

Aus der Klinik Altonaer Kinderkrankenhaus
 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

des Universitätsklinikum Hamburg -Eppendorf

Direktor Prof. Dr. Frank Riedel

Ermittlung immunologischer Referenzwerte spezifischer
Immunglobuline gegen Tetanus, Haemophilus influenzae
Typ b und Pneumokokken bei gesunden Kindern und
Erwachsenen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Helga Andrea Möllers
aus Bottrop

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 31.03.2010

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. Riedel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Nolte

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. R. Ganschow

Inhaltsangabe

	Seite
1. Arbeitshypothese	3
2. Einleitung	4 – 8
3. Probanden und Methodik	9 - 25
4. Statistik	26
5. Ergebnisse	27 - 40
6. Diskussion	41 - 46
7. Zusammenfassung	47
8. Literaturverzeichnis	48 - 50

1. ARBEITSHYPOTHESE

Im Rahmen der heutigen immunologischen Untersuchungen dient die Bestimmung der Serumspiegel spezifischer Antikörper der Beurteilung einer kompetenten Immunantwort [18,26]. Die Bedeutung einer adäquaten Immunglobulinbildung liegt in der Abwehr infektiöser Erreger und der Bekämpfung der mit ihnen verbundenen Erkrankungen durch eine adaptive Immunantwort, die eine langfristige Immunität bewirken kann. Erniedrigte Konzentrationen spezifischer Antikörper finden sich etwa bei Patienten mit Immundefekten, aber auch bei Patienten mit regulärer Immunfunktion [1].

Die in dieser Studie durchgeführte Analyse der altersabhängigen Immunglobulin G-Konzentrationen ermöglicht eine Beurteilung des Immunstatus des Probanden. Im Hinblick auf die jeweils erfolgten Impfungen ist eine Aussage zu deren Effektivität möglich. Die erfolgreiche Immunisierung bewirkt einen Anstieg der spezifischen Immunglobulin-Titer [18]. Falls ein Immundefekt besteht, wird durch die Konzentrationsbestimmung der Immunglobuline die Entscheidung zur Durchführung einer Substitutionstherapie erleichtert [26].

In bisher veröffentlichten Normwertstudien lassen sich keine einheitlichen Normwerte der einzelnen Altersklassen erkennen. Dies dürfte vor allem auf die Verwendung unterschiedlicher Referenzstandards und Testmethoden zurückzuführen sein. Das in dieser Studie verwendete Referenzmaterial CRM 470 wurde vom European Community Bureau of Reference und dem U.S. College of American Pathologists zertifiziert.

Das Ziel dieser Studie ist die Ermittlung verbindlicher, altersbezogener Normwerte für spezifische Antikörper unter Verwendung der internationalen Referenzpräparation CRM 470 .

2. Einleitung

Die Immunologie ist eine relativ junge Wissenschaft. Der Beginn der immunologischen Forschung läßt sich auf Edward Jenner zurückführen, der 1796 entdeckte, daß ein Mensch vor einer Variola-Infektion geschützt ist, wenn man ihn mit Kuhpocken impft. Jenner bezeichnete dieses Verfahren als „Vaccination“, ein Begriff, der auch heute noch verwendet wird und der die Schutzimpfung einer gesunden Person mit abgeschwächten oder toten Krankheitserregern impliziert.

Louis Pasteur beobachtete 1880, daß eine Kultur von *Pasteurella ariseptica* nach längerer Lagerung ihre Virulenz verlor und damit geimpfte Versuchstiere nicht an den virulenten Stämmen erkrankten. Er postulierte so den Impfschutz durch Vaccination mit „attenuierten“ Bakterienbestandteilen [29].

Im 19. Jahrhundert entdeckte Robert Koch, dass Infektionen auf Mikroorganismen zurückzuführen sind, die spezifische Krankheitsbilder hervorrufen.

Die Entdeckungen von Robert Koch und weiteren bedeutenden Mikrobiologen des 19. Jahrhunderts ermöglichten die Übertragung von Jenners Impfverfahren auf andere Krankheiten. So stellte Louis Pasteur einen Impfstoff gegen Cholera und Tollwut her.

Ein grundlegender Fortschritt der immunologischen Forschung war 1890 die Entdeckung von Antikörpern im Serum geimpfter Personen durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato [13]. Sie stellten fest, dass das Serum eines gegen Tetanus immunisierten Tieres eine neutralisierende, antitoxische Wirkung besitzt.

Diese über Jahrhunderte erzielten Forschungsergebnisse bilden die Grundlage der heutigen Immunologie. Sie ermöglichen den Einsatz verschiedener Impfstoffe zur Abwehr zahlreicher Infektionserkrankungen, die in Entwicklungsländern nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen darstellen [13].

Im Verlauf des 20. Jahrhunderts gelang Georg Köhler die Herstellung monoklonaler Antikörper mit Hilfe von antikörperbildenden Hybridzellen. Es folgte die Entdeckung der Polypeptidstruktur von Antikörpermolekülen durch Rodney Portier und somit die Grundlage ihrer Analyse durch die Proteinsequenzierung. Schließlich ermöglichte die Forschungsarbeit von Gerald Edelman die Entschlüsselung der vollständigen Immunglobulinstruktur [29].

Im Rahmen der heutigen immunologischen Untersuchungen dient die Bestimmung der Serumspiegel spezifischer Antikörper der Beurteilung einer kompetenten Immunantwort [18,26]. Erniedrigte Konzentrationen spezifischer Antikörper finden sich etwa bei Patienten mit Immundefekten, wie etwa bei selektivem Immunglobulin-G-Subklassenmangel oder kombinierten Immundefekten, aber auch bei Patienten mit regulärer Immunfunktion [1]. Das Wissen um das mögliche Ausbleiben einer suffizienten Immunantwort, unzureichend durchgeführte Impfungen oder eine Verminderung der Antikörperkonzentrationen im Verlauf der Zeit führte zur Einführung der Konzentrationsbestimmungen spezifischer Antikörper im Serum [6,15].

Die Bedeutung der adäquaten Immunglobulinbildung liegt in der Abwehr infektiöser Erreger und der Bekämpfung der mit ihnen verbundenen Erkrankungen.

Die zahlreichen Komponenten des Immunsystems ermöglichen die Identifikation und Elimination von Krankheitserregern und können durch eine adaptive Immunantwort eine langfristige Immunität bewirken.

Die Immunglobuline der Gruppe G sind in der Lage, eine spezifische Abwehrreaktion hervorzurufen. Ihr Vorliegen sowie ihre Konzentration im Plasma sind ausschlaggebend für die Effektivität der erfolgenden Immunantwort.

Die Immunglobuline der Gruppe G umfassen vier Subklassen, die als IgG 1, IgG 2, IgG 3 und IgG 4 bezeichnet werden. Sie zeigen eine ähnliche Proteinstruktur, sind jedoch durch unterschiedliche Gene kodiert. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Effekte bei der Komplementbindung, Placentapassage und Fc-Rezeptor-Bindung. Die Bildung von IgG-Subklassen beruht auf einem Wechsel des Isotyps, der unter der Einwirkung von Cytokinen und der Expression der CD 40 – Liganden auf einer T- Helferzelle stattfindet [13].

Adäquate Immunantworten sind abhängig von der Spezifität und der Effektorfunktion der Antikörper. Die Spezifität einer Antikörperantwort ergibt sich durch die zwei variablen Domänen der Antigen-Bindungsstelle, die Effektorfunktion ist durch die Isotypen der konstanten Domäne der schweren Ketten bestimmt. Durch einen Wechsel des Isotyps kann die variable Domäne einer schweren Kette mit der konstanten Region eines jeden Isotyps assoziieren [13].

Im Plasma findet man IgG in hohen Konzentrationen, obwohl reife, naive B-Zellen IgM- und IgD- Isotypen exprimieren. Dies bedeutet, daß die B- Zellen einen Isotypenwechsel durchlaufen müssen, um IgG- Isotypen exprimieren zu können.

Die Isotyp-Expression und der Isotypenwechsel sind abhängig von T- Helferzellen und den von ihnen produzierten unterschiedlichen Cytokinen.

In Tierexperimenten konnte festgestellt werden, daß verschiedene Cytokine den Wechsel zu unterschiedlichen Isotypen auslösen. Einige dieser Cytokine steuern etwa die B-Zellproliferation zu Beginn einer B- Zell-Antwort.

IgG 1 liegt in der höchsten Konzentration vor, IgG 4 in der niedrigsten. Immunologische Untersuchungen haben ergeben, daß die T-Zell-abhängigen Immunantworten gegen Peptidantigene durch IgG 1 und IgG 3, die T-Zell-unabhängigen Immunantworten gegen Polysaccharide durch IgG 2 vermittelt werden [13,14,22].

Ein isolierter IgG-Subklassenmangel ist der häufigste Immundefekt und führt zu chronisch rezidivierenden, eitrigen Infektionen. Dieses Defizit, meist an IgG 1 und IgG 2, erfordert eventuell eine Substitutionstherapie mit Immunglobulinpräparaten [26].

Die Analyse der altersabhängigen Immunglobulin-G-Konzentrationen ermöglicht eine Beurteilung des Immunstatus des Probanden. Im Hinblick auf die jeweils erfolgten Impfungen ist eine Aussage zu deren Effektivität möglich. Die erfolgreiche Immunisierung bewirkt einen Anstieg der spezifischen Immunglobulin-Titer [4]. Falls ein Immunmangel besteht, wird durch die Konzentrationsbestimmung der Immunglobuline die Entscheidung zur Durchführung einer Substitutionstherapie erleichtert [26].

Die Konzentrationsbestimmung spezifischer Antikörper erfolgt mittels eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), wodurch eine Spiegelbestimmung spezifischer Antikörper als auch von Immunglobulin-Subklassen möglich ist [27].

Die in Deutschland geltenden Impfempfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) unterliegen einem steten Wandel. So wurden die Impfempfehlungen in den letzten Jahren um die Konjugat-Impfung mit Haemophilus influenzae Typ b (Hib) erweitert.

Im Hinblick auf die in dieser Studie analysierten spezifischen Antikörper-Titer gegen Pneumokokken-Kapselpolysaccharid, anti-Hib-Kapselpolysaccharid und Tetanus-Toxoid empfiehlt die Ständige Impfkommission seit Juli 2001 ein Impfschema entsprechend der Tabelle 1 [28].

Alter \ Impfstoff	2 Monate	3 Monate	4 Monate	11-14 Monate	15-23 Monate	4-5 Jahre	9-17 Jahre
DTP	1.	2.	3.	4.			
DT/Td						A	A
P							A
Hib	1.		2.	3.			

Tab.1: Auszug aus dem Impfkalender für Säuglinge, Kinder und Jugendliche
in Anlehnung an die Empfehlungen der Ständigen Impfkommission 2001
(A = Auffrischimpfung)

Vor diesem Hintergrund ist die in dieser Studie durchgeführte Ermittlung von altersspezifischen Normwerten der spezifischen Immunglobuline von entscheidender Bedeutung.

In bisher veröffentlichten Normwertstudien lassen sich keine einheitlichen Normwerte in den einzelnen Altersklassen erkennen. Dies dürfte vor allem auf die Verwendung unterschiedlicher Referenzstandards und Testmethoden zurückzuführen sein.

Andererseits ergeben sich auch Hinweise auf eine Beeinflussung der IgG-Subklassenkonzentrationen durch das Geschlecht, die Ethnizität, die biologische Variation verschiedener Untersuchungskollektive und die mögliche atopische Disposition der Probanden.

Die altersabhängige Konzentration der Subklassen ist in allen Studien nachgewiesen. So sind bei Säuglingen und Kleinkindern die niedrigsten Spiegel zu verzeichnen [18].

Die Isotypen IgG 1 und IgG 3 erreichen den Konzentrationsspiegel im Serum eines Erwachsenen schneller als IgG 2 und IgG 4.

Das Ziel dieser Studie ist die Ermittlung verbindlicher, altersbezogener Normwerte von spezifischen Antikörpern unter Verwendung eines internationalen Referenzstandards.

Das bisher verwendete Referenzmaterial wurde uneinheitlich eingesetzt und stand nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung. Ein definierter Referenzstandard ist jedoch die Voraussetzung zur Erlangung vergleichbarer Testergebnisse bei der Analyse von Plasmaproteinen in Patientenproben. Bisher zeigten sich unterschiedliche, voneinander abweichende Werte der Referenzmaterialien aufgrund eines fehlenden standardisierten Wertetransfers verschiedener Meßmethoden und einer nicht vorhandenen standardisierten Referenzmethode.

Das in dieser Studie verwendete Referenzmaterial CRM 470 wurde vom European Community Bureau of Reference und dem U.S. College of American Pathologists zertifiziert.

Zur Herstellung dieses neuen Referenzmaterials sind Serumproben verwandt worden, bei denen die demographischen Daten und die vollständige Anamnese der gesunden Spender bekannt waren.

Bisher wurden bereits einige Referenzbereiche für Plasmaproteine bestimmt, jedoch noch keine Normwerte für Immunglobulinsubklassen oder spezifische Antikörpertiter.

Zur Konzentrationsbestimmung der Immunglobulin-G-Subklassen im Referenzstandard CRM 470 wurden hochreine Präparationen der einzelnen Subklassen hergestellt.

Die Ermittlung altersabhängiger Normbereiche für spezifische Antikörper in Bezug auf die Referenzpräparation CRM 470 ist Inhalt dieser Studie.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im Rahmen einer Multizenterstudie der Ruhr -Universität Bochum, der Universitätskinderklinik Leipzig und des Altonaer Kinderkrankenhauses Hamburg bestimmt worden.

3. Probanden und Methodik

1. Probandenermittlung

1.1 Elterninformation

Das Ziel der Studie ist die Ermittlung altersabhängiger Serumspiegel für spezifische Immunglobuline in Bezug auf die Referenzpräparation CRM 470.

Die Probenentnahme erfolgte bei gesunden, zum Zeitpunkt der Blutentnahme infektfreien, Kindern. Die Probanden wurden aus einer Gruppe von Kindern ausgewählt, die zu elektiven Eingriffen und allgemeinen diagnostischen Maßnahmen meist in Narkose stationär aufgenommen worden sind. Die unten genannten Einschluß- und Ausschlußkriterien wurden hierzu in einem standardisierten Fragebogen aufgeführt.

Im Rahmen der stationären Aufnahme führte ich ein Gespräch mit den Eltern des Kindes und anhand eines Informationsblattes wurden die Inhalte der Studie sowie deren Zweck und Unbedenklichkeit dargestellt (Abb.1).

Den Eltern wurde zugesichert, daß die von mir durchgeführte Blutentnahme im Rahmen der Schaffung eines notwendigen intravenösen Zugangs erfolgen würde, die Kinder somit also keiner zusätzlichen Punktion unterzogen werden würden.

Innerhalb des Aufklärungsgesprächs konnte auf eventuelle Fragen der Eltern ausführlich eingegangen werden.

Es wurde in jedem Fall das schriftliche Einverständnis der Eltern eingeholt (Abb.2).

Im Anschluß an das Einführungsgespräch erfolgte die Erhebung der Grunddaten der Probanden.

Dies umfaßte die Krankenblattnummer, das Geschlecht, das Geburtsdatum sowie die Nationalität (Abb.3a).

1.2 Einschlußkriterien

Die jeweilige diagnostische oder operative Maßnahme wurde im Rahmen der Einschlußkriterien festgehalten (Abb.3b).

Die erfassten Einschlußkriterien waren:

- Vaterschaftsgutachten (n = 8)
- Leistenbruch (n = 64)
- Nabelbruch (n = 11)
- Hodenhochstand (n = 29)
- Phimose (n = 48)

- Hämangiom (n = 16)
- Kontroll-Endoskopie (n = 22)
- Enuresis-Diagnostik (n = 19)
- Materialentfernung (n = 25)
- Orthopädische Operationen (n = 28)
- Plastische Ohroperationen (n = 10)
- Kleinwuchs/Großwuchs (n = 18)
- Akzidentelles Herzgeräusch (n = 4)
- Blutspende (n = 70)
- Schiel-Operationen (n = 0)

1.3 Ausschlußkriterien

Als Ausschlußkriterien wurden gewertet:

- Ehemalige Frühgeborene
- Mißbildungssyndrome
- Stoffwechselerkrankungen
- Chronisch- entzündliche Erkrankungen
- Gehäufte Infektionen
- kürzlich abgelaufene Infektionen mit einem oder mehreren der folgenden Symptome:
Atemnot, Pfeifen, Giemen, Husten, Otagien,
Schnupfen, Heiserkeit, Niesen, Erbrechen,
Durchfall, Fieber (Abb.4a).

Um den jeweils vorliegenden Impfstatus der Kinder zu ermitteln, wurden die letzten Impftermine und die Anzahl der jeweils erfolgten Impfungen gegen Tetanus, Haemophilus influenzae Typ b und Pneumokokken anamnestisch und anhand der Impfausweise durch mich erfasst (Abb.4b).

Ferner wurde im Rahmen der Laboranalysen ein Suchtest zum Ausschluss einer allergischen Sensibilisierung durchgeführt.

Abb.1

Elterninformation zur Studie

Ermittlung von immunologischen Referenzwerten für das Kindesalter
Studiennummer TBS-01

Sehr geehrte Eltern,

Der behandelnde Arzt hat bei Ihrem Kind eine Blutentnahme vorgesehen. Wir möchten Sie bitten, einen kleinen Teil des entnommenen Blutes (4 ml) für eine Normwertstudie verwenden zu können.

Ziel unserer Untersuchung ist es, Normwerte für die Konzentration von Abwehrstoffen im Blut von gesunden Kindern zu erhalten. Entsprechende Werte, die für die Diagnose von Abwehrschwächen im Kindesalter wichtig sind, liegen zurzeit nicht in zufriedenstellender Form vor.

Da die Blutentnahme ohnehin erfolgt und nur eine kleine Menge an Blut zusätzlich entnommen wird, entstehen für Ihr Kind keine Risiken, aber auch kein direkter Nutzen aus der Studie.

Die wenigen für diese Untersuchung notwendigen persönlichen Daten werden anonymisiert und unter Einhaltung der Datenschutzbestimmungen ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke eingesetzt.

Selbstverständlich haben wir uns durch die Ethikkommission beraten lassen, die keine Einwände gegen die Studie hatte. Eine Ablehnung der Teilnahme oder auch das spätere Ausscheiden aus der Studie zu jedem beliebigen Zeitpunkt bleibt natürlich ohne nachteilige Folgen, insbesondere für die weitere medizinische Versorgung Ihres Kindes.

Abb. 2

<p>Einwilligungserklärung zur Studie</p> <p>Ermittlung von immunologischen Referenzwerten für das Kindesalter Studiennummer TBS-01</p> <p>Proband (-in) _____ geb.am: _____ (Name, Vorname)</p> <p>Die mündliche und schriftliche Aufklärung über die o.g. Studie erstreckte sich auf (zutreffendes ankreuzen):</p> <p><input type="checkbox"/> Ziele der Untersuchung</p> <p><input type="checkbox"/> Durchführung der Untersuchung (Blutentnahme)</p> <p><input type="checkbox"/> Weiterverwendung der Daten</p> <p><input type="checkbox"/> Freiwillige Teilnahme (Ablehnung/Widerruf ohne nachteilige Folgen)</p> <p><input type="checkbox"/> Ausreichend Zeit zur Entscheidungsfindung</p> <p><input type="checkbox"/> Einwilligung zur Teilnahme</p> <p><input type="checkbox"/> Keine Einwilligung zur Teilnahme</p> <p>_____</p> <p>Aufklärender Arzt (Name, Vorname in Druckbuchstaben)</p> <p>Vater oder Mutter _____</p> <p>(Datum und Unterschrift)(Name, Vorname in Druckbuchstaben)</p> <p>Proband _____</p> <p>(Datum und Unterschrift)(Name, Vorname in Druckbuchstaben)</p> <p>Zeuge _____</p> <p>(Datum und Unterschrift)</p>
--

Abb. 3a/3b

Grunddaten

Krankenblattnummer	_____		
Abnahmedatum	____ . ____ . _____		
Geschlecht	_____	_____	
	weiblich	männlich	
Geburtsdatum	____ . ____ . _____		
Ethnizität	_____	_____	_____
	Deutsch	Türkisch	andere Herkunft
	Aufnahme in die Studie		keine Aufnahme

Einschlusskriterien

	Ja	Nein
Vaterschaftsgutachten	_____	_____
Leistenbruch	_____	_____
Nabelbruch	_____	_____
Hodenhochstand	_____	_____
Phimose	_____	_____
Hämangiom	_____	_____
Kontroll-Endoskopie	_____	_____
Enuresis-Diagnostik	_____	_____
Materialentfernung	_____	_____
Orthopädische Operation	_____	_____
Plastische Ohroperation	_____	_____
Kleinwuchs (familiär)	_____	_____
Großwuchs	_____	_____
Akzidentelles Herzgeräusch	_____	_____
Blutspende	_____	_____
Schiel-Operation	_____	_____

Wenn 1 x „ja“ Aufnahme in die Studie

Abbildung 4 a/b

Ausschlußkriterien

Ehemalige Frühgeborene
(Geburtsstermin vor der 36.Schwangerschaftswoche)

Mißbildungssyndrome
oder Stoffwechselerkrankungen

Chronisch entzündliche Erkrankungen

Akute Infektionen in den letzten 3 Wochen

Infektionen in den letzten 6 Monaten

	1 x			3x oft	
	nie	selten	manchmal		
Atemnot	___	___	___	___	___
Pfeifen oder Giemen	___	___	___	___	___
Husten	___	___	___	___	___
Ohrenschmerzen	___	___	___	___	___
Schnupfen	___	___	___	___	___
Heiserkeit	___	___	___	___	___
Niesen	___	___	___	___	___
Erbrechen	___	___	___	___	___
Durchfall	___	___	___	___	___
Fieber	___	___	___	___	___

	ja	nein
	___	___
	___	___
	___	___
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Wenn 5 x „Nein“, Aufnahme in die Studie

Impfungen (laut Impfausweis)

	Zahl	letzter Termin
Tetanus-Toxoid	___	___ . ___ . ___
Diphtherie	___	___ . ___ . ___
Hib	___	___ . ___ . ___
Pneumovax	___	___ . ___ . ___

CRP ___ . ___ mg/dl mögliche Infektion bestätigt ___

1.4 Probanden

Für die Studie wurden Blutentnahmen von 313 klinisch gesunden Kindern analysiert. Es wurden 214 männliche und 99 weibliche Probanden, in einer Altersspanne von 6 Monaten bis zum 18. Lebensjahr sowie 73 erwachsene Probanden in die Studie aufgenommen.

Tabelle 2 zeigt die Anzahl der Probanden in den jeweiligen Altersklassen.

Die Einverständniserklärung der Eltern wurde im Rahmen eines ausführlichen Aufklärungsgesprächs durch mich vor Versuchsbeginn eingeholt.

Bei den erwachsenen Probanden wurden insgesamt 73 gesunde Blutspender, 36 Männer und 37 Frauen, rekrutiert. Die Altersspanne lag zwischen 20 und 61 Jahren.

Anhand eines standardisierten Fragebogens und eines im Normbereich angesiedelten CRP-Wertes wurden rezidivierende bzw. akut vorliegende Infektionskrankheiten ausgeschlossen.

Die Blutentnahme bei den Kindern erfolgte am nüchternen, zur elektiven Maßnahme stationär aufgenommenen Probanden meist während der Einleitung der Narkose. Bei den erwachsenen Studienteilnehmern erfolgte die Probenentnahme im Rahmen der Blutspende.

Mittels Zentrifugation wurde im Anschluß an die Blutentnahme das Serum separiert, der CRP-Wert bestimmt und die Proben bis zur abschließenden Analyse bei -20°C eingefroren.

Die jeweils durchgeführte Anzahl der Impfungen mit Tetanus-Toxoid, Haemophilus influenzae-Konjugat und Pneumokokken-Konjugat wurden anhand der Impfausweise von mir dokumentiert.

Altersgruppe	Probandenzahl
½-1 Jahr	35
1-2 Jahre	30
2-3 Jahre	33
3-4 Jahre	45
5-7 Jahre	83
8-11 Jahre	56
12-18 Jahre	31
Erwachsene	73

Tab.2: Anzahl der Probanden bezogen auf die jeweilige Altersgruppe

1.5 gesetzliche Auflagen

Der Datenschutz der Patienten wurde über eine Codierung mittels Studiennummern und unter Verwendung der Initialen gewährleistet. Die einzelnen Laborproben sind nur mit der Studiennummer gekennzeichnet worden.

Für eine mögliche spätere Identifizierung wurde eine Liste der Studiennummern und den dazugehörigen Patientendaten beim Studienleiter, Herrn Prof. Dr. Schauer hinterlegt.

2. Durchführung der Laboranalysen

2.1 Enzymimmunoassays

Enzymimmunoassays basieren auf der Möglichkeit, Antigene oder Antikörper so mit Enzymen zu koppeln, daß weder die immunologische noch die enzymatische Aktivität verloren geht. Die spezifische Bindung eines enzymatisch markierten Reaktionspartners wird nach Ablauf des Versuchs durch eine Enzym-Substrat-Reaktion gemessen.

Zum Antikörpernachweis und zur Quantifizierung der Antikörper wird die indirekte Methode des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) angewandt.

Es werden beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, in deren Vertiefungen das jeweilige Antigen durch passive Adsorption gebunden ist. Nach Auswaschen des nicht gebundenen, überschüssigen Antigens werden die Mikrotiterplatten mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Sind in der Serumprobe entsprechende spezifische Antikörper vorhanden, werden diese nun an die fixierten Antigene gebunden. Es erfolgt dann eine erneute Auswaschung des überschüssigen Serums.

Im folgenden Arbeitsgang wird ein Enzym-markiertes Anti-Human-Immunglobulin zugesetzt, welches sich an die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe anlagert.

Nach erneutem Waschvorgang wird eine Lösung zugegeben, die dem zur Markierung verwendeten Enzym als Substrat dient. Die nun ablaufende Reaktion wird nach einiger Zeit unterbrochen und die Abbaurate des Substrats kann anhand einer Farbreaktion gemessen werden.

Diese indirekte Methode kann nur durchgeführt werden, wenn ausreichend gereinigtes Antigen zur Verfügung steht. Ist dies nicht der Fall, kann die Mikrotiterplatte auch mit dem spezifischen Antikörper beladen werden. Im weiteren Verlauf werden dann ungereinigte

Antigene, die Serumprobe, enzymmarkiertes Anti-Human-Globulin sowie das Enzymsubstrat zugefügt.

Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, muß mindestens eine der beiden Komponenten, Antigen - oder Antikörperfraktion, in einer aufgereinigten Form vorliegen.

Zum Nachweis einer Bindung unmarkierter Antikörper an den antigenbeschichteten Träger dienen markierte Anti-Immunglobulin-Antikörper. Diese Anti-Immunglobulin-Antikörper reagieren mit Antikörpern aller Spezifitäten. Dies ist auf Grund der konstanten Abschnitte, die allen Antikörpern gemein sind, möglich.

Anti-Immunglobulin-Antikörper gewinnt man, indem man Immunglobuline des Menschen einer anderen Spezies injiziert. Die so gewonnenen Anti-Immunglobulin-Antikörper werden durch Affinitätschromatographie aufgereinigt, danach markiert und als allgemeine Sonden für gebundene Antikörper eingesetzt.

2.2 Testdurchführung zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern

2.2.1 Bestimmung von Pneumokokken-Kapselpolysaccharid IgG-Antikörpern

Zunächst wird der Kit auf Raumtemperatur erwärmt, wobei die optimale Temperatur zwischen 20°C und 24°C liegt. Der Waschpuffer muß im Verhältnis 1:20 verdünnt werden. Danach werden 10 µl der Probe mit 1000 µl des Probenverdünnungspuffers vermischt. Je 100 µl von jedem Kalibrator, Kontrolle und jeder Probe werden in die entsprechenden Wells pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß daran erfolgt die dreimalige Waschung der Wells mit Waschpuffer.

Dann pipettiert man 100 µl Konjugat in jedes Well und inkubiert die Proben für 30 Minuten, bevor sie erneut gewaschen werden. Jetzt werden jeweils 100 µl Tetramethylbenzidin hinzugefügt, nach weiteren 10 Minuten gibt man die Stop-Lösung hinzu und erhält so einen Farbumschlag von blau nach gelb.

Nun wird die optische Dichte bei 450 nm bestimmt, die Kalibrationskurve wird erstellt und die Ergebnisse können ermittelt werden.

2.2.2 Bestimmung von anti- HiB Kapselpolysaccharid

Zu Beginn der Analyse erfolgt die Verdünnung der Kontrolle und der Serumprobe auf 1:50. Dann werden jeweils 100 µl der Kontrolle, der Kallibratoren und der Proben pro Well pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten und der Verdünnung des Waschpuffers mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:20 erfolgt ein dreimaliges Waschen der Platten.

Anschließend werden 100 µl des Konjugats in jede Vertiefung gegeben und nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten erneut dreifach gewaschen. Nachdem je 100 µl des Tetramethylbenzidin-Substrates pipettiert wurden, wird nach 10 Minuten die Stop-Lösung zugegeben und die optische Dichte kann ermittelt werden.

Abschließend erfolgen die Erstellung der Kallibrationskurven sowie die Ermittlung der Ergebnisse.

2.2.3 Bestimmung von Tetanus- Toxoid IgG-Antikörpern

Zu Beginn der Analyse erfolgt die Verdünnung des Waschpuffers mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1: 20. Anschließend werden die Proben mit Verdünnungspuffer versetzt. In der Folge pipettiert man je 100 µl/Well des Kalibrators, der Kontrolle sowie der Proben. Es folgt eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nun werden die Platten gewaschen und nach Pipettierung des Konjugats erneut für 30 Minuten inkubiert.

Dann erfolgt eine dreifache Waschung, die Zugabe von Tetramethylbenzidin und nach weiteren 10 Minuten Inkubation die Zugabe der Stop-Lösung.

Nachdem die optische Dichte bei 450 nm bestimmt wurde, können die Kallibrationskurven erstellt und die Ergebnisse ermittelt werden.

3. Referenzpräparation CRM 470

Die Anfertigung der Referenzpräparation erfolgte durch die Firma Binding Site GmbH, Heidelberg.

Um gleiche Qualitätsstandards bei der Ermittlung der Konzentrationen der spezifischen Antikörper zu ermöglichen, wurden zunächst hochreine Präparationen der einzelnen Antikörper hergestellt.

Das Ausgangsmaterial einer jeden Antikörperpräparation war eine polyklonale IgG-Präparation, die aus einem Serumpool gefiltert wurde. Mittels einer Affinitätschromatographie erhielt man ein Immunglobulinsubklassen-Eluat. Die Aufreinigung des Eluats wurde dann mit einer allotypspezifischen, polyklonalen Immunaффinitätssäule durchgeführt. Bei der Affinitätschromatographie nutzt man die

spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Antigen, welches an eine feste Matrix gekoppelt ist. Das Antigen wird kovalent an chemisch reaktive Partikel gebunden. Dieses Material wird mit dem Antiserum versetzt so dass die spezifischen Antikörper an die Matrix binden und alle anderen Proteine sowie die übrigen Antikörper ausgewaschen werden können. Die spezifischen Antikörper werden danach freigesetzt, indem man den pH-Wert auf 2,5 erniedrigt oder auf 11 erhöht. Ebenso kann durch Bindung spezifischer Antikörper an eine Matrix die Aufreinigung von Antigenen aus komplexen Gemischen erfolgen.

Die Reinheit der Präparationen wurde anhand eines Western Blot, einer polyklonalen radialen Immundiffusion und durch ein enzyme-linked immunosorbent assay geprüft.

Im Anschluß daran erfolgte die Bestimmung der absoluten Konzentration in jeder Subklassenpräparation mit Hilfe der Aminosäurenanalyse.

4. Geräte

4.1 Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen mittels eines Behring Nephelometer (BNA oder BNA 2)

Durchführung im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, München

PD Dr. Wick

4.2 Bestimmung des Tetanus-Toxoid, Diphtherie-Toxin, Pneumokokken-Kapselpolysaccharid und Haemophilus influenzae Typ b Kapselpolysaccharid sowie der Suchtest zum Ausschluß einer allergischen Sensibilisierung (sx1 und fx5).

Durchführung im Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik,

Philipps Universität Marburg

Prof. Dr. Renz

4.3 Bestimmung der CRP- Werte aller Blutproben

Durchführung im Zentrallabor des Altonaer Kinderkrankenhauses, Hamburg

Dr.D.Pohland

5. Reagenzien

5.1 Bindazyme TM Enzym-Immunoassay

zur Bestimmung von Tetanus- Toxoid IgG-Antikörpern

5.1.1 Packungsinhalt

- 12 x Mikrotiterstreifen mit je 8 vereinzelbaren Wells
- 7 x 1,2 ml gebrauchsfertige Kalibratoren
- 1 x 1,2 ml gebrauchsfertige Positivkontrolle
- 2 x 50 ml Probenverdünnungs-Puffer
- 1 x 12 ml gebrauchsfertiges anti- Human IgG-Konjugat
- 1 x 50 ml Waschpuffer-Konzentrat (20-fach)
- 1 x 14 ml gebrauchsfertige TMB-Substratlösung
- 1 x 14 ml gebrauchsfertige Stop-Lösung
- 1 x Englische Packungsbeilage
- 1 x Deutsche Packungsbeilage
- 1 x Chargenspezifisches QC-Zertifikat (englisch)

In einem Kit ist ausreichend Material enthalten, um 96 Tests zu messen, d. h. 40 Proben können in Doppelbestimmung gemessen werden.

5.1.2 Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen:

Die vereinzelbaren Wells sind mit dem Tetanus-Toxoid-Antigen aus *Clostridium tetani* beschichtet. Sie sind in einem wiederverschließbaren Folienbeutel verpackt, der ein Trockenmittel enthält.

5.1.3 Gebrauchsfertige Kalibratoren:

7 Flaschen mit je 1,2 ml stabilisiertem, vorverdünntem Humanserum mit den folgenden Konzentrationen: 7; 2,33; 0,78; 0,26; 0,09; 0,03; 0,01 IU/ml. Die Kalibratoren sind gegen die NIBSC Tetanus Antitoxin-Referenzpräparation 76/589 kalibriert.

5.1.4 Positivkontrolle:

Eine Flasche mit 1,2 ml stabilisiertem, vorverdünntem Humanserum. Das Serum ist gegen die NIBSC Tetanus Antitoxin-Referenzpräparation 76/589 kalibriert.

5.1.5 Konjugat:

Eine Flasche mit 12 ml affinitätsgereinigtem, Peroxidase-markiertem, gebrauchsfertigem Anti-Human-IgG-Konjugat.

5.1.6 TMB:

Eine Flasche mit 14 ml gebrauchsfertiger Lösung. Das TMB dient als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase des Konjugats.

5.1.7 Stop-Lösung:

Eine Flasche mit 14 ml 3M Phosphorsäure; diese stoppt die Reaktion zwischen Enzym und Substrat.

5.1.8 Waschpuffer (Konzentrat):

Flasche mit 50 ml Pufferkonzentrat (20fach konzentriert) zum Waschen der Wells.

5.1.9 Proben-Verdünnungspuffer:

Zwei Flaschen mit je 50 ml gelb gefärbtem, gebrauchsfertigem Puffer zur Probenverdünnung.

5.1.10 QC-Zertifikat :

Das Zertifikat gibt Auskunft über den erwarteten chargenspezifischen Testverlauf und liegt jedem Test-Kit bei.

5.2 Bindazym TM Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen HiB-Kapselpolysaccharid

5.2.1 Packungsinhalt

12 x Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, in Folie eingeschweißt

6 x 1.5 ml vorverdünnte Kalibratoren

1 x 300 µl flüssige, gebrauchsfertige Kontrolle

1 x 50 ml Probenverdünnungspuffer

- 1 x 10 ml gebrauchsfertiges Konjugat
- 1 x 50 ml Waschpuffer-Konzentrat
- 1 x 14 ml gebrauchsfertige Substratlösung TMB (Tetramethylbenzidin)
- 1 x 14 ml Stop-Lösung
- 1 x Rahmen zum Halten der Mikrotiterstreifen
- 1 x Plattenabdeckung
- 1 x komplette Arbeitsanleitung mit Millimeterpapier für die Kalibrationskurve

Der Test enthält Material für die Untersuchung von maximal 41 Patientenproben (Doppelbestimmungen).

5.2.2 Haemophilus Typ b beschichtete Mikrotiter-Streifen:

12 Mikrotiter-Streifen (mit je 8 Vertiefungen), beschichtet mit HbO-HSA, eingeschweißt in sechs Folientaschen. Die Mikrotiter-Streifen sind grün gekennzeichnet.

5.2.3 Haemophilus Typ b Kalibratoren:

Sechs Flaschen mit je 1,5 ml vorverdünntem, stabilisiertem Humanserum. Das Serum wurde gegen das humane anti-H Influenza Typ b Kapsel Polysaccharid Serum (Lot 1983) der FDA (Food & Drug Administration, USA) kalibriert.

5.2.4 Haemophilus Typ b Kontrolle:

Eine Flasche mit 300 µl stabilisiertem Humanserum. Das Serum wurde gegen das humane anti-H Influenza Typ b Kapsel Polysaccharid Serum (Lot 1983) der FDA (Food & Drug Administration, USA) kalibriert.

5.2.5 Haemophilus Typ b Probenverdünnungspuffer:

Gebrauchsfertige detergenzienhaltige Pufferlösung für die Verdünnung von Kontrolle und Testseren. Eine Flasche mit 50 ml ist im Kit enthalten.

5.2.6 Haemophilus Typ b Konjugat:

Gebrauchsfertig, eine Flasche mit 10 ml Schafantiserum gegen humanes IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.

5.2.7 Waschpuffer:

Protein- und Detergenz-haltiger Puffer zum Waschen der Vertiefungen. Eine Flasche mit 50 ml 20-fach Konzentrat ist in jedem Test enthalten.

5.2.8 Substrat (TMB - 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin): eine Flasche mit 14 ml stabilisierter TMB-Lösung. TMB ist ein Substrat für die Meerrettich-Peroxidase des Konjugats und wird in ein blaues Reaktionsprodukt umgesetzt.

5.2.9 Stop-Lösung:

Eine Flasche mit 14 ml Phosphorsäure; diese stoppt die Reaktion zwischen dem Enzym und dem Substrat und bewirkt einen Farbwechsel des blauen Reaktionsproduktes nach gelb

5.3 Bindazyme TM Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen Pneumokokken-Kapselpolysaccharid

5.3.1 Packungsinhalt

- 12 x Mikrotiterstreifen mit je 8 vereinzelbaren Wells
- 5 x 1,2 ml gebrauchsfertige anti-PCP-Kalibratoren
- 1 x 1,2 ml gebrauchsfertige hohe anti-PCP-Kontrolle
- 1 x 1,2 ml gebrauchsfertige niedrige anti-PCP-Kontrolle
- 2 x 50 ml gebrauchsfertiger, CPS-haltiger Probenverdünnungs-Puffer
- 1 x 12 ml gebrauchsfertiges anti-human-IgG-Konjugat
- 1 x 50 ml Waschpuffer-Konzentrat (20-fach)
- 1 x 14 ml gebrauchsfertige TMB-Substratlösung
- 1 x 14 ml gebrauchsfertige Stop-Lösung
- 1 x Englische Packungsbeilage
- 1 x Deutsche Packungsbeilage
- 1 x Chargenspezifisches QC-Zertifikat

5.3.2 Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen:

Die vereinzelbaren Wells sind mit dem PCP-Antigen beschichtet. Sie sind in einem wiederverschließbaren Folienbeutel, der einen Beutel mit Trockenmittel enthält, verpackt.

5.3.3 Gebrauchsfertige Kalibratoren:

5 Flaschen mit je 1,2 ml stabilisiertem, vorverdünntem und gebrauchsfertigem Humanserum mit den folgenden PCP-Antikörper-Konzentrationen: 270, 90, 30, 10 und 3,3 mg/l. Jeder Kalibrator ist gegen ein humanes, affinitätsgereinigtes PCP-Antiserum kalibriert.

5.3.4 Hohe PCP-Kontrolle:

Eine Flasche mit 1,2 ml stabilisiertem, vorverdünntem und gebrauchsfertigem Humanserum.

5.3.5 Niedrige PCP-Kontrolle:

Eine Flasche mit 1,2 ml stabilisiertem, vorverdünntem und gebrauchsfertigem Humanserum.

5.3.6 IgG-Konjugat:

Eine Flasche mit 12 ml affinitätsgereinigtem, Peroxidase-markiertem, gebrauchsfertigem Anti-Human-IgG-Konjugat.

5.3.7 TMB:

Eine Flasche mit 14 ml gebrauchsfertiger Lösung. Das TMB dient als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase des Konjugats.

5.3.8 Stop-Lösung:

Eine Flasche mit 14 ml 3M Phosphorsäure; diese stoppt die Reaktion von Enzym und Substrat.

5.3.9 Waschpuffer (Konzentrat):

Flasche mit 50 ml Pufferkonzentrat (20fach konzentriert) zum Waschen der Wells.

5.3.10 PCP-Proben-Verdünnungspuffer

Zwei Flaschen mit je 50 ml gelb gefärbtem, gebrauchsfertigem, CPS-haltigem Puffer zur Probenverdünnung.

5.3.11 QC-Zertifikat

6. Blutprobengewinnung und Verarbeitung

6.1 Probengewinnung

Die Blutentnahme bei den Kindern erfolgte durch mich, jeweils in Zusammenhang mit der Anlage eines intravenösen Zugangs meist vor Einleitung der Narkose.

Die Probenentnahme der erwachsenen Probanden wurde im Rahmen der Blutspende durchgeführt.

6.2 Probenverarbeitung

Ein grundlegendes Einschlußkriterium ist neben einer gründlichen Anamnese die Infektfreiheit der involvierten Probanden. Zur Objektivierung dieser Annahme wurde eine klinische Untersuchung und von jeder der entnommenen Blutproben eine CRP-Bestimmung durchgeführt. Ergab sich bei einer Probe eine Überschreitung des Grenzwertes von 1 mg/l, schied der Proband aus der Studie aus.

Nach einer Gerinnungszeit von zwei Stunden wurden die Proben bei 1500 x g für 10 Minuten zentrifugiert und das Serum in die Lagerungsröhrchen abpipettiert.

Diese wurden dann bei -20°C eingefroren.

Zum Ende der Studie erfolgte die eigentliche Analyse.

6.3 Probenanalyse

Es wurden nur Seren analysiert, die optisch klar waren.

Die Analysen umfaßten die Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter gegen Tetanus, Pneumokokken und Haemophilus influenzae Typ b. Die erhaltenen Konzentrationswerte wurden mir zur statistischen Bearbeitung übermittelt.

Hinzu kam ein Suchtest zum Ausschluß einer allergischen Sensibilisierung.

4. Statistische Auswertung

Die spezifischen Antikörpertiter folgen nicht der Gaußschen Verteilung, da die beeinflussenden Komponenten nicht additiv aufeinander wirken.

Wir stellten deshalb die Hauptwerte und die Verteilung der einzelnen Titer Spiegel über die Bestimmung des Log 10 der Antikörperkonzentrationen dar.

Es erfolgte die Ermittlung der 3. und 97. Perzentile.

Bei der Erstellung von Perzentiltabellen gibt die kumulative Häufigkeitsfunktion $F(x)$ für einen gegebenen Wert x an, wieviel Prozent aller Werte kleiner oder gleich diesem x -Wert sind. Mittels dieser Berechnung kann dann auch ermittelt werden, wie viele Werte unter einem bestimmten x -Wert angesiedelt sind. Die Perzentiltabellen ermöglichen also die Ermittlung des dazugehörigen x -Wertes bei gegebenem $F(x)$ [7].

Die Anwendung des Logarithmus ermöglicht durch die logarithmische Unterteilung der X-Achse die Darstellung der Meßreihe in Form einer Geraden. In diesen Fällen erhält man eine sogenannte Log-Normalverteilung, bei der die Logarithmen der Zufallsvariablen normalverteilt sind. Die Entstehung einer Log-Normalverteilung ist darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Komponenten multiplikativ aufeinander Einfluß nehmen. Logarithmiert man die log-normalverteilte Variable X , kann man mit der so entstandenen Variablen $Z = \log X$ ebenso rechnen wie mit einer normalverteilten Variablen [7].

5. Ergebnisse

a) Tetanus-Antikörper

Die in dieser Studie ermittelten anti-Tetanus Titer ließen einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der durchgeführten Impfungen und der Höhe der Antikörperspiegel erkennen. Nach den Empfehlungen der Ständigen Impfkommission soll die Grundimmunisierung gegen Tetanus im 2., 3., 4. sowie 11.-14. Lebensmonat erfolgen. Auffrischimpfungen erfolgen mit 4-5 Jahren und 9-17 Jahren.

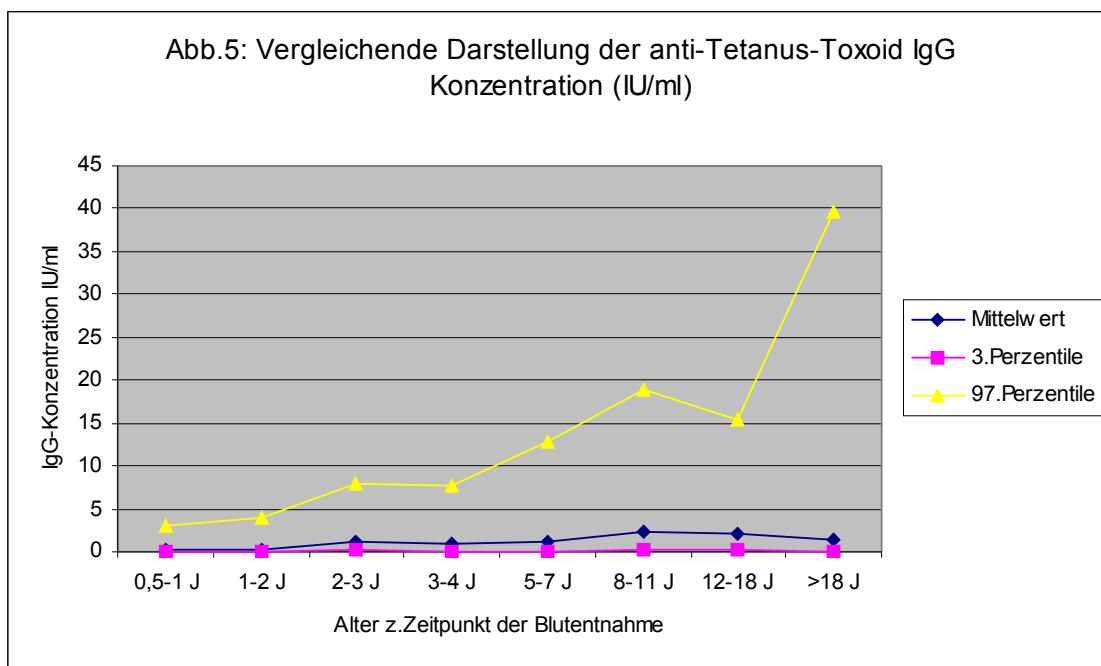
Die altersabhängigen ermittelten anti-Tetanus-Toxoid IgG-Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

	Mittelwert	3.Perzentile	97.Perzentile
½-1 Jahr	0,24	0,02	3,12
1-2 Jahre	0,3	0,04	3,92
2-3 Jahre	1,13	0,16	7,87
3-4 Jahre	0,93	0,11	7,79
5-7 Jahre	1,07	0,09	12,87
8-11 Jahre	2,31	0,28	18,78
12-18 Jahre	1,99	0,26	15,44
Erwachsene	1,44	0,05	39,62

Tab.3 : Altersbezogene Konzentration an spezifischem anti-Tetanus-Toxoid IgG (IU/ml)

Entsprechend der Anzahl der erhaltenen Impfungen ermittelten wir bei Probanden im ersten Lebensjahr anti-Tetanus-Immunglobulin-Titer im Mittel von 0,24 IU/ml, diese Werte zeigten bis zum 5.Lebensjahr einen Anstieg und erreichten in der Altersklasse der 5-7 jährigen 1,07 IU/ml. Nach Durchführung der zweiten Auffrischimpfung zwischen dem 9.und 17.Lebensjahr lies sich ein erneuter Titeranstieg in der Gruppe der 8-11 jährigen mit 2,31 IU/ml ermitteln.

In der Altersklasse der 12-18 jährigen war ein leichter Titerabfall auf 1,99 IU/ml festzustellen, der am ehesten auf eine bei einigen dieser Probanden nicht durchgeführte zweite Boosterimpfung zurückzuführen ist (Abb.5).



In der Gruppe der Erwachsenen fand sich ein weiterer Titerabfall auf 1,44 IU/ml. Eine Erklärung dieses Titerrückganges könnte in der reduzierten Impfpraxis der Erwachsenen liegen, andererseits zeigt sich bei ausbleibenden Auffrischimpfungen ein physiologischer Rückgang der Antikörperspiegel. Bei 86 % der Erwachsenen fanden sich Titer im protektiven Bereich, das heißt Werte über 0,15 IU/ml [27].

Somit ließ sich eine direkte Korrelation der Titer mit der Anzahl der in den einzelnen Altersklassen durchgeführten Impfungen erkennen. Es erfolgte ein Titeranstieg in den ersten zwei Lebensjahren, danach wurde ein Plateau bis zur Durchführung der Auffrischimpfungen gehalten und in deren Folge ließ sich ein erneuter Anstieg verzeichnen.

Die in dieser Studie ermittelten anti-Tetanus-Toxoid Konzentrationen an spezifischem IgG sind graphisch in Korrelation zum Probandenalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme in Form der 3. sowie der 97. Perzentile (Abb.5) dargestellt.

Die Darstellung der 3. Perzentile der anti-Tetanus-Toxoid IgG-Konzentrationen zeigt in der Altersgruppe der Einjährigen einen Basiswert von 0,02 IU/ml der mit 2-3 Jahren einen Peak von 0,16 IU/ml erreicht und vor der zweiten Boosterimpfung bei 0,09 IU/ml liegt. Nach erfolgter 2. Auffrischimpfung werden Konzentrationswerte bis zu 0,28 IU/ml gemessen (Abb. 5).

Die 97. Perzentile zeigt einen relativ kontinuierlichen Anstieg der Konzentrationen spezifischer anti-Tetanus-Toxoid IgG. Im ersten Lebensjahr finden sich Konzentrationen von 3,12 IU/ml mit einem folgenden Plateau vom 2.-4. Lebensjahr sowie einem deutlichen Titeranstieg nach der 2. Auffrischimpfung bis in der Gruppe der 12-18 jährigen 15,44 IU/ml erreicht werden (Abb. 5).

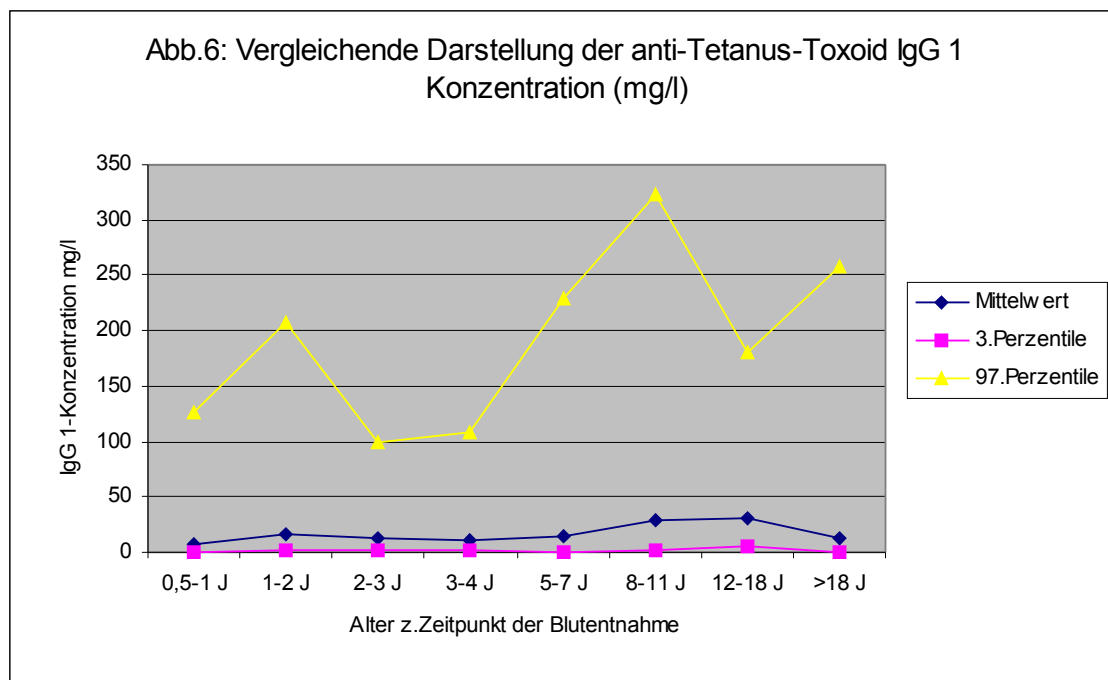
Da etwa 80% der spezifischen Antikörper gegen Tetanus der Immunglobulinsubklasse 1 angehören, zeigten auch die für diese Subklasse ermittelten Werte eine ähnliche Verteilung. In Tabelle 4 sind die altersbezogenen Konzentrationen an anti-Tetanus-Toxoid IgG 1 wiedergegeben.

	Mittelwert	3.Perzentile	97.Perzentile
½-1 Jahr	6,6	0,3	126,4
1-2 Jahre	17,1	1,4	208,0
2-3 Jahre	12,9	1,7	99,8
3-4 Jahre	11,5	1,2	108,7
5-7 Jahre	14,3	0,9	228,5
8-11 Jahre	29,2	2,6	323,5
12-18 Jahre	29,8	4,9	180,0
Erwachsene	13,2	0,7	258,1

Tab.4: Altersbezogene Konzentration von anti-Tetanus-Toxoid IgG 1 (mg/l)

Nach Abschluß des ersten Impfzyklus fanden sich Antikörpertiter von 17,1 mg/l , die nach einem leichten Abfall im Kleinkindalter in der Folge der jeweiligen weiteren Impfungen auf Werte von 14,3 mg/l und 29,8 mg/l anstiegen .

Der in der Gruppe der Erwachsenen ermittelte Abfall der Gesamtimoglobuline der Gruppe G ließ sich auch für die entsprechende Subklasse IgG 1 erheben (Abb.6).



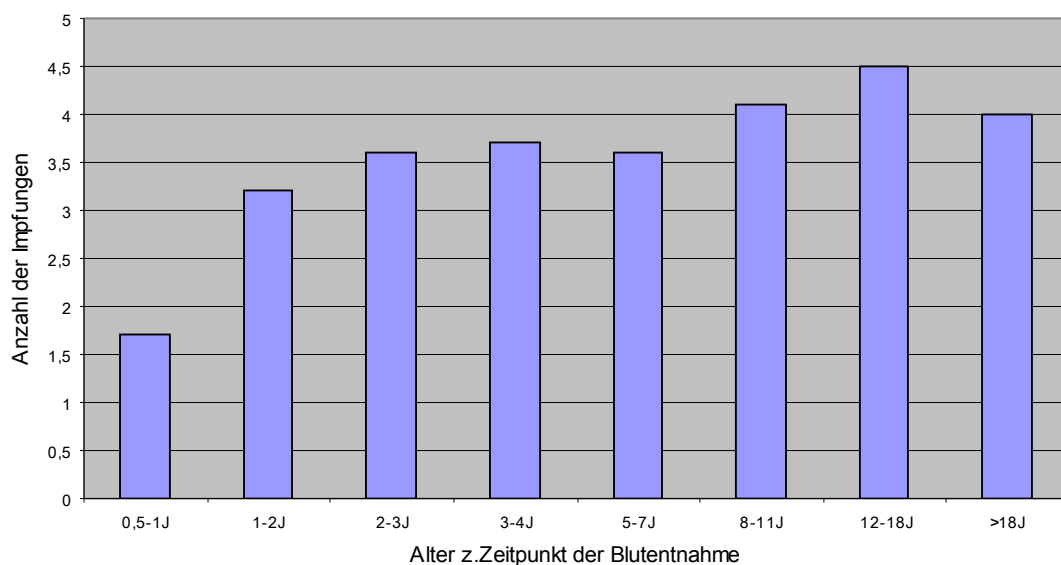
In Korrelation zu den Konzentrationswerten an spezifischem IgG zeigt die Kurve der 3. Perzentile für IgG 1 einen Anstieg der Titerkonzentrationen von 1,4 mg/l in der Altersgruppe der 1-2 jährigen, um dann im 5.-7. Lebensjahr auf 0,9 mg/l abzusinken. Nach der zweiten Auffrischimpfung wird eine Peak von 4,9 mg/l erreicht, der in der Gruppe der Erwachsenen auf Grund der nicht immer erfolgenden Auffrischimpfung auf 0,7 mg/l abfällt (Abb. 6).

Entsprechend zeigt die 97. Perzentile für spezifische anti-Tetanus-Toxoid IgG 1 ein Peak in der Altersgruppe der 1-2 jährigen mit 208 mg/l und steigt im Weiteren auf Konzentrationswerte von 323,5 mg/l in der Altersklasse der 8-11 jährigen an (Abb.6).

Die Anzahl der bei den Probanden durchgeführten Impfungen wurde den Impfausweisen entnommen und in Korrelation mit der jeweiligen Altersklasse dargestellt (Abb.7).

Demnach waren im Mittel drei bis vier anti-Tetanus Impfungen bis zu einem Alter von 7 Jahren erfolgt. Nach dem 8. Lebensjahr wiesen alle Probanden in der Regel vier Impfungen auf.

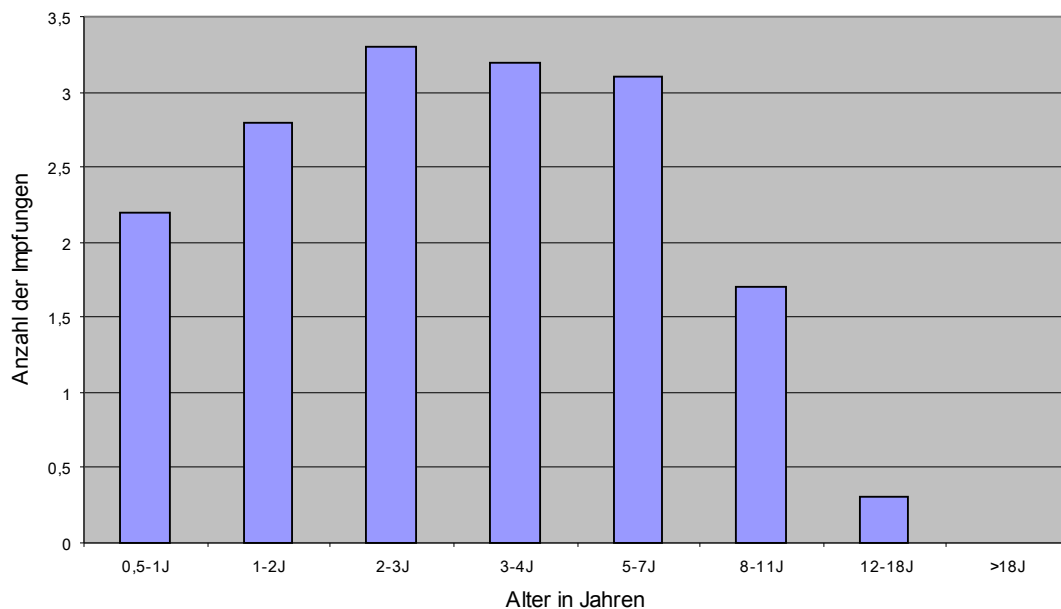
Abb.7:Anzahl der Impfungen gegen Tetanus in Korrelation zum Alter



b) Haemophilus-Antikörper

Die Ständige Impfkommission empfiehlt die Durchführung von insgesamt drei Impfungen gegen Haemophilus influenzae. Diese sollten im 2. und 4. Lebensmonat, sowie mit 11-14 Monaten erfolgen. Die Anzahl der erfolgten Impfungen in Bezug auf die einzelnen Altersklassen ist in Abbildung 8 dargestellt.

Abb.:8
Anzahl der Impfungen gegen Hib in Korrelation zum Alter



Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, sind bis zum Abschluß des siebten Lebensjahres nahezu immer drei Impfungen erfolgt. Auffallend ist, dass in der Gruppe der 8-11 jährigen Probanden keine vollständige Immunisierung festzustellen ist. Diese Gruppe ließ im Mittel eine Anzahl von zwei anti-Haemophilus influenzae Impfungen erkennen. Ab dem 12. Lebensjahr ist diese Impfung nur vereinzelt angewandt worden und bei den erwachsenen Probanden wurde keine Impfung durchgeführt. Diese Verteilung der Anzahl der erfolgten Impfungen ist darauf zurückzuführen, dass die Schutzimpfung gegen Haemophilus influenzae erst vor wenigen Jahren (1990) als Standardimpfung in die allgemeinen Empfehlungen der Ständigen Impfkommission aufgenommen wurde. Die in diesen

Gruppen vorliegenden Titer von 1,9 mg/l und 1,32 mg/l sind demnach auf die natürliche, adaptive Immunantwort zurückzuführen (Tab.5).

Die ermittelten Titer gegen Haemophilus influenzae Typ b unter Erstellung der 3. und 97.Perzentile sowie des Mittelwertes in Bezug zu den jeweiligen Altersgruppen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

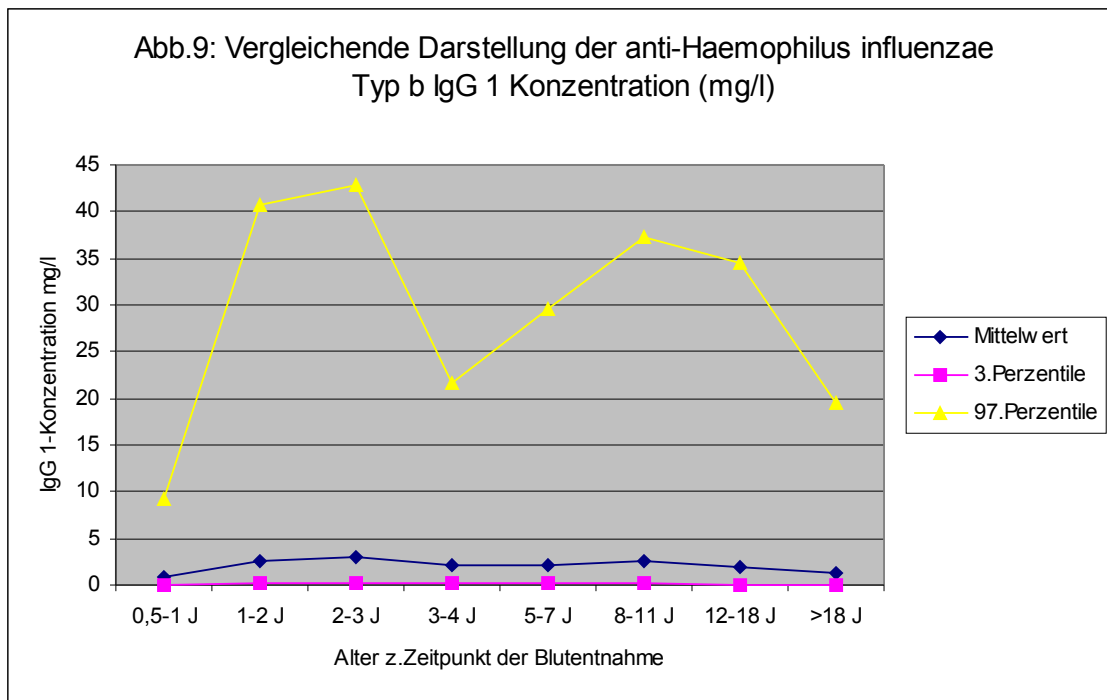
	Mittelwert	3.Perzentile	97.Perzentile
½-1 Jahr	0,84	0,08	9,2
1-2 Jahre	2,54	0,16	40,8
2-3 Jahre	3,06	0,22	42,8
3-4 Jahre	2,05	0,19	21,6
5-7 Jahre	2,08	0,15	29,5
8-11 Jahre	2,48	0,16	37,2
12-18 Jahre	1,90	0,10	34,5
Erwachsene	1,32	0,09	19,5

Tab. 5: Altersbezogene Konzentration an spezifischem anti- Haemophilus influenzae Typ b IgG 1 (mg/l) und Angabe der 3./ 97.Perzentile sowie des Mittelwertes

Im ersten Lebensjahr fanden sich die niedrigsten Titer von im Mittel 0,84 mg/l.

Nach Abschluß des Impfzyklus im zweiten Lebensjahr erfolgte ein Anstieg auf 2,54 mg/l und im dritten Lebensjahr auf 3,06 mg/l. Die folgenden Altersklassen wiesen ein Plateau mit Werten von 2,05 mg/l – 2,48 mg/l auf. Die höchsten Titer wurden somit im Kleinkindalter nachgewiesen, also in der Altersstufe, in der Infektionen mit Haemophilus influenzae auch ein schweres Erkrankungsbild hervorrufen können.

Die in dieser Studie ermittelten Konzentrationen an anti-Haemophilus Typ b IgG 1 sind im Hinblick auf den Mittelwert sowie die 3. und 97. Perzentile graphisch in Abbildung 9 erfasst.



Die 3. Perzentile zeigt Basiswerte im 1. Lebensjahr von 0,08 mg/l an spezifischen IgG 1, um dann nach der 2. Impfung in der Altersklasse der 2-3 jährigen einen Konzentrationsanstieg auf 0,22 mg/l zu zeigen. Danach erfolgt nach einem Plateau um 0,15 mg/l in der Gruppe der 5-11 jährigen ein Abfall auf 0,09 mg/l in der Gruppe der Erwachsenen (Abb. 9).

Die 97. Perzentile zeigt einen Ausgangswert von 9,2 mg/l im 1. Lebensjahr, der nach der zweiten Impfung einen Peak von 42,8 mg/l im 2.-3. Lebensjahr aufweist. Nach einem Abfall um 50,4 % auf 21,6 mg/l erfolgt dann ein neuerlicher Anstieg auf 37,2 mg/l in der Gruppe der 8-11 jährigen (Abb. 9).

c) Pneumokokken – Antikörper

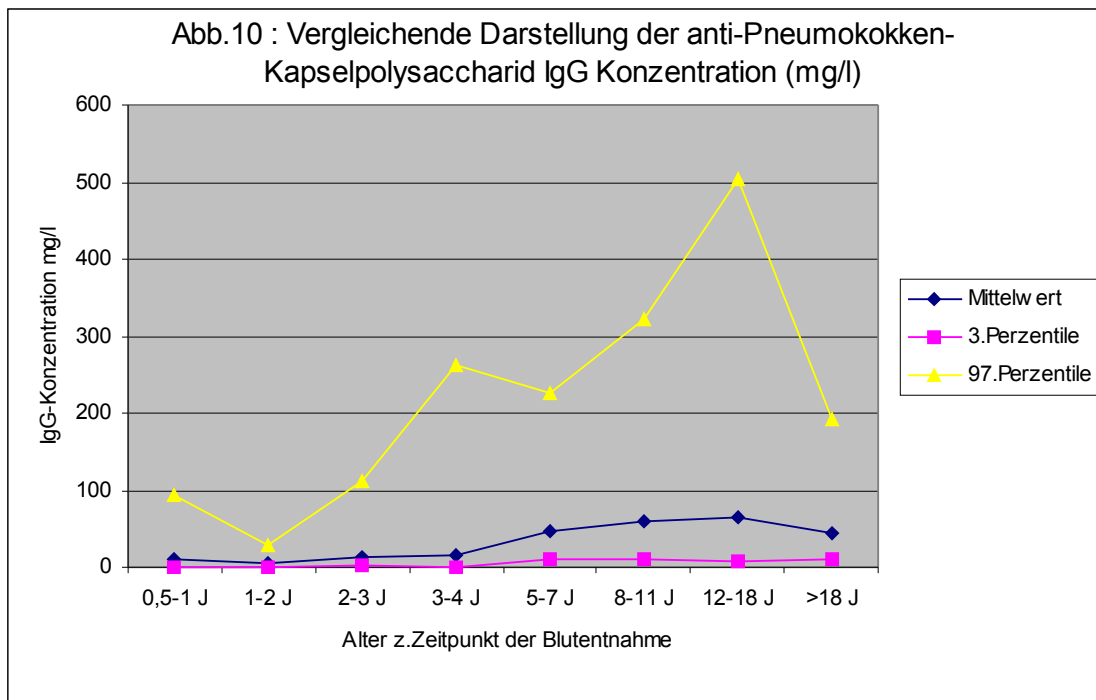
Die ermittelten Ergebnisse spiegeln die natürlich erworbene Immunitätslage wieder, da es bisher keine empfohlene Pneumokokkenimpfung in Deutschland gibt.

80% der spezifischen Antikörper gegen *Streptococcus pneumoniae* gehören der Immunglobulinsubklasse 2 an.

	Mittelwert	3.Perzentile	97.Perzentile
½-1 Jahr	9,2	0,9	93,0
1-2 Jahre	4,6	0,9	29,2
2-3 Jahre	12,3	1,4	110,4
3-4 Jahre	14,6	0,8	262,1
5-7 Jahre	45,5	9,2	225,9
8-11 Jahre	59,5	11,0	320,8
12-18 Jahre	65,9	8,7	502,6
Erwachsene	43,8	10,0	191,2

Tab.6: Altersbezogene Konzentration an spezifischem anti-Pneumokokken-Kapselpolysaccharid IgG (mg/l) in Bezug auf die 3. Und 97.Perzentile sowie den Mittelwert

Im Verlauf der ersten zwei Lebensjahre fand sich ein leichter Titerabfall von 9,2 mg/l auf 4,6 mg/l. In den folgenden Jahren ließ sich ein Titeranstieg auf 12,3 mg/l und 14,6 mg/l ermitteln. Zwischen dem 3. und 5. Jahr ergab sich ein Plateau, in dessen Folge sich ein deutlicher Anstieg der Antikörperkonzentrationen von 45,5 mg/l auf 65,9 mg/l verzeichnen ließ. Die gemittelten Titer der Gruppe der Erwachsenen lagen bei 43,8 mg/l (Tab.6). Die graphische Darstellung zeigt Abbildung 10.



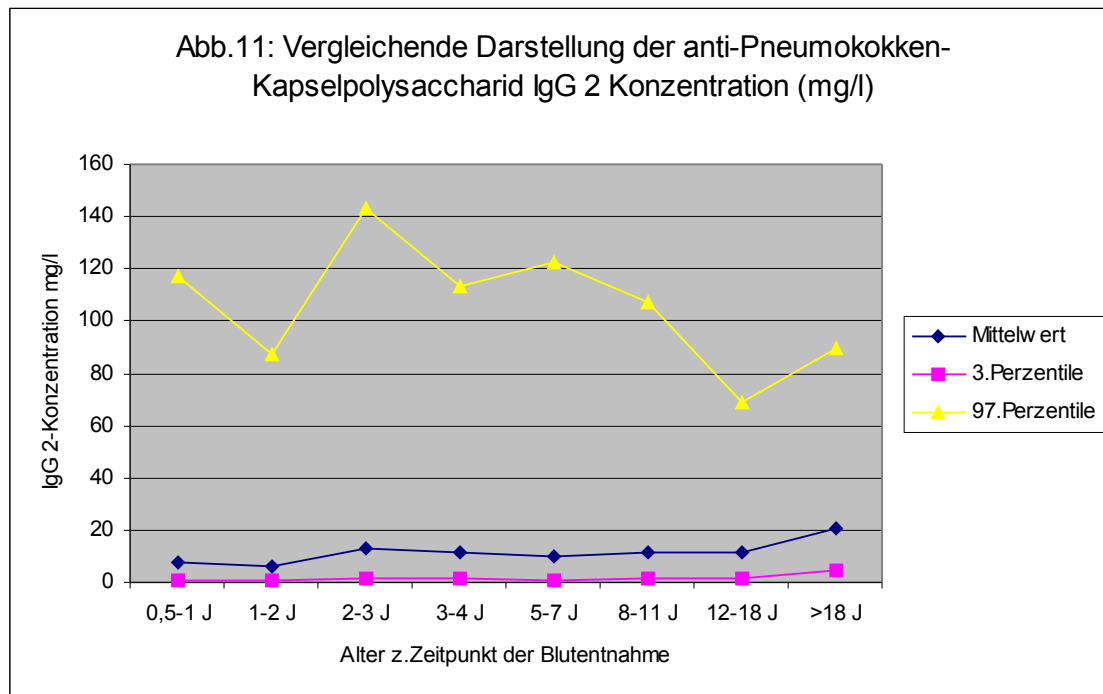
Die 3. Perzentile der Antikörperkonzentrationen an spezifischem IgG zeigt bis zum 3.-4. Lebensjahr einen relativ konstanten Wert um 0,9 mg/l. Danach ist ein Anstieg bis auf 11,0 mg/l in der Altersklasse der 8-11 jährigen zu verzeichnen. Der Titerwert verbleibt in der Folge annähernd auf diesem Niveau (Abb. 10).

Der Kurvenverlauf der 97. Perzentile zeigt einen Ausgangswert von 93 mg/l in der Altersgruppe der 1-2 jährigen. Hier folgt nach einem geringen Konzentrationsabfall im 2.-3. Lebensjahr ein Titeranstieg bis auf 262,1 mg/l in der Gruppe der 3-4 jährigen. Ein weiterer Anstieg auf 502,6 mg/l erfolgt in der Gruppe der 12-18 jährigen (Abb. 10).

Im Hinblick auf die Verteilung der spezifischen Antikörper der Immunglobuline der Gruppe G 2 zeigt sich nach einem anfänglichen Titerabfall von 7,6 mg/l auf 6,5 mg/l ein Plateau vom 3.-18. Lebensjahr, hier ermittelten wir Werte von 13,1 mg/l bis 11,4 mg/l. Die Erwachsenen wiesen eine mittlere Konzentration an Immunglobulin G 2 von 20,5 mg/l auf (Tab.7). Die graphische Darstellung der mittleren Konzentrationen an IgG 2 in Bezug auf die Altersklassen erfolgt in Abbildung 11.

	Mittelwert	3.Perzentile	97.Perzentile
½-1 Jahr	7,6	0,5	117,3
1-2 Jahre	6,5	0,5	87,0
2-3 Jahre	13,1	1,2	142,8
3-4 Jahre	11,7	1,2	113,4
5-7 Jahre	9,7	0,8	122,4
8-11 Jahre	11,6	1,2	107,1
12-18 Jahre	11,4	1,9	69,2
Erwachsene	20,5	4,7	89,4

Tab.7: Konzentration an spezifischen anti-Pneumococccen Kapselpolysaccharid IgG 2 (mg/l) unter Angabe der altersbezogenen Werte der 3./ 97. Perzentile und des Mittelwertes



Diese ermittelten Werte lassen keine Rückschlüsse über die immunologische Lage eines Probanden im Hinblick auf eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* zu, da die erhaltenen Ergebnisse keine Aussage über den jeweils vorliegenden Kapselpolysaccharidtyp treffen können.

Die graphische Erfassung der 3. Perzentile der spezifischen IgG 2 Antikörper gegen Pneumokokken - Kapselpolysaccharid zeigt innerhalb der ersten 2 Lebensjahre ein Plateau mit Konzentrationen von 0,5 mg/l, in den folgenden zwei Jahren steigen die Werte auf 1,2 mg/l an und erreichen in der Altersklasse der Erwachsenen mit 4,7 mg/l den höchsten Wert (Abb. 11).

Die 97. Perzentile zeigt einen Basiswert von 117,3 mg/l, wohl bedingt durch die mütterliche Leihimmunität, erreicht einen Peak von 142,8 mg/l in der Altersgruppe der 2-3 jährigen um dann langsam auf 69,2 mg/l in der Altersgruppe der 12-18 jährigen abzufallen. Die Gruppe der Erwachsenen weist wieder einen leichten Anstieg auf 89,4 mg/l auf (Abb.11).

Tabelle 8 ermöglicht den Vergleich der erhaltenen Mittelwerte der einzelne Antikörpertiter in Relation zum Probandenalter.

In Tabelle 9 sind jeweils die 3. und 97. Perzentile an erhaltenen Antikörperkonzentrationen gegen Tetanus-Toxoid, Pneumokokken-Kapselpolysaccharid und *Haemophilus influenzae* Typ b in Korrelation zum Probandenalter erfasst.

	0,5-1 J	1-2 J	2-3 J	3-4 J	5-7 J	8-11 J	12-18 J	> 18 J
TT IgG (IU/ml)	0,24	0,3	1,13	0,93	1,07	2,31	1,99	1,44
TT IgG 1 (mg/l)	6,6	17,1	12,9	11,5	14,3	29,2	29,8	13,2
Hib IgG (mg/l)	0,84	2,54	3,06	2,05	2,08	2,48	1,90	1,32
PCP IgG (mg/l)	9,2	4,6	12,3	14,6	45,5	59,5	65,9	43,8
PCP IgG 2 (mg/l)	7,6	6,5	13,1	11,7	9,7	11,6	11,4	20,5
Probandenzahl	35	30	33	45	83	56	31	73

Tab.8 Mittelwerte der einzelnen Antikörpertiter in Abhängigkeit zur Altersgruppe. (TT: Tetanus-Toxoid; Hib: Haemophilus influenzae Typ b; PCP: Pneumokokken-Kapselpolysaccharid)

	0,5-1 J	1-2 J	2-3 J	3-4 J	5-7 J	8-11 J	12-18 J	> 18 J
TT IgG (IU/ml)	0,02-3,12	0,04-3,92	0,16-7,87	0,11-7,79	0,09-12,87	0,28-18,78	0,26-15,44	0,05-39,62
TT IgG 1 (mg/l)	0,3-126,4	1,4-208,0	1,7-99,8	1,2-108,7	0,9-228,5	2,6-323,5	4,9-180,0	0,7-258,1
Hib IgG (mg/l)	0,08-9,2	0,16-40,8	0,22-42,8	0,19-21,6	0,15-29,5	0,16-37,2	0,10-34,5	0,09-19,5
PCP IgG (mg/l)	0,9-93,0	0,9-29,2	1,4-110,4	0,8-262,1	9,2-225,9	11,0-320,8	8,7-502,6	10,0-191,2
PCP IgG 2 (mg/l)	0,5-117,3	0,5-87,0	1,2-142,8	1,2-113,4	0,8-122,4	1,2-107,1	1,9-69,2	4,7-89,4
Probandenzahl	35	30	33	45	83	56	31	73

Tab. 9 3. und 97. Perzentile der spezifischen Antikörpertiter in Korrelation zum Alter. (TT: Tetanus-Toxoid; Hib: Haemophilus influenzae Typ b; PCP: Pneumokokken-Kapselpolysaccharid)

6. Diskussion

Die Messung spezifischer Antikörper ist ein unverzichtbarer Bestandteil der immunologischen Untersuchung eines Patienten, bei dem ein Defekt der Immunfunktion vermutet wird [4,13].

Obwohl Immundefekt-Syndrome relativ selten sind (die Inzidenz beträgt 1:10 000), sollte bei Patienten mit gehäuft auftretenden Infekten eine Analyse des Immunstatus erfolgen. Die Immunkompetenz ist sowohl durch eine **quantitative** als auch durch eine **funktionelle** Analyse der einzelnen Komponenten einzuschätzen. Neben der Untersuchung des Blutbildes und des Differentialblutbildes sollte auch eine morphologische Beurteilung der Leukozyten erfolgen.

Die Durchführung eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zur quantitativen Erhebung der Immunglobulinkonzentrationen vervollständigt die Laboranalysen. Die Ermittlung der Immunglobulinkonzentrationen ermöglicht eine Aussage über die Effektivität der adaptiven humoralen Immunantwort.

Eine Einschätzung der funktionellen Aspekte wird durch die Messung von spezifischen Antikörper-Titern nach Impfungen ermöglicht [18,26]

Zum heutigen Zeitpunkt fehlen jedoch genaue Referenzstandards in Bezug auf die altersspezifische Normalverteilung spezifischer Antikörperkonzentrationen.

Dahingegen ist die Berücksichtigung der spezifischen Antikörper-Titer im Hinblick auf die jeweilige Altersklasse und die Impfanamnese ein grundlegendes Kriterium. Auch der Zeitpunkt, zu dem die jeweilige Analyse durchgeführt wird, ist nicht ohne Effekt. So lassen sich postpartal Immunglobulinkonzentrationen ermitteln, die annähernd denen der Erwachsenen entsprechen. Dies ist auf maternal transferierte Immunglobuline zurückzuführen. Im Verlauf des ersten Lebensjahres fallen die Immunglobulinkonzentrationen auf etwa 60 % eines Erwachsenen ab und mit dem 10. Lebensjahr werden diese Konzentrationsspiegel wieder endgültig erreicht [18].

Die Möglichkeit, eine adäquate Immunantwort auszubilden, ist sowohl von den Faktoren des Antigens als auch von denen des Individuums abhängig [5,9,18,20].

Damit eine effektive Antikörperbildung erfolgen kann, bedarf es eines suffizienten Zusammenspiels der zellulären und humoralen Komponenten des Immunsystems.

Primäre Immundefekt-Syndrome betreffen in etwa 50 % der Fälle einen spezifischen Antikörpermangel, in 20 % besteht ein kombinierter Defekt, der die Antikörperbildung und die zellulären Komponenten betrifft. Die übrigen Bereiche betreffen Störungen des Komplementsystems und der Phagozytenaktivität.

Die zelluläre Komponente der Immunantwort basiert auf der Erkennung eines Antigens und dessen Präsentation in Verbindung mit MHC-Molekülen durch T-Zellen und der Aktivierung von Cytokinen. Vermittelt durch die Antigenpräsentation, die Anwesenheit von Cytokinen und T-Zellen erfolgt die Aktivierung der B-Zellen. Die Identifikation des Antigens nach Präsentation und in der Folge die Proliferation und Differenzierung des B-Zell-Klons in Plasmazellen und Gedächtniszellen sind die grundlegenden Mechanismen der adaptativen Immunantwort.

Das Ausbleiben einer adäquaten Immunantwort legt die Vermutung eines Defektes innerhalb des Systems nahe. Dabei können sowohl die humorale als auch die zelluläre Ebene ursächlich sein. Ein Defekt der zellulären Komponente der Immunreaktion kann sich zunächst allein in einem verminderten Gesamt-Immunglobulinspiegel äußern [9,18,12].

Patienten mit variablen Immundefektsyndromen zeigen eine verminderte Bildung spezifischer Immunglobuline in Folge von gestörter T-Zell-Aktivierung und Antigenerkennung.

Daten zu spezifischen Immunglobulinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Alter des Probanden und von erfolgten Impfungen liegen in systematischer Form bisher nicht vor. Diese Studie dient somit der Ermittlung der spezifischen Antikörperbildung nach natürlichem Kontakt mit Polysaccharidantigenen und Proteinantigenen im Rahmen von Impfungen bzw. Infektionen in Relation zu den Altersklassen der Probanden.

Die Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung der Verwendung der Antigene als Impfstoffe zur primären Prophylaxe und der Art und Weise der durch das Antigen ausgelösten Immunantwort interpretiert werden.

Das Tetanus-Toxoid findet als Impfstoff eine weit verbreitete Anwendung, deshalb ist die Messung der Immunantwort auf Tetanus besonders geeignet, um die Funktion des Immunsystems zu analysieren.

Als Tetanus- Impfstoff wird ein Formoltoxoidadsorbat-Impfstoff verwendet. Die von *Clostridium tetani* gebildeten Exotoxine Tetanospasmin und Tetanolysin gehen bei der Züchtung der Stämme in das Kulturmedium über und können so extrahiert werden. Nach der Isolierung und Reinigung des Toxins erfolgt durch Zugabe von Formalin die Bildung

eines Formoltoxoids. Die folgende Adsorption an Aluminiumhydroxid führt beim Impfling über eine verlangsamte Resorption des adsorbierten Immunogens zu einer gesteigerten Antitoxinbildung. Formoltoxoidadsorbat-Impfstoffe induzieren eine antitoxische, aber keine antiinfektiöse Immunität [3].

Die in dieser Studie ermittelten spezifischen Antikörpertiter gegen Tetanus-Toxoid lassen zwei Maximalwerte erkennen. Korrespondierend zu den routinemäßig durchgeführten Impfschemata im Kindesalter findet sich in der Altersklasse der 2-jährigen ein Spitzenwert von 1,13 IU/ml und bei 9-jährigen Kindern ein weiterer Spitzenwert von 2,31 IU/ml [28].

In der Gruppe der erwachsenen Probanden ließ sich eine erhebliche Zahl an Personen abgrenzen, die einen Antikörperspiegel unterhalb des protektiven Wertes von 0,15 IU/ml aufwiesen [27].

Annähernd 80 % der gegen Tetanus-Toxoid gebildeten spezifischen Immunglobuline sind der Gruppe der IgG 1 zuzuordnen [23].

Bei der Antikörperbildung gegen *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* ist die ausschlaggebende, als Antigen wirkende Komponente eine Polysaccharidkapsel. Diese Polysaccharidkapsel erschwert die Opsonierung und Phagozytose des Erregers und ist so verantwortlich für dessen Virulenz [17].

Die bisher aus Blut oder Liquor isolierten *Haemophilus*-Stämme sind fast ausnahmslos bekapselt. Je nach dem chemischen Aufbau des Kapselpolysaccharids lassen sich sechs serologische Typen, bezeichnet von a - f, unterscheiden. Im pathologischen Material dominieren Stämme mit dem Kapseltyp b. Die Kapselsubstanz von *Haemophilus influenzae* Typ b zeigt einen Aufbau aus Polyribosyl-ribitol-phosphat, welcher für die Virulenz des Erregers ausschlaggebend ist [3].

Die ermittelten IgG 1-Titer gegen *Haemophilus influenzae* Typ b zeigen die erfolgte Immunantwort nach Applikation des Konjugatimpfstoffes und sind somit Ausdruck der durch die Impfung induzierten Immunität.

Durch die Konjugation mit Proteinantigenen im Konjugatimpfstoff werden Antikörper im IgG 1-System gebildet, hierzu sind auch schon Säuglinge fähig. Im Gegensatz dazu entwickelt sich die natürliche Immunität gegenüber *Haemophilus influenzae* im IgG 2-Bereich.

Die Polysaccharid-Kapsel von *Streptococcus pneumoniae* zeigt eine antiphagozytäre Wirkung. Über 80 verschiedene Kapselpolysaccharide von *Streptococcus pneumoniae* entsprechen den verschiedenen serologischen Typen. Weitere Zellwandantigene der

Streptococccen-Gruppe werden durch das sogenannte C-Polysaccharid, ein R-Protein und ein M-Protein repräsentiert. Nur die kapseltragenden Stämme sind für den Menschen hochvirulent. Antikörper gegen Kapselpolysaccharide verleihen auch eine hohe Immunität gegen Pneumokokken mit homologem Kapseltyp. Die hier ermittelten Titer für IgG 2 entsprechen der natürlichen Immunität der Probanden ohne Erfassung einer Impfantwort.

Der Effekt der Polysaccharide im Hinblick auf die Blockierung der Phagozytose und Oponierung beruht auf der während der Erregervermehrung erfolgenden Abgabe der Polysaccharide an die Umgebung [3].

Zur Impfung gegen Haemophilus influenzae Typ b und Pneumokokken stehen so genannte Konjugatimpfstoffe zur Verfügung.

Aus den entsprechenden Bakterienkulturen lassen sich die Kapselpolysaccharide gewinnen. Da ihre Antigene T-Zell-unabhängig sind, könnte man sie direkt als Impfstoff verwenden.

Die Möglichkeit, Antikörper gegen Polysaccharid-Antigene auszubilden, ist abhängig von der CD 21-Eigenschaft von B-Lymphozyten in der Grenzzone der Milz. Diese Grundvoraussetzung ist jedoch nicht vor dem dritten Lebensjahr gegeben [19].

Dieses physiologische Defizit einer kompetenten Immunantwort im Kleinkindalter führt zu einer gehäuften Infektionsrate in Bezug auf Bakterien, die eine Polysaccharidkapsel tragen.

Im Gegensatz dazu verhalten sich proteinkonjugierte Hib-Impfstoffe wie

Proteinimpfstoffe (entsprechend Tetanusvaccine) und bewirken einen effektiven Infektionsschutz gegen Haemophilus influenzae bereits in jungen Jahren [24].

Durch eine chemische Kopplung der Bakterienpolysaccharide an peptidbildende Proteinträgermoleküle können T-Zellen aktiviert werden. So bewirkt die Konjugation mit einem Protein den Wandel in eine T-Zell-abhängige Immunleistung, die auch bereits im Kleinkindalter suffizient erfolgen kann [13].

Ein proteinkonjugierter Impfstoff gegen Haemophilus influenzae Typ b wurde 1990 in Deutschland eingeführt [28]. Ähnlich der Ergebnisse nach einer Tetanusimpfung zeigt sich in der vorliegenden Studie eine gute Korrelation zwischen der jeweils durchgeführten Anzahl an Impfungen und der Höhe der spezifischen Antikörperspiegel. Annähernd alle geimpften Kinder weisen einen protektiven anti - Hib - Titer von über 0,15 mg/l auf. Innerhalb der Gruppe der nicht geimpften erwachsenen Probanden liegen die Titer vielfach unter der schützenden Konzentration.

Bei Patienten mit Immundefekt-Syndromen kann keine Antikörperbildung nach Durchführung einer Haemophilus influenzae Typ b Impfung festgestellt werden [21].

Im Gegensatz dazu konnte bei Patienten mit selektivem Immunglobulinmangel, so z.B. bei selektivem Mangel an Immunglobulin G 2, eine spezifische Antikörperbildung gemessen werden, die sich jedoch nur auf den konjugierten Impfstoff bezieht und nicht durch die Polysaccharidkapsel der Erreger selbst ausgelöst wurde [10,11].

Da bis zum Abschluß der Studie in Deutschland keine routinemäßige Vaccination gegen Streptococcus pneumoniae bestand, spiegeln die in dieser Studie ermittelten Antikörpertiter gegen Streptococcus pneumoniae daher die natürlich erworbene Immunität gegen diesen Erreger wieder. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die ermittelten Titer keine Aussage darüber erlauben, gegen welchen der bekannten 23 Serotypen der Kapselpolysaccharide eine Immunität vorliegt.

Entsprechend einiger bereits veröffentlichter Studienergebnisse [2,8,25] zeigen in unserer Studie die Konzentrationen spezifischer, gegen die Kapselpolysaccharide von Streptococcus pneumoniae gerichtete Antikörper einen leichten Abfall während des ersten Lebensjahres. Dies ist am ehesten durch den Verlust der mütterlichen Immunglobuline zu erklären.

Die Antikörperkonzentrationen bleiben bis zum 3.-4. Lebensjahr niedrig, um dann im Weiteren bis auf die im Erwachsenenalter erzielten Werte anzusteigen. 80 % der vorliegenden spezifischen Antikörper gegen Pneumokokken-Polysaccharide gehören den Immunglobulinen der Gruppe G 2 an.

Die durch diese Studie ermittelten immunologisch relevanten Titerwerte erlauben es, diejenigen Personen, die erniedrigte Antikörper-Titer aufweisen, zu erkennen und sie einer weiteren Diagnostik oder einer weiteren Impfung zuzuführen.

Ein Teil der gesunden Personen zeigt erniedrigte Spiegel für spezifische Antikörper. Personen, die einen erniedrigten anti-Pneumokokken-Titer besitzen, sollten, sofern sich der Verdacht auf einen immunologischen Defekt ergibt, einer Vaccination zugeführt werden.

Ein Anstieg der spezifischen Antikörper-Titer auf das Dreifache des Ausgangswertes sollte nach Vaccination mit polyvalentem Pneumokokken-Impfstoff und konjugiertem

Haemophilus influenzae- Impfstoff zu verzeichnen sein, um einen ausreichenden Infektionsschutz zu gewährleisten [21].

Der Titeranstieg nach einer Tetanusimpfung sollte eine zwanzigfache Erhöhung des Ausgangswertes ergeben [16].

Die mittels dieser Studie erhaltenen Referenzbereiche an Antikörperkonzentrationen gegen Tetanus-Toxoid, Pneumokokken-Kapselpolysaccharid und Haemophilus influenzae Typ b werden es dem Kliniker erleichtern, die bei seinen Patienten erhobenen Titerwerte sicher zu interpretieren. Auf Grund der nun vorliegenden Perzentilen kann eine ausreichende Immunantwort im Anschluss an eine Impfung genau erfasst werden, ebenso wie nicht ausreichende Immunitätslagen, so dass Patienten mit festgestellten Immundefiziten einer weiteren Impfung oder weiterführender Diagnostik zugeführt werden können.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurden die spezifischen Antikörperspiegel gegen die Kapselpolysaccharide von *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* sowie die Antikörpertiter gegen Tetanustoxoid bestimmt. Die Titerbestimmung erfolgte in Serumproben von 386 Probanden. Die Serumproben wurden von gesunden erwachsenen Blutspendern und gesunden hospitalisierten Kindern, die sich einem elektiven Eingriff unterziehen mußten, gewonnen. Probanden mit einer positiven Infektanamnese wurden zuvor durch die Anwendung von Ausschlußkriterien herausgefiltert.

In der Gruppe der Kinder konnte eine direkte Korrelation der Titerwerte mit den Impfdaten ermittelt werden.

Entsprechend der erfolgten Impfungen gegen Tetanus im ersten Lebensjahr und mit fünf Jahren fanden sich hier zwei Maximalwerte der anti-Tetanus-Toxoid-Antikörperspiegel von 1,13 IU/ml und 2,31 IU/ml. 80% der ermittelten Antikörper gehören dem Immunglobulin-Isotyp G 1 an.

Die Konzentrationsspiegel der anti-*Haemophilus-influenzae*-Antikörper ließen ebenfalls eine Korrelation mit der Anzahl der durchgeführten Impfungen erkennen. Hier fand sich ein Anstieg der Titer von 0,84 mg/l in der Gruppe der $\frac{1}{2}$ - 1 jährigen Kinder auf 2,54 mg/l im ersten bis zweiten Lebensjahr.

Die spezifischen Antikörperspiegel gegen Pneumokokken-Kapselpolysaccharid spiegeln zunächst die Leihimmunität durch die Mutter wider. So liegen die Titer im ersten Lebensjahr im Mittel bei 9,2 mg/l. Sie sinken innerhalb der ersten Monate auf einen Mittelwert von 4,6 mg/l ab. In der weiteren Entwicklung der natürlichen Immunität- zum Zeitpunkt der Untersuchung bestand noch keine Routineimpfung- zeigen sie zunächst Mittelwerte um 14,6 mg/l bis zum vierten Lebensjahr, um dann einen stetigen Anstieg bis zum Erreichen der Erwachsenenwerte mit 59,5 mg/l erkennen zu lassen.

Die ermittelten Antikörper sind zu 80% dem Isotyp G 2 zugehörig.

Die Erhebung dieser Daten soll der Beurteilung des Immunstatus im Hinblick auf die Interpretation spezifischer Antikörperkonzentrationen in Abhängigkeit zum Patientenalter und der Anzahl der durchgeführten Impfungen im klinischen Alltag dienen.

8. Literaturverzeichnis

1. Ambrosino DM Umetsu DT Silber GR et al. (1988) Selective defect in the antibody response to Haemophilus influenzae type b in children with recurrent infections and normal IgG subclass levels. J Allergy Clin Immunol 81:1175-9
2. Austrian R (1989) Pneumococcal polysaccharide vaccines. Rev Infect Dis 11 Suppl 3: 598-602
3. Brandis H Pulverer G (1988) Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie ,6.Aufl., Fischer, Stuttgart
4. Chapel HM (1994) Consensus on diagnosis and management of primary antibody deficiencies. Consensus Panel for the Diagnosis and Management of Primary Antibody Deficiencies. Brit Med J 308:581-5
5. Edwards KM (1988) Pediatric immunizations. Curr Probl Pediatr 23:186-209
6. Galazka A Keja J (1988) Diphtheria: Incidence trends and age-wise changes of immunity. Scand J Infect Dis 20:355-6
7. Harms V (1998) Biomathematik, Statistik und Dokumentation, Harms, Kiel
8. Hazlewood MA Kumararatne DS Webster Adet et al. (1992) An association between homozygous C3 deficiency and low levels of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. Clin Exp Immunol 87:404-9
9. Huston DP Kavanaugh AF Rohane PW et al. (1991) Immunoglobulin deficiency syndromes and therapy. J Allergy Clin Immunol 87:1-17
10. Insel RA Anderson PW (1986) Oligosaccharide-protein conjugate vaccines induce and prime for oligoclonal IgG antibody responses to the Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide in human infants. J Exp Med 163:262-9

11. Insel RA Anderson PW (1986) Response to oligosaccharide-protein conjugate vaccine against *Haemophilus influenzae* b in two patients with IgG 2 deficiency unresponsive to capsular polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 315:499-503
12. Iseki M Heiner DC (1993) Immunodeficiency disorders. *Pediatr Rev* 14:226-36
13. Janeway C Travers P (1997) *Immunologie*, 2.Aufl., Spektrum, Heidelberg
14. Klein J (1991) *Immunologie*, 1.Aufl., VCH, Weinheim
15. Lau RC Bettelheim KA Patel AC (1988) The 1985 national immunisation survey: diphtheria, tetanus and pertussis (whooping cough). *NZ Med J* 101:797-800
16. McCusker C Somerville W Grey V et al. (1997) Specific antibody responses to diphtheria/tetanus revaccination in children evaluated for immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79:145-50
17. Moxon ER Kroll JS (1990) The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 150:65-85
18. Pacheco SE Shearer WT (1994) Laboratory aspects of immunology. *Pediatr Clin North Am* 41:623-55
19. Peset Llopis MJ Harms G Hardonk MJ et al. (1996) Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 97:1015-24
20. Report of an IUIS Scientific Committee (1999) Primary immunodeficiency diseases. International Union of Immunological Societies. *Clin Exp Immunol* 118 Suppl 1: 1-28
21. Rodrigo MJ Vendrell M Cruz MJ et al. (2000) Utility of the antibody response to a conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine for diagnosis of primary humoral immunodeficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1462-5.

22. Roitt I (1993) Leitfaden der Immunologie, 4.Aufl., Blackwell Wissenschaft, Berlin
23. Rubin RL Tang FL Lucas AH et al. (1986) IgG subclasses of anti-tetanus toxoid antibodies in adult and newborn normal subjects and in patients with systemic lupus erythematosus, Sjögren`s syndrome and drug induced autoimmunity. *J Immunol* 137:2522-7
24. Schneerson R Barrera O Sutton A et al. (1980) Preparation, characterization and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med* 152: 361-76
25. Schur PH Rosen F Norman ME (1979) Immunoglobulin subclasses in normal children. *Pediatr Res* 13: 181-3
26. Shearer WT Buckley RH Engler RJ et al. (1996) Practice parameters for the diagnosis and management of immunodeficiency. The Clinical and Laboratory Immunology Committee of the American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 76:282-94
27. Simonsen O Bentzon MW Heron I (1986) Elisa for the routine determination of antitoxic immunity to tetanus. *J Biol Stand* 14:231-239
28. STIKO (2001) Impfeempfehlungen der ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 203-239
29. Stites D Stobo J Wells J (1987) Basic and Clinical Immunology, 6.Aufl., Appleton & Lange, Norwalk

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Riedel für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die stete Motivation und seine Geduld!
Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Schauer für die wissenschaftliche Beratung danken.
Für die Durchführung der Laboruntersuchungen danke ich den Mitarbeitern des Institutes für klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps Universität Marburg.

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....