

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie und
der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie/ Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Die Immunantwort auf Virus-Infektion der Herpesgruppe bei Kindern als potentieller
Modulator der menschlichen Allergieentwicklung**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Nora Laske

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
2. Prof. Dr. med. H. Renz
3. Prof. Dr. med. K.-Ch. Bergmann

Datum der Einreichung: 22. Februar 2000
Datum der Promotion: 12. Dezember 2000

INHALTSVERZEICHNIS

2.	EINLEITUNG	3
2.1.	ATOPISCHE ERKRANKUNGEN (79a)	3
2.1.1.	Atopische Dermatitis	9
2.1.2.	Asthma bronchiale (79e)	10
2.1.3.	Rhinokonjunktivitis (79d)	11
2.2.	VIRALE INFEKTIONEN	12
2.2.1.	Cytomegalie-Virus CMV	13
2.2.2.	Epstein-Barr-Virus EBV	15
2.2.3.	Varizella-Zoster-Virus VZV	17
2.3.	Hypothese der vorliegenden Studie	19
3.	METHODEN UND MATERIAL	20
3.1.	Humorale Immunantwort und Atopie	20
3.1.1.	Patientenauswahl und Studiendesign	20
3.2.2.	Methoden	25
3.1.3.	Material	26
3.2.	T-Zell-Reaktivität nach CMV-spezifischer Stimulation und Atopie	27
3.2.1.	Patientenauswahl und Studiendesign	27
3.2.2.	Methoden	29
3.2.3.	Material	38
3.3.	Statistische Signifkanz	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	Humorale Immunantwort und Atopie	42
4.1.1.	Häufigkeitsverteilungen	42
4.1.2.	ELISA-(enzyme-linked immunosorbent assay)-Virus-spezifisches IgG	47
4.1.3.	Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay-spezifisches CMV-IgE	54
4.2.	T-Zell-Reaktivität und Atopie	55

4.2.1.	Häufigkeitsverteilungen	55
4.2.2.	T-Zell-Reaktivität nach CMV-Stimulation	57
5.	DISKUSSION	59
5.1.	Humorale Immunantwort und Atopie	59
5.2.	T-Zell-Reaktivität und Atopie	62
5.3.	Hypothese der vorliegenden Studie	64
6.	ZUSAMMENFASSUNG	71
7.	LITERATURVERZEICHNIS	72
8.	ANHANG	80
8.1.	Abbildungsverzeichnis	80
8.3.	Danksagung	84
8.4.	Lebenslauf	85
8.5.	Erklärung an Eides Statt	87

2. EINLEITUNG

2.1. ATOPISCHE ERKRANKUNGEN (79a)

Der Begriff „Atopie“ wurde erstmalig von Coca und Cooke 1923 als klinisches Bild einer Überempfindlichkeitsreaktion bzw. einer allergischen Reaktion vom Typ I beschrieben. Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I nach Coombs und Gell werden B-Zellen zur Bildung von spezifischem IgE mit T-Zell-Hilfe angeregt (60a). Dieses antigenspezifische IgE bindet über Fc-Rezeptoren an Mastzellen, wodurch diese sensibilisiert werden. Beim nächsten Antigenkontakt mit der sensibilisierten Mastzelle wird das gebundene IgE kreuzvernetzt, und die Zelle degranuliert unter Freisetzung von Mediatoren, welche die bekannten Symptome wie Asthma, Heuschnupfen oder atopisches Ekzem hervorrufen.

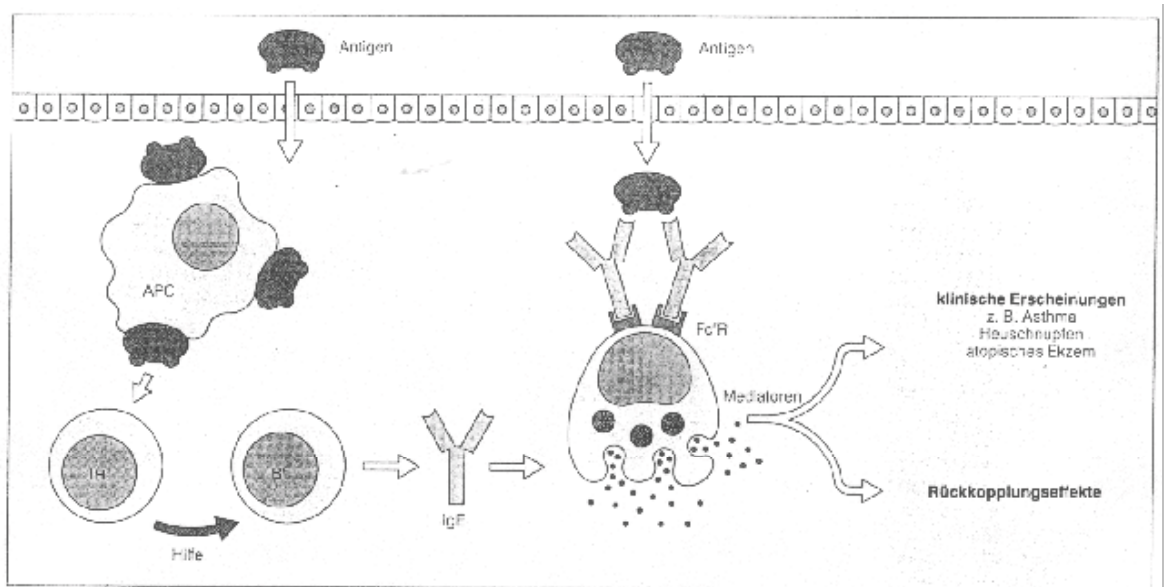


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion (60a)

Bei der durch IgE vermittelten allergischen Reaktion lassen sich eine frühe und eine späte Phase unterscheiden. Die *Sofortreaktion* beruht auf der Wirkung von Histamin und anderen, von den Mastzellen ausgeschütteten, schnell metabolisierten Effektoren. Die Entzündungseffekte von Histamin erklären sich aus seinen pharmakologischen Eigenschaften, die über H1-Rezeptoren auf Blutgefäße, glatte Muskulatur und die Oberfläche von Schleimhäuten einwirken. Die *Spätreaktion* wird durch eingewanderte inflammatorische Leukocyten hervorgerufen, die durch Chemokine und andere von den Mastzellen während oder nach der Sofortreaktion freigesetzte Mediatoren angelockt werden. Immunologisch wird die verstärkte IgE-Bildung bei der Atopie durch ein Überwiegen der TH2-Immunantwort gesteuert, bei partieller Unterdrückung der TH1-Immunantwort (60a).

Die Immunantwort gegen Viren und gewisse intrazelluläre Bakterien ist durch die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität und die Sekretion von IFN-gamma und TNF-alpha gekennzeichnet. Diese Zytokine werden von Typ 1-T-Zellen produziert. Im Gegensatz dazu ist die Abwehr gegen extrazellulär gelegene Pathogene durch die Bildung der Zytokine IL4 charakterisiert, welche zur Synthese neutralisierender Antikörper Anlaß geben. T-Zellen mit einem solchen Zytokinprofil werden Typ 2-T-Zellen genannt. Die Dichotomie in Typ 1- und Typ 2-T-Zellen ist wohl typisch für CD4+-Lymphozyten, kann aber auch in der Population der CD8+-T-Zellen nachgewiesen werden. Als Typ 1 werden deshalb TH1-CD4+- oder Tc1-CD8+-Lymphozyten bezeichnet, welche IFN-gamma, IL2 und TNF-beta sezernieren. In Analogie werden Typ 2 TH2-CD4+-oder Tc2-CD8+-Lymphozyten definiert, die typischerweise die Zytokine IL4, IL5, IL6, IL10 und IL13 bilden. Als Hauptaufgabe von TH1-Zellen gilt die Aktivierung von Makrophagen durch Hochregulation von CD40, CD80, CD86, MHC-Klasse-II-Molekülen und TNF-Rezeptoren, die Induktion der NO-Synthetase, die Bildung von Sauerstoffradikalen und die Sekretion von Zytokinen einschließlich IL12. Die antigenspezifische Hilfe der TH2-Zellen führt zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der B-Zellen, Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und integriert dadurch die Funktion der einzelnen Effektorzellen zu einer gemeinsamen Immunantwort. So fördern IL4, IL6, IL10 und IL13 die Sekretion von Immunglobulinen, und IL4 führt insbesondere zur Bildung von IgE, das besonders über FcEpsilonRI und CD23 an Mastzellen und basophile und eosinophile Granulozyten gebunden wird. IL4 und IL10 wirken auch hemmend auf die Polarisierung von naiven T-Zellen zu Typ 1-Effektorzellen. Entgegen der Funktion von Typ 1-Zellen verhindern Typ 2-Zellen durch Sekretion von IL4 die Aktivierung von Makrophagen und über IL10 die Bildung von IFN-gamma in T-Zellen und Makrophagen. Beide Zelltypen stammen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle ab. Ob die Entwicklung dabei über eine IL2, IFN-gamma und IL4 sezernierende Typ 0-Zelle als Zwischenstufe erfolgt, ist zur Zeit noch umstritten. IL12 hat keine direkte Wirkung auf die Polarisierung naiver T-Zellen zu TH2-Zellen. Diese Differenzierung wird jedoch durch IL4 sezernierende Zellen reguliert, denn die Gegenwart von anti-IL4-Antikörpern hemmt die Differenzierung zu TH2-Zellen. IFN-gamma und IL12 fördern die Ausbildung von TH1-Effektorzellen. Dabei nimmt IL12 auf die Differenzierung direkt Einfluß während IFN-gamma über die Hemmung der TH2-Polarisierung wirkt, denn der Mangel an IL4 ist für die TH1-Differenzierung förderlich (79a).

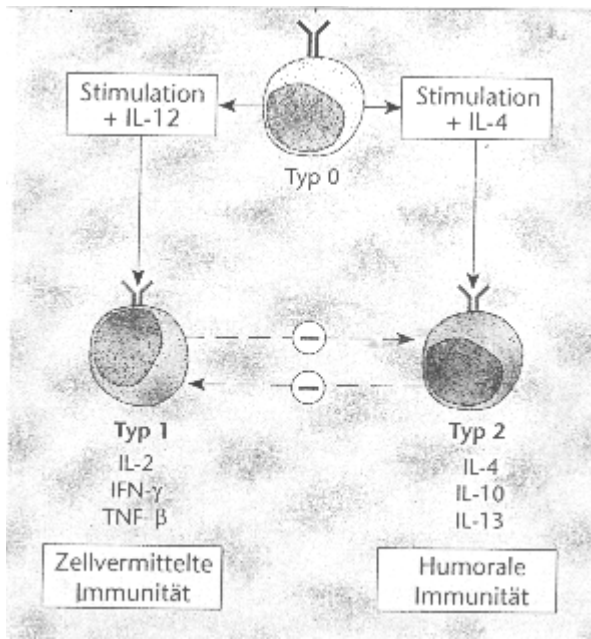


Abbildung 2: Die Differenzierung der Typ 1- und Typ 2-T-Zellen (79a)

Zu den klassischen atopischen Erkrankungen zählen das atopische Ekzem, das Asthma bronchiale und die Rhinokonjunktivitis. Es besteht für alle diese Manifestationsformen des Atopiesyndroms ein typischer Altersgipfel. Die atopische Dermatitis wird in etwa 40% von einer saisonalen Rhinitis, in weiteren 25% jeweils von einer perennialen Rhinitis oder einem Asthma bronchiale gefolgt. Spezifische Antikörper gegen inhalative Allergene sind dabei häufig bereits vor der klinischen Manifestation nachweisbar (79b).

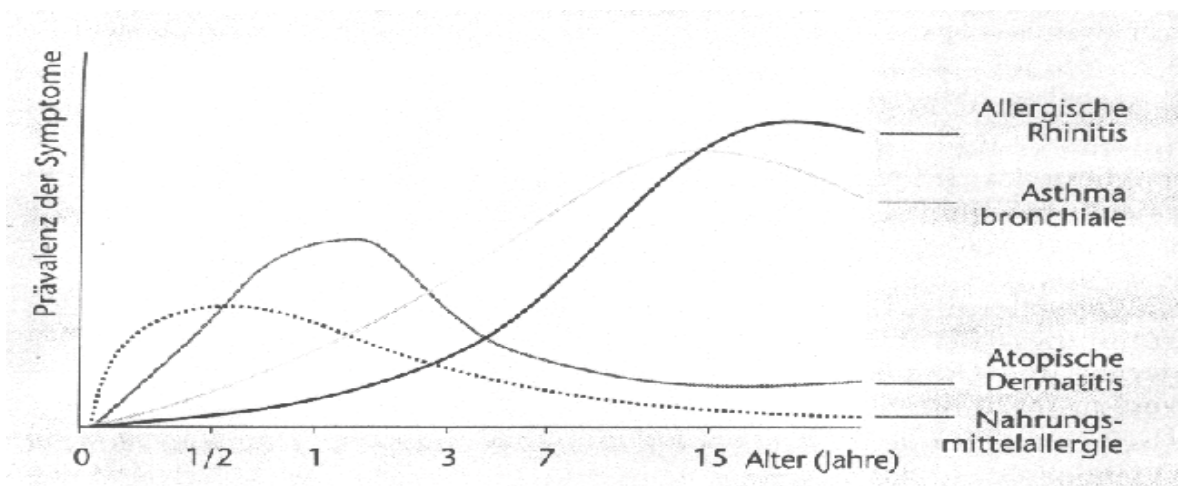


Abbildung 3: Häufigkeit der Manifestationsformen des Atopiesyndroms in verschiedenen Lebensaltern (79b).

Epidemiologie

Es wird heute von einer Häufigkeitsverteilung der atopischen Dermatitis von etwa 14% unter deutschen Schulkindern ausgegangen. Die Häufigkeit der allergischen Rhinitis bei Kindern jünger als 4 Jahre liegt unter 5%, sie steigt im Schulalter an und beträgt im frühen Erwachsenenalter ca. 20% (58,18,74). Die Untersuchungsergebnisse zahlreicher Studien deuten darauf hin, daß das Asthma bronchiale und andere atopische Erkrankungen in ländlichen Gebieten von Entwicklungsländern, im Vergleich zu westlichen Industrieländern weniger häufig vorkommen (84). Es konnte gezeigt werden, daß in Papua-Neuguinea Asthma bei Kindern und Jugendlichen kaum zu finden war. Erstaunlicherweise war jedoch die Häufigkeit von Infekten der oberen Atemwege annähernd 4mal so groß, wie in Großbritannien (79b). Innerhalb Europas existiert ein deutlicher Ost-West-Gradient. Eine besondere Situation innerhalb der Beschäftigung mit dem Phänomen Allergie bot sich im Rahmen der deutschen Wiedervereinigung. Es zeigte sich, daß in Westdeutschland die Prävalenz des Heuschnupfens (8,6% versus 2,7%, $p < 0,0001$); des Asthma bronchiale (9,3% versus 7,2%, $p < 0,05$) und der bronchialen Hyperreagibilität (8,3% versus 5,5%, $p < 0,001$) bei 9 bis 11 Jahre alten Schulkindern signifikant höher als in Ostdeutschland ist. Die Häufigkeit der atopischen Sensibilisierung gemessen am Haut-Pricktest ist bei ostdeutschen Kindern wesentlich niedriger als bei westdeutschen Kindern (18,2% versus 36,7%, $p < 0,001$), (75). In ähnlicher Weise wurde eine geringere Prävalenz der atopischen Sensibilisierung bei Kindern im Alter von 10 bis 12 Jahren in Estland und Polen im Vergleich zu Schweden (13,6% versus 30,3%, $p < 0,001$) gefunden (79b). Die Erfassung allergischer Manifestationen unter 25- bis 69-Jährigen in Ost- und Westdeutschland ergab, daß auch unter den Erwachsenen deutliche Unterschiede bestehen. Sowohl die Positivität im Prick-Test, als auch die klinische Atopie traten in der Gruppe der unter 45-Jährigen häufiger in Westdeutschland auf (53). Es konnte aber auch gezeigt werden, daß sich die Häufigkeiten atopischer Erkrankungen in den Jahren nach der Vereinigung im Osten und im Westen Deutschlands kontinuierlich angleichen. Die Prävalenz von Heuschnupfen nahm von 2,3% auf 5,1% zu, die Prävalenz von atopischer Sensibilisierung stieg von 19,3% auf 26,7% (76).

Risikofaktoren

Familiäre Prädisposition

Die positive Familienanamnese ist stark mit einem erhöhten Risiko für atopische Erkrankungen, vor allem für das Asthma bronchiale, verbunden (11). In einer Studie unter 1480 7- bis 9-jährigen schwedischen Zwillingspärchen zeigte sich eine Manifestationsvarianz der atopischen Erkrankungen Asthma, Heuschnupfen, Ekzem und Urtikaria im Hinblick auf den genetischen Effekt von 33-76%.

Allergenexposition und Ernährung

Es ist hinreichend belegt, daß im Kindesalter mit steigender Exposition gegenüber Innenraumallergenen (z.B. Hausstaubmilbenkot, Katzenhaare) das Risiko, einer entsprechenden Sensibilisierung, insbesondere bei genetisch prädisponierten Individuen steigt (59). Die Verbannung von Allergenen aus dem Haushalt scheint wirksam, im Hinblick auf die mögliche Prävention einer Sensibilisierung (78). Hinsichtlich der Ernährung, scheint das Stillen einen vorübergehenden, protektiven Effekt auf die Inzidenz der atopischen Dermatitis, der Nahrungsmittelallergie und frühkindlicher obstruktiver Bronchitiden zu haben (79b). Der präventive Effekt einer mütterlichen allergenfreien Diät während der Schwangerschaft und das damit verbundene geringere Risiko einer frühen Exposition mit Nahrungsmittelallergenen konnte bisher nicht ausreichend belegt werden (27).

Luftschadstoffe

In Regionen mit hoher Schadstoffkonzentration in Ostdeutschland und Polen war die Prävalenz des Asthma, der bronchialen Hyperreaktivität, des Heuschnupfens und der atopischen Dermatitis niedriger als in Gebieten in Westdeutschland und Schweden, die weniger mit Schadstoffen belastet waren (34,35). Andererseits fand sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten atopischer Manifestationen und Nähe zu stark befahrenen Straßen (59). Inwieweit dies auf eine vermehrte Ruß- und Deselexposition oder eine verstärkte Feinstaubexposition zurückzuführen ist, ist noch unklar (79b). Der Stellenwert des Faktors „mütterliches Rauchen“ während und nach der Schwangerschaft wurde in zahlreichen Studien untersucht. Kinder, die in den ersten drei Lebensjahren, pre- und postnatal passivem Rauch ausgesetzt waren, hatten ein höheres Risiko für eine Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmittelallergenen (40,41).

Sozialfaktoren und frühkindliche Infekte

Neben Sozialstatus und elterlichem Bildungsgrad wird die Familiengröße als Einflußfaktor der Allergieentstehung diskutiert (34,36,59). Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Anzahl der Geschwister und Prävalenz von Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung feststellen (8,25,40,41). Die Vermutung lag nahe, daß eine vermehrte frühkindliche Exposition gegenüber viralen und bakteriellen Infekten der Manifestation atopischer Erkrankungen vorbeugen könnte (9). Gerade im Hinblick auf die epidemiologischen Vergleichsstudien zwischen Ost- und Westdeutschland erscheint diese Hypothese sehr interessant. Einerseits lagen die Impfraten in Ostdeutschland wesentlich höher als in Westdeutschland. Andererseits sorgte die Betreuung und der damit enge Kontakt der Kinder in Kindertagesstätten (Kinderkrippe, Kindergarten) für einen hohen „Durchseuchungsgrad“ (59). Den immunologischen Hintergrund für die Hypothese, daß frühkindliche Virusinfektionen der Entstehung von atopischen Erkrankungen vorbeugen können, erklärt man vereinfacht wie folgt. Es kann das Vorliegen zweier T-Helferpopulationen angenommen

werden. TH2-Zellen fördern die IgE-Produktion. Im Gegensatz dazu unterdrücken TH1-Zellen und ihre Zytokine, vor allem das IFN-gamma die Funktion der TH2-Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß das IFN-gamma, welches u.a. im Verlauf viraler Infektionen gebildet wird, ein starker Inhibitor vieler TH2-Zellfunktionen und somit der IgE-Synthese ist. Viele virale Infekte sind lange Zeit als Wegbereiter des kindlichen Asthma bronchiale angesehen worden. Zweifelsohne sind sie potente Auslöser, wenn das Asthma erst einmal manifest ist (79b). Der Nachweis des Influenzavirus war bei Patienten mit exazerbiertem Asthma höher (10-30%), als bei den gleichen Patienten während asymptomatischer Perioden (3%). Bronchiale Hyperreagibilität wurde nach Influenza-Impfung beobachtet (50). Auch andere Viren können in prädisponierten Atopikern eine inflammatorische Antwort des Respirationstraktes induzieren (81). Im Tierversuch kam man zu ähnlichen Ergebnissen. So wurde der Zusammenhang zwischen Infektionen mit dem „respiratory syncytial virus“ und einer allergischen Sensibilisierung gegenüber Ovalbumin im Meerschweinchen analysiert. Das „respiratory syncytial virus“ bewirkte die Produktion von Ovalbumin-spezifischem IgG1 mit Zunahme der Atemwegshyperreagibilität bzw. Atemwegsentzündung (13). In einer Studie von Säuglingen mit nachgewiesener, klinisch manifester RSV-Bronchiolitis wurde im Alter von 3 Jahren ein signifikant häufigeres Auftreten von obstruktiven Bronchitiden und eine höhere Sensibilisierungsrate auf alimentäre und inhalative Allergene gezeigt. Es ist jedoch unklar, ob dies auf einer Prädisposition für Asthma, die mit einer frühen Sensibilisierung einhergeht, beruht und eine größere Empfänglichkeit von Asthmatikern für virale Infekte widerspiegelt. Dieses „Henne-Ei“-Problem erschwert, einer bestimmten Variablen die Bedeutung eines Prädiktors oder eines Risikofaktors zuzuschreiben (79b).

2.1.1. Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine chronisch bzw. chronisch-rezidivierend verlaufende, entzündliche Hauterkrankung, die gekennzeichnet ist, durch starken Juckreiz, Erythem, Papel, Schuppung, Lichenifikation, Akanthose, Parakeratose und lymphozytäre Infiltration (4).

Pathogenese (79f)

Es finden sich neben der atopischen Disposition eine gestörte Immunregulation, vegetative Dysregulation, Lipiddefekte, trockene Haut und erhöhte IgE-Bildung, sowie Allergien auf Nahrungsmittel und Aeroallergene. Zudem spielen psychosomatische Faktoren eine entscheidende Rolle. Die zahlreichen immunologischen Veränderungen lassen sich grob auf einen Nenner bringen. Eine abnormale, teilweise defekte zelluläre Immunantwort und eine überschießend starke Immunantwort vom Soforttyp. Diese beiden scheinbar widersprüchlichen Aktivitäten des Immunsystems könnten durch die zwei unterschiedlich wirksamen T-Helfer-Lymphozyten (TH1 und TH2) erklärt werden. TH1-Zellen vermitteln die klassische verzögerte, zelluläre Immunantwort, produzieren IL2, TNF-alpha sowie IFN-gamma und wirken negativ regulierend auf die TH2-Zellen. Letztere setzen bevorzugt die Interleukine 4, 5, 10 und 13 frei. IL4 und IL13 stimulieren die IgE-Synthese, während IL5 die Entwicklung und Funktion der Eosinophilen beeinflusst und IL10 wiederum TH1-Zellen inhibiert. Ebenfalls von besonderer pathogenetischem Interesse ist die Beobachtung, daß auch epidermale Langerhans-Zellen den hochaffinen IgE-Rezeptor FcEpsilonRI exprimieren und beim atopischen Ekzem auch vermehrt IgE an ihrer Oberfläche tragen. Damit könnten Langerhans-Zellen bei Hautkontakt mit typischen Inhalationsallergenen auch eine ekzematöse Entzündungsreaktion auslösen. Mehrere klinische Besonderheiten geben einen Hinweis auf die Veränderungen des Immunsystems beim atopischen Ekzem. Die Krankheit spricht auf Immunmodulatoren wie Cyclosporin A an. Die Haut der Patienten neigt zu Sekundärinfektionen (Viren, Bakterien, Pilze). Bei 90% der Patienten besteht eine Besiedlung mit *Staphylococcus aureus*. Dabei können bakterielle Stoffwechselprodukte (Endotoxin) als Superantigene fungieren und eine Ekzeberation bewirken, häufig sind zusätzlich IgE-spezifische Antikörper gegen *Staphylococcus aureus* nachweisbar (29).

2.1.2. Asthma bronchiale (79e)

Das Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung des Kindesalters. Das Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, begleitet von einer ausgedehnten, aber variablen Atemwegsobstruktion. Klinische Leitsymptome des Asthma bronchiale sind ein expiratorisches Giemen und Brummen, Atemnot, eine expiratorische Dyspnoe und/ oder Husten. Die Symptome werden bedingt durch eine Einengung des Bronchialsystems, an der in unterschiedlichem Ausmaß ein Spasmus der Bronchialmuskulatur, eine ödematöse Schwellung der Schleimhaut und eine Dyskrinie, d.h. eine vermehrte Produktion eines viskösen Schleims, beteiligt sind. Dabei führt eine Zunahme von freiem intrazellulären Calcium über einen transmembranären Calcium-Einstrom oder eine Freisetzung aus den Speicher-Pools (endoplasmatisches Retikulum, Zellmembran) zu einer Kontraktion der Bronchialmuskelzelle. Berücksichtigt man die pathogenetischen Gesichtspunkte, so ist die Einteilung in extrinsisches und intrinsisches Asthma am gebräuchlichsten. Obwohl im Kindesalter die extrinsisch-atopische Genese des Asthmas am häufigsten ist, kommt es auf dem Boden der Atopie und der durch sie bedingten Hyperreagibilität auch immer zu Bronchokonstriktionen, die durch nicht-atopische Faktoren ausgelöst werden können. Trotz einer primären Atopie besteht somit nahezu bei allen Fällen eine Asthmamischform.

Epidemiologie

Eine relativ aktuelle Untersuchung aus Deutschland gibt eine Lebenszeitprävalenz für Asthma bronchiale von 7,3% für Leipziger und 9,3% für Münchner Kinder zwischen 9 und 11 Jahren an. Das männliche Geschlecht zeigt in den ersten 10 Jahren eine eindeutig stärkere Prävalenz von etwa 2:1. Nach der Pubertät zeigt ein Teil der Patienten eine Abnahme der Asthmasymptomatik, und das Verhältnis der Geschlechter liegt bei 1:1.

Atemwegsinfekte und obstruktive Bronchitiden

Welche Rolle Virusinfektionen, die zu einer obstruktiven Säuglingsbronchitis führen können (z.B. Parainfluenza-, Adeno- und RS-Viren), bei der Entstehung des Asthma bronchiale spielen, ist derzeit Gegenstand lebhafter Diskussionen. Einerseits kann eine Virusinfektion zu einer Epithelschädigung führen, die eine bronchiale Hyperreagibilität auslösen bzw. verstärken kann. Andere Befunde deuten daraufhin, daß eine atopische Veranlagung zu einer Bereitschaft für Atemwegsinfekte mit „asthmogenen“ Viren disponiert. Angeregt durch die Untersuchungsergebnisse der epidemiologischen Vergleichsstudien zur Häufigkeitsverteilung atopischer Erkrankungen in Ost- und Westdeutschland wird hypothetisch diskutiert, ob Kinder in Leipzig, die in der Regel schon früh Kindertagesstätten besuchten und zahlreiche Atemwegsinfekte durchmachten, durch die Prävalenz einer TH1-Reaktionsbereitschaft gegenüber einer TH2-Reaktion als Folge rezidivierender Infekte, vor der Entwicklung eines Asthma bronchiale geschützt wurden.

Genetische Aspekte

Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen konzentrieren sich großangelegte Familienstudien auf chromosomale Regionen, die Kandidatengene enthalten, welche durch ihren Einfluß auf den IgE-Stoffwechsel für den Atopiestatus von Bedeutung sein könnten: z.B. HLA-10 System (6q21.3), IgE-Rezeptor (11q13) und Interleukine (5q31). Bekannt sind Polymorphismen, die den IL4-Rezeptor und die Kontrollenzyme der Cysteinyl-Leukotrien Produktion betreffen. Abnormale Signale zwischen Epithel, das in Kontakt mit der Umwelt steht, und den darunter befindlichen (Myo)-Fibroblasten sowie dendritischen Zellen, induzieren eine Reaktivierung epithelialer, mesenchymaler Strukturen. Diese Prozesse sind an der Entwicklung der fetalen Lunge beteiligt und liefern die Basis für ein Asthma, das sowohl TH2-Polarisation als auch ein Remodeling der Wände des Respirationstraktes einschließt (32). Eine Assoziation mit erhöhten IgE-Spiegeln und Asthma konnte für genetische Varianten von FcEpsilonRIbeta und HTm4 gefunden werden. Die eher telomerischen Varianten, D11S480, waren mit Asthma, jedoch nicht mit erhöhten IgE-Spiegeln assoziiert (1). Auch für das 12q15-q24.1 Chromosom wurde eine Assoziation mit erhöhten Gesamt-IgE-Spiegeln festgestellt (52). Im Zusammenhang mit einer Region des 5q31 Chromosoms (IL Gencluster) konnte ein Prädisposition für die atopische Dematitis gefunden werden (22).

2.1.3. Rhinokonjunktivitis (79d)

Rhinokonjunktivitis ist eine allergische Entzündung der Nasenschleimhaut und/ oder der Konjunktiven infolge Überempfindlichkeit gegen Aeroallergene. In Abhängigkeit von den auslösenden Allergenen als saisonale Rhinokonjunktivitis (Baum-, und Gräserpollen) nur zu den jeweiligen Pollenflugzeiten oder als perenniale Rhinokonjunktivitis ganzjährig nach Allergenkontakt (z.B. Hausstaubmilbenkot, Tierepithelien, Schimmelpilze).

Epidemiologie

Die allergische Rhinokonjunktivitis stellt die häufigste klinische Manifestation einer atopischen Erkrankung dar, gefolgt von der atopischen Dermatitis, dem allergischen Asthma und der Nahrungsmittelallergie. Die Neuerkrankungsrate ist zwischen dem 6. und 15. Lebensjahr am höchsten, etwa 75% der Kindern entwickeln allergische Rhinitissymptome vor dem 25. Lebensjahr. Prospektive Untersuchungen haben gezeigt, daß etwa 40% der Rhinitispatienten über einen Zeitraum von 10 Jahren Asthmasymptome entwickeln.

2.2. VIRALE INFEKTIONEN

Bei der Auswahl der in der Studie zu untersuchenden Virusinfektionen waren vor allem solche Infektionen von Interesse, die eine starke TH1-Antwort induzieren, Infektionen mit hoher Prävalenz bereits im Kindesalter und lebenslanger Seropositivität. Die Studie konzentriert sich auf die Untersuchung der Infektion mit dem Cytomegalie-Virus, dem Epstein-Barr-Virus und dem Varizella-Zoster-Virus. Während der erste Teil der Arbeit die Infektionen anhand von serologischer Diagnostik (IgG-Synthese) untersucht, beschäftigt sich der zweite Teil der Arbeit mit den Effektorzellen nach CMV-Infektion (TH1-Lymphozyten). Die Immunität gegen CMV auf zellulärer Ebene konnte überprüft werden, indem T-Lymphozyten von Kindern in vitro mit CMV-spezifischem Antigen und CMV-Proteinen (IE1- und pp65-Proteinen) stimuliert wurden und ihre Reaktivität in Form der intrazellulären IFN-gamma-Produktion erfaßt wurde. Das nicht-strukturele IE1 (pUL123) Protein erscheint schon sehr früh („immediate early protein“) in infizierten Zellen und stellt den entscheidenden Faktor für die Initiierung des Replikationszyklus dar. Etwas später wird noch vor der Viruspartikelformation das strukturele pp65 (UL83) Protein („early protein“) von CMV-infizierten Zellen gebildet. Es wird angenommen, daß das pp65 Protein und das IE1-Protein zu den beiden wichtigsten Zielproteinen der zellulären Immunantwort zählen, die über 90% aller T-Zell-Epitope abdecken. Die sogenannten „late proteins“ scheinen als Hüllproteine eine entscheidende Rolle bei der humoralen Immunantwort zu spielen. Aufgrund des hohen Polymorphismus der menschlichen MHC-Moleküle schien es uns durchaus sinnvoll, die Möglichkeit einer anti-CMV-T-Zell-Antwort durch die Stimulation mit zwei unterschiedlichen Proteinen zu erhöhen. Die Infektion mit dem Cytomegalie-Virus bot so die Möglichkeit neben der serologischen Diagnostik mittels ELISA-Technik, die T-Zell-Reaktivität mit Hilfe der Durchflußzytometrie zu untersuchen. Somit konnten sowohl Aussagen über einen aktuellen, als auch über einen länger zurückliegenden Viruskontakt getroffen werden. Anhand der Messung der IFN-gamma-Produktion konnte die TH1-Antwort bewertet werden.

2.2.1. Cytomegalie-Virus CMV

Morphologie

Das Cytomegalievirus ist ein DNA-Virus der Herpesvirusgruppe. Wie alle Erreger dieser Gruppe ist es aus einem ikosaederförmigen Kapsid mit 162 Kapsomeren aufgebaut. Das Kapsid umschließt das DNA-Genom (235 kb), welches mehr als 200 verschiedene Proteine kodiert. Das Kapsid wird von einer Demarkationszone, dem Tegument umgeben. Das Tegument ist aus einer Reihe von Phosphoproteinen aufgebaut. Hierzu zählen u.a. das UL82(pp71), das UL83(pp65) und das UL69. Das Tegument wiederum wird von einer lockeren, äußeren Hülle, dem Envelope eingeschlossen. Allgemein wird zwischen zwei morphologischen Strukturen unterschieden, den Virus-spezifischen Proteinen und dem Envelope. Ersteres wird als „dense body-dichter Körper“ beschrieben und erscheint als große amorphe Struktur, die weder ein Nucleo-Kapsid, noch DNA enthält. Zweiteres wird als „non-infectious enveloped particle (NIEP)-nicht infektiöser Hüllpartikel“ beschrieben und besteht aus einem leeren Kapsid, umgeben von einer Lipidhülle. Abbildung 4 zeigt die CMV-Proteine, von denen die ein „mapping“ erfolgte (86).

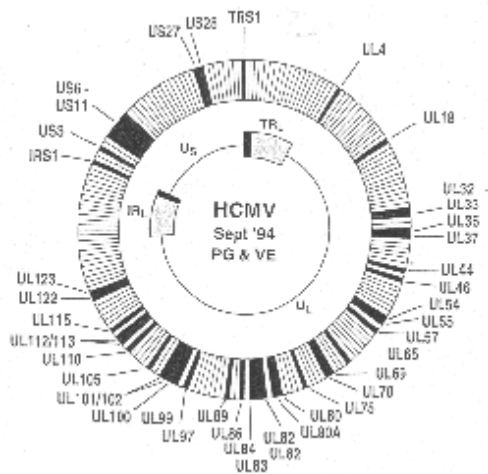


Abbildung 4: Darstellung der CMV-Proteine (86)

Kontrolle der Genexpression

Die Expression des CMV-Genoms wird von einer Syntheseabfolge verschiedener Proteine gesteuert. Zunächst erfolgt die Synthese des „immediate early protein“. Dieser Schritt erlaubt die Transkription von messenger RNA der zweiten Gruppe von Proteinen „early protein“. Dies wiederum ermöglicht die Weiterführung der DNA-Replikation und führt zum Erscheinen der letzten Gruppe von Proteinen „late protein“. Während die Gruppe von „early protein“ vor allem an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind, wirken die Gruppe von „late protein“ insbesondere bei der Bildung von viralen Strukturproteinen mit (86).

Epidemiologie

Während in Deutschland ähnlich wie in anderen Industrieländern mit einer Seropositivität von über 60% gerechnet werden kann, sind in der dritten Welt über 90% der Bevölkerung seropositiv. Das CMV-Virus kann nach Erstinfektion latent im Körper persistieren und reaktiviert werden, wenn das Abwehrsystem geschwächt ist. Die konnatale CMV-Infektion ist die häufigste konnatale Infektion. Hauptrisiko ist die Primärinfektion in der Schwangerschaft, die bei ca. 3% der seronegativen Frauen auftritt. Dabei infizieren sich 1/3 der Feten. Studien der letzten Jahren fanden eine Prävalenz der kongenitalen Infektion von 0,5-2% (6,85). Bei den infizierten Feten kommt es in ca. 10% der Fälle zu einer konnatalen CMV-Erkrankung. Bei seropositiven Frauen kann es in ca. 10% zu einer Reaktivierung der CMV-Infektion während der Schwangerschaft kommen. Dabei infiziert sich der Fetus aber seltener (<10%) und die Neugeborenen sind meist asymptomatisch. Spätschäden können aber in ca. 10% auftreten (28). Vom 2. bis zum 16. Lebensjahr steigt die Häufigkeit der Infektion von etwa 28% auf 45% (5,51). Die postnatale Infektion manifestiert sich klinisch als CMV-Erkrankung vorzugsweise in Abwehrgeschwächten. Sie zählt zu den häufigsten Komplikationen nach Nierentransplantation.

Infektionsweg

Die Übertragung erfolgt diaplazentar und postnatal durch Schmierinfektion, Bluttransfusion, Organtransplantation oder durch sexuellen Kontakt.

Klinische Manifestationen

Die Erkrankung kann sich an verschiedenen Organen abspielen. Die Erkrankung beim Neugeborenen zeichnet sich aus durch Frühgeburten, Hepatitis mit prolongiertem Ikterus, Hepatosplenomegalie, hämolytischer Purpura, Schwerhörigkeit, Chorioretinitis, Wachstumsretardierung oder geistiger Behinderung. Bei immunkompetenten Erwachsenen verläuft die Infektion in 90% der Fälle symptomlos, eventuell kommt es zu einem mononukleoseähnlichen Krankheitsbild mit Lymphadenopathie oder leichter Hepatitis. Bei immunsupprimierten Patienten verläuft die Erkrankung schwerer. Die Patienten können Symptome, wie Fieber, mononukleoseähnliches Krankheitsbild, Retinitis, Meningoenzephalitis, interstitielle Pneumonie oder Ulzerationen im Gastrointestinalbereich aufweisen (28).

Virusdiagnostik

Die Diagnostik der postnatalen Infektion erfolgt über Virus-, Antigen- und CMV-DNA-Nachweis aus Urin, Blut, bronchoalveolärer Lavage oder Biopsiematerial. Die Primärinfektion lässt sich durch Serokonversion (Neuerscheinen von IgG-Antikörpern gegen CMV) und den Nachweis von IgM-Antikörpern gegen CMV detektieren. Persistierende Infektionen werden durch IgG-Antikörper und Reaktivierungen durch erneuten IgG-Antikörper-Anstieg und eventuell erneuten Nachweis von IgM-Antikörpern diagnostiziert. Es gibt jedoch auch Reaktivierungen, insbesondere bei Immunsupprimierten, die nicht mit serologischen Veränderungen einhergehen. Mittels moderner Verfahren, wie der Histopathologie oder der Elektronenmikroskopie bzw. PCR-Methoden lässt sich das Virus sehr gut direkt nachweisen. Das Labor zeigt eine Leukopenie mit relativer Lymphozytose und atypischen Lymphozyten (28).

2.2.2. Epstein-Barr-Virus EBV

Morphologie

Die Epstein-Barr-Virus Typen I und Typ II sind DNA-Viren und gehören zur Herpesgruppe. Die zentrale Nukleinsäure ist umhüllt von einem ikosaederförmigen Kapsid, welches aus 160 triangulären Kapsomeren besteht. Diese Strukturen wiederum sind von einer irregulären, lipidhaltigen Hülle, dem Envelope, umgeben. Das Envelope ist essentiell für die Infektiösität des Virus (86).

Das virale Genom und viral kodierende Proteine

Das virale Genom besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül von 172 kb Länge. Sequenz-Analysen haben zwei Typen des Virus, Typ 1 und Typ 2 gefunden, die sich in den Domänen unterscheiden, die für das virale Kern-Antigen (EBNA) kodieren. Das virale Genom kodiert für etwa 100 Proteine, von denen bisher nur wenige identifiziert wurden. Elf viral-kodierende Proteine sind mit latent infizierten Zellen und weitere drei Proteine mit lytischer Infektion assoziiert. Zu den latenten Proteinen werden der „EB viral nuclear antigen complex“ (EBNA), das „latent membrane protein“ (LMP) und das „terminal protein“ (TP) gezählt. Zu den lytischen Proteinen gehören die „membrane antigens“ (MA), die „early antigens“ (EA) und das „viral capsid antigen“ (VCA). Von EBNA sind insgesamt sechs Proteine bekannt EBNA 1-6). Das von uns untersuchte EBNA 1 ist zuständig für die Blastentransformation (86).

Epidemiologie

In Westeuropa sind 95% der Bevölkerung bis zum 30. Lebensjahr infiziert, der Erkrankungsgipfel liegt im jugendlichen Alter. Im Vergleich dazu sind in Zentralafrika fast alle Kinder schon mit 3 Jahren infiziert. Die Prävalenz der Infektion steigt vom 1. bis zum 7. Lebensjahr von etwa 15% auf etwa 70% an (3,5,12,31,43). Die Abbildung 5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Seropositivität für EBV (86).

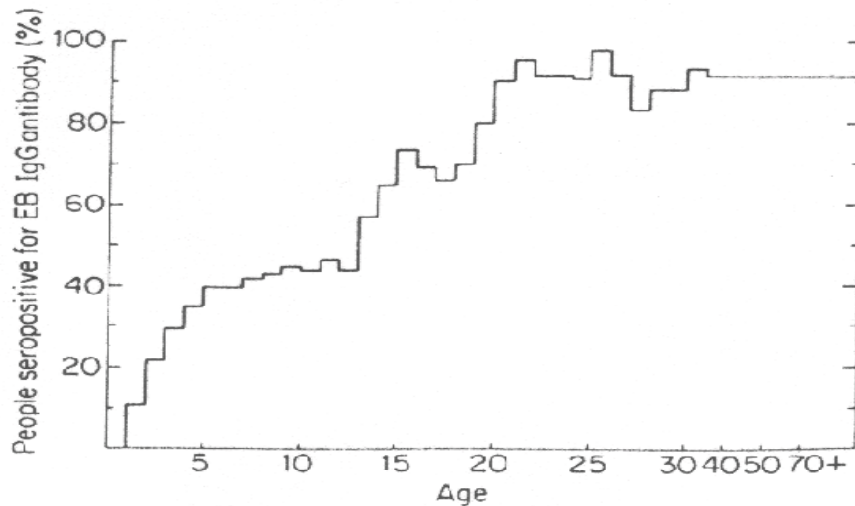


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Seropositivität für EBV (86)

Infektionsweg

Zielzellen des Virus sind die naso- und oropharygealen Epithelien sowie B-Lymphozyten, die als „EBV-Rezeptor“ das CD-21-Antigen tragen. Unzerstörte infizierte B-Lymphozyten können Viruspersistenz verursachen. Die Infektion wird hauptsächlich über den Speichel übertragen (z.B. durch Küssen „kissing disease“).

Klinische Manifestation

Im Kleinkindalter verläuft die Infektion meist asymptomatisch. Im späteren Lebensalter tritt das klinische Bild der infektiösen Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber) mit fieberhafter Angina tonsillaris/ Pharyngitis, Lymphknotenschwellungen und typischem Blutbild mit Virozyten auf. Zu den EBV-assoziierten Malignomen gehören das Nasopharynxkarzinom und das Burkitt-Lymphom (28).

Virusdiagnostik

Die Virus-Diagnostik erfolgt durch serologischen Antikörper-Nachweis. Die frische Infektion ist gekennzeichnet durch das Erscheinen des Anti-VCA, virales Capsid-Antigen (IgG und IgM), des Anti-EA-D, early antigen diffuse und heterophiler IgM-Antikörper bei 80% der Erwachsenen und 50% der Kinder. Frühere Infektionen zeigen Anti-VCA, virales Capsid-Antigen (IgG) und Anti-EBNA EBV, nukleäres Antigen (IgG). Das Blutbild zeigt eine Leukozytose mit 40-90% mononukleärer Zellen und Reizformen der Lymphozyten = Virozyten = aktivierte T-Lymphozyten (28).

2.2.3. Varizella-Zoster-Virus VZV

Morphologie

Das VZV erscheint morphologisch als ein Herpesvirus. Das Genom besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA mit einer Länge von etwa 125 Kilobasen Paaren kbp.

Epidemiologie

Die Varizellen sind eine Kinderkrankheit mit generalisiertem vesikulärem Exanthem und hohem Kontagionsindex (90%). Einen zeitlichen Verlauf der VZV-Prävalenz zeigt Abbildung 6 (86).

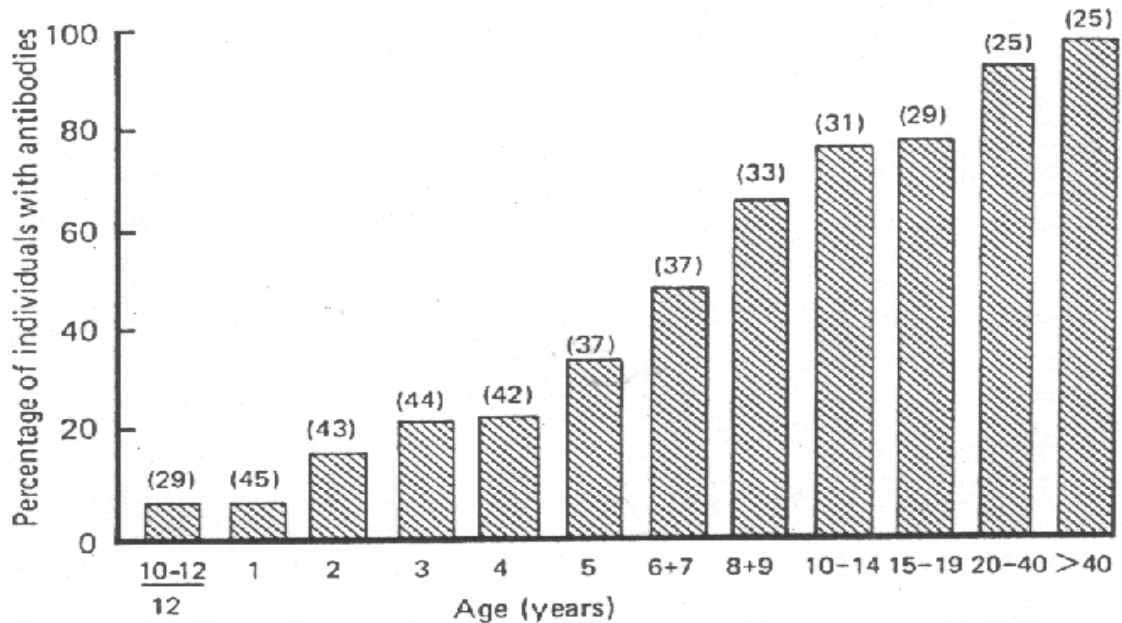


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der VZV-Prävalenz (86)

Infektionsweg

Die Varizellen sind eine hoch kontagiöse aerogene Tröpfcheninfektion.

Klinische Manifestation

Windpocken stellen die Erstinfektion mit VZV dar. Sie zeigen ein polymorphes Bild, verursacht durch schubweisen Verlauf mit Roseolen-Papeln-Bläschen-Krusten. Man findet ungekammerte Bläschen mit dünner Decke. Die Mundschleimhaut ist mitbefallen. Der Herpes zoster ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters und wird ausgelöst durch Reaktivierung des Virus, das nach der Primärinfektion in den Spinalganglien persistiert. 15% der Erwachsenen erkranken an einer Gürtelrose. Die Effloreszenzen beschränken sich meist auf ein oder mehrere Dermatome, meist Thorakalnerven. Vor, während und nach der Bläschenruption treten starke Schmerzen auf (28).

Virusdiagnostik

Die Diagnostik erfolgt durch Antigennachweis, Virusisolierung bzw. elektronenmikroskopischen Virusnachweis oder serologischen Antikörper-Nachweis, IgM-Antikörper mit Serokonversion (28).

2.3. Hypothese der vorliegenden Studie

Die Hypothese dieser Studie geht davon aus, daß in den ersten Lebensjahren auftretende Virusinfektionen eine TH1-Immunantwort induzieren, die in der Folgezeit zu einer reduzierten Inzidenz atopischer Krankheitsmerkmale führt. Ausgangspunkt der Untersuchung sind die folgenden Annahmen. Kinder, die in den ersten Lebensjahren seropositiv gegenüber viralen Infektionen waren, zeigen im späteren Leben weniger häufig Symptome atopischer Erkrankungen als seronegative Kinder. Kinder ohne Symptome atopischer Erkrankungen reagieren auf eine virale Stimulation häufiger mit einer TH1-Immunantwort als Kinder mit atopischen Manifestationen.

Die vorliegende Arbeit analysiert einerseits den Zusammenhang zwischen Seroprävalenz häufig auftretender Virusinfektionen bei Kindern im Alter von 3 Monaten bis 16 Jahren und dem Auftreten atopischer Erkrankungen. Auf der anderen Seite untersucht die Arbeit die T-Zell-Reaktivität von Kindern und Jugendlichen mit und ohne Symptome atopischer Erkrankungen nach einer viralen Stimulation. Bei der Ermittlung von Seroprävalenzen häufig auftretender Virusinfektionen wurden im ersten Teil der Arbeit Kinder mit 1 Jahr und mit 3 Jahren untersucht, da die ersten Lebensjahre als wichtiger immunologischer Entwicklungszeitraum für die T-Zell-Reifung angesehen werden. Daten zur atopischen Manifestation lagen uns für den Zeitraum vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr vor (MAS-Studie). Die Seroprävalenz der Kinder wurden mit den atopischen Manifestationen der Kinder sowohl zum gleichen Zeitpunkt als auch zu einem späteren Zeitpunkt (7. Lebensjahr) verglichen. Den Vergleich zum Zeitpunkt der Infektion und zu einem späteren Zeitpunkt vorzunehmen, sollte dem Umstand Rechnung tragen, daß ein möglicher Einfluß der Virusinfektion auf die atopische Manifestation erst innerhalb einer Wirkungszeit von mehreren Jahren zum Tragen kommt. Zum anderen galt es zu berücksichtigen, daß bereits manifeste atopische Symptome bei Virusinfekten eher verstärkt auftreten können. Bei der Auswahl der zu untersuchenden Virusinfektionen interessierten vor allem Infektionen mit hoher Prävalenz unter Kindern, Infektionen mit lebenslanger Immunität und Infektionen mit Induktion einer TH1-Immunantwort. Im Einzelnen widmet sich die vorliegende Arbeit der Infektion mit dem Cytomegalie-Virus, dem Epstein-Barr-Virus und dem Varizella-Zoster-Virus. Das Cytomegalie-Virus ermöglichte es zusätzlich, die T-Zell-Reaktivität der Kinder nach einer Infektion zu untersuchen. Während im ersten Teil der Arbeit der Schwerpunkt auf der serologischen Diagnostik mittels ELISA-Technik liegt, beschäftigt sich der zweite Teil der Studie mit den Effektorzellen unter Verwendung der Durchflußzytometrie. Somit konnten sowohl Aussagen über einen aktuellen, als auch einen länger zurückliegenden Viruskontakt, getroffen werden. Im zweiten Teil wurden Kinder bzw. Jugendliche im Alter von 1 Jahr bis 16 Jahren untersucht. Es wurden bewußt höhere Altersgruppen in die Untersuchung einbezogen. Zum einen konnte so ein möglicher Einfluß viraler Infektion auf atopische Manifestation auch im jugendlichen Alter analysiert werden, zum anderen war die Erweiterung der Altersgrenzen nötig, um ausreichend Untersuchungsmaterial rekrutieren zu können. Als Nebeneffekt lieferte die Studie Aussagen über die Seroprävalenz der untersuchten Infektionen, sowie eine Aussage über die CMV-spezifische TH1-Zell-Reaktivitäten unter deutschen Kindern und Jugendlichen.

3. METHODEN UND MATERIAL

3.1. Humorale Immunantwort und Atopie

3.1.1. Patientenauswahl und Studiendesign

Für den ersten Teil der Untersuchung Seren und Informationen der MAS- Multizentrische Allergie Studie untersucht. Die MAS Studie ist eine prospektive Kohorten-Studie mit einer Neugeborenenpopulation von 1314 Kindern.

Die Studie begann 1990 als Beobachtungsstudie mit dem Ziel, auf folgende Fragen eine Antwort geben zu können:

Warum sind allergische Erkrankungen so weit verbreitet?

Welche Frühsymptome treten auf und wie ist der Verlauf von allergischen Erkrankungen?

Gibt es erkennbare Ansatzpunkte zur Allergieprävention?

Dazu wurden Eltern von über 6000 Neugeborenen, die zwischen dem 1.1. und 31.12.1990 in 6 Geburtskliniken der Städte Berlin, Düsseldorf, Freiburg, Mainz und München zur Welt kamen, systematisch nach dem Vorkommen von Allergien in der Familie befragt. Außerdem wurden Nabelschnur-IgE-Bestimmungen durchgeführt. 1314 von diesen Neugeborenen wurden in die Studienkohorte aufgenommen. Etwa 40% dieser Kinder haben eine doppelte familiäre Atopiebelastung oder erhöhtes Nabelschnur-IgE ($\text{IgE} > 0,9 \text{ kU/l}$) aufzuweisen. Die Befragung der Eltern bzw. die Allergieuntersuchungen (AUs) der Kinder erfolgten zu festgelegten vom Lebensalter der Kinder abhängigen Terminen und zwar:

AU1	mit 1 Monat
AU2	mit 3 Monaten
AU3	mit 6 Monaten
AU4	mit 12 Monaten
AU5	mit 18 Monaten
AU6	mit 24 Monaten
AU7	mit 36 Monaten.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde eine Vielzahl von Daten zur Familie, zum Wohnumfeld, zu allergischen Symptomen, zu Krankheiten usw. gewonnen. Neben den Laborparametern aus der Analyse von Serum (Sensibilisierung gegenüber häufigen Allergenen und zum IgE-Gesamt-Serum-Spiegel) wurden mit Hilfe eines standardisierten Scorings diagnostische Daten zur atopischen Manifestation der Kinder erhoben. Insgesamt ergaben sich im Zeitraum 1990-1993 je Kind 6827 verschiedene Informationen. Insgesamt lagen Daten zu den atopischen Manifestationen der Kinder vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr vor.

Einen Überblick über diese Daten zeigt Abbildung 7.

<u>Manifestationen:</u>	<u>Untersuchungszeitpunkt:</u>
Atopische Dermatitis AD	3, 6, 12, 18 Monate, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Jahre
Asthma Bronchiale OB	3, 6, 12, 18 Monate, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Jahre
Rhinokonjunktivitis RK	3, 6, 12, 18 Monate, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Jahre

<u>Laborparameter:</u>	
Gesamt-IgE im Serum	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
spezifisches IgE gegen Milcheiweiß	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Hühnereiweiß	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Soja	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Weize	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Dermatophagoides	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Katze	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Hund	3, 5, 6, 7 Jahre
Birke	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Lieschgras	1, 2, 3, 5, 6, 7 Jahre
Latex	5, 6, 7 Jahre

Abbildung 7: Allergische Symptomatik vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr

Alle erfaßten Daten wurden zu fünf Bewertungskriterien der atopischen Symptomatik zusammengefaßt. Die Einschätzung der klinischen Manifestation der Atopie gelang durch die Kriterien: Atopische Dermatitis, Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis. Eine Aussage über den serologischen Hintergrund der Atopie lieferten die Laborparameter: Atopische Sensibilisierung bzw. erhöhtes spezifisches IgE und erhöhtes Gesamt-IgE. Das Kriterium „Atopische Sensibilisierung“ lag vor, wenn die Kinder gegenüber mindestens einem der getesteten Allergene sensibilisiert waren (sens größer gleich 0,35 kU/l). Bei der Bewertung der Gesamt-IgE-Spiegel orientierte sich die Studie an den Perzentilen für Gesamt IgE-Werte im Serum von Kindern, abgelesen aus MAS-Studie (42,79c), die in Abbildung 8 dargestellt sind.

Perzentilen	50. Perzentile	75. Perzentile	85. Perzentile	90. Perzentile	95. Perzentile
1. Lebensjahr	5	13	26	40	78
2. Lebensjahr	15	40	75	107	226
3. Lebensjahr	20	58	111	155	261
5. Lebensjahr	34	85	150	212	372
6. Lebensjahr	42	95	170	259	428

Abbildung 8: Bevölkerungsbezogene IgE-Werte in kU/

Die vorliegende Arbeit befaßt sich ausschließlich mit der Untersuchung von Virusinfektionen der Herpesgruppe, der Infektion mit dem Cytomegalievirus (CMV), dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Varizella-Zoster-Virus (VZV). Alle drei Infektionen besitzen eine hohe Prävalenz unter Kindern, hinterlassen eine lebenslange Immunität und führen zur Induktion einer TH1-Immunantwort. Der qualitative und quantitative Nachweis von Virus-spezifischem IgG für CMV, EBV, VZV und IgE für CMV wurde bei 672 Kindern, 351 Jungen (52,2%) und 321 Mädchen (47,8%) im Alter von 1 und 3 Jahren durchgeführt. Diese Altersgruppe war Ziel der Untersuchung, da die ersten Lebensjahre als wichtiger immunologischer Entwicklungszeitraum für die T-Zell-Reifung angesehen werden. Die Bestimmung des CVM-spezifischen IgE erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. B. Weber, Laboratoires Reunis Kutter, Lieners-Hastert Junglinster, Luxemburg. Aussagen zum CMV-spezifischen IgE sollten zusätzlich zu den Aussagen über CMV-spezifisches IgG eine umfassende Einschätzung des Infektions-Status der Kinder möglich machen, da das CMV-spezifischen IgE gerade für primäre Infektionen ein besserer Marker, als das CMV-spezifische IgM zu sein scheint (54,73,80).

Insgesamt standen 362 Seren 1-jähriger Kinder und 457 Seren 3-jähriger Kinder zur Verfügung. Davon waren 147 Antikörper-Bestimmungen im Verlauf, also Doppelbestimmungen von Kindern, die sowohl im Alter von 1 Jahr als auch im Alter von 3 Jahren untersucht worden waren. Die Abbildung 9 gibt einen Überblick über die verschiedenen Gruppen von Informationen und ihre Erhebungszeiträume.

Das Ziel der Studie bestand darin, zu prüfen, ob seropositive Kinder mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren im späteren Leben (7 Jahre) weniger häufig an atopischen Manifestationen erkranken als seronegative Kinder, die virale Infektion also einen protektiven Effekt hinsichtlich der Allergieentstehung besitzt. Um dies beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse der Antikörper-Detektion mittels ELISA-Diagnostik mit den Daten der MAS-Studie zur allergischen Symptomatik der untersuchten Kinder verglichen.

Die MAS-Studie lieferte Daten zur atopischen Manifestation der Kinder für den Zeitraum vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr. Die Seropositivität der Kinder gegenüber den untersuchten Infektionen wurde mit den atopischen Manifestationen der Kinder sowohl zum Zeitpunkt der Antikörper-Detektion (mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren) als auch mit 7 Jahren vorgenommen. Diese Vorgehensweise berücksichtigte zum einen den Umstand, daß ein möglicher Einfluß von Virusinfektionen auf die atopische Manifestation Zeit benötigt, um seine Wirkung zu entfalten. Zum anderen war bekannt, daß bereits manifeste atopische Symptome bei Virusinfektion eher verstärkt werden können. Es deutet vieles darauf hin, daß der Zeitpunkt der Infektion eine entscheidende Rolle hinsichtlich eines protektiven Effekts auf die Allergieentstehung spielt. Virale Infektionen bei Patienten mit bereits manifester Allergie führen eher zur Verschlechterung der allergischen Symptomatik. Diesen Umstand galt es zu berücksichtigen. Ein möglicher protektiver Effekt viraler Infektionen auf die Entstehung von atopischen Manifestationen sollte in einer erweiterten statistischen Auswertung allein bei Kindern untersucht werden, die zum Zeitpunkt der Antikörper-Bestimmung noch keine atopischen Manifestation aufwiesen, bei Kindern, die mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren weder Symptome von atopischer Dermatitis, Asthma bronchiale noch Rhinokonjunktivitis zeigten.

Studiendesign (erstellt mit Hilfe der MAS-Studie, Prof. U. Wahn, Virchow-Klinikum Berlin)

672 untersuchte Kinder (1-Jährige: 362, 3-Jährige: 457, davon Verläufe: 147)

Untersuchungszeitpunkt: Methoden zur Erfassung atopischer und viraler Parameter

AU2	---	3 Monate	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung			
AU3	---	6 Monate	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung			
AU4	---	12 Monate	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung	----	Gesamt IgE spez. IgE	---- ELISA CMV IgG, IgE EBV IgG VZV IgG
AU5	---	18 Monate	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung			
AU6	---	2 Jahre	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung	----	Gesamt IgE spez. IgE	
AU7	---	3 Jahre	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung	----	Gesamt IgE spez. IgE	---- ELISA CMV IgG, IgE EBV IgG VZV IgG
AU8	---	4 Jahre	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung			
AU9	---	5 Jahre	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung	----	Gesamt IgE spez. IgE	
AU10	---	6 Jahre	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung	----	Gesamt IgE spez. IgE	
AU11	---	7 Jahre	----	Fragebogen Strukt. Interview Untersuchung	----	Gesamt IgE spez. IgE	

Abbildung 9: Studiendesign der Untersuchung auf humoraler Ebene

3.2.2. Methoden

ELISA-(enzyme-linked immunosorbent assay)-Technik

Die Bestimmungen des Virus-spezifischen IgG für CMV, EBV und VZV erfolgten mit ELISA-(enzyme-linked immunosorbent assay)-Technik.

Dabei wird eine Trägerplatte mit dem zum gesuchten Antikörper korrespondierenden Antikörper beschichtet. Sind diese Antikörper im Serum vorhanden, binden sie an das Antigen. Ein enzymatisch markierter Sekundärantikörper bindet im nächsten Reaktionsschritt an die gesuchten Antikörper. Durch das Enzym wird in der Farbreaktion Substrat umgewandelt. Anhand eines mitgeführten Standards kann dann, nach Erstellung einer Eichkurve, die Farbreaktion direkt mit der Antikörperreaktion korreliert werden (60b).

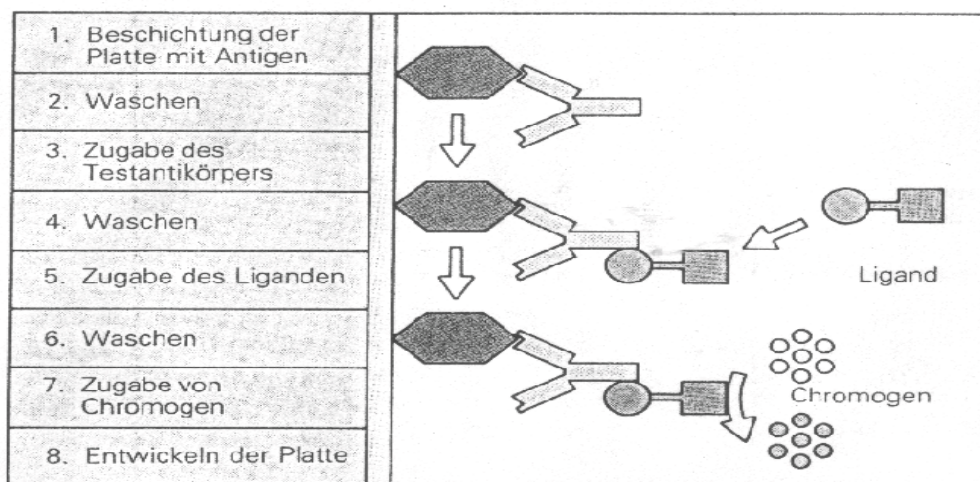


Abbildung 10: Der ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay)

Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay-Technik

Die Bestimmungen des CMV-spezifischen IgE erfolgte mit antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay.

Dabei erfolgt die Beschichtung der Träger mit unmarkiertem Anti-IgE-Antikörper und anschließendem Nachweis des gebundenen IgE mit markiertem Anti-IgE-Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist. Im Gegensatz zur klassischen ELISA-(enzyme-linked immunosorbent assay)-Technik, ist dieser Test hochspezifisch, da Antigene, die mit einem Antikörper kreuzreagieren mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auch noch an einen zweiten binden (80).

3.1.3. Material

Cytomegalie-Virus CMV IgG

ETI-CYTOK-G (P2860) DiaSorin:

Methode zur quantitativen/ qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von Anti-Cytomegalovirus IgG-Antikörpern (AD 169 Stamm) im Human-Serum oder -Plasma

Der Cut-Off dieses Tests lag bei 5 AU/ml.

Cytomegalie-Virus CMV IgE

Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay

Hochspezifische Methode zur immunenzymatischen Bestimmung von Anti-Cytomegalovirus IgE-Antikörpern im Human-Serum.

Der Cut-Off dieses Tests lag bei 0,4 OD Ag.

Epstein-Barr-Virus EBV IgG

ETI-EBNA-G (P001607) DiaSorin

Methode zur quantitativen/ qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von Anti-Kern-Antigen IgG-Antikörpern des Epstein-Barr-Virus (synthetisches Peptid EBNA-1) in Human-Serum oder – Plasma. Bei diesem Test wurde die sich wiederholende Region Gly-Ala ausgeschlossen, da sie bekannte Kreuzreaktionen mit dem Autoantigen verursacht. Das Protein EBNA-1 dient der Replikation des runden Virus-Genoms. Der Cut-Off dieses Tests lag bei vom Hersteller vorgegeben bei 20 AU/ml. Da der Test bei der Antikörper-Detektion im Serum der 1-Jährigen auch für die mütterlichen Antikörper sensitiv war und dadurch eine kindliche Infektion nicht mit Sicherheit diagnostiziert werden konnte, wurde der Cut-Off auf 100 AU/ml erhöht. Dies entsprach dem Wert, bei dem ein seropositives Kind mit 1 Jahr auch noch mit 3 Jahren seropositiv war.

Varizella-Zoster-Virus VZV IgG

VZV-IgG ELISA (DS5600) DiaSorin

DiaSorin Varizella-Zoster Virus IgG ELISA ist für die Detektion und quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern in Humanserum gegen VZV Virus konzipiert und kann Hilfe bei der Diagnose einer Primärinfektion oder einer Reaktivierung mit dem VZV liefern. Der Cut-Off des Tests lag bei 1,10 ISR Wert.

3.2. T-Zell-Reaktivität nach CMV-spezifischer Stimulation und Atopie

3.2.1. Patientenauswahl und Studiendesign

Der zweiten Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der zellulären Immunabwehr der Infektion mit dem Cytomegalie-Virus, indem die T-Zell-Reaktivität von Kindern nach einer Infektion untersucht wurden. Aus mehreren Berliner Krankenhäusern wurden insgesamt 100 Kinder und Jugendliche im Alter von 1 bis 16 Jahren mit und ohne atopische Krankheitsgeschichte rekrutiert.

Anamnestische Informationen über atopische Erkrankungen, atopische Familienanamnese wurden in Form eines Fragebogens erfaßt. Auch zusätzliche Einflußgrößen der immunologischen Reaktion, wie medikamentöse Therapien mit immunmodulierenden Substanzen (z.B. Kortikoide) oder akute bzw. chronische Infektionen wurden im Fragebogen festgehalten. Als Atopiker galten alle die Kinder und Jugendliche, die bis zum Zeitpunkt der Befragung und/ oder zum Zeitpunkt der Befragung mindestens eine der drei klassischen atopische Erkrankung (atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis) aufwiesen. Die möglichen chronischen Infektionskrankheiten im Kindesalter (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) wurden erfaßt, wenn sie bis zum Zeitpunkt der Befragung und/ oder zum Zeitpunkt der Befragung aufgetreten waren. Nach medikamentösen Therapien bzw. akuten Infektionen (z.B. grippaler Infekt) wurde für den Zeitraum der letzten 3 Wochen gefragt. Besondere Berücksichtigung galt der Erfassung von eventuellen immunsupprimierenden medikamentösen Therapie (z.B. Kortison inhalativ), akuten Infektionen (z.B. grippale Infekte) und entzündlichen Begleiterkrankungen (z.B. Morbus Crohn). Die genannten Faktoren stellen potentielle „confounding variables“ dar, die T-Zell-Reaktivitäten zusätzlich beeinflussen können. Um die Abhängigkeit von Atopie und T-Zell-Reaktivität untersuchen zu können, war es daher unvermeidbar, nur Daten der Kinder in die Auswertung einzubeziehen, die keine zusätzlichen Einflußgrößen boten.

Insgesamt nahmen 100 Kinder im Alter von 1 bis 16 Jahren an der Studie teil. Dabei waren 5% der Kinder jünger als 3 Jahre, 4% jünger als 7 Jahre und 91% 7 Jahre und älter. Die Geschlechtsverteilung belief sich auf 42% Mädchen und 58% Jungen. Bei 24% der Kinder und Jugendlichen zeigten sich in der Anamnese atopische Manifestationen, 76% der Kinder und Jugendlichen hatten keinerlei atopische Symptome gezeigt.

Die mit Immulite bestimmte Seropositivität für CMV lag bei 40% der Untersuchten. Von diesen Kindern und Jugendlichen wiesen 11% akute Infektionen und 18% entzündliche Begleiterkrankungen auf. Eine immunsupprimierende Medikation erhielten 14% der Kinder. Die Daten der Kinder mit einer möglichen Einschränkung der immunologischen Reaktion auf Virusbestandteile flossen nicht in die Berechnung statistischer Signifikanzen ein. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten mit 62 Kinder und Jugendlichen im Alter von 1 bis 12 Jahren ohne erkennbare „confounding variables“. Von diesen 62 Kindern und Jugendlichen waren 4,8% jünger als 3 Jahre, 1,6% jünger als 7 Jahre und 93,6% 7 Jahre und älter. Die Geschlechtsverteilung belief sich auf 40,3% Mädchen und 59,7% Jungen. Atopische Manifestationen zeigten 21% der Untersuchten, 79% der Kinder und Jugendlichen wiesen keine atopischen Symptome auf.

Hinsichtlich einer positiven Familienanamnese läßt sich festhalten, 43,3% der Mütter und 9,1% der Väter gaben an, atopische Symptome aufzuweisen. Die mit Immulite bestimmte Seropositivität für CMV lag bei 50%. Ziel des zweiten Teils der Studie war es, die intrazelluläre Zytokinproduktion in CD4 und CD8-T-Zellen nach kurzzeitiger ex-vivo Stimulation mit viralem Lysat-Antigen und Peptidgemischen (pp65 und IE1) des CMV bei Kindern mit und ohne atopische Symptome mittels Durchflußzytometrie/ FacsCalibur, Becton Dickinson zu vergleichen. Im Gegensatz zum ersten Teil der Arbeit vergleicht der zweite Teil Infektionsstatus und atopische Manifestation der Kinder zum gleichen Zeitpunkt. Es konnten durch die Analyse der Effektorzellen sowohl Aussagen über einen aktuellen, als auch einen länger zurückliegenden Viruskontakt getroffen werden. Die Immunantwort wurde nach Stimulation mit CMV-Antigen und CMV-Peptidgemischen (pp65, IE1) durch Detektion intrazellulärer Zytokine untersucht. Dabei wurden IFN-gamma-produzierenden CD4- (Antigen) und CD8- (Peptid) T-Zellen quantifiziert. Es galt zu prüfen, ob die T-Zellen von Kinder ohne atopische Symptome eher mit einer Produktion von IFN-gamma auf die Stimulation reagieren würden als T-Zellen von Kinder mit atopischen Symptomen. Dies würde darauf hinweisen, daß die Kinder ohne atopische Symptome eher fähig sind, mit einer Typ1-Immunantwort zu reagieren als Kinder mit atopischen Symptomen. Die Reaktivität wurde anhand der IFN-gamma-Produktion nach Stimulation bewertet. Dabei war sowohl die prozentuale Produktionsmenge als auch die visuelle Abgrenzbarkeit einer IFN-gamma-produzierenden Zellpopulation im Durchflußzytometer von Bedeutung. Die Auswertung der Reaktivität auf Antigen (CD4) und Peptid (CD8) erfolgte getrennt als „Reaktivität CD4“ sowie verbunden als „absolute Reaktivität“. Dabei galt diejenige Probe als „absolut reaktiv“, die entweder auf CMV-Antigen (CD4) und/ oder auf eines der CMV-Peptidgemische (CD8) mit einer IFN-gamma-Produktion reagiert hatte. Um eine schärfere Trennung von „stark reaktiven“ und „nicht reaktiven“ bzw. „wenig reaktiven“ Kindern und somit eventuell deutliche Tendenzen bei der statistischen Analyse zu erhalten, wurden aus der Gruppe der „reaktiven Kinder“ die „stark reaktiven Kinder“ („Highresponder“) ermittelt und mit der Gruppe der „nicht reaktiven“ bzw. „wenig reaktiven“ Kinder verglichen. Dabei galten Kinder mit IFN-gamma-produzierenden Zellpopulationen größer gleich 0,30% als „Highresponder“. Neben zellulären Immunantworten beschäftigt sich der zweite Teil der Studie mit humoralen Parametern der Cytomegalie-Virus-Infektion. Mit Hilfe eines Chemiluminescent enzyme immunoassays wurde qualitativ das CMV-spezifische IgG bestimmt. So war es möglich, die zelluläre und humorale Immunantwort der Kinder und Jugendlichen zu vergleichen. Als Nebeneffekt lieferte die Studie Aussagen über die Seroprävalenz der untersuchten Infektionen, sowie eine Aussage über T-Zell-Reaktivitäten unter deutschen Kindern und Jugendlichen.

Chemilumescenscent enzyme immunoassay CMV IgG

3.2.2. Methoden

Mit dem Chemilumescenscent Enzyme Immunoassay CMV IgG konnten qualitativ Anti-CMV-IgG im Serum der Kinder bestimmt werden. Zur Anwendung kam der Immulite Automatic Analyzer von DPC. Dabei lag das Mischverhältnis bei 400 µl Solution und 20 µl Plasma. Die Standards waren definiert durch:

Diluent	negativ
Negativ	negativ
5 AU	negativ
10 AU	negativ
50 AU	negativ
100 AU	negativ

Durchflußzytometrie

Methode

Nach Stimulation von T-Zellen wurden IFN-gamma produzierende Zellen mit Antikörpern angefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht. Die Durchflußzytometrie ist ein optisches Meßverfahren, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Zur durchflußzytometrischen Untersuchung sind Zellen jeder Herkunft geeignet, sofern sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Die Zellen werden „im Gänsemarsch“ zu einem Analysepunkt geleitet, an dem sie von einem fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle beleuchtet werden, Abbildung 11. Als Lichtquelle dienen luftgekühlte Argonlaser mit einer 488-nm-Emissionslinie. Das optische Detektionssystem und die Elektronik quantifizieren die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle. Unter Fluoreszenz wird die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung verstanden. Fluoreszenzsignale entstehen durch die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche mittels fluorochromkonjugierter Antikörper auf die Zellen aufgebracht oder in die Zellen eingebracht (intrazelluläre Färbung) werden. Daneben besteht die Möglichkeit, die Zellmembran direkt anzufärben. Bei der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse werden Fluoreszenzfarbstoffe gewählt (z.B. PerCP-Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplexe, PE-Phycoerythrin, APC-Allophycocyanin, FITC-Fluoresceinisothiocyanat), die sich zwar in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden, deren Fluoreszenzfarbe jedoch mit derselben Wellenlänge anregbar ist. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Größe, Form, Oberfläche und Granularität, Licht mit unterschiedlicher Qualität und Quantität. Die Lichtstreuung ist am größten im

Kleinwinkelbereich (0-10°) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter FSC), ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter SSC). Dabei gibt die Intensität des FSC einen Anhalt für die Zellgröße, das SSC einen Anhalt für die Granularität. Mittels beider Lichtstreuparameter lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen unterscheiden.

Die Darstellung der Meßergebnisse erfolgte in einem Zweiparameter-Punkthistogramm (dot plot). Die korrelierte Zweiparameterdarstellung zeigt die Relation zwei verschiedener Eigenschaften einer Zelle zueinander an. Als Beispiele seien angeführt die Korrelation von FSC mit SSC, Abbildung 12b. Der Schnittpunkt zweier Meßwerte einer Zelle ist das Ergebnis der Korrelation, Abbildung 12a.

Bei der Datenauswertung der Immunfluoreszenzmessungen werden die in den Parametrekombinationen vermuteten Lymphozyten eingegrenzt. Der englischsprachige Fachausdruck für dieses Fenster wird „gate“ genannt. Bei der weiteren Analyse finden nur solche Ergebnisse Berücksichtigung, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches liegen.

Ein Nachteil dieser Darstellungsweise ist die schwierige visuelle Abschätzung der Quantität der Populationen in den einzelnen Punktwolken. Zur Vermittlung einer visuellen Dimension stehen daher zusätzliche numerische Daten, wie Anzahl der Ereignisse in verschiedenen Auswertefenstern und deren prozentuale Aufteilung (relative Prozentanteile), Mittelwert, Median und Modus der Signalintensität zur Verfügung (66).

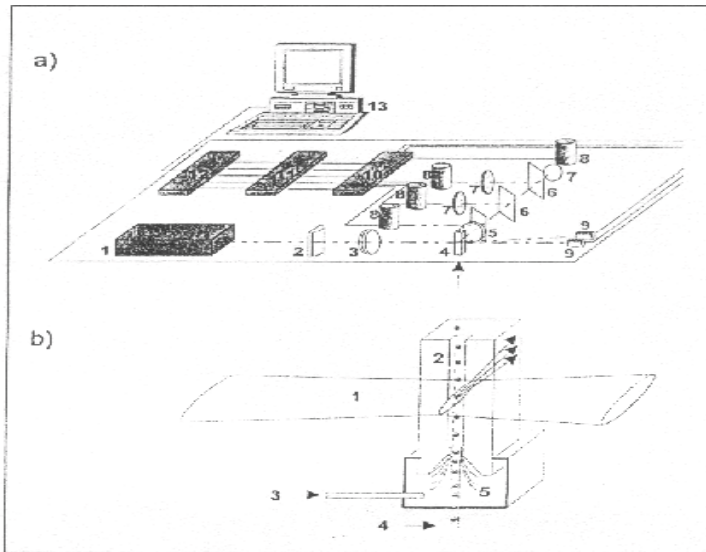


Abbildung 11: a) 1=Laser, 2=Strahlenerweiterung, 3=Fokussierlinse, 4=Meßkammer, 5=Sammellinse, 6=Teilerspiegel, 7=Lichtfilter, 8=Photomultiplier, 9=Photodiode, 10=Vorverstärker, 11=Impulsanalysatoren, 12=Analog-Digital-Konverter, 13=Datenverarbeitung
 b) Detailansicht der Meßkammer 1=Laserstrahl, 2=Meßküvette, 3=Trägerflüssigkeit, 4=Zellsuspension, 5=hydrodynamische Fokussierung

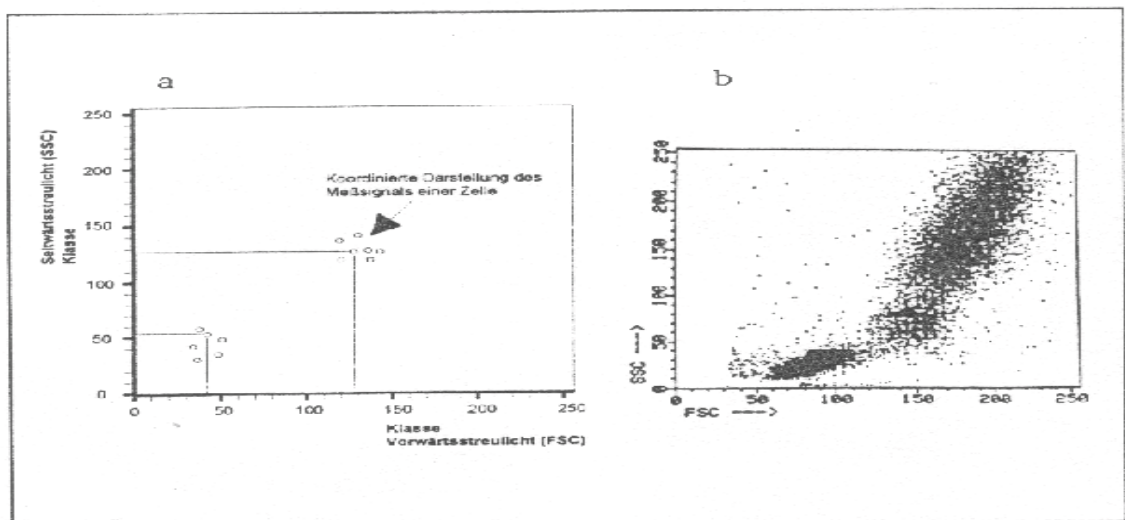


Abbildung 12: a) Theoretisches und b) Praktisches Lichtstreuungsdiagramm (66)

Stimulation

Zunächst wurden 100 µl Vollblut (Lithiumheparinat) mit jeweils 2 µl CMV- Antigen ABI (Verdünnung 1:20 mit PBS, Endkonzentration 5 µg/µl), 10 µl CMV-Peptidgemisch pp56 A, 500 µg/ml DMSO (Verdünnung 1:10 mit PBS, Endkonzentration 5 µg/µl und 10 µl CMV-Peptidgemisch IE1, 500 µg/ml DMSO (Verdünnung 1:10 mit PBS Stock, Endkonzentration 5 µg/µl) versetzt. Um die generelle Sekretionsfähigkeit für Zytokine zu testen, wurde ein Gemisch aus 2 µl PMA (Verdünnung 1:10 mit PBS, Endkonzentration 2,5 µl/ml) und 2,5 µl Ionomycin (Verdünnung 1:1000 mit PBS, Endkonzentration 2 µl/ml) eingesetzt. Nach 1-stündiger Stimulation im Brutschrank bei 20°C erfolgte die Zugabe von 2 µl Brefeldin A (Verdünnung 1:10 mit PBS, Endkonzentration 10 µg/ml). Nach 16-stündiger Stimulation im Brutschrank bei 20°C erfolgte die Lyse mit 1 ml Lysereagenz (Verdünnung 1:10 mit Aqua dest). Anschließend wurde 10 Minuten dunkel bei Raumtemperatur gelagert, mit 3 ml Natrium Acid Puffer gewaschen, 8 Minuten bei 1500 Umdrehungen, 4°C, a 9, r 172 zentrifugiert, dekantiert und gevortext. Nach Zugabe von jeweils 1 ml Permeabilisierungslösung wurde wiederum 10 Minuten dunkel bei Raumtemperatur gelagert, mit 3 ml Natrium Acid Puffer gewaschen, 8 Minuten bei 1500 Umdrehungen, 4°C, a 9, r 172 zentrifugiert, dekantiert und gevortext. Zusätzlich wurden Negativkontrollen und Isotypkontrollen durchgeführt.

Färbung

Im Anschluß erfolgte die Färbung der Zellen. Die mit CMV-Antigen stimulierten Zellen sowie die unstimulierten Negativkontrollen wurden mit 35 µl einer Antikörpermischung von IFN-gamma, CD4, CD69 und CD3 gefärbt. Die mit CMV-Peptidgemischen pp65 bzw. IE1 stimulierten Zellen sowie die Positivkontrollen wurden mit 35 µl einer Antikörpermischung von IFN-gamma, CD8, CD69 und CD3 gefärbt. Die unstimulierten Isotypkontrollen wurden sowohl mit 28 µl einer Antikörpermischung von IFN-gamma, CD4, CD69 und CD3 als auch mit 28 µl einer Antikörpermischung von IFN-gamma, CD8, CD69 und CD3 gefärbt. Die Antikörpermischungen setzten sich im einzelnen wie folgt zusammen. Das Gemisch für die Färbung der stimulierten Zelle und der Negativkontrollen bestand in Färbung 1 CD69 FITC 10 µl, Färbung 2 CD3 PE 10 µl, Färbung 3 CD4 bzw. CD8 PercP 10 µl und Färbung 4 IFN-gamma APC 5 µl. Das Gemisch für die Färbung der Isotypkontrollen bestand in Färbung 1 IgG1 FITC 5 µl, Färbung 2 CD3 PE 10 µl, Färbung 3 CD4 bzw. CD8 PercP 10 µl und Färbung 4 IgG2a APC 3 µl. Anschließend wurde 30 Minuten dunkel auf Eis gelagert, mit 3 ml Natrium Acid Puffer gewaschen, 8 Minuten bei 1500 Umdrehungen, 4°C, a 9, r 172 zentrifugiert, dekantiert und gevortext. Bei großen vorhersehbaren Zeitverlusten zwischen Färbung und Messung der Zellen wurde mit 200 µl PFA 1% refixiert.

Messung

Die Messung der Proben erfolgte mit Hilfe des Durchflußzytometers FacsCalibur von Becton Dickinson.

Überschüssige Zellsuspension wurde nach Präparation für weitere Versuche vor der Stimulation bei -70°C eingefroren.

1 ml Vollblut/ Lithiumheparinat wurde mit 10ml Lyseereagenz (Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. lysiert, gevortext und 12 Minuten dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde mit jeweils 30 ml Natrium Acid Puffer gewaschen, 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen, 4°C , a 9, r 172 zentrifugiert, dekantiert und gevortext und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das gewonnene Pellet bei -70°C eingefroren.

Die Abbildungen 13 bis 22 zeigen beispielhaft, welche Daten über die IFN-gamma-Produktion der stimulierten CD4- bzw CD8-T-Zellen gewonnen wurden. Eine visuelle Abschätzung der Quantität IFN-gamma-produzierender Zellen ist als Punktwolke im oberen rechten Quadranten („UR Gated“) des Diagramms möglich. Zur Vermittlung einer visuellen Dimension stehen zusätzliche numerische Daten, wie Anzahl der Ereignisse in verschiedenen Auswertefenstern („Gated events“) und deren prozentuale Aufteilung (% Gated“) zur Verfügung. Während in den Abbildungen 13 bis 15 die Daten eines CMV-seronegativen Kindes ohne IFN-gamma-Produktion dargestellt sind, zeigen die Abbildungen 16 bis 18 die Daten eines CMV-seropositiven Kindes mit entsprechender IFN-gamma-Produktion nach Stimulation mit viralem Antigen bzw. Peptidgemisch.

Während die Abbildungen 13 und 16 jeweils die IFN-gamma-Produktion nach Stimulation mit CMV-Antigen widerspiegeln, zeigen die Abbildungen 14 bzw. 17 die IFN-gamma-Produktion nach Stimulation mit CMV-Peptidgemisch pp65 und die Abbildungen 15 bzw. 18 die IFN-gamma-Produktion nach Stimulation mit CMV-Peptidgemisch IE1.

Ein Beispiel für unstimulierte Zellen als Negativkontrolle zeigt die Abbildung 19. In Abbildung 20 findet sich ein Beispiel für die Positivkontrollen mit PMA. Beispiele der Isotypkontrollen für CD4- und CD8- positive Zellen sind in den Abbildungen 21 (CD4) bzw. 22 (CD8) dargestellt.

Stimulation mit CMV-Antigen bzw. Peptidgemisch ohne IFN-gamma-Produktion

Abbildungen 13 bis 15

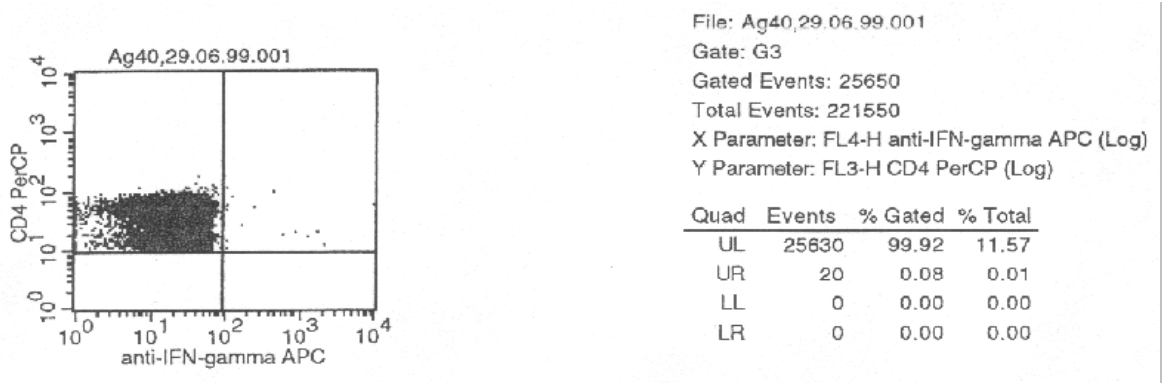


Abbildung 13: Stimulation mit CMV-Antigen, nichtreaktiv

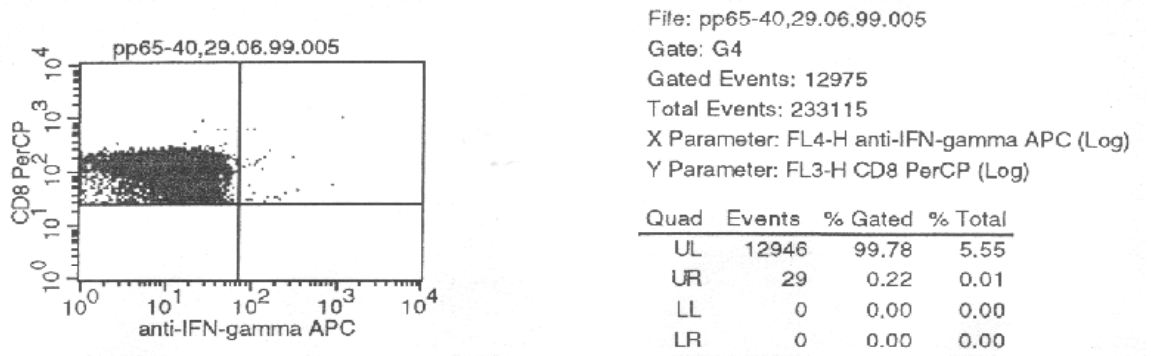


Abbildung 14: Stimulation mit CMV-Peptidgemisch pp65, nichtreaktiv

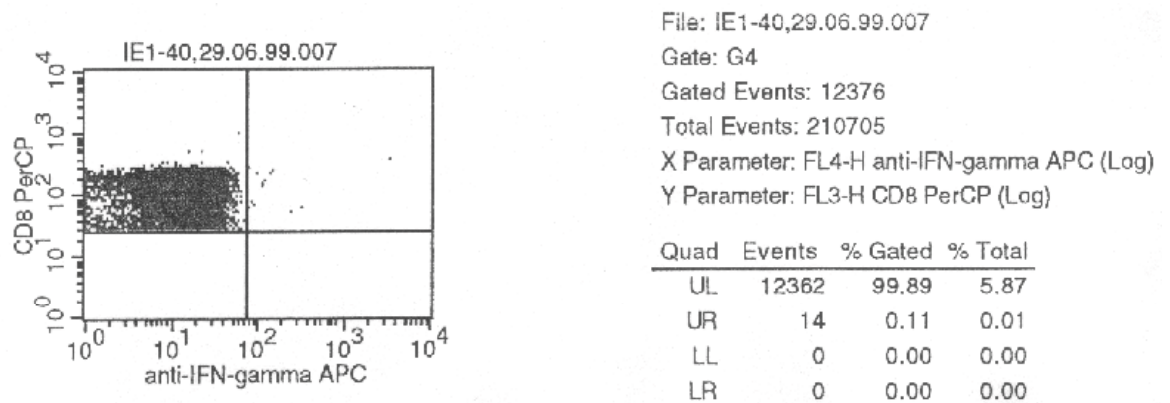


Abbildung 15: Stimulation mit CMV- Peptidgemisch IE1, nichtreaktiv

Stimulation mit CMV- Antigen bzw. Peptidgemisch mit IFN-gamma-Produktion

Abbildungen 16 bis 18

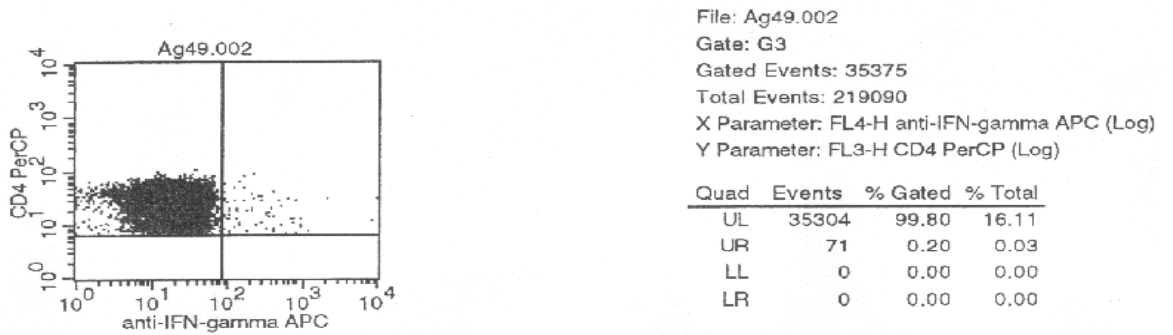


Abbildung 16: Stimulation mit CMV-Antigen, reaktiv

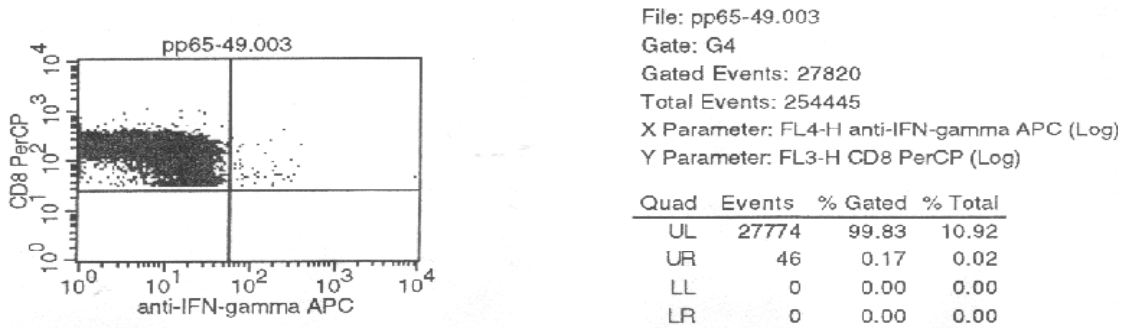


Abbildung 17: Stimulation mit CMV-Peptidgemisch pp65, reaktiv

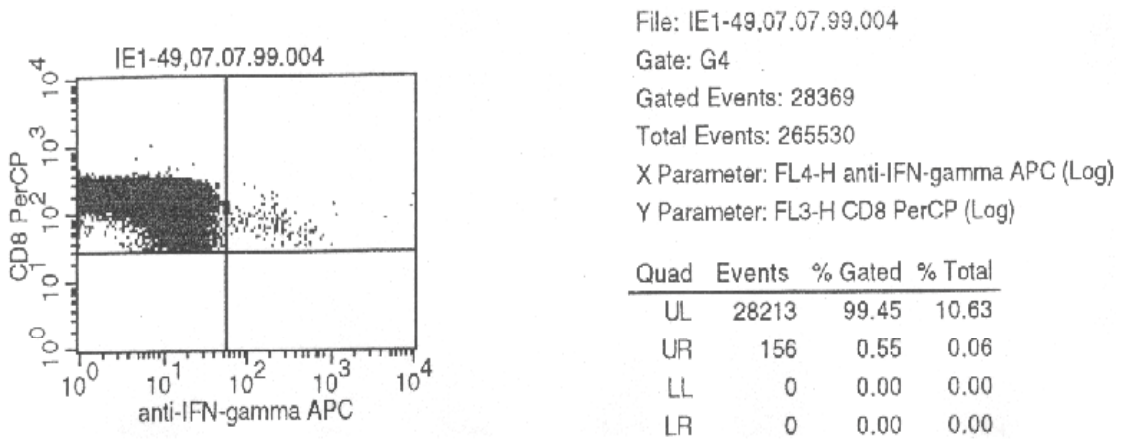
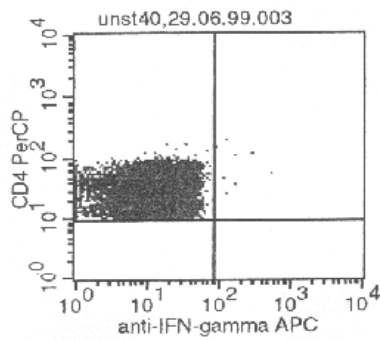


Abbildung 18: Stimulation mit CMV-Peptidgemisch IE1, reaktiv

Beispiele für unstimulierte Zellen, Positivkontrolle mit PMA und Isotypkontrollen CD4/ CD8

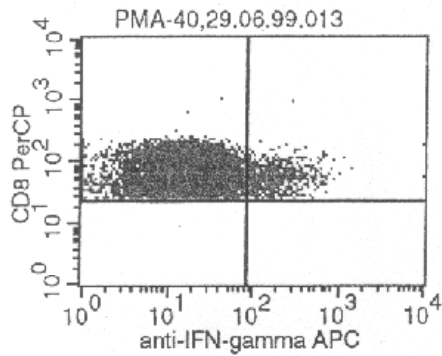
Abbildungen 19 bis 22



File: unst40,29.06.99.003
 Gate: G3
 Gated Events: 25201
 Total Events: 160650
 X Parameter: FL4-H anti-IFN-gamma APC (Log)
 Y Parameter: FL3-H CD4 PerCP (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	25193	99.97	15.68
UR	8	0.03	0.00
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00

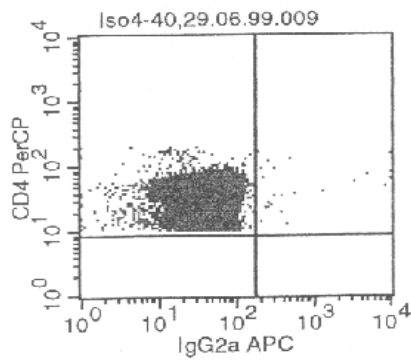
Abbildung 19: unstimulierte Zellen



File: PMA-40,29.06.99.013
 Gate: G4
 Gated Events: 8470
 Total Events: 158205
 X Parameter: FL4-H anti-IFN-gamma APC (Log)
 Y Parameter: FL3-H CD8 PerCP (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7737	91.35	4.89
UR	733	8.65	0.46
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00

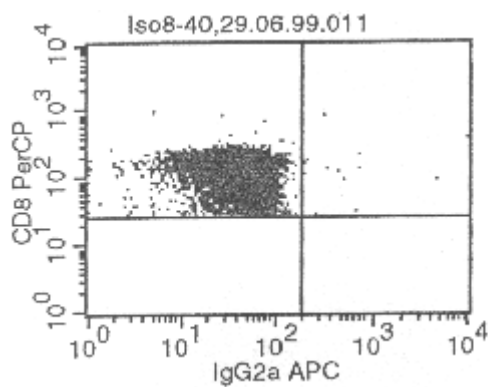
Abbildung 20: Stimulation mit PMA als Positivkontrolle



File: Iso4-40,29.06.99.009
 Gate: G3
 Gated Events: 25109
 Total Events: 220500
 X Parameter: FL4-H IgG2a APC (Log)
 Y Parameter: FL3-H CD4 PerCP (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	25086	99.91	11.38
UR	23	0.09	0.01
LL	0	0.00	0.00
LR	0	0.00	0.00

Abbildung 21: Isotypkontrolle CD4



Gate: G4
 Gated Events: 14702
 Total Events: 216015
 X Parameter: FL4-H IgG2a APC (Log)
 Y Parameter: FL3-H CD8 PerCP (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	14509	98.69	6.72
UR	13	0.09	0.01
LL	180	1.22	0.08
LR	0	0.00	0.00

Abbildung 22: Isotypkontrolle CD8

3.2.3. Material

Geräte

1. Immulite Automated Analyzer I3209
2. FacsCalibur

Hersteller

- DPC Biermann, Bad Nauheim, BRD
Becton Dickinson, San Jose, USA

Zentrifugen

3. CR422
4. Centrifuge 5415C

- Jouan, Saint Mazaire, Frankreich
Eppendorf, Hamburg, BRD

Brutschrank

5. Heraeus instruments/BB6220CU, 51007641 Kendro Laboratory Products, Hanau, BRD
6. Pipetten Eppendorf, Hamburg, BRD
7. Pipettenspitzen Sarstedt, Nümbrecht, BRD
8. Polystyrene Round Bottom Tube 5 ml Falcon352052 Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
9. Polystyrene Conical Tube BlueMax 50 ml Falcon352070 Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
10. Reaktionsgefäße, MicroTest Tubes Safe-lock 0,5 ml Eppendorf, Hamburg, BRD
0030121.023
11. Reaktionsgefäße, MicroTest Tubes Safe-lock 1,5 ml Eppendorf, Hamburg, BRD
0030120.086

Reagenzien

Chemiluminescent enzyme immunoassay CMV IgG, Immulite

12. CMV A Reagent Wedge Flacon Réactif, LCVA0007 DPC, Los Angeles, USA
13. CMV B Reagent Edge Flacon Réactif, LCVB0007 DPC, Los Angeles, USA
14. CMV IgG Test Units, LCV10006 DPC, Los Angeles, USA
15. IgG/IgM Sample Diluent, LIGZ20004 DPC, Los Angeles, USA

Durchflußzytometrie

Stimulation

16. CMV spezifisches Antigen ABI Human TEBU Frankfurt am Main, BRD
Cytomegalovirus HCMV AD 169, 10-144-000
 17. pp65 Peptidgemisch A, P06725 NMI Reutlingen, BRD
 18. IE1 Peptidgemisch, 50mg/ml Major immediate NMI Reutlingen, BRD
early protein, P13202(72DU)
 19. Ionomycin CalciumSalt 1mg in 2ml Ethanol Sigma, St. Louis, USA
gelöst, I0634
 20. Phorbol12-Myristate13-Acetate/PMA 5mg in 1ml Sigma, St. Louis, USA
DMSO gelöst, P8139
 21. Brefeldin A 1mg gelöst in 1ml DMSO, B7651 Sigma, St. Louis, USA
 22. Lysereagenz FacsLysingSolution100ml, 349202 BectonDickinson, San Jose, USA
Permeabilisierungslösung, NatriumAcid-Puffer in
PBS
 23. Albumin, Bovine 50 mg, A6003 BectonDickinson, San Jose, USA
 24. NatriumAcid reinst 50 mg, 30175 Serva, Heidelberg, BRD
 25. Paraformaldehyd reinst DAC,BPC,USP/PFA Merck, Darmstadt, BRD
Verdünnt mit PBS auf 1%, 104005
- Verdünnungsmedien
26. DimethylsulfoxideSilylationGrade/DMSO 50 ml, Pierce, Rockford, Illinois, USA
20684
 27. Ethanol 96% reinst,DAB, 100971 Merck, Darmstadt, BRD
 28. EcotrainerAquaB.Braun,1000ml, 9184P12C Braun, Melsungen, BRD
 29. PBS 500ml, 14190094 Gibocobrl lifetechnologies Paisley,
Scotland

Färbung

- | | | |
|-----|---|-----------------------------------|
| 30. | CD69(Leu-23)FITC 100Tests, 20 µl/Test, 347823 | BectonDickinson, San Jose, USA |
| 31. | CD3PE 100Tests2ml, 20µl/Test, PN IM1282 | Immunotech, Marseille, Frankreich |
| 32. | CD4(Leu-3a)PerCP 100Tests, 20 µ/Test, 347324 | BectonDickinson, San Jose, USA |
| 33. | CD8(Leu-2a)PerCP 100Tests, 20 µl/Test, 347314 | BectonDickinson, San Jose, USA |
| 34. | IFNgammaAPC 100Tests, 10 µl/Test, 10805 | ImmuneSource, St. Katharinen, BRD |
| 35. | MouselgG1FITC 100Tests, 349041 | BectonDickinson, San Jose, USA |
| 36. | MouselgG2aAPC 1ml, 0,1 mg/ml, 340473 | BectonDickinson, San Jose, USA |

3.3. Statistische Signifikanz

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS Version 8.0. Neben den Häufigkeitsverteilungen berechneten wir die signifikanten Unterschiede in den Untersuchungsgruppen mittels Chi-Quadrat-Test und Yates-Korrektur.

4. ERGEBNISSE

4.1. Humorale Immunantwort und Atopie

4.1.1. Häufigkeitsverteilungen

Zeitlicher Verlauf der atopischen Manifestationen (Fallzahlen sind mit (n) angegeben)

Unter Verwendung der Daten von 672 Kindern der MAS- Multizentrischen Allergie Studie, konnten Aussagen zum zeitlichen Verlauf der klassischen atopischen Erkrankungen, atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis, sowie zum zeitlichen Verlauf der atopischen Parameter, erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel und atopische Sensibilisierung, vom 3 Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr getroffen werden. Der zeitliche Verlauf der Häufigkeiten aller untersuchten atopischen Erkrankungen ist in den Abbildungen 23 und 24 wiedergegeben.

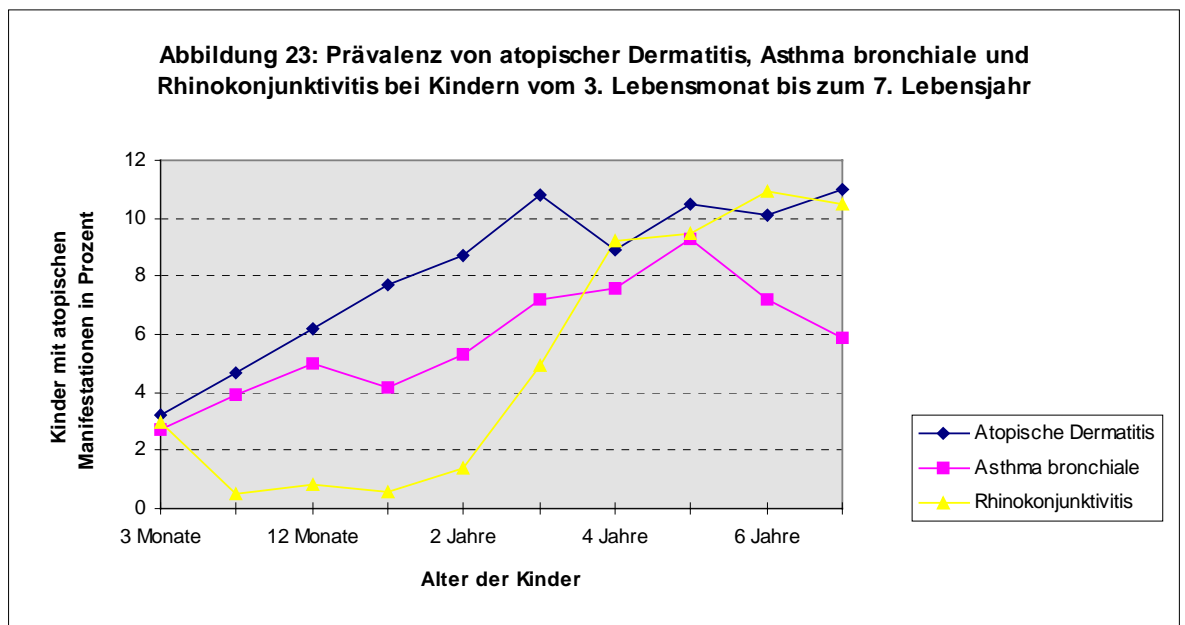
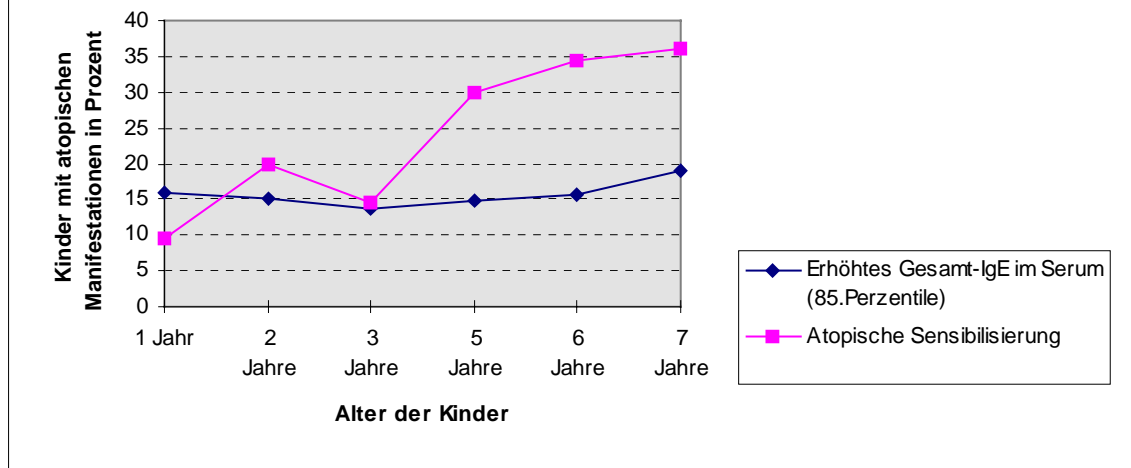


Abbildung 24: Prävalenz von erhöhtem Gesamt-IgE im Serum (85. Perzentile) und atopischer Sensibilisierung bei Kindern im Alter vom 1. bis 7. Lebensjahr



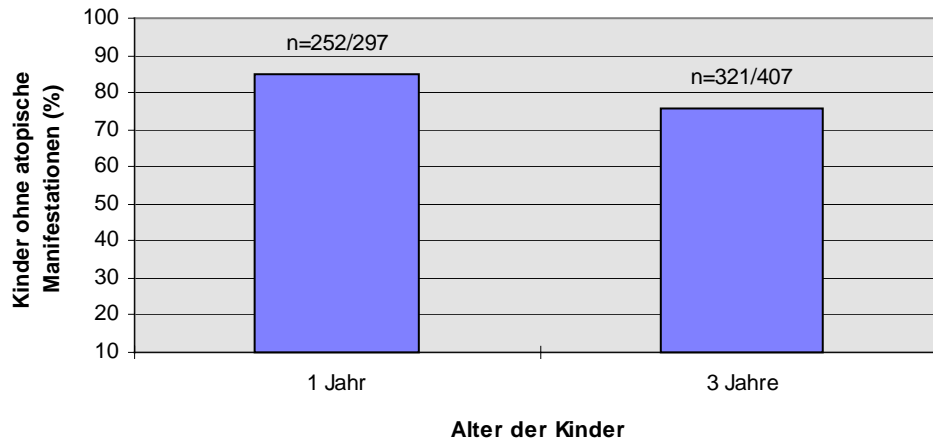
Der Vergleich der atopischen Symptome mit dem Virus-Antikörperstatus (IgG) der Kinder zum 1. bzw. 3. Lebensjahr, also der Vergleich bei Koinzidenz von Atopie und Infektion ergab keine signifikanten Unterschiede. Seropositive Kinder wiesen nicht signifikant weniger atopischen Symptome auf, als seronegative Kinder. Im Anschluß galt es, den Antikörperstatus der Kinder zum 1. und 3. Lebensjahr mit der atopischen Symptomatik zu einem späteren Zeitpunkt, zum 7. Lebensjahr zu vergleichen, um den möglichen Einfluß von Infektionen auf eine Allergieentstehung zu analysieren. Für die Definition der „Atopie“ war daher allein das Auftreten von atopischen Symptomen zum 7. Lebensjahr von Bedeutung. Es handelt sich um die Erfassung einer Periodenprävalenz. Dabei wurden atopische Symptome der Kinder in den letzten zwölf Monaten ermittelt. Eine derartige Definition „Atopie zum 7. Lebensjahr“ war notwendig, um „missing data“ Raten zu vermeiden. Einerseits konnten dadurch einige atopische Kinder, als „falsch negativ“ eingestuft werden. Andererseits konnten Kinder, ohne atopische Symptomatik sicherer als Atopiker ausgeschlossen werden.

Der Vergleich des Antikörperstatus mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren mit den atopischen Symptomen zu einem späteren Zeitpunkt im Leben der Kinder berücksichtigt den Umstand, daß ein möglicher Einfluß von Virusinfektionen auf die atopische Manifestation Zeit benötigt, um seine Wirkung zu entfalten. Zum anderen ist bekannt, daß bereits manifeste atopische Symptome bei Virusinfektion eher verstärkt werden können. Beispielsweise können grippale Infekte die Haut des Neurodermitikers exazerbieren lassen, die pulmonale Situation des Asthmatikers kann sich durch Infekte der oberen Atemwege verschlechtern. Eine virale Infektion trifft auf das bereits „dysregulierte“ Immunsystem (TH2-Immunantwort dominiert) des Atopikers. Ursache und Wirkung können nicht mehr getrennt voneinander analysiert werden. Es galt zu untersuchen, was geschieht, wenn das Virus infiziert, bevor eine manifeste Allergie diagnostiziert wurde.

Um dieses Problem zu berücksichtigen, unterteilt die Studie die untersuchten Kinder in zwei große Gruppen. Die Gruppe der Kinder, die zum Zeitpunkt der Antikörper-Bestimmung (1. und 3. Lebensjahr) noch keine atopischen Symptome aufwiesen und die Gruppe der Kinder, die zum Zeitpunkt der Antikörper-Bestimmung (1. und 3. Lebensjahr) bereits unter atopischen Symptomen litten (Atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis oder atopische Sensibilisierung). In der statistischen Auswertung konzentriert sich die Arbeit einerseits auf Signifikanz-Unterschieden zwischen seronegativen und seropositiven Kindern, ungeachtet ihrer atopischen Symptome zum Zeitpunkt der Antikörper-Detektion, hinsichtlich ihrer atopischen Symptome zum 7. Lebensjahr. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 27, 28, 31, 32, 35 und 36 wiedergegeben. Andererseits wurden Signifikanzen für die Gruppe der Kinder, die zum Zeitpunkt der Antikörper-Bestimmung keine atopischen Symptome aufwiesen, berechnet. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 29, 30, 33, 34, 37 und 38 gezeigt. Es wurden somit zusätzlich die atopischen Symptome (zum 7. Lebensjahr) von denjenigen seronegativen und seropositiven Kindern (zum 1. und 3. Lebensjahr) verglichen, die zum Zeitpunkt der Antikörper-Detektion (zum 1. und 3. Lebensjahr) noch keine atopische Symptomatik entwickelt hatten. Eine Atopie lag für uns dann vor, wenn mindestens eine der atopischen Manifestationen, atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis und atopische Sensibilisierung, bei den Kindern diagnostiziert worden war. Abbildung 25 zeigt die Zahl der Kinder, die mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren noch keine atopische Symptomatik (weder atopische Dermatitis, Asthma bronchiale noch atopische Sensibilisierung) entwickelt hatten. Von den mit 1 Jahr untersuchten 362 Kinder lagen von 297 1-Jährigen Daten und von den mit 3 Jahren untersuchten 457 Kinder lagen von 407 3-Jährigen Daten zur atopischen Symptomatik (atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, atopische Sensibilisierung) vor. Mit 1 Jahr wiesen 84,9% ($n=252/297$) und mit 3 Jahren 78,9% ($n=321/407$) keine atopischen Manifestationen auf. Der Parameter „erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel“ wurde bei der Definition von „Atopie mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren“ vernachlässigt. Erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel (85. Perzentile) traten im Verhältnis zu den restlichen atopischen Parametern wesentlich häufiger auf, auch ohne entsprechende klinische Symptomatik. Um die Atopie-Kriterien zu präzisieren, beschränkte sich die Definition von „Atopie mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren“ auf die atopischen Manifestationen, atopischer Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis und atopische Sensibilisierung. Damit wurden einerseits einige „falsch negative Atopiker“ riskiert, es verringerte sich jedoch die Wahrscheinlichkeit, „falsch positive Atopiker“, in die Auswertung einzubeziehen.

Abbildung 25: Kinder ohne atopische Manifestationen (weder atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis noch atopische Sensibilisierung) zum 1. und 3. Lebensjahr

Fallzahlen (n) sind in der Grafik angegeben



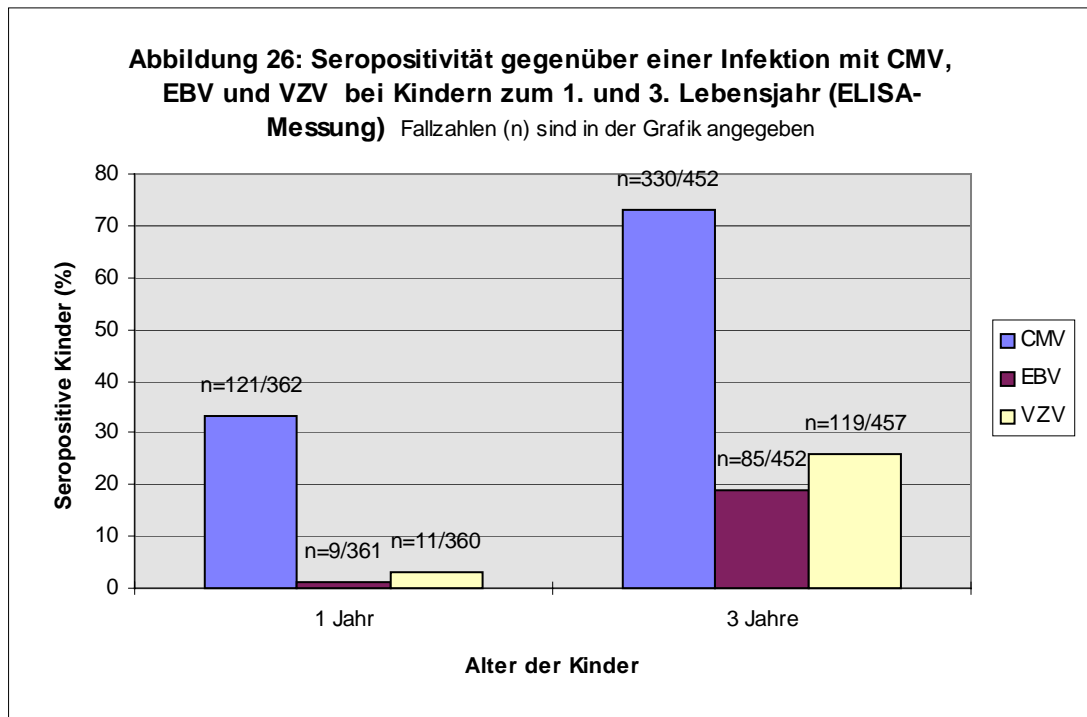
Geschlecht und Alter

Wir untersuchten insgesamt 672 Kinder, davon 351 Jungen (52,2%) und 321 Mädchen (47,8%) im Alter von 1 Jahr und 3 Jahren. Es standen uns Seren von 362 Kindern im Alter von 1 Jahr und 457 Kindern im Alter von 3 Jahren zur Verfügung.

Seropositivität

Von den getesteten Seren 1-jähriger Kinder waren für CMV 33,4% seropositiv (121 von 362), für EBV 1,3% seropositiv (9 von 361) und für VZV 3,1% seropositiv (11 von 360). Unter den 3-Jährigen waren für CMV 73,0% seropositiv (330 von 452), für EBV 18,8% seropositiv (85 von 452) und für VZV 26,0% seropositiv (119 von 457). Siehe Abbildung 26.

Der verwendeten ELISA Kit für EBV stellte sich als hoch sensitiv heraus, so daß auch mütterliche Antikörper bei den 1-Jährigen detektiert wurden. Den vom Hersteller empfohlenen Cut-Off mußten wir nachträglich von 20 auf 100 AU/ml verändern.



Familienanamnese

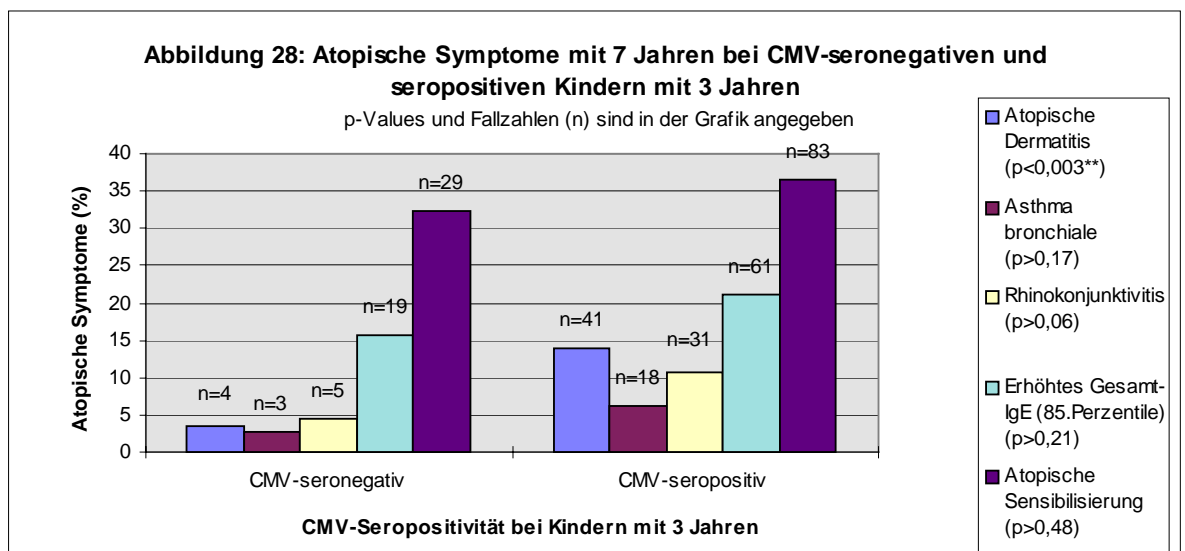
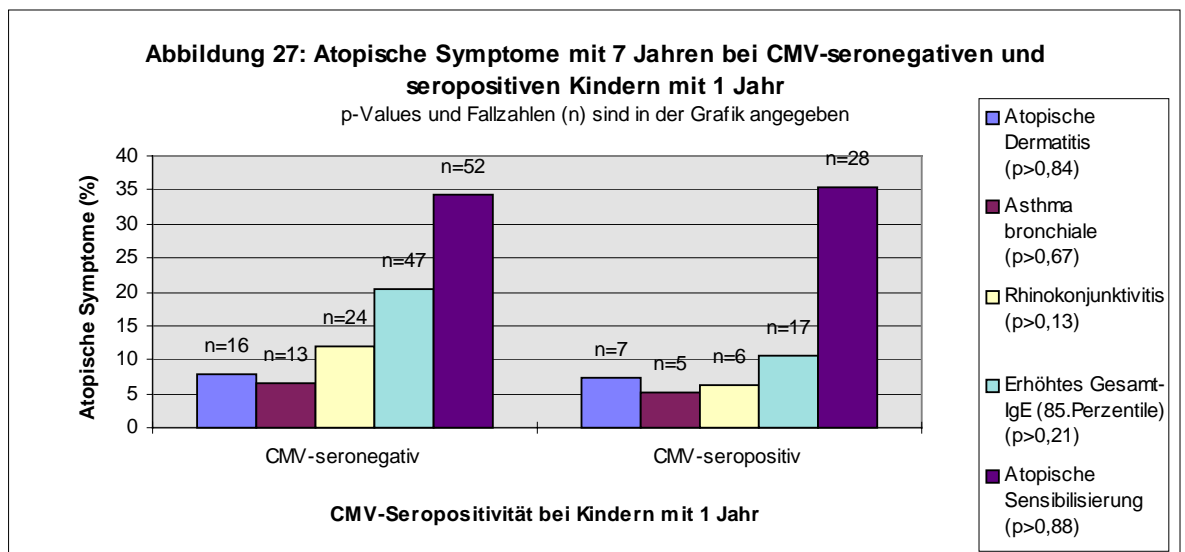
Hinsichtlich der Verteilung einer positiven Familienanamnese können wir festhalten, 45,8% aller Eltern wiesen ebenfalls atopische Symptome auf, 54,2% waren dementsprechend keine Atopiker. Es bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen atopischer Erkrankung beim Kind und positiver Familienanamnese. Kinder atopischer Eltern wiesen signifikant häufiger atopische Manifestationen auf, als Kinder von Eltern ohne Atopiemerkmale.

4.1.2. ELISA-(enzyme-linked immunosorbent assay)-Virus-spezifisches IgG

Unterschiede in den atopischen Manifestationen mit 7 Jahren zwischen seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren

Cytomegalie-Virus Infektion CMV

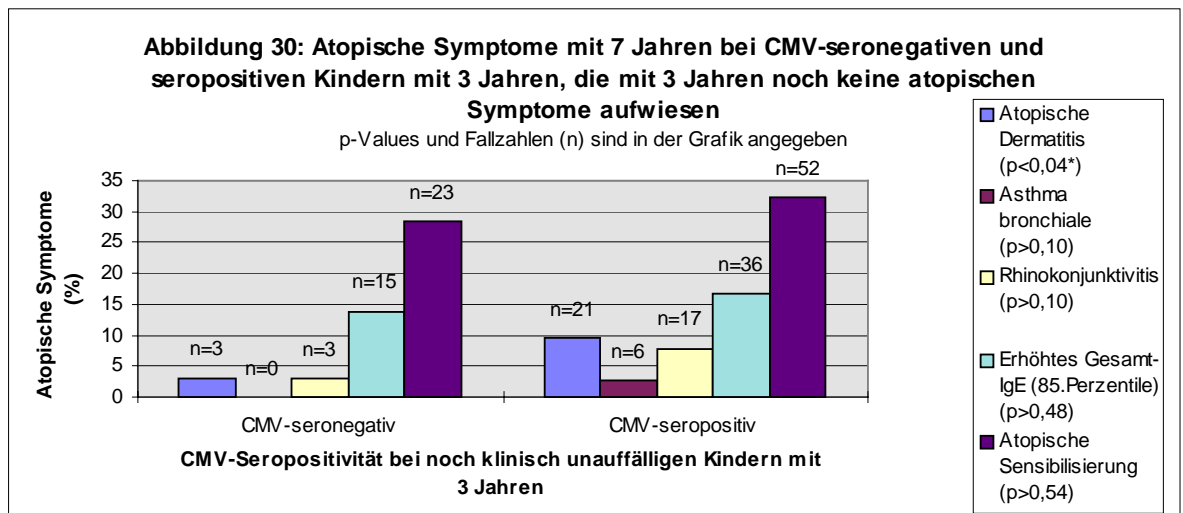
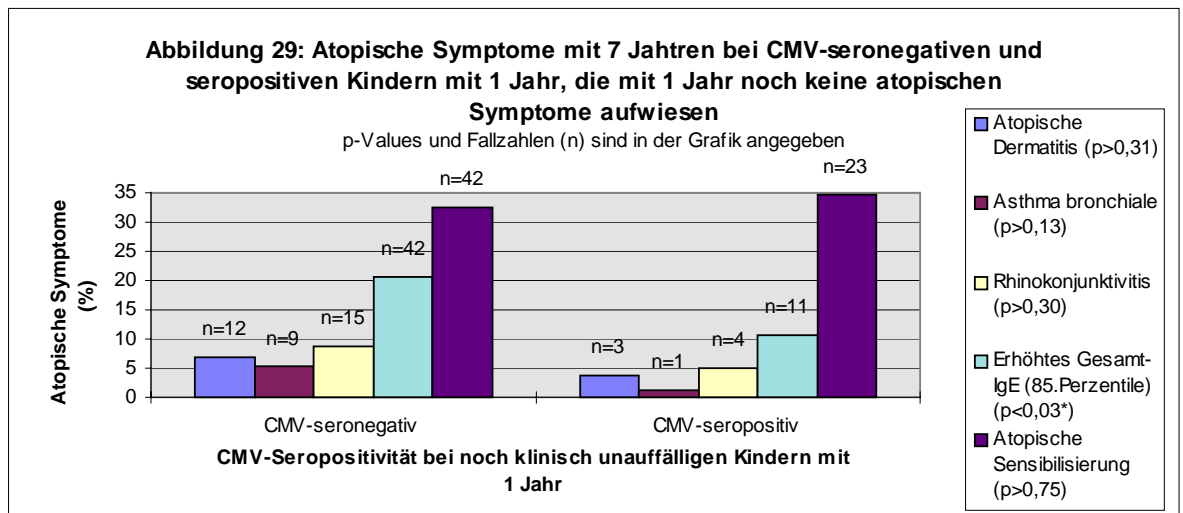
Die CMV-Seropositivität mit 1 Jahr hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren (Abbildung 27). Die mit 3 Jahren CMV-seropositiven Kinder zeigten mit 7 Jahren signifikant häufiger Symptome einer atopische Dermatitis als Kinder, die mit 3 Jahren seronegativ waren. Für die übrigen Manifestationen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden, (Abbildung 28).



Unterschiede in den atopischen Manifestationen mit 7 Jahren zwischen seronegativen und seropositiven Kindern ohne atopische Symptome mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren

Cytomegalie-Virus Infektion CMV

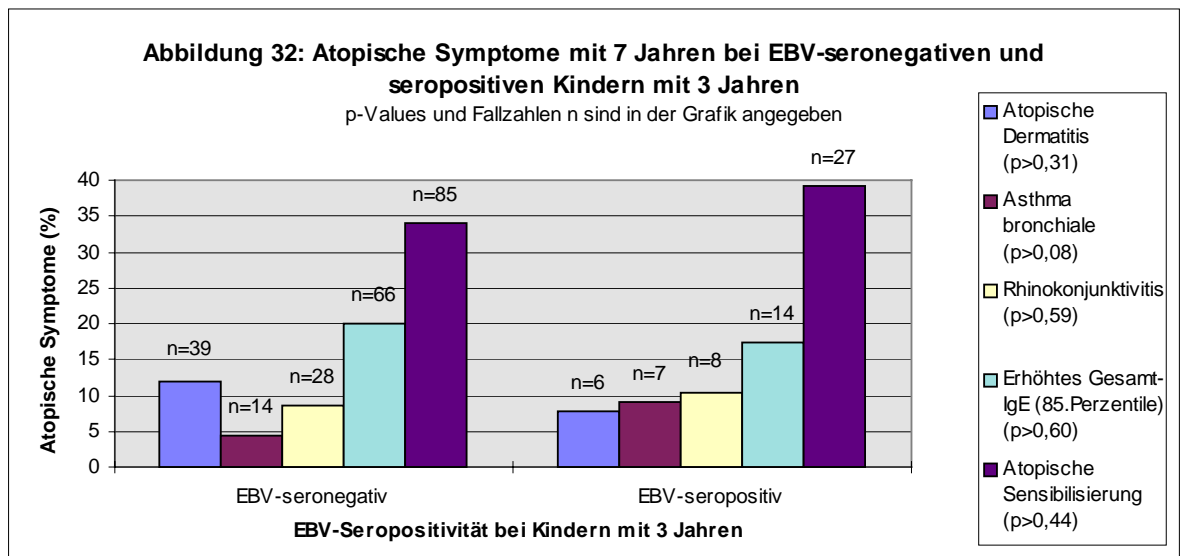
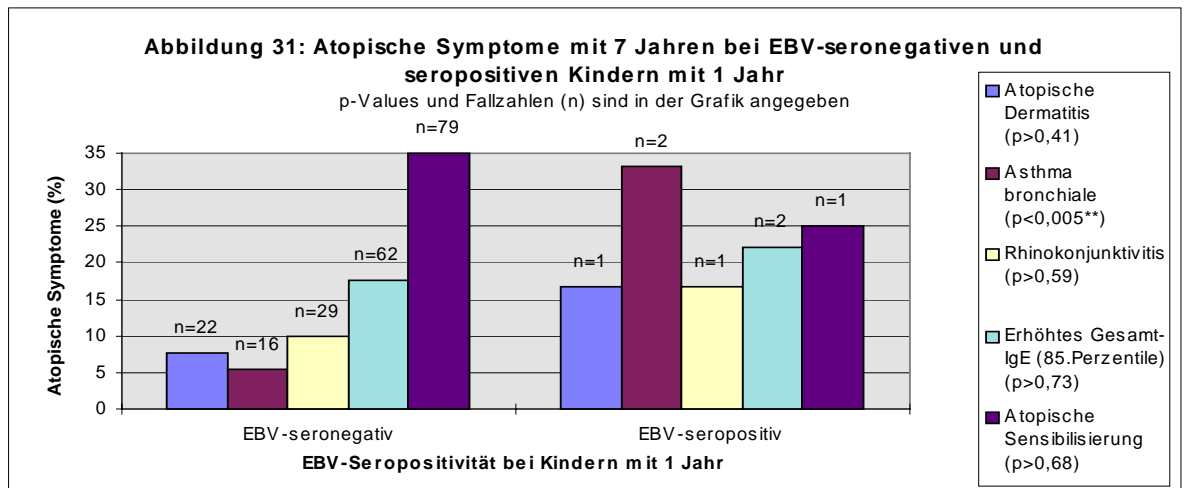
Die mit 1 Jahr klinisch noch unauffälligen CMV-seropositiven Kinder zeigten mit 7 Jahren signifikant seltener ein erhöhtes Gesamt-IgE (85. Perzentile) als Kinder, die mit 1 Jahr seronegativ waren. Für die übrigen Manifestationen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abbildung 29). Die mit 3 Jahren klinisch noch unauffälligen CMV-seropositiven Kinder zeigten mit 7 Jahren signifikant häufiger Symptome einer atopischen Dermatitis als Kinder, die mit 3 Jahren seronegativ waren. Für die übrigen Manifestationen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abbildung 30).



Unterschiede in den atopischen Manifestationen mit 7 Jahren zwischen seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren

Epstein-Barr-Virus Infektion EBV

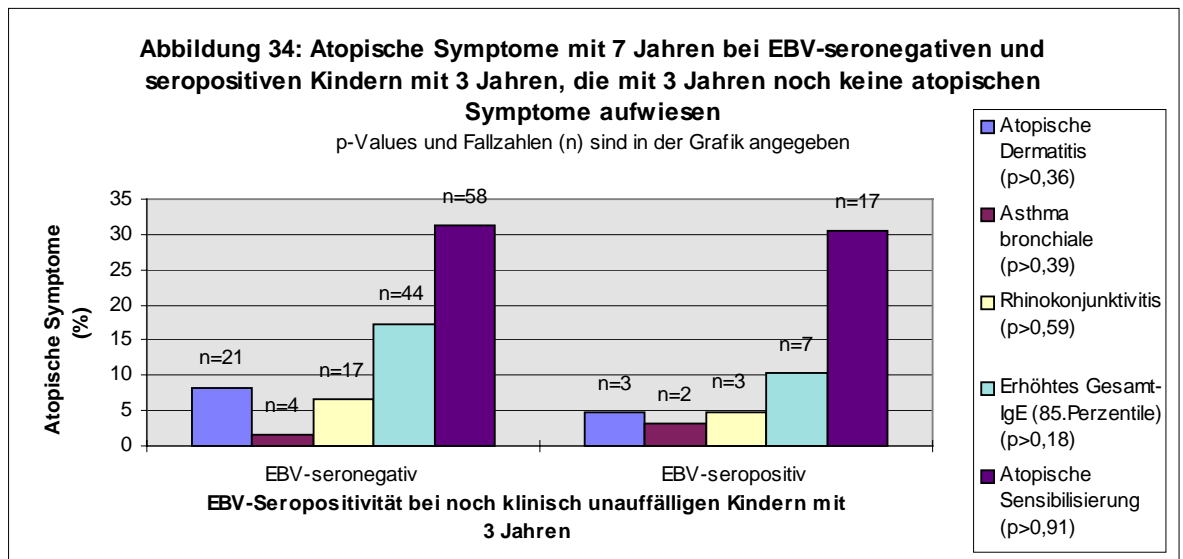
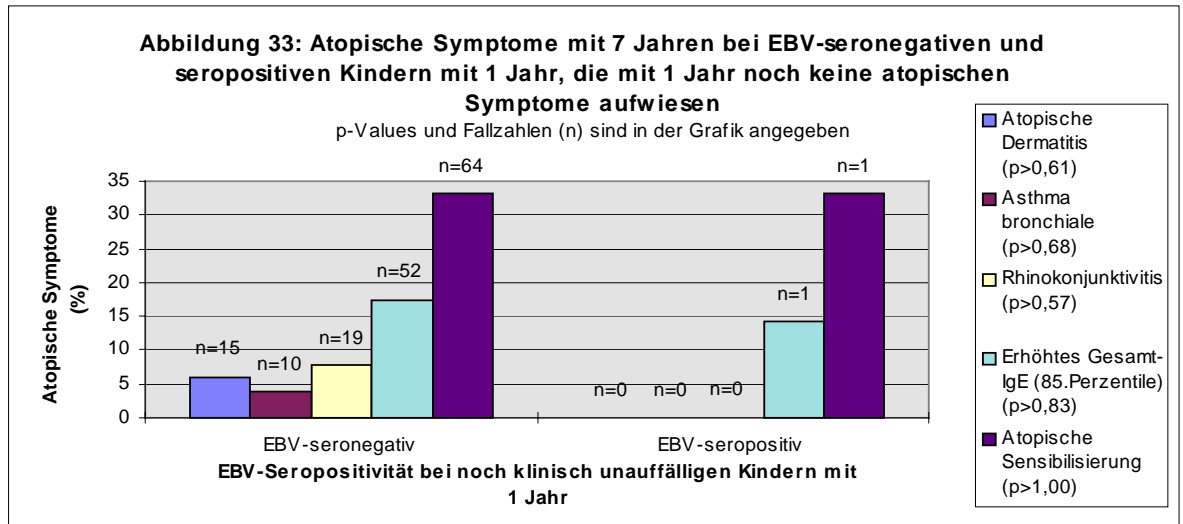
Die mit 1 Jahr EBV-seropositiven Kinder zeigten mit 7 Jahren signifikant häufiger Symptome eines Asthma bronchiale als Kinder, die mit 1 Jahr seronegativ waren. Für die übrigen Manifestationen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abbildung 31). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 3 Jahren EBV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 32).



Unterschiede in den atopischen Manifestationen mit 7 Jahren zwischen seronegativen und seropositiven Kindern ohne atopische Symptome mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren

Epstein-Barr-Virus Infektion EBV

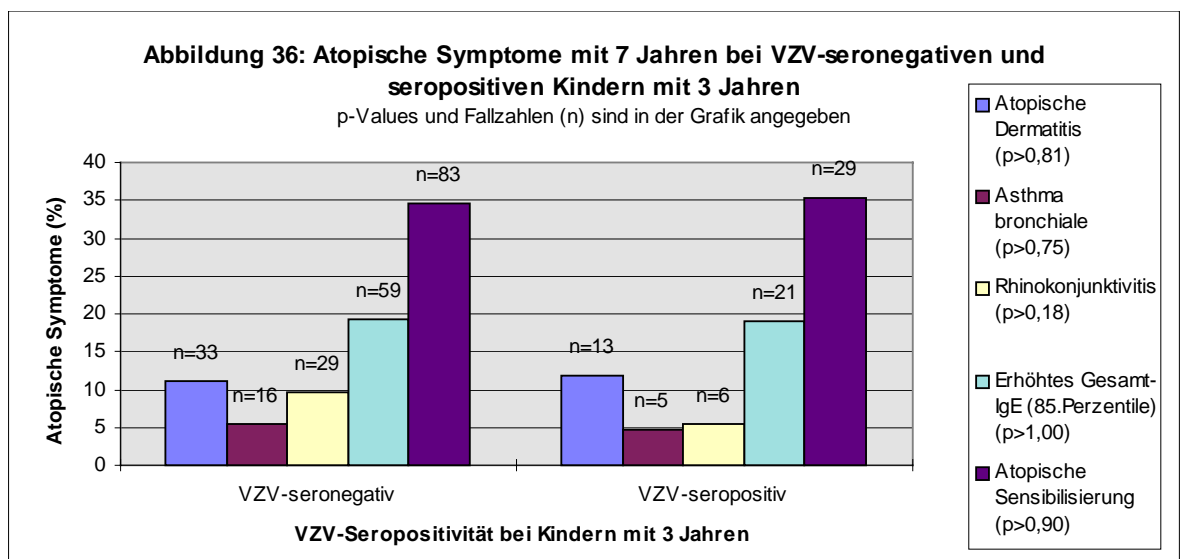
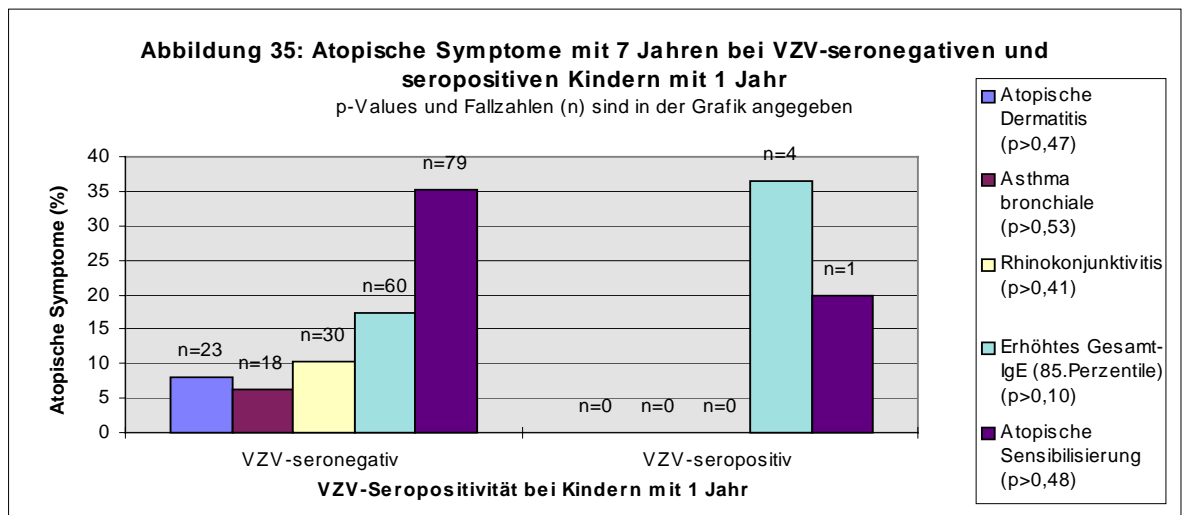
Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 1 Jahr klinisch noch unauffälligen EBV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 33). Es bestanden auch keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 3 Jahren klinisch noch unauffälligen EBV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 34).



Unterschiede in den atopischen Manifestationen mit 7 Jahren zwischen seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren

Varizella-Zoster-Virus Infektion VZV

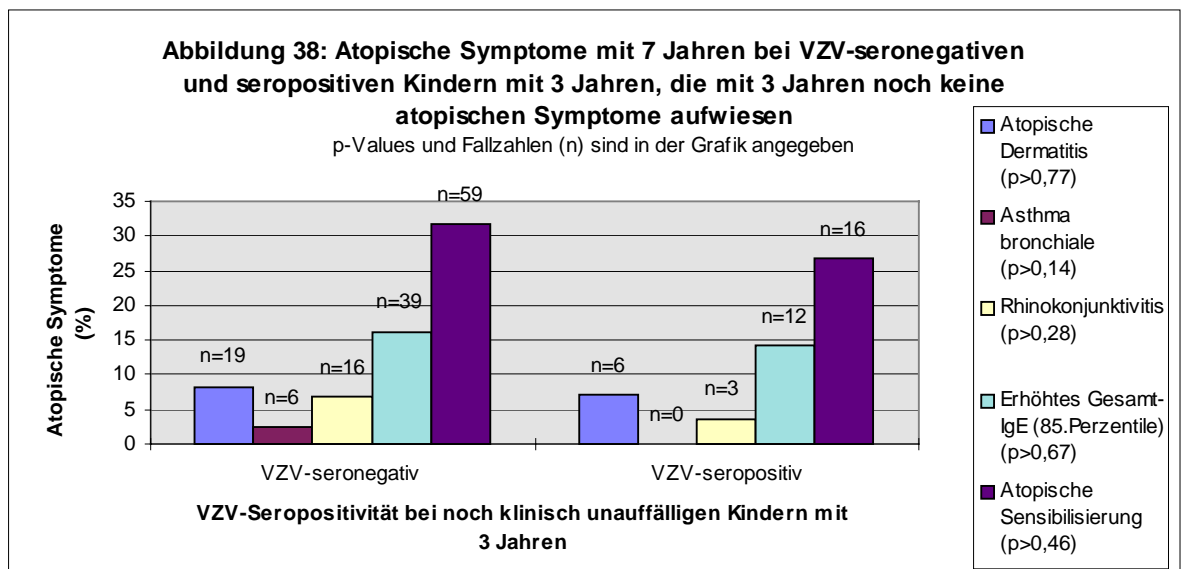
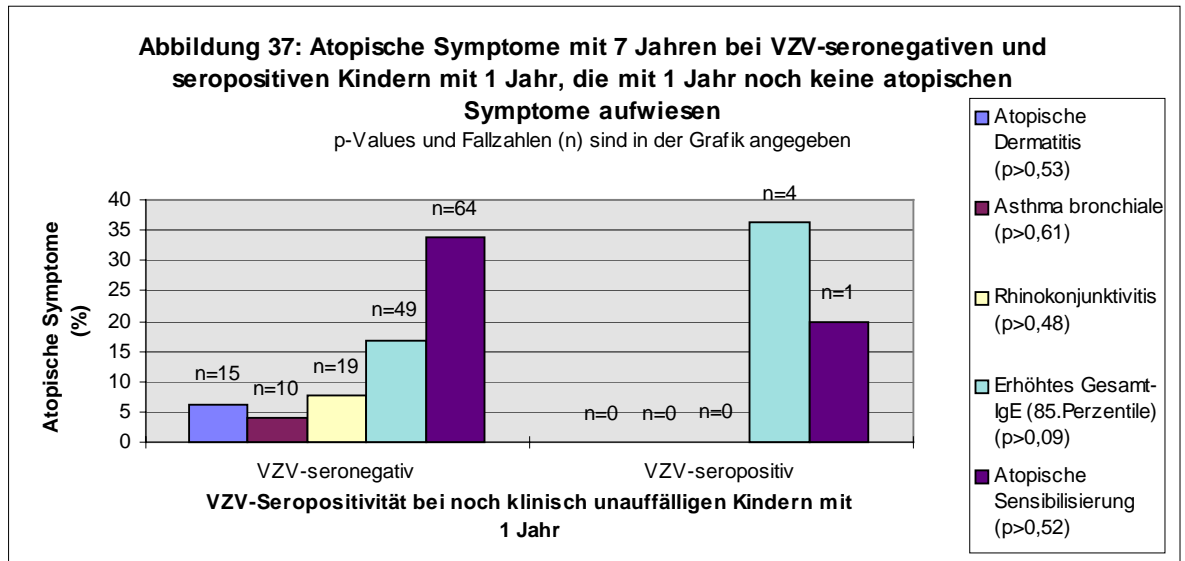
Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 1 Jahr VZV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 35). Es bestanden auch keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 3 Jahren EBV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 36).



Unterschiede in den atopischen Manifestationen mit 7 Jahren zwischen seronegativen und seropositiven Kindern ohne atopische Symptome mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren

Varizella-Zoster-Virus Infektion VZV

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 1 Jahr klinisch noch unauffälligen VZV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 37). Es bestanden auch keine signifikanten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Manifestationen mit 7 Jahren zwischen mit 3 Jahren klinisch noch unauffälligen VZV-seropositiven und seronegativen Kindern (Abbildung 34).



Kinder, die mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren seropositiv gegenüber den drei untersuchten Infektionen CMV, EBV und VZV waren, zeigten in der Tendenz mit 7 Jahren ebenso häufig Symptome atopischer Erkrankungen, wie ihre seronegativen Altersgenossen. Dennoch konnten für die Infektion mit CMV und EBV einzelne signifikante Unterschiede in der Prävalenz der atopischen Manifestationen zwischen seropositiven und seronegativen Kindern gezeigt werden. Kinder, die mit 3 Jahren CMV-seropositiv waren, zeigten mit 7 Jahren signifikant häufiger Symptome einer atopischen Dermatitis ($p < 0,003^{**}$). Diese Tendenz fand sich auch in der Untersuchung der klinisch noch unauffälligen 3-Jährigen. Kinder, die mit 3 Jahren CMV-seropositiv waren und zu diesem Zeitpunkt noch keine atopischen Symptome aufwiesen, zeigten mit 7 Jahren signifikant häufiger Symptome einer atopischen Dermatitis als ihre seronegativen Altersgenossen ($p < 0,04^*$). Hingegen zeigten Kinder, die mit 1 Jahr CMV-seropositiv waren und zu diesem Zeitpunkt noch keine atopischen Symptome aufwiesen, mit 7 Jahren signifikant seltener ein erhöhtes Gesamt-IgE (85. Perzentile) als Kinder, die mit 1 Jahr seronegativ waren ($p < 0,03^*$). Die Untersuchung der EBV-Infektion ergab, daß Kinder, die mit 1 Jahr seropositiv gegenüber einer EBV-Infektion waren, mit 7 Jahren signifikant häufiger Symptome eines Asthma bronchiale zeigten ($p < 0,005^{**}$). Jedoch war die Zahl der Seropositiven mit 1 Jahr relativ klein. Die Prävalenz atopischer Erkrankungen zeigte hinsichtlich der Infektion mit VZV zwischen seropositiven und seronegativen Kindern keine signifikanten Unterschiede.

Die Verteilung zusätzlicher Einflußgrößen der atopischen Symptomatik, wie Geschlecht und positive Familienanamnese zwischen den Gruppen der Seropositiven und Seronegativen wurde statistisch überprüft. Für die Gruppe mit signifikantem Unterschied, der Gruppe der 1-Jährigen mit erhöhtem Gesamt-IgE ergab sich, daß Kinder atopischer Eltern weniger häufig CMV-seropositiv waren. Gefundene Signifikanzen sind auch von anderen „Bias“ beeinflusst und daher nicht allein auf den Einfluß viraler Infektion zurückzuführen. Die errechneten signifikanten Unterschiede für die CMV-Infektion innerhalb der Gruppe der 3-Jährigen konnte durch die geringe Fallzahl in den Untersuchungsgruppen bei einer erweiterten Signifikanzberechnung (Yates-Korrektur) nicht bestätigt werden. Die Geschlechtsverteilung war in beiden Gruppen gleich. Die Ergebnisse der Untersuchung der humoralen Immunantwort zeigten für die Infektion mit CMV und EBV statistisch signifikante Unterschiede in der Prävalenz einiger atopischer Manifestationen zwischen seropositiven und seronegativen Kindern. Diese Unterschiede konnten jedoch durch die Ungleichverteilung zusätzlicher Einflußfaktoren („confounding variables“) und die geringe Fallzahl in den Untersuchungsgruppen bei einer erweiterten Signifikanzberechnung (Yates-Korrektur) nicht bestätigt werden. Auch wenn sich bei der graphischen Darstellung der Daten leichte Tendenzen abzeichnen müssen wir abschließend festhalten, daß die Daten keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit atopischer Erkrankungen zwischen seropositiven und seronegativen Kindern zeigen konnten. Kinder, die zum 1. bzw. 3. Lebensjahr seropositiv gegenüber den untersuchten Infektionen waren, zeigten mit 7 Jahren in der Tendenz ebenso häufig Symptome atopischer Erkrankungen wie seronegative Kinder. Die Arbeitsergebnisse konnten die Studienhypothese nicht stützen.

4.1.3. Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay-spezifisches CMV-IgE

Bisher liegen uns Daten von 456 Kindern im Alter von 3 Jahren vor. Unter diesen Kindern konnten insgesamt nur 2 Kinder als positiv gewertet werden. Eine statistische Auswertung der Unterschiede im Auftreten atopischer Symptome zwischen seropositiven und seronegativen Kindern, ist auf Grund der geringen Prävalenz von CMV-spezifischen IgE-Antikörpern im Moment nicht sinnvoll.

4.2. T-Zell-Reaktivität und Atopie

Für die immunologische Abwehr von Virusinfektionen sind die T-Zellen von entscheidender Bedeutung. Die Infektion mit dem Cytomegalie-Virus bewirkt im Organismus vor allem die Induktion einer TH1-Antwort. Dabei sezernieren die T-Zellen u.a. IL2, IFN-gamma, TNF-beta sowie GM-CSF und führen über Makrophagen-Aktivierung hauptsächlich zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern ermöglichen. Außerdem werden CD8+-zytotoxische T-Lymphozyten generiert, die MHC-Klasse-I-positive CMV-infiltrierte Zellen abtöten können. Der zweite Teil der Arbeit untersucht, ob periphere Blut-T-Lymphozyten von Kindern ohne atopische Symptome (nichtatopische Kinder) auf Stimulation mit CMV-Antigen bzw. Peptid häufiger bzw. stärker mit einer TH1-Antwort reagieren, als stimulierte T-Lymphozyten von Kindern mit atopischen Symptomen (atopische Kinder). Die TH1-Reaktivität wurde anhand einer IFN-gamma-Produktion nach Stimulation bewertet. Dabei war sowohl die prozentuale Produktionsmenge als auch die visuelle Abgrenzbarkeit einer IFN-gamma-produzierenden Zellpopulation von Bedeutung. Die Auswertung der T-Zell-Reaktivität auf Antigen (CD4) und Peptid (CD8) erfolgte getrennt sowie verbunden als „absolute T-Zell-Reaktivität“. Dabei galt diejenige Probe als „absolut reaktiv“, die entweder auf CMV-Antigen (CD4) und/ oder auf eines der CMV-Peptidgemische (CD8) mit einer IFN-gamma-Produktion reagiert hatte. Um eine schärfere Trennung von „stark reaktiven“ und „nicht reaktiven“ bzw. „wenig reaktiven“ Kindern und somit eventuell deutliche Tendenzen bei der statistischen Analyse zu erhalten, wurden aus der Gruppe der „reaktiven Kinder“ die „stark reaktiven Kinder“ („Highresponder“) ermittelt und mit der Gruppe der „nicht reaktiven“ bzw. „wenig reaktiven“ Kinder verglichen. Dabei galten Kinder mit IFN-gamma-produzierenden Zellpopulationen größer gleich 0,30% als „Highresponder“.

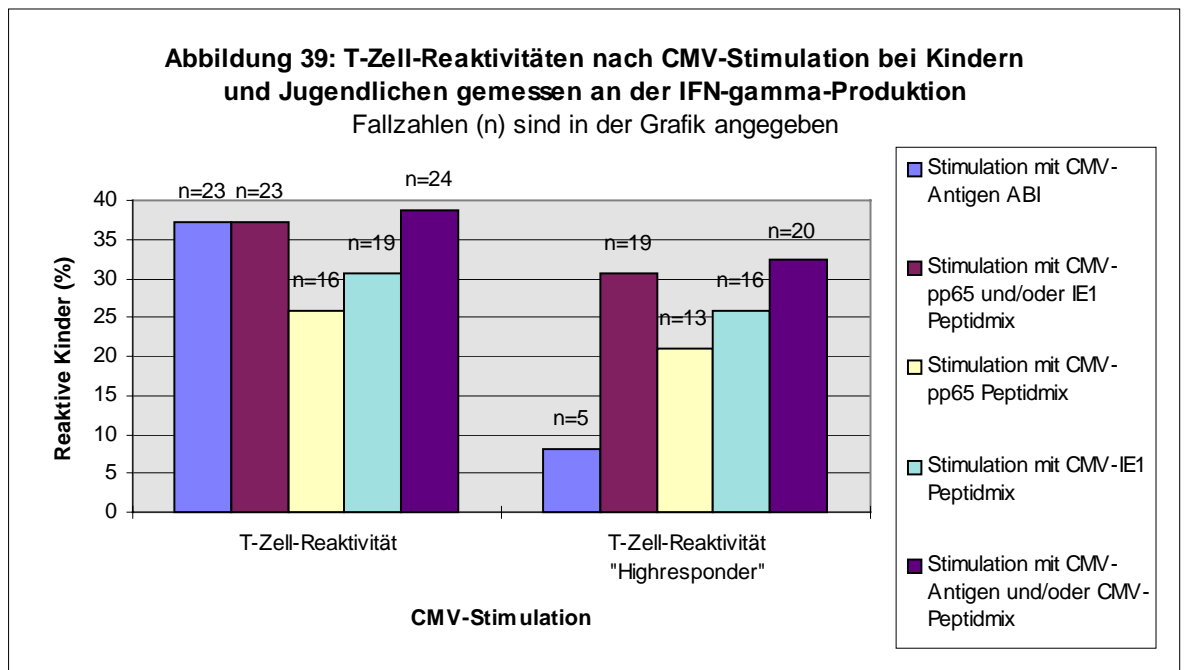
4.2.1. Häufigkeitsverteilungen

Geschlecht und Alter

Von den 62 untersuchten Kindern und Jugendlichen im Alter von 1 Jahr bis 12 Jahren waren 4,8% jünger als 3 Jahre, 1,6% jünger als 7 Jahre und 93,6% 7 Jahre und älter. Die Geschlechtsverteilung belief sich auf 40,3% Mädchen und 59,7% Jungen. Die Kinder und Jugendlichen zeigten in 21% der Fälle atopische Symptome (atopische Dermatitis, Asthma bronchiale oder Rhinokonjunktivitis). Hinsichtlich einer positiven Familienanamnese lässt sich festhalten, 43,3% der Mütter und 9,1% der Väter wiesen atopische Symptome auf.

Seropositivität und T-Zell-Reaktivität

Im Immulite ergab sich unter den 62 untersuchten Kindern und Jugendlichen im Alter von 1 Jahr bis 12 Jahren eine CMV-Seropositivität von 50%. Die Reaktivität nach Stimulation mit CMV-spezifischem Antigen lag bei 37,1%, „Highresponder“ waren 8,1%. Die T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit CMV-spezifischem Peptidgemisch lag insgesamt bei 37,1%, „Highresponder“ waren 30,6%. 25,8% reagierten auf den „pp65 Peptidmix“, „Highresponder“ waren 21,0%. 30,6% reagierten auf „IE1 Peptidmix“, 25,8% waren „Highresponder“. Die „absolute Reaktivität“ („Antigen und/ oder Peptidmix“) lag bei 38,7%, „Highresponder“ waren 32,3%, Abbildung 39.



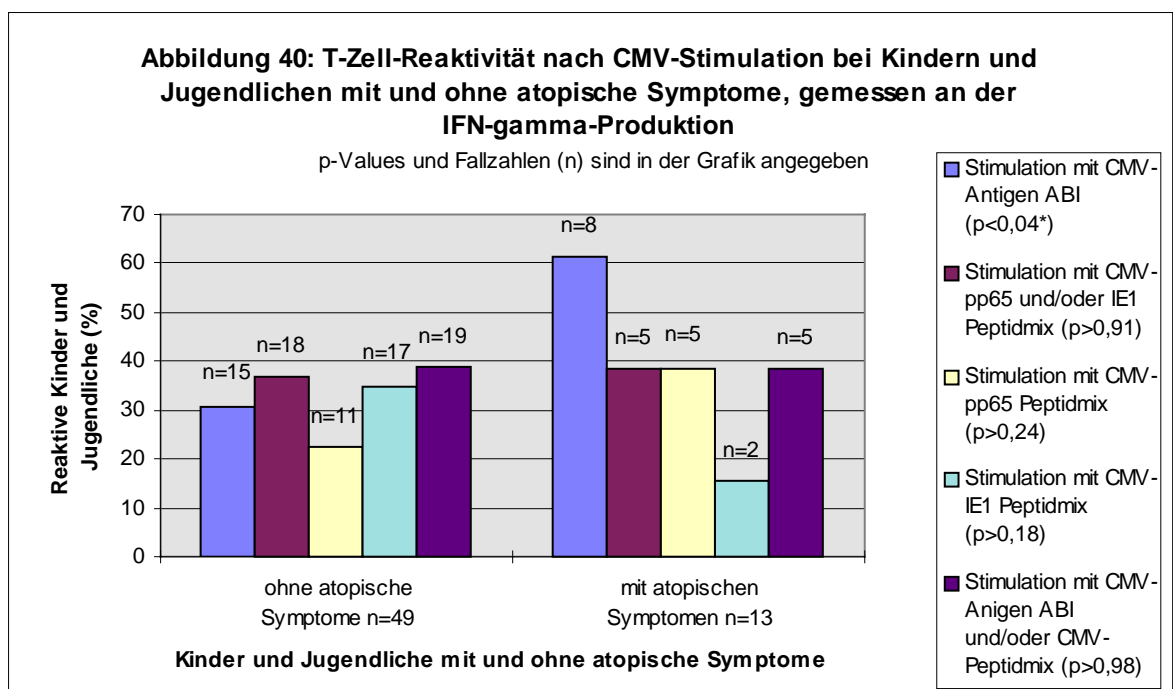
Die Ergebnisse über CMV-Seropositivität und T-Zell-Reaktivität, gewonnen durch Immulite und Facs-Analyse waren interessanterweise nicht übereinstimmend. Von den 31, der im Immulite CMV-seropositiv getesteten Kinder reagierten 71% (22 Kinder) auf Stimulation mit CMV-Antigen, 67,7% (21 Kinder) auf Stimulation mit CMV-spezifischem „pp65 und/ oder IE1 Peptidmix“. Im Einzelnen reagierten 45,2% der 31 seropositiven Kinder (14 Kinder) auf „pp65 Peptidmix“ und 58,1% (18 Kinder) auf „IE1 Peptidmix“. Auf eine Stimulation mit „Antigen und/ oder Peptidmix“ (pp65 oder IE1) reagierten 71% der Kinder (22 Kinder). Es läßt sich festhalten, daß die Kinder auf Antigen oder „Peptidmix“ etwa genauso häufig reagierten. Betrachtet man die Reaktivität auf „Peptidmix“ im Detail, so wird deutlich, die Kinder etwas häufiger auf „IE1-Peptidmix“ reagierten. Dieses Ergebnis läßt sich unter anderem durch die Varianz der HLA-Typen unter den untersuchten Kindern erklären. Zusammenfassend heißt dies, daß nur 22 von 31 (71%) CMV-seropositiven Kindern eine T-Zell-Reaktivität zeigten, während bei erwachsenen, gesunden CMV-seropositiven Blutspendern 100% auch T-Zell-reaktiv sind. Dies könnte auf eine geringere Frequenz CMV-reaktiver Memory-Zellen bei zumindest einem Teil der Kinder aufgrund seltener CMV-Reaktivierungen hindeuten.

4.2.2. T-Zell-Reaktivität nach CMV-Stimulation

Unterschiede in der T-Zell-Reaktivität nach CMV-Stimulation zwischen Kindern und Jugendlichen mit und ohne atopische Symptome

(Reaktivität gemessen an der IFN-gamma-Produktion)

CD4+-T-Lymphozyten von Kindern und Jugendlichen ohne atopische Symptome reagierten weniger häufig mit einer IFN-gamma-Produktion nach Stimulation mit CMV-Antigen, als von Kindern und Jugendlichen mit atopischen Symptomen ($p < 0,04^*$). Die IFN-gamma-Produktion der CD8+-T-Lymphozyten nach Stimulation mit CMV-Peptidgemischen unterschied sich bei Kindern und Jugendlichen mit und ohne atopische Symptome nicht signifikant, Abbildung 40.



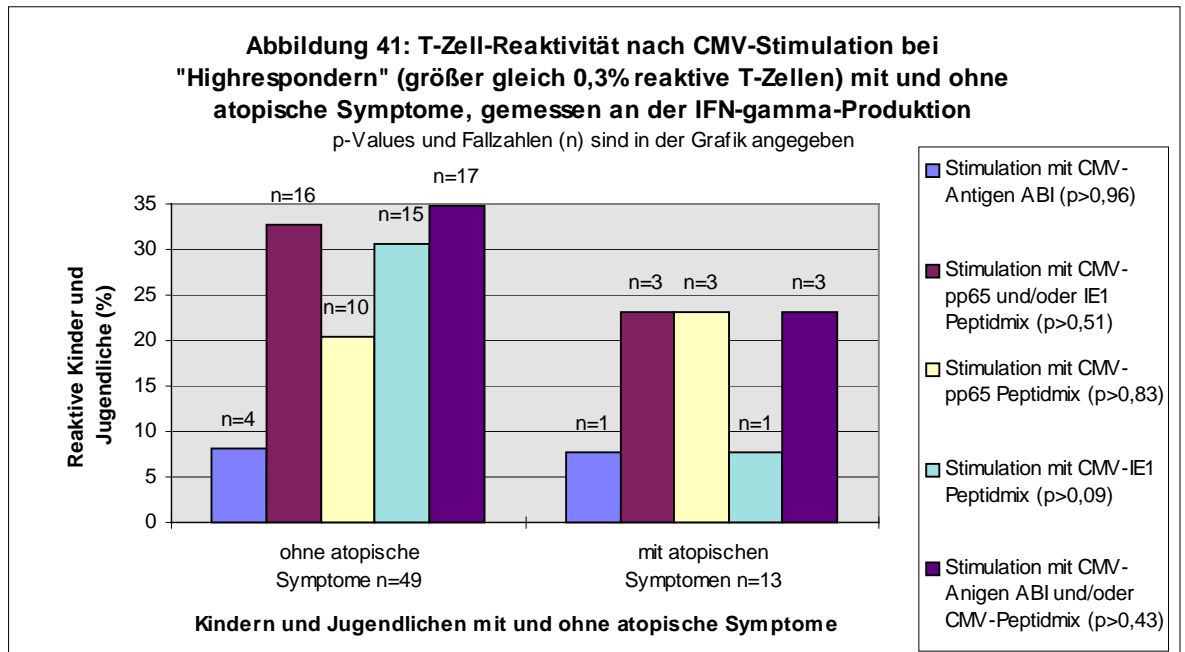
Die errechnete Signifikanz konnte durch die geringe Fallzahl in den Untersuchungsgruppen bei einer erweiterten statistischen Berechnung (Yates-Korrektur) nicht bestätigt werden.

Die Verteilung von positiver Familienanamnese und Geschlecht war in den Gruppen gleich.

Unterschiede in der T-Zell-Reaktivität nach CMV-Stimulation zwischen Kindern und Jugendlichen mit und ohne atopische Symptome

(Reaktivität bei „Highrespondern“ gemessen an der IFN-gamma-Produktion)

Die IFN-gamma-Produktion der T-Lymphozyten von „Highrespondern“ ($\geq 0,3\%$ reaktive T-Lymphozyten) nach CMV-Stimulation unterschied sich bei Kindern und Jugendlichen mit und ohne atopische Symptome nicht signifikant, Abbildung 41.



Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit CMV-spezifischem Antigen und/ oder „Peptidgemisch“, sowohl pp65 als auch IE1, zwischen Kindern mit und ohne atopische Symptome. Die Verteilung von positiver Familienanamnese und Geschlecht war in den Gruppen gleich.

Die Ergebnisse der Untersuchung von T-Zell-Reaktivitäten nach viraler Stimulation bei Kindern und Jugendlichen konnten die Arbeitshypothese der Studie nicht stützen.

5. DISKUSSION

Die Ergebnisse der Studie konnten die Hypothese des protektiven Effektes viraler Infektionen im 1. und 3. Lebensjahr auf die Entstehung von Allergien nicht bestätigen. Die Untersuchung der Serologie ergab, daß sich die Häufigkeit atopischer Manifestationen zwischen hinsichtlich der drei untersuchten Virusinfektionen seropositiven und seronegativen Kindern statistisch gleich verteilt ist. Auch auf zellulärer Ebene (CD4+- und CD8+-T-Lymphozyten) zeigte sich, daß Kinder ohne atopische Symptome ebenso häufig bzw. stark („Highresponder“) mit einer TH1-Immunantwort in Form einer IFN-gamma-Produktion reagierten wie Kinder mit atopischen Symptomen.

5.1. Humorale Immunantwort und Atopie

Die Untersuchung auf humoraler Ebene zeigte, daß atopische Manifestationen zum 7. Lebensjahr bei Kindern, die mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren gegenüber der Infektion mit CMV, EBV oder VZV seropositiv waren, ebenso häufig auftraten wie bei ihren seronegativen Altersgenossen. Die gezeigten Unterschiede in der Prävalenz atopischer Erkrankungen zwischen seropositiven und seronegativen Kindern waren insgesamt statistisch nicht signifikant. Obwohl die Anzahl der untersuchten Kinder mit 672 relativ groß war, entstanden im Rahmen der statistischen Analyse häufig Auswertungsgruppen mit weniger als 5 Kindern. Dieser Umstand erschwerte die Signifikanzberechnung erheblich und führte dazu, daß allein durch die geringe Fallzahl signifikante Unterschiede nicht berechnet werden konnten. Die kleinen Fallzahlen in den Gruppen entstanden u.a. durch die geringe Prävalenz von Seropositivität. Dies galt insbesondere für die Infektion mit EBV und VZV im ersten Lebensjahr.

Bei der Detektion von EBV-IgG Antikörpern wurden vom Kit zusätzlich mütterliche Antikörper gemessen. Der vom Hersteller empfohlenen Cut-Off wurde von 20 auf 100 AU/ml angehoben. Dies entsprach genau dem Grenzwert der Antikörperkonzentration, bei der ein mit 1 Jahr seropositives Kind, mit 3 Jahren seronegativ war. Die Prävalenz der EBV-Infektion entsprach nach Korrektur mit 1,3% mit 1 Jahr und 18,8% mit 3 Jahren den epidemiologisch ermittelten Werten der gleichaltrigen Durchschnittsbevölkerung (10-25% der 1- bis 3-Jährigen) (86).

Die Prävalenz der CMV-Infektion lag mit 33,4% mit 1 Jahr und 73% mit 3 Jahren im Vergleich zur gleichaltrigen Normalbevölkerung (28- bis 45% unter 2- bis 16-Jährigen) (51) relativ hoch. Die serologischen Ergebnisse im Rahmen der Untersuchung auf zellulärere Ebene ergaben unter den 1- bis 12-Jährigen, einer Population, die sich von den Kindern der MAS-Studie unterschied, eine Prävalenz von 50%. Dies entspricht in etwa der Prävalenz der CMV-Infektion unter gleichaltriger Durchschnittsbevölkerung. Die Prävalenz unter erwachsener Normalbevölkerung liegt bei über 60%. Ein Grund für die hohe Prävalenz der CMV-Infektion unter den jüngeren Kindern der MAS-Studie könnte die Zusammenstellung der Population sein. Bei den in der MAS-Studie untersuchten Kindern handelt es sich um eine Risikogruppe. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion lag für die rekrutierten Kinder durch häufigeren Krankenhauskontakt höher als für Kinder der Durchschnittsbevölkerung.

Die Prävalenz der VZV-Infektion (1 Jahr: 3,1%, 3 Jahre: 26%) lag in der epidemiologischen Norm (10-25% unter 1- bis 3-Jährigen) (86).

Der Zusammenhang zwischen Infektion und atopischen Symptomen wurde auf zweierlei Weise bewertet. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede in der Häufigkeit atopischer Symptome mit 7 Jahren zwischen seropositiven und seronegativen Kindern mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren erfolgte sowohl mit als auch ohne Berücksichtigung der atopischen Symptome der Kinder mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren.

Diese Form der Auswertung steht ganz im Sinne der Hypothese, daß Infektionen nur dann vor Allergie im späteren Leben schützen können, wenn zum Zeitpunkt der Infektion noch keine atopischen Symptome aufgetreten waren. Bei Kindern, die bereits allergische Symptome aufweisen, wäre demnach eine TH1-TH2-Dysbalance schon manifest und eine virale TH1-Induktion könnte ihre potentiell protektive Wirkung kaum noch entfalten.

Die Studie nimmt die Auswertung anhand zweier Untersuchungsgruppen vor. Die eine Gruppe von Kindern zeigt zum Zeitpunkt der Antikörper-Detektion schon atopische Symptome. Die andere Gruppe von Kindern zeigt zum Zeitpunkt der Antikörper-Detektion noch keine atopischen Symptome.

Somit konnte nicht nur festgestellt werden, ob ein protektiver Effekt viraler Infektion auf die Allergieentstehung existiert, sondern auch, ob der Zeitpunkt der Infektion für die Allergieentstehung bedeutsam ist.

Die insgesamt geringe Anzahl seropositiver Kinder vor allem hinsichtlich der Infektion mit EBV und VZV könnte eine mögliche Ursache dafür sein, daß signifikante Unterschiede insbesondere für die CMV-Infektion zu finden waren, hier konnte mit einer höheren Anzahl seropositiver Kinder gearbeitet werden.

Die Daten ergaben, daß Kinder, die mit 1 Jahr CMV-seropositiv waren und zu diesem Zeitpunkt noch keine atopischen Manifestationen zeigten, mit 7 Jahren seltener einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel aufwiesen. Diese Ergebnisse konnten jedoch einer genaueren Überprüfung nicht standhalten. Neben der viralen Infektion wurden weitere mögliche Einflußgrößen der Allergieentstehung überprüft, wie positive Familienanamnese (Kinder atopischer Eltern erkranken häufiger an atopischen Erkrankungen als Kinder nonatopischer Eltern) und Geschlecht (Jungen erkranken im frühen Kindesalter häufiger an Asthma bronchiale als Mädchen). Bei der Überprüfung der Verteilung dieser Einflußgrößen innerhalb der Gruppen, stellte sich eine ungleiche Verteilung der positiven Familienanamnese fest. Für die untersuchte Gruppe der 1-jährigen Kinder ohne atopische Symptome ergab sich, daß Kinder atopischer Eltern weniger häufig CMV-seropositiv waren, als 1-jährige Kinder, deren Eltern keine Atopiker waren. Die zuvor ermittelten signifikanten Unterschiede in der atopischen Manifestation der Kinder mit 7 Jahren können somit nicht allein auf die unterschiedliche Seropositivität der Kinder zurückgeführt werden.

Auch die Signifikanzen für die CMV-Infektion innerhalb der Gruppe der 3-jährigen Kinder ohne atopische Symptome konnten durch die geringe Fallzahl in den Untersuchungsgruppen bei einer erweiterten Signifikanzberechnung (Yates-Korrektur) nicht bestätigt werden. Dies gilt auch für die ermittelten Signifikanzen hinsichtlich der EBV-Infektion bei 1-jährigen und der CMV-Infektion bei 3-jährigen Kindern, die unabhängig von ihren atopischen Symptomen mit 1 Jahr bzw. 3 Jahren untersucht wurden.

Die Prävalenz atopischer Erkrankungen unter den Kindern entsprach den epidemiologischen und klinischen Erfahrungen (58, 75). Die atopische Dermatitis lag mit 3 Monaten bei 3,2% und stieg bis zum 7. Lebensjahren auf 11% an. Die Prävalenz des Asthma bronchiale nahm von 2,7% mit 3 Monaten auf 5,9% mit 7 Jahren zu. Die Prävalenz der Rhinokonjunktivitis stieg von 3% mit 3 Monaten auf 10,5% mit 7 Jahren kontinuierlich an.

Die Abhängigkeit von viraler Infektion und erhöhtem Gesamt-IgE-Spiegel wurde für verschiedene Perzentilen (50. Perzentile bis 95. Perzentile) untersucht. Bei der Auswertung ergaben sich lediglich signifikante Unterschiede für die 85. Perzentile.

Nachfolgende Angaben beziehen sich daher immer auf die 85. Perzentile. Die Prävalenz von erhöhtem Gesamt-IgE lag mit 1 Jahr bei 15,9% und stieg bis zum 7 Jahr auf 19% an. Sensibilisiert waren mit 1 Jahr 9,6% und mit 7 Jahren bereits 36,1% der untersuchten Kinder. Wie sinnvoll die Analyse von Gesamt-IgE und spezifischem IgE als Allergie-Prädiktor ist, lässt sich diskutieren. Während eine starke Assoziation zwischen spezifischem IgE (Nahrungsmittel-, Wohnraum-, „Outdoor“-Allergene) und atopischer Sensibilisierung besteht (69), konnte kein prädiktiver Effekt von erhöhtem Nabelschnur IgE gefunden werden (17).

Die Ergebnisse der Studie können die Hypothese eines protektiven Effekts einer viralen Infektion der Herpesgruppe auf die Allergieentstehung nicht stützen.

5.2. T-Zell-Reaktivität und Atopie

Auch die Untersuchung auf zellulärer Ebene zeigte keine Unterstützung der Arbeitshypothese. Kinder ohne atopische Symptome reagierten in der Tendenz ebenso häufig mit einer TH1-Immunantwort auf virale Stimulation mit CMV wie Kinder ohne atopische Erkrankungen. Dies galt sowohl für die Stimulation mit CMV- Antigen (CD4-Antwort) als auch mit CMV-„Peptidgemisch“ (CD8-Antwort).

Um zusätzliche Einflußgrößen der T-Zell-Reaktivität zu berücksichtigen, wurden Daten über immunsupprimierende Medikation, akute bzw. chronische Infektionskrankheiten und familienanamnestische Gesichtspunkte erfaßt. Immunsupprimierende Medikamente wie Kortikoide, nahmen 14,3% der Kinder ein, 11,2% wiesen einem akuten Infekt, 18,9% chronisch entzündliche Erkrankungen, wie Morbus Crohn u.a., auf.

Die zusätzlichen Einflußfaktoren wurden bei der statistischen Analyse berücksichtigt. Sowohl akute als auch chronische Infektionen können die T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit CMV- Antigen bzw. Peptidmix beeinflussen. Daher wurden Kinder, die zusätzliche Einflußgrößen, wie Infektionen oder immunsupprimierende Medikationen aufwiesen, nicht in die Auswertung miteinbezogen. Von den insgesamt 100 untersuchten Kindern zeigten insgesamt 62 Kinder keine zusätzlichen Einflußgrößen. Diese 62 Kinder wurden in die statistische Analyse miteinbezogen.

Die Geschlechtsverteilung der untersuchten Kinder und Jugendlichen im Alter zwischen 1 Jahr und 12 Jahren lag bei 40,3% Mädchen und 59,7% Jungen. Die mit Immulite bestimmte Seropositivität gegenüber der CMV Infektion lag mit 50% im bevölkerungsbezogenen Durchschnitt (51). Die Prävalenz von atopischen Erkrankungen lag bei 21%. Als Atopiker galten alle die Kinder und Jugendliche, die bis zum Zeitpunkt der Befragung und/ oder zum Zeitpunkt der Befragung mindestens eine der drei klassischen atopische Erkrankung (atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis) aufwiesen. Hinsichtlich einer positiven Familienanamnese läßt sich festhalten, 43,3% der Mütter und 9,1% der Väter zeigten atopische Symptome.

Die Erfassung der atopischen Erkrankungen erwies sich im zweiten Teil der Studie als problematisch.

Bei der Datenrekrutierung waren wir auf Angaben verschiedener Ärzte und verschiedener Einrichtungen angewiesen. Dies hatte zur Folge, daß bei der Einschätzung des atopischen Status der Kinder, im Vergleich zur standardisierten Erfassung atopischer Manifestationen (Scoring-System) der MAS-Studie, im zweiten Teil der Arbeit mitunter voneinander differierende Bewertungskriterien der Atopie vorlagen. Der für die Studie entwickelte Fragebogen konnte jedoch bedingt einheitliche Bewertungskriterien sicherstellen.

Die Reaktivität, gemessen an der IFN-gamma-Produktion nach Stimulation mit CMV-Antigen und „Peptidmix“ verteilte sich wie folgt: 37,1% der Kinder reagierte auf CMV-Antigen und ebenfalls 37,1% auf CMV-„Peptidmix“, 30,6% reagierten auf „IE1-Peptidmix“ und 25,8% reagierten auf „pp65 Peptidmix“. Insgesamt reagierten 38,7% der Kinder auf „Antigen und/ oder Peptidmix“. Die T-Zell-Reaktivität lag somit etwas unter den im Immulite ermittelten CMV-Seropositivität von 50%. Dies bedeutet, daß nicht alle im Immulite CMV-seropositiv getesteten Kinder nach Stimulation mit einer IFN-gamma-Produktion reagierten. Insgesamt reagierten die Kinder etwas häufiger nach Stimulation mit „IE1 Peptidmix“ als nach Stimulation mit „pp65 Peptidmix“. Dieser Unterschied war jedoch geringfügig (4,8%). Zusammenfassend heißt dies, daß nur ein Teil (71%) der CMV-seropositiven Kindern eine T-Zell-Reaktivität zeigten, während bei erwachsenen, gesunden CMV-seropositiven Blutspendern 100% auch T-Zell-reaktiv sind. Dies könnte auf eine geringere Frequenz CMV-reaktiver Memory-Zellen bei zumindest einem Teil der Kinder aufgrund seltener CMV-Reaktivierungen hindeuten. Die Verteilung von positiver Familienanamnese und Geschlecht war in den Gruppen etwa gleich.

Der Zusammenhang zwischen Infektion und Atopie wurde beleuchtet, indem der atopische Status der Kinder mit der T-Zell-Reaktivität verglichen wurde.

Es zeigten sich keine statistischen Unterschiede hinsichtlich der TH1-Antwort nach viraler Stimulation mit CMV zwischen Kindern und Jugendlichen mit und ohne atopische Symptome. Es ergab sich nur für die Stimulation mit CMV-Antigen eine statistische Signifikanz. Diese konnte jedoch durch die geringe Fallzahl in den Untersuchungsgruppen einer statistischen Überprüfung (Yates-Korrektur) nicht standhalten.

5.3. Hypothese der vorliegenden Studie

Sowohl die Untersuchung auf humoraler Ebene als auch der T-Zell-Reaktivität lieferten keine überzeugenden Hinweise auf einen protektiven Einfluß viraler Infektionen der Herpesgruppe in den ersten Lebensjahren hinsichtlich einer späteren Allergieentstehung.

Ein Grund für die Schwierigkeiten bei der Signifikanzberechnung könnte darin bestehen, daß für den Untersuchungszeitraum nach 1 Jahr bzw. 3 Jahren die T-Zell-Reifung bereits eine TH1-TH2-Dysbalance produziert hat. Es wäre interessant, frühere Zeitpunkte als das 1. Lebensjahr als „immunologischen Prägungszeitraum“ zu untersuchen, auch wenn dies eine noch geringere Prävalenz von Infektionen zur Folge hätte. Es bleibt abzuwarten, ob in den folgenden Jahren die MAS-Daten der Kinder jenseits des 7. Lebensjahres, neue Erkenntnisse bringen.

Sinnvoll scheint auch die Untersuchung weiterer Infektionen. Allein die Einbeziehung einer Vielzahl von Infektionen könnte einen umfassenden Einblick in den Zusammenhang zwischen Infektion und der Entstehung atopischer Erkrankungen bieten.

Das Für und Wider in der Diskussion um den Einfluß viraler Infektion auf die Entstehung von Allergien wird seit Jahren widersprüchlich diskutiert.

Die Gruppe um Strannegard IL untersuchte den Einfluß der BCG-Impfung und fand keine Unterstützung für die Hypothese, daß frühe Infektionen einen suppressiven Effekt auf die Entstehung von Allergien haben. Unter Verwendung eines Fragebogens und Prick-Tests wurden atopische Manifestationen unter mehr als 6000 schwedischen Kindern untersucht. Geimpfte Kinder wiesen keine niedrigere Allergie-Prävalenz auf, als ihre ungeimpften Altersgenossen. Die Häufigkeit von Prick-Test-Reaktivitäten auf Mycobacterien waren in den Gruppen etwa gleich verteilt. Allerdings gab es die Tendenz einer stärkeren Prick-Test-Reaktivität in der Gruppe der nicht allergischen Kinder (72).

In einer retrospektiven Kohortenstudie wurden 216 Kinder mit positiver atopischer Familienanamnese, die in Stockholm von 1989 bis 1992 geboren wurden, untersucht. Die 216 Kinder erhielten vor dem 6. Lebensmonat eine BCG-Impfung. Die atopischen Manifestationen wurden von 1995-96 erfaßt und mit denen, gleichaltriger Kinder ohne BCG-Impfung verglichen. Die frühe Impfung bei Kindern mit atopischer Belastung zeigte keinen Effekt auf mögliche atopische Erkrankungen der Kinder im Vorschulalter (2). Dabei ist der Einfluß einer positiven atopischen Familienanamnese hinsichtlich des protektiven Effekt der Infektionen noch nicht vollständig geklärt. Der Einfluß viraler Infektion auf die Entstehung von Allergien bei Kindern, die ohnehin schon atopisch vorbelastet sind, muß anders bewertet werden als bei Kindern ohne positive atopische Familienanamnese. Einerseits könnte die Prägung durch genetische Faktoren so stark, daß ein möglicher Einfluß von Infektion bzw. Schutzimpfungen überlagert wird. Andererseits deuten Studienergebnisse darauf hin, daß ein Schutzeffekt von Infektionen im frühen Kindesalter eher bei Kindern mit positiver atopischer Familienanamnese zum tragen kommt.

Eine Studie mit 669 Kindern im Alter von 7 Monaten bis 2 ½ Jahren zeigte einen Zusammenhang zwischen einer Impfung mit Pertussis-Vaccine und Asthma im Alter von 2 ½ Jahren (55). Unumstritten ist, daß neben den Infektionen auch andere Faktoren, wie Genetik, Ernährung oder Luftverschmutzung, an der Allergieentstehung beteiligt sind. Lilja G konstatiert, daß genetische oder Umweltfaktoren möglicherweise einen größeren Einfluß auf die Entwicklung atopischer Symptome haben als frühkindliche Infektionen.

Die Einfluß von Infektionen mit Toxoplasma gondii, Cytomegalievirus, Parvovirus B19, „respiratory syncytial virus-RSV“ und Influenzavirus A, B auf den noch ungeborenen Feten wurde im Hinblick auf die fetale IgE-Synthese von Lilja G et al. unter 153 Schwangeren analysiert. Die IgE-Spiegel der Kinder unterschieden sich nicht signifikant zwischen seropositiven und seronegativen Müttern (45).

In einer Studie über den Zusammenhang zwischen viraler Infektion und atopischer Manifestation wurden unter 140 Patienten mit atopischer Dermatitis und 48 Kontrollprobanden der Antikörperstatus gegenüber einer Infektion Epstein-Barr-Virus-EBV, Varizella-Zoster-Virus-VZV und Herpes-Simplex-Virus-HSV Infektion bestimmt. Unter Patienten mit atopischer Dermatitis ließen sich häufiger Antikörper gegen Herpes Zoster Virus-HSV und Epstein-Barr-Virus-EBV nachweisen. Diese könnten die immunregulatorischen Dysbalancen bei Patienten mit atopischer Dermatitis widerspiegeln. Es wäre aber auch denkbar, das die EBV-Infektion eine wichtige Rolle in der Pathogenese von atopischen Erkrankungen spielt (62,63).

Auch die Untersuchung respiratorischer Infektionen im Kindesalter lieferte ähnliche Ergebnisse. Es deutet vieles darauf hin, daß respiratorische Infektionen die Sensibilisierung gegenüber Aeroallergenen triggern und somit die Entstehung von Allergien eher fördern können. Dieser Umstand würde die Verifizierung der von uns formulierten Ausgangshypothese erschweren. Studien vergangener Jahre zeigten, daß respiratorische Virusinfektionen in der Kindheit die Lungen und das Immunsystem beeinflussen, und zu einer allergischen Sensibilisierung und bronchialen Hyperreagibilität führen. Die Faktoren, die bestimmen, ob ein Kind zum Allergiker wird, oder nicht, sind im Detail noch nicht ergründet. Klar ist, daß eine frühe aerogene Sensibilisierung bei Risikokindern, ein Prädiktor für erhöhte IgE-Spiegel ist (47).

Bei der Untersuchung von 609 Kinder auf Antikörper gegen „respiratory syncytial virus“-RSV, konnte keine Korrelation zwischen der Seropositivität gegenüber RSV und jedweder allergischen Manifestation festgestellt werden. RSV-Infektionen spielen möglicherweise nur im ersten Lebensjahr die Rolle eines Promotors für aerogene Sensibilisierung und verursachen zu diesem Zeitpunkt noch keine allergischen Symptome (23).

Im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie wurden 57 Kinder im Alter von durchschnittlich 3 ½ Monaten mit RSV-Bronchiolitis in der Vergangenheit untersucht und mit einer Kontrollgruppe von 93 gleichaltrigen Kindern verglichen. Als follow-up wurden atopische Symptome vom 1. bis 3. Lebensjahr unter Verwendung von Prick-Testung und Serum-IgE-Spiegel erfaßt. Eine RSV-Infektion während des ersten Lebensjahres erwies sich als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung von Asthma und Sensibilisierung in den folgenden 2 Jahren (70).

Die Gefahr einer allergischen Sensibilisierung durch verschiedene Virusinfekte sahen auch Frick OL et al. 13 Risikokinder (beide Elternteile Atopiker) wurden über 4 Jahre, alle 3 bis 6 Monate nach klinischen und immunologischen Gesichtspunkten untersucht, um Rückschlüsse auf den Prozeß der Sensibilisierung zu erhalten. Auch hier konnte bestätigt werden, daß verschiedene Virusinfekte (Infektionen der unteren Luftwege mit Parainfluenza, RSV und CMV) den allergischen Sensibilisierungsprozeß fördern (24). Schirm J et al. bewerteten 39 Patienten mit Kälteurtikaria und deren Titer gegen Masern-Virus, EBV, CMV, VZV, HSV, Chlamydia psittaci und Mycoplasma pneumoniae im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Es ergab sich, daß der Antikörpertiter gegen das Masern-Virus, CMV, HSV und Mycoplasma pneumoniae unter Patienten mit Kälteurtikaria höher war als unter der Kontrollgruppe (15). Jonkhof-Slok TW und Veenhoven RH beobachteten einen 5 Wochen alten Säugling mit Diarrhoe, rektalen Blutungen, Erbrechen und Dehydratation nach erstmaliger Fütterung mit einer Kuhmilch-Formula. Die Diagnose einer Kuhmilch-Allergie wurde gestellt, da die allergische Enterokolitis nach Umstellung auf eine hypoallergene Nahrung verschwand und zusätzliche Labordaten vorlagen. Nach histopathologischen Untersuchungen wurde eine CMV-Kolitis diagnostiziert. Somit könnte eine allergische Kolitis Wegbereiter einer CMV-Kolitis sein, oder möglicherweise auch umgekehrt, eine CMV-Kolitis eine Kuhmilchprotein-induzierte Kolitis triggern (33).

Für die Infektion mit Rotaviren zeigte Kuitunen M, daß häufige Rotavirus-Gastroenteritiden in früher Kindheit, mit der Entwicklung einer atopischen Dermatitis und Rhinitis nach Exposition mit Nahrungsmitteln assoziiert ist (38).

Auch andere Infektionen, wie Tetanus, Diphterie oder Pertussis wurden untersucht. Dannemann A untersuchte die Immunantwort auf Tetanus- und Diphterietoxin unter 538 Kindern mit und ohne atopische Symptome im Alter von 24 Monaten. Sowohl Kinder mit atopischen als auch Kinder ohne atopische Symptome sind in der Lage, auf Toxin mit hohem spezifischem IgE zu reagieren. Kinder mit erhöhtem Nabelschnur-IgE, Serum-IgE und einer Sensibilisierung mit 24 Monaten wiesen höhere IgE-Antworten auf Toxin auf. Die spezifische IgE-Antwort auf Tetanus und Diphterie verringern nicht die klinische Manifestationen von Atopie in den ersten zwei Lebensjahren, stehen jedoch in Relation zu immunologischen Parametern der Atopie (14).

In einer epidemiologischen Studie untersuchte Farooqi IS den Zusammenhang zwischen einer Infektion in der Kindheit und der Entstehung von atopischen Erkrankungen. Unter anderen wurden Daten über Infektionen, deren Behandlung, Impfungen, Asthma, Heuschnupfen, Ekzem, und mütterliche Atopie gesammelt. Als signifikante Prädiktoren für atopische Erkrankungen erwiesen sich, mütterliche Atopie, Pertussis-Impfung und orale antibiotische Behandlung in den ersten zwei Lebensjahren. Der Einfluß der mütterlichen Atopie bestätigt die Rolle genetischer Faktoren bei der Allergieentstehung. Kein Zusammenhang konnte für das mütterliche Rauchen, die Flaschenernährung, die Familiengröße oder die soziale Schicht gefunden werden. Diese Ergebnisse müssen mit Vorsicht behandelt werden, da die Möglichkeit von „Confounding“ Effekten besteht. Gerade im Hinblick auf den Einfluß von mütterlichem Rauchen, sozialer Schicht und Familiengröße widerlegen zahlreiche Studien die obengenannten Ergebnisse (20).

Eine Vielzahl viraler Infektionen, vor allem die Infektion mit dem „respiratory syncytial virus“ aber auch Infektionen mit Rhino-, Influenza- und Parainfluenza-Viren sind mit einem Pfeifen oder Keuchen verbunden, im anglophonen Sprachraum auch als „wheeze“ bekannt. Eine britische Studie zeigte, daß bei 80% asthmatischer Kinder im Alter von 9-11 Jahren, im nasalen Aspirat, daß innerhalb von 4 Tagen vor der „wheezing“-Attacke gewonnen wurde, Viren detektiert werden konnten. In den meisten Fällen handelte es sich um Rhinoviren. Es existieren zwei große Hypothesen, um den Zusammenhang zwischen Virusinfektion und respiratorischen Abnormitäten zu erklären. Die eine besagt, daß virale Infektionen im frühen Leben der Lungenentwicklung schaden oder die Immunregulation verändern. Die andere Hypothese geht davon aus, daß respiratorische Infektionen häufiger unter prädisponierten Kindern vorkommen. Zahlreiche Studien belegen jedoch auch, daß Infektionen mit einem geringeren Risiko, eine atopischen Erkrankung zu erkranken, assoziiert sind (77).

Der Zusammenhang zwischen „wheezing“ und „non-wheezing“ Erkrankungen des unteren Respirationstraktes, d.h. Erkrankungen mit oder ohne zusätzliches Keuchen oder Pfeifen, und atopischen Symptomen wurde an 888 Kindern zum Zeitpunkt der Geburt bis zum 6. Lebensjahr untersucht. Kinder mit „non-wheezing“ Erkrankungen zeigten niedrigere IgE-Spiegel und geringere Prick-Test-Reaktivität (48).

Die Studienergebnisse zeigen, daß der Zusammenhang zwischen viraler Infektion und atopischen Erkrankungen bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Andere Einflußgrößen wie positive atopische Familienanamnese, Ernährung oder Luftverschmutzung spielen bei der Entstehung von Allergien eine wichtige Rolle. Einerseits konnte gezeigt werden, daß vor allem Infektionen des Respirationstraktes die Sensibilisierung gegenüber aerogenen Allergenen triggern können.

Andererseits zeigen Studien gegensätzliche Tendenzen und unterstützen die Hypothese eines protektiven Effekts viraler Infektion hinsichtlich der Allergieentstehung. Hierzu zählt eine noch unveröffentlichte Studie über den Zusammenhang von respiratorischen Infektionen im frühen Kindesalter und der Prävalenz atopischer Erkrankungen an unserem Zentrum. Es konnte gezeigt werden, daß Kinder, die in jungen Lebensjahren an Infekten der oberen Atemwege litten, wobei keine Spezifizierung der Infektionserreger erfolgte, im späteren Leben weniger häufig atopische Symptome aufwiesen. Dabei wurde der atopische Status der Kinder durch ein standardisiertes Scoring-System bewertet. Aussagen über die Infektionen der Atemwege wurden mit einem Fragebogen erfaßt, indem nach der Häufigkeit derartiger Erkrankungen in den frühen Lebensjahren gefragt wurde.

Auch epidemiologische Daten spiegeln diese Tendenz wider. Wichmann HE et al. untersuchten von 1992-93 insgesamt 2471 Kinder in drei Altersstufen (5-7, 8-10, 11-14 Jahre) im Osten Deutschlands. Dabei war die Atopieprävalenz unter den Kindern, die in jüngeren Jahren in den Kindergarten gekommen waren, höher, als unter Kindern, die an ihrem ersten Kindertag schon älter waren (83).

Je früher im Leben Kinder den Kindergarten oder andere Betreuungseinrichtungen besuchen, desto eher treten sie Kontakt zu anderen Kindern und damit zu verschiedenen Virusantigenen. Die geringere Prävalenz von atopischen Erkrankungen unter Kindergartenkindern könnte sich durch die höhere Rate an Seropositivität gegenüber einer Vielzahl von Viren erklären.

Nystad W schlußfolgerte aus einer Studie mit 502 norwegischen Kindern, daß häufige Infektionen des Respirationstraktes während der ersten drei Lebensjahre negativ mit einer Atopie im Schulalter assoziiert war (56).

Rylander E untersuchte Infektionen der unteren Luftwege unter schwedische Kinder im Alter von 4 Monaten bis 4 Jahren. RSV-Infektionen waren die häufigsten Infektionen unter jüngeren Kindern, Rhinoviren waren die häufigsten Auslöser respiratorischer Infektionen unter älteren Kindern. Es konnte gezeigt werden, daß Kinder mit einer negativen Virusisolation, höhere IgE-Spiegel aufwiesen, als Kinder mit positiver Virusisolation (61). Eine Untersuchung von 2226 italienischen Schulkindern im Alter von 7-11 Jahren machte deutlich, daß eine durchgemachte Bronchitis oder Bronchiolitis vor dem zweiten Lebensjahr mit einem geringeren Atopierisiko verbunden ist. Zusätzlich zeigte sich, daß sowohl die väterliche Bildung, als auch die Familiengröße sowie respiratorische Infekte potentielle Einflußgrößen für das Atopierisiko darstellen. Die Prick-Test-Positivität war unter den Kindern häufiger, deren Väter das höchste Bildungsniveau besaßen, im Vergleich zu Kindern von Vätern mit dem niedrigsten Bildungsniveau. Es bestand eine geringere Atopieprävalenz unter größeren Familien (Vier oder mehr Mitglieder). Der Schluß liegt nahe, daß ein höherer sozioökonomischer Status und eine kleinere Familiengröße entscheidende Faktoren bei der Entwicklung atopischer Erkrankungen sind (21).

Auch der Zusammenhang zwischen Schutzimpfungen und Allergien wurde eingehend analysiert. Shirakawa T et al. verglichen unter japanischen Schulkindern atopische Symptome, wie Sensibilisierung und Asthma mit den Reaktivität der Kinder auf *Mycobacterium tuberculosis*. Es zeigte sich, daß positive Tuberculin-Antworten eine geringere Inzidenz von Asthma, niedrigen Serum IgE-Spiegeln und TH1-Zytokin Profilen zur Folge hatten (68).

Die gezeigte Assoziation zwischen positiver Tuberculin-Antwort und TH1-Zytokin Profilen könnte zudem die bisherigen immunologischen Erklärungsversuche zum Zusammenhang von Allergie und Infektion bereichern. Die bei der Atopie vorherrschende Dysbalance zwischen der TH1- und TH2-Immunantwort, mit Überwiegen der TH2-Antwort, könnte durch eine Virus induzierte TH1-Antwort moduliert werden.

Den Zusammenhang zwischen einer Infektion mit EBV und atopischen Manifestationen zeigt eine Untersuchung unter 353 italienischen Kindern im Alter von 1 Monat bis 19 Jahren. Dabei war eine EBV-Infektion im ersten Lebensjahr mit einer geringeren Prävalenz von erhöhten IgE-Spiegeln assoziiert (10).

Im Rahmen einer Studie über Masern, wurden bei über 6000 britischen Kindern, die im Jahre 1970 geboren worden waren, Hintergründe über den Impfstatus und Infektionskrankheiten mit 5, 10 und 16 Jahren, näher beleuchtet. Sowohl die Infektion als auch die Impfung in der Kindheit senkten das Risiko, an Heuschnupfen zu erkranken (44).

Im gleichen Jahr veröffentlichte Seaton A die Ergebnisse einer Studie mit 2111 Kindern im Alter von 10 und 14 Jahren aus dem englischen Aberdeen. Neben dem atopischen Status (Asthma, Ekzem, Heuschnupfen) wurden Daten über Infektionen mit Masern, Pertussis, Varizellen, Röteln und Mumps nach dem dritten Lebensjahr erfaßt. Es fand sich eine positive Assoziation zwischen Anzahl der Familienmitglieder und einem Schutz vor atopischen Erkrankungen (67).

Der Zusammenhang zwischen einer Hepatitis-A-Infektion und atopischen Manifestationen (Prick-Test, spezifisches IgE, Asthma, Rhinitis) wurde unter 1659 italienischen Soldaten im Alter von 17 bis 24 Jahren untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Atopien weniger häufig unter seropositiven, als unter seronegativen Soldaten anzutreffen waren. Die Atopieprävalenz war konstant niedrig unter seropositiven Soldaten. Zusätzlich wurde deutlich, daß die Atopieprävalenz unter seropositiven Soldaten mit zunehmender Familiegröße sank. Im frühen Leben durchgemachte Infektionen könnten somit das Risiko der Entstehung einer Allergie verringern (49). Tierexperimentelle Studien der letzten Jahre untermauern die Hypothese.

Die Untersuchung einer BCG-Infektion am Tiermodell zeigte, daß die BCG-Immunisierung eine TH1-Antwort bewirkt, die die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und Atemwegsreaktivität verhindert (30). Dieser suppressiven Effekt mycobacterieller Infektionen konnte im Tiermodell nachweisen und durch immunologische Daten bestätigt werden. Die BCG-induzierte Reduktion der Atemwegseosinophilie wurde in IFN-gamma-Rezeptor-defizienten Mäusen verhindert und konnte teilweise durch intranasale Applikation von IL5 rückgängig gemacht werden.

Die IFN-gamma-Produktion während der TH1-Antwort nach BCG-Infektion, unterdrückt die lokale TH2-Entzündungsreaktion in der Lunge. Mycobacterielle Infektionen hätten somit ein suppressives Potential im Hinblick auf die Entstehung von atopischen Erkrankungen (19). Studien zu adenoviralen Infektionen und allergischer Entzündung der Atemwege in Mäusen zeigten, daß die Immunantwort auf Adenoviren während nasaler Gabe von Ovalbumin, die Entwicklung einer Entzündung der Atemwege verhindert (71). Selbstverständlich können Tiermodelle nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden, die Studie liefern jedoch Hintergründe zum immunologischen Verständnis von Infektion und Allergie.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zusammenhänge der Entwicklung atopischer Erkrankungen sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Neben familiärer Prädisposition spielen Umweltfaktoren, wie Allergenexposition und Ernährung, Luftschadstoffe, frühkindliche Infekte sowie soziale Faktoren eine entscheidende Rolle in der Allergieentstehung (36). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Analyse frühkindlicher Infektionen als Risikofaktor der Allergieentstehung.

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien konnte zeigen, daß ein starkes geographisches Gefälle hinsichtlich der Verteilung atopischer Erkrankungen besteht. Die Häufigkeit atopischer Erkrankungen liegt z.B. im Westen Deutschlands höher als im Osten Deutschlands (53,76). Atopische Erkrankungen werden in den Industrienationen weltweit häufiger gefunden, als in den Staaten der dritten Welt, deren Wirtschaft vor allem landwirtschaftlich geprägt ist (25,84).

In Ländern niedriger Prävalenzen atopischer Erkrankungen (z.B. Osteuropa, afrikanischer Kontinent) sind virale, bakterielle und parasitäre Erkrankungen häufiger anzutreffen, als in west- und nordeuropäischen Ländern mit niedrigeren Prävalenzen atopischer Erkrankungen. Diese Überlegungen führten zur Hypothese, daß virale Infektionen im frühen Kindesalter einen protektiven Effekt hinsichtlich der Allergieentstehung im späteren Leben besitzen.

Das IFN-gamma, welches u.a. im Verlauf viraler Infektionen gebildet wird könnte dabei ein starker Inhibitor von TH2-Zellfunktionen und somit der IgE-Synthese sein (79a). Es scheint von entscheidender Bedeutung zu sein, daß die Infektion in den ersten Lebensjahren, während der Phase der „Ausreifung“ des Immunsystems erfolgt, bevor eine TH1-TH2-Dysbalance des Immunsystems manifest wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können die Hypothese eines protektiven Effekts viraler Infektion, zumindest der Herpesgruppe, in den ersten Lebensjahren hinsichtlich einer späteren Allergieentstehung nicht bestätigen. Dies galt sowohl für die Untersuchung auf serologischer als auch auf zellulärer Ebene. Auf serologischer Ebene wurde deutlich, daß statistisch Kinder mit positivem Antikörper-Titer gegen CMV, EBV und VZV mit 1 oder 3 Jahren, mit 7 Jahren ebenso häufig atopische Erkrankungen zeigen wie Kinder mit negativem Virus-Antikörper-Titer. Signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten atopischer Symptome zwischen Kindern mit positivem und negativem Antikörper-Titer gegen CMV, EBV und VZV konnten nicht gezeigt werden. Auf zellulärer Ebene zeigte sich, daß Kinder und Jugendliche ohne atopische Symptome auf Virus-Stimulation (CMV-Antigen bzw. Peptid) statistisch ebenso häufig mit einer IFN-gamma-Produktion (TH1-Immunantwort) reagieren wie Kinder und Jugendliche mit atopischen Krankheitszeichen. Signifikante Unterschiede zwischen Kindern und Jugendlichen mit und ohne Zeichen atopischer Erkrankungen konnten nicht gezeigt werden. Die Veröffentlichungen der letzten Jahre sowie unserer Daten zeigen, daß bisher noch kein Schlußstrich unter die Diskussion um Rolle von Infektionen für die Atopieentstehung gezogen werden kann. Weitere Studien, wie die vorliegende, können in den nächsten Jahren wohl am ehesten Licht in das Dunkel bringen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Quellen in alphabetischer Reihenfolge

1. **Adra CN, Mao XQ, Kawada H, Gao PS, Korzycka B, Donate JL, Shaldon SR, Coull P, Dubowitz M, Enomoto T, Ozawa A, Syed SA, Horiuchi T, Khaeraja R, Khan R, Lin SR, Flinter F, Beales P, Hagihara A, Inoko H, Shirakawa T, Hopkins JM.** *ClinGenet* 1999 Jun;55(6):431-7:Chromosome 11q13 and atopic asthma.
2. **Alm JS, Pershagen G, Scheynius A, Lilja G.** *Lancet* 1997 Aug 9;350(9075):400-3:Early BCG vaccination and development of atopy.
3. **Ammatuna P, Di Stefano R, Arista S, Sammartano F, Bellia L, Formica P, Albeggiani A.** *EurJEpidemiol* 1989 Jun;5(2):219-23:Immune status towards Epstein-Barr virus in a group of Sicilian children.
4. **Amon U, Fandrey K, Fedler R.** *Kurzlehrbuch Dermatologie* 1. Auflage 1996 Jungjohann;7.3.:94-97.
5. **Andersson-Ellstrom A, Svennerholm B, Forssman L.** *ScandJInfectDis* 1995;27(4):315-8:Prevalence of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in teenage girls.
6. **Barbi M, Binda S, Primache V, Clerici D.** *EurJEpidemiol* 1998 Dec;14(8):791-6:Congenital cytomegalovirus infection in a northern Italian region. NEOCMV Group.
7. **Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Forster J, Bauer CP, Wahn V, Zepp F, Wahn U.** *ClinExpAllergy* 1998 Aug;28(8):965-70:Atopic dermatitis in early infancy predicts allergic airway disease at 5 years.
8. **Bjorksten B, Dumitrascu D, Foucard T, Khetsuriani N, Khaitov R, Leja M, Lis G, Pekkanen J, Priftanji A, Riikjarv MA.** *EurRespirJ* 1998 Aug;12(2):432-7:Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe.
9. **Brouard J, Freymuth F, Vabret A, Toutain F, Duhamel JF.** *ArchPediatr* 1999;6Suppl1:29S-34S:Respiratory allergy and the viruses.
10. **Calvani M, Alessandri C, Paolone G, Rosengard L, DiCaro A, DeFranco D.** *PediatrAllergyImmunol* 1997 May;8(2):91-6:Correlation between Epstein Barr virus antibodies, serum IgE and atopic disease.
11. **Christie GL, McDougall CM, Helms PJ.** *ScottMedJ* 1998 Dec;43(6):180-2:Is the increase in asthma prevalence occurring in children without a family history of atopy?
12. **Crowcroft NS, Vyse A, Brown DW, Strachan DP.** *JEpidemiolCommunityHealth* 1998 Feb;52(2):101-4:Epidemiology of Epstein-Barr virus infection in pre-adolescent children: application of a new salivary method in Edinburgh, Scotland.

13. **Dakhama A, Bramley AM, Chan NG, McKay KO, Schellenberg RR, Hegele RG.** *EurRespirJ* 1999 May;13(5):976-82:Effect of respiratory syncytial virus on subsequent allergic sensitization to ovalbumin in guinea-pigs.
14. **Dannemann A, vanRee R, Kulig M, Bergmann RL, Bauer P, Forster J, GuggenmoosHolzmann I, Aalberse RC, Wahn U.** *IntArchAllergyImmunol* 1996 Nov;111(3):262-7:Specific IgE and IgG4 immune response to tetanus and diphtheria toxoid in atopic and nonatopic children during the first two years of life.
15. **Doeglas HM, Rjinten WJ, Schroder FP, Schirm J.** *BrJDermatol* 1986 March;114(3):311-8:Cold urticaria and virus infections: a clinical and serological study in 39 patients.
16. **Duhme H, Weiland SK, Rudolph P, Wienke A, Kramer A, Keil U.** *EurRespir J* 1998 apr;11(4):840-7:asthma and allergies among children in West and East Germany: a comparison between Munster and Greifswald using the ISAAC phase I protocol. International Study of Asthma and Allergies in Childhood.
17. **Edenharter G, Bergmann RL, Bergmann KE, Wahn V, Forster J, Zepp F, Wahn U.** *ClinExpAllergy* 1998 Jun;28(6):671-8:Cord blood-IgE as risk factor and predictor for atopic diseases.
18. **Eder W, Gamper A, Oberfeld G, Riedler J.** *WienKlinWochenschr* 1998 Oct 16;110(19):669-77:Prevalence and severity of bronchial asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis in Salzburg school children.
19. **Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, Moll H, Le Gros G.** *JExpMed* 1998 Feb 16;187(4):561-9:Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia.
20. **Farooqi IS, Hopkins JM.** *Thorax* 1998 Nov;53(11):927-32:Early childhood infection and atopic disorder.
21. **Forastiere F, Agabiti N, Corbo GM, Dell'Orco V, Porta D, Pistelli R, Levenstein S, Perucci CA.** *Epidemiology* 1997 Sep;8(5):566-70:Socioeconomic status, number of siblings, and respiratory infections in early life as determinants of atopy in children.
22. **Forrest D, Dunn K, Elliott K, Fitzpatrick E, Fullerton J, McCarthy M, Brown J, Hill D, Williamson R.** *JAllergyClinImmunol* 1999 Nov;104(5):1066-70:Identifying genes predisposing to atopic eczema.
23. **Forster J, Tacke U, Krebs H, Streckert HJ, Werchau H, Bergmann RL, Schulz J, Lau S, Wahn U.** *PediatrAllergyImmunol* 1996 May;7(2):55-60:Respiratory syncytial virus infection: its role in aeroallergen sensitization during the first two years of life.
24. **Frick OL, German DF, Mills J.** *JAllergyClinImmunol* 1979 Apr;63(4):228-41:Development of allergy in children. I. Association with virus infections.

25. **Green MS, Cohen D, Slepon R, Robin G, Wiener M.** *IntJEpidemiol* 1993 Aug;22(4):720-3:Ethnic and gender differences in the prevalence of anti-cytomegalovirus antibodies among young adults in Israel.
26. **Heinrich J, Nowak D, Wassmer G, Jorres R, Wijst M, Berger J, Magnussen H, Wichmann HE.** *Allergy* 1998 Jan;53(1):89-93:Age-dependent differences in the prevalence of allergic rhinitis and atopic sensitization between an eastern and a western German city.
27. **Herrmann ME, Dannemann A, Gruters A, Radisch B, Dudenhausen JW, Bergmann R, Coumbos A, Weitzel HK, Wahn U.** *EurJPediatr* 1996 Sep;155(9):770-4:Prospective study of the atopy preventive effect of maternal avoidance of milk and eggs during pregnancy and lactation.
28. **Herold G.** *Innere Medizin* 1996;XI656-657,659-660,660-661.
29. **Herz U, Schnoy N, Borelli S, Weigl L, Kasbohrer U, Daser A, Wahn U, Kottgen E, Renz H.** *JInvestDermatol* 1998 Mar;110(3):224-31:A human-SCID mouse model for allergic immune response bacterial superantigen enhances skin inflammation and suppresses IgE production.
30. **Herz U, Gerhold K, Gruber C, Braun A, Wahn U, Renz H, Paul K.** *JAllergyClinImmunol* 1998 Nov;102(5):867-74:BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model.
31. **Hesse J, Ibsen KK, Krabbe , Uldall P.** *ScandJInfectDis* 1983;15(4):335-8:Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus (EBV) in childhood and adolescence in Denmark.
32. **Holgate ST.** *JAllergyClinImmunol* 1999 Dec;104(6):1139-46:Genetic and enviromental interaction in allergy and asthma.
33. **Jonkhoff-Slok, Veenhoven RH, deGraeffMeeder ER, Buller HA.** *EurJPediatr* 1997 Jul;156(7):528-9:An immunocompetent infant with cow's milk allergy and cytomegalovirus colitis.
34. **Kramer U, Schafer T, Vieluf D, Behrendt H, Ring J.** *Allergy* 1996 Aug;51(8):532-9:Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany.
35. **Kramer U, Duhme H, Weiland SK, Rudolph P, Wienke A, Keil U.** *EurRespirJ* 1998 Apr;11(4):840-7:Asthma and allergies among children in West and East Germany: a comparison between Munster and Greifswald using the ISAAC phase I protocol. International Study of Asthma and Allergies in Childhood.
36. **Kramer U, Schafer T, Dockery D, Vieluf D, Behrendt H, Ring J.** *AllergyAsthmaProc* 1999 Jan-Feb;20(1):23-7:What makes a child allergic? Analysis of risk factors for allergic sensitization in preschool children from East and West Germany.

37. **Kramer U, Ring J, Schafer T, Abeck D, Vieluf D, Behrendt H.** *IntArchAllergyImmunol* 1999 Feb-Apr;118(2-4):403-7:Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany.
38. **Kuitonen M, Virtanen M, Savilahti E.** *ActaPaediatr* 1993 Dec; 82(12):1075:Infantile rotavirus diarrhoe and development of allergy.
39. **Kulig M, Bergmann R, Tacke U, Wahn U, Guggenmoos-Holzmann I.** *PediatrAllergyImmunol* 1998 May;9(2):61-7:Long-lasting sensitization to food during the first two years precedes allergic airway disease. The MAS Study Group, Germany.
40. **Kulig M, Luck W, Lau S, Niggemann B, Bergmann R, Klettke U, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U.** *Allergy* 1999 Mar;54(3):220-8:Effect of pre- and postnatal tobacco exposure on specific sensitization to food and inhalant allergenes during the first 3 years of life. Multicentre Allergy Study Group, Germany.
41. **Kulig M, Luck W, Wahn U.** *HumExpToxicol* 1999 Apr;18(4):241-4:The assoziation between pre- and postnatal tobacco smoke exposure and allergic sensitization during early childhood. Multicentre Allergy Study Group, Germany.
42. **Kulig M, Tacke U, Forster J, Edenharter G, Bergmann R, Lau S, Wahn V, Zepp F, Wahn U.** *JPediatr* 1999 Apr;134(4):453-8:Serum IgE levels during the first 6 years of life.
43. **Leogrande G, Jirillo E.** *EurJEpidemiol* 1993 Jul;9(4):368-72:Studies on the epideniology of child infections in the Bari area (south Italy). VII. Epidemiology of Epstein-Barr virus infections.
44. **Lewis SA, Britton JR.** *ClinExpAllergy* 1998 Dec;28(12)1493-500:Measles infection, measles vaccination and the effect of birth order in the aetology of hay fever.
45. **Lilja G, Forsgen M, Johansson SG, Kusoffsky E, Oman H.** *Allergy* 1997 Oct;52(10):978-84:Influence of maternal infections with viral agents or *Toxoplasma gondii* during pregnancy on fetal IgE production.
46. **Magnussen H.** *EurRespirJ* 1996 Dec;9(12):2541-52:Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany.
47. **Martinez FD.** *AmJRespirCritCareMed* 1995 May;151(5):1644-7;discussion 1647-8:Viral infections and the development of asthma.
48. **Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Halonen M.** *Thorax* 1995 Oct;50(10):1067-72:Association of non-wheezing lower respiratory tract illnesses in early life with persistently diminished serum IgE levels. Group Health Medical Associates.

49. **Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne O, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R.** *BMJ* 1997 Apr 5;314(7086):999-1003:Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus.
50. **Murriss-Epsin M, Didier A, Mezghani S, Lacassagne L, Leophonte P.** *RevMalRespir* 1999 Feb;16(1):9-15:Influenza and asthma.
51. **Natali A, Valcavi P, Medici MC, Dieci E, Montali S, Chezzi C.** *NewMicrobiol* 1997 Apr;20(2):123-33:Cytomegalovirus infection in an Italian population: antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission.
52. **Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG.** *Genomics* 1997 Nov 15;46(1):159-62:Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicentre Allergy Study.
53. **Nicolai T, Bellach B, Mutius EV, Thefeld W, Hoffmeister H.** *ClinExpAllergy* 1997 Aug;27(8):886-92:Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany.
54. **Nielsen SL, Ronholm E, Sorensen I, Jaeger P, Andersen HK.** *JClinMicrobiol* 1987 Aug;25(8):1406-10:Improvement of serological diagnosis of neonatal cytomegalovirus infection by simultaneously testing for specific immunoglobulins E and M by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay.
55. **Nilsson L, Kjellman NI, Bjorksten B.** *ArchPediatrAdolescMed* 1998 Aug;152(8):734-8:A randomized controlled trial of effect of pertussis vaccines on atopic disease.
56. **Nystad W, Skrondal, Nja F, Hetlevik O, Carlsen KH, Magnus P.** *Allergy* 1998 Dec;53(12):1189-94:Recurrent respiratory tract infections during the first 3 years of life and atopy at school age.
57. **Nowak D, Heinrich J, Jorres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, Boczor S, Claussen M, Wichmann HE, Magnussen H.** *EurRespirJ* 1996 Dec;9(12):2541-52:Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany.
58. **Poysa L, Korppi M, Pietikainen M, Remes K, Juntunen-Backman K.** *Allergy* 1991 Apr;46(3):161-5:Asthma, allergic rhinitis and atopic eczema in Finnish children and adolescents.
59. **Ring J, Kramer U, Schafer T, Abeck D, Vieluf D, Behrendt H.** *IntArchAllergyImmunol* 1999 Feb-Apr;118(2-4):403-7:Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany.

60. **Roitt IM, Brostoff J, Male DK.** *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* 2. neubearbeitete Auflage 1991 Thieme Verlag;a-Kapitel 19:253-273,Kapitel 25:331-334.
61. **Rylander E, Eriksson M, Pershagen G, Nordvall L, Ehrnst A, Ziegler T.** *PediatrAllergyImmunol* 1996 Feb;7(1):6-11:Wheezing bronchitis in children. Incidence, viral infections, and other risk factors in a defined population.
62. **Rystedt I, Strannegard IL, Strannegard O.** *IntArchAllergyApplImmunol* 1984;75(2):179-83:Increased serum levels of antibodies to Epstein-Barr virus in adults with history of atopic dermatitis.
63. **Rystedt I, Strannegard IL, Strannegard O.** *Allergy* 1989;44Suppl9:79-83:Infections as contributing factors to atopic dermatitis.
64. **Schafer T, Vieluf D, Behrendt H, Kramer U, Ring J.** *Allergy* 1996 Aug;51(8):532-9:Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany.
65. **Schafer T, Kramer U, Dockery D, Vieluf D, Behrendt H, Ring J.** *AllergyAsthmaProc* 1999 Jan-Feb;20(1):23-7:What makes a child allergic? Analysis of risk factors for allergic sensitization in preschool children from East and West Germany.
66. **Schmitz G, Rothe G.** *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik* 1994 Schattauer;3-48.
67. **Seaton A, Bodner C, Godden D.** *Thorax* 1998 Jan;53(1):28-32:Family size, childhood infections and atopic diseases. The Aberdeen WHEASE Group.
68. **Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkins JM.** *Science* 1997 Jan 3;275(5296):77-9:The inverse association between tuberculin response and atopic disorder.
69. **Sigurs N, Hattevig G, Kjellman B, Kjellman NI, Nilsson L, Bjorksten B.** *JAllergyClinImmunol* 1994 Oct;94(4):757-63:Appearance of atopic disease in relation to serum IgE antibodies in children followed up from birth for 4 to 15 years.
70. **Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B.** *Pediatrics* 1995 Apr;95(4):500-5:Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls.
71. **Stampfli MR, Ritz SA, Neigh GS, Sime PJ, Lei XF, Xing Z, Croitoru K, Jordana M.** *ClinExpAllergy* 1998 Dec;28(12):1581-90:Adenoviral infection inhibits allergic airways inflammation in mice.
72. **Strannegard IL, Larsson LO, Wennergren G, Strannegard O.** *Allergy* 1998 Mar;53(3):249-54:Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria.

73. **Van Loon AM, Heessen FW, VanderLogt JT.** *JVirolMethods* 1987 Feb;15(2):101-7:Antibody isotype response after human cytomegalovirus infection.
74. **Varjonen E, Kalimo K, Lammintausta K, Terho P.** *Allergy* 1992 Jun;47(3):243-8:Prevalence of atopic disorders among adolescents in Turku, Finland.
75. **Von Mutius, Martinez FD, Fritzsich C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH.** *AmJRespirCritCareMed* 1994 Feb;149(2Pt1):358-64:Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany.
76. **Von Mutius E, Weiland SK, Fritzsich C, Duhme H, Keil U.** *Lancet* 1998 Mar 21;351(9106):862-6:Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany.
77. **Von Mutius E.** *SchweizMedWochenschr* 1998 Nov 21;128(47):1833-9:asthma and infection: risk or prevention?
78. **Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, Guggenmoos-Holzmann I.** *JAllergyClinImmunol* 1997 Jun;99(6Pt1):763-9:Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life.
79. **Wahn U, Seger R, Wahn V.** *Pädiatrische Allergologie und Immunologie* 3. Auflage 1999 Urban Fischer;a-I:40-42,b-II5:157-172,c-II9:196,d-II22:278-283,e-II23:285-303,f-II27:320-327.
80. **Weber B, Braun W, Tyralla B, Hamann A, Doerr HW.** *JClinInvest* 1992 Jun;70 (6):497-502:Human cytomegalovirus (HCMV)-specific immunoglobulin E as a serological marker for HCMV infection in immunocompromised patients.
81. **Welliver RC.** *JPediatr* 1999 Aug;135(2Pt2):14-20:Immunologic mechanisms of virus-induced wheezing and asthma.
82. **Wichmann HE, Heinrich J, Nowak D, Wassmer G, Jorres R, Wjst M, Berger J, Magnussen H.** *Allergy* 1998 Jan;53(1):89-93:Age-dependent differences in the prevalence of allergic rhinitis and atopic sensitization between an eastern and a western German city.
83. **Wichmann HE, Kramer U, Heinrich J, Wjst M, Perucci CA.** *Lancet* 1999 Feb 6;353(9151):450-4:Age of entry to nursery and allergy in later childhood.
84. **Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, Asher I, Beasley R, Bjorksten B, Burr M, Clayton T, Crane J, Ellwood P, Keil U, Lai C, Mallol J, Martinez F, Mitchell E, Montefort S, Pearce N, Shah J, Sibbald B, Strachan D, von Mutius E, Weiland SK.** *JAllergyClinImmunol* 1999 Jan;103(1Pt1):125-38:Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood.

85. **Zawilinska B, Kopec J, Rojek-Zakrzewska D, Zgorniak-Nowosielska I.** *MedDoswMikrobiol* 1993;45(1):137-41:Cytomegalovirus infection in infants examined in the department of virology in 1988-1992.
86. **Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR.** *Principles and practice of clinical virology* Third Edition 1994:37-134.

8. ANHANG

8.1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Schematische Darstellung der Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion
- Abbildung 2 Differenzierung der Typ 1- und Typ 2-T-Zellen
- Abbildung 3 Häufigkeit der Manifestationsformen des Atopiesyndroms in verschiedenen Lebensaltern
- Abbildung 4 Darstellung der CMV-Proteine
- Abbildung 5 Zeitlicher Verlauf der Seropositivität für EBV
- Abbildung 6 Zeitlicher Verlauf der VZV-Prävalenz
- Abbildung 7 Allergischen Symptomatik vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr
- Abbildung 8 Bevölkerungsbezogene IgE-Werte in kU/l
- Abbildung 9 Studiendesign der Untersuchung auf humoraler Ebene
- Abbildung 10 Der ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay)
- Abbildung 11 Schematischer Aufbau eines Durchflußzytometers
- Abbildung 12a Theoretisches Lichtsteuungsdiagramm
- Abbildung 12b Praktisches Lichtsteuungsdiagramm
- Abbildung 13 Stimulation mit CMV-Antigen, nichtreaktiv
- Abbildung 14 Stimulation mit CMV-Peptidgemisch pp65, nichtreaktiv
- Abbildung 15 Stimulation mit CMV-Peptidgemisch IE1, nichtreaktiv
- Abbildung 16 Stimulation mit CMV-Antigen, reaktiv
- Abbildung 17 Stimulation mit CMV-Peptidgemisch pp65, reaktiv
- Abbildung 18 Stimulation mit CMV-Peptidgemisch IE1, reaktiv
- Abbildung 19 unstimulierte Zellen
- Abbildung 20 Stimulation mit PMA Positivkontrolle
- Abbildung 21 Isotypkontrolle CD4
- Abbildung 22 Isotypkontrolle CD8
- Abbildung 23 Prävalenz von atopischer Dermatitis, Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis bei Kindern vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr

- Abbildung 24 Prävalenz von erhöhtem Gesamt-IgE im Serum (85.Perzentile) und atopischer Sensibilisierung bei Kindern im Alter vom 3. Lebensmonat bis zum 7. Lebensjahr
- Abbildung 25 Kinder ohne atopische Manifestationen (weder atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis noch atopische Sensibilisierung) zum 1. und 3. Lebensjahr
- Abbildung 26 Seropositivität gegenüber einer Infektion mit CMV, EBV und VZV bei Kindern zum 1. und 3. Lebensjahr (ELISA-Messung)
- Abbildung 27 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei CMV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr
- Abbildung 28 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei CMV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 3 Jahren
- Abbildung 29 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei CMV-seronegativen und seropositiven mit 1 Jahr, die mit 1 Jahr noch keine atopischen Symptome aufwiesen
- Abbildung 30 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei CMV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 3 Jahren, die mit 3 Jahren noch keine atopischen Symptome aufwiesen
- Abbildung 31 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei EBV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr
- Abbildung 32 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei EBV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 3 Jahren
- Abbildung 33 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei EBV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr, die mit 1 Jahr noch keine atopischen Symptome aufwiesen
- Abbildung 34 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei EBV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 3 Jahren, die mit 3 Jahren noch keine atopischen Symptome aufwiesen
- Abbildung 35 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei VZV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr
- Abbildung 36 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei VZV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 3 Jahren
- Abbildung 37 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei VZV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 1 Jahr, die mit 1 Jahr noch keine atopischen Symptome aufwiesen

- Abbildung 38 Atopische Symptome mit 7 Jahren bei VZV-seronegativen und seropositiven Kindern mit 3 Jahren, die mit 3 Jahren noch keine atopischen Symptome aufwiesen
- Abbildung 39 T-Zell-Reaktivitäten nach CMV-Stimulation bei Kindern und Jugendlichen gemessen an der IFN-gamma-Produktion
- Abbildung 40 T-Zell-Reaktivität nach CMV-Stimulation bei Kindern und Jugendlichen mit und ohne atopische Symptome gemessen an der IFN-gamma-Produktion
- Abbildung 41 T-Zell-Reaktivität nach CMV-Stimulation bei „Highrespondern“ ($\geq 0,3\%$ reaktive T-Zellen) mit und ohne atopische Symptome gemessen an der IFN-gamma-Produktion

8.2. Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
EBV	Ebstein-Barr-Virus
FACS	Floureszenzaktivierter Zellsorter
FcR	Rezeptor für das Fc-Fragment von Immunglobulinen
FITC	Flouresceinisothyocianat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Colony-stimulating-Faktor Flouresceinisothyocianat
HLA	Human Leukozytenantigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Major histocompatibility complex
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PrCP	Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplexe
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH1	T-Helfer-1-Zellen
TH2	T-Helfer-2-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
VZV	Varizella-Zoster-Virus

8.3. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Immunologie in Zusammenarbeit mit der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie/ Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin. Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Hans-Dieter Volk und Herrn Professor Dr. Ulrich Wahn für die wissenschaftliche Betreuung, Unterstützung und Förderung der vorliegenden Arbeit.

Die Experimente wurden am Institut für Medizinische Immunologie der Universitätsklinik Charité, Campus Mitte, durchgeführt.

In diesem Zusammenhang danke ich Herrn Dr. Florian Kern, Herrn Dr. Robert Sabbat, Herr Dr. Wolf Döcke und Frau Christa Liebenthal für die vielfache Unterstützung.

Für die Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Arbeit möchte ich mich bedanken bei Frau Professorin Dr. Renate Bergmann, Herrn Professor Dr. B. Niggemann, Herrn Dr. Christoph Grüber, Herrn Dr. Albrecht Tacke und Herrn Dr. Uwe Kragel.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Christine Sommerfeld bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre die statistische Datenverarbeitung nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt auch Frau Brigitte Schulz, die mir bei der Beschaffung des Probenmaterials mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein Dankeschön auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und die herzliche Atmosphäre.

8.4. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nora Laske
Geburtsdatum: 29.12.1973 in Berlin
Anschrift: Hörstenweg 72, 13125 Berlin
Tel.: 29 10 250, E-mail: noralaske@hotmail.com
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980-1990 Wilhelm-Pieck-Oberschule Berlin
1990-1992 Kissingen-Gymnasium Berlin
19.06.1992 Abitur

Studium

Oktober 1992 Medizinstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin
August 1995 Ärztliche Vorprüfung
August 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

25.10.1999-13.02.2000 Bundeswehrkrankenhaus Berlin, *Dermatologie*
10.02.2000-04.06.2000 Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, *Chirurgie*
05.06.2000-30.07.2000 Franz-Volhard-Klinik Buch, *Innere Medizin*
31.07.2000-24.09.2000 Royal Melbourne Hospital, *Innere Medizin*

**Studienbegleitende
Praktika**

23.07.-08.08.93	Instituto Nacional de la Nutrición Mexico, <i>Chirurgie, Immunologie</i>
20.09.-04.10.96	Docteur Guy Khaznadar Paris, <i>Kardiologie</i>
03.03.-06.04.97	Institute of Psychiatry, London, <i>Psychiatrie</i>
14.07.-10.08.97	Ospedale San Giacomo, Rom, <i>Orthopädie</i>
11.08.-07.09.97	Hochgebirgsklinik Davos-Wolfgang, Schweiz, <i>Innere Medizin</i>
08.09.-22.09.97	Hôpital d'Enfants Armand-Trousseau Paris, <i>Pädiatrie</i>
10.1989-10.99	Promotion bei Prof. H.-D. Volk und Prof. U. Wahn Institut für Medizinische Immunologie, Charité Mitte Klinik für Pädiatrie m. S. Pneumologie/ Immunologie, Virchow- Klinikum

eingereicht Februar 2000, Disputation am 11.12.2000

Berlin, den 20.01.2001

8.5. Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre hiermit, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfaßt wurde und auch in allen Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 20. 01. 2001