)	31 (5)	32 (4)	32 (5)	32 (4)	31 (4)	32 (4)	n.s.

NT: HCMV-Non Transmitterinnen, T: HCMV- Transmitterinnen, FW: Fruchtwasser, SSW: Schwangerschaftswoche, IQR: Interquartilenabstand, SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin; siehe auch Kagan et al 2019 [102]), IgM+: frühe HCMV-Primärinfektion mit noch hohem IgM Index, niedriger Avidität, rec-gB2 negativ.

Die anti-HCMV-IgG-Konzentrationen der für die Pools eingesetzten Proben schwanken zwischen nicht nachweisbar (HCMV-IgG negativ) beziehungsweise 1 U/ml (NT, HIG-, IgM+) und 544 U/ml (T, HIG-) im Serum bei einer mittleren Konzentration von 151 U/ml (SD: 118). In der post-hoc Analyse mittels Bonferroni-Tests zeigen sich signifikante Unterschiede insbesondere im Gruppenvergleich der Kohorten NT, HIG- und NT, HIG-, IgM+ zu den anderen Kohorten. Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen den beiden Kohorten der Transmitterinnen und den Kohorten NT, HIG+ und NT, HIG+, SG.

Im Fruchtwasser sind die niedrigsten gemessenen Einzelwerte in drei Kohorten unter dem Detektionslimit (HCMV-IgG negativ; NT, HIG-, IgM+; T, HIG-). Der höchste Einzelwert liegt bei 24 U/ml (aus NT, HIG-). Signifikant unterscheiden sich die Kohorten NT, HIG- und NT, HIG-, IgM+ von den anderen Kohorten. Lediglich im Vergleich NT, HIG- zu T, HIG+ besteht hier kein signifikanter Unterschied.

Insbesondere in den Kohorten der Transmitterinnen (T, HIG+ und T, HIG-) zeigt sich ein höheres medianes Gestationsalter zum Zeitpunkt der AC (23. und 25. SSW) verglichen mit den nicht-transmittierenden Kohorten. Diese Unterschiede sind signifikant im post-Hoc Test mit $p < 0,01$ (T, HIG- und NT, HIG+), $p < 0,05$ (T, HIG- und NT, HIG-), $p < 0,0001$ (T, HIG+ und NT, HIG+) sowie $p < 0,01$ (T, HIG+ und NT, HIG-).

3.1.3.2 Rekombinante Immunoblots der Serum- und Fruchtwasserpools

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse rekombinanter Immunoblots aus den gepoolten Serumproben, gewonnen um den Zeitpunkt der Amniozentese. Auffällig ist, dass insbesondere die Kohorte der Schwangeren mit früher PI und hohem IgM-Spiegel keine anti-gB1/anti-gB2-Aktivität aufweist und die HCMV-spezifischen Immunglobuline noch keine Aviditätsmaturation vollzogen haben. In allen anderen gepoolten Proben sind, insbesondere gegen das rekombinante p150 und gB2, deutlich avide Antikörper nachweisbar.

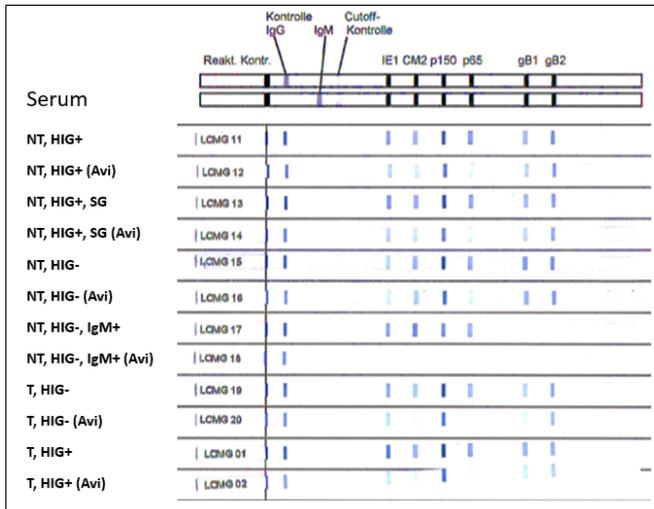


Abbildung 14: Ergebnisse von Immunoblots von gepoolten Serumproben nach HCMV-Transmissionsstatus und HIG-Vorbehandlung; NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, Avi: Aviditätsmessung, SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin; siehe auch Kagan et al 2019 [102]), IgM+: frühe HCMV-Primärinfektion mit noch hohem IgM Index, niedriger Avidität, rec-gB2 negativ.

Die gepoolten Fruchtwasserproben der in Tabelle 6 beschriebenen Kohorten wurden ebenfalls mittels Immunoblot auf das HCMV-Antikörpermuster hin untersucht. Abbildung 15 ist zu entnehmen, dass in der Kohorte der Schwangeren mit früher PI im Fruchtwasser ebenfalls keine Reaktivität gegen rec-gB1/gB2 festzustellen ist. Im Übrigen ähneln sich die Bandmuster zwischen Serum und Fruchtwasser. Lediglich bei der

qualitativen Bestimmung der Avidität fällt im Fruchtwasser auf, dass die Banden deutlich schwächer gefärbt sind als im Serum. Lediglich anti-rec-p150 und rec-gB2-Aktivitätsmuster kommen annähernd mit gleicher Intensität zur Darstellung.

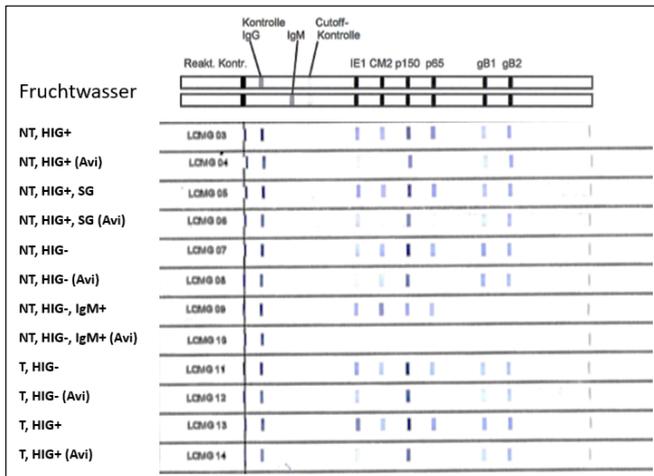


Abbildung 15: Ergebnisse von Immunoblots von gepoolten Fruchtwasserproben nach HCMV-Transmissionsstatus und HIG-Vorbehandlung; NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, Avi: Aviditätsmessung, SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); siehe auch Kagan et al 2019 [102]), IgM+: frühe HCMV-Primärinfektion mit noch hohem IgM Index, niedriger Avidität, rec-gB2 negativ.

3.1.3.3 Rohdaten

Die gepoolten Neutralisationstestungen an den 6 Kohorten wurden an mehreren Tagen insgesamt drei Mal wiederholt (A-C). Die Neutralisationskurven der drei Wiederholungen eines jeden Pools für Serum und Fruchtwasser auf HFF und ARPE-19 sind in den nächsten vier Abbildungen dargestellt (Abbildung 16 bis Abbildung 19). Die aus den Diagrammen ableitbare NT50% wird durch die Kreuzung der entsprechenden Kurve mit dem Diagramm dargestellt. Die Rohdaten der Verdünnungsreihen werden für eine valide Ergebnisinterpretation zusammengefasst (Abbildung 20 und Abbildung 21 für Serum sowie Abbildung 22 und Abbildung 23 für Fruchtwasser).

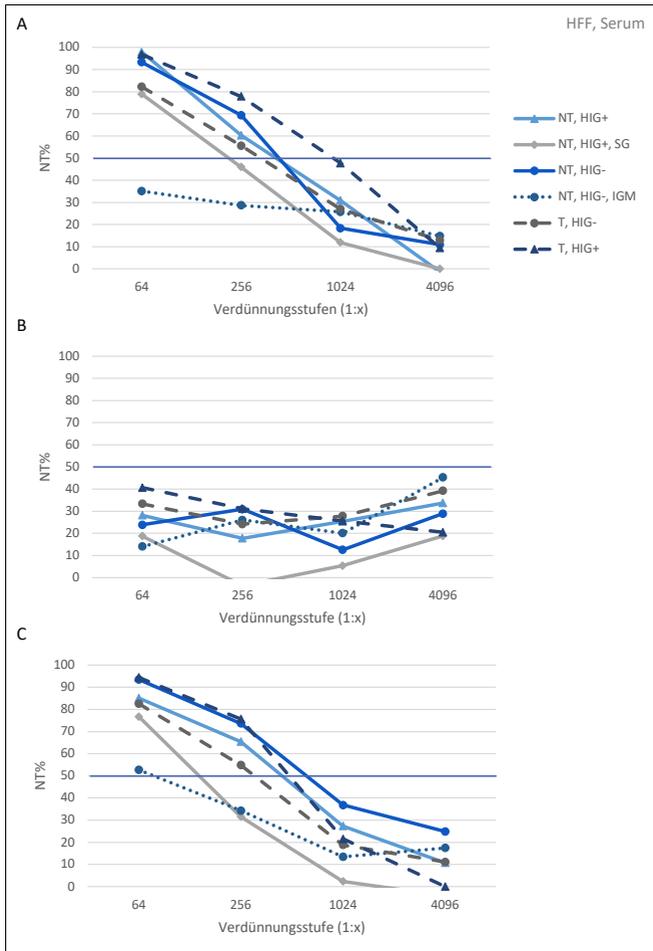


Abbildung 16: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen und drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten Serumproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NTS50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen; HFF: Humane Vorhautfibroblasten.

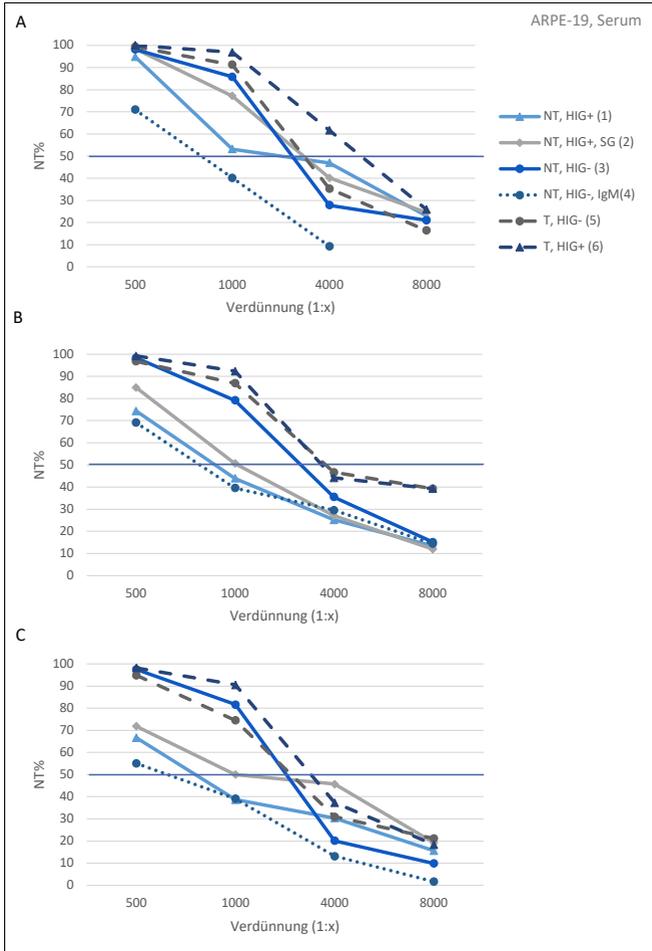


Abbildung 17: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen, drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten maternalen Serumproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen, ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen.

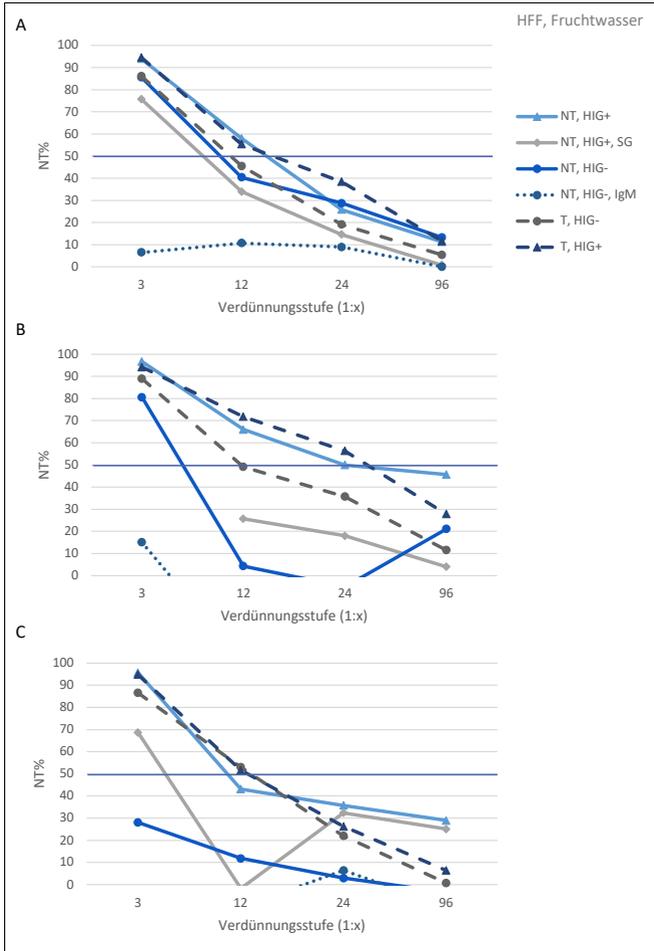


Abbildung 18: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen und drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten Fruchtwasserproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen, HFF: Humane Vorhautfibroblasten.

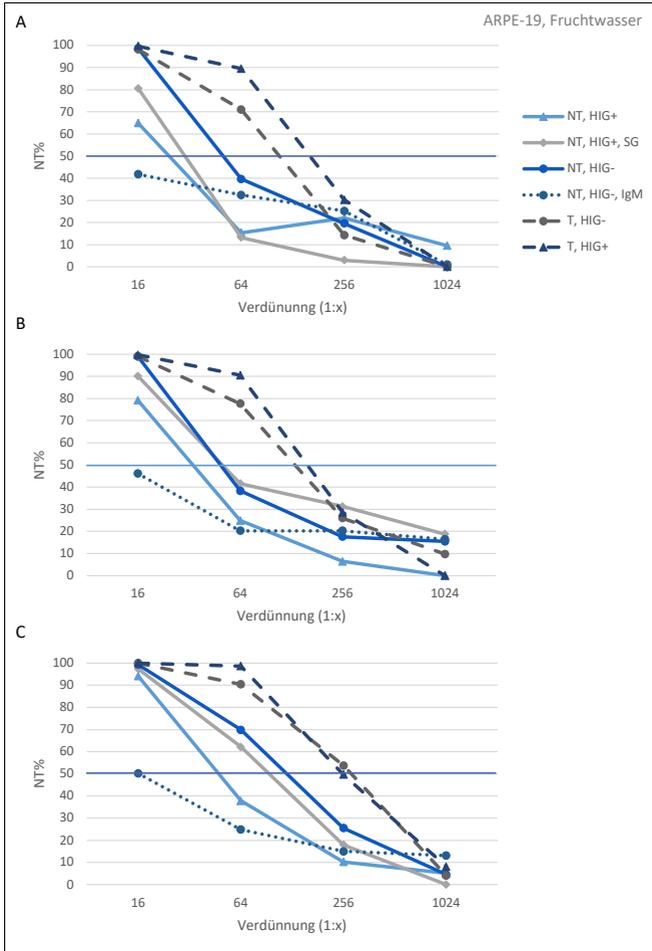


Abbildung 19: Plaque-Reduktions-Neutralisationstests mit vier Verdünnungsstufen und drei Wiederholungen (A-C) mit Triplikaten aus gepoolten Fruchtwasserproben in 6 Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen, ARPE-19: Adulte Retinapigmentepithelzellen.

3.1.3.4 Serum-PRNT

Für PRNTs aus Serumproben der Kohorten ergeben sich die Kurven der Abbildung 20 (HFF) und Abbildung 21 (ARPE-19). Beide Abbildungen zeigen, verglichen mit den Ergebnissen von PRNT aus Fruchtwasserproben, enger zusammenliegende Kurvenverläufe. Im Ansatz mit HFF zeigen sich bei einer Verdünnung der gepoolten Serumproben von 1:64 mittlere Neutralisationen zwischen 77 % und 39 %. Diese fallen bis zur Verdünnung von 1:4096 auf Werte zwischen 26 % und 3 % ab. Die Kohorte der HIG-behandelten Transmitterinnen (6) zeigt größtenteils die höchste Neutralisationskapazität.

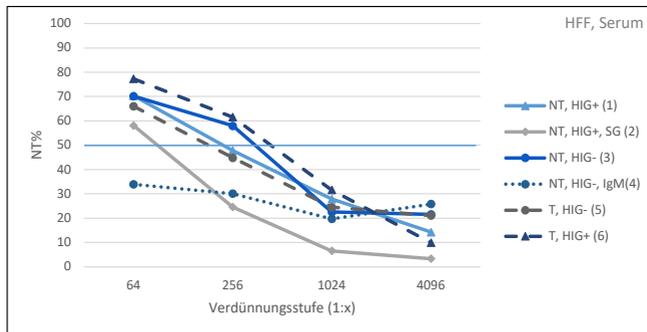


Abbildung 20: Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Fibroblasten (HFF) gepoolter Serumproben der sechs Kohorten (1-6). Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe. NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.

Im Versuchsansatz mit ARPE-19 Zellen variieren die mittleren Neutralisationen bei einer Verdünnung von 1:500 zwischen 99 % und 65 %. Sie fallen ab auf Werte zwischen 28 % und 8 % verglichen mit der Neutralisationskapazität des HCMV-IgG negativen Referenzpools (Abbildung 21). Im direkten Vergleich der Kurven von Serumproben auf HFF und ARPE-19 fällt auf, dass die Kohorte, der mit striktem Regime behandelten, nicht-transmitterenden Schwangeren (2) auf HFF besonders schwache HCMV-neutralisierende Effekte zeigt. Ab der Verdünnungsstufe 1:256 sind die kumulierten Ergebnisse der Neutralisation dieser Kohorte sogar geringer als jene der Kohorte mit früher HCMV-PI (4), die zwischen den Verdünnungsstufen 1:256 und 1:4096 eher zwischen 30 % und 20 % stagniert. Sowohl auf ARPE-19 Zellen als auch in den

Versuchsreihen mit Fruchtwasserproben neutralisiert die Kohorte der Schwangeren mit früher HCMV-PI (4) schlechter.

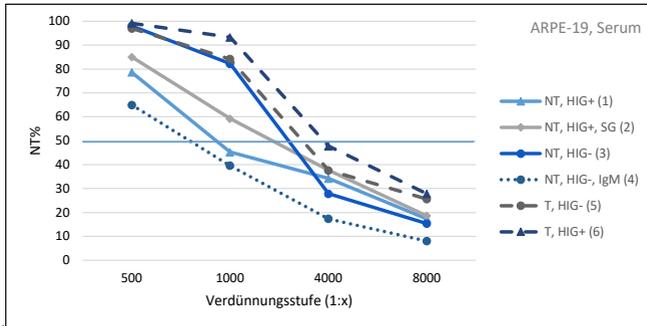


Abbildung 21: Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19) gepoolter Serumproben der sechs Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, Hig: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.

3.1.3.5 Fruchtwasser-PRNT

Die Abbildung 22 zeigt die kumulierten Neutralisationskurven aller Wiederholungen der PRNT mit Fruchtwasserproben der sechs Kohorten auf HFF. Bei der Verdünnungsstufe 1:3 neutralisieren die Proben zwischen 95 % und 65 %. Lediglich die gepoolten Proben der Kohorte der Schwangeren mit früher PI und hohem IgM (4) zeigen bereits bei geringster Verdünnung kaum mehr Neutralisationskapazität. Auffällig ist der eng zusammenliegende Kurvenverlauf der Kohorten der im strikten Schema Hig-behandelten NT (2) und der Hig-naiven NT (3) ausgehend von einem mittleren Neutralisationsniveau zwischen 72 % und 65 % bei einer Verdünnung von 1:3. Die Kohorten NT, Hig+ (1) und beide Kohorten der Transmitterinnen mit (6) und ohne (5) Hig verlaufen zunächst gleichförmig mit höchster NT-Kapazität zwischen 95 % und 87 % bei der 1:3-Verdünnung und trennen sich erst bei der höchsten Verdünnungsstufe von 1:96.

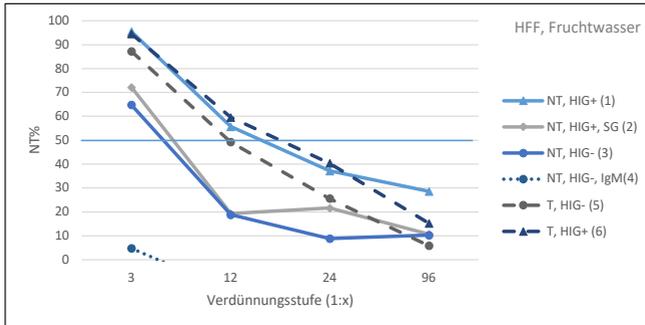


Abbildung 22: Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Fibroblasten (HFF) gepoolter Fruchtwasserproben der sechs Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.

Abbildung 23 zeigt entsprechende Kurven für ARPE-19 als Zellsystem:

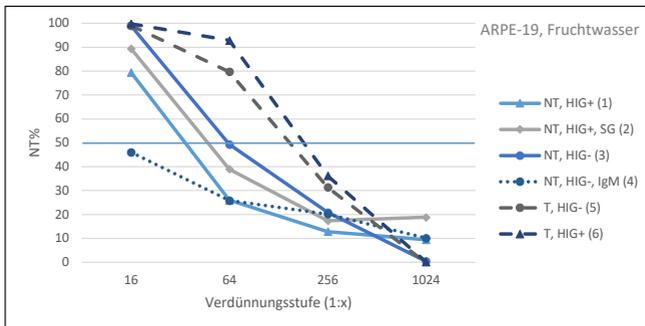


Abbildung 23 Kumulierte Daten der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests auf Retinapigmentepithelzellen (ARPE-19) gepoolter Fruchtwasserproben der sechs Kohorten. Der Querbalken markiert die NT50% der Verdünnungsreihe. NT%: Neutralisationskapazität bei einer Verdünnungsstufe, NT: HCMV-Non Transmitterinnen, HIG: Hyperimmunglobulin, T: HCMV-Transmitterinnen.

Insbesondere die beiden Kohorten transmittierender Schwangerer (5/6) zeigen in den Verdünnungen 1:64 und 1:256 eine höhere Neutralisationskapazität verglichen mit den anderen Kohorten: Ausgehend von 100 % fallen die Werte auf 93 % und 80 % sowie auf 36 % und 31 % ab. Der Kurvenverlauf der Kohorten NT, HIG+ (1) und NT, HIG+, SG (2) zeigt im Bereich der stärksten untersuchten Verdünnung von 1:1024 eher unveränderliche

NT% verglichen mit der nächsthöheren Konzentration. Diese beiden Kohorten erreichen die 0 % Neutralisation nicht.

3.1.3.6 NT-50 % mittels Probit-Regression

Aus den Ergebnissen der 3 Wiederholungen der PRNT können durch nicht-lineare-Regression (Probit-Model) NT50%-Werte mit 95%-KI für die Pools aus Serum und Fruchtwasser errechnet werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: NT50%-Werte mit 95% Konfidenzintervall für 3 Versuchsreihen an 6 Kohorten auf Fibroblasten (HFF) und Epithelzellen (ARPE-19) mit Fruchtwasser- und Serumpools.

Kohorte	Serum NT50% (95% KI)		Fruchtwasser NT50% (95% KI)	
	HFF	ARPE-19	HFF	ARPE-19
NT, HIG+, SG	1:86 (1-1:339)	1:1759 (1:1172-1:2571)	1:6 (1-1:12)	1:57 (1:8-1:173)
NT, HIG+	1:224 (1:4-1:779)	1:1191 (1:737-1:1722)	1:22 (1:12-1:42)	1:33 (1:11-1:63)
NT, HIG-	1:570 (1:447-1:727)	1:1938 (1:1508 – 1:2507)	1:5 (1:3-1:7)	1:80 (1:59 – 1:108)
NT, HIG-, IgM+	1:20 (1:5-1:46)	1:765 (1:540-1:998)	- (-)	1:5 (1:1-1:15)
T, HIG-	1:200 (1:71-1:388)	1:3192 (1:2754-1:3730)	1:12 (1:10-1:14)	1:142 (1:119-1:172)
T, HIG+	1:416 (1:234-1:716)	1:3865 (1:3484 – 1:4305)	1:21 (1:17-1:25)	1:192 (1:173-1:215)

NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); T: HCMV- Transmitterinnen; NT50%: Probenverdünnung für 50% Neutralisationskapazität; KI: Konfidenzintervall; HFF: humane Vorhautfibroblasten; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen

Daraus lässt sich ableiten, dass die Kohorte NT, HIG-, IgM+ kaum anti-HCMV-Reaktive neutralisierende Antikörper enthält. Im Serum finden sich signifikante Gruppenunterschiede unter Betrachtung der Konfidenzintervalle insbesondere zwischen den NT50%-Werte der Kohorte NT, HIG- und T, HIG- (ausgenommen im Ansatz mit HFF als Zielzellen und der Neutralisation mit Fruchtwasser). In den Ansätzen auf HFF als Zielzellen stellt hier die Kohorte NT, HIG- mit einer NT50% von 1:570 verglichen mit 1:200 in der Kohorte T, HIG- die besser neutralisierende dar. Völlig invers verhalten sich die beiden Kohorten in Bezug auf die NT50% im Ansatz mit ARPE-19 Zellen, wobei mit einer NT50% von 1:1938 die Kohorte NT, HIG- verglichen mit 1:3192 (T, HIG-) schlechter neutralisiert. Zudem besteht ein signifikanter Unterschied zwischen NT, HIG- und NT, HIG+, SG für Serum auf HFF aber nicht auf ARPE-19. Auch das Fruchtwasser dieser beiden Kohorten zeigt keine relevanten Unterschiede in Bezug auf die NT50%. In den Serumansätzen auf ARPE-19 Zellen kann ein signifikant höherer Gehalt an neutralisierenden Antikörpern in den Proben der Kohorten der

Transmitterinnen (T, HIG- und T, HIG+) verglichen mit sämtlichen anderen nicht-transmittierenden Kohorten abgeleitet werden. Dieser Umstand besteht auch im Fruchtwasser, wobei sich hier die Konfidenzintervalle der Kohorten NT, HIG+, SG und T, HIG- überlappen. Die beiden HCMV-transmittierenden Kohorten unterscheiden sich in ihrer Neutralisationskapazität bezogen auf Serum-Pools weder auf HFF noch auf ARPE-19 Zellen signifikant. Im Fruchtwasser zeigen sich signifikant höhere Konzentrationen neutralisierender Antikörper in der HIG-behandelten, transmittierenden Kohorte bei Versuchen auf HFF und ARPE-19-Zellen verglichen mit T, HIG-.

Die Serumverdünnungen 1:2000 (ARPE-19) und 1:162 (HFF) sind in den gepoolten Untersuchungen für die verschiedenen Pools um NT50%-Werte lokalisiert. Dasselbe gilt für die Fruchtwasserverdünnungen 1:100 (ARPE-19) und 1:10 (HFF). Daher wurden diese Konzentrationen zur Neutralisation von Einzelproben verwendet.

3.1.4 Neutralisation von Einzelproben unter definierten Verdünnungen

Die von den Versuchen an gepoolten Proben abgeleiteten Konzentrationen wurden für die Neutralisationen von 143 Paaren Serum- und Fruchtwasserproben im dreifachen Ansatz verwendet. Die Kohortenbildung wurde zu Gunsten der Fallzahlen der einzelnen Subgruppen vereinfacht. Die dabei ermittelten mittleren Neutralisationskapazitäten der Einzelproben und die Spannweite der Ergebnisse zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Mittlere Neutralisationskapazitäten (NT%) und Spannweite der Neutralisation mit Serum- und Fruchtwasser (FW)-Einzelproben.

	\bar{x} (σ)	Minimum	Maximum
Serum NT% ARPE-19 (1:2000) [%]	44,6 (28,4)	0	100
Serum NT% HFF (1:162) [%]	52,4 (29,3)	0	100
FW NT% ARPE-19 (1:100) [%]	34 (28,3)	0	100
FW NT% HFF (1:10) [%]	38,0 (30,1)	0	100

NT%: Neutralisationskapazität bei vorgegebener Verdünnung; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; HFF: humane Vorhauftriblasten; FW: Fruchtwasser

Für die Auswertung der Einzelneutralisationen werden Kohorten, welche den für die PRNT von gepoolten Proben definierten Kohorten (Tabelle 6) ähnlich sind, verwendet. Die Kohorten der HIG-vorbehandelten, nicht-transmittierenden Schwangeren werden zusammengefasst und es wird eine Kohorte zum Zeitpunkt der Erstdiagnostik latent HCMV-infizierter Schwangerer definiert. Die Charakteristika dieser Kohorten zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Maternale und serologische Charakteristika der Proben für Neutralisationen mit Einzelproben.

	NT, HIG+	NT, HIG-	T, HIG-	T, HIG+	Latent	Δ
n	65	14	18	24	22	
\bar{x}_{SSW} (IQR) [Wochen]	20+1 (2,1)	21+3 (3,3)	22+5 (3,6)	23+6 (4,6)	20+3 (1,9)	$P < 0,0001$
\bar{x}_{Alter} (o) [Jahre]	32 (4)	33 (4)	32 (5)	31 (3)	32 (6)	n.s.
$\bar{x}_{Serum\ IgG}$ (IQR) [U/ml]	121 (89)	4 (57)	149 (221)	176 (136)	313 (194)	$P < 0,0001$
$\bar{x}_{Serum\ Avidität}$ (IQR) [%]	65 (10)	32 (17)	53 (20)	63 (13)	66 (14)	$P < 0,0001$
$\bar{x}_{FW\ IgG}$ (IQR) [U/ml]	4 (2,5)	0 (1,8)	5 (6,0)	6 (6,0)	7 (9,3)	$P < 0,0001$
$\bar{x}_{FW\ Avidität}$ (o) [%]	80 (6)	14 (26)	52 (27)	78 (8)	73 (10)	$P < 0,0001$

FW: Fruchtwasser; SSW: Schwangerschaftswochen; IQR: Interquartilenabstand; n.s.: nicht signifikant (ANOVA/Kruskal-Wallis-Test); NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV-Transmitterinnen; NTS0%: latent: latent HCMV- infizierte Schwangere

Serum

Der Abbildung 24 können die entsprechenden NT% für Serumproben bei Verdünnungen von 1:2000 auf ARPE-19-Zellen und auf HFF in der Verdünnung 1:162 entnommen werden. Es zeigt sich, dass die beiden Kohorten der HCMV-Transmitterinnen in beiden Zellsystemen jeweils mit im Median 57 % und 58 % (T, HIG-) sowie 55 % und 69 % (T, HIG+) den höchsten Gehalt an neutralisierenden HCMV-spezifischen Antikörpern enthalten.

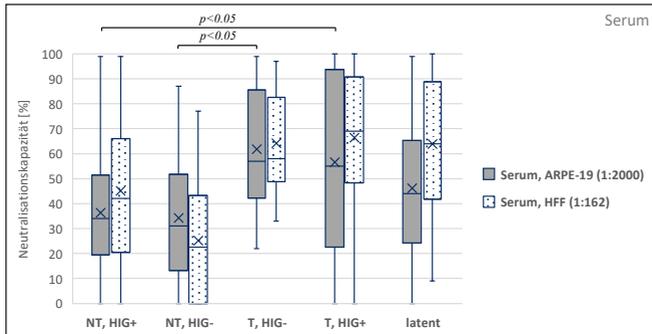


Abbildung 24: Neutralisationskapazitäten von 5 Kohorten nach Einzelneutralisationen von Serumproben gegen zwei Target-Zellsysteme; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; HFF: humane Vorhautfibroblasten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen

Insgesamt zeigt sich eine große Spannweite von näherungsweise 0 % bis 100 % Neutralisation in HIG-vorbehandelten Kohorten. Unter den Schwangeren, die ohne HIG-Behandlung HCMV diaplazentar übertragen haben, liegen die geringsten NT% dagegen deutlich höher zwischen 22 % und 33 %. In der Kohorte NT, HIG- wird bei den gegebenen Verdünnungsstufen keine 100 % Neutralisation erreicht.

Mittels Varianzanalyse kann gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse der Kohorten sowohl für ARPE-19 ($p = 0,001$) als auch für HFF ($p < 0,0001$) als Zellsystem signifikant unterscheiden. Relevante Unterschiede in der Versuchsreihe auf HFF finden sich zwischen den Kohorten NT, HIG+ (\bar{x} : 45 %; σ : 28) und T, HIG+ (\bar{x} : 66 %; σ : 28; $p = 0,01$) sowie den Kohorten NT, HIG- (\bar{x} : 25; σ : 27) und T, HIG- (\bar{x} : 64; σ : 19; $p = 0,001$).

Vergleichbare Beobachtung können auch für ARPE-19 als Zellsystem vorgenommen werden, wengleich die Mittelwerte aller Kohorten in diesen Versuchsreihen näher zusammen liegen (Abbildung 24).

Latent mit HCMV-infizierte Schwangere zeigen einen mittleren NT%-Wert von 46 % (σ : 29) und liegen damit zwischen den Kohorten der nicht-HCMV transmittierenden Schwangeren und den Transmitterinnen (ARPE-19). Der mittlere NT%-Wert auf HFF als Zellsystem liegt mit 64 % (σ : 27) deutlich höher und unterscheidet sich deutlich von der Kohorte NT, HIG- ($p < 0,0001$).

Fruchtwasser

In den Neutralisationsversuchen von individuellen Fruchtwasserproben zeigen sich ebenfalls in mehreren Kohorten große Spannweiten. Wobei die Kohorte der latent HCMV-infizierten Frauen in Versuchsreihen mit HFF und ARPE-19 weder die 0 % noch die 100 % erreicht (Abbildung 25).

Auch der Gruppenvergleich der Neutralisationsversuche von Amnionflüssigkeit ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Post-Hoc-Analyse (ARPE-19) konnten dabei Unterschiede zwischen NT, HIG+ (\bar{x} : 24; σ : 22) und T, HIG+ (\bar{x} : 47; σ : 37; $p = 0,007$) sowie T, HIG- (\bar{x} : 45; σ : 32; $p = 0,046$) festgestellt werden.

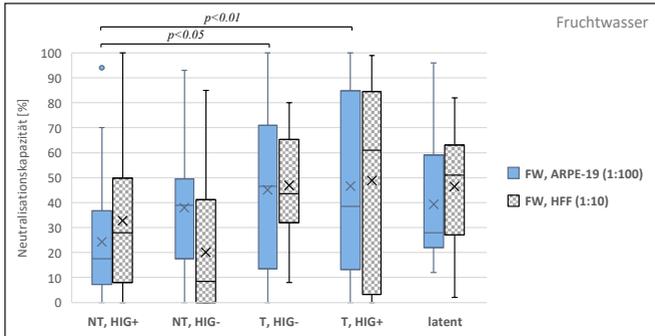


Abbildung 25: Neutralisationskapazität von 5 Kohorten nach Einzelneutralisation von Fruchtwasserproben gegen zwei Target-Zellsysteme; FW: Fruchtwasser; ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; HFF: humane Vorhautfibroblasten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV-Transmitterinnen

Sowohl in der Neutralisation von Serum- als auch Fruchtwasserproben zeigt sich, dass die Proben von Schwangeren NT, die mit HIG vorbehandelt wurden, eher niedrigere Konzentrationen an neutralisierenden HCMV-spezifischen Antikörpern enthalten. Ebenso lässt sich ableiten, dass insbesondere die HCMV-Transmission von der mütterlichen in die fetale Zirkulation einen Effekt auf die in der Folge bestimmte Neutralisationskapazität zu haben scheint. Die beiden betreffenden Kohorten (T, HIG- und T, HIG+) zeigen jeweils die höhere mittleren NT% verglichen mit den Non-Transmitterinnen.

Sowohl die Ergebnisse der Einzelneutralisationen gegen HFF und ARPE-19 mit Serum als auch mit Fruchtwasser zeigen, dass für alle Kohorten tendenziell die mittleren Neutralisationskapazitäten gegen HFF mit einer 1:162 (Serum) bzw. 1:10 (Fruchtwasser) Verdünnung höher sind als gegen ARPE-19 Zellen mit Verdünnungen von 1:2000 (Serum) bzw. 1:100 (Fruchtwasser). Der direkte Vergleich der Versuchsansätze in zwei Zellsystemen ist, bedingt durch unterschiedliche Verdünnungen, nicht möglich. Es fällt auf, dass sowohl im Versuchsaufbau mit Serum als auch mit Fruchtwasser die Kohorte NT, HIG- entgegen dem Trend in den anderen Kohorten im Ansatz mit HFF geringere Neutralisationskapazitäten zeigt als gegen ARPE-19 (Abbildung 24, Abbildung 25).

3.2 Serologische Einflussfaktoren der Neutralisationskapazität

In Serum und Fruchtwasser sind große Spannweiten bei den gemessenen NT% von 143 Probenpaaren in allen Kohorten feststellbar. Unterschiede in serologischen Parametern, die, wie bereits in Tabelle 9 angegeben, über die Kohorten signifikante und relevante Unterschiede zeigen, sollen daher im Kontext der NT% näher beschrieben werden.

3.2.1 Anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität

Die Höhe des HCMV-spezifischen IgG variiert sehr stark über die Kohorten mit einem minimalen mittleren Spiegel in der Gruppe der HIG-naiven NT. In dieser Gruppe ist auch die Avidität der gemessenen IgG besonders niedrig (Abbildung 26).

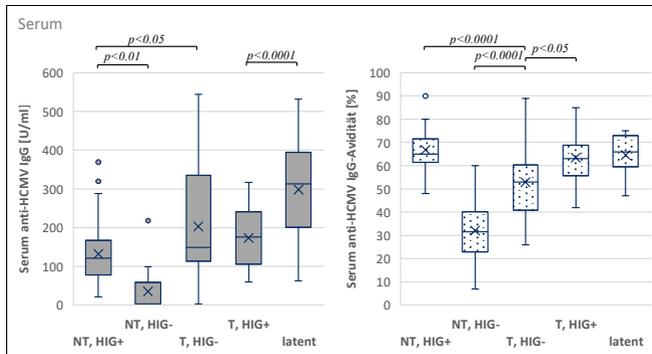


Abbildung 26: Anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität im Serum in den Kohorten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen

Obwohl in den beiden Kohorten der HCMV-Transmitterinnen (T, HIG- und T, HIG+) in den PRNT und den Einzelneutralisationen durchweg hohe Konzentrationen an HCMV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnten, sind die anti-HCMV-IgG-Spiegel und auch die Höhe der Avidität der IgG in der Kohorte T, HIG- signifikant niedriger als die IgG-Konzentrationen in der Kohorte der latent HCMV-Infizierten Schwangeren und auch der Avidität der Kohorte der mit HIG behandelten NT. Die Avidität der HCMV-spezifischen IgG ist insbesondere in dieser Kohorte sehr hoch und zeigt mit 90 % auch den höchsten gemessenen Einzelwert (Abbildung 26).

Die mittleren IgG-Konzentrationen im Fruchtwasser sind, verglichen mit jenen im Serum etwa um den Faktor 20 geringer. Die relativen Konzentrationsunterschiede zwischen den fünf Kohorten sind jedoch in beiden Kompartimenten ähnlich. Ebenso sind die Unterschiede in der Avidität der IgG im Fruchtwasser gleichsinnig ausgeprägt. Die gemessenen Aviditätsindizes im Fruchtwasser sind in allen, außer den beiden HIG-naiven Kohorten, deutlich höher als in den Serumproben. Insbesondere in der Kohorte NT, HIG- zeigt sich im Fruchtwasser eine niedrige mittlere Avidität (Abbildung 27).

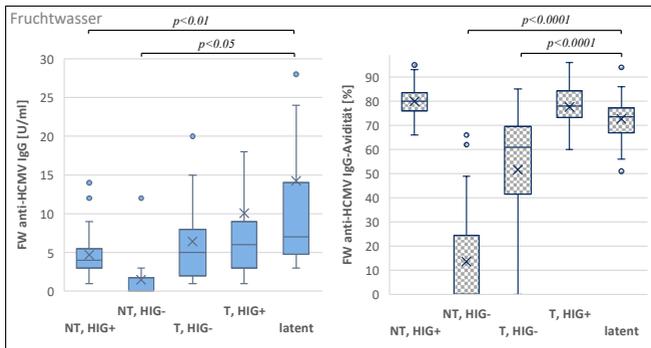


Abbildung 27: Anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität im Fruchtwasser in den Kohorten; FW: Fruchtwasser; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV-Transmitterinnen.

Der Abbildung 27 lässt sich zudem entnehmen, dass die anti-HCMV IgG-Konzentrationen der transmittierenden Kohorten nicht wesentlich höher sind als in der Kohorte NT, HIG+. Obwohl beide Kohorten (T, HIG- und T, HIG+) im Fruchtwasser hohe neutralisierende Effekte zeigen (Tabelle 7, Abbildung 25). Die beiden HIG-unbehandelten Kohorten zeigen signifikant niedriger-avide HCMV-IgG als die mit HIG behandelten Schwangeren oder latent HCMV-infizierte Schwangere.

Abbildung 28 zeigt ein Streudiagramm, in dem auf der Abszisse die Serum-NT% bei Neutralisation auf ARPE-19 Zellen gegen die individuellen Serum-anti-HCMV-IgG-Werte (ECLIA) [U/ml] auf der Ordinate abgetragen sind. Bemerkenswert ist, dass es Proben gibt, deren NT% deutlich über 20% liegen, während im ECLIA HCMV-IgG Konzentrationen niedrige Konzentrationen kleiner als 10 U/ml gemessen werden.

Die bivariate Korrelation nach Pearsons der in Abbildung 28 dargestellten Daten ergibt $r = 0,453$ ($p < 0,0001$). Die Korrelation der Datensätze nach Transmissionsstatus ergibt für Daten der Transmitterinnen $r = 0,54$ ($p < 0,0001$) und für die der nicht-transmittierenden Schwangeren $r = 0,389$ ($p < 0,0001$). Vergleichbare Ergebnisse liefert auch die Untersuchung der Korrelation der Serum-IgG-Werte mit den NT%-Daten aus den Versuchsreihen mit HFF und die Korrelationen der Versuchsreihen mit beiden Zellsystemen und Fruchtwasserproben mit den HCMV-IgG- Konzentrationen im Fruchtwasser.

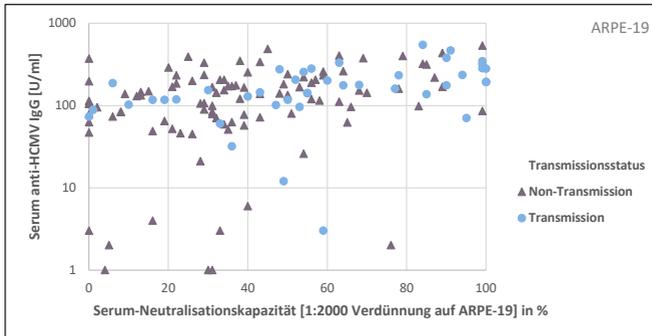


Abbildung 28: Streudiagramm der Serum-HCMV-IgG und Neutralisationskapazität nach HCMV-Transmissionsstatus; ARPE-19: Adulte Retinapigmentepithelzellen.

Tabelle 10 zeigt die Korrelationskoeffizienten für die Korrelationen von anti-HCMV-IgG-Konzentrationen und die Neutralisationskapazitäten in Serum um Fruchtwasser. Zudem wurden die gemessenen anti-HCMV-IgG-Aviditäten mit den individuellen NT% korreliert. Die ermittelten Produkt-Moment-Korrelationen nach Pearson (r) und Rangkorrelationen nach Spearman (ρ) ergeben für die Beziehungen zwischen IgG-Konzentration und NT% überwiegend Werte, die einen mittelstarken Zusammenhang vermuten lassen.

Bei den Korrelationen von anti-HCMV-IgG mit NT% zeigen in der Regel die Transmitterinnen einen stärkeren Zusammenhang beider Variablen als die Non-Transmitterinnen. Einzige Ausnahme ist die Korrelation der NT% auf HFF aus

Serumproben mit dem Serum anti-HCMV-IgG. Hier zeigen die Non-Transmitterinnen den stärkeren Zusammenhang.

Tabelle 10: Korrelation von anti-HCMV-IgG beziehungsweise anti-HCMV-IgG-Avidität mit Neutralisationskapazitäten (NT%), jeweils aus Serumproben und Fruchtwasserproben (FW).

Korrelation von	Und	Gesamt	Transmitterinnen	Non-Transmitterinnen
Serum anti-HCMV-IgG [U/ml]	Serum NT% ARPE; 1:2000	$r=0,45; p<0,0001$	$r=0,54; p<0,0001$	$r=0,39; p<0,0001$
	Serum NT% HFF; 1:162	$r=0,49; p<0,0001$	$r=0,39; p<0,0001$	$r=0,5; p<0,0001$
FW anti-HCMV-IgG [U/ml]	FW NT% ARPE; 1:100	$\rho=0,4; p<0,0001$	$\rho=0,62; p<0,0001$	$\rho=0,25; p=0,015$
	FW NT% HFF; 1:10	$\rho=0,51; p<0,0001$	$\rho=0,59; p<0,0001$	$\rho=0,44; p<0,0001$
Serum IgG-Avidität [%]	Serum NT% ARPE; 1:2000	$\rho=-,24; p=0,004$	$\rho=-,34; p=0,029$	$\rho=-,11; p=0,27$
	Serum NT% HFF; 1:162	$\rho=0,04; p=0,6$	$\rho=0,02; p=0,91$	$\rho=0,13; p=0,19$
FW IgG-Avidität [%]	FW NT% ARPE; 1:100	$\rho=-,4; p<0,0001$	$\rho=-,32; p=0,045$	$\rho=-,35; p<0,0001$
	FW NT% HFF; 1:10	$\rho=-,1; p=0,133$	$\rho=-,28; p=0,08$	$\rho=0,01; p=0,93$

ARPE-19: Retinapigmentepithelzellen; HFF: Humane Vorhaufibroblasten

Die Avidität der HCMV-IgG im Serum beziehungsweise Fruchtwasser korreliert deutlich weniger stark mit den NT%. Für die Serum-IgG-Avidität gegenüber der Serum-NT% auf HFF und der Fruchtwasser-IgG-Avidität gegenüber den entsprechenden Neutralisationsversuchen auf HFF kann nicht mehr von einer Korrelation der gemessenen Werte ausgegangen werden. Ein Streudiagramm, das die Serum-NT% auf HFF bei einer Verdünnung von 1:162 gegen die individuell gemessene IgG-Avidität darstellt, zeigt Abbildung 29. Über die gesamte Spannweite der NT% von 0 % bis 100 % divergieren die entsprechenden IgG-Aviditätsindizes überwiegend zwischen 50 % und 80 %. Auffällig ist, dass für sieben Fälle, deren Neutralisationskapazität jeweils bei 0 % im Serum auf HFF lag, Werte für die anti-HCMV-IgG-Avidität zwischen 7 % und 76 % gemessen werden konnten.

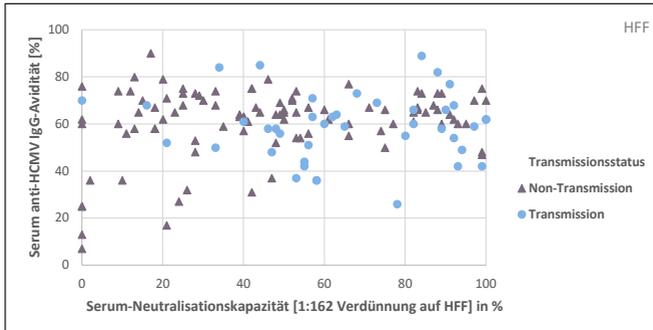


Abbildung 29: Streudiagramm der Serum-HCMV-IgG-Avidität und Neutralisationskapazität nach HCMV-Transmissionsstatus; HFF: Humane Vorhautfibroblasten.

3.2.2 Anti-recgB2-Reaktivität

Um den Einfluss verschiedener Antikörper gegen HCMV-Antigene zu erfassen, wurde neben den Ergebnissen der HCMV-IgG-Konzentrationen, gemessen mittels ECLIA unter Verwendung eines Antigenmix, auch die Reaktivität gegen rekombinantes gB2 in Zusammenhang mit den Neutralisationskapazitäten gebracht.

Dabei zeigt sich, dass die Präsenz von anti-recgB2-IgG auch in Abhängigkeit einer Vorbehandlung mit HIG steht. Denn nur die beiden mit HIG behandelten Kohorten beinhalten im direkten Vergleich aller Kohorten ausschließlich anti-recgB2 positive Serumproben. Auch im Fruchtwasser ist der Anteil der anti-gB2-reaktiven Fruchtwasserproben bei jenen Frauen unterrepräsentiert. Abbildung 30 zeigt zudem, dass der geringste Anteil von Proben mit IgG gegen HCMV-gB2 in der Kohorte der HIG-naiven NT zu finden ist. Über 25 % der Serumproben mit hoher anti-recgB2 Aktivität (+++) findet sich in der Gruppe der latent HCMV-infizierten Schwangeren. Im Fruchtwasser ist es demgegenüber die Kohorte T, HIG-, die den größten Anteil hochreaktiver Proben aufweist. Verteilungsdiagramme zu den anderen rekombinanten Antigenen des Immunoblots (IE1, CM2, p65, p150 und gB1) zeigt Abbildung 31. Es fällt auf, dass insbesondere gegen das rekombinante p150 ein deutlicher Anteil an reaktiven Proben vorliegt.

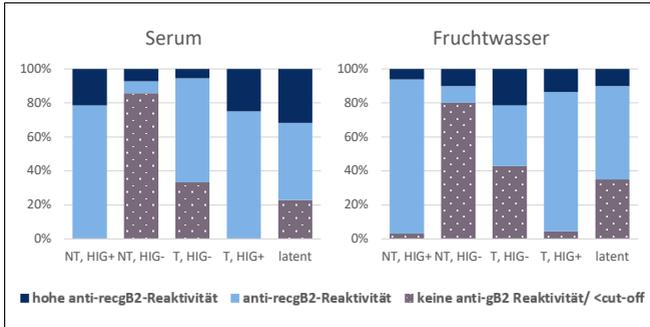


Abbildung 30: Relativer Anteil von gB2-reaktiven und nicht-gB2-reaktiven Proben an 5 Gesamtkohorten; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; T: HCMV- Transmitterinnen

Wenn die anti-recgB2-Reaktivität der Serum- und Fruchtwasserproben gegen die NT% der Proben abgetragen wird (Abbildung 32), zeigt sich, dass für beide Probenotypen und für Neutralisationstests auf beiden Zellsystemen (ARPE-19 und HFF) die Mittelwerte für die Proben mit und ohne anti-HCMV gB2-spezifische IgG relativ eng zusammenliegen. Die anti-recgB2-IgG-areaktiven Proben (23/143) zeigen lediglich im Ansatz mit Fibroblasten als Zielzellsystem für die Neutralisation ein signifikant geringere mittlere NT% (\bar{x} : 37; σ : 27) als jene Proben (120/143), die im rekombinanten Immunoblot eine Reaktivität zwischen + und +++ aufweisen (\bar{x} : 55; σ : 29; $p = 0,008$).

In den Neutralisationstests von Fruchtwasserproben auf ARPE-19 zeigt sich ein den anderen Ergebnissen inverses Bild: Die Proben ohne die anti-recgB2-IgG-reaktive Komponente zeigen im Mittel einen geringgradig höheren Anteil (\bar{x} : 36; σ : 26) neutralisierender Antikörper als die Proben, die sich im Immunoblot reaktiv gegenüber recgB2 zeigen (\bar{x} : 33; σ : 28).

Die vergleichenden Untersuchungen der Neutralisationskapazität in Abhängigkeit von der Reaktivität gegenüber anderen, beim Immunoblot semiquantitativ erfassbaren rekombinanten Antigenen (recIE1, recCM2, recp150, recP65 und recgB1), zeigt kaum auffällige Unterschiede zwischen reaktiven und areaktiven Proben. Abbildung 33 zeigt die Analysen der NT% unterschieden nach Reaktivität gegenüber einzelnen Antigenen.

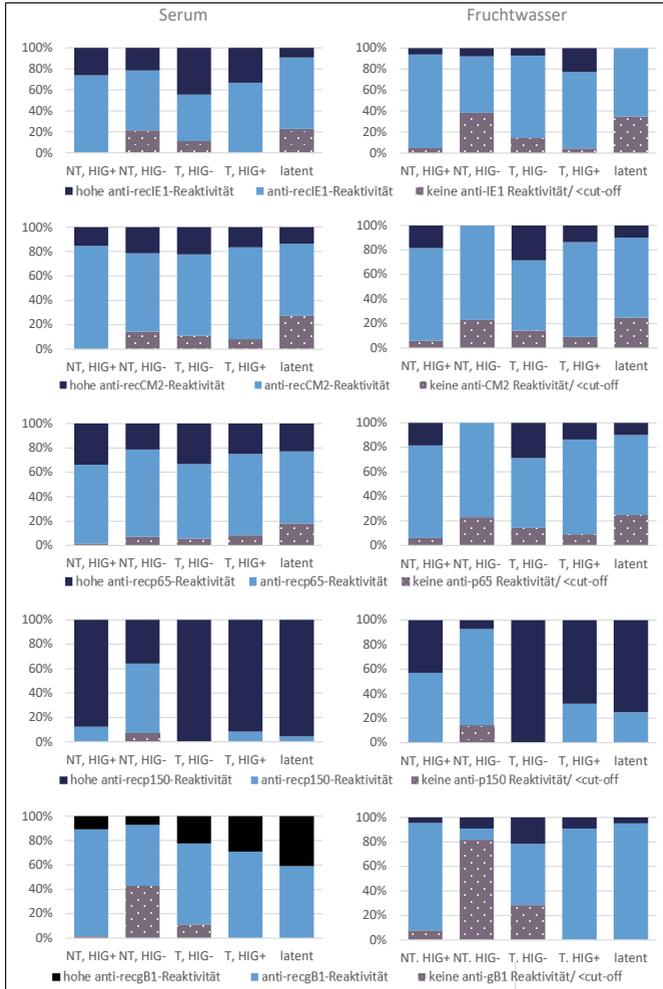


Abbildung 31: Relativer Anteil der Reaktivitätsmuster der Kohorten nach Transmissionsstatus in Serum (links) und Fruchtwasser (rechts) im Immunoblot gegenüber den rekombinanten Antigenen IE1, CM2, p65, p150 und gB1.

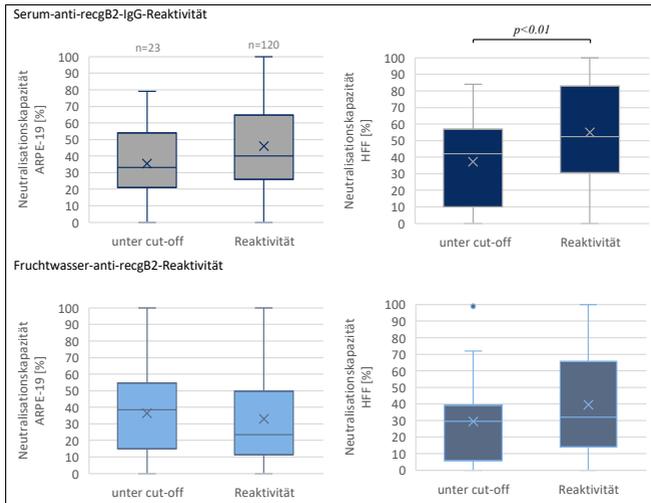
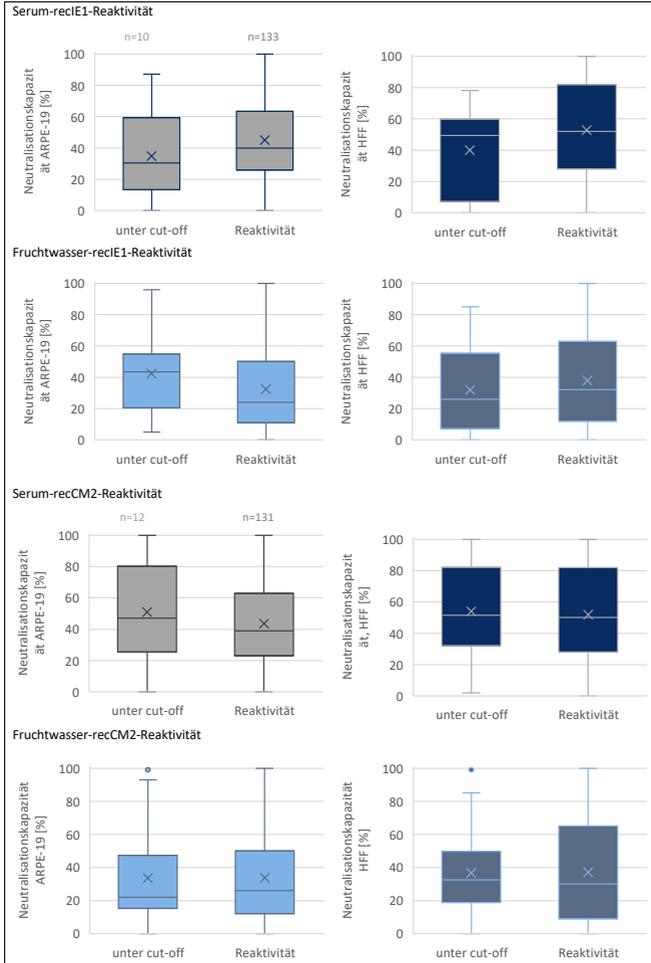
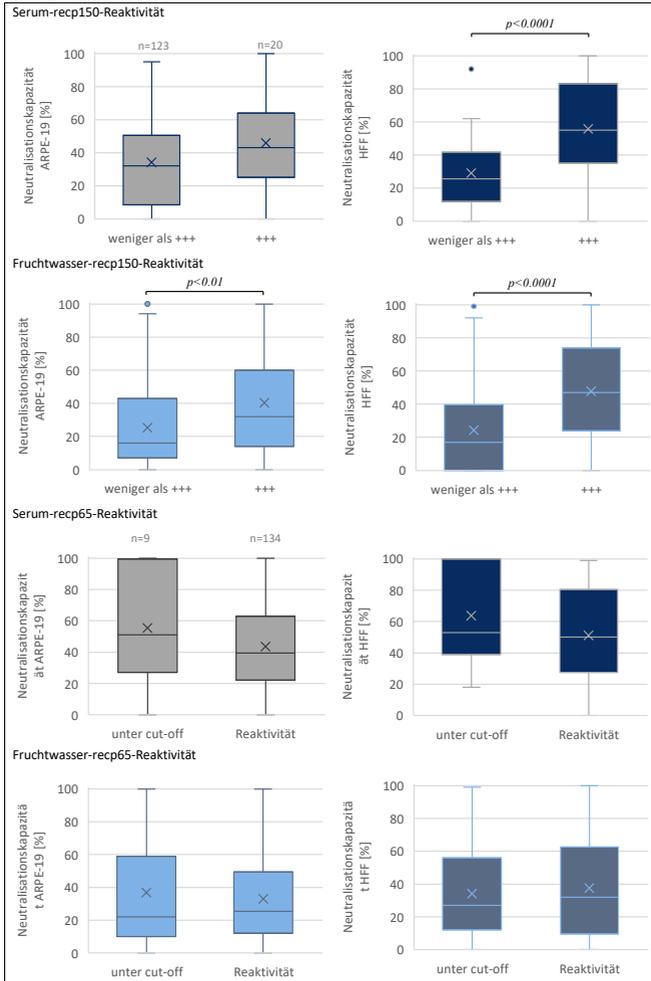


Abbildung 32: Neutralisationskapazität in Abhängigkeit von der Reaktivität gegenüber recB2; Reaktivität von + bis +++ gemäß dem Auswertungsschema der Fa. Mikrogen.

Grundsätzlich sind im Immunblot nur wenige Serumproben gegen einzelne Antigene reaktiv (zwischen 9 und 12 Proben je nach Antigen). Im Fruchtwasser ist dieser Anteil geringfügig höher. Bei der Reaktivität gegen das p150-Antigen zeigt jede Probe reaktive Antikörper. Die Aufteilung in reaktive (+ und ++) und stark reaktive (+++) Proben ergibt einen signifikanten Unterschied in der NT% auf HFF zwischen 29 % (+ und ++) und 56 % (+++). Dieser Unterschied besteht auch zwischen Fruchtwasserproben sowohl auf HFF als auch auf ARPE-19-Zellen. Ein weiterer, hoch-signifikant nachweisbarer Unterschied besteht in der NT% zwischen gB1-reaktiven und -areaktiven Proben bei der Neutralisation von Serum und Fruchtwasser auf HFF.





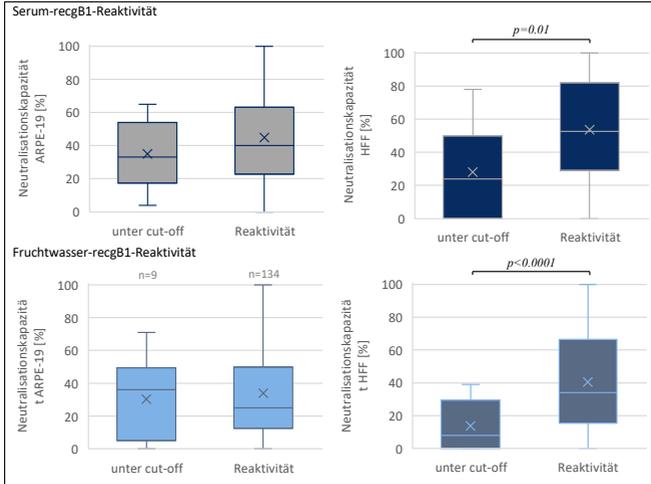


Abbildung 33: Assoziation der Reaktivität gegenüber einzelnen rekombinanten Antigenen des rekombinanten Immunoblots und der Neutralisationskapazität auf ARPE-19 und HFF-Zellen in Serum- und Fruchtwassereinzelnproben (Reaktivität von + bis +++ gemäß dem Auswertungsschema der Fa. Mikrogen).

3.3 HCMV-Quantifizierung

Es standen 51 Fruchtwasserproben von 34 Föten und 33 Schwangeren zur Verfügung, die in der 18h-Kurzzeit-Mikrokultur und der qPCR positiv auf eine stattgehabte diaplazentare HCMV-Infektion getestet wurden. Die Proben stammen aus dem Zeitraum zwischen Januar 2007 und Dezember 2017. Bei 11 dieser Schwangeren wurden mehrere ACs durchgeführt, um direkt intraamnial beziehungsweise in die Nabelschnur HIG zu applizieren. 11 Proben wurden von der Analyse der Viruslast, differenziert nach Vorbehandlung, ausgeschlossen (Tabelle 11). Zu diesen Ergebnissen wurden bereits Daten publiziert [138].

Tabelle 11: Von der Analyse der Viruslast, differenziert nach Vorbehandlung, ausgeschlossene Fruchtwasserproben mit Ausschlusskriterium.

Probe	SSW	HCMV DNA [IU/ml]	N_{IE}/ml	Ausschlusskriterium
1	21+1	75 950	0	>50 h präanalytische Phase
6	26+2	7 114 500	179	>50 h präanalytische Phase
3a	20+3	6526	0	Virusisolation nach mehreren Passagen
3b	22+1	3 053 501	-	Hämolytische Kontamination
5a	20+2	12 726	2	HIG i.a. direkt vor Probenentnahme
5b	22+2	1612	5	HIG i.a. direkt vor Probenentnahme
29	31+0	18 135 000	98	HIG i.a. direkt vor Probenentnahme
4	20+5	-	1680	Kein Material zur qPCR-Testung
21c	25+1	92 690	40 000	<7d zwischen 2 Amniozentesen
30/31 (Zwilling 2)	20+5	31 000 (AF1) 13 873 (AF2)	230 (AF1) 7(AF2)	Unklarer Einfluss Zwillingschwangerschaft
30/31 (Zwilling 2)	20+5			Unklarer Einfluss Zwillingschwangerschaft

SSW: Schwangerschaftswoche; N_{IE}/ml : Antigengefärbte Kerne/ml; HIG: Hyperimmunglobulin; i.a.: intraamnial; qPCR: quantitative PCR; AF: Fruchtwasser

Um den Zusammenhang zwischen der DNA-Quantifizierung mittels qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur zu untersuchen, wird eine bivariate Korrelation (Spearman's Rho) durchgeführt. Untersuchungsergebnisse aus 40 Fruchtwasserproben von 29 Schwangeren werden für Proben von HIG-vorbehandelten Frauen und nach stattgehabter Vorbehandlung mit HIG vor der AC separat ausgewertet. Diese Unterscheidung wird getroffen, um den potenziellen Einfluss extern zugeführter Immunglobuline auf die virale Infektiosität in der Mikrokultur abzubilden. Das Streudiagramm zur Korrelation der

Ergebnisse aus qPCR und Mikrokultur von HIG-naiven Proben ist in Abbildung 34 dargestellt. Die beiden quantitativen Tests korrelieren mit $\rho = 0,903$ ($n = 15, p < 0,0001$).

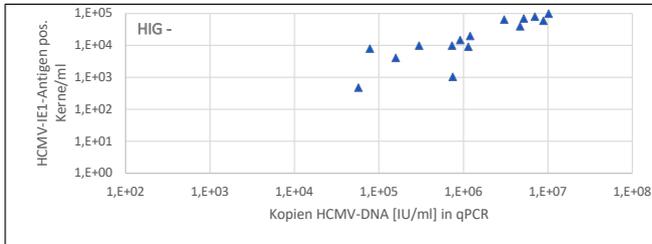


Abbildung 34: Korrelation von qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur aus Fruchtwasser HIG-negativer Schwangerer; qPCR: quantitative PCR; Daten bereits publiziert [138].

Dem gegenüber steht die Korrelation der Ergebnisse von qPCR und Mikrokultur aus Proben von HIG-vorbehandelten Schwangeren zur Prävention der diaplazentaren HCMV-Transmission mit $\rho = 0,445$ ($n = 25$), dargestellt in Abbildung 35.

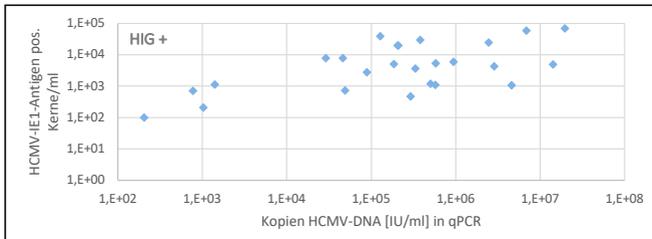


Abbildung 35: Korrelation von qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur aus Fruchtwasser HIG-behandelter Schwangerer; qPCR: quantitative PCR; Daten bereits publiziert [138].

Im Gesamtkollektiv sind weder die Ergebnisse der qPCR noch der Mikrokultur in Zusammenhang mit dem Gestationsalter zu bringen. Für HIG naives Fruchtwasser ergibt sich für die Ergebnisse der Kurzzeitkultur in Relation zum Gestationsalter $\rho = 0,161$ ($n = 15; p = \text{n.s.}$). Die Ergebnisse der qPCR korreliert mit dem Gestationsalter ergeben $\rho = 0,318$ ($n = 15; p = \text{n.s.}$).

Bei Vorbehandlung mit HIG können keine relevanten Zusammenhänge zwischen der gemessenen Anzahl der Kopien ($\rho = -0,134; n = 25; p = \text{n.s.}$) beziehungsweise HCMV

positiven Kernen in der Kurzzeitkultur ($\rho = -0,223$; $n = 25$; $p = \text{n.s.}$) und dem Schwangerschaftsalter festgestellt werden.

Abbildung 36 zeigt die assoziierten Streudiagramme zu den Ergebnissen der quantitativen Methoden und dem Gestationsalter.

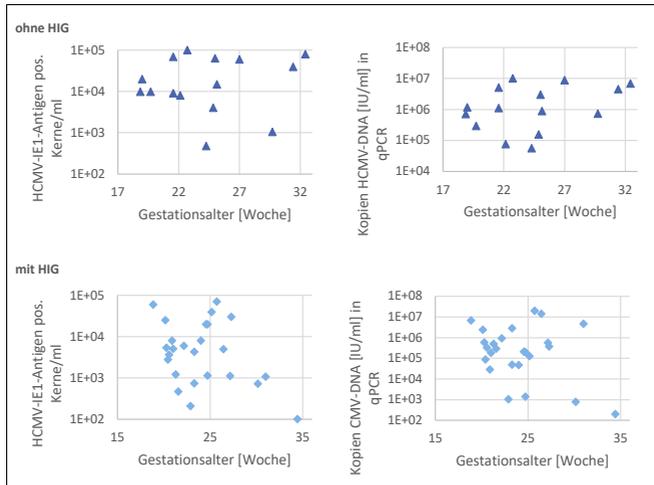


Abbildung 36: Korrelationen von qPCR beziehungsweise 18h-Kurzzeit-Mikrokultur und dem Schwangerschaftsalter in Abhängigkeit zur Vortherapie mit oder ohne HIG (Hyperimmunglobulin); qPCR: quantitative PCR.

Des Weiteren werden die gemessenen Werte aus qPCR und Kurzzeitkultur je nach Vorbehandlung in den definierten Kohorten 1 bis 3 verglichen (siehe auch 2.8.2). Tabelle 12 zeigt das maternale Alter bei AC, den vermuteten Zeitraum der PI und das Gestationsalter zum Zeitpunkt der AC der Kohorten.

Tabelle 12: Angaben zum maternalen Alter, Gestationsalter (GA) bei Primärinfektion und Amniozentese (AC) zum Gruppenvergleich der Viruslast in qPCR und Kurzzeitkultur bei HCMV-transmittierenden Schwangeren.

	Gruppe 1 HIG-naiv; n=13	Gruppe 2 andere HIG- Behandlung; n=7	Gruppe 3 zweiwöchentlich 200U HIG/kgKG; n=9
Maternales Alter zur AC [Jahre]	34 (IQR: 4,5)	34 (IQR: 9,0)	31 (IQR: 5)
GA zur PI	5/13: < 8+0	<12+0	8/9: < 11+0;
[Gestationswoche]	8/13: >6+0 & <17+0		1/9: >12+0
GA zur AC			
[Gestationswoche]	24+2 (IQR: 5,43)	22+6 (IQR: 7,0)	21+0 (IQR: 2,93)

HIG: Hyperimmunglobulin; IQR: Interquartilenabstand; PI: Primärinfektion; kgKG: Kilogramm Körpergewicht

Die mittlere Anzahl der HCMV-IE1-Antigen positiven Zellkerne in der quantitativen 18-Kurzzeit-Mikrokultur liegt bei 8×10^3 N_{IEA/ml} in der Gesamtkohorte mit maximal 7×10^4 N_{IEA/ml} und minimal 102 IE-Antigen-gefärbten Kernen. Abbildung 37 stellt die Verteilung der N_{IEA/ml} in den Subkohorten mit und ohne HIG-Behandlung dar.

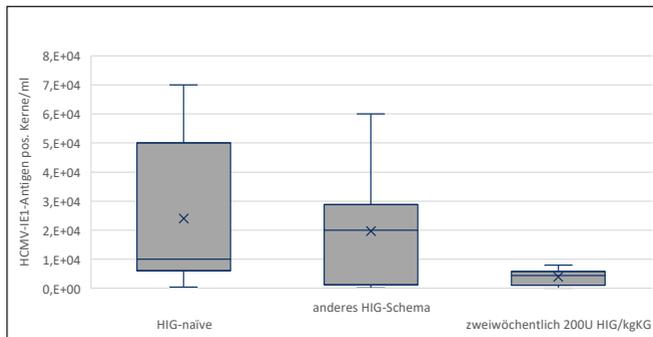


Abbildung 37: Anzahl der HCMV-IE1-Antigen gefärbten Kerne in der Kurzzeit-18h-Mikrokultur in den drei Subkohorten der HIG-Behandlung; HIG: Hyperimmunglobulin; kgKG: Kilogramm Körpergewicht; daten bereits publiziert [138].

Gruppe 3 zeigt einen niedrigeren Median für die IE1-exprimierenden Zellkerne (\bar{x} : 5×10^3 N_{IEA/ml}; IQR: 5352) verglichen mit Fruchtwasserproben HIG-unbehandelter Schwangerer (\bar{x} : 1×10^4 N_{IEA/ml}; IQR: 4×10^4) mit $p = 0,025$ (Mann-Whitney-U). Die mediane Anzahl an IE1-exprimierenden Kernen ist am höchsten in der Gruppe der HIG-vorbehandelten Schwangeren, die nicht nach striktem Behandlungsprotokoll HIG erhalten haben (Gruppe 2; 2×10^4 N_{IEA/ml}; IQR: $2,8 \times 10^4$).

In der qPCR ergeben sich zwischen 203 IU DNA/ml und $8,84 \times 10^6$ IU DNA/ml (\bar{x} : 5×10^5 IU DNA/ml) über alle drei Subkohorten. Es können Effekte analog zu den

Ergebnissen der Verteilung der Infektiosität in der Kurzzeitkultur beobachtet werden (Abbildung 38). HIG-naives Fruchtwasser enthält im Median $9,1 \times 10^5$ IU DNA/ml (IQR: $3,6 \times 10^6$). Dies steht im Gegensatz zu \bar{x} : 2×10^5 IU DNA/ml (IQR: 4×10^5) im Fruchtwasser von Schwangeren, die zuvor zweiwöchentlich 200U HIG/kgKG erhalten hatten ($p = 0,037$; Mann-Whitney-U). Die Subkohorte mit der weniger strikten HIG-Vorbehandlung zeigte im Median 5×10^5 IU DNA/ml (IQR: $2,2 \times 10^6$).

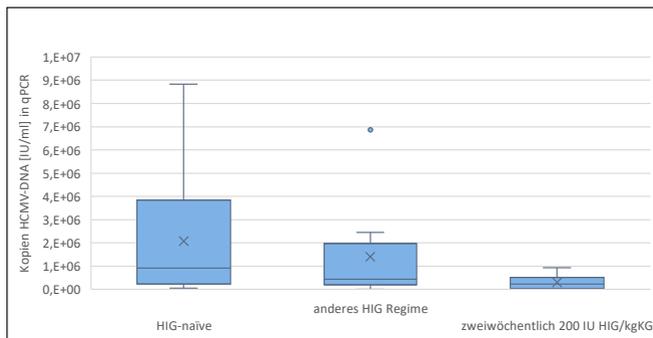


Abbildung 38: Kopienzahl HCMV-DNA in der qPCR in den drei Subkohorten der HIG-Behandlung; qPCR: quantitative PCR; HIG: Hyperimmunglobulin; kgKG: Kilogramm Körpergewicht; Daten bereits publiziert [138].

Die direkte intraamniotische HIG-Applikation führt zu stark reduzierter in vitro-Infektiosität des HCMV-infizierten Fruchtwassers. Während die in der qPCR gemessene Viruslast zwischen $1,6 \times 10^3$ und 18×10^6 IU HCMV DNA/ml Fruchtwasser beträgt, können lediglich zwischen 2 bis zu 98 N_{IEA}/ml Fruchtwasser nachgewiesen werden (Tabelle 11). In einem Fall konnte, trotz initial negativer 18h-Kurzzeitkultur, nach mehrmaligem Passagieren des Überstandes ein HCMV-Isolat gewonnen werden.

Das Outcome der Schwangerschaften nach erfolgter diaplazentarer HCMV-Übertragung kann für 25 der 33 Schwangerschaften nachvollzogen werden. In 10 Fällen endete die Schwangerschaft im intrauterinen Fruchttod oder Schwangerschaftsabbruch, wobei neun Schwangere kein HIG vor der ersten AC erhalten hatten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Fälle von HCMV-Transmission mit intrauterinem Fruchttod oder Termination und Viruslast; Daten bereits publiziert [138].

Probe	GA bei AC	HCMV DNA [IU/ml]	N _{IEA} /ml	HIG- +/-	Schwangerschaftsverlauf GA
1	19+4	757 950	0*	-	IUFD (19+4)
5	24+4	209 250	20 000	-	IUFD (31+6)
12	21+5	5 177 000	70 000	-	TOP (21+5)
13	25+0	3 038 000	64 000	-	TOP (25+0)
14	29+5	748 650	1057	-	TOP (31+5)
18a	31+3	4 654 650	40 000	-	TOP (32+3)
18b	32+3	7 006 000	80 000	-	
21a	20+6	28 830	8000	+	TOP (29+1)
21b	25+1	127 720	40 000		
20	25+1	911 400	15 000	-	TOP (25+1)
27	19+0	1 195 050	20 000	-	TOP (19+6)
32	27+0	8 835 000	60 000	-	TOP (29+1)

GA: Gestationsalter; AC: Amniozentese; N_{IEA}: immediate early-Antigen gefärbte Zellkerne; HIG: Hyperimmunglobulin; IUFD: intrauterine fetal death; TOP: termination of pregnancy

16 Schwangerschaften endeten mit der Kindsgeburt. Zu 11 der geborenen Kinder konnten die Untersuchungsbefunde nachvollzogen werden. In sechs Fällen lagen unmittelbar postnatal keine Hinweise auf eine symptomatische kongenitale HCMV-Infektion vor. Von den asymptomatischen Neugeborenen wurden alle Mütter präpartal mit anti-HCMV-IgG behandelt.

In der Folge von fünf Schwangerschaften wurden Kinder mit Symptomen geboren, die vereinbar mit einer kongenitalen HCMV-Infektion waren. Davon wurde in einem Fall die Mutter ab der 19. SSW, noch vor der ersten AC, mit intravenösem-HIG behandelt. Typische Symptome, mit denen die Kinder postnatal auffällig wurden, waren Wachstumsrestriktion, lentigo-striatale Vaskulopathie, Mikrozephalie, niedrige Thrombozytenzahlen und Petechien sowie Hyperbilirubinämie mit Ikterus. Tabelle 14 zeigt die Fälle kongenitaler Infektion post partum mit Symptomen und Viruslast in Körperflüssigkeiten des Neugeborenen.

Tabelle 14: Fälle kongenitaler Transmission mit virologischen Daten aus Fruchtwasser, Biometrie, Körperflüssigkeiten und klinischen und labormedizinischen Infektionszeichen [138]

Probe	GA Infektion	GA bei AC	HCMV DNA [IU/ml]	NieA/ml	HIG +/-	GA Geburt	Gewicht [g]	Perz. Länge [cm]	Perz. Kopfumfang [cm]	Klinische Symptome	Befunde Neugeborenenuntersuchung			Virologische Befunde		
											Asymptomatic	Kopfumfang [cm]	Perz.	Asymptomatic	Kopfumfang [cm]	Perz.
3c	<8+0	27+1	575 050	1126	ja	40+1	3920	54	36	asymptomatisch	161 (Blut)	738 (Speichel)				
3d	<8+0	31+0	4 572 500	1077			70	70	60		>10 ⁶ (Urin) ^a	>10 ⁶ (Blut) ^a	42 (Urin)			
4	<8+0	20+5	-	1680	Ja	40+6	3700	51	36,5	Asymptomatisch						
9a	<2+0 ^b	21+0	184 450	5064	Ja	38+5	3350	50	34	Asymptomatisch	13 423 (Blut)		2 (Speichel)			
9b	8+0	24+0	46 190	8000	Ja	38+5	3350	50	40	Asymptomatisch			18 000 (Urin)			
17a	8+0	22+6	1028	212	Ja	38+6	3640	52	34	Asymptomatisch	nPCR neg. (Blut)		2500 (Urin)			
17b	10+0	24+5	1403	1159			80	70	30							
17c	30+1	770	728													
19a	<2+0 ^b	20+3	88 350	2823	Ja	38+4	3542	52	35,4	Asymptomatisch	3968 (Blut)	3053 (Urin)				
19b	23+2	23+2	48 670	736			50	40	50	Asymptomatisch	215 450 (Urin)					
34	<2+0	20+2	579700	5392	Ja	37+4	2620	49	33	Asymptomatisch	22 791 (Speichel)	274 (Speichel)				
22	2+0-6+0	24+5	204 600	20 000	ja ^a	34+4	2310	46,5	32,5	Lentigo-striatale Vasculopathie; Petechien; Thrombozytopenie; Hyperbilirubinämie	99 690 (Urin)	429 (Urin)				
8a	<8	21+4	1 137 700	9200	Nein	39+3	2820	50	34,5	Wachstumsrestriktion; Petechien, Thrombozytopenie	99 510 (Blut)	5 (Speichel)				
8b	22+5	10 152 500	100 000				30	40	50		50 995 (Urin)	233 (Speichel)				
8c	26+3	14 105 000	4980				5	20	25		4741 (Urin) ^a	2400 (Urin)				
11	>6+0	19+5	297 600	10 000	Nein	37+4	2400	48	32	Wachstumsrestriktion; Enteritis; Mikrozephalie; Ikterus; Hyperbilirubinämie	>1x10 ⁶ (Blut) ^a	0 (Stuhl)				
16	<10+0	24+2	56 885	484	Nein	39+0	3890	53	35,5	Lentigo-striatale Vasculopathie	1798 (Blut)	16 000 (Urin)				
							3	15	3		3472 (Urin)	40 000 (Urin)				
30/31 (Zwilling 1)	<8+0	21+5	31 000 (AF1) 13 873 (AF2)	230 (AF1) 7 (AF2)	Nein	35+6	2298	45	29,5	Wachstumsrestriktion; Mikrozephalie; Schwerhörigkeit; Thrombozytopenie	15 900 (Blut)	80 000 (Urin)				
							90	80	75		201 000 (Urin)	14 (Speichel)				
30/31 (Zwilling 2)	<8+0	21+5			Nein	35+6	2740	48	34	Lentigo-striatale Vasculopathie	801 (Liquor)	80 000 (Urin)				
							50	50	30		332 (Blut)	28 055 (Blut)				
							50	50	30		380 000 (Urin)	80 000 (Urin)				
							50	50	30		25 730 (Speichel)	14 (Speichel)				
							50	50	30		>380 000 (Urin)	80 000 (Urin)				
							50	50	30		2279 (Speichel)	80 000 (Speichel)				

3.4 Evaluation von sFlt1 und PlGF als potenzielle Biomarker

Insgesamt stehen 114 Serum- und Fruchtwasser-Probenpaare zur Messung der Konzentrationen von sFlt1 und PlGF zur Verfügung. Die Proben wurden zwischen 2011 und 2019 gesammelt. Zehn Fälle sind zum Zeitpunkt der Probenentnahme latent HCMV-infiziert und dienen als Kontrolle. In 65 Fällen erhielt die Schwangere HIG zur Prävention des diaplazentaren HCMV-Übertrittes. In 34 Fällen ist das Fruchtwasser zum Zeitpunkt der AC HCMV positiv. Der Tabelle 15 können darüber hinaus Kennzahlen der Subkohorten (siehe auch 2.9.1) wie das maternale Alter zum Zeitpunkt der AC, Anzahl der HIG-Gaben, das Gestationsalter zur AC, Gravida und Para sowie das Körpergewicht zum Zeitpunkt der AC entnommen werden.

Tabelle 15: Maternale Kennzahlen der vier Kohorten vor Evaluation der Konzentrationen von PlGF und sFlt1.

	A (T, HIG-)	B (T, HIG+)	C (NT, HIG-)	D (NT, HIG+)	
Stichprobenumfang	18	16	21	49	
\bar{x} maternales Alter bei PI in Jahren (σ)	31 (6)	32 (4)	32 (4)	30 (4)	n.s.
\tilde{x} Gravität (IQR)	2 (2)	2 (1)	2 (1)	2 (2)	n.s.
\tilde{x} Parität (IQR)	1 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (1)	n.s.
\tilde{x} GA zur Amniozentese in Wochen (IQR)	22 (5)	21 (2)	22 (5)	20 (1)	n.s.
\bar{x} HIG-Gaben (σ)	-	3 (2)	-	4 (1)	n.s.
\tilde{x} Körpergewicht in kg (IQR)		65 (23)		63 (13)	n.s.

T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV- Non Transmitterinnen; PI: Primärinfektion; IQR: Interquartilenabstand; GA: Gestationsalter

Serum

Die Ergebnisse aus Serumproben zeigen eine große Spannweite zwischen 0,4 ng/ml bis 9,0 ng/ml (sFlt1) sowie 39 pg/ml bis 1867 pg/ml (PlGF). Mit einem Median von 6 und einem Interquartilenabstand von 7 sind die davon ableitbaren sFlt1/PlGF-Quotienten überwiegend unauffällig. Die einzige Ausnahme stellen drei Serumproben aus der Gruppe der HIG-naiven Transmitterinnen mit Quotienten von 42, 47 und 85 sowie ein Fall in der Kohorte B (T, HIG+) mit einer Ratio von 40 dar (Abbildung 39). Diese vier Proben zeigen höhere sFlt1/PlGF-Quotienten über dem von Zeisler et al. definierten „cut-off“ zum kurzfristigen Ausschluss einer drohenden Präeklampsie [132].

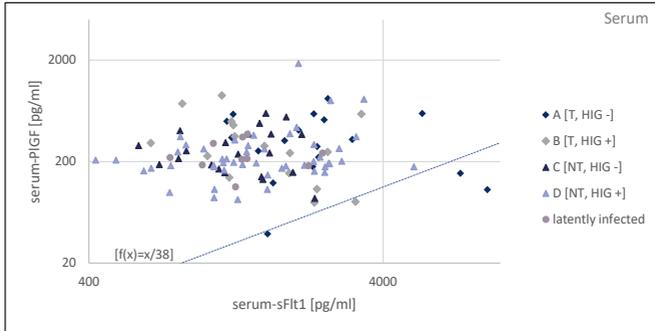


Abbildung 39: Serum sFlt1 und PIGF, abgetragen nach den vier Kohorten, die Gerade mit der Gleichung $[f(x)=x/38]$ entspricht dem von Zeisler et al. gesetzten Grenzwert von 38; PIGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIV: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den sFlt1/PIGF-Quotienten zwischen NT und T oder zwischen den HIV-behandelten und unbehandelten Kohorten festgestellt werden (Abbildung 40, $p = 0,27$).

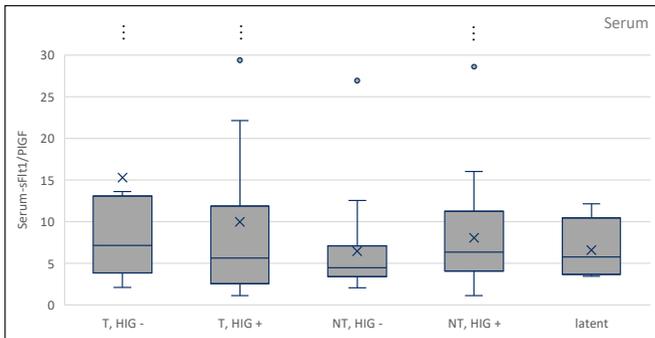


Abbildung 40: sFlt1/PIGF-Quotient aus Serum von Frauen nach HCMV-Primärinfektion, unterteilt nach Transmissionsstatus und Vortherapie; PIGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIV: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen

Die mediane sFlt1-Konzentration im Serum war in der Subkohorte A (T, HIV-) mit 2,3 ng/ml (IQR: 1,1) am höchsten (Abbildung 41). Die medianen Konzentrationen von sFlt1 in den anderen Kohorten waren mit 1,4 ng/ml (B), 1,4 ng/ml (C) und 1,5 ng/ml (D)

niedriger ($p < 0,01$). Zwischen den Kohorten A und C zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied in der post-hoc Analyse ($p < 0,001$).

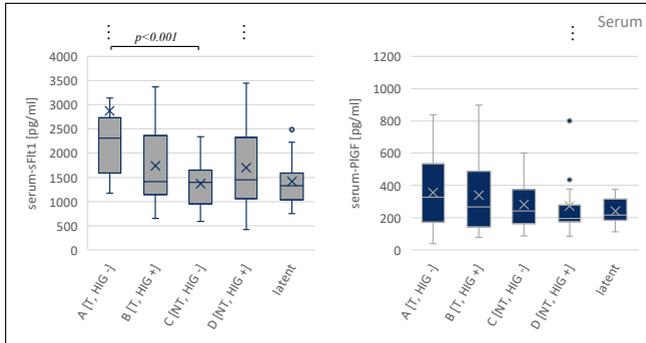


Abbildung 41: sFlt1- & PlGF-Serumkonzentrationen in den Kohorten und latent HCMV-infizierten Kontrollen; PlGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt1; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].

Die Beobachtung der höchsten sFlt1-Proteinkonzentrationen in der Kohorte A lässt sich auf PlGF übertragen, wenn gleich die Unterschiede zu gering ausgeprägt sind, um ein signifikantes Niveau zu erreichen (Abbildung 41). Die medianen PlGF-Konzentrationen sind in der Kohorte A mit 326 pg/ml (IQR: 363) am höchsten. Im Vergleich zwischen der Kohorte A und den latent infizierten Kontrollen ergibt sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,051$. Die latent infizierten Kontrollen zeigen sowohl für sFlt1 ($\bar{X}_{\text{Serum-sFlt1}}$: 218 pg/ml; IQR: 130) als auch PlGF die niedrigsten Konzentrationen ($\bar{X}_{\text{Serum-PlGF}}$: 1326 pg/ml; IQR: 556).

Fruchtwasser

Einige Proben zeigen über hundertfach höhere sFlt1-Spiegel im Fruchtwasser verglichen mit den Serumkonzentrationen. Die medianen Konzentrationen ($\bar{X}_{\text{Fruchtwassers-Flt1}}$: 63 ng/ml & $\bar{X}_{\text{Serum-sFlt1}}$: 1,5 ng/ml) über der Plazentaschranke unterscheiden sich um den Faktor 42. Die sFlt1-Konzentrationen belaufen sich auf Werte zwischen 13 ng/ml und 559 ng/ml. Die PlGF-Konzentrationen liegen zwischen 41 pg/ml und 868 pg/ml (Abbildung 42).

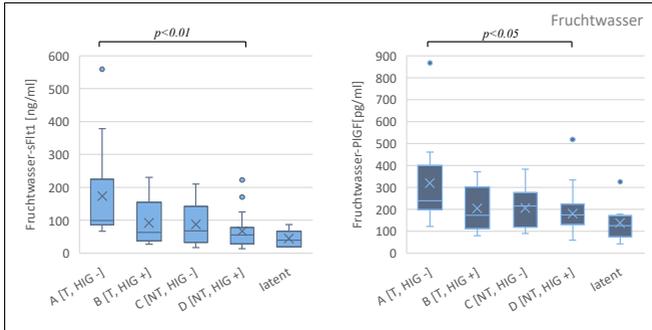


Abbildung 42: sFlt1- & PIGF- Fruchtwasserkonzentrationen in den Kohorten und latent HCMV-infizierten Kontrollen; PIGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].

Hohe Konzentrationen, sowohl von PIGF als auch von sFlt1, finden sich in der Kohorte A. Die medianen Werte (PIGF: 239 pg/ml; sFlt1: 99 ng/ml) sind 1, 4- und 1, 8-fach höher als die medianen Konzentrationen von HIG-behandelten NT (PIGF: 173 pg/ml; sFlt1: 54 ng/ml). Diese Unterschiede sind signifikant sowohl für sFlt1 ($p < 0,01$) als auch PIGF ($p < 0,05$). Die Kontrollgruppe der latent HCMV-infizierten Schwangeren zeigt die niedrigsten sFlt1- und PIGF-Konzentrationen. Beide Proteine zeigen beim Vergleich der Konzentrationen in Serum und Fruchtwasser eine schlechte Korrelation ($\rho_{\text{sFlt1}} = 0,23$; $\rho_{\text{PIGF}} = 0,14$). Dem gegenüber korrelieren beide Fruchtwasser-Konzentrationen stark (Spearman's $\rho = 0,73$; $p < 0,0001$).

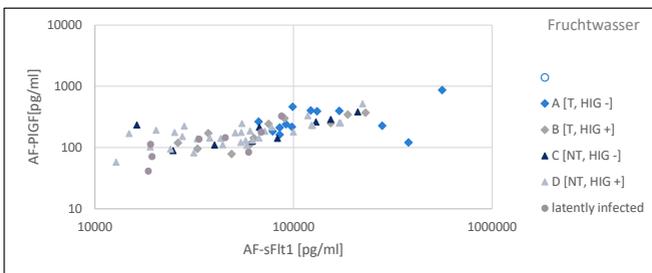


Abbildung 43: Streudiagramm zur Assoziation der beiden Protein-Konzentrationen (sFlt1 und PIGF) in Fruchtwasser (AF); PIGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV - Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV - Non Transmitterinnen; Daten bereits publiziert [140].

Längsschnittdaten

An Serumproben von 13 Schwangeren mit HCMV-PI zwischen der achten und 35. SSW werden im Verlauf Proben auf die sFlt1- Konzentration hin untersucht. Dazu werden MoM-Werte in Relation zu gesunden Kontrollen verwendet. Die Fälle einer Transmitterin und einer Non-Transmitterinnen werden um die Evaluation der PIGF-Konzentrationen ergänzt (Abbildung 44). Die Kurve der NT zeigt einen relativen steady-state der sFlt1-MoM unter 0,7 kombiniert mit einem Spitzenwert von etwa 2,0 MoM für PIGF um die 18. SSW. Höhere Konzentrationen von sFlt1 und PIGF ab der 15. SSW, jeweils deutlich über 1,0 MoM, können im Fall der Transmitterinnen beschrieben werden.

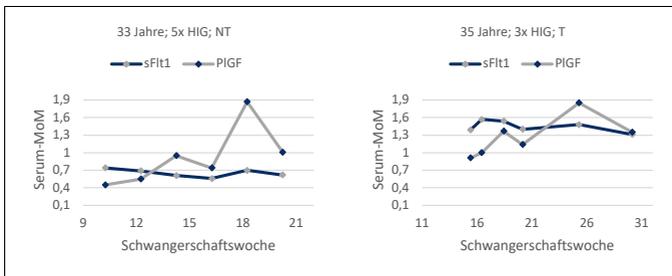


Abbildung 44: Expressionsmuster von sFlt1 & PIGF in je einem Fall von Non-Transmission & Transmission; PIGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; MoM: Multiple des Median

Die weiteren 11 Fälle der longitudinalen sFlt1-Auswertung zeigen heterogene Expressionsmuster mit langsamen Anstiegen oder Abfällen der initialen sFlt1-MoM. Auch steile Anstiege und stabile Konzentrationen können beobachtet werden. In der Abbildung 45 sind die betreffende Verläufe aufgeführt und nach Transmissionsstatus separiert.

Unter der Annahme, dass die HCMV-Transmission mit erhöhten sFlt1-Konzentrationen im maternalen Serum assoziiert ist, kann für longitudinale Daten empirisch der Grenzwert von 1,3 sFlt1-MoM abgeleitet werden. Ein signifikanter Unterschied in der Frequenz von Werten oberhalb dieser Grenze besteht zwischen T (5/8) und NT (0/5) ($p < 0,05$, Abbildung 47 links).

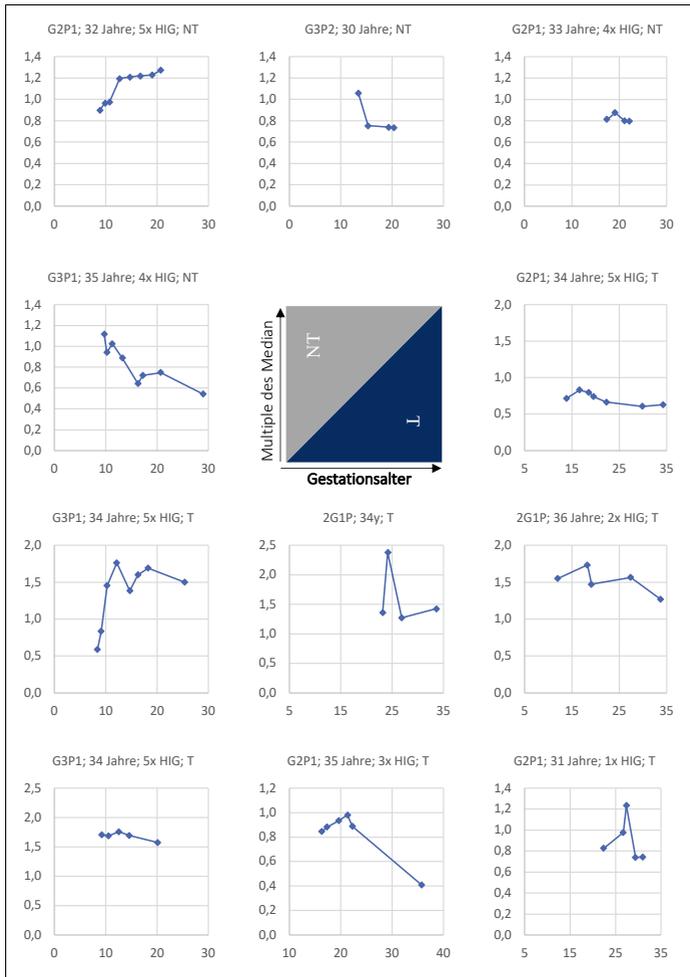


Abbildung 45: 11 Konzentrationsverläufe von sFlt1 als Multiple des Median in der Schwangerschaft nach maternalen HCMV-Primärinfektion G: Gravida; P: Para; sFlt1: soluble-Flt; T: HCMV-Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; NT: HCMV-Non Transmitterinnen.

Ultraschallbefunde

In 12 von 34 Fällen der diaplazentaren Transmission zeigte der pränatale Ultraschall um die 20. SSW Auffälligkeiten, die mit HCMV in Verbindung zu bringen sind. Die Serum-sFlt1-Konzentrationen sind in dieser Gruppe über 1,5fach höher ($\bar{x} = 2,6$ ng/ml; IQR: 3,1) verglichen zu Schwangeren mit unauffälligem Ultraschallbefund ($\bar{x} = 1,6$ ng/ml; IQR: 1,1; $p < 0,01$). Dem gegenüber ist die mediane PIGF-Konzentration in der Gruppe der Schwangeren mit Ultraschallauffälligkeiten mit 217 pg/ml (IQR: 406) geringer als in der Gruppe ohne Auffälligkeiten (315 pg/ml; IQR: 279; $p = 0,33$). Der Unterschied von Transmitterinnen ohne Auffälligkeiten zur Gruppe der NT ($\bar{x} = 205$ g/ml; IQR: 126) ist signifikant mit $p < 0,05$ (Abbildung 46).

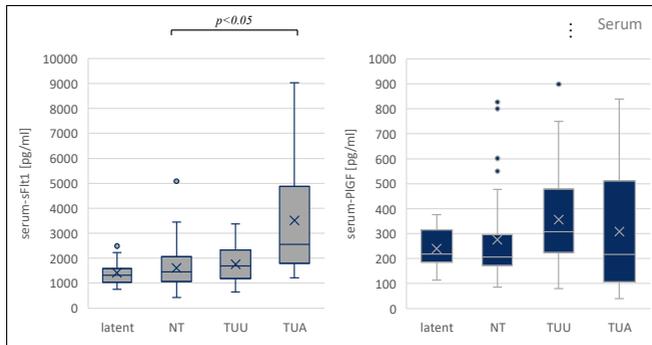


Abbildung 46: sFlt1- & PIGF- Serumkonzentrationen nach Transmissionsstatus und Ultraschallbefund; PIGF: placental growth factor; sFlt1: soluble-Flt; NT: HCMV – Non Transmitterinnen; TUA: Transmitterinnen, Ultraschall unauffällig; TUA: Transmitterinnen, Ultraschall auffällig; Daten bereits publiziert [140].

ROC-Analysen

In der Evaluation von sFlt1 und PIGF als potenzielle Marker für die stattgehabte vertikale HCMV-Übertragung wurden Grenzwertoptimierungs- (ROC-) Analysen mit Bestimmung der Fläche unter der Kurve (AUC) und 95%-KI durchgeführt. Für die sFlt1-Datensätze ergibt sich eine AUC von 0,66; 95%-KI [0,55 - 0,77]; $p < 0,01$ und für PIGF eine AUC von 0,61; 95%-KI [0,48 - 0,74]; $p = 0,07$. In der Vorhersage von Ultraschallauffälligkeiten durch Serum-Protein Konzentrationen kann für sFlt1 eine AUC von 0,82; 95%-KI [0,69 - 0,94]; $p < 0,001$ und für PIGF eine AUC von 0,462; 95%-

KI [0,24 – 0,69]; $p = 0,66$ ermittelt werden. Eine Übersicht über errechnete ROC-Analysen zeigt Tabelle 16:

Tabelle 16: Aus ROC-Analyse abgeleitete Grenzwertoptimierungsanalyse für sFlt1, PlGF und deren Kombinationen.

	AUC	95%-Konfidenzintervall	
sFlt1 (Transmission)	0,66	0,55 – 0,77	$p < 0,01$
PlGF (Transmission)	0,61	0,48 – 0,74	$p = 0,07$
sFlt1 (Ultraschallauffälligkeiten)	0,82	0,69 – 0,94	$p < 0,001$
PlGF (Ultraschallauffälligkeiten)	0,46	0,24 – 0,69	$p = 0,66$
PlGF/sFlt1 (Transmission)	0,52	0,39 – 0,65	$p = 0,73$
PlGF/sFlt1 (Ultraschallauffälligkeiten)	0,70	0,52 – 0,89	$p < 0,05$
MoM-PlGF+MoM-sFlt1 (Transmission)	0,66	0,55 – 0,77	$p < 0,01$
MoM-PlGF+MoM-sFlt1 (Transmission)	0,81	0,68 – 0,94	$p < 0,001$

sFlt1: soluble-Flt; PlGF: placental growth factor; MoM: Multiple des Median; AUC: Fläche unter der Kurve

Aus den Grenzwertoptimierungsanalysen lassen sich die beiden Grenzwerte <1504 pg/ml für sFlt1 und <307 pg/ml für PlGF zum Ausschluss der HCMV-Transmission nach HCMV-PI ableiten. Anhand dieser Grenzwerte gelingt der fetale Infektionsausschluss zur AC bei 37/39 Fällen von Werten unter den Grenzwerten korrekt (Abbildung 47 rechts).

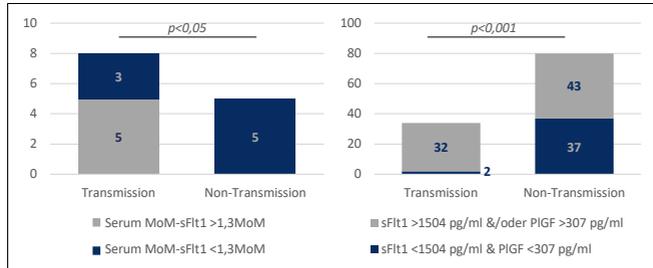


Abbildung 47: empirische Grenzwerte für longitudinale MoM-Werte (links) und Querschnittsdaten (rechts) mit Gruppenverteilung; MoM: Multiple des Median; sFlt1: soluble-Flt; PlGF: placental growth factor; Daten bereits publiziert [140].

3.5 Multiplex-Assay

Die Analyse der unter 2.6.2 angeführten Fruchtwasserpools auf die, unter Tabelle 17 angegebenen Proteine hin, ergab valide Ergebnisse für 79/92 Proteinen.

Tabelle 17: Durch das Olink-Inflammation Panel quantifizierbare Proteine.

Protein	Protein		
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	IL-17A	Interleukin 17A
ADA	Adenosine deaminase	IL-17C	Interleukin 17C
ARTN	Artemin	IL18	Interleukin 18
AXIN1	Axis inhibitor protein 1	IL-18R1	Interleukin-18 receptor 1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	IL2	Interleukin 2
β-NGF	Beta nerve growth factor	IL-20	Interleukin 20
CASP-8	Caspase 8	IL-20RA	Interleukin 20 Receptor Subunit alpha
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	IL-22 RA1	Interleukin 22 receptor, alpha 1
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	IL-24	Interleukin 24
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	IL-2RB	Interleukin-2 receptor subunit beta
CCL23	Chemokine (C-C motif) ligand 23	IL33	Interleukin 33
CCL25	Chemokine (C-C motif) ligand 25	IL4	Interleukin 4
CCL28	Chemokine (C-C motif) ligand 28	IL5	Interleukin 5
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	IL-6	Interleukin 6
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	IL-7	Interleukin 7
CD244	Cluster of Differentiation 244	IL-8	Interleukin 8
CD40	Cluster of Differentiation 40	LAP TGF-beta-1	latency associated peptide transforming growth factor beta 1
CD5	cluster of differentiation 5	LIF	Leukemia inhibitory factor
CD6	cluster of differentiation 5	LIF-R	Leukemia inhibitory factor receptor
CDCP1	CUB domain-containing protein 1	MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
CSF-1	colony stimulating factor 1	MCP-2	monocyte chemoattractant protein 2
CST5	Cystatin-D	MCP-3	monocyte-chemoattractant protein 3
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	MCP-4	Monocyte chemoattractant Protein 4
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	MMP-1	Matrix metalloproteinase 1
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	MMP-10	Matrix metalloproteinase 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	NRTN	Neurturin
CXCL5	C-X-C motif chemokine ligand 5	NT-3	Neurotrophin-3
CXCL6	C-X-C motif chemokine ligand 9	OPG	Osteoprotegerin
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9	OSM	Oncostatin M
DNER	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor	PD-L1	Programmed death-ligand 1
EN-RAGE	Extracellular newly identified receptor for advanced glycation end-products binding protein	RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
FGF-19	Fibroblast growth factor 19	SCF	stem cell factor
FGF-21	Fibroblast growth factor 21	SIRT2	Sirtuin 2
FGF-23	Fibroblast growth factor 23	SLAMF1	Signaling lymphocytic activation molecule 1
FGF-5	Fibroblast growth factor 5	ST1A1	Sulfotransferase 1A1
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand	STAMPB	STAM-binding protein
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor	TGF-alpha	Transforming growth factor alpha
HGF	Hepatocyte growth factor	TNF	Tumor necrosis factor
IFN-gamma	Interferon gamma	TNFB	tumor necrosis factor-beta
IL-1 α	Interleukin 1 alpha	TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9
IL10	Interleukin 10	TNFSF14	TNF superfamily member 14
IL-10RA	Interleukin 10 receptor, alpha subunit	TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
IL-10RB	Interleukin 10 receptor, beta subunit	TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
IL-12B	Interleukin-12 subunit beta	TWEAK	TNF-related weak inducer of apoptosis
IL-13	Interleukin 13	uPA	Urokinase-type plasminogen activator
IL-15RA	Interleukin 15 receptor, alpha subunit	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

Für ein Protein (brain-derived neurotrophic factor - BDNF) konnte keine Analyse durchgeführt werden. Bei 12 Proteinen ergaben die Messungen stets Ergebnisse unter dem Detektionslimit. Abbildung 48 zeigt den Vergleich der Expressionsmuster als Abweichung vom Mittelwert der Gesamtanalyse als Heatmap.

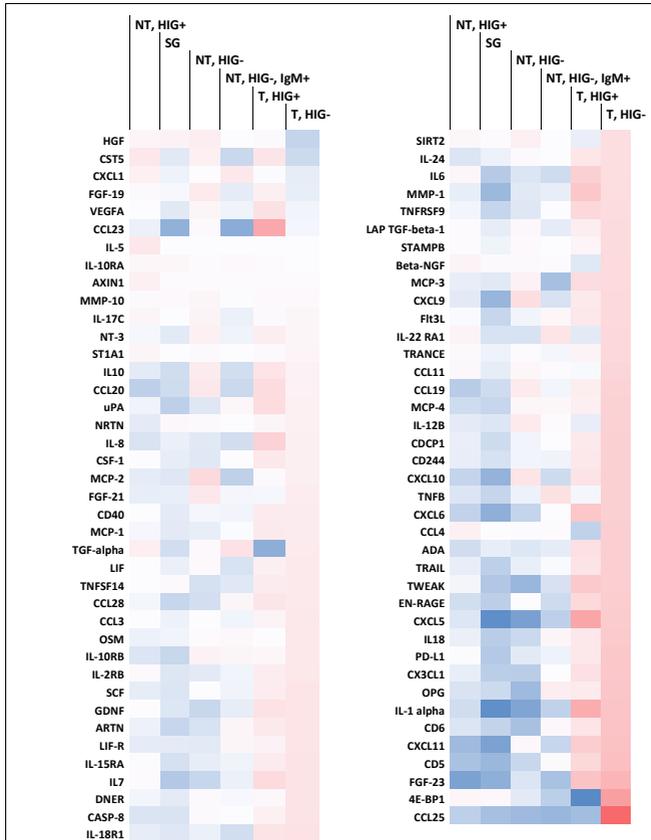


Abbildung 48: Heatmap zu den Expressionsmustern von 79 Proteinen in Fruchtwasserpools (rot: Konzentration höher als die mittlere Konzentration über alle Subkohorten; blau: Konzentration geringer als die mittlere Konzentration über alle Subkohorten).

Es fällt auf, dass für 70 von 79 Proteinen in der Subkohorte T, HIG- und für 60 von 79 Proteinen in der Subkohorte T, HIG+ eine überdurchschnittliche Expression im Fruchtwasser nachweisbar ist.

Dem gegenüber stehen 12 Proteine in der Kohorte NT, HIG+, vier in der HIG-Behandlungsgruppe mit strengem Dosisintervall von 2 Wochen (SG), 21 in der Kohorte NT, HIG- und 12 in den gepoolten Fruchtwasserproben von Schwangeren mit sehr früher Infektion, die überdurchschnittliche Expressionsmuster zeigen (Abbildung 48).

Sechs Proteine zeigten im Multiplex-Assay Abweichungen von mehr als einer Verdopplung des gemeinsamen, proteineigenen Mittelwerts (Abbildung 49). Die Proteine sind in der Abbildung mit der jeweiligen Abweichung von Mittelwert abgebildet. Davon war die größte Abweichung in der Kohorte der HIG-naiven Transmitterinnen für die Konzentration des CC-Chemokin-Ligand 25 (CCL25) mit Faktor 3,52 zum Mittelwert. In dieser Kohorte ist zudem das Transkriptionsfaktor 4E-Bindeprotein (4E-BP1) um Faktor 2,56 deutlich überexprimiert. Sowohl für T, HIG- als auch T, HIG+ sind der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF-23), Interleukin-1 α (IL-1 α) und das C-X-C Motiv-Chemokin 5 (CXCL5) höher konzentriert. Der CC-Chemokin-Ligand 23 (CCL23) ist nur im Pool T, HIG+ erhöht messbar.

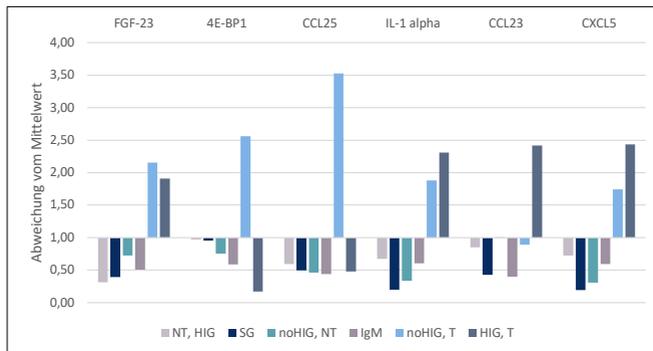


Abbildung 49: Abweichungen vom Protein-individuellen Mittelwert von mehr als einer Verdoppelung; NT: HCMV-Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); IgM: Kohorte mit früher Infektion und noch hohem IgM; T: HCMV - Transmitterinnen

Für 16 Proteine wurden Konzentrationen von unter 50 % des gemeinsamen Mittelwerts für das betreffende individuelle Protein gefunden (Abbildung 50).

Die drei Proteine 4E-BP1 (in T, HIG+), CXCL5 und IL-1 α (beide in SG) sind in einer Konzentration von weniger als 20 % des jeweiligen Mittelwerts in den genannten Fruchtwasserpools enthalten.



Abbildung 50: Abweichungen vom Protein-individuellen Mittelwert von mehr als einer Halbierung: NT: HCMV – Non Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin; SG: Studiengruppe (strikte Behandlungskriterien mit Hyperimmunglobulin); IgM: Kohorte mit früher Infektion und noch hohem IgM; T: HCMV - Transmitterinnen

Die Proteine CXCL5, IL-1 α und FGF-23 sind jeweils in den nicht-HCMV-transmittierenden Kohorten in Fruchtwasserpools eher unterexprimiert und im Kontrast

dazu höher konzentriert in entsprechenden Pools aus Proben von Transmitterinnen unabhängig von HIG-Vorbehandlung enthalten.

CCL-25 und 4E-BP1 hingegen besitzen in diesem Versuchsaufbau eine gute Selektivität zwischen HIG-vorbehandelten und unbehandelten Transmitterinnen. Wohingegen CCL-23 als einziges Protein in der Kohorte T, HIG um den Faktor 2,42 höher konzentriert ist als der Mittelwert, während sich dieses Protein in der Kohorte T, HIG- unterexprimiert zeigt.

4 Diskussion

Die intrauterine HCMV-Infektion stellt eine bedeutende Ursache für kindliche Entwicklungsstörungen dar. Dabei ist die maternale PI in der Frühschwangerschaft mit einem hohen Risiko für fetale Folgeschäden assoziiert. Mit zunehmendem Schwangerschaftsalter steigt die Transmissionsfrequenz [141]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Einflüssen der Transmission und der präemptiven Behandlung der Schwangeren mit Hyperimmunglobulin auf neutralisierende Antikörper, mögliche Biomarker wie sFlt1 und PlGF sowie die Viruslast in maternalen Serum- und Fruchtwasserproben. Im optimalen Fall können maternale Biomarker, gemessen aus einer Serumprobe, die invasive Transmissionsdiagnostik mittels Amniozentese ergänzen oder gar ersetzen.

4.1 Kohortenbildung

In der vorliegenden Arbeit wird die maternale HCMV-PI im Kontext von anti-HCMV-IgG-Konzentrationen, Antikörperprofilen im rekombinanten Immunoblot, Neutralisationstestungen, der Konzentrationsmessung von pro- und antiangiogenen Proteinen und einem Multiplex-Assay untersucht. Die Datenauswertung basiert auf bereits erhobenen klinischen Daten, Nachtstungen von kryokonservierten Patientinnenproben und der fortlaufenden Analyse von klinischen Proben von Serum und Fruchtwasser. Die Gesamtkohorte besteht aus 177 Schwangerschaften in einem Zeitraum zwischen 2007 und 2019. Die fortlaufende Datenerhebung begann im April 2017. Die ausgewerteten Datensätze des Zeitraums zwischen 2007 und 2017 basieren für Daten aus den HCMV-IgG und IgM, ECLIA-Messungen, den rekombinanten Immunblots und der Mikrokultur sowie qPCR in der Regel auf zuvor im Labor gemessenen und dokumentierten Werten und auf Nachtstungen asservierter Proben. Die PRNT und Einzelneutralisationen, die Konzentrationsmessungen von PlGF und sFlt1 und das Multiplex-Assay wurden im Zeitraum zwischen April 2017 und dem ersten Quartal 2018 durchgeführt. Die Vergleichbarkeit der ausgewerteten Daten über den ausgewerteten Zeitraum basiert auf der klinischen Anwendung der Testverfahren (ECLIA, rekombinanter Immunoblot, qPCR und Mikrokultur) im akkreditierten Labor.

Es werden Neutralisationstestungen an gepoolten Serum- und Fruchtwasserproben von Schwangeren nach einer HCMV-PI analysiert. Von 143 Probenpaaren aus Serum und

Fruchtwasser werden einzeln die Neutralisationskapazitäten bestimmt und der Gehalt an HCMV-IgG sowie die IgG-Avidität ins Verhältnis dazu gesetzt. Zudem werden die Expressionsmuster spezifischer HCMV-IgG-Antikörper im Immunoblot untersucht.

Von 51 Fruchtwasserproben werden die quantitativen Ergebnisse aus Kurzzeit (18h-) Mikrokultur und qPCR verglichen.

Mittels etablierter Testsysteme zur Konzentrationsbestimmung der Proteine sFlt1 und PlGF können 114 korrespondierende Serum- und Fruchtwasserproben analysiert werden.

Von gepoolten Fruchtwasserproben werden zudem mittels 96-Multiplex-Assay Konzentrationen von inflammations-assoziierten Proteinen verglichen.

Ein möglichst homogener Abgleich der Schwangeren-Kohorten im Bezug auf das Schwangerschaftsalter zum Zeitpunkt der Probenentnahmen, maternale Charakteristika wie Parität, Vorerkrankungen oder auch die Zeitspanne zwischen Serumprobenentnahme und AC ist wünschenswert. Aufgrund des ausgeprägten retrospektiven Untersuchungsansatzes und der Erhebung von klinischen Daten aus Patientinnenakten kann nicht für jeden Datensatz eine optimale Konsistenz aller möglichen Variablen in Relation zur Gesamtkohorte sichergestellt werden. Über die Gesamtkohorte ist die Streuung des Gestationsalters mit einem IQR von 2 Wochen um die 21. SSW und einer mittleren Abweichung zwischen Serum- und Fruchtwasserentnahme von 1,5 Tagen gering.

Bei der Kohortenbildung für die Analyse der einzelnen dargestellten Variablen wird im Verlauf der Arbeit der Schwerpunkt auf verschiedene Merkmale gelegt. Die Subgruppenbildung für die Neutralisationstestungen an gepooltem Probenmaterial erfolgte in einer frühen Phase der Aufbereitung des Themas, weswegen beispielsweise zwei NT-Kohorten mit der Bedingung der HIG-Therapie gebildet wurden: In der Gesamtstichprobe sind Fälle vorhanden, bei denen das HIG-Behandlungsschema vom zum Zeitpunkt der Niederschrift praktizierten, zweiwöchigen Schema und der dann gebräuchlichen Dosierung abweicht (Schema publiziert in Kagan et al. 2019 [102]). Dieser Sachverhalt wird durch zwei differenzierte Kohorten abgebildet (Tabelle 6). Dieselbe Unterscheidung findet sich auch in der quantitativen Auswertung der Viruslast in den drei Transmitterinnenkohorten (Tabelle 12). Für die in der Folge durchgeführte

Evaluation der serologischen Einflussfaktoren auf die Neutralisationskapazität sowie die Konzentrationen von sFlt1 und PlGF werden die Kohorten angepasst, um die Fallzahlen in den Kohorten zu erhöhen und eine klare Polarisierung nach Transmissionsstatus und HIG-Vorbehandlung zu schaffen. Zudem werden die Subgruppe der latent HCMV-Infizierten Schwangeren definiert und die frühen Infektionen mit noch positivem IgM-Index in die entsprechende Kohorte NT, HIG- integriert.

Bedingt durch die fortlaufende Untersuchung asservierter klinischer Proben über den Mess- und Auswertungszeitraum sind nicht alle klinischen Fälle in allen Auswertungsansätzen vertreten und die Stichprobenumfänge von der Gesamtstichprobe abweichend. Dazu trägt zudem der Umstand bei, dass in manchen Fällen nur Fruchtwasser kryokonserviert war, welches dann in die Auswertung der Viruslast in qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur aufgenommen werden kann, nicht aber für den Vergleich von Antikörperspiegeln in simultanen Serum- und Fruchtwasserproben ausreicht.

Die retrospektiven Auswertungen und retrospektiven Untersuchungen an zuvor abgeschlossenen klinischen Fällen und bereits kryokonservierten Proben bedingen möglicherweise Abweichungen der Ergebnisse von prospektiven Datenerhebungen. Da die Proben in jenem Fall nicht einem (evtl. sogar wiederholten) Gefriertau-Zyklus unterworfen sind. Das Kryokonservieren könnte einen Einfluss auf die messbaren Ergebnisse der Bestimmung von Proteinkonzentrationen haben. Eine im Jahr 2020 publizierte Übersichtsarbeit von Simpson et al. konnte zu 33 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen Daten zur Stabilität unter Kryokonservierung und Gefriertau-Zyklen evaluieren. Die Arbeit schließt mit der Erkenntnis, dass es in diesem Bereich noch Forschungsbedarf gibt und Ergebnisse, gewonnen nach langen Lagerperioden oder mehreren Gefriertauzyklen nur vorsichtig interpretiert werden können [142].

4.2 Neutralisationsassays

Von 143 Serum- und Fruchtwasserproben liegen Ergebnisse zur HCMV-spezifischen Neutralisation vor. Es werden gepoolte Kohorten und Einzelproben untersucht.

Die Kalibrierung des PRNT wurde an Einzelproben mit HFF und ARPE-19 Zellen zur Infektion vorgenommen. Bereits in den ersten Versuchen zeigt sich, dass zur

Neutralisation der Infektion von HFF wesentlich höhere Konzentrationen des Probenmaterials nötig sind. Wohingegen auch bei höheren Verdünnungen der zu testenden Proben im Ansatz mit ARPE-19 Zellen noch deutliche Virus-neutralisierende Effekte beobachtet werden können. Dieser zellsystem-abhängige Titer-Effekt bei konstanter Verdünnung des Virusisolates wurde bereits beschrieben [143, 144]. Er kann den unterschiedlichen Zellinvasionsmechanismen von HCMV bei Fibroblasten und Epithelzellen zugeschrieben werden. Während für den HCMV-Zelleintritt in Epithelzellen der Pentamerkomplex aus gH, gL, pUL128, pUL130 und pUL131 von Bedeutung ist, übernimmt der Trimär-Komplex aus gH, gL, gO eine Schlüsselrolle beim Zelleintritt in Fibroblasten [145]. Insgesamt zeigen die Versuchsreihen mit ARPE-19 Zellen als suszeptibles Zellsystem eine bessere Diskrimination der Neutralisationskurven verglichen mit HFF (vergleichend Abbildung 20 und Abbildung 21).

Die gewählten Verdünnungsreihen von 1:64 bis 1:4096 auf Fibroblasten und 1:500 bis 1:8000 auf ARPE-19 bilden die Bereiche hoher und niederer Neutralisation gut ab. In der Literatur wurden für Verdünnungen von weniger als 1:50 unspezifische Neutralisationseffekte beschrieben [144, 146]. Diese Effekte können auch bei der Neutralisation mit nur schwach verdünntem Fruchtwasser beobachtet werden.

In den Vorversuchen mit Verdünnungsreihen von Einzelproben und auch kleinen Pools kann bereits beobachtet werden, dass Proben von HCMV-Transmitterinnen in vitro bessere HCMV-neutralisierende Eigenschaften besitzen als Proben von HCMV-Non-Transmitterinnen (Abbildung 10 bis Abbildung 13).

In einem Ansatz zeigt sich ein inverses Bild: Die Neutralisation mit Serum auf ARPE-19 Zellen im kleinen Pool zeigt für den Pool T, HIG- zwischen den Verdünnungsstufen 1:1000 und 1:4000 einen Abfall der Neutralisation von knapp 90 % auf keine nachweisbare Neutralisation (Abbildung 13 oben links). Dies kann zum einen darin begründet sein, dass die wahre NT50% bei etwa 1:2000 liegt, wie in der Regression ermittelt (Tabelle 5). Dann wäre davon auszugehen, dass die Proben, die für diesen kleinen Pool im Vorversuch eingesetzt wurden, eine vom Durchschnitt abweichende HCMV-spezifische Antikörperkomposition enthalten. Ein anderer Grund kann aber auch in fehlerhafter Prozessierung im PRNT oder falscher Verdünnung in der Probenvorbereitung liegen. Insbesondere der vom erwarteten Ergebnis abweichende

Kurvenverlauf des Neutralisationsdiagramms und die anderen Ergebnisse, bei denen Kohorten von Transmitterinnen konsistent höhere Neutralisationskapazitäten zeigen als Non-Transmitterinnen, lenken hier den Fokus auf Fehlmessungen. Diese Überlegung wird auch durch Folgeversuche mit größeren Pools bestätigt, bei denen sich dieser starke Abfall nicht zeigt (Abbildung 21) und die NT50% für die Kohorte T, HIG- mit 1:3192 auch deutlich von den Ergebnissen aus kleinen Pools abweicht (Tabelle 7).

Das homogene Bild der Voruntersuchung der Pools mittels Immunoblot auf Reaktivität gegenüber sechs rekombinanten HCMV-Antigenen mit deutlicher Reaktivität gegen alle getesteten Antigene kann als Resultat des Mischens von Proben verschiedener Patientinnen angesehen werden. Die Prozessierung der Proben zu Pools ähnelt dabei der Herstellung von HIG oder stark neutralisierender Referenzseren, die ebenfalls eine starke Reaktivität gegen alle 6 rekombinanten Antigene zeigen [147]. Die Kohorte der unbehandelten Mütter mit früher Infektion (NT, HIG-, IgM+) zeigt homogen noch keine Reaktivität gegenüber den rekombinanten Glykoproteine B1 und B2. Dieser Effekt wurde bereits 1997 von Schoppel beschrieben [71]. Durch den Vorgang des Poolens können schwache Reaktivitäten in der Gesamtlösung untergehen. Vor dem Poolen wurden die Einzelproben selbst auch serologisch untersucht.

Die Ergebnisse der in der Folge durchgeführten PRNT der gepoolten Serum- und Fruchtwasserproben zeigen Auffälligkeiten für eben diese Kohorte der frühen, maternalen HCMV-PI mit noch hohem IgM-Index. So weisen die kumulierten Daten für Serum in den jeweiligen Verdünnungsstufen die geringste NT50% in dieser Kohorte, auf HFF ausgehend von 35 % bei einer Verdünnung von 1:64 (Abbildung 20), auf. Beim Vergleich der Serum- mit den Fruchtwasserdaten wird deutlich, dass in der Kohorte der Frauen mit früher HCMV-PI noch keine suffiziente Synthese neutralisierender anti-HCMV-IgG stattfindet. So sind HCMV-neutralisierende Antikörper bei einer geringen Verdünnung des Fruchtwassers von 1:3 auf HFF faktisch nicht nachweisbar (Abbildung 22). Dabei fällt der große Abstand der NT50% dieser Kohorte zu den anderen Kohorten, verglichen mit den Serumdaten, auf. Auch im Vergleich der ARPE-19 generierten Daten ist dieser Effekt der überproportionalen Abnahme der NT50% in der Kohorte der frühen HCMV-Infektion sichtbar. In der Zusammenschau kann dieser Effekt als ein Resultat der noch schwach ausgeprägten Antikörperbildung, sowie geringen Avidität (Abbildung 14) und eventuell fehlenden Zeit für den diaplazentaren IgG-

Transport angesehen werden. Dieser plazentare IgG-Transport gewinnt erst im Laufe der Schwangerschaft an Effektivität [122]. Die Kohorte der Schwangeren mit hohem IgM-Index befindet sich im Median in der 22. SSW und hebt sich damit nicht von den anderen Kohorten ab (Tabelle 6). Damit bleibt die Überlegung, dass eine präventive Gabe von HIG wie in der gepoolten Kohorten NT, HIG+ und NT, HIG+, SG gerade in der Frühphase der Infektion mit noch hohem IgM starken Einfluss auf die Serum- und Fruchtwassertiter HCMV-neutralisierender Antikörper haben könnte.

Mittels PRNT wurden NT50%-Werte von den Pools aus Serum und Fruchtwasser ermittelt (Tabelle 7). Dabei bestätigt sich die Beobachtung, dass die maternale Applikation von HIG nicht dazu führt, dass in den entsprechenden Proben die höchste Neutralisation erzielt werden kann. HIG enthält in relevanten Mengen HCMV-neutralisierende Antikörper [92, 147]. Jedoch beträgt die Halbwertszeit von anti-HCMV IgG nur ca. 10 Tage, sodass sowohl HCMV-IgG, die HCMV IgG-Avidität und die HCMV-spezifische Neutralisation, abhängig vom Zeitpunkt der Gabe, schnell abgebaut werden [100]. Zudem scheint die Transmission verbunden mit immunologischen Reaktionen durch die HCMV-Infektion der Plazenta einen Einfluss auf die *in vitro* Neutralisationskapazitäten zu besitzen.

Die hohe mittlere Neutralisationskapazität von Proben, die von transmittierenden Frauen gewonnen wurden, zeigt sich auch bei der Neutralisation von Einzelproben von Serum- (Abbildung 24) und Fruchtwasserproben (Abbildung 25). Bei diesen Analysen wurde auch der Tatsache Rechnung getragen, dass in der Gesamtstichprobe verfügbarer Proben der vergangenen Jahre auch Proben von Frauen vorhanden sind, deren HCMV-PI zum Zeitpunkt der AC schon deutlich vorangeschritten war, so dass sie als latent infiziert gelten können. Interessanterweise zeigen die latent HCMV-infizierten Schwangeren im Serum und Fruchtwasser überwiegend auch höhere Neutralisationskapazitäten als die beiden NT-Kohorten mit und ohne HIG-Behandlung. Dies könnte ein Resultat der bei diesen latent HCMV-Infizierten bereits optimal abgelaufenen natürlichen Aviditätsmaturation der gegen HCMV gerichteten IgG sein. Dies wird kontrastiert durch die Ergebnisse der deutlich IgM-positiven Subkohorte in gepoolten Untersuchungen, die die niedrigsten beziehungsweise nicht ermittelbare NT50%-Werte zeigt (Tabelle 7).

4.2.1 Einflüsse auf die Ergebnisse der Neutralisationstestungen

Verschiedene Begleitumstände im Rahmen der Probengewinnung, der Prozessierung und der Ergebnisauswertung können als externe Einflüsse auf die vorgestellten Ergebnisse beschrieben werden.

Insgesamt sind die Resultate der Neutralisationstestungen durch die händische Durchführung der Plattenbeschickung und die visuelle Evaluation der Neutralisation durch Auszählen der wells mittels Inversionsmikroskop fehleranfälliger als ein maschinell unterstütztes oder vollautomatisiertes Testverfahren. In den PRNT-Ansätzen von gepoolten Proben wurden jeweils drei Wiederholungen der Tests vorgenommen, um zum einen die Retest-Reliabilität zu beschreiben und zum anderen die Ergebnisse valider zu untermauern. In anderen Arbeiten und Publikationen konnte gezeigt werden, dass das Prinzip der Neutralisationstestung grundsätzlich eine hohe Reliabilität besitzt [146]. Einzelne Ergebnisse erlauben aber einen Rückschluss auf fehlerhafte Prozessierung: Die über die Verdünnungen hinweg nicht abfallende Neutralisationskapazität der IgM-Kohorte in den gemittelten Ergebnissen auf HFF im Serum (Abbildung 20) oder die sogar ansteigenden Neutralisationskapazitäten in einer Wiederholung (Abbildung 16 B) sind wahrscheinlich verfälschte Ergebnisse, bedingt durch fehlerhafte Prozessierung.

Dennoch ist ein fehlerhaftes Resultat nicht auszuschließen. In einem Ansatz der Neutralisation mit gepoolten Serumproben auf HFF zeigt sich ein so nicht zu erwartendes Bild: Die Neutralisationskurven verlaufen nahezu horizontal. Einige steigen sogar bei der höchsten gemessenen Verdünnung an (Abbildung 16 B). Dabei ist entweder von einem Fehler in der Prozessierung (Pipettierfehler oder fehlerhaftes Beschicken der Platten) oder einem Problem mit der Zellkultur auszugehen. Bei Pipettierfehlern wären allerdings durch die fortlaufenden Verdünnungen ebenfalls abfallende Neutralisationen zu erwarten.

In den kumulierten Ergebnissen fällt zum Teil auf, dass insbesondere die Pools, die gemeinsam auf einer 96-well Platte pipettiert wurden, parallel verlaufende Kurven zeigen (NT, HIG+ & NT, HIG+, SG; NT, HIG- & NT, HIG-, IgM; T, HIG- & T, HIG+; bspw. Abbildung 23). Diese Beobachtung könnte auf einen Plattenfaktor zurückzuführen sein, welcher ein Resultat aus gemeinsam verwendeter Virusverdünnung, suszeptiblen Zellen aus einer gemeinsamen Passage, gemeinsam vorgelegten Verdünnungsreihen und simultaner Auswertung sein könnte.

Die geringen Verdünnungsstufen 1:16 (ARPE-19) und 1:3 (HFF) zur Neutralisation von Fruchtwasserproben zeigen in den HCMV-IgG negativen Referenzpools gegenüber der Viruslösung unspezifische neutralisierende Effekte. Analog zu den Serumproben wurden die eingesetzten Fruchtwasserproben vor der Neutralisation einer Inaktivierung des Komplementsystems unterzogen. Es kommt durch die fast unverdünnten Fruchtwasserproben dennoch zur signifikanten Reduktion der Plaquezahlen gegenüber der Viruskontrolle durch die HCMV-IgG negative Kontrolle. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung der Neutralisationskapazität in diesen Verdünnungsstufen jeweils der Mittelwert nur dieser Verdünnungsstufe als Referenz verwendet, wohingegen bei allen anderen Verdünnungsstufen der Mittelwert der Plaquezahlen aller HCMV-IgG-negativen Referenzproben verwendet wurde, da die Plaquezahlen der HCMV-IgG negativen Serum- und Fruchtwasserpools bei höheren Verdünnungen kaum variierten.

Bei der Neutralisation von Einzelproben zeigte sich im Fruchtwasser der Einfluss der Kontamination mit Blut und konsekutiver Hämolyse (rote Verfärbung der Probe). Zwei kontaminierte, deutlich verfärbte Fruchtwasserproben zeigen überdurchschnittliche HCMV-IgG-Konzentrationen von 112 U/ml und 72 U/ml mit jeweils 100 % Neutralisation bei den Verdünnungen 1:100 und 1:10 von Fruchtwasser zur Neutralisation auf ARPE-19-Zellen und HFF. Diese Ergebnisse wurden nicht gewertet.

Es zeigen sich signifikante Unterschiede im Schwangerschaftsalter (23. und 25. SSW) in den Kohorten der Transmitterinnen (T, HIG+ und T, HIG-) verglichen mit den anderen Kohorten. Der fortschreitende Schwangerschaftsverlauf mit einer größer werdenden Plazentaoberfläche und zunehmendem Blutfluss steht hier in direktem Zusammenhang mit der steigenden Transmissionswahrscheinlichkeit [53]. Dieser Umstand relativiert alle Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Transmissionsstatus, da als zweite Variable immer auch das höhere Schwangerschaftsalter einen Einfluss haben könnte.

Bestimmte Beobachtungen, wie die niedrige Neutralisationskapazität in der Kohorte der Frauen mit früher PI oder die hohe Neutralisation von Proben transmittierender Schwangerer sind über die Wiederholungen und in verschiedenen Versuchsansätzen konsistent. Allerdings zeigt sich bei der Betrachtung der 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) für die errechneten NT50% aus den PRNT für Serum- und Fruchtwasserproben eine gewisse Streuung. Exemplarisch zeigt Abbildung 51 für den Versuchsaufbau von

Fruchtwasser in der Neutralisation auf HFF neben den NT50%-Werten für die einzelnen Versuchswiederholungen auch die dazugehörigen 95%-KI für den berechneten Wert. Es zeigen sich in den zwei Versuchsreihen NT, HIG+ und NT, HIG- jeweils eine Wiederholung mit einem KI deutlich über dem doppelten Wert der errechneten NT50%. Dennoch überschneiden sich alle Konfidenzintervalle, so dass nicht von einer signifikanten Abweichung einzelner Ergebnisse auszugehen ist und die Ausreißer daher auch nicht eliminiert wurden.

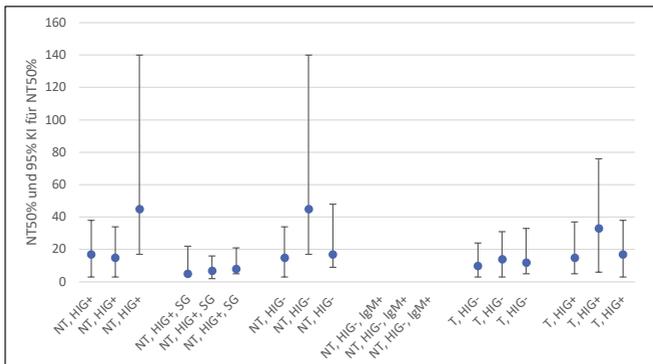


Abbildung 51: Errechnete NT50%-Werte für Fruchtwasserproben in der Neutralisation auf HFF für drei Versuchswiederholungen mit den dazugehörigen 95%-KI für den errechneten Wert nach nicht-linearer Regression

Zudem können aus den Ergebnissen der PRNT von 4 Einzelproben (vgl.3.1.1) und deren Abgleich mit den entsprechenden Ergebnissen aus den Neutralisationsversuchen bei einer definierten Verdünnungsstufe Aussagen über die Vergleichbarkeit beider Versuchsansätze gezogen werden: Die Serumproben H2537-15 und H1220-16 sowie die Fruchtwasserproben H2649-15 und H1218-16 wurden in den Vorversuchen zur Etablierung adäquater Verdünnungsreihen für nachfolgende PRNT verwendet (Abbildung 10 bis Abbildung 12). Die entsprechenden Proben wurden auch in den Versuchsreihen mit Einzelverdünnungen zur Neutralisation in den beiden Zellsystemen verwendet. Die Ergebnisse aus beiden Tests an den Proben zeigen vergleichbare Wertebereiche (Tabelle 18) und damit den „proof of concept“ der Quantifizierung neutralisierender HCMV-gerichteter Antikörper mittels PRNT bzw. Einzelbestimmung einer Verdünnungsstufe.

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse von NT50%-Werten generiert aus Plaque-Reduktions-Neutralisationstest und NT% aus Einzelverdünnung von 4 Proben.

Serum	NT50% HFF	HFF 1:162	NT50% ARPE-19	ARPE-19 1:2000
H2537-15	> 1:128	40%	1:512 – 1:1024	40%
H1220-16	1:1024 – 1:2048	>90%	1:4096 – 1:8192	90%
Fruchtwasser	NT50% HFF	HFF 1:10	NT50% ARPE-19	ARPE-19 1:100
H2649-15	1:4 – 1:8	46%	< 1:32	57%
H1218-16	1:32 – 1:64	>80%	1:256 – 1:512	87%

Auffällig ist die große Spannweite in den Einzelneutralisationen, die sowohl kumuliert über alle Kohorten von 0 % bis 100 % (Tabelle 8) reicht als auch in den einzelnen Kohorten in beiden Zellsystemen jeweils deutlich über 50 Prozentpunkte und bei den HIG-Empfängerinnen sogar stets 100 Prozentpunkte beträgt (Abbildung 24). Die große Spannweite der Neutralisationskapazitäten stellt in diesem Zusammenhang die Diskrepanz zwischen messbaren IgG auf einer linearen Skala und dem System eines Neutralisationsassays bei einer Einzelverdünnung der Serumprobe mit einem Wertebereich der Ergebnisse von 0 % bis 100 % dar. Im in-vitro Neutralisationsassay mit suszeptiblen Zellsystemen spielen eine deutlich größere Bandbreite an spezifischen HCMV-IgG eine Rolle, während der ECLIA-Test lediglich die Antikörper gegen phosphoryliertes p150, phosphoryliertes p28 sowie p52 und p38 quantifizieren kann. Eine Erklärung für die große Spannweite in den Kohorten der HIG-Empfängerinnen, die nachweislich intravenös einen Immunglobulin-Mix mit neutralisierenden Antikörpern gegen HCMV erhalten haben, wäre beispielsweise, dass diese bei einigen Frauen in vivo bereits in großem Maße an HCMV-Virionen gebunden haben, was eine Depletion dieser neutralisierenden Antikörper bewirken kann. In der Folge stehen diese IgG in vitro nicht mehr oder in verringertem Maße zur Neutralisation zur Verfügung. Dem entgegen steht allerdings die Beobachtung, dass in einem Neutralisationsassay die eingesetzte Menge Virionen im Verhältnis zur Konzentration aus nicht-infektiösen viralen Partikeln, die dennoch eine Depletion neutralisierender Antikörper verursachen, wenig Einfluss auf die gemessenen Antikörpertiter zu haben scheint [146].

In einer wichtigen Arbeit zur HCMV-Neutralisation konnte gezeigt werden, dass die Kreuzneutralisation von Sera gegenüber verschiedenen klinischen Virusisolaten und Laborstämmen (Towne und AD169) bei den gleichen Serumproben zu völlig

unterschiedlichen Verläufen der Neutralisationskurven und verschiedenen Neutralisationstiter führen kann. Es wurden Fälle beschrieben, in denen ein Serum gegenüber einem Virusisolat eine NT50% von 1:3000 und gegenüber einem anderen Isolat eine nicht nachweisbare Neutralisation zeigt. Die Autoren begründen diese Beobachtung unter anderem mit der Virusstamm-abhängigen Bildung von neutralisierenden Antikörpern in vivo [146]. Daraus lässt sich für Folgeuntersuchungen ableiten, die Ergebnisse von Neutralisationsassays auch in Zusammenhang mit dem Virusstamm des klinischen Isolates zu setzen.

4.3 Serologische Einflussfaktoren der Neutralisation

Die Analyse von 143 Serum- und Fruchtwasserproben auf ihren Gehalt an HCMV-IgG und die Avidität mittels ECLIA ergab hohe mittlere IgG-Konzentrationen in den beiden Kohorten von Schwangeren HCMV-Transmitterinnen (Abbildung 26). Diese zeigten parallel hohe Neutralisationskapazitäten der Proben und hohe Aviditätsindices. Bemerkenswerterweise waren die gemessenen IgG-Konzentrationen in der Kohorte der latent-HCMV-Infizierten nochmals signifikant höher. Auch der mediane Aviditätsindex war in dieser Kohorte am höchsten (Tabelle 9).

Die signifikanten Unterschiede in der HCMV-IgG-Serumkonzentration der beiden Kohorten NT, HIG+ und NT, HIG- stellen mit großer Wahrscheinlichkeit ein Resultat der HIG-Therapie dar. So konnte von Kagan et al. gezeigt werden, wie sich mit jeder Dosis HIG im Therapieverlauf der Talspiegel der HIG-Serumkonzentration erhöht [102]. Dasselbe gilt für die Avidität. Die HIG-Gaben haben in diesen Kohorten nicht zu signifikant unterschiedlichen IgG-Spiegeln im Fruchtwasser zwischen den beiden Kohorten NT, HIG+ und NT, HIG- geführt. Die mittleren Spiegel und Streuungsmaße unterscheiden sich dennoch deutlich. Die Gründe hierfür sind vermutlich in der Fallzahl und der reduzierten Variabilität in der IgG-Höhe, bedingt durch die generell niedrigeren Konzentrationen im Fruchtwasser allgemein und den Abbau der IgG bei einer grundsätzlich kurzen Halbwertszeit, zu suchen [100].

Die Zusammenschau von Reaktivitäten gegenüber einzelnen rekombinanten Antigenen und den Neutralisationskapazitäten zeigte für Serum-gB2 und die Neutralisation auf HFF einen signifikanten Unterschied zwischen areaktiven und reaktiven Proben. Da das Hüllprotein gB als Vermittler sowohl bei der Virion-Zell Interaktion mit Fibroblasten als

auch Epithelzellen interagiert, wäre ein ähnlicher Effekt auch bei der Gegenüberstellung der Neutralisationstiter auf ARPE-19 Zellen separiert nach gB2 Reaktivität zu erwarten gewesen. Interessant wäre des Weiteren eine Gegenüberstellung der Neutralisationen von reaktiven und areaktiven Proben im Bezug auf Antikörper, die gegen den Pentamerkomplex aus gH, gL, pUL128, pUL130 und pUL131A. Dieser spielt eine bedeutende Rolle in der Induktion neutralisierender Antikörper gegenüber Epithelien und Endothelien [148]. Neben gB2 zeigten sich auch bei Betrachtung von p150 und gB1 signifikante Unterschiede in der NT%, separiert nach Antigenreaktivität. Die rekombinanten Antigene gB1 und gB2 des verwendeten Immunblots unterscheiden sich in ihrer Herkunft. Während beim rekombinanten Antigen gB1 Epitope der antigenen Domänen 1 und 2 des UL55-Gen des Stamm AD169 eingesetzt werden, enthält das Fusionsprotein gB2 die Epitope der antigenen Domäne 2 der beiden Virusstämme Towne und AD169 [149]. Es sind Korrelationen für die Titer neutralisierender Antikörper und anti-gB-Antikörper beschrieben, die vor allem ausgeprägt bei Proben mit einer hohen Neutralisationskapazität nachzuweisen waren [150].

Gegen rekombinantes p150 zeigten alle Proben Reaktivität. Das virale Tegumentprotein p150 (UL 32) induziert konsistent eine deutliche Antikörperantwort und zeigte in Impfstoffexperimenten mit gB-Vaccinen eine Sensitivität von 96 % im HCMV-Infektionsnachweis [151]. Hinweise auf HCMV-neutralisierende Effekte von anti-p150 Antikörpern finden sich in der Literaturrecherche jedoch nicht. Die Beobachtung der Vergesellschaftung von hohen anti-rec-p150 mit signifikant höheren NT% verglichen mit mittlerer oder niedrigerer Reaktivität könnte in diesem Zusammenhang ein Effekt der ausgeprägteren oder fortgeschritteneren Immunantwort insgesamt sein.

Im Gegensatz zu den serologischen Markern (IgG-Konzentration, IgG-Avidität und Präsenz von anti-gB2-IgG) unterscheiden sich die gemessenen Neutralisationskapazitäten der Serum- und Fruchtwasserproben im gepoolten und einzelnen Ansatz zwischen NT, HIG+ und NT, HIG- nicht. Gründe dafür könnten zum einen höhere Unsicherheitsfaktoren in der Ermittlung der Neutralisationswerte, bedingt durch aufwendigere und fehleranfälliger Testverfahren sein. Zum anderen scheint die Neutralisationskapazität nicht nur eine abhängige Variable der serologisch erhebbaren Befunde, sondern multifaktoriell bedingt zu sein. So können weder ECLIA noch Immunoblot die komplexen Zell-Virion-Antikörper-Interaktionen eines zellbasierten in

in vitro-Assay mit einem klinischen HCMV-Isolat und klinischen Analysaten abbilden. Das zeigt sich auch an den großen Spannweiten der ermittelten NT-Kapazitäten unabhängig beispielsweise von der Höhe der HCMV-spezifischen IgG (Abbildung 28).

Im Vergleich der Kohorten zeigten die latent infizierten Schwangeren für die Prävention einer kongenitalen Infektion optimale serologische Indizes mit sowohl hohen mittleren Serum anti-HCMV IgG als auch hoher Avidität (Abbildung 28). Das gleiche Phänomen konnte im Fruchtwasser beobachtet werden (Abbildung 27). Sowohl die Aviditätsmessung als auch die quantitative IgG-Bestimmung aus Fruchtwasser sind, insbesondere auf Grund der niedrigeren Konzentrationen an IgG im Medium, fehleranfälliger. Daher sind insbesondere die Aviditäten tendenziell falsch hoch gemessen. In den Neutralisationstest von Serum und Fruchtwasser latent infizierter Schwangerer konnten demgegenüber keine herausragend hohen Mengen neutralisierender Antikörper gegen HCMV nachgewiesen werden (Abbildung 24 und Abbildung 25). Die Latenz zwischen abgelaufener PI und Probenentnahme, die in der Gruppe der latent infizierten Schwangeren definitionsgemäß am größten war, könnte für dieses Phänomen eine Rolle gespielt haben. Denkbar wäre, dass eine Seronarbe mit hohen IgG Spiegeln bleibt, aber der Gehalt an spezifischen, neutralisierenden Antikörpern wieder abnimmt.

Die Testsysteme der Serologie zielen nicht explizit auf den Gehalt von für die Neutralisation relevanten Antikörpern ab, da der ECLIA phosphoryliertes p150, phosphoryliertes p28, p52 und p38 als Zielstrukturen nutzt.

Dennoch wäre ein größerer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der ECLIA-Messungen (anti-HCMV-IgG und IgG-Avidität) und den Neutralisationstestungen zu erwarten gewesen. Dieser scheint zwar in der Anwendung von Korrelationen bei Betrachtung einzelner Parameter zu bestehen (Tabelle 10), aber insbesondere die Serum anti-HCMV-IgG-Avidität verhält sich zu den ermittelten Neutralisationskapazitäten in HFF bei einer Serumverdünnung von 1:162 völlig zufällig (Abbildung 29). Es gibt Proben, die einen hohen anti-HCMV-IgG Spiegel ohne ausgeprägte neutralisierende Effekte zeigen („poor neutralizer“) und solche mit tendenziell niedrigen IgG-Spiegeln und hohem Gehalt an neutralisierenden Antikörpern („super neutralizer“). Ein vergleichbares Phänomen von hohen und niedrigen Neutralisationskapazitäten bei einer vergleichbaren Kohorte wurde bereits in einer Untersuchung an 100 latent infizierten

Müttern zum Zeitpunkt der Geburt beschrieben. Diese Beobachtung lässt zwei mögliche Schlüsse zu: Zum einen kann der beobachtete Neutralisationseffekt unspezifisch sein. Das sollte allerdings durch Kontrollproben IgG negativer Probandinnen kompensiert werden. Des Weiteren kann es als Hinweis darauf verstanden werden, dass die Antikörperkomposition des ECLIA-Testsystems nicht alle relevanten Anti-HCMV-IgG-Subgruppen abbildet, die im zellbasierten Neutralisationsassay eine Rolle spielen. Die Antikörperkomposition des ECLIA Testsystems scheint bei der Gruppe der poor-neutralizer mit hohen ECLIA-Spiegeln von großer Bedeutung zu sein.

4.4 HCMV-Quantifikation im Fruchtwasser

Die Untersuchung der Viruslast in 51 Fruchtwasserproben mittels qPCR und Kurzzeit (18h-) Mikrokultur zeigt eine Korrelation beider Methoden. Sie ist hoch für Proben von Schwangeren ohne vorherige HIG-Behandlung ($\rho=0,903$) und geringer ausgeprägt bei Proben nach Vorbehandlung mit HIG ($\rho=0,445$). Eine geringere Expression von viralem IE1 in Zellkultur auf HFF verglichen mit der DNA-Viruslast kann auch nach direkter intraamniarer HIG-Gabe beobachtet werden (Tabelle 11).

Die hochgeschwindigkeitszentrifugations-gestützte IE1-Immunoperoxidase-basierte 18h-Kurzzeitkultur zum HCMV-Nachweis aus Fruchtwasser ist eine aussagekräftige und leicht durchführbare Methode ohne hohe apparative Anforderungen. Doch die Kontamination mit hämolytischen Erythrozyten reduziert zum einen die Spezifität der HCMV-Immunfärbung oder resultiert in toxischen Effekten auf die Fibroblasten-Monolayer. Daiminger berichtet von einer hohen Spezifität (99,5 %) für Early-Antigen basierte HCMV-Nachweismethoden verglichen mit einer konventionellen Viruskultur und -Isolation [152]. In den vorliegenden Fällen konnte ebenfalls eine hohe Assoziation zwischen Gewinnung eines klinischen Isolates und der Expression von IE1 in Kurzzeitkultur beobachtet werden. In 20 % der Fälle konnte ein charakteristischer zytopathischer Effekt bereits nach der Inkubation über die Nacht (18h) nachgewiesen werden. Zudem konnte ein klinisches Isolat auch nach initial negativer IE1-18h-Kurzzeitkultur in der Langzeitkultur über 10 Tage gewonnen werden (Tabelle 11). Neben PCR basierten Methoden stellen daher kulturelle HCMV-Nachweismethoden eine unterschätzte, sensitive und schnelle Option zur Detektion der maternofetalen HCMV-Transmission dar. In Fällen von Primer-Mismatch oder probenbedingter

Amplifikationsinhibition kann ein viruskulturbasiertes Verfahren helfen, falsch negative PCR-Ergebnisse richtig zu deuten.

Die Vorbereitung zur Untersuchung der Infektiosität von Fruchtwasserproben mittels Kurzzeit (18h-) Mikrokultur und Langzeitkultur wurden sofort nach Probeneingang begonnen, so dass hier die Ergebnisbeeinflussung durch Kryokonservierung auszuschließen ist. Fruchtwasser, das replikationskompetente Virionen enthält, kann durch externe Einflüsse wie Ultraviolette- oder Infrarotstrahlung in der Infektiosität beeinträchtigt werden. Insbesondere eine verlängerte präanalytische Phase oder der postalische Probenversand mit verlängerter Expositionsdauer gegenüber unkontrollierten externen (Temperatur-) Einflüssen reduziert die Sensitivität der 18h-Kurzzeitkultur (Tabelle 11) [153]. Umso wichtiger sind zur klinischen Befundinterpretation Informationen über maternale Vortherapie, präanalytisches Probenhandling und Transportzeit zwischen Probenabnahme und Verarbeitung im Labor.

Der Quantifikation durch PCR-Methoden gelingt keine Differenzierung zwischen replikationskompetenten Virionen und freien DNA-Sequenzen. Bei HIG-vorbehandelten Frauen müssen in vitro Infektiosität und virale DNA-Konzentration nicht notwendigerweise korrelieren, da die passive Immunisierung mit HIG zur Reduzierung der Infektiosität durch Bildung von Virion-Antikörper-Komplexen beitragen könnte (Abbildung 34 und Abbildung 35). Ein vergleichbares Problem der Unterscheidung zwischen Konzentrationen viraler RNA- und infektiösen Virionen wurde für Enteroviren aufgezeigt [154].

HCMV-DNA-Konzentrationen unter 1×10^3 Kopien/ml wurden als Indikator für ein asymptomatisches fetales Outcome beschrieben [74]. Die meisten der asymptomatisch-infizierten Neugeborenen in der untersuchten Kohorte zeigten höhere Viruslasten zwischen 1028 und $4,6 \times 10^6$ IU/ml. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine persistierende Infektion im Amnionepithel nach maternaler PI, die die extrem hohen Viruslasten auch nach HIG-Behandlung und ohne schlechtes Outcome für den Fetus erklären könnten [155].

Die HCMV-DNA-Last und die Anzahl an IE1-gefärbten Zellkerne in der 18h-Kurzzeitkultur zeigen signifikante Unterschiede zwischen Frauen, die mit HIG behandelt wurden und unbehandelten Frauen (Abbildung 37 und Abbildung 38). Ob HIG die

Viruslast im Falle einer Transmission zu reduzieren vermag, wird in der Literatur unterschiedlich bewertet [95, 99]. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass sowohl Nigro et al. (2005) als auch Revello et al. (2014) jeweils monatliche Intervalle der HIG-Gaben vorsahen.

Die Ergebnisse der Analyse quantitativer Viruslasten, ermittelt durch qPCR und Kurzzeit- (18h-) Mikrokultur, wurden bereits in einer Publikation diskutiert [138].

4.5 PLGF & sFlt1 als Biomarker der Transmission

Bisher basiert die pränatale Diagnose der vertikalen HCMV-Transmission auf dem Virusnachweis aus Fruchtwasser. Eine Biomarker-basierte Diagnostik aus maternalem Blut wäre hingegen weniger invasiv und mit weniger fetalen Risiken verbunden. 114 Serum- und 72 Fruchtwasserproben wurden je nach HIG-Behandlung und Transmissionsstatus nach AC kategorisiert. Die daraus generierten Kohorten (A-D) zeigen, dass Fruchtwasser von Schwangeren nach vertikaler HCMV-Transmission ohne vorherige HIG-Behandlung verglichen mit Non-Transmitterinnen sowohl erhöhte mittlere Konzentrationen von PLGF als auch sFlt1 enthält (Abbildung 42). Der mittlere sFlt1/PLGF-Quotient über die vier Kohorten zeigt vergleichbare Werte (Abbildung 40). Dieser Befund steht im Gegensatz zu veröffentlichten Daten, für die 47 Fälle von HIG-behandelten und unbehandelten Schwangeren mit sieben seronegativen Kontrollen verglichen wurden [129].

Die Untersuchungen zeigen zudem, dass hoch-signifikante Unterschiede in den sFlt1-Konzentrationen zwischen T und NT auch im Serum vor der AC nachweisbar sind (Abbildung 41). Der Serum-sFlt1/PLGF-Quotient zeigte sich im Zusammenhang mit einer HCMV-Transmission nicht erhöht, obwohl einige dieser Fälle mit erhöhten Werten (>38) assoziiert waren.

Unter der Annahme, dass die sFlt1-Konzentration durch die HCMV-Transmission beeinflusst wird, kann nach einer ROC-Analyse empirisch ein Grenzwert für beide Proteine abgeleitet werden. Dieser Grenzwert zeigt hoch-signifikant eine Assoziation mit dem Ausschluss einer Transmission ($p < .001$). Lediglich zwei der 34 Fälle von Transmission zeigen Werte unter den beiden Grenzwerten (Abbildung 47). Bisher gibt es weder für die Risikostratifizierung der diaplazentaren HCMV-Übertragung noch für das

Risiko für HCMV-assoziierte postnatale Folgeerscheinungen einen etablierten Marker. Fetale Thrombozytenzahlen, eine zunehmende maternale Viruslast oder der maternale Nachweis von HCMV-IgM wurden als Indikatoren für ein schlechtes postnatales Outcome für das ungeborene Kind oder für histologische Befunde im Plazentagewebe beschrieben [156, 157].

Die Konzentration von β_2 -Mikroglobulin im fetalen Blut könnte als potenzieller Marker für die Differenzierung in symptomatisch und asymptomatisch infizierte Feten in Frage kommen. Problematisch erscheint sowohl bei diesem Ansatz als auch bei der Analyse von fetalen Thrombozytenzahlen die Probenentnahme durch die Bauchdecke der Mutter und die kindliche Nabelschnur via Chordozentese [157].

Guerra konnte zeigen, dass Auffälligkeiten im Ultraschall als Determinante für symptomatisch HCMV-Infizierte Feten Anwendung finden können. Der positive Vorhersagewert lag in diesem Zusammenhang bei 35 % für alle untersuchten Feten nach maternaler PI und bei 78 % in der Subkohorte der diaplazentar infizierten Feten [158]. Werden Ultraschallauffälligkeiten in Zusammenhang mit der Expression von sFlt1 und PlGF gestellt, zeigt sich ein Bild, das von den Beobachtungen in den Kohorten nach Transmissionsstatus abweicht. Während hier ebenfalls erhöhte Konzentrationen von sFlt1 beobachtet werden können, sind die PlGF-Konzentrationen in der Kohorte der Schwangeren mit Ultraschallauffälligkeiten tendenziell erniedrigt (Abbildung 46). Dies führt rechnerisch zu einem Anstieg der sFlt1/PlGF-Quotienten, wie bei Präeklampsie beschrieben. Zudem entspricht das dem Trend, der bereits von Maidji et al. beschrieben wurde, dass es in der Folge einer diaplazentaren HCMV-Transmission zu einer Erhöhung des Quotienten kommt [129].

Eine mögliche nicht-invasive Determinante der materno-fetalen HCMV-Transmission könnte die Reaktivität aktivierter T-Zellen auf HCMV-Antigene sein. Zwei Testsysteme, die auf der Messung von Interferon γ aus den maternalen Zellen basieren wurden an 57 Schwangeren mit HCMV-PI getestet von denen 16 diaplazentar transmittierten. Für ein Assay (CMV-ELISPOT) wurde dabei hinsichtlich der Prädiktion der materno-fetalen Transmission eine AUC von 0,8055 beschrieben [159].

Die mit HIG behandelte Subkohorte B (T, HIG +) zeigt im Serum sFlt1- und PlGF-Konzentrationen, die mit gesunden NT vergleichbar sind (Abbildung 41). Das könnte ein

Hinweis auf eine Reduktion der inflammatorischen Reaktion nach passiver Immunisierung sein. Interessanterweise korrelieren beide Proteinkonzentrationen in der Gesamtkohorte im Fruchtwasser. Ein Grund für die gleichsinnige Erhöhung beider Proteinkonzentrationen im fetalen Kompartiment könnte das Ausmaß der plazentaren Schäden bedingt durch HCMV-Replikation sein. Aktuelle Studien zeigen wiederholt die Assoziation von erhöhten sFlt1-Werten mit erniedrigten PlGF-Konzentrationen [160, 161]. Dieser Effekt ist in der untersuchten Kohorte nur nach Transmission und auffälligem Ultraschallbefund zu beobachten (Abbildung 46).

In der retrospektiven Analyse von Längsschnittdaten von 13 Schwangerschaften unter Beachtung der MoM für die Konzentrationen von sFlt1 und PlGF zeigt sich, analog den Querschnittdaten, eine Erhöhung der sFlt1-MoM unter den Transmitterinnen (Abbildung 45). Um diese Tendenzen bestätigen zu können und auch um den Einfluss der HIG-Gaben auf die Serumkonzentrationen besser abschätzen zu können, braucht es zusätzliche prospektiv gewonnene Datensätze mit einer höheren zeitlichen Auflösung und einem standardisierten Beobachtungszeitraum. Die vorliegenden Daten sind limitiert durch den retrospektiven Ansatz der Untersuchung und die geringe Anzahl longitudinaler Daten zwischen HIG-Therapiebeginn bzw. Diagnose der HCMV-PI und Amniozentese.

Die Ergebnisse der Analyse von Serum- und Fruchtwasserproben wurden bereits in einer Publikation diskutiert [140].

4.6 Multiplex-Assay Analyse

Bei der Analyse gepoolter Fruchtwasserproben in den unter 2.6.2 vorgestellten Kohorten zeigt sich für 60 beziehungsweise 70 von 78 Proteinen eine Überexpression in den beiden transmittierenden Kohorten verglichen zur mittleren Konzentration über alle Kohorten. Dieser Befund kann als Ausdruck eines proinflammatorischen Milieus im Fruchtwasser-Kompartiment der Schwangeren aufgefasst werden.

4.6.1 Ergebnisinterpretation

Die Ergebnisausgabe durch den Anbieter des Multiplex-Panels erfolgt in einer virtuellen \log_2 skalierten Maßeinheit (NPX). Über, für jedes Protein zur Verfügung gestellte, Verdünnungskurven des Assay-Herstellers kann von der virtuellen Einheit NPX auf

Konzentrationen geschlossen werden. Die entsprechende Kalibrierungskurve für das C-C motif chemokine 25 (CCL25) als Beispiel zeigt Abbildung 52.

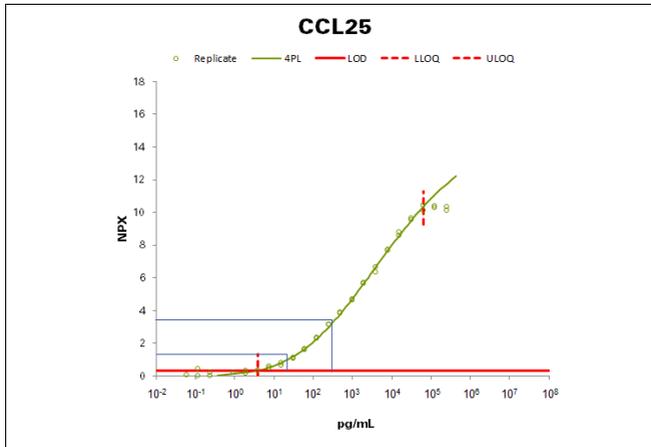


Abbildung 52: Kalibrierungskurve des C-C motif chemokine 25 (CCL25) zwischen Konzentration und log₂-skalierter Einheit [162].

Für CCL25, das einen hohen Konzentrationsunterschied zwischen Kohorte T, HIG- und dem gemeinsamen Mittelwert zeigt, weist einen Unterschied von 1,0 NPX (Mittelwert) zu 3,4 NPX auf. Visuell auf Konzentrationen geschlossen, lässt sich anhand der Abbildung 52 ein Konzentrationsunterschied von etwa 30 pg/ml zu etwa 500pg/ml abschätzen. Ein exakter Konzentrationsunterschied lässt sich anhand der zur Verfügung gestellten Kurven nicht ableiten. Zumal die Messungen beispielsweise von CCL25 Streuungen der Ergebnisse von 6 % innerhalb eines Ansatzes und 18 % zwischen mehreren Ansätzen aufzeigen [162]. Die Messungen im Multiplex-Assay können daher allenfalls einen Trend zu Konzentrationsunterschieden anzeigen.

4.6.2 Auffällige Proteine

Zur systematischen Evaluation der Ergebnisse der Multiplex-Assays aus gepoolten Fruchtwasserproben kann die Abweichung vom gemeinsamen Mittelwert, der in NPX ausgegebenen Ergebnisse analysiert werden. Es zeigen sich für 16 Proteine deutliche Abweichungen vom Mittelwert. Für diese Proteine finden sich in der Literatur bei der

Suche mit den Schlagworten „amniotic fluid; CMV; pregnancy“ jeweils mit dem Proteinnamen folgende dokumentierten Ergebnisse:

Tabelle 19: Ergebnisse einer strukturierten Literaturrecherche zu 16 Proteinen mit auffälligen Konzentrationsunterschieden im Multiplex-Assay: T: HCMV – Transmitterinnen; HIG: Hyperimmunglobulin.

Suchwörter	T, HIG+	T, HIG-	Relevante Ergebnisse der Datenbank des National Center for Biotechnology Information + „amniotic fluid“ oder „pregnancy“	+ „CMV“ & „amniotic fluid“/„pregnancy“
<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i> (+ „4E-BP1“)	↓	↑	Dieser Repressor der Translation wird üblicherweise vom mechanistic target of Rapamycin (mTOR) phosphoryliert [151]. Im Schweinemodell wurde ein Einfluss auf die Initiation der Translation im Endometrium beschrieben [152].	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Chemokine (C-C motif) ligand 23</i> (+ „CCL23“)	↑	↓	Im Schweinemodell in die Signalkaskade der Endometriumentwicklung der frühen Schwangerschaft eingebunden [163]. Im Schwangerschaftsverlauf evtl. Assoziation zwischen maternalem Stress und der Konzentration immunologischer Proteine wie CCL23 oder auch CXCL10 zu geben [164]. In einer Untersuchung waren erhöhte CCL23-Konzentrationen im Nabelschnurblut ein unabhängiger Risikofaktor für spontane Frühgeburtlichkeit [165].	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Chemokine (C-C motif) ligand 25</i> (+ „CCL25“)	↓	↑	Eine Erhöhung von CCL25 im intervillösen Blut von am Termin geborenen Neugeborenen scheint mit einer Erhöhung der Konzentration von Mukosa-assoziierten T-Zellen einher zu gehen [166].	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Cluster of differentiation 5</i> (+ „CD5“)	↑	↑	In der Schwangerschaft wird die Rolle von CD5 als Biomarker für das Risiko einer Präeklampsie diskutiert [167].	CD-5 und andere Proteine sind erhöht in der Muttermilch HCMV-reaktiver stillender Mütter [168].
<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i> (+ „CXCL10“)	↑	↑	In einer Übersichtsarbeit wird die Rolle von CXCL10 im Rahmen der chronischen Plazenta-Inflammation verschiedenster Ursachen aufgezeigt [169].	Eine Publikation von Scott et al. beschreibt die Erhöhung von CXCL10 zusammen mit TNFα, IL1β, IL-12 und -17, CCL2, CCL4 und zweier Wachstumsfaktoren in Fruchtwasser von 8 Schwangeren nach CMV-Transmission . Dabei zeigte sich CXCL-10 als einziges Protein auch im Serum nach CMV-PI erhöht [170].

<i>C-X-C motif chemokine ligand 11</i> (+ „CXCL11“)	↑	↑	In einer Übersichtsarbeit wird die Rolle von CXCL11 im Rahmen der chronischen Plazenta-Inflammation verschiedenster Ursachen aufgezeigt [169].	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>C-X-C motif chemokine ligand 5</i> (+ „CXCL5“)	↑	↑	Dieses Chemokin wurde in erhöhter Konzentration im Fruchtwasser von Schwangeren mit intrauteriner Infektion und Frühgeburtlichkeit nachgewiesen. In der Arbeit wird die Infektion nicht näher auf Pathogene spezifiziert[171]	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
+ „CXCL 6 oder 9“	↑	↑	Im Zusammenhang mit Schwangerschaft oder Fruchtwasser findet sich keine relevante Literatur.	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Fibroblast growth factor 23</i> (+ „FGF-23“)	↑	↑	Im Zusammenhang mit Schwangerschaft oder Fruchtwasser findet sich keine relevante Literatur.	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Interleukin 1 alpha</i> (+ „IL-1α“)	↑	↑	Im Zusammenhang mit Fruchtwasser und Schwangerschaft findet sich keine Literatur.	Eine Arbeit aus dem Jahr 2007 zeigt, dass in vitro die Konzentration von TNF-α und IL1-β durch CMV-Infektion von kultivierten Trophoblasten nicht beeinflusst werden können, wobei beide Proteinen nicht nachgewiesen werden können [172].
<i>monocyte-chemotactic protein 3</i> (+ „MCP-3“)	↑	↑	MCP-3 zeigt bei intraamniarer bakterieller Infektion im Fruchtwasser erhöhte Konzentrationen [173].	In vitro CMV-infizierte Retinapigmentepithelzellen zeigen reduzierte MCP3-Konzentrationen verglichen mit Kontrollen [174].
<i>Matrix metalloproteinase-1</i> (+ „MMP-1“)	↑	↑	Erhöhte Level verschiedener Matrix-Metalloproteasen wurden im Zusammenhang mit Frühgeburtsbestrebungen mittels Multiplex-Analysen untersucht [175]. Die Inflammation, die unter anderem durch MMP-1 mediert wird, könnte in diesem Zusammenhang zu strukturellen Schäden der Fruchthöhle führen [176].	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Osteoprotegerin</i> (+ „OPG“)	↑	↑	Osteoprotegerin (OPG) wurde in Plazentaprobe von Frauen mit ausgeprägter Präeklampsie in erhöhter Konzentration verglichen mit unauffälligen Schwangeren nachgewiesen [177].	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
<i>Transforming growth factor alpha</i> (+ „TGF-alpha“)	↓	↑	Im Zusammenhang mit Schwangerschaft und CMV finden sich keine veröffentlichten Ergebnisse.	In Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.

<i>TNF-related weak inducer of apoptosis</i> (+ „TWEAK“)	↑	↑	Im Zusammenhang mit Schwangerschaft und CMV finden sich keine veröffentlichten Ergebnisse.	Im Zusammenhang mit CMV findet sich keine Literatur.
---	---	---	--	--

4.6.3 Proinflammatorischer Zustand nach Transmission

Von 79 Proteinen mit validen Ergebnissen waren 70 im Pool T, HIG - (n = 14; vgl. Abschnitt 2.6.2) erhöht messbar. Ein deutlicher Unterschied sowohl in der Konzentration als auch der Menge an erhöhten Proteinkonzentrationen zur Gruppe der HIG-behandelten Transmitterinnen (T, HIG +; n = 17) war nachweisbar. Auf die Konzentrationen pro- und antiangiogener Proteinen und die mit einer Hypoxie verbundenen Veränderungen wie der plazentaren Dichte der Villi oder fibrinoide Ablagerungen wurde der positive Einfluss von HIG nach stattgehabter diaplazentärer HCMV-Transmission bereits beschrieben [129]. Das eine mikrobielle Kolonisation der Plazenta eine inflammatorische Antwort induziert und dabei unter anderem zu Störungen der fetalen und neonatalen cerebralen Entwicklung führen kann, ist hinreichend beschrieben. Insbesondere werden Erhöhungen von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, Tumor-Nekrose Faktor- α und Interferon γ und des antiinflammatorischen IL-10 beschrieben [178]. Diese Effekte können in der vorliegenden Untersuchung für IL-6, IL-8, IL-18, die Beta-Untereinheiten des IL-12 sowie die Alpha-Untereinheit des IL-1 und IL-10 im Multiplex-Assay ebenfalls beschrieben werden.

TNF- α und Interferon γ können im durchgeführten Ansatz nicht nachgewiesen werden, da die Konzentrationen jeweils unter dem Detektionslimit liegen. Beide Zytokine sind aber grundsätzlich im Fruchtwasser messbar enthalten. Für diaplazentäre Toxoplasmose-Infektionen konnten Konzentrationen um 6 pg/ml (TNF- α) und 12 pg/ml (Interferon- γ) nachgewiesen werden [179]. Diese Konzentrationen liegen grundsätzlich im linearen Messbereich des Multiplex-Assays [180, 181].

4.6.4 Proteine unterhalb des Detektionslimits

Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die 13 Proteine, die mittels des Multiplex-PEA nicht in gepoolten Fruchtwasserproben nachgewiesen werden können:

Tabelle 20: Proteine, deren Konzentrationen im gepoolten Fruchtwasser unterhalb der Nachweisgrenze (limit of detection in pg/ml – LOD) nicht nachgewiesen wurden.

Protein	Kurzbeschreibung [182, 183]	LOD (pg/ml)
Interleukin-17A	Zytokin, das von aktivierten T-Gedächtniszellen produziert wird	3,81
Interleukin -20RA	Zytokinrezeptor, der mit IL20RB und IL10RB Heterodimere bildet und weit verbreitet exprimiert wird (vor allem von Epithelien).	1,91
Interleukin 2	Zytokin, das von T-Zellen nach Antigenkontakt produziert wird und unter anderem B-Zellen und Monozyten aktiviert.	30,5
Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)	Induziert Chemokine zur T-Zell-Migration aus Monozyten und die Reifung von dendritischen Zellen. Von verschiedensten Geweben wie Herz, Leber oder Keratinozyten exprimiert.	3,81
Signaling lymphocytic activation molecule (SLAMF1)	Oberflächenrezeptor auf aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen	30,5
Fibroblast growth factor (FGF-5)	Wachstumsfaktor, unter anderem eingebunden in die Regulation des Haarwachstums.	1,91
Interleukin 13	Reduziert die Expression anderer Zytokine, induziert die Expression von Matrix-Metalloproteinasen in den oberen Atemwegen.	7,63
Tumornekrosefaktor (TNF)	Durch Bindung an seine Rezeptoren induziert er die Apoptose über den NF-kappa-B und MAPK-Signalweg. Durch das Multiplex-Assay von Olink werden laut Hersteller normale Plasmakonzentrationen nicht detektiert.	0,95
Interleukin 20	Proinflammatorisches und angiogenes Zytokin, insbesondere an Epithelzellen	7,63
Interleukin 33	Rezeptorbindung induziert den NF-kappa-B und MAPK-Signalweg; Chemokin für TH2-Zellen, Eingebunden in die Aktivierung von Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen und NK-Zellen	3,81
Interferon- γ (INF- γ)	Von Antigen-aktivierten Lymphozyten sezernierter Makrophagenaktivator mit antiviraler Aktivität und antiproliferativen Effekten. Durch das Multiplex-Assay von Olink werden laut Hersteller normale Plasmakonzentrationen nicht detektiert.	0,24
Interleukin 4	B-Zell-aktivierendes Zytokin, induziert MHC II-Expression; multiple Wirkungen auf Lymphozyten, Monozyten und Dendritische Zellen	0,24
Interleukin 5	Reifungsvermittlung von B-Zellen zu Plasmazellen	3,81

Für Interferon- γ und den Tumornekrosefaktor wird Herstellerseitig eingeräumt, dass die durch das PEA messbaren Konzentrationen über den üblicherweise bei gesunden Probanden nachweisbaren Plasmakonzentrationen liegen [182].

4.6.5 Vor- und Nachteile eines Multiplex-Assay

Unter dem Begriff Multiplex-Assay werden verschiedene Antigen-Antikörper oder PCR-basierte Tests zusammengefasst, die es ermöglichen, in einem Untersuchungsgang mehrere Analysate, üblicherweise aus einer Patientinnenprobe, zu quantifizieren. Einen

diagnostischen Stellenwert besitzt dieses Vorgehen beispielsweise in der Pränatalmedizin oder Allergiediagnostik. Darüber hinaus eignen sich Multiparameter-Testsysteme zur Autoimmundiagnostik oder als Suchtest in der Biomarkerforschung [184].

Mittels gepoolter Proben und der Verwendung eines Multiplex-Assay können nach einem Untersuchungsgang Aussagen zu Proteinzusammensetzungen bezogen auf 91 einzelne Komponenten in sieben Pools, bestehend aus insgesamt 106 Einzelproben, getroffen werden. Es fließen folglich 9646 Einzelkonzentrationen in die Ergebnisse mit ein. Ohne größeren Aufwand können daraus Trends abgeleitet werden, wie zum Beispiel, dass ein deutlicher Anteil der proinflammatorischen Proteine in den gepoolten Proben der Transmitterinnen relativ erhöht nachgewiesen werden kann.

Allerdings sind die Einzelinformationen über Konzentrationen einzelner Proteine individueller Proben keiner Evaluation zugänglich. Ob erhöhte Konzentrationen im Pool das Resultat weniger überproportional erhöhter Konzentrationen in einzelnen Fruchtwasserproben sind oder auf eine im Mittel erhöhte Konzentration in der Kohorte zurückzuführen sind, lässt sich nicht ableiten.

Eine tatsächliche Spezifität der beobachteten Konzentrationsunterschiede ist durch das unselektive Untersuchen vieler Proteine im Rahmen des Multiplex-Assays nicht gegeben. Auffällige Ergebnisse im Sinne relativer, großer Konzentrationsunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen oder bezogen auf den Transmissionsstatus können aber als Grundlage für Bestätigungstests an Einzelproben verwendet werden.

Ein Nachteil des gewählten Multiplex-Assay ist die Ausgabe der Ergebnisse in einer virtuellen Einheit, die lediglich durch vom Hersteller zur Verfügung gestellte Kalibrierungskurven einen visuellen Rückschluss auf Konzentrationen erlaubt. Vergleiche zu Normwerten und Ergebnissen anderer Forschungsvorhaben werden damit erschwert.

4.6.6 IgG negativer Pool

Das Multiplex-PEA wurde auch mit einem Pool aus HCMV-IgG negativen Fruchtwasserproben ($n = 7$; vgl. Abschnitt 2.6.2) durchgeführt. 42 von 79 evaluierten Proteine zeigten mittlere Konzentrationen über dem gemeinsamen Mittelwert aller Pools. In diesem Pool fanden sich überproportional hohe Expressionsmuster von

Neurothrophin 3, 4E-BP1, CCL3, CCL19, FGF-21, IL-10 Rezeptor Subunit α , Tumornekrosefaktor-Ligand superfamily member 14 (TNFSF14), CCL11, Oncostatin-M, Axin-1, Monocyte Chemotactic protein 1 (MCP-1), IL-17C, Latency-associated peptide transforming growth factor beta-1 (LAG-TGF-beta-1) und MCP-3. Da die Fruchtwasserproben stets im Rahmen einer AC bei diagnostischem Anfangsverdacht eines zu diagnostizierenden pränatalen Krankheitsbildes gewonnen wurden, ist es plausibel, dass Abweichungen von absolut gesunden Kollektiven beobachtet werden könnten. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der HCMV-IgG negativ Pool eine geeignete Kontrolle für die Neutralisationsassays an Pools darstellt. Einen möglichen, bedeutsamen Einflussfaktor auf die HCMV-Neutralisation stellt der Serostatus dar. Ob durch inflammatorische Proteine ebenfalls auf die in vitro Neutralisationskapazität Einfluss genommen wird, bleibt offen. Einen Versuch der Kontrolle stellt in diesem Zusammenhang die Komplementinaktivierung dar.

In der Gesamtschau zeigt sich im Vergleich der Pools von HCMV-IgG positiven, HIG -, Non-Transmitterinnen zu HCMV-IgG positiven, HIG -, Transmitterinnen der deutliche Trend zu einer Überexpression proinflammatorischer Proteine im Fruchtwasser im Rahmen einer Transmission.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit untersucht an Serum und Fruchtwasserproben von Schwangeren mit akuter oder stattgehabter HCMV-PI im Kontext der Behandlung mit HiG die Konzentration neutralisierender anti-HCMV-Antikörper, den Einfluss von serologischen Markern (anti-HCMV-IgG und -IgM im ECLIA, Reaktivität im recomLine-HCMV-Immunoblot), die Konzentration der beiden Proteine sFlt1 und PlGF sowie die Vergleichbarkeit der beiden quantitativen Methoden der Kurzzeit (18h-) Mikrokultur und der qPCR.

In den Neutralisationstestungen sowohl an gepoolten- als auch an Einzelproben kann gezeigt werden, dass Serum und Fruchtwasser von HCMV-Transmitterinnen *in vitro* signifikant besser das klinische HCMV-Isolat neutralisiert. Ein Effekt durch die vorherige intravenöse Applikation von Hyperimmunglobulin auf die spätere Neutralisationskapazität von Serum- oder Fruchtwasserproben zeigt sich nur innerhalb der Kohorten der Transmitterinnen und Non-Transmitterinnen. Serum und Fruchtwasser von Schwangeren mit sehr früher Infektion und noch hohem IgM-Titer enthält kaum HCMV-neutralisierende Antikörper.

Für Folgeuntersuchungen lässt sich ableiten, dass die Ergebnisse von Neutralisationsassays auch in Zusammenhang mit dem Virusstamm des klinischen Isolates gesetzt werden müssen. Neutralisationen mit verschiedenen Virusstämmen und die Untersuchung der Immunglobulin-Komposition könnte weiter Aufschluss über die Rolle der stammspezifischen Induktion einer Antikörperantwort und die Rolle einzelner Antigene geben. Hierzu können unter anderem auch Depletions-Neutralisationsassays an Serum- und Fruchtwasserproben durchgeführt werden und die Konzentrationen von Immunglobulinen gegen spezifische antigene Domänen wie gB oder p150 gemessen werden.

Durch die Neutralisation von Einzelproben kann gezeigt werden, dass es in sämtlichen Kohorten Einzelproben mit hohem und niedrigem Gehalt an neutralisierenden Antikörpern gibt. Um hier Effekte genauer beschreiben zu können, müssen in longitudinalen Folgeuntersuchungen die Neutralisationskapazitäten von Einzelproben gegenüber definierten viralen Epitopen analysiert werden. Von enormer Bedeutung ist im Kontext der passiven Immunisierung mittels HiG im Rahmen der HCMV-PI aufgrund

der kurzen Halbwertszeit der spezifischen Immunglobuline der zeitliche Abstand zwischen den Einzelproben.

Die Untersuchung der Viruslast in klinischen Fruchtwasserproben mittels qPCR und 18h-Kurzzeit-Mikrokultur zeigt den Einfluss der HIG-Behandlung auf die *in vitro* - Infektiosität. Verschiedene Studien kommen zu unterschiedlichen Bewertungen der Effektivität der maternalen HIG-Behandlung auf die diaplazentare HCMV-Transmission *in-utero*. Welchen Stellenwert die maternale Dosierung sowie das Dosierungsintervall spielen, müssen weitere Studien zeigen. Die vorliegenden Daten weisen jedoch auf den Trend zu niedrigeren Viruslasten im Fruchtwasser von mit HIG behandelten Schwangeren hin.

Schwangere HCMV-Transmitterinnen zeigen signifikant höhere Serum- und auch Fruchtwasserspiegel des anti-angiogenen sFlt1, während über alle Kohorten der Quotient aus sFlt1/PlGF bei Transmitterinnen nicht signifikant erhöht messbar ist.

Es braucht weitere, prospektive Studien, um zu evaluieren, ob sFlt1 und PlGF die Prädiktion der fetalen HCMV-Infektion sicher erlauben und ob eine Vorhersage der symptomatischen kongenitalen HCMV-Infektion möglich ist. Eine Assoziation zwischen der Höhe der sFlt1-Konzentration und auffälligen Ultraschallbefunden besteht (Abbildung 46) und eine Kombination mit anderen möglichen Verfahren, wie dem CMV-ELISPOT erscheint sinnvoll.

Die Untersuchung gepoolter Fruchtwasserproben an Kohorten unterschiedlicher Behandlung mit oder ohne HIG und Transmissionsstatus zeigte ein deutlich inflammatorisch verändertes Milieus in den Proben der Transmitterinnen verglichen mit HCMV negativen Fruchtwasserpools. Es können hier Zytokine identifiziert werden, die im Fruchtwasser eine relativ hohe Trennschärfe zwischen Transmitterinnen und Non-Transmitterinnen (bspw. FGF-23, IL-1 alpha und CXCL5) und auch zwischen HIG-naiven und HIG behandelten Transmitterinnen (CCL25) besitzen. In einem nächsten Schritt wäre daher die Untersuchung dieser Proteine im maternalen Serum und insbesondere an singulären Proben angezeigt um deren Potential als Biomarker weiter zu ergründen.

Die kongenitale HCMV-Infektion als häufigste, schwangerschaftsassoziierte Viruserkrankung stellt große Herausforderungen an verschiedene Akteure im Bereich Gesundheitsfürsorge: Eine international schwelenden Debatte um die Aufnahme des HCMV-Serostatus in nationale Schwangerschaftsvorsorgeprogramme (auch als Grundlage für eine gezielte Prävention der PI), die diskrepanten Ergebnisse zur Forschung mit Immunglobulinpräparaten zur Prävention der diaplazentaren HCMV-Transmission oder das konsequente Umsetzen von bereits in Empfehlungen aufgenommene Präventionsansätze der HCMV-PI, wie die regelmäßige Hygieneberatung aller Schwangeren sind wichtige, meist jedoch nicht konsequent adressierte Themen im Kontext der öffentlichen Gesundheitsfürsorge.

Abschließend stellt sich auch die Frage nach einer evolutionären Komponente: Ökosysteme und einzelne Organismen haben über viele Zeitalter gegenseitig Nischen geschaffen, besetzt und wurden wieder verdrängt. Insbesondere Infektionskrankheiten zeigen hier zum Teil komplexe, auf den Wirt abgestimmte Lebenszyklen. Mit dem Nachweis von HCMV in männlicher Samenflüssigkeit stellt sich auch die Frage, welche Bedeutung der sexuellen Transmission im Infektionszyklus der HCMV zukommt. Insbesondere im Zusammenhang mit der Samenspende und dem unerfüllten Kinderwunsch eröffnet sich hier ein breite Forschungsfeld für die Zukunft [185].

6 Quellenangaben

1. Haymaker W, Girdany BR, Stephens J, Lillie RD, Fetterman GH. Cerebral Involvement with Advanced Periventricular Calcification in Generalized Cytomegalic Inclusion Disease in the Newborn*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1954;13:562–86. doi:10.1093/jnen/13.4.562.
2. Margileth AM. The diagnosis and treatment of generalized cytomegalic inclusion disease of the newborn. *Pediatrics*. 1955;15:270–83.
3. Rosenstein DL, Navarrete-Reyna A. Cytomegalic inclusion disease: Observation of the characteristic inclusion bodies in the placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 1964;89:220–4.
4. Becker P, Melnick JL, Mayor HD. A morphologic comparison between the developmental stages of herpes zoster and human cytomegalovirus. *Exp Mol Pathol*. 1965;4:11–23.
5. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:86–102. doi:10.1128/CMR.00062-12.
6. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*. 2003;98:269–97.
7. Stinski MF. History of the molecular biology of cytomegaloviruses. *Methods Mol Biol*. 2014;1119:1–14. doi:10.1007/978-1-62703-788-4_1.
8. Haaheim LR, Pattison JR, Whitley RJ, editors. *A Practical Guide to Clinical Virology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2002.
9. Smith RM, Kosuri S, Kerry JA. Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses*. 2014;6:582–605. doi:10.3390/v6020582.
10. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:63–83.
11. Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2004;85:1301–12. doi:10.1099/vir.0.79888-0.
12. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72:249-65, table of contents. doi:10.1128/MMBR.00040-07.

13. Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, Holton M, Dargan DJ, Baluchova K, et al. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:19755–60. doi:10.1073/pnas.1115861108.
14. Cheng S, Caviness K, Buehler J, Smithey M, Nikolich-Žugich J, Goodrum F. Transcriptome-wide characterization of human cytomegalovirus in natural infection and experimental latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114:E10586. doi:10.1073/pnas.1710522114.
15. Wu Y, Prager A, Boos S, Resch M, Brizic I, Mach M, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- α as a key for entry. *PLOS Pathogens*. 2017;13:e1006281. doi:10.1371/journal.ppat.1006281.
16. Adler B, Scrivano L, Ruzcics Z, Rupp B, Sinzger C, Koszinowski U. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J Gen Virol*. 2006;87:2451–60. doi:10.1099/vir.0.81921-0.
17. Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: Scientific background and clinical implications. *Rev Med Virol*. 2010;20:136–55. doi:10.1002/rmv.645.
18. Kabanova A, Marcandalli J, Zhou T, Bianchi S, Baxa U, Tsybovsky Y, et al. Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nat Microbiol*. 2016;1:16082. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.82.
19. Beltran PMJ, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: Lessons from proteomics. *Expert review of proteomics*. 2014;11:697–711. doi:10.1586/14789450.2014.971116.
20. Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. Human cytomegalovirus penetrates host cells by PH-independent fusion at the cell surface. *Virology*. 1992;191:387–95. doi:10.1016/0042-6822(92)90200-9.
21. Arend KC, Lenarcic EM, Moorman NJ. The 5' Untranslated Region of the Major Immediate Early mRNA is Necessary for Efficient Human Cytomegalovirus Replication. *Journal of Virology* 2018. doi:10.1128/JVI.02128-17.
22. Ligat G, Cazal R, Hantz S, Alain S. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: A close-up view. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42:137–45. doi:10.1093/femsre/fuy004.

23. Bogner E, Radsak K, Stinski MF. The Gene Product of Human Cytomegalovirus Open Reading Frame UL56 Binds the pac Motif and Has Specific Nuclease Activity. *Journal of Virology*. 1997;72:2259–64.
24. Sonntag E, Milbradt J, Svrlanska A, Strojan H, Häge S, Kraut A, et al. Protein kinases responsible for the phosphorylation of the nuclear egress core complex of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*. 2017;98:2569–81.
25. Alwine JC, Condit RC. The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress. *PLOS Pathogens*. 2012;8:e1002878. doi:10.1371/journal.ppat.1002878.
26. Spaete RR, Perot K, Scott PI, Nelson JA, Stinski MF, Pacht C. Coexpression of Truncated Human Cytomegalovirus gH with the UL115 Gene Product or the Truncated Human Fibroblast Growth Factor Receptor Results in Transport of gH to the Cell Surface. *Virology*. 1993;193:853–61. doi:10.1006/viro.1993.1194.
27. Kagan KO, Hamprecht K. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296:15–26. doi:10.1007/s00404-017-4380-2.
28. Rutten H, Rissmann A, Brett B, Costa S-D, Dossow B, Farber J, et al. Congenital cytomegalovirus infection in Central Germany: An underestimated risk. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296:231–40. doi:10.1007/s00404-017-4435-4.
29. Mhandire D, Duri K, Kaba M, Mhandire K, Musarurwa C, Chimusa E, et al. Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection Among HIV-Infected and HIV-Uninfected Pregnant Women Attending Antenatal Clinic in Harare, Zimbabwe. *Viral Immunol*. 2019;32:289–95. doi:10.1089/vim.2019.0024.
30. Mohammadi A, Karbasi B, Shahbazi R, Foroughi A, Mokhber-Alsafa L. Cytomegalovirus Seroepidemiology: a Population-based Study in Alborz Province, Iran. *Arch Razi Inst*. 2019;74:165–73. doi:10.22092/ari.2018.115919.1157.
31. Bawa MK, Mamman A, Olayinka A, Gidado S, Waziri NE, Balogun MS, et al. Blood donor safety, prevalence and associated factors for cytomegalovirus infection among blood donors in Minna-Nigeria, 2014. *Pan Afr Med J*. 2019;32:6. doi:10.11604/pamj.suppl.2019.32.1.13297.
32. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, Griffiths P. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2019;29:e2034. doi:10.1002/rmv.2034.

33. Burgdorf KS, Trabjerg BB, Pedersen MG, Nissen J, Banasik K, Pedersen OB, et al. Large-scale study of Toxoplasma and Cytomegalovirus shows an association between infection and serious psychiatric disorders. *Brain Behav Immun.* 2019;79:152–8. doi:10.1016/j.bbi.2019.01.026.
34. Lachmann R, Loenenbach A, Waterboer T, Brenner N, Pawlita M, Michel A, et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS ONE.* 2018;13:e0200267. doi:10.1371/journal.pone.0200267.
35. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Aragon DC, Duarte G, Fowler KB, Boppana S, Britt WJ. Seroconversion for Cytomegalovirus Infection During Pregnancy and Fetal Infection in a Highly Seropositive Population: "The BraCHS Study". *J Infect Dis.* 2018;218:1200–4. doi:10.1093/infdis/jiy321.
36. Arellano-Galindo J, Villanueva-García D, Cruz-Ramirez JL, Yalaupari-Mejia JP, Uribe-Gutiérrez G, Velazquez-Guadarrama N, et al. Detection and gB genotyping of CMV in Mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8:758–67. doi:10.3855/jidc.3501.
37. Wang S, Wang T, Zhang W, Liu X, Wang X, Wang H, et al. Cohort study on maternal cytomegalovirus seroprevalence and prevalence and clinical manifestations of congenital infection in China. *Medicine (Baltimore).* 2017;96:e6007. doi:10.1097/MD.0000000000006007.
38. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Calvario A, Germinario C, Bozzi A, et al. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2006;25:156–9. doi:10.1097/01.inf.0000199261.98769.29.
39. Schlesinger Y, Halle D, Eidelman AI, Reich D, Dayan D, Rudensky B, et al. Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003;88:F371-4. doi:10.1136/fn.88.5.f371.
40. Viswanathan R, Bafna S, Mergu R, Deshpande G, Gunjkar R, Gaikwad S, Mullick J. Direct Saliva Real-time Polymerase Chain Reaction Assay Shows Low Birth Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection in Urban Western India. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2019;38:e65-e68. doi:10.1097/INF.0000000000002094.

41. Karimian P, Yaghini O, Nasr Azadani H, Mohammadzadeh M, Arabzadeh SAM, Adibi A, Rahimi H. Prevalence, Characteristics, and One-Year Follow-Up of Congenital Cytomegalovirus Infection in Isfahan City, Iran. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2016;2016:7812106. doi:10.1155/2016/7812106.
42. Mwaanza N, Chilukutu L, Tembo J, Kabwe M, Musonda K, Kapasa M, et al. High rates of congenital cytomegalovirus infection linked with maternal HIV infection among neonatal admissions at a large referral center in sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2014;58:728–35. doi:10.1093/cid/cit766.
43. Tshabalala D, Newman H, Businge C, Mabunda SA, Kemp W, Beja P. Prevalence and determinants of congenital cytomegalovirus infection at a rural South African central hospital in the Eastern Cape. *Southern African Journal of Infectious Diseases.* 2018;33:89–92. doi:10.1080/23120053.2018.1462560.
44. Otieno NA, Nyawanda BO, Otiamo F, Onoko M, Amin MM, Otieno M, et al. The impact of maternal HIV and malaria infection on the prevalence of congenital cytomegalovirus infection in Western Kenya. *J Clin Virol.* 2019;120:33–7. doi:10.1016/j.jcv.2019.09.007.
45. Putri ND, Wiyatno A, Dhenni R, Sriyani IY, Dewantari AK, Handryastuti S, et al. Birth prevalence and characteristics of congenital cytomegalovirus infection in an urban birth cohort, Jakarta, Indonesia. *Int J Infect Dis.* 2019;86:31–9. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.009.
46. Barlinn R, Dudman SG, Trogstad L, Gibory M, Muller F, Magnus P, Rollag H. Maternal and congenital cytomegalovirus infections in a population-based pregnancy cohort study. *APMIS.* 2018;126:899–906. doi:10.1111/apm.12899.
47. Humberg A, Leienbach V, Fortmann MI, Rausch TK, Buxmann H, Müller A, et al. Prävalenz der kongenitalen CMV Infektion und antivirale Therapie in Very-Low-Birth-Weight Infants: Beobachtungen aus dem German Neonatal Network. [Prevalence of Congenital CMV Infection and Antiviral Therapy in Very-Low-Birth-Weight Infants: Observations of the German Neonatal Network]. *Klin Padiatr.* 2018;230:257–62. doi:10.1055/a-0598-4748.
48. Beswick R, David M, Higashi H, Thomas D, Nourse C, Koh G, et al. Integration of congenital cytomegalovirus screening within a newborn hearing screening programme. *J Paediatr Child Health.* 2019;55:1381–8. doi:10.1111/jpc.14428.

49. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17:253–76. doi:10.1002/rmv.535.
50. Stagno S. Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *JAMA.* 1986;256:1904. doi:10.1001/jama.1986.03380140074025.
51. Cannon MJ, Davis KF. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health.* 2005;5:70. doi:10.1186/1471-2458-5-70.
52. Simonazzi G, Curti A, Cervi F, Gabrielli L, Contoli M, Capretti MG, et al. Perinatal Outcomes of Non-Primary Maternal Cytomegalovirus Infection: A 15-Year Experience. *Fetal Diagn Ther.* 2018;43:138–42.
53. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitten S, Senat MV, Fuchs F, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn.* 2013;33:751–8. doi:10.1002/pd.4118.
54. Forman MS, Vaidya D, Bolorunduro O, Diener-West M, Pass RF, Arav-Boger R. Cytomegalovirus Kinetics Following Primary Infection in Healthy Women. *J Infect Dis.* 2017;215:1523–6. doi:10.1093/infdis/jix188.
55. Bresson JL, Clavequin MC, Mazon MC, Mengelle C, Scieux C, Segondy M, Houhou N. Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. *Hum Reprod.* 2003;18:1881–6.
56. Hamprecht K, Goelz R. Postnatal Cytomegalovirus Infection Through Human Milk in Preterm Infants: Transmission, Clinical Presentation, and Prevention. *Clin Perinatol.* 2017;44:121–30. doi:10.1016/j.clp.2016.11.012.
57. Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet.* 2001;357:513–8. doi:10.1016/S0140-6736(00)04043-5.
58. Marshall BC, Adler SP. The frequency of pregnancy and exposure to cytomegalovirus infections among women with a young child in day care. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200:163.e1-5. doi:10.1016/j.ajog.2008.08.037.
59. Hamprecht K, Bissinger AL, Arellano-Galindo J, Schweinzer K, Jiang X, Göhring K, et al. Intrafamilial transmission of human cytomegalovirus (HCMV): Long-term dynamics of epitope-specific antibody response in context of avidity maturation. *J Clin Virol.* 2014;60:119–26. doi:10.1016/j.jcv.2014.03.006.

60. Stranzinger J, Kozak A, Schilgen B, Paris D, Nießen T, Schmidt L, et al. Are female daycare workers at greater risk of cytomegalovirus infection? A secondary data analysis of CMV seroprevalence between 2010 and 2013 in Hamburg, Germany. *GMS Hyg Infect Control*. 2016;11:Doc09. doi:10.3205/dgkh000269.
61. Lamarre V, Gilbert NL, Rousseau C, Gyorkos TW, Fraser WD. Seroconversion for cytomegalovirus infection in a cohort of pregnant women in Québec, 2010-2013. *Epidemiol Infect*. 2016;144:1701–9. doi:10.1017/S0950268815003167.
62. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*. 2015;235:288–97. doi:10.1002/path.4437.
63. Pass RF, Arav-Boger R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management, and prevention. *F1000Res*. 2018;7:255. doi:10.12688/f1000research.12517.1.
64. Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K, et al. Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017;36:1205–13. doi:10.1097/INF.0000000000001763.
65. Leruez-Ville M, Stirnemann J, Sellier Y, Guilleminot T, Dejean A, Magny J-F, et al. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215:342.e1-342.e9. doi:10.1016/j.ajog.2016.03.052.
66. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG, et al. Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. *New England Journal of Medicine*. 2015;372:933–43. doi:10.1056/NEJMoa1404599.
67. Bartlett AW, Hall BM, Palasanthiran P, McMullan B, Shand AW, Rawlinson WD. Recognition, treatment, and sequelae of congenital cytomegalovirus in Australia: An observational study. *J Clin Virol*. 2018;108:121–5. doi:10.1016/j.jcv.2018.09.017.
68. Beaudoin ML, Renaud C, Boucher M, Kakkar F, Gantt S, Boucoiran I. Perspectives of women on screening and prevention of CMV in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2021;258:409–13. doi:10.1016/j.ejogrb.2021.01.035.
69. Toriyabe K, Morikawa F, Minematsu T, Ikejiri M, Suga S, Ikeda T. Anti-cytomegalovirus immunoglobulin M titer for congenital infection in first-trimester

- pregnancy with primary infection: A multicenter prospective cohort study. *J Perinatol.* 2017;37:1272–7. doi:10.1038/jp.2017.133.
70. Tanimura K, Tairaku S, Morioka I, Ozaki K, Nagamata S, Morizane M, et al. Universal Screening With Use of Immunoglobulin G Avidity for Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clin Infect Dis.* 2017;65:1652–8. doi:10.1093/cid/cix621.
 71. Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J Infect Dis.* 1997;175:533–44.
 72. Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten, Gesellschaft für Virologie. S2k-Leitlinie - Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen. Berlin: Springer; 2014.
 73. Gemeinsamen Bundesausschusses. Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“). 10.12.1986. <https://www-gba.de/informationen/richtlinien/19/>.
 74. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2008;41:192–7. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.015.
 75. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. *Infectious disorders drug targets.* 2011;11:466–74.
 76. Leruez-Ville M, Stirnemann J, Sellier Y, Guilleminot T, Dejean A, Magny J-F, et al. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol;*215:342.e1-342.e9. doi:10.1016/j.ajog.2016.03.052.
 77. Bilavsky E, Pardo J, Attias J, Levy I, Magny J-F, Ville Y, et al. Clinical Implications for Children Born With Congenital Cytomegalovirus Infection Following a Negative Amniocentesis. *Clin Infect Dis.* 2016;63:33–8. doi:10.1093/cid/ciw237.
 78. Gouarin S, Palmer P, Cointe D, Rogez S, Vabret A, Rozenberg F, et al. Congenital HCMV infection: A collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J Clin Virol.* 2001;21:47–55.

79. Bodeus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn.* 1999;19:314–7.
80. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: Prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol.* 2000;95:881–8.
81. Enders G, Bader U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001;21:362–77. doi:10.1002/pd.59.
82. Enders M, Daiminger A, Exler S, Ertan K, Enders G, Bald R. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 115 cases: A 5 years' single center experience. *Prenat Diagn.* 2017;37:389–98. doi:10.1002/pd.5025.
83. Shand AW, Luk W, Nassar N, Hui L, Dyer K, Rawlinson W. Cytomegalovirus (CMV) infection and pregnancy-potential for improvements in Australasian maternity health providers' knowledge. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31:2515–20. doi:10.1080/14767058.2017.1344968.
84. Hughes BL, Gans KM, Raker C, Hipolito ER, Rouse DJ. A Brief Prenatal Intervention of Behavioral Change to Reduce the Risk of Maternal Cytomegalovirus: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol.* 2017;130:726–34. doi:10.1097/AOG.0000000000002216.
85. Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr.* 2004;145:485–91. doi:10.1016/j.jpeds.2004.05.041.
86. Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier A-G, Parent-du-Châtelet I, Senat M-V, Frydman R, Grangeot-Keros L. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy?: Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol.* 2009;46:S49-S53. doi:10.1016/j.jcv.2009.09.003.
87. Adler SP. Prevention of Maternal–Fetal Transmission of Cytomegalovirus. *EBioMedicine.* 2015;2:1027–8. doi:10.1016/j.ebiom.2015.08.004.
88. Inoue N, Abe M, Kobayashi R, Yamada S. Vaccine Development for Cytomegalovirus. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1045:271–96. doi:10.1007/978-981-10-7230-7_13.

89. Schleiss MR, Permar SR, Plotkin SA. Progress toward Development of a Vaccine against Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clinical and vaccine immunology* : CVI. 2017;24:e00268-17. doi:10.1128/CVI.00268-17.
90. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang M-L, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*. 2009;360:1191–9. doi:10.1056/NEJMoa0804749.
91. Bernstein DI, Callahan ST, Munoz-Rivas F, Rupp R, Edwards K, Stanberry LR, et al. 1113: Safety and Efficacy of a Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB) Vaccine in Adolescent Girls. *Open Forum Infectious Diseases*. 2014;1:S330-S330. doi:10.1093/ofid/ofu052.821.
92. Schampera MS, Schweinzer K, Abele H, Kagan KO, Klein R, Rettig I, et al. Comparison of cytomegalovirus (CMV)-specific neutralization capacity of hyperimmunoglobulin (HIG) versus standard intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations: Impact of CMV IgG normalization. *J Clin Virol*. 2017;90:40–5. doi:10.1016/j.jcv.2017.03.005.
93. Nigro G, La Torre R, Anceschi MM, Mazzocco M, Cosmi E v. Hyperimmunoglobulin therapy for a twin fetus with cytomegalovirus infection and growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:1222–6. doi:10.1016/S0002-9378(99)70620-4.
94. Negishi H, Yamada H, Hirayama E, Okuyama K, Sagawa T, Matsumoto Y, Fujimoto S. Intraperitoneal administration of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin to the cytomegalovirus-infected fetus. *J Perinatol*. 1998;18:466–9.
95. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*. 2005;353:1350–62. doi:10.1056/NEJMoa043337.
96. Buxmann H, Stackelberg OMv, Schlößer RL, Enders G, Gonser M, Meyer-Wittkopf M, et al. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J Perinat Med*. 2012;40:439–46. doi:10.1515/jpm-2011-0257.
97. Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Zech F, Hubinont C, Bernard P, Goubau P. Human cytomegalovirus in utero transmission: follow-up of 524 maternal seroconversions. *J Clin Virol*. 2010;47:201–2. doi:10.1016/j.jcv.2009.11.009.

98. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol.* 2011;52:244–6. doi:10.1016/j.jcv.2011.07.005.
99. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Engl J Med.* 2014;370:1316–26. doi:10.1056/NEJMoa1310214.
100. Hamprecht K, Kagan K-O, Goelz R. Hyperimmune globulin to prevent congenital CMV infection. *N Engl J Med.* 2014;370:2543. doi:10.1056/NEJMc1405377.
101. van Leeuwen E, Oude Rengerink K, Pajkrt E. Hyperimmune globulin to prevent congenital CMV infection. *N Engl J Med.* 2014;370:2543–4. doi:10.1056/NEJMc1405377.
102. Kagan KO, Enders M, Schampera MS, Baeumel E, Hoopmann M, Geipel A, et al. Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus after primary maternal infection in the first trimester by biweekly hyperimmunoglobulin administration. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53:383–9. doi:10.1002/uog.19164.
103. Chiaie LD, Neuberger P, Vochem M, Lihs A, Karck U, Enders M. No evidence of obstetrical adverse events after hyperimmune globulin application for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: experience from a single centre. *Arch Gynecol Obstet.* 2018;297:1389–95. doi:10.1007/s00404-018-4703-y.
104. A Randomized Trial to Prevent Congenital Cytomegalovirus (CMV) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01376778?cond=Cmv+Congenital&draw=2&rank=6>. Accessed 5 Nov 2019.
105. Schleiss MR. The Value of Hyperimmune Globulin (HIG) in Pregnancies Complicated by Cytomegalovirus Infection: A Continuing Saga. *Clin Infect Dis* 2019. doi:10.1093/cid/ciz1036.
106. Hughes B. LB17. Randomized Trial to Prevent Congenital Cytomegalovirus (CMV). *Open Forum Infectious Diseases.* 2019;6:S1000-S1001. doi:10.1093/ofid/ofz415.2500.
107. Blázquez-Gamero D, Galindo Izquierdo A, Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Izquierdo Méndez N, Soriano-Ramos M, et al. Prevention and treatment of fetal

- cytomegalovirus infection with cytomegalovirus hyperimmune globulin: a multicenter study in Madrid. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019;32:617–25. doi:10.1080/14767058.2017.1387890.
108. Codaccioni C, Vauloup-Fellous C, Letamendia E, Saada J, Benachi A, Vivanti AJ. Case report on early treatment with valganciclovir after maternal primary cytomegalovirus infection. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2019;48:287–9. doi:10.1016/j.jogoh.2019.01.003.
 109. Shahar-Nissan K, Pardo J, Peled O, Krause I, Bilavsky E, Wiznitzer A, et al. LB20. Valganciclovir to Prevent Vertical Transmission of Cytomegalovirus After Maternal Primary Infection During Pregnancy. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6:S1002-S1002. doi:10.1093/ofid/ofz415.2503.
 110. Nigro G, Adler SP, Gatta E, Mascaretti G, Megaloikonomou A, La Torre R, Necozone S. Fetal hyperechogenic bowel may indicate congenital cytomegalovirus disease responsive to immunoglobulin therapy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25:2202–5. doi:10.3109/14767058.2012.684111.
 111. Nigro G, Adler SP, Parruti G, Anceschi MM, Coclite E, Pezone I, Di Renzo GC. Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy--a case-control study of the outcome in children. *J Infect Dis.* 2012;205:215–27. doi:10.1093/infdis/jir718.
 112. Yamada H, Morizane M, Tanimura K, Morioka I, Ebina Y, Matsuda H, Yoshida M, Wakamatsu H, Furuya K, Murotsuki J, Saito S, Kawabata I, Takahashi Y, Ueda T, Sato Y, Kamitomo M, Maruyama Y, Hirano H, Yamada T, Minakami H, Yaegashi N, Minematsu T, Matsuoka R, Banzai M, Ikenoue T. A trial of immunoglobulin fetal therapy for symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Reprod Immunol.* 2012;95:73–9. doi:10.1016/j.jri.2012.05.002.
 113. Visentin S et al (Clin Infect Dis 2012; 55:497-503). *Clin Infect Dis.* 2012;55:1748. doi:10.1093/cid/cis829.
 114. Jückstock J, Rothenburger M, Friese K, Traunmüller F. Passive Immunization against Congenital Cytomegalovirus Infection: Current State of Knowledge. *Pharmacology.* 2015;95:209–17. doi:10.1159/000381626.
 115. Jacquemard F, Yamamoto M, Costa J-M, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A, et al. Maternal administration of valganciclovir in symptomatic intrauterine

- cytomegalovirus infection. *BJOG*. 2007;114:1113–21. doi:10.1111/j.1471-0528.2007.01308.x.
116. Leruez-Ville M, Ghout I, Bussières L, Stirnemann J, Magny J-F, Couderc S, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215:462.e1-462.e10. doi:10.1016/j.ajog.2016.04.003.
 117. De SM, Apicella M, De LC, D'Oria L, Valentini P, Sanguinetti M, et al. Valacyclovir in primary maternal CMV infection for prevention of vertical transmission: A case-series. *J Clin Virol* 2020. doi:10.1016/j.jcv.2020.104351.
 118. Kimberlin DW, Lin C-Y, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr*. 2003;143:16–25. doi:10.1016/S0022-3476(03)00192-6.
 119. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science*. 1994;266:1508–18.
 120. Weyerstahl T, Stauber M. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2013.
 121. Damsky CH, Fisher SJ. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: Faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:660–6.
 122. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21:3365–9. doi:10.1016/S0264-410X(03)00334-7.
 123. Ishikawa T, Takizawa T, Iwaki J, Mishima T, Ui-Tei K, Takeshita T, et al. Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2015;35:1273–89. doi:10.3892/ijmm.2015.2141.
 124. Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaidis KH, Schneider H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36:248–55.
 125. Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol*. 2005;13:164–74. doi:10.1016/j.tim.2005.02.009.

126. Gabrielli L, Bonasoni MP, Lazzarotto T, Lega S, Santini D, Foschini MP, et al. Histological findings in fetuses congenitally infected by cytomegalovirus. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 4:S16-21. doi:10.1016/j.jcv.2009.09.026.
127. Oliveira L de, Sass N, Boute T, Moron AF. sFlt-1 and PlGF levels in a patient with mirror syndrome related to cytomegalovirus infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;158:366–7. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.04.049.
128. Higgins L, Vause S, Tower C. Cytomegalovirus infection in association with early onset pre-eclampsia. *BMJ Case Rep* 2010. doi:10.1136/bcr.03.2010.2803.
129. Maidji E, Nigro G, Tabata T, McDonagh S, Nozawa N, Shiboski S, et al. Antibody treatment promotes compensation for human cytomegalovirus-induced pathogenesis and a hypoxia-like condition in placentas with congenital infection. *Am J Pathol.* 2010;177:1298–310. doi:10.2353/ajpath.2010.091210.
130. Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:499–506. doi:10.1016/S0002-9378(99)70239-5.
131. Cornelius DC. Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation. *Clin Med Insights Blood Disord.* 2018;11:1179545X17752325. doi:10.1177/1179545X17752325.
132. Zeisler H, Llorca E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2016;374:13–22. doi:10.1056/NEJMoa1414838.
133. Matthias Stefan Schampera. Characterization of hyperimmunoglobulins for prevention of maternofetal Cytomegalovirus transmission [Dissertation]. Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen; 2019.
134. Preisetanz S. Vergleich zellfreier und zellassoziierter HCMV-Mikroneutralisations-Testsysteme: Fibroblasten versus Epithelzellen [Diplomarbeit]. Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen; 03.2012.
135. Mikrogen GmbH. recomLine CMV IgG und IgM (Avidität): GARLCM001D gültig ab 2014-10.
136. Töpfer G. Elektrochemilumineszenz-Immunoassay. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* Berlin Germany: Springer; 2019. p. 761–762. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_981.

137. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Elecsys CMV IgG/IgM - Testbeschreibung Stand 2011. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-cmv-igg.html>. Accessed 17 Apr 2021.
138. Lukas Penka, Karl-Oliver Kagan, Rangmar Goelz, Klaus Hamprecht. Comparison of quantitative real-time PCR and short-term (18-hour) microculture in diagnosis of fetal cytomegalovirus infection: Impact of hyperimmunoglobulin treatment. *Prenat Diagn.* 2018;38:936–42. doi:10.1002/pd.5338.
139. Verloren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202:161.e1-161.e11. doi:10.1016/j.ajog.2009.09.016.
140. Penka L, Kagan K-O, Hamprecht K. Enhanced Serum Levels of sFlt1: Impact on Materno-Fetal CMV Transmission. *Journal of Clinical Medicine.* 2020;9:1258. doi:10.3390/jcm9051258.
141. Kagan KO, Hamprecht K, Hoopmann M. Prognosemodelle für intrauterine Infektionen anhand des Zytomegalievirus (CMV). *Gynäkologe.* 2020;53:813–20. doi:10.1007/s00129-020-04706-z.
142. Simpson S, Kaislasuo J, Guller S, Pal L. Thermal stability of Cytokines: A review. *Cytokine.* 2020;125:154829. doi:10.1016/j.cyto.2019.154829.
143. Gerna G, Sarasini A, Patrone M, Percivalle E, Fiorina L, Campanini G, et al. Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol.* 2008;89:853–65. doi:10.1099/vir.0.83523-0.
144. Schweinzer KM. Etablierung und Kalibrierung eines neuen HCMV-spezifischen Mikroneutralisationstestes : Einfluss von Fibroblasten und Epithelzellen als Targetzellen [Dissertation]. Tübingen: Universität Tübingen; 2014.
145. Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines (Basel)* 2019. doi:10.3390/vaccines7030070.
146. Klein M, Schoppel K, Amvrossiadis N, Mach M. Strain-Specific Neutralization of Human Cytomegalovirus Isolates by Human Sera. *Journal of Virology.* 1999;73:878–86.

147. Schampera MS, Arellano-Galindo J, Kagan KO, Adler SP, Jahn G, Hamprecht K. Role of pentamer complex-specific and IgG subclass 3 antibodies in HCMV hyperimmunoglobulin and standard intravenous IgG preparations. *Med Microbiol Immunol.* 2019;208:69–80. doi:10.1007/s00430-018-0558-x.
148. Cui X, Cao Z, Wang S, Lee RB, Wang X, Murata H, et al. Novel trimeric human cytomegalovirus glycoprotein B elicits a high-titer neutralizing antibody response. *Vaccine.* 2018;36:5580–90. doi:10.1016/j.vaccine.2018.07.056.
149. Rothe M, Pepperl-Klindworth S, Lang D, Vornhagen R, Hinderer W, Weise K, et al. An antigen fragment encompassing the AD2 domains of glycoprotein B from two different strains is sufficient for differentiation of primary vs. recurrent human cytomegalovirus infection by ELISA. *J Med Virol.* 2001;65:719–29. doi:10.1002/jmv.2096.
150. Kropff B, Landini MP, Mach M. An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J Med Virol.* 1993;39:187–95. doi:10.1002/jmv.1890390303.
151. Pagnon A, Piras F, Gimenez-Fourage S, Dubayle J, Arnaud-Barbe N, Hessler C, Caillet C. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cytomegalovirus infections during clinical trials of recombinant vaccines. *J Clin Virol.* 2017;96:99–104. doi:10.1016/j.jcv.2017.10.004.
152. Daiminger A, Schalasta G, Betzl D, Enders G. Detection of human cytomegalovirus in urine samples by cell culture, early antigen assay and polymerase chain reaction. *Infection.* 1994;22:24–8. doi:10.1007/bf01780759.
153. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res.* 2004;56:529–35. doi:10.1203/01.PDR.0000139483.35087.BE.
154. Monteiro S, Santos R. Enzymatic and viability RT-qPCR assays for evaluation of enterovirus, hepatitis A virus and norovirus inactivation: Implications for public health risk assessment. *J Appl Microbiol.* 2018;124:965–76. doi:10.1111/jam.13568.
155. Tabata T, Pettitt M, Fang-Hoover J, Zydek M, Pereira L. Persistent Cytomegalovirus Infection in Amniotic Membranes of the Human Placenta. *Am J Pathol.* 2016;186:2970–86. doi:10.1016/j.ajpath.2016.07.016.

156. Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG*. 2008;115:823–9. doi:10.1111/j.1471-0528.2008.01714.x.
157. Fabbri E, Revello MG, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG*. 2011;118:448–56. doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02822.x.
158. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T, Rizzo N. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:380.e1-7. doi:10.1016/j.ajog.2007.09.052.
159. Forner G, Saldan A, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay but Not CMV QuantiFERON Assay Is a Novel Biomarker To Determine Risk of Congenital CMV Infection in Pregnant Women. *J Clin Microbiol*. 2016;54:2149–54. doi:10.1128/JCM.00561-16.
160. Kwiatkowski S, Dolegowska B, Kwiatkowska E, Rzepka R, Marczuk N, Loj B, Torbè A. Maternal endothelial damage as a disorder shared by early preeclampsia, late preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Perinat Med*. 2017;45:793–802. doi:10.1515/jpm-2016-0178.
161. Pereira L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu Rev Virol*. 2018;5:273–99. doi:10.1146/annurev-virology-092917-043236.
162. Olink. C-C motif chemokine 25 (CCL25). <https://www.olink.com/products/inflammation/biomarkers/?biomarkerId=551>. Accessed 14 Aug 2020.
163. Jeong W, Bae H, Lim W, Bazer FW, Song G. Differential expression and functional roles of chemokine (C-C motif) ligand 23 and its receptor chemokine (C-C motif) receptor type 1 in the uterine endometrium during early pregnancy in pigs. *Developmental and comparative immunology* 2017. doi:10.1016/j.dci.2017.07.007.
164. Cowell W, Colicino E, Lee AG, Bosquet Enlow M, Flom JD, Berin C, et al. Data-driven discovery of mid-pregnancy immune markers associated with maternal lifetime stress: results from an urban pre-birth cohort. *Stress*. 2020;23:349–58. doi:10.1080/10253890.2019.1686612.

165. Kaukola T, Ojaniemi M, Tuimala J, Herva R, Saarela T, Kingsmore SF, Hallman M. Cord blood chemokines differentiate between spontaneous and elective preterm births in singleton pregnancies. *Cytokine*. 2011;54:85–91. doi:10.1016/j.cyto.2011.01.002.
166. Solders M, Gorchs L, Tiblad E, Gidlöf S, Leeansyah E, Dias J, et al. Recruitment of MAIT Cells to the Intervillous Space of the Placenta by Placenta-Derived Chemokines. *Front Immunol*. 2019;10:1300. doi:10.3389/fimmu.2019.01300.
167. Kolialexi A, Tsangaris GT, Sifakis S, Gourgiotis D, Katsafadou A, Lykoudi A, et al. Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early-onset preeclampsia. Expert review of proteomics 2017. doi:10.1080/14789450.2017.1291345.
168. Rabe T, Lazar K, Cambroner C, Goelz R, Hamprecht K. Human Cytomegalovirus (HCMV) Reactivation in the Mammary Gland Induces a Proinflammatory Cytokine Shift in Breast Milk. *Microorganisms* 2020. doi:10.3390/microorganisms8020289.
169. Kim CJ, Romero R, Chaemsathong P, Kim J-S. Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213:S53-69. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.041.
170. Scott GM, Chow SSW, Craig ME, Pang CNI, Hall B, Wilkins MR, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory Cytokine bias in placenta and amniotic fluid. *J Infect Dis*. 2012;205:1305–10. doi:10.1093/infdis/jis186.
171. Keelan JA, Yang J, Romero RJ, Chaiworapongsa T, Marvin KW, Sato TA, Mitchell MD. Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 is present in fetal membranes and amniotic fluid at increased concentrations with intra-amniotic infection and preterm delivery. *Biol Reprod*. 2004;70:253–9. doi:10.1095/biolreprod.103.016204.
172. Kovács IJ, Hegedus K, Pál A, Pusztai R. Production of proinflammatory Cytokines by syncytiotrophoblasts infected with human cytomegalovirus isolates. *Placenta*. 2007;28:620–3. doi:10.1016/j.placenta.2006.09.008.
173. Jacobsson B, Holst R-M, Andersson B, Hagberg H. Monocyte chemotactic protein-2 and -3 in amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic

- cavity, intra-amniotic inflammation and preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84:566–71. doi:10.1111/j.0001-6349.2005.00830.x.
174. Momma Y, Nagineni CN, Chin MS, Srinivasan K, Detrick B, Hooks JJ. Differential expression of chemokines by human retinal pigment epithelial cells infected with cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2026–33. doi:10.1167/iops.02-0980.
175. Lee SM, Park JS, Norwitz ER, Oh S, Kim EJ, Kim SM, et al. Mid-trimester amniotic fluid pro-inflammatory biomarkers predict the risk of spontaneous preterm delivery in twins: a retrospective cohort study. *J Perinatol* 2015. doi:10.1038/jp.2015.29.
176. Helmo FR, Alves EAR, Moreira RAdA, Severino VO, Rocha LP, Monteiro MLGDR, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31:1227–33. doi:10.1080/14767058.2017.1311318.
177. Shen P, Gong Y, Wang T, Chen Y, Jia J, Ni S, et al. Expression of osteoprotegerin in placenta and its association with preeclampsia. *PLoS ONE.* 2012;7:e44340. doi:10.1371/journal.pone.0044340.
178. Tomlinson MS, Lu K, Stewart JR, Marsit CJ, O'Shea TM, Fry RC. Microorganisms in the Placenta: Links to Early-Life Inflammation and Neurodevelopment in Children. *Clin Microbiol Rev* 2019. doi:10.1128/CMR.00103-18.
179. Marchioro AA, Colli CM, Souza CZ de, da Silva SS, Tiyo BT, Evangelista FF, et al. Analysis of Cytokines IFN- γ , TNF- α , TGF- β and nitric oxide in amniotic fluid and serum of pregnant women with toxoplasmosis in southern Brazil. *Cytokine.* 2018;106:35–9. doi:10.1016/j.cyto.2018.02.023.
180. Olink. Tumor necrosis factor (TNF). <https://www.olink.com/products/inflammation/biomarkers/?biomarkerId=529>. Accessed 17 Jan 2021.
181. Olink. Interferon gamma (IFN-gamma). <https://www.olink.com/products/inflammation/biomarkers/?biomarkerId=544>. Accessed 17 Jan 2021.
182. Olink. Olink Target 96 Inflammation. <https://www.olink.com/products/inflammation/>. Accessed 14 Aug 2020.

183. The UniProt Consortium. UniProt Knowledgebase: ID-Numbers: Q16552; Q9UHF4; P60568; Q969D9; Q13291; P12034; P35225; P01375; Q9NYY1; O95760; P01579; P05112; P05113. <https://www.uniprot.org/uniprot/>. Accessed 14 Aug 2020.
184. Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl.* 2015;9:406–22. doi:10.1002/prca.201400130.
185. GfV Tagung 2P, editor. High HCMV viral load in chronic seminal shedding of a latently infected semen donor: impact on extension of diagnostic methods and formalities.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht durchgeführt.

Die Konzeption sämtlicher Untersuchungen erfolgte zusammen mit Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht als Leiter des Konsiliarlabors für Cytomegalievirusinfektionen am Standort Tübingen.

Die Versuche zur Neutralisationskapazität der Serum- und Fruchtwasserproben wurden nach Einarbeitung durch Labormitglied Mathias Schampera von mir eigenständig durchgeführt. Die Bestimmung HCMV-spezifischer Antikörperprofile wurde nach Einarbeitung durch Labormitglied Veronique Baudy von mir eigenständig durchgeführt. Dabei wurden bereits zuvor erhobene Daten mit ausgewertet (Anteil 50 %). Die Kurzzeitkultur und real-time PCR zur CMV-Quantifikation wurden durch Labormitglied Andrea Baumeister durchgeführt. Die Bestimmungen von sFlt1 und PIGF aus Serum- und Fruchtwasserproben wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Probengewinnung wurde von Karl-Oliver Kagan durchgeführt. Die Daten zum Outcome der Feten bzw. Neugeborenen stammen von Rangmar Goelz. Die Daten wurden von mir eigenständig ausgewertet und aufbereitet. Die Manuskripte der Publikationen wurden von mir erstellt und von Klaus Hamprecht, Karl Oliver Kagan und Rangmar Goelz korrigiert. Die Multiplex Untersuchung erfolgte durch einen externen Dienstleister (Fa. Olink, Uppsala), wobei sämtliche vor- und nachbereitenden Maßnahmen von mir eigenständig durchgeführt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig. Für die Publikationen zur Quantifikation der HCMV-Viruslast in Fruchtwasser und der Rolle von sFlt1 und PIGF als Biomarker der diaplazentaren HCMV-Transmission erfolgte jeweils eine Beratung durch das Institut für Biometrie.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Lukas Penka

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Penka, L., Kagan, K-O, Goelz, R, Hamprecht, K. Comparison of quantitative real-time PCR and short-term (18-hour) microculture in diagnosis of fetal cytomegalovirus infection: Impact of hyperimmunoglobulin treatment. *Prenatal Diagnosis*. 2018; 38: 936–942.

Penka L, Kagan K-O, Hamprecht K. Enhanced Serum Levels of sFlt1: Impact on Materno-Fetal CMV Transmission. *J Clin Med*. 2020 Apr 26;9(5):1258.

Vortrag- und Posterbeiträge:

Lukas E. M. Penka, Karl Oliver Kagan, Klaus Hamprecht. HCMV-specific neutralizing antibodies in amniotic fluid from women with primary HCMV-infection; **Posterbeitrag** zum 28. Jahresmeeting der Gesellschaft für Virologie und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten; 14. März – 17. März 2018, Würzburg

Lukas E. M. Penka, Karl Oliver Kagan, Klaus Hamprecht. Changed expression of angiogenic factors following HCMV-vertical transmission - Results from serum and amniotic fluid; **Posterbeitrag** zum European Congenital Cytomegalovirus Initiative (ECCI) – Jahresmeeting; 13. Mai bis 15. Mai 2018, Brüssel

Lukas E. M. Penka. Changed expression of angiogenic factors following HCMV-vertical transmission - Results from serum and amniotic fluid; **Vortrag** beim European Congenital Cytomegalovirus Initiative (ECCI) – Jahresmeeting; 13. Mai bis 15. Mai 2018, Brüssel

Dieses Promotionsvorhaben wurde durch ein Promotionsstipendium über das IZKF Promotionskolleg Tübingen, Nr. 2017-1-25; Bewilligung vom 09.02.2017, gefördert.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Doktorvater und Mentor. Klaus Hamprecht hat die Forschung rund um CMV und damit den Schutz derer, die sich noch nicht selbst schützen können, in den Mittelpunkt seines professionellen Handelns gestellt. Er dient mir für meinen ärztlichen Werdegang als großes Vorbild.

Ebenso danke ich meinen Mitstreitern im virologischen Institut für den professionellen Austausch, das eine oder andere kritisch-konstruktive Wort und die wunderbare Einarbeitung. Insbesondere Katrin Lazar und Matthias Schampera standen mir jederzeit mit Rat zur Seite.

Durch meine Teilnahme am IZKF Promotionskolleg wurde ich intensiv an die Praxis der guten wissenschaftlichen Praxis herangeführt. Inka Montero hat das Kolleg maßgeblich mitgeprägt und gestaltet. Ihr gebührt mein Dank für viele kleine wissenschaftlich Impulse meine eigene Arbeit betreffend.

Abschließend möchte ich den Gedanken der Widmung aufgreifen, dass diese Arbeit ohne die unermüdliche Unterstützung meiner Familie nicht zustande gekommen wäre.