Aus dem Institut für
Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Jahn

Etablierung eines neuen Verfahrens zur Kurzzeithitzepasteurisierung zur Inaktivierung von Humanem Cytomegalievirus in Muttermilch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Denise Katharina Müller
aus
Offenburg

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dr. K. Hamprecht
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Poets

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

TABELLENVERZEICHNIS V

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IX

1. EINLEITUNG 1

1.1. Herpesviren 1

1.2. Humanes Cytomegalievirus (HCMV) 4

1.2.1. Struktur des HCMV 4

1.2.2. Epidemiologie des HCMV 6

1.2.3. HCMV-Latenz und Reaktivierung; Zelltropismus 7

1.3. Primär- und Sekundärinfektion in der Schwangerschaft 9

1.4. HCMV-Transmission 10

1.4.1. Kongenitale Cytomegalievirusinfektionen und deren Therapie 10

1.4.2. Postnatale HCMV-Transmission durch Muttermilch auf Reifgeborene 14

1.4.3. Postnatale HCMV-Transmission durch Muttermilch auf Frühgeborene 14

1.5. Bedeutung der Muttermilch 16

1.5.1. Inhaltsstoffe 16

1.5.2. Milchbankwesen 19

1.6. HCMV-Inaktivierung in Muttermilch 21

1.6.1. Hitzeinaktivierungsverfahren 21

1.6.2. Kryoinaktivierung 23

1.6.3. Aktivität und Verhalten biochemischer Markersubstanzen in Muttermilch 24

1.7. Ziel der Arbeit 24

2. MATERIAL UND METHODIK 27

2.1. Material 27

2.1.1. Zellen 27

2.1.2. Muttermilch 27
2.1.3. Virusstamm HCMV-AD169 27
2.1.4. Lösungen und Medien 27
2.1.4.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur 27
2.1.4.2. Lösungen für den Immunperoxidasetest 29
2.1.5. Reagenzien für den rekombinanten HCMV-lgG-Immunblot-Test 30
2.1.6. Reagenzien für COBAS AMPLiCOR CMV MONITOR TEST 30
2.1.7. Arbeitsgeräte 34

2.2. Methoden 35
2.2.1. Zellkultur 35
2.2.1.1. HFF (human foreskin fibroblasts); Kultivierung 35
2.2.1.2. Zellpassagierung 35
2.2.1.3. HFF- Mikrokultur 36
2.2.1.4. HCMV-IEA-Immunperoxidasetest 37
2.2.2. HCMV-$TCID_{50}$-Bestimmung 38
2.2.3. Inaktivierungsverfahren 40
2.2.3.1. Inaktivierungsgerät zur Kurzzeitpasteurisierung und Temperaturerfassung 40
2.2.3.2. Langzeithitzepasteurisierung (62,5 °C, 30 Minuten, Holder) 42
2.2.3.3. Kurzzeitpasteurisierung von Muttermilch 43
2.2.4. Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase 45
2.2.5. Aktivitätsbestimmung der Lipase 46
2.2.6. Rekombinanter HCMV-lgG-Immunblot 46
2.2.7. COBAS AMPLICOR CMV MONITOR TEST 48

3. ERGEBNISSE 51

3.1. Inaktivierung der Muttermilch und Fraktionierung; Übersicht 51

3.2. Temperaturzeitevaluierung 53
3.2.1. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C 53
3.2.2. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C 54
3.2.3. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C 55
3.2.4. Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 63 °C 55
3.2.5. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C 56
3.2.6. Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 62 °C 57
3.2.7. Inkubationsdauer 9 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C 58
3.2.8. Inkubationsdauer 8 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C 59
3.2.9. Inkubationsdauer 7 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C 59
3.2.10. Inkubationsdauer 6 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C 60
3.2.11. Inkubationsdauer 3 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C 61
3.2.12. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C 62

3.2.13. Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 61 °C 63
3.2.14. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C 63

3.3. Standardisierung der Kurzzeitvirusinaktivierung 65
3.3.1. Übersicht 65
3.3.2. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C 65
3.3.3. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 70 °C 68
3.3.4. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 66 °C 70
3.3.5. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C 72
3.3.6. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 64 °C 74
3.3.7. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C 76
3.3.8. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C 77
3.3.9. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C 79
3.3.10. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C 81
3.3.11. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 59 °C 83
3.3.12. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 58 °C 84
3.3.13. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 57 °C 85
3.3.14. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 56 °C 87
3.3.15 . Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 55 °C 88

3.4. Statistische Auswertung unterschiedlicher Maximaltemperaturen auf Virussicherheit 90
3.4.1. Übersicht 90
3.4.2. Statistische Auswertung der Maximaltemperaturen auf AP-Aktivität 93
3.4.3. Statistische Auswertung der Maximaltemperaturen auf Lipase-Aktivität 95

3.5. Langzeithitzepasteurisierung (Holder-Pasteurisierung) 97
3.5.1. Temperaturkurve der Langzeithitzepasteurisierung 97
3.5.2. Berechnung der Mediane für das Langzeithitzepasteurisierungs- verfahren für die AP 98
3.5.3. Berechnung der Mediane für das Langzeithitzepasteurisierungs- verfahren für die Lipase 98

3.6. Kurzzeitpasteurisierung bei natürlich infizierten Muttermilchproben 99

3.7. Immunblot-Test zum Nachweis von spezifischem lgG gegen HCMV in humanem Plasma oder in Muttermilch 100
3.7.1. Übersicht 100
3.7.2. Rekombinanter HCMV-lgG-Immunblot von Mutter A, B_1, B_2 101
3.7.3. Rekombinanter HCMV-lgG-Test von Mutter C, D_1, D_2 103
3.7.4. Rekombinanter HCMV-lgG-Test bei Muttermilchproben mit unbekanntem HCMV-Serostatus 105

3.8. Quantitative PCR von HCMV-DNA in Muttermilch 107

4. DISKUSSION **108**

5. ZUSAMMENFASSUNG **119**

6. LITERATURVERZEICHNIS **120**

DANKSAGUNG **130**

CURRICULUM VITAE **131**

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Klinik der symptomatisch-kongenitalen HCMV-Infektion in der Neonatalperiode (modifiziert nach Boppana et al., 1992)	12
Tab. 2:	HCMV-Inaktivierung durch Langzeit- und Kurzzeit-Pasteurisierungs-verfahren (modifiziert nach Hamprecht, 2003)	23
Tab. 3:	HCMV-Kryoinaktivierung in Muttermilch	24
Tab. 4:	TCID50-Bestimmung nach Spearman-Kerber	39
Tab. 5:	Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C	53
Tab. 6:	Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C	54
Tab. 7:	Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C	55
Tab. 8:	Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 63 °C	55
Tab. 9:	Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C	56
Tab. 10:	Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 62 °C	57
Tab. 11:	Inkubationsdauer 9 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	58
Tab. 12:	Inkubationsdauer 8 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	59
Tab. 13:	Inkubationsdauer 7 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	60
Tab. 14:	Inkubationsdauer 6 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	60
Tab. 15:	Inkubationsdauer 3 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	61
Tab. 16:	Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	62
Tab. 17:	Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 61 °C	63
Tab. 18:	Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C	64
Tab. 19:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C	65
Tab. 20:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 70 °C	68
Tab. 21:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 66 °C	70
Tab. 22:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C	72
Tab. 23:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 64 °C	74
Tab. 24:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C	76
Tab. 25:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C	77
Tab. 26:	Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C	79

Tab. 27: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C 81

Tab. 28: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 59 °C 83

Tab. 29: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 58 °C 84

Tab. 30: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 57 °C 85

Tab. 31: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 56 °C 87

Tab. 32: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 55 °C 88

Tab. 33: Darstellung der unterschiedlichen Maximaltemperaturen 90

Tab. 34: Abhängigkeit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase von den gewählten Maximaltemperaturen bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden 93

Tab. 35: Abhängigkeit der Aktivität der Lipase von den gewählten Maximaltemperaturen bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden 95

Tab. 36: Inkubationsdauer 30 Minuten, Maximaltemperatur 62,5 °C 97

Tab. 37: Darstellung der seropositiven Muttermilchproben 99

Tab. 38: Einfluss der Kurzzeithitzeinaktivierung auf HCMV-spezifische Antikörper (Mutter A, B1, B2) 102

Tab. 39: Einfluss der Kurzzeithitzeinaktivierung auf HCMV-spezifische Antikörper (Mutter C, D1, D2) 103

Tab. 40: Aufstellung von verschiedenen Muttermilchproben unterschiedlicher Spender-innen mit unbekanntem HCMV-Serostatus mit dem rekombinanten HCMV-lgG-Test 105

Tab. 41: Darstellung des quantitativen HCMV-DNA-Nachweises bei seropositiver Muttermilch 107

Tab. 42: Daten zur HCMV-Transmission über Muttermilch auf Frühgeborene 114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	HCMV-Virionstruktur (modifiziert nach Hamprecht, 2003)	4
Abb. 2:	HCMV Genom-Struktur (modifiziert nach Hamprecht, 2003)	6
Abb. 3:	Hypothetisches Schema der HCMV-Latenz und -Persistenz in myleoider Zellreihe	8
Abb. 4:	Enteromammärer Kreislauf (modifiziert nach Hanson et al., 2002)	18
Abb. 5:	Inaktivierungsgerät (Prototyp)	41
Abb. 6:	Langzeithitzeinaktivierungsverfahren nach Holder (62,5 °C, 30 Min.)	43
Abb. 7:	Teststreifen - Rekombinanter HCMV-IgG-Imunblot	47
Abb. 8:	Prinzip der Kurzzeithitzepasteurisierung	52
Abb. 9:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 72 °C	67
Abb. 10:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 70 °C	69
Abb. 11:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 66 °C	71
Abb. 12:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 65 °C	73
Abb. 13:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 64 °C	75
Abb. 14:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 62 °C	78
Abb. 15:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 61 °C	80
Abb. 16:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 60 °C	82
Abb. 17:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 57 °C	86
Abb. 18:	Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 55 °C	89
Abb. 19:	Effizienz der Virusinaktivierung als Funktion der Maximaltemperatur (Rampenzeit von fünf Sekunden)	92
Abb. 20:	Abhängigkeit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase von den gewählten Maximaltemperaturen	94
Abb. 21:	Abhängigkeit der Aktivität der Lipase von den gewählten Maximaltemperaturen	96

Abb. 22: Temperaturkurve der Langzeithitzepasteurisierung 98

Abb. 23: Grafik zur Darstellung der Virusinaktivierung seropositiver Muttermilchproben 100

Abb. 24: Virusspezifisches Antikörperprofil nach Kurzzeithitzeinaktivierung in Muttermilch (Molke); (Mutter A, B1, B2) 101

Abb. 25: Virusspezifisches Antikörperprofil nachKurzzeithitzeinaktivierung in Muttermilch (Molke); (Mutter C, D1, D2) 103

Abb. 26: Rekombinanter HCMV-lgG-Test unterschiedlicher Muttermilchproben 105

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethyl-Carbazol Substrat
AMP	2-amino-2-methyl-1 Proponal
AP	Alkalische Phosphatase
AP-Akt. Erwartet) (%)	Aktivität der AP in Prozent
AP-K (U/L)	AP-Aktivität in der Kontrolle
AP-P(U/L)	AP-Aktivität in der Probe
ATP	Adenosintriphosphat
Av-HRP	Avidin-Meerettich-Peroxidase
Bp	Basenpaare
BSSL	bile salt stimulated lipase; durch Gallensalze stimulierte Lipase
cAMP	zyclisches Adenosinmonophosphat
CID	Cytomegalen Einschlusserkrankung
CMV	Humanes Cytomegalievirus
Core	Kern
CPE	zytopathischer Effekt
CREB-1/ATF-1	Transkriptionsfaktoren
CTP	Cytosintriphosphat
dense bodies	„Nicht-infektiöse Viruspartikel“
DGGMR	1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6’-methylresorufin)ester
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay; heterogener

	Enzym-Immunassay
Envelope	Hülle
Exp.Nr.	Nummer des Exmperiments
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GA	Gestationsalter
gB	Glykoprotein B
GCV	Ganciclovir
gH	Glykoprotein H
gL	Glykoprotein L
gM	Glykoprotein M
gpUL47-52	Bestandteil der Phospholipid-Hülle, bindet an Heparansulfat
gpUS27-28	Bestandteil der Phospholipid-Hülle, G-gekoppelter Rezeptor und C-C-Chemokin-Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HBs-Ag	Hepatitis-B-surface-Antigen
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HFF	human foreskin fibroblasts; humane Vorhaut-Fibroblasten
HHV-1	Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)
HHV-2	Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)
HHV-3	Herpes simplex-Virus Typ 3 ; Varicella-Zoster-Virus (VZV)
HHV-4	Epstein-Barr-Virus (EBV)
HHV-5	Humanes Zytomegalievirus (HCMV)
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6; Roseolovirus
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8:	Humanes Herpesvirus 8 ; Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV)
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus-1 ;

	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus-2; Humanes Immundefizienz-Virus 2
hot air stream	heißer Luftstrom
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämievirus
HVL	Hypophysenvorderlappen
IE	Immediate Early (sehr früh)
IEA	Immediate Early Antigen
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
Immediate Early-, Early- und Late:	HCMV-Genexpression, die in zeitlich aufeinander folgende Phasen eingeteilt ist: sehr früh, früh und spät.
internal repeats (IR)	mittlere Wiederholungssequenzen
J(oining)-(Peptid)Kette	Verbindungsprotein
K (N_{IEA}+/ml Molke)	in der Kontrolle detektierte Kerne in der Viruskultur
Kbp	Kilobasenpaare
Ko.Molke	Kontrolle-Molke
lgM	Immunglobulin M
Lipase-Akt. Erwartet) (%)	Aktivität der Lipase in Prozent
Lipase-Akt. in %	Lipase-Aktivität in Prozent
Lipase-K (U/L)	Lipase-Aktivität in der Kontrolle
Lipase-P (U/L)	Lipase-Aktivität in der Probe
M	Mol
MCP	major capsid protein; großes Kapsid-Protein
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
mCP	minor capsid protein; kleines Kapsid-Protein

mmol/l	Millimol pro Liter
M-Zellen	spezialisierte Zellen in der Follikel-assoziierten Epithelzellschicht der Peyer´schen Plaques.
N	Anzahl
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
Nm	Nanometer
Nr	Nummer
P (N_{IEA}/ml Molke)	in der Probe detektierte Kerne in der Viruskultur
p65 bzw. pp65	lower Matrixprotein, phosphoryliertes Protein
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Ketten-Reaktion
Pfu	plaque forming unit; Plaque bildende Einheit
PK	Positivkontrolle
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
Pos-Kont.	Positiv-Kontrolle
pp	post partum
pp150	Phosphoprotein 150
pp28	Phosphoprotein 28
PRL	Prolaktin-Realising-Hormon
r RNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Real-Time-PCR	Echt-Zeit-Polymerase-Ketten-Reaktion
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
SLS	Sepsis-like symptoms; Sepsis ähnliche Symptome
Spiking	artifiziell mit Virus infizieren
$TCID_{50/100µl}$	Tissue culture infectious dose 50 %
Temp	Temperatur
TR	terminal repeats; Wiederholungssequenzen am Ende
TMB	5,5´-Tetramethylbenzidin

TNFα	Tumornekrosefaktor α
U/mg	Units per milligramme; Einheiten pro Milligramm
UL	langes Segment
UNG	Uracil-N-Glykosylase
US	kurzes Segment
UTP	Uridintriphosphat
V	Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
W	Woche
X	Median (p)
Zahl Exp	Anzahl der Experimente
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Herpesviren

In der Familie der Herpesviren sind bei Mensch und Tier weltweit ca. 100 verschiedene Arten von Viren zu verzeichnen. Wirbeltiere aber auch Eidechsen und Fische können den Herpesviren als Wirt dienen. Herpesviren sind doppelsträngige, behüllte DNA-Viren. Beim Menschen sind acht unterschiedliche Familien von Herpesviren bekannt.

- HHV-1 = Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), Subfamilie: Alphaherpesviridae; Erreger des Herpes labialis sowie anderer Infektionen im Kopf- und Gesichtsbereich (hauptsächlich orale und okuläre Läsionen), im schlimmsten Fall kann eine Enzephalitis auftreten. Dies stellt zwar eine seltene Komplikation dar, kann aber, wenn sie unerkannt bleibt, zum Tod führen.
- HHV-2 = Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2), Subfamilie: Alphaherpesviridae; Erreger des Herpes genitalis, überwiegende Eintrittspforte dieser Erkrankung ist die Genitalschleimhaut, seltener der orale Bereich. Dieser Virustyp ruft genitale und anale Läsionen hervor und kann Erreger des Herpes neonatorum sein, was für das Neugeborene eine erhebliche Gefahr darstellen kann, da ebenfalls eine Enzephalitis mit schwersten Folgen entstehen kann. Das Neugeborene infiziert sich durch den bestehenden Herpes genitalis der Mutter.
- HHV-3 = Herpes simplex-Virus Typ 3 bzw. Varicella-Zoster-Virus (VZV), Subfamilie: Alphaherpesviridae; Erreger von Windpocken und Gürtelrose (Zoster). Der obere Respirationstrakt und die Konjunktiven stellen die Eintrittspforte für das Virus dar. Es breitet sich dann über die regionalen Lymphknoten aus und gelangt im Rahmen einer ersten Virämie in Milz und Leber. In Folge einer zweiten Virämie werden epidermale Zellen infiziert und es entstehen die charakteristischen multimorphen Hautläsionen. Zu diesem Zeitpunkt findet auch die Infizierung der Zellen der Lumbosakralganglien statt. Nach Jahren der Latenz kann es wieder zur Reaktivierung des Virus und damit zur

Virusreplikation im befallenen Ganglion kommen. Die Schmerzen sowie Hyper- und Parästhesien in den betroffenen Hautarealen rühren von der Zerstörung der peripheren Nerven her. Komplikationen können dabei auftreten, wenn das Auge (Zoster ophtalmicus) oder das Ohr (Zoster oticus) befallen werden. Varizellen in der Schwangerschaft können ein Problem darstellen, wenn die Schwangere Varicellen- oder Zoster-Kontakt hatte. Es können eine Varicellen-Embryopathie oder bei perinataler Infektion Neugeborenen-Varicellen hervorgerufen werden.

- HHV-4 = Epstein-Barr-Virus (EBV), Subfamilie: Gammaherpesviridae; Erreger der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber); außerdem können Tumoren auftreten wie z.B. das Burkitt-Lymphom, das Nasopharynxcarcinom sowie verschiedene lymphoproliferative Syndrome bei immunsupprimierten Patienten. EBV wird durch Speichel übertragen (Kissing disease). Bis zum 15. Lebensjahr wird eine Durchseuchungsrate von ca. 40% erreicht, sie steigt dann bis zum Erwachsenenalter noch weiter bis zu einer Rate von 80-90%. Erfolgt eine EBV-Primärinfektion, so kann man im Blut vermehrt mononukleäre Zellen finden, die der Krankheit auch den charakteristischen Namen gegeben haben. Verschiedenste auftretende Symptome werden nicht durch die Infektion selbst, sondern durch die Abwehrreaktion des Körpers hervorgerufen. So rufen vor allem aktivierte T-Lymphozyten die in der Leber bestehenden Infiltrate hervor. Das Burkitt-Lymphom tritt in den Industrienationen nur sporadisch auf, während es sich in Äquatorialafrika als endemischer Tumor darstellt. Die endemischen Tumoren enthalten fast alle das Genom von EBV, während bei den sporadischen nur bei jedem fünften Tumor das EBV-Genom auftritt.
- HHV-5 = Humanes Zytomegalievirus (HCMV), Subfamilie: Betaherpesviridae; Erreger der Zytomegalie (Speicheldrüsenviruserkrankung). Früher wurde der Begriff der Einschlusskörperchenkrankheit verwendet. Befallene Organe weisen die charakteristischen Einschlusskörper auf. Durch HCMV können kongenitale und postnatale Infektionen hervorgerufen werden.

- HHV-6 = Humanes Herpesvirus 6; Roseolovirus, Subfamilie: Betaherpesviridae; Erreger des 3-Tage-Fiebers mit Exanthema subitum. Das Exanthema subitum zeigt einen schnellen Fieberanstieg, gefolgt von dem kurzzeitig auftretenden Exanthem mit Lymphknotenschwellung. Das Virus erwies sich in Untersuchungen als vorwiegend T-lymphotrop. Komplikationen können bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem auftreten.
- HHV-7 = Humanes Herpesvirus 7, Subfamilie: Betaherpesviridae; 1990 wurde aus einer In-vitro-Kultur von $CD4^+$-Lymphozyten eines gesunden jungen Mannes ein Virus isoliert, das mit HHV-6 zwar verwandt, aber doch als eigenständige Spezies davon abzugrenzen war. Es soll in einigen Fällen das Exanthema subitum ausgelöst haben und wurde auch vorübergehend als Erreger der Pityriasis rosea diskutiert, doch diesem Erreger kann zum jetzigen Zeitpunkt noch kein spezifisches Krankheitsbild zugeordnet werden (Schneweis, 2001).
- HHV-8 = Humanes Herpesvirus 8 bzw.: Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV), Subfamilie: Gammaherpesviridae; Ruft das Kaposisarkom und B-Zelllymphome hervor. Erstbeschreiber des Kaposi-Sarkoms war 1872 der Wiener Dermatologe Kaposi.

1.2. Humanes Cytomegalievirus (HCMV)

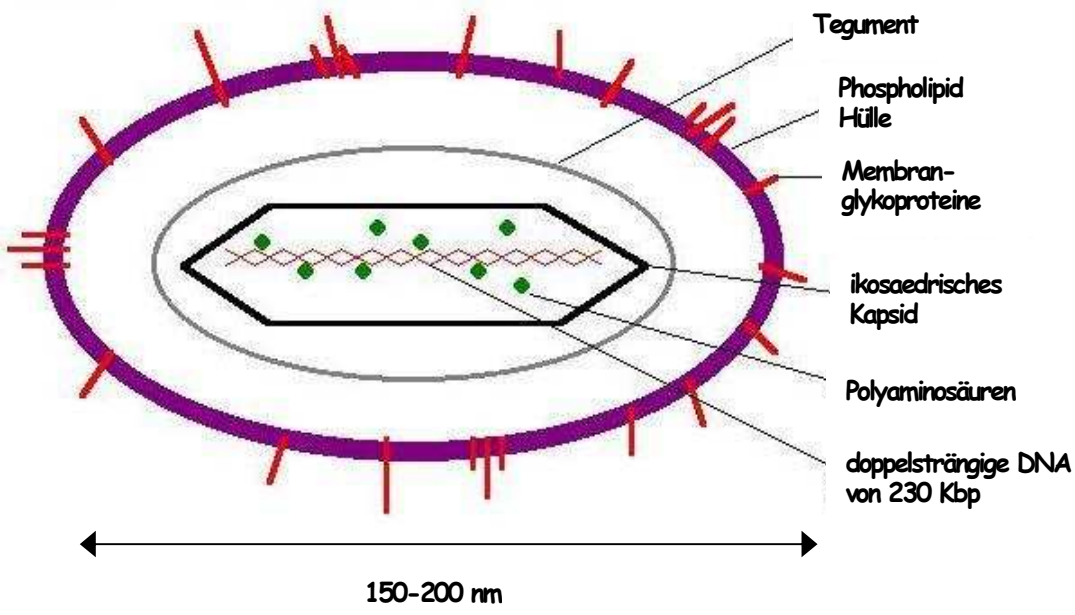
1.2.1. Struktur des HCMV

Das humane Cytomegalievirus und auch die anderen Herpesviren setzen sich aus vier unterschiedlichen Strukturelementen zusammen:

(1) Hülle (Envelope)
(2) Tegument bzw. Matrix: enthält u.a. Proteine und Enzyme
(3) Kapsid
(4) DNA-Kern (=core)

Zu 1: Die Lipidhülle besteht aus bestimmten Membrankomponenten der Wirtszelle und verschiedenen Glykoproteinen und schirmt das Virus nach außen ab.

Abb. 1: HCMV-Virionstruktur (modifiziert nach Hamprecht, 2003)



Das dominierende Glykoprotein stellt Glykoprotein-B (gB) dar. Dieses Protein kann man auch an der Oberfläche von Zellen detektieren, die mit HCMV infiziert wurden. Außerdem löst es auch die Bildung von Antikörpern aus. Hat bereits eine Primärinfektion stattgefunden und das Virus wird im Zusammenhang mit

einer rekurrenten Infektion reaktiviert, so sind anti-gB-Antikörper sofort präsent. Bei einer Primärinfektion ist gB im Gegensatz dazu erst nach einer Latenzphase von ca. 50-100 Tagen nachweisbar. Diese Tatsache kann zur Unterscheidung einer Primärinfektion bzw. einer Reaktivierung herangezogen werden (Schoppel et al., 1997; Britt und Mach, 1996).
Ein weiteres wichtiges Glykoprotein stellt Glykoprotein H (gH) als Ligand von Wirtszellrezeptoren dar. Sowohl gB als auch gH könnten Komponenten eines Impfstoffs sein. Plotkin schlägt die Kombination von gB, pp65 und IE1 als Schutz gegen eine HCMV-Infektion vor. Ob gB-spezifische Antikörper alleine einen ausreichenden Schutz bieten, wird in Birmingham getestet werden (Plotkin, 2002). Weitere identifizierte Glykoproteine sind gL und gM, es wurden außerdem noch zusätzliche Glykoproteine analysiert, deren Funktion aber noch nicht vollständig geklärt ist (Britt und Mach, 1996).

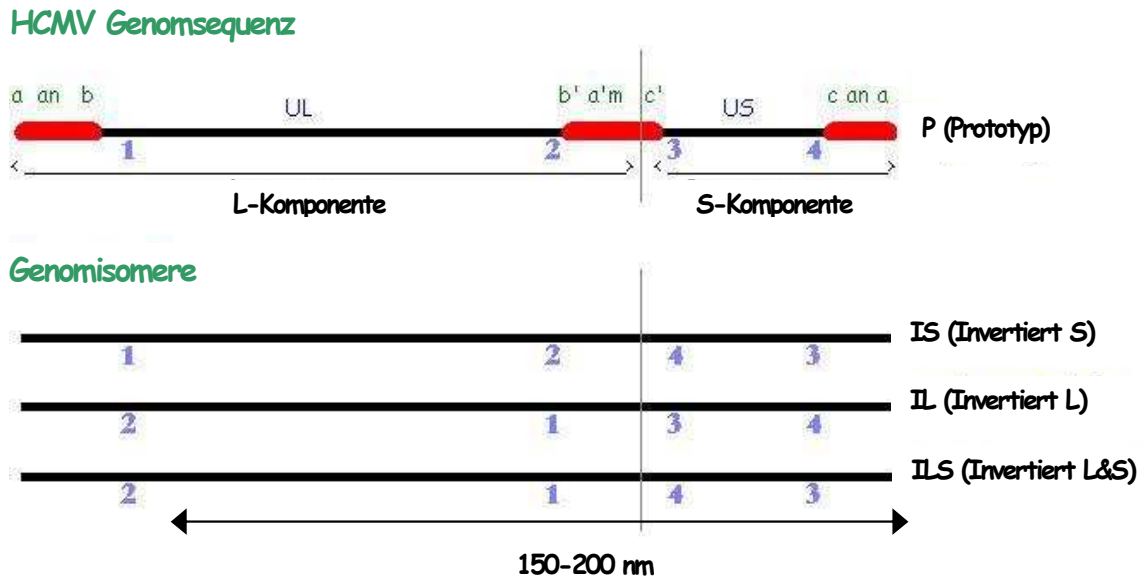
Zu 2: Das Tegument befindet sich zwischen dem Kern und der Hülle. Es enthält viele verschiedene Proteine und Enzyme. Ein bedeutsames Matrixprotein stellt das pp65 (ppUL83; lower Matrixprotein) dar. Wird eine Zelle mit HCMV infiziert, so gelangt pp65 praktisch direkt in den Kern. „Das pp65-Antigen ist auch Hauptbestandteil (95%) der „dense bodies“, „nicht infektiöser“ Partikel, die auch bei Infektionen in Zellkultur gebildet werden (Dense body: umhülltes Partikel ohne DNA und ohne Kapsidstruktur). Epitope des pp65-Antigens werden von MHC-Klasse-1 Molekülen infizierter Zellen präsentiert und sind damit Hauptzielmoleküle für zytotoxische T-Zellen“ (Hampl und Mertens, 2001).

Zu 3: Das Kapsid hat eine ikosaedrische Form, eine Größe von 100 nm und besteht aus insgesamt 162 Kapsomeren. Man unterscheidet zwischen major capsid protein (MCP) und minor capsid protein (mCP), beides Komponenten, die am Aufbau der Kapsidstruktur beteiligt sind.

Zu 4: Das Genom des HCMV-Laborstamms AD 169 liegt als doppelsträngige DNA vor und ist aus 229 354 bp aufgebaut. Es kodiert für etwa 200 Genprodukte. Eine Aufteilung erfolgt in ein kurzes (US = 45kbp) und ein langes

(UL = 190kbp) Segment. Diese sind von Wiederholungssequenzen am jeweiligen Ende (terminal repeats: TR) und der LS-Junktionsstelle (internal repeats: IR) umgeben. Da eine freie Rekombination der Segmente während der Replikation möglich ist, können vier Genomisomere in äquimolarer Konzentration existieren (Huang und Kowalik, 1993).

Abb. 2: HCMV Genom-Struktur (modifiziert nach Hamprecht, 2003)



1.2.2. Epidemiologie des HCMV

Das Cytomegalievirus ist weltweit verbreitet, der einzige Wirt ist der Mensch. Erfolgt die Übertragung des Virus postnatal, so geschieht dies durch Speichel, Urin und genitale Ausscheidungen oder aber auch durch Muttermilch, durch die Mutter auf den Säugling. Pränatal erfolgt die Infektion über die Plazenta. Außerdem wird perinatale Übertragung durch Zervixsekret postuliert.

Die Häufigkeit und Inzidenz einer Infektion hängt von dem sozioökonomischen Status und auch von der geografischen Lokalisation ab. Nach einer epidemiologischen Studie haben mehr als 60% der Durchschnittsbevölkerung Antikörper gegen HCMV, wenn sie ein Alter von 35 Jahren erreicht haben. Einige Gebiete im Fernen Osten und Afrika erreichen sogar eine100%ige Seropositivität (Huang und Kowalik, 1993). Bei Immunkompetenten zeigt eine Primärinfektion meist keine Symptome, sie verläuft in der Regel

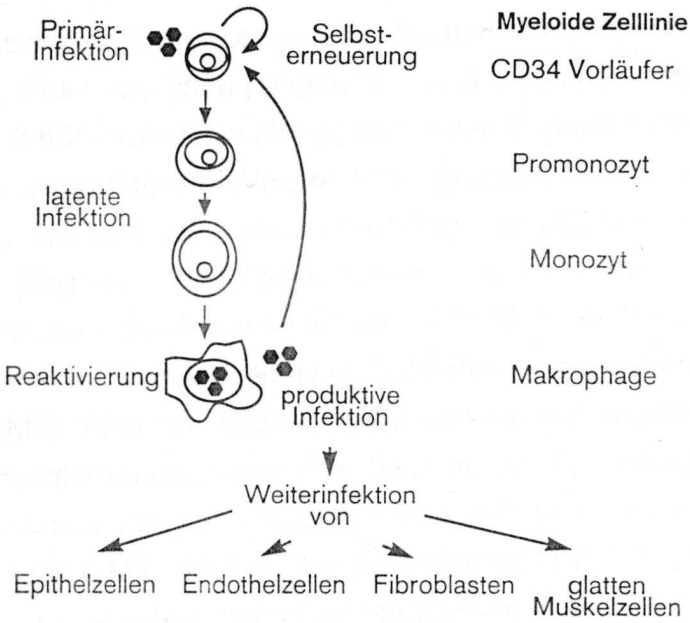
asymptomatisch. In wenigen Fällen treten mononukleose ähnliche Symptome auf wie z.B. Lymphknotenschwellung und gripppeähnliche Symptome. Ribbert beschrieb zum ersten Mal vergrößerte „protozoenähnliche“ Zellen in der Niere eines totgeborenen Kindes im Jahre 1904. Der Begriff der Speicheldrüsen-Virus-Erkrankung wurde im Wesentlichen durch Farber und Wolbach geprägt. Durch sie entstand auch der Begriff Eulenaugenzellen (Farber und Wolbach, 1932). Mit der Grundlage dieser Erkenntnis wurde die Definition der „Cytomegalen Einschlusserkrankung“ (CID) eingeführt. 1954 gelang Margaret Smith die Isolierung von murimem CMV und die Virusanzucht in Zellkultur (Smith, 1954). Kurz darauf konnte sie HCMV aus Speicheldrüsen und Nieren von Kindern, die an „CID“ gestorben waren, isolieren (Smith, 1956).

1.2.3. HCMV-Latenz und Reaktivierung; Zelltropismus

Die Inzidenz der HCMV-Infektion steigt mit dem Alter an. Bei immunkompetenten Gesunden verläuft die Erstinfektion meist asymptomatisch. Danach kommt es zu einem lebenslangen Latenzzustand des Virus wie bei allen anderen Herpesviren. Unter bestimmten Bedingungen kann das Virus auch reaktiviert werden, z.B. bei mangelnder Immunkompetenz (HIV, Leukämie, Lymphome) und auch bei Patienten nach Organtransplantation (Ho, 1993). Bevorzugte Zielzellen für HCMV stellen Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten dar. HCMV wurde aber auch vor allem in $CD34^+$ Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen des Knochenmarks und peripheren $CD14^+$ Monozyten gefunden (Taylor-Wiedemann et al., 1991; Sinclair und Sissons, 1996; Prösch et al., 1999). In diesen genannten Zellen wurden virale Immediate Early-, Early- und Late-Antigene gefunden (Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1996). Man geht davon aus, dass manche Zelltypen dem Virus vorwiegend zur Replikation dienen, während andere wiederum als Wirt während der Latenzzeit verwendet werden. Die genaue Zielzelle der Latenz des Virus bleibt bis heute weiterhin ungeklärt. Grundsätzlich sind zwei Wege der HCMV-Reaktivierung beschrieben (Prösch et al., 1999). Es wurden einerseits Entzündungsmediatoren, wie TNFα identifiziert und festgestellt, dass diese eine Infektion mit HCMV triggern können. Die ablaufende systemische

Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von TNFα führt zu einer vermehrten HCMV-IE-Genexpression (über beta-2 adrenerge Rezeptoren in Monozyten), was dann auf diesem Wege wiederum eine gesteigerte Virusreplikation auslöst. Auf der anderen Seite konnte beobachtet werden, dass auch extremer Stress nach Myokardinfarkt zu einer Reaktivierung führen kann (Prösch et al., 2000). Dies funktioniert auf folgendem Wege: Katecholamine aktivieren cAMP und dadurch die gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 (Prösch et al., 1999; Prösch et al., 2000). Der Mechanismus des während der Laktation auftretenden Reaktivierungsprozesses ist bis heute unbekannt. Man weiß allerdings aus verschiedenen Untersuchungen, die in vivo und in vitro durchgeführt worden sind, dass Hydrocortison zur Vermehrung der HCMV-Replikation führt. An der Laktation sind unterschiedliche Hormone wie z.B Oxytocin und Prolaktin aus dem Hypophysenvorderlappen (PRL) beteiligt. PRL-Expression kann neben dem HVL auch in peripheren Lymphozyten, in Epithelzellen der laktierenden Brustdrüse sowie in Milch nachgewiesen werden. Dennoch existieren derzeit keine Daten über den Einfluss von Prolaktin auf die HCMV-Replikation.

Abb. 3: Hypothetisches Schema der HCMV-Latenz und -Persistenz in myleoider Zellreihe
$CD34^+$-Vorläuferzellen werden mit HCMV infiziert. Das Virus bleibt die ganze Zeit während der Differenzierung latent, bis es schließlich in differenzierten Makrophagen reaktiviert (Sinclair und Sissons, 1996).



1.3. Primär- und Sekundärinfektion in der Schwangerschaft

Es ist insbesondere bei Schwangeren wichtig, zwischen einer Primär- und einer Sekundärinfektion zu unterscheiden. Denn wie oben schon beschrieben, ist das Neugeborene, wenn die Mutter vor der Konzeption Antikörper besitzt, zwar nicht vor einer HCMV-Transmission geschützt, doch treten schwerwiegende Schäden in aller Regel nicht auf. Da bei einer Primärinfektion selten Symptome vorhanden sind, ist diese auch schwer zu diagnostizieren. Ebenso werden Reaktivierungen einer schon abgelaufenen Infektion meistens nicht wahrgenommen. Früher war das Mittel der Wahl die Bestimmung von anti-HCMV-IgM (Stagno et al., 1985). Eine kongenitale Infektion wurde mit der Isolierung von HCMV aus dem Urin gesichert (Stagno et al., 1986). Heute steht jedoch eine breite Palette diagnostischer Verfahren zur Verfügung. Ein Nachweis von spezifischen IgM reicht nicht aus, um eine Primärinfektion zu diagnostizieren, weil diese Immunantwort lange persistieren und auch nach Reaktivierung wieder auftreten kann. Daiminger et al. empfehlen hier, dass zusätzliche Tests gemacht werden sollten, um eine Primär- von einer Sekundärinfektion unterscheiden zu können. Sie verglichen in einer Studie zwei neu entwickelte ELISA-Tests mit konventionellen ELISA-Tests. Bei dem neuen Verfahren wurden rekombinante Antigene verwendet, um HCMV-spezifisches IgM zu detektieren (Daiminger et al., 1999). Liegt ein Verdacht auf eine HCMV-Infektion vor und besteht aus diesem Grunde der Verdacht auf eine Schädigung des Kindes, so kann der Untersucher mittels Amniozentese im Zeitraum der 14. und 36. Gestationswoche Kenntnis über den maternalen und fetalen HCMV-Status gewinnen (Grose et al., 1992). Eine PCR kann die Sensitivität der Diagnostik erhöhen. Weitere Verfahren, die zur Klärung beitragen, sind Mikroneutralisationstests und Ig-Avidität (Eggers et al., 2000). In einigen Fällen kann nur die Kombination all dieser Methoden weiterhelfen. Auch der Nachweis von gB-spezifischen Antikörpern kann hilfreich sein (Rothe et al., 2000). Es zeigte sich, dass bei einer Primärinfektion zu Beginn der Nachweis von gB und gH nicht gelingt, weil diese erst mit einer Verzögerung von 50-100 Tagen nachzuweisen sind, dagegen ist der Nachweis von nicht-neutralisierenden

Antikörpern gegen bestimmte strukturelle Phosphoproteine (pp65, pp150, pp28) möglich (Schoppel et al., 1997).

1.4. HCMV-Transmission

1.4.1. Kongenitale Cytomegalievirusinfektionen und deren Therapie

HCMV kann wie andere Erreger auch Infektionen während der Schwangerschaft bzw. vor der Geburt hervorrufen. Zu weiteren Erregern, die das Kind vor der Geburt potentiell gefährden können, zählen: Rötelnvirus, humanes Parvovirus B19, Herpes simplex und Varizellen.

Von diesen genannten Erregern führt allerdings am häufigsten HCMV durch intrauterine Transmission zur kongenitalen Infektion. In den USA beträgt die Zahl der kongenitalen HCMV-Infektionen etwa 1% (Stagno, 1995), in Großbritanien etwa 0,3%. In der Studie von Peckham et al., zeigten 7% schwere Symptome, 33% leichte Symptome und 60% hatten keine Anzeichen einer Erkrankung (Peckham et al., 1983). In Schweden liegt die Rate der kongenitalen HCMV-Infektion bei 0,5% (Ahlfors et al., 1999). Die Wahrscheinlichkeit für eine transplazentare Infektion liegt bei 30% (Griffiths, 1993). Dies gilt für den Fall, dass bei der Mutter eine Primärinfektion vorliegt. Für das Kind besteht dann eine Wahrscheinlichkeit von 10%, dass es auch klinische Symptome aufweist. Diese Symptome sind vielfältiger Natur: zerebrale Symptomatik mit Hydrozephalus, Chorioretinitis und Mikrozephalus, viszerale Symptomatik, Anämie, Thrombozytopenie und Hämolyse, Hepatosplenomegalie, Petechien, einem Ikterus mit konjugierter Hyperbilirubinämie, Hörschäden. Die Schwere oder das Ausmaß der Erkrankung ist abhängig vom Entwicklungsstadium des Kindes. 90% der Kinder, deren Mütter eine Erstinfektion durchmachen, bleiben klinisch unauffällig. So berichteten z.B. Embil et al. von einer 18-jährigen kaukasischen Mutter, die innerhalb eines Jahres zwei Kinder geboren hatte, welche beide kongenital mit HCMV infiziert worden waren: Das erste Kind hatte eine disseminierte HCMV-Infektion und starb 30 Tage nach der Geburt. Das zweite Kind schied noch 8,5 Monate nach der Geburt das Virus im Urin aus und zeigte

eine Virämie noch mit 5 Monaten, war aber sonst asymptomatisch (Embil et al., 1977).
Tritt bei der Mutter eine Reaktivierung auf, so besteht ein geringeres Risiko für das Kind zu erkranken (0,2-2,0%). Jedoch muss bedacht werden, dass präkonzeptionell präsente HCMV-Antikörper nicht vor intrauteriner maternaler HCMV-Infektion schützen. So untersuchten Stagno et al. 239 Geburten. Und obwohl präkonzeptionell Antikörper vorhanden waren, wurden in sieben von 208 untersuchten Fällen, bei denen ein positiver Serostatus vorlag, eine intrauterine HCMV-Infektion festgestellt. Bei drei von 31 Fällen, bei denen keine Immunkompetenz vorlag, wurde ebenfalls eine intrauterine Infektion beobachtet (Stagno et al., 1977).

Liegt der Verdacht auf eine HCMV-Infektion vor, so erfolgt der Nachweis mittels Speichel- oder Urinprobe des Neugeborenen (Balcarek et al., 1993) oder einem spezifischen lgM-Nachweis innerhalb der ersten Lebenswochen bei gleichzeitigem Auftreten von mindestens einer der klinischen Zeichen wie Petechien, Hepatosplenomegalie, Mikrozephalie, Thrombozytopenie oder Ikterus mit konjugierter Hyperbilirubinämie (Fowler et al., 1992). Auch diese Autoren berichten, dass präkonzeptionell vorhandene Antikörper gegen HCMV nicht notwendigerweise vor einer Infektion schützen, dass aber im Falle einer Primärinfektion der Schwangeren die kongenitale Infektion sehr viel schwerwiegender verläuft. (Fowler et al., 1992). Diese Autoren untersuchten auch, welchen Einfluss der Zeitabstand zwischen maternaler HCMV-Infektion und erfolgter Geburt auf eine kongenitale Infektion haben würde. Dabei wurde die Zahl der kongenitalen HCMV-Infektionen relativ in Zusammenhang gesetzt mit den Zeitabständen zwischen den Geburten bei jungen Müttern. Bei Müttern, bei denen eine Serokonversion zwischen den einzelnen Geburten stattfand, war die Zahl der kongenitalen Infektionen am höchsten, wenn das Zeitintervall zwischen den Geburten ≤ 24 Monate war. Das Risiko einer Transmission blieb bei einem Zeitintervall von 25-48 Monaten erhöht und war bei einem Zeitintervall > 48 Monaten zu vernachlässigen (Fowler et al., 2004). Zeigt sich bei einem Patienten schließlich eine symptomatische HCMV-Infektion, so sind

immer mehrere Organe befallen mit Beteiligung des hepatobilären und des hämatopoetischen Systems.

Tab. 1: Klinik der symptomatisch-kongenitalen HCMV-Infektion in der Neonatalperiode (modifiziert nach Boppana et al., 1992)

[1] Gestationsalter < 38. SSW
[2] Geburtsgewicht < 10. Perzentile
[3] Kopfumfang < 10. Perzentile

Symptome	Häufigkeit (%)
Frühgeburt[1]	34
Hypotrophie[2]	50
RES (Retikuloendotheliales System)	
Petechien	76
Ikterus	67
Hepatosplenomegalie	60
Thrombozytopenische Purpura	13
ZNS (Zentralnervensystem)	
Ausprägungen wie:	68
Mikrozephalie[3]	53
Lethargie/Hypotonie	27
Schwacher Saugreflex	19
Krämpfe	7

Je nachdem, ob eine Primär- oder Sekundärinfektion der Mutter vorliegt, unterscheiden sich auch die Spätschäden, die bis zum 6. Lebensjahr registriert werden konnten. Kongenitale HCMV Infektionen scheinen ca. 30% der sensorischen Hörstörungen von Kleinkindern auszumachen, sie treten aber erst relativ spät während der Entwicklung auf. Es wurde eine sehr große Gruppe von Kindern untersucht (12371), von denen 167 eine kongenitale HCMV-Infektion aufwiesen; weitere 14 hatten eine Hörminderung. Aus diesem Grunde wurde ein neonatales Gehörscreening in Kombination mit einem HCMV-Urinscreening empfohlen, um die asymptomatischen Träger der Infektion nicht zu übersehen (Hicks et al., 1993; Fowler et al., 1999). Revello und Gerna

empfehlen bezüglich der HCMV-Diagnostik, sowohl die Untersuchung von fetalem Blut als auch die Fruchtwasseruntersuchung. So könnte man das Risiko von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen mindern (Revello und Gerna, 2004). Mit ihrer Arbeit liefern die Autoren einen wesentlichen Beitrag zur Diagnose der HCMV-Infektion. Man schätzt, dass in den vergangenen 20 Jahren ca. 800 000 Kinder alleine in den USA intrauterin mit HCMV infiziert worden sind (Yow und Demmler, 1992).

Eine Therapie mit Ganciclovir ist insbesondere bei symptomatischen HCMV-Infektionen indiziert und vor allem dann, wenn das ZNS mitbeteiligt ist. Es sollte jedoch auch immer an die Nebenwirkungen einer Therapie gedacht werden. Welche Vorteile hat eine Kurzzeit- gegenüber einer Langzeittherapie mit Ganciclovir? Kimberlin et al. untersuchten 100 Neugeborene mit einer symptomatischen HCMV-Infektion, bei der auch das ZNS mitbeteiligt war. Es wurden Neugeborene untersucht, die eine intravenöse Therapie über sechs Wochen erhielten gegenüber Neugeborenen ohne Therapie. Die Ergebnisse stellten sich wie folgt dar: 21 von 25 Patienten mit Ganciclovirtherapie zeigten ein verbessertes oder normales Hörvermögen nach Beginn der Therapie gegenüber 10 von 17 Patienten ohne Therapie. Keiner der Patienten unter Therapie zeigte eine Verschlechterung des Hörvermögens, wobei eine solche Verschlechterung bei 7 der 17 Kontrollpatienten aufgetreten war.

Bei fast zwei Drittel der Patienten war eine Neutropenie unter Therapie aufgetreten (Kimberlin et al., 2003). Michaels untersuchte im Gegensatz zu Kimberlin die Auswirkungen einer Langzeitganciclovirtherapie. Dabei wurde Ganciclovir zuerst intravenös und anschließend oral gegeben. Dauer: 1 Jahr bzw. 0,83 Jahre. Von neun untersuchten Kindern hatte dabei keines eine Verschlechterung seines Hörvermögens. Sieben Kinder zeigten mindestens eine Komplikation während der Therapie wie z.B. Katheterinfektion oder eine Neutropenie (Michaels et al., 2003).

So ist also zum heutigen Zeitpunkt die Ganciclovirtherapie noch Babys mit einer schweren HCMV-Infektion vorbehalten. Es besteht jedoch die Hoffnung, dass neue Wirkstoffe mit weniger starken Nebenwirkungen in klinischen Studien

erprobt werden und letztendlich die HCMV-Infektion mit größerer Wirksamkeit behandelt werden kann.

1.4.2. Postnatale HCMV-Transmission durch Muttermilch auf Reifgeborene

Im Jahre 1967 wurde HCMV erstmals aus einer von 49 Muttermilchproben isoliert (Diosi et al., 1967). In einer weiteren Studie wurden aus 17 von 63 Muttermilchproben HCMV isoliert (Hayes et al., 1972). Die Autoren berichten, dass die gefundenen Ergebnisse sich sehr von vorherigen Aussagen unterscheiden, wo beschrieben wurde, dass HCMV nur sehr selten durch Muttermilch ausgeschieden wird. Deshalb muss Muttermilch zusammen mit Zervixsekret als potentiell wichtige Quelle der HCMV-Infektion für Kinder angesehen werden (Hayes et al., 1972). Dass die postnatale HCMV-Infektion der Hauptverbreitungsweg des Virus ist, hat auch mit der Zunahme der Popularität des Stillens und der Kleinkindbetreuung in Tagesstätten zu tun (Stagno und Cloud, 1994).

So nahm schon Weller im Jahre 1971 an, dass die hohe Rate seropositiver Kinder mit der hohen Anzahl von Kindertagesstätten korreliere (Weller, 1971).

1.4.3. Postnatale HCMV-Transmission durch Muttermilch auf Frühgeborene

Seit den siebziger Jahren ist bekannt, dass Muttermilch eine mögliche Quelle für die erworbene HCMV-Infektion von Neugeborenen darstellt. Insbesondere für Frühgeborene kann dies ernsthafte Folgen haben. Maschmann et al. untersuchten in einer dreijährigen Studie (1995-1998) die Auswirkungen einer HCMV-Infektion auf Neugeborene mit einem extrem geringen Geburtsgewicht (< 1500 g, Gestationsalter < 32. Schwangerschaftswoche): Von insgesamt 180 Neugeborenen war bei 80 Kindern seronegativer Mütter und bei drei Kindern seropositiver Mütter keine Transmission zu verzeichnen gewesen. Bei 33 Neugeborenen von insgesamt 87, die HCMV ausgesetzt waren, erfolgte eine Transmission. 16 von diesen Neugeborenen zeigten Symptome wie Hepatopathie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Sepsis-ähnlichen Symptomen (Maschmann et al., 2001). Die Bedeutung der Übertragung von

HCMV via Muttermilch wurde lange unterschätzt. Auch wird darauf hingewiesen, dass die Reaktivierung von HCMV während der Laktation bei seropositiven Müttern eine ganz entscheidende Rolle für die Übertragung des Virus auf das Frühgeborene darstellt. Die Reaktivierungsrate bei seropositiven Müttern beträgt 96% und entspricht damit der Seroprävalenzrate (Hamprecht et al., 2001). In einer Studie von Vollmer et al. wurden die Folgen der postnatal erworbenen HCMV-Infektion auf das Hörvermögen und die geistige Entwicklung bei Frühgeborenen untersucht. Es wurden 22 Frühgeborene (medianes Gestationsalter 27,6 Wochen, medianes Geburtsgewicht 1020 g) mit einer postnatalen erworbenen HCMV-Infektion durch Muttermilch mit 22 HCMV-negativen Frühgeborenen verglichen. Von 22 Kindern mit einer postnatalen HCMV-Infektion, die vor der 32. Schwangerschaftswoche geboren wurden und ein Geburtsgewicht < 1500g aufwiesen, hatten 12 Symptome wie Thrombozytopenie und Leukopenie. Vier Kinder entwickelten Sepsis-ähnliche Symptome und fünf Kinder zeigten Zeichen einer Leberschädigung. Was aber den neurologischen Status, die motorische Entwicklung und die Entwicklung der Sprache anbelangt, gab es keinen Unterschied zwischen der HCMV-seronegativen und der HCMV-seropositiven Gruppe. Es konnten keine neurologischen Spätschäden festgestellt werden (Vollmer et al., 2004). Dworsky beschreibt in einer Studie von 1982, dass HCMV auf Frühgeborene einen größeren Einfluss hat als auf Reifgeborene und weist damit auf die Gefahr hin, die Spendermilch auf Frühgeborene mit geringerem Geburtsgewicht haben könnte. Er vergleicht verschiedene Methoden der Inaktivierung miteinander und damit den Einfluss auf HCMV in der Muttermilch (Dworsky et al., 1982). 1983 berichten Dworsky et al., dass 39% von den in dieser Studie untersuchten Müttern HCMV nach Reaktivierung über die Muttermilch ausschieden. Dadurch wurden 69% der Neugeborenen mit HCMV infiziert. Zwei Frühgeborene entwickelten sogar eine Pneumonie (Dworsky et al., 1983).

1.5. Bedeutung der Muttermilch

1.5.1. Inhaltsstoffe

In diesem Abschnitt soll auf die besondere Bedeutung der Muttermilch für das Neugeborene hingewiesen werden. Auf der einen Seite können Viren wie HCMV und HIV übertragen werden und dem Kind damit Schaden zufügen, auf der anderen Seite kann die Muttermilch als Immunprotektor auch dazu beitragen, das Kind vor bestimmten Erkrankungen zu schützen. Das Neugeborene hat ein Immunsystem, das in seiner Ausprägung und seinen Fähigkeiten sehr limitiert ist. Es braucht Zeit, bis es vollständig ausgereift ist, derweil spielen IgG-Antikörper, die das Kind von der Mutter erhalten hat, eine wichtige Rolle (Hanson et al., 2002). So berichtet z.B. May 1994, dass die Inzidenz von Darm- und Lungenerkrankungen bei Kindern, die Muttermilch erhalten, aufgrund von spezifischen Antikörpern geringer ist als bei Kindern, die nicht gestillt werden. Außerdem enthält die Muttermilch zelluläre Bestandteile wie T-und B-Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Makrophagen haben Rezeptoren für sekretorische IgA-Antikörper und dürften eine Rolle spielen bei der lokalen Abwehr im Gastrointestinaltrakt. Muttermilch enthält neben der spezifischen Abwehr auch unspezifische Abwehrsysteme wie z.B. die Aktivität der Lipase (May, 1994, Xanthou et al., 1995). Aus diesem Grund sollte die Frage der Risiken des Stillens immer vor dem Hintergrund des Nutzens der Muttermilch diskutiert und immer individuell entschieden werden. Lawrence und Howard schreiben in ihrem Artikel von 1999, dass es keine spezifischen Kontraindikationen gegen Stillen gibt, sondern es müsse von Kind zu Kind individuell entschieden werden. Auch HCMV stelle keine Kontraindikation dar, aber Frühgeborene können aufgrund ihrer Antikörperlage erkranken. Aus diesem Grund sollte die Muttermilch in den ersten paar Wochen, bis genug Antikörper ausgebildet sind, jeweils für sieben Tage bei -20 °C eingefroren werden, bevor sie an das Kind verfüttert wird (Lawrence und Howard, 1999).

Folgende unspezifische humorale Faktoren können nun in der Muttermilch unterschieden werden: Laktoferrin, Komplement C3/C4, Bifidusfaktor, Lysozym,

gallensalzabhängige Lipasen, Neuraminsäure und humorale Faktoren wie B- und T-Lymphozyten und Immunglobuline sowie zelluläre Bestandteile (Goldman, 1993; Speer und Hein-Kriekenbaum, 1993).

Die vollständige Entwicklung des Immunsystems des Neugeborenen läuft über mehrere Wochen ab. Deshalb wird den Antikörpern, die über die Plazenta übertragen werden, eine wichtige Bedeutung zugemessen. Sie induzieren beim Neugeborenen eine inflammatorische Reaktion durch Aktivierung von Komplement und Neutrophilen. Dadurch werden proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1β, Tumornekrosefaktor (TNF)α und IL-6 freigesetzt. Dies verstärkt wiederum den entzündungs-induzierten Gewebeschaden und den Energieverbrauch für Abwehrreaktionen.

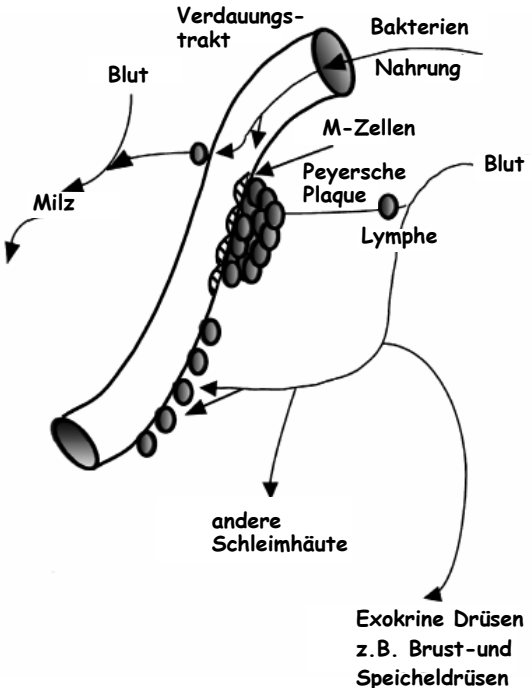
Sekretorisches IgA (Polymeres IgA) ist das Immunglobulin, welches mit 90% am häufigsten in der Muttermilch vorkommt (Goldman et al., 1982).

Aufgebaut ist es aus zwei IgA-Monomeren und der J(oining)-(Peptid)Kette, die die Untereinheiten dieser Moleküle verbindet, sowie dem pIgA-Rezeptor (pIgAR), der so genannten sekretorischen Komponente.

Mikrobielle, Nahrungsmittel und andere Antigene gelangen über den Darm in die M-Zellen der Peyerschen Plaques, wo sie Antigen-präsentierenden Zellen und Lymphozyten präsentiert werden. Darauf findet Antigenprozessierung und -präsentation sowie T-Zellstimulation und B-Zellproliferation statt (Hanson et al., 2002). In der Brustdrüse findet dann die Ausreifung zu bestimmten IgA-sezernierenden Plasmazellen statt. Der Weg erfolgt über den Ductus thoracicus sowie die Blutbahn. Die J-Kette der IgA-Dimere bindet an den pIgA-Rezeptor. Das sekretorische IgA gelangt durch transepithelialen Transport in die Muttermilch (Hanson et al., 2002; Xanthou et al., 1995).

Abb. 4: Enteromammärer Kreislauf (modifiziert nach Hanson et al., 2002)

Nahrungsantigene und mikrobielle Antigene gelangen in die Peyer'schen Plaques, wo B-Lymphozyten zur IgA-Produktion angeregt werden. Diese B-Lymphozyten verlassen die Peyer'schen Plaques und wandern u.a. auch zu exokrinen Drüsen, also auch zu der Brustdrüse. Dort werden IgA-Dimere produziert. Dieser Kreislauf bezeichnet man als enteromammären Kreislauf.



Laktoferrin: Das abundanteste Protein in reifer Milch ist das Laktoferrin. Es kann unspezifisch Bakterien und Viren sowie Pilze abtöten. Diese Fähigkeit resultiert wahrscheinlich aus der antiinflammatorischen Eigenschaft des Laktoferrin (Hanson et al., 2002). Die höchste Konzentration dieses Proteins findet man im Kolostrum (Welsh und May, 1979), obgleich es auch in anderen Körpersekreten vorkommt. Laktoferrin entzieht anderen Organismen das Eisen, das sie für ihr Wachstum benötigen (Speer und Hein-Keikenbaum, 1993).

Lysozym: Im Vergleich zu Laktoferrin steigt das Lysozym mit der Stilldauer weiter an, es ist ein säurestabiles Enzym und kann Bakterien durch Hydrolyse lysieren (Xanthou et al., 1995).

Alkalische Phosphatase in der Muttermilch: Dieses Enzym hat die molekulare Größe der plazentaren Alkalischen Phosphatase, ein Molekulargewicht von 160000 Dalton. Dennoch unterscheiden sich die beiden Enzyme. Die

Alkalische Phosphatase in der Milch wird nicht von L-phenylalanin (2,5 mmol/l) und L-homoarginin (10 mmol/l) gehemmt (Chuang 1987). Die AP in der Muttermilch ähnelt der Alkalischen Phosphatase in der Leber. Es wurde festgestellt, dass sich beide in einer Untereinheit des Molekulargewichts und im isoelektrischen Punkt unterscheiden (Hamilton et al., 1979). Auch Worth et al. berichten in einem Artikel von 1981 über dieses Enzym: Zuerst wurde angenommen, dass die Alkalische Phosphatase, die man während der Laktation im Serum findet, sich aus den Isoenzymen aus dem Knochen und der Leber zusammensetzt, doch man stellte schließlich fest, dass es sich um ein ganz anderes Isoenzym handelte (Worth et al., 1981).

Lipase in der Muttermilch: 1953 wurde die Lipase, die in der Muttermilch enthalten ist, erstmals beschrieben. Wegen der absoluten Notwendigkeit für die Gallensalze wird die Lipase in der Muttermilch auch bezeichnet als durch Gallensalze stimulierte Lipase (BSSL; bile salt stimulated lipase). Die höchste Konzentration hat dieses Enzym im Kolostrum von Müttern Frühgeborener. BSSL besteht aus 722 Aminosäuresequenzen und hat ein Molekulargewicht von 90000 Dalton. Die Lipase zeigt Übereinstimmungen zu anderen menschlichen Lipasen, bestimmte Sequenzen ähneln jedoch der Acetylcholinesterase.

BSSL findet man in der Muttermilch in der wässrigen Fraktion (Molke). Sie hydrolysiert das Triacylglycerol, das in der Fettfraktion vorhanden ist, nicht.

Diese Lipase ist essentiell für die optimale Ernährung und neurologische Entwicklung der Neugeborenen. Im Vergleich zu unbehandelter Muttermilch ist bei pasteurisierter Spendermilch die Fettabsorption auf 73 bzw. 64% reduziert (Manson und Weaver, 1997).

1.5.2. Milchbankwesen

Während das Milchbankwesen in Westdeutschland seit 1972 nicht mehr so weit verbreitet ist, hat es in den angelsächsischen Ländern noch eine sehr große Bedeutung. In Deutschland wurde im Jahre 1919 eine erste Milchbank eingerichtet. Das Milchbankwesen erreichte dann in den 50er Jahren seinen Höhepunkt, um dann 1972 wieder zu stagnieren. Die Nordamerikanische

Vereinigung für das Milchbankwesen berichtet in ihrem Leitfaden, dass die erste Milchbank in Boston, Massachusetts gegründet wurde, weil festgestellt wurde, dass die Mortalität und Morbidität von Kindern, die nicht gestillt wurden, anstieg. Die Spendermilch wurde auf Tuberkulose und Syphillis untersucht und unter medizinischer Aufsicht geführt. Nach dem zweiten Weltkrieg ging das Interesse an Milchbanken in den USA zurück, um dann 1970 wieder anzusteigen.

Bei den amerikanischen Milchbanken kann man folgende Milchpräparationen erhalten:

- frische Rohmilch, die bei 4 °C gelagert wird, aber nicht länger als 72 Stunden verwendet werden darf;
- frisch gefrorene Milch, die bei -20 °C aufbewahrt wird, aber nicht länger als 12 Monate;
- hitzebehandelte Milch (Oxford Human Milk Pasteurizer, 30 min bei 56 °C);
- Milchpools, d.h. Milch von mehreren Spendern;
- „Preterm milk“, d.h. Milch, die innerhalb des ersten Monats nach der Geburt von einer Mutter abgepumpt wird, die während oder vor der 36. Schwangerschaftswoche entbunden hat (Human Milk Banking Association of North America, 2000).

An serologischen Tests werden durchgeführt: serologisches Screening auf HIV-1, HIV-2, HTLV (Humanes T-Zell-Leukämievirus), Hepatitis C, Hepatitis B-Oberflächenantigen sowie Syphilis. Sollte sich ein positives Ergebnis bei den genannten Tests zeigen, so wird die Spenderin von der Milchbank ausgeschlossen, selbst wenn das Ergebnis falsch positiv sein sollte. Ebenso als potentielle Spender ausgeschlossen werden z.B. Frauen, die innerhalb der letzten zwölf Monate eine Bluttransfusion oder eine Organtransplantation erhalten haben oder die drogenabhängig sind (Human Milk Banking Association of North America, 2000). Daraus geht also hervor, dass keine Untersuchung auf den HCMV-Status stattfindet. 1998 waren in Deutschland noch 15 Milchbanken vorhanden. Daraus konnten hauptsächlich für Frühgeborene noch 8000 Liter Milch von ca. 500 Spenderinnen gewonnen werden (Springer, 2000). Zur

Inaktivierung von Bakterien und Viren wird die zur Verfügung stehende Milch mit Hitze behandelt (30 min bei 57 °C). Eine eventuelle Lagerung vor und nach Pasteurisierung erfolgt durch Tiefkühlung (-18 °C bis -40 °C) (Springer, 1998).

1.6. HCMV-Inaktivierung in Muttermilch

Stillen ist für das Frühgeborene unentbehrlich, da nur so eine optimale Entwicklung gewährleistet werden kann. Mit der Gabe von Muttermilch sind ernährungsphysiologische Vorteile und die Übertragung von immunprotektiven Komponenten verbunden (Schanler et al., 1999). Die postnatale laktogene HCMV-Transmission wird getriggert durch die postpartal einsetzende Laktation (Vochem, 2003). Es stellt sich also hier die Frage, wie die Ernährung der Frühgeborenen aussehen soll im Falle einer Seropositivität der Mutter: keine Ernährung mit Muttermilch, Pasteurisierung, Einfrieren, Abwarten, Muttermilchgabe mit Zustimmung der Eltern. Gibt man allerdings nur reine Formulaernährung und verhindert dadurch die Übertragung der HCMV-Infektion, so entsteht natürlich auch ein Verlust der Vorteile der Muttermilchernährung. Mit diesem Problem setzen sich auch Goelz et al. auseinander. Bei dieser abwägenden Stellungnahme waren insgesamt drei Kliniken beteiligt: Stuttgart, Tübingen und Würzburg. Diese haben sich nun aufgrund der aktuellen Datenlage dazu entschieden, weiterhin auch sehr kleine Frühgeborene mit supplementierter Milch, jedoch nicht mit behandelter Muttermilch zu ernähren. Dies geschieht aber immer nur mit Aufklärung und Einwilligung der Eltern. Bei allen Müttern von Frühgeborenen der Hochrisikogruppe (Geburtsgewicht < 1000 g; Gestationsalter < 30 Wochen) wird deshalb peripartal der HCMV-IgG-Serostatus bestimmt (Goelz et al., 2004).

1.6.1. Hitzeinaktivierungsverfahren

In einem Artikel von 1977 beschreibt J.E. Ford ein Hitzeinaktivierungsverfahren. Dabei wird ein bestimmtes Volumen an Milch für 30 Minuten auf 62,5 °C erhitzt. Bei diesem Verfahren wird der IgA-Titer um 20% reduziert, IgM und der größte Teil vom Laktoferrin werden zerstört, während das Lysozym stabil bleibt. Würde man die Temperatur allerdings noch weiter erhöhen, würde man eine fast

100%ige Einschränkung der Aktivitäten dieser Marker erhalten. Die Autoren empfehlen, das so genannte Holder-Verfahren anzuwenden, weil nur dadurch gewährleistet werden kann, dass die Gabe von Muttermilch für das Kind unbedenklich ist, wenn die Milch in bestimmten Zentren gesammelt wird, auch dann, wenn dies leider dazu führt, dass bestimmte Enzyme, die in der Milch vorhanden sind, auf ein niedrigeres Niveau reduziert werden (Ford et al., 1977). Eine ungarische Arbeitsgruppe hatte bereits 1969 die Empfehlung herausgegeben, Spendermilch für 30 Minuten auf 65 °C zu erhitzen (Molnar et al., 1969). Auch Dworsky wendet in einem 1982 erschienenen Artikel die Holder-Pasteurisierung an. Es wurde festgestellt, dass nur bei 62 °C eine HCMV- Inaktivierung zu beobachten war, wenngleich dies nicht ideal ist für die immunologischen Eigenschaften der Milch (Dworsky et al., 1982). Goldblum stellte erstmals in einem 1982 erschienenen Artikel neben der Methode der Holder-Pasteurisierung ein Kurzzeithitzepasteurisierungsverfahren vor. Dabei wurde ein Plattenhitzeaustauscher, der eigentlich für die industrielle Behandlung von großen Mengen von Kuhmilch hergestellt worden war, unter der Injektion von Wasserdampf und Eiswasser verwendet (Goldblum et al., 1984). Die Spendermilch wurde dabei mit einer Temperatur von 72 °C behandelt. Man stellte fest, dass bei dieser Behandlungstemperatur und einer Behandlungsdauer von 5 Sekunden keine Aktivität von HCMV mehr vorhanden war. Jedoch benötigte dieses Verfahren eine sehr große Milchmenge (2 Liter) was einem Milchpool von etwa 20 Spenderinnen entspricht und deshalb nur innerhalb von Milchbanken verwendet werden kann. Die Autoren stellen jedoch eine potentielle kommerzielle Nutzung des Verfahrens in Aussicht (Goldblum et al., 1984). Dennoch gibt es bis heute kein Kurzzeithitze-Inaktivierungsverfahren, das man kommerziell nutzen könnte (Hamprecht, 2003).

Tab. 2: HCMV-Inaktivierung durch Langzeit- und Kurzzeit-Pasteurisierungsverfahren
(modifiziert nach Hamprecht, 2003)

Pfu: Plaque bildende Einheit
CPE: cytopathischer Effekt
n: Anzahl

Virusinokulum	Fraktionierung	Pasteurisierung	Infektiosität (CPE, nProben)	Literatur
10^7 - 10^8 pfu/ml	Entrahmung	30 min 56 °C	**positiv**	Welsh et al., 1979
10^7 - 10^8 pfu/ml	Entrahmung	30min 62,5 °C	negativ	Welsh et al., 1979
10^7 - 10^8 pfu/ml	Entrahmung	5min 100 °C	negativ	Welsh et al., 1979
200 pfu	nein	30min 56 °C	negativ (7/10), **positiv** (3/10)	Dworsky et al., 1982
200 pfu	nein	30 min 62 °C	negativ (10/10)	Dworsky et al., 1982
Natürlich infizierte Proben	Entrahmung	8min 63 °C	negativ	Friis und Andersen, 1982
5 x 10^4 - 5 x 10^5 pfu/ml, Pool: 2L	nein	**1, 5, 15 sec 72 °C**	1sec: **positiv;** ab 5 sec: negativ	Goldblum et al., 1984

1.6.2. Kryoinaktivierung

1982 wurde die Methode der Kryoinaktivierung von Friis und Andersen vorgestellt. Die Autoren beschrieben, dass die Aufbewahrung der Milch über drei Tage bei -20 °C den Virustiter über 99% reduzierte. Gleichzeitig wurde auch die Pasteurisierung bei 63 °C untersucht, auch hier war nach 8 Minuten kein Virus mehr vorhanden. Die Autoren untersuchten diese Methoden, weil bisher fraglich war, ob Muttermilch pasteurisiert werden sollte, weil dies wichtige Substanzen wie z.B. Immunglobuline zerstören könnte. Letztendlich kommen die Autoren zu dem Ergebnis, dass sowohl nach Kryoinaktivierung bei -20 °C über drei Tage als auch nach Pasteurisierung bei 63 °C für 8 Minuten keine signifikante Gefahr für das Neugeborene besteht, wenn die Milch weiter verfüttert wird. Möglicherweise könnte aber bei hohen Virustitern bei der Kryoinaktivierung noch eine Restaktivität erhalten geblieben sein (Friis und Andersen, 1982). Über die Methode der Kryoinaktivierung liegen aber insgesamt nur wenige Daten vor, die auch schon mehr als zwanzig Jahre alt sind (z. B. Welsh et al., 1979). In einer weiteren Arbeit wurde ebenfalls diese Methode untersucht, allerdings traten dabei einige Probleme auf, die die Autoren selbst erläutert haben: in der Zellkultur, die mit positiver Spendermilch beimpft worden war, konnte aufgrund bestimmter toxischer Substanzen, die möglicherweise das Virus neutralisiert haben, keine Aussage über die Wirksamkeit der verwendeten Methode gemacht werden. Sieben der 11

nichttoxischen Milchfraktionen, die bei 4 °C inaktiviert wurden und neun der 12 nichttoxischen Milchfraktionen, die bei -20 °C inaktiviert wurden, behielten ihre Infektiosität bei der Kryoinaktivierung über Nacht. Eine von sechs nichttoxischen Fraktionen, die bei 4 °C inaktiviert wurden und fünf von zwölf nichttoxischen Fraktionen, die bei -20 °C inaktiviert wurden, behielten ihre Infektiosität nach der Behandlung nach sieben Tagen. Auch stellt der Autor fest, dass bei geringer Viruslast der Milch nur eine geringe Sensitivität der Zellkultur vorliegt (Dworsky et al., 1982).

Die genannten Arbeiten zur Kryoinaktivierung dienten den Autoren Lawrence und Howard für weitere Empfehlungen zur HCMV-Inaktivierung in der Muttermilch (Lawrence und Howard, 1999; Lawrence und Lawrence 2001).

Tab. 3: HCMV-Kryoinaktivierung in Muttermilch

(modifiziert n. Hamprecht, 2003)

Kryoinaktivierung	Infektiosität (CPE, nProben)	Literatur
10 Tage, -15 °C	schwach positiv nach 20 Tagen, n=2	Welsh et al., 1979
1,7,7-30 Tage, -20 °C	1Tag:9/10 negativ; 7 Tage alle negativ 19/19	Dworsky et al., 1982
1,7,7-30 Tage, -20 °C	1Tag: 9/10 positiv 7 Tage: 5/12 positiv	Dworsky et al., 1983
1-10 Tage, -20 °C	**3Tage: 99% Reduktion**	Friis und Andersen, 1982

1.6.3. Aktivität und Verhalten biochemischer Markersubstanzen in Muttermilch

Wird die Muttermilch mit oben genannten Verfahren behandelt, so verändern sich auch die in der Milch enthaltenen Markersubstanzen. Im folgenden Absatz sollen diesbezüglich einige Daten dargestellt werden:

- Bereits 1977 veröffentlichten Ford et al. hierzu folgende Ergebnisse: Die Holder-Pasteurisierung reduzierte den IgA-Titer um 20%, IgM und Laktoferrin wurden dabei fast vollständig zerstört, wobei das Enzym Lysozym stabil blieb. Ähnlich verhielt es sich mit der Kapazität der Milch Folsäure zu binden und Bakterien abzuwehren (Ford et al., 1977).
- In einer weiteren Arbeit von Liebhaber et al. wurde festgestellt, dass das Holder-Verfahren und die Kryoinaktivierung die Gesamtlymphozytenzahl und die Konzentration von lgA verminderte. Nach der Kryoinaktivierung dagegen wurde keine signifikante Verminderung von IgA festgestellt (Liebhaber et al., 1977).

- 1978 veröffentlichten Evans et al. folgende Ergebnisse: das Holder-Verfahren verminderte Lysozym, Laktoferrin und IgG. IgA dagegen blieb stabil. Nach dem Verfahren der Kryoinaktivierung waren die Marker Laktoferrin, Lysozym, IgG, IgA und der Komplementfaktor C3 nicht nennenswert verändert (Evans et al., 1978).
- Wills et al. untersuchten nicht nur die gewöhnliche Holder-Pasteurisierung, sondern auch die Inaktivierung bei 62,5 °C und fünf Minuten sowie die Inaktivierung bei 56 °C für 15 Minuten. Die Durchschnittsaktivität dieser Verfahren zeigte folgende Ergebnisse: Verminderung des IgA-Spiegls um 67%, Laktoferrin-Spiegel um 27% und des Lysozym-Spiegels um 67%. Pasteurisierung für 15 Minuten bei 56 °C hingegen hatte keinen Einfluss auf diese Spiegel (Wills et al. 1982).
- Goldblum et al., beschrieben in ihrer Arbeit von 1984, dass Kurzzeithitzepasteurisierung bei 72°C für 5 oder 15 Sekunden die Aktivität der Lipase zerstörte. Lediglich 3% der ursprünglichen Aktivität konnten erhalten bleiben. Folsäure, Vitamin B_1, B_2, B_6 und Vitamin C blieben unbeeinflusst. Unverändert stabil waren auch sIgA und Laktoferrin, wobei ein Anstieg von Lysozym-Konzentration und Lysozym-Aktivität zu verzeichnen war (Goldblum et al., 1984)
- Berkow et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Effekt der Kryoinaktivierung auf bestimmte Marker der Muttermilch: Dabei bleibt die Aktivität der Lipase unbeeinträchtigt, während Milchfett bei -20 °C hydrolisiert wird, aber nicht bei -70 °C (Berkow et al., 1984).

1.7. Ziel der Arbeit

Von allen seropositiven Müttern reaktivieren bis zu 96% das HCMV in der Brustdrüse. Eine Transmission auf das Frühgeborene (Geburtsgewicht < 1500g) kann bei bis zu 37% stattfinden. Die durch Stillen erworbene HCMV-Infektion des Risiko-Frühgeborenen (< 1000g Geburtsgewicht) kann mit einer symptomatischen HCMV-Infektion assoziiert sein. Bisher verfügbare Präventionsstrategien zur Virusinaktivierung sind auf der einen Seite die Langzeithitzepasteurisierung (Holder-Verfahren), die mit erheblichen

Qualitätsverlusten von immunologisch und nutritiv wichtigen Komponenten der Muttermilch einhergeht und auf der anderen Seite die Kryoinaktivierung bei -20 °C. Die Gefriertaumethode ist jedoch ungeeignet, HCMV quantitativ aus der Muttermilch zu eliminieren (Hamprecht, 2004). Deshalb wurde ein neues Verfahren zur Kurzzeithitzepasteurisierung etabliert und im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob eine Kurzzeithitzepasteurisierung unterhalb 72 °C möglich ist und wie sich dies auf die Aktivität von Markerenzymen auswirkt.

Die apparative Durchführung der Kurzzeithitzepasteurisierung erfolgte mittels eines Prototyps (Firma Lauf, Tübingen). Diese Methode wurde mit dem kommerziell verfügbaren Verfahren der Holder-Pasteurisierung (30 Minuten, 62,5 °C) verglichen. Für die Versuche wurde sowohl Milch von Müttern mit positivem als auch mit negativem Serostatus verwendet. Milchproben von seronegativen Müttern wurden artifiziell mit definierter Viruslast infiziert (Laborstamm AD169). Die quantitative Detektion der verbleibenden viralen Restinfektiosität nach Inaktivierung in der Muttermilch erfolgte mittels Inokulation auf Mikrokulturen durch quantitativen Infektiositätsnachweis nach 18- stündiger Inkubation (Hamprecht, 2003). Die quantitative Detektion viraler DNA in der Muttermilch wurde mittels COBAS AMPLICOR CMV MONITOR TEST getestet.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die Aktivität der beiden Markerenzyme Alkalische Phosphatase und Lipase als Erfolgskontrolle der Inaktivierung analysiert. Wie verhalten sich die Enzyme nach erfolgter Inaktivierung? Wie hoch ist deren Aktivität im Vergleich zum Holder-Verfahren?

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Zellen

Es werden humane Vorhautfibroblasten (HFF) verwendet, die ursprünglich aus einer Gewebebiopsie nach Circumcision gewonnen wurden. Man kultiviert in Eagles Minimum Essential Medium. Sie wachsen als einschichtiger adhärenter Zellrasen (Monolayer).

2.1.2. Muttermilch

Diese erhielten wir von stillenden Müttern Frühgeborener (Neonatologie der Universität Tübingen) und Reifgeborener (Freiwillige).

2.1.3. Virusstamm HCMV-AD169

Laborstamm: es wird der Laborstamm HCMV-AD169, ein an humane Vorhautfibroblasten und MRC-5 adaptierter Cytomegalovirus-Laborstamm verwendet.

2.1.4. Lösungen und Medien

2.1.4.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Minimum Essential Medium (MEM)

MEM mit Zusatz von Salzen nach Earle oder Hanks, sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Salzkonzentrationen im Trockenpulver:

10,7 g MEM Trockenpulver	(Firma Gibco)
0,7 g $NaHCO_3$	(Firma Merck)

in 1000 ml deionisiertem Wasser lösen und versetzen mit

100 µg/ml Gentamycin	(Firma Grünenthal)
und fötalem Kälberserum	(Firma Gibco)

(nach 30-minütiger Inaktivierung des Komplements im Wasserbad bei 56 °C)

Anschließend erfolgt die Sterilfiltration (Millex-GS 0,22 µm Filter).

Wachstumsmedium

MEM/E
Zusatz von 10% (v/v) Fötales Kälberserum (FCS)
Zusatz von 3,5 ml L-Glutamin

Erhaltungsmedium
MEM/E
Zusatz von 5% (v/v) Fötales Kälberserum (FCS)
Zusatz von 3,5 ml L-Glutamin

Phosphat gepufferte Saline (PBS)

PBS in 1000 ml Phosphatpuffer (ohne Calcium- und Magnesiumionen) sind folgende Komponenten enthalten:

8,0 g NaCl	(Firma Merck)
0,2 g KCl	(Firma Merck)
2,898 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O	(Firma Merck)
0,2 g K_2HPO_4	(Firma Merck)

Trypsin-Lösung

0,2 g/l EDTA	(Firma Sigma)
0,25% Trypsin (1:250; 5,1 U/mg, Serva)	
0,25% KCl	(Firma Merck)
100 µg/ml Gentamycin	(Firma Grünenthal)

anschließend erfolgt die Sterilfiltration (Millex-GS 0,22 µm Filter)

Trypanblaulösung

0,5% Trypanblau in 0,9%-iger NaCl-Lösung

2.1.4.2. Lösungen für den Immunperoxidasetest

Methanol 100% (Firma Merck)

Primärer Antikörper

Gegen das Immediate Early Antigen anti-pp 72 (IE1, codiert im UL123-Abschnitt des HCMV-Genoms) gerichteter monoklonaler IgG-Maus-Antikörper (E13-Klon, 700 µg/ml)

Verdünnung: 1:200 in PBS (mit 0,5% FCS) (Paesel & Lorei)

Sekundärer Antikörper

Gegen IgG-Maus-Antikörper gerichtetes
Anti-Maus-Immunglobulin (ausK aninchenserum gewonnen)
mit Meerettich-Peroxidase konjugiert
Verdünnung: 1:200 in PBS (mit 0,5% FCS) (Firma Dako)

Natriumacetatpuffer

4,1 g (3M) Natriumacetat, mit Essigsäure
auf pH 4,9 eingestellt (Firma Merck)

AEC-Lösung

400 mg 3-Amino-9-ethyl-Carbazol Substrat (AEC) (Firma Sigma)
gelöst in 100 ml N,N-Dimethylformamid (DMF) (Firma Merck)
(entspricht einer Tablette Sigma A 6926 auf 5 ml DMF)
mit 0,1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,9) auf 50 ml aufgefüllt (1:20)
sterilfiltriert (0,2 µm Filter)
direkt vor Gebrauch wurden 10 µl 30% H_2O_2 (1:1000) (Firma Merck)
als Substrat zugeben.

Kern-Gegenfärbung mit Hämatoxilin/Hämalaun

Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie (Firma Merck)
Verdünnung 1:4 in PBS 0,5 % FCS

2.1.5. Reagenzien für den rekombinanten HCMV-IgG-Immunblot-Test

Teststreifen

Röhrchen mit 10 fortlaufend nummerierten Western-Blot-Teststreifen beschichtet mit definierten HCMV-Antigenen (Tegumentprotein pp150, Nicht-Struktur-Proteine IE1, CM2, p65, Glykoproteine gB1 und gB2).

Waschpuffer (zehnfach konzentriert)

Phosphat-Puffer, NaCl, Detergenz, Konservierungsmittel

Schwachpositive IgG-Serumkontrolle

Humaner Ursprung, anti-HIV-1/2, anti-HCV und HBs-Ag negativ

Anti-human IgG Konjugat (tausendfach konzentriert)

aus Kaninchen, enthält NaN_3

Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB)

gebrauchsfertig

Magermilchpulver

Inkubationsschalen mit je 10 Vertiefungen

2.1.6. Reagenzien für COBAS AMPLiCOR CMV MONITOR TEST

Lysereagenz

Tris-HCl Puffer
68% Guanidin Thiocyanat
3% Dithiothreitol
< 1% Glykogen

Quantifizierungspuffer

< 0,001% nicht infektiöse Plasmid-DNA, die Primer bindende Sequenzen enthält.

< 0,005% Poly rA RNA
EDTA
0,05% Natriumacetat

Probendiluent
Tris-HCl Puffer
< 0,005% Poly rA RNA
EDTA
0,05% Natriumacetat

Farbstoff
< 0,4% Dextranblau 2000
0,05% Natriumacetat

Negative Human-Plasma Kontrolle
nicht reaktiv, aber zugelassen für Antikörpertests gegen HCV, Antikörper gegen HIV-1/2 und HBs-Ag.
0,1% ProClin®300

HCMV-Negativkontrolle
< 0,005%Poly rA RNA
EDTA
0,05% Natriumacetat

HCMV Schwach positive Kontrolle
< 0,001% nicht infektiöse Plasmid-DNA, die HCMV-Sequenzen enthält.
< 0,005% Poly rA RNA
EDTA
0,05% Natriumacetat

HCMV Stark positive Kontrolle
< 0,001% nicht infektiöse Plasmid-DNA, die HCMV Sequenzen enthält.

< 0,005 % Poly rA RNA
EDTA
0,05% Natriumacetat

HCMV MONITOR Master Mix
Tris-HCL-Puffer
Glycerol
< 0,01% AmpliTaq® (Taq DNA Polymerase)
< 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP
< 0,005% Primer LC342 und LC383
< 0,01% AmpErase®
0,09% Natriumacetat
< 2% Magnesiumchlorid
0,09% Natriumacetat

Detektions Kits
AD3 (Amplicon Lösungs Reagenz)
EDTA
0,8% Natriumhydroxid

VM PS1 (CMV Probe Suspension 1)
MES Puffer
< 0,5% Suspension of Dynabeads® (paramagnetic particles)
0,09% Natriumacetat

VM4 (CMV Probe Suspension 2)
Natriumphosphatpuffer
< 0,2% Detergent
24,9% Natriumthiocyanat

VQ PS1 (CMV Quantitation Standard Probe Suspension 1)
MES Puffer

< 0,1% Suspension of Dynabeads®

0,09% Natriumacetat

VQ4 (CMV Quantitation Standard Probe Suspension 2)

Natriumphosphatpuffer

< 0,2 % Detergent

24,9% Natriumthiocyanat

DN4 (Denaturation Solution)

1,6% Natriumhydroxid

EDTA

Thymolblau

CN4 (Avidin-Meerettichperoxidase-Konjugat)

Tris-HCl-Puffer

< 0,001% Avidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugat

Rinderserumalbumin

Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)

0,1% Phenol

1% ProClin 150

SB3 (Substrat A)

Zitratlösung

0,01% Hydrogenperoxid

0,1% ProClin 150

SB (Substrate B)

0,1% 3,3´, 5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB)

40% Dimethylformamid (DMF)

CN4 (Avidin-Meerettichperoxidase Konjugat)

Tris-HCl-Puffer

< 0,001% Avidin-Meerettichperoxidase Konjugat

Rinderserumalbumin
Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd)
0,1% Phenol
1% ProClin 150

Waschpuffer (10X-Wash Konzentrat)
< 2% Phosphatpuffer
< 9% Natriumchlorid
EDTA
< 2% Detergenz
0,5% ProClin300

2.1.7. Arbeitsgeräte

Brutschrank (Firma Labotect)
Gefrierschrank (Firma Bosch)
Mikroskop (Firma Leitz)
Mikroskop (ID 02) (Firma Zeiss)
Zentrifuge Biofuge stratos/Rotor #3331 (Firma Heraeus)
Zentrifuge Megafuge 1.0R (Firma Heraeus)
Zentrifuge Eppendorf 5415 C (Firma Eppendorf)
Vortex (Firma Scientific Industries)
Kühlschrank (Firma Bosch)
Magnetrührgerät (Firma Heidolph)
Waage AC210 (Firma Sartorius)
Prototyp zur Virusinaktivierung in Muttermilch (Firma Lauf, Tübingen)
COBAS AMPLICOR CMV MONITOR TEST (Firma Roche)
Muttermilchpasteur 20 (Labor Buchdrucker, A-Ottenheim)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. HFF (human foreskin fibroblasts); Kultivierung

Humane Vorhautfibroblasten werden zum Nachweis der Infektiosität von HCMV in der zellfreien Fraktion der Muttermilch, nachdem diese aufgearbeitet wurde, verwendet. Die Fibroblasten stammen ursprünglich aus einer Vorhautbiopsie (Circumcision). Die Fibroblasten werden in einer Gewebekulturflasche ausgesät, als Nährmedium dient Eagles Minimum Essential Medium. Sie wachsen in der Kulturflasche als adhärenter Monolayer. Eine Passagezahl von ca. 20-30 ist möglich. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer Atmosphäre von 5% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

Nach Aussaat in der Kulturflasche werden die Zellen einen Tag im Wachstumsmedium belassen, dieses wird dann entfernt und Erhaltungsmedium hinzugegeben, welches danach nur noch alle zwei bis drei Tage gewechselt wird. Sollte der Indikator Phenolrot, der sich im Erhaltungsmedium befindet früher von rot nach orange umgeschlagen, so muss das Medium zu diesem Zeitpunkt gewechselt werden, da dies auf eine Übersäuerung hindeutet.

2.2.1.2. Zellpassagierung

Wenn der Zellrasen dicht genug ist (Mikroskopkontrolle), wird das Medium abgenommen. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-Lösung abgelöst. Dazu wird eine 175 cm^2-Kulturflasche für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch anschließendes Klopfen gegen die Kulturflasche können die adhärenten Zellen abgelöst werden.

Dieser Vorgang wird durch Gabe von MEM mit 10% FCS beendet. Die Zellen werden im Verhältnis 1:2 geteilt. Sie werden nun wieder in Wachstumsmedium aufgenommen und wieder ausgesät. Nach weiteren vier Stunden kann man unter dem Mikroskop Adhärenz beobachten.

Um sicher zu gehen, dass keine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen stattgefunden hat, wird dies täglich mittels Mikroskop überprüft. Mycoplasmen

lassen sich zusätzlich durch einen ELISA-Test erkennen (Mycoplasmen-Detektionskit der Firma Boehringer Mannheim), der in monatlichen Abständen durchgeführt wird.
Hat sich ein neuer Zellrasen gebildet, können die Zellen zum Nachweis der Infektiosität von HCMV in der zellfreien Fraktion der Muttermilch dienen.

2.2.1.3. HFF- Mikrokultur

Die Zellen werden wie in 2.8.2. beschrieben, mit PBS gewaschen und mit Trypsin-Lösung abgelöst. Diesen Ablösevorgang kann man auch sehr gut unter dem Mikroskop beobachten. Durch Zugabe von MEM mit 10% FCS wird der Verdau gestoppt und die Zellsuspension wird anschließend in ein 15 ml-Falcontube überführt. Dies wird nun bei 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der entstehende Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml MEM 10% FCS resuspendiert. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl geht man folgendermaßen vor:
Man verwendet hierzu eine Neubauer-Zählkammer, welche aus einem Gitternetz aus vier großen Quadraten, die wiederum aus 16 kleinen Quadraten bestehen, aufgebaut ist. Nun verdünnt man in einem Alliquot 10 µl der Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau. Dies entspricht einer 1:5 Verdünnung.
10 µl dieses Alliquots werden dann in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau nicht auf, wobei er tote oder geschädigte Zellen sehr gut anfärbt (Dye Exclusion Test). Zur Bestimmung der Zellzahl zählt man alle vitalen und nichtvitalen Zellen in einem Großquadrat. Die Gesamtzellzahl pro ml errechnet sich aus der Anzahl der vitalen gefärbten Zellen in einem Großquadrat multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor fünf und dem geometrischen Kammerfaktor 10^4. Hat man die Gesamtzellfraktion zuvor in einem geringeren oder größeren Volumen PBS resuspendiert, muss zusätzlich dieser Verdünnungs- bzw. Konzentrationsfaktor mit berücksichtigt werden.

$$\frac{N}{ml} = X \times VF \times 10^4 \qquad N_{tot} = \frac{N}{ml} \times V$$

mit:

VF = Verdünnungsfaktor (5); V = Volumen Zellsuspension (ml); 10^4 = geometrischer Kammerfaktor, X = Quersumme der Zellzahl eines Großquadranten, N=Zellzahl.

Möchte man wie in diesem Fall die Infektiosität in der zellfreien Fraktion der Muttermilch nachweisen, pipettiert man 100 µl der Zellsuspension (2,5 x 10^5/ml MEM 10% FCS) in jedes Well der Mikrotiterplatte. Die mit den Fibroblasten beimpfte Platte wird dann für mindestens vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Adhärenz der Zellen prüft man nach der abgelaufenen Zeit mittels Umkehrmikroskop.

2.2.1.4. HCMV-IEA-Immunperoxidasetest

Dieser Test setzt sich aus mehreren Arbeitsschritten zusammen und dient als Nachweis eines frühen viralen Proteins, das Aufschluss gibt über das Vorliegen einer viralen Infektion von HFF in der Kultur (Witzel, 2000). Der Primärantikörper dient zur Detektion des HCMV-spezifischen Immediate early antigen (IEA) p72 (UL 123) im infizierten Zellkern und wird von einem mit einer Meerettich-Peroxidase-konjugierten (POD), gegen den Primärantikörper gerichteten, anti-Spezies-Sekundärantikörper erkannt. Die Meerettich-Peroxidase reduziert anhand des dreiwertigen Eisens im Porphyrinring unter Zugabe von AEC H_2O_2 zu H_2O, dabei wird das AEC selbst oxidiert. Dabei entsteht Azamethin, welches als unlösliches Präzipitat vorliegt. Es resultiert in einem Farbumschlag zu rotbraun. Die Anzahl der HFF-Zellen, die das IE1 im Zellkern exprimieren, kann dann unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden (Witzel, 2000).

Folgende Arbeitsschritte sind nötig:

- Das Überstandsmedium wird von der Mikrotiterplatte abgenommen und eiskaltes Methanol, das bei -20 °C gelagert wurde zur Fixierung der Zellen hinzugegeben. Dann wird die Mikrotiterplatte für 20 Minuten im Kühlschrank

bei 4 °C inkubiert. Danach wird das Methanol wiederum entfernt und es schließt sich ein Waschschritt mit PBS 5% FCS an.

- Dann werden pro Well 100 µl des monoklonalen Maus-Antikörpers gegen das HCMV IE-Antigen p72 (UL123), Klon E13 (Mazeron et al., 1992) 1:500 verdünnt in PBS 0,5% FCS zugegeben und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgt ein zweimaliger Waschgang mit PBS 5% FCS.
- Nach Zugabe des sekundären Antikörpers (aus Kaninchenserum gewonnener Anti-Maus lgG-Antikörper) in einer 1:500 Verdünnung mit PBS 0,5% FCS wird wiederum für eine Stunde inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerettich-Peroxidase konjugiert. Nach der Inkubation erfolgt wieder ein zweimaliger Waschgang mit PBS 5% FCS.
- Um die infizierten Zellkerne zu erkennen, wird AEC-Stammlösung (3-Amino-9ethylcarbazol; Firma Merck) mit 1:20 0,1 molaren Na-Acetatpuffer verdünnt und mit einem 0,22 µm-Filter steril filtriert. Vor Gebrauch wird dann im Kühlschrank gelagertes H_2O_2 hinzugegeben. Diese Reaktion wird nun lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert. Die über die beiden Antikörper indirekt gebundene Meerettich-Peroxidase reduziert hierbei das Substrat H_2O_2 zu H_2O, während AEC oxidiert wird und als rotbrauner, unlöslicher kristalliner Farbstoff präzipitiert. Da die IE-Antigene im Kern lokalisiert sind, werden bei der Enzymreaktion die Kerne infizierter Zellen rötlich-braun angefärbt und können so mikroskopisch detektiert werden (Witzel, 2000).

2.2.2. HCMV-$TCID_{50}$-Bestimmung

Zur Inaktivierung seronegativer Muttermilch wird diese mit dem Laborstamm AD169 artifiziell infiziert (Spiking). Zusätzlich dient dieser Laborstamm auch als Positivkontrolle zum Nachweis der Infektiosität in der Zellkultur. Es wird ein an HFF- und der Zellinie MRC-5-adaptierter Laborstamm AD169 Lysat „B“ mit einer $TCID_{50/100\ µl}$ von $10^{-4.875}$ verwendet.

Der Laborstamm wird auf 175 cm^2 Kulturschalen passagiert, weil hohe Titer von extrazellulärem Virus benötigt werden. Wenn ein CPE (zytopathischer Effekt) von 80-90% erreicht ist, werden die infizierten und trypsinierten Fibroblasten pelletiert (400 g; 10 min) und zur Gewinnung von zellfreiem Virus werden die

Kulturüberstände gepoolt. Im Weiteren wird mit zellfreien Viruskultur-Überständen gearbeitet. Dazu wird der resultierende Überstand bei 3000g zentrifugiert. Zur anschließenden Pelletierung wird der Überstand für 60 Minuten bei 50000 g zentrifugiert. Die Pellets werden in je 100 µl MEM-10% FCS resuspendiert und portioniert bei -70 °C eingefroren. Aus einem Alliquot des Kulturüberstandes erfolgt dann die Titerbestimmung nach Spearman-Kärber. Hierzu wird wiederum eine aus 96 Wells bestehende Mikrotiterplatte mit $2{,}5 \times 10^4$ HFF in 100 µl MEM pro Well für fünf Stunden bis zur Zelladhärenz inkubiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Brutschrank. Nach der Inkubation wird nun eine Verdünnungsreihe angesetzt. Dazu werden die zu testenden Viruspräparationen aufgetaut und logarithmisch im MEM von 10^{-1}–10^{-8} verdünnt. Zuerst wird der Mediumüberstand abgenommen und mit 100 µl Virusverdünnung beimpft. Pro Verdünnungsstufe werden jeweils acht Wells infiziert. Zur Virusinokulation wird die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 400 g zentrifugiert und für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgt die weitere Inkubation bei 37 °C für 18 Stunden. Nach diesem Schritt wird die Mikrotiterplatte dem HCMV-IEA-Immunperoxidasetest unterzogen, welcher Aufschluss gibt über das Vorliegen einer viralen Infektion.
Nach diesem Arbeitsschritt kann man nun die $TCID_{50}$ nach folgendem Schema berechnen:

Tab. 4: TCID50-Bestimmung nach Spearman-Kerber
(modifiziert n. Prix, 1999)

Klassengrenze	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
HCMV-IEA$^+$	0/8	0/8	0/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Klassenmitte	-7,5	-6,5	-5,5	-4,5	-3,5	-2,5	-1,5	
Zunahme	0	0	3	5	0	0	0	
Produkte	0	0	-16,5	-22,5	0	0	0	

Im obigen Beispiel waren noch drei der insgesamt acht Wells bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-5} positiv. Bei der darauf folgenden höheren Verdünnungsstufe von 10^{-6} waren keine der acht Mikrokulturansätze mehr

positiv. Damit ergibt sich eine Zunahme von drei von 10^{-6} nach 10^{-5}. Nach der Methode von Spearman und Kärber kann man die $TCID_{50}$ dann so berechnen: (n=Mikrokulturen/Verdünnungsstufe):

$$\log TCID_{50} \text{ pro } 100\,\mu l = \frac{\Sigma \text{ Produkte}}{n} = -\frac{39}{8} = -4{,}875 \text{ (Titerverdünnung)}$$

$$TCID_{50} \text{ pro } 100\,\mu l = 10^{-4{,}875} \text{ (Titer)}$$

Da die Infektion der HFF-Mikrokulturen in Volumina von 100 µl durchgeführt wird, berechnet sich die $TCID_{50}$ auf ein Volumen von 100 µl. Die $TCID_{50}$ pro ml im Beispiel beträgt demnach $10^{-5,875}$ (Prix, 1999). Die Verdünnung zur Darstellung einer Virussuspension mit 100x$TCID_{50}$ als Kontrolle im Mikrokulturansatz beträgt demnach $10^{-3,875}$.

2.2.3. Inaktivierungsverfahren

2.2.3.1. Inaktivierungsgerät zur Kurzzeitpasteurisierung und Temperaturerfassung

Der vorliegende Prototyp wurde von der Firma Lauf in Tübingen speziell für die HCMV-Inaktivierung in unserer Abteilung entwickelt.

Zur Handhabung des Gerätes: In einen 250 ml Rundkolben werden 20 ml Milch gefüllt und dieser wird an der dafür vorgesehenen Vorrichtung mit einem integrierten Temperaturmessfühler befestigt. Durch den Temperaturmessfühler kann die Muttermilch auf die gewünschten Temperatursollwerte gebracht werden. Die Wahl der Standardvorgänge ist an den Tasten des Bedienfeldes vorzunehmen. Der gesamte Prozess der Inaktivierung erfolgt danach vollautomatisch.

Der Kolben wird derart in Rotation versetzt, dass an der Innenwand ein Milchfilm generiert wird, der die geometrische Figur einer Halbhohlkugel beschreibt. Voraussetzung der Generierung des Milchfilms ist: ein 250 ml Rundkolben, ein Milchvolumen von 20 ml und eine definierte Rotationsgeschwindigkeit. Durch diesen Milchfilm kann ein optimaler Temperaturaustausch gewährleistet werden. Der rotierende Rundkolben taucht nun in eine Temperierkammer ein. In der Kammer ist der rotierende Behälter

sowohl der Heizwirkung der Wärmequelle (Heißluft) als auch der Kühlwirkung der Kühlquelle (Kaltwasser 8 °C) aussetzbar. Die Temperierkammer steht über eine Ablauföffnung mit dem Wasserbad in Verbindung, wobei das Wasserbad einen unterhalb der Temperierkammer angeordneten Wassertank aufweist. Somit kann das Wasser dann direkt ablaufen.

Während dem Inaktivierungsvorgang bleibt die zu behandelnde Probe in der Temperierkammer und wird durch heißen Luftstrom auf die gewünschte Temperatur gebracht. Der Aufheizvorgang dauert ca. 80 Sekunden. Durch eine relativ niedrig gehaltene Temperatur des heißen Luftstromes ist ein schonender Aufheizvorgang gewährleistet. Ist der Sollwert der Maximaltemperatur erreicht, beginnt die Rampenzeit, die zwischen 1 und 10 Sekunden variiert.

Der Abkühlvorgang erfolgt durch Einstrahl von Wasser (8 °C) auf die rotierende Kolbenoberfläche. Das Abkühlen erfolgt damit nicht schockartig, sondern genauso schonend wie das Aufheizen.

Abb. 5: Inaktivierungsgerät (Prototyp)

Die Temperaturdaten werden mittels eines integrierten Temperaturmessfühlers im Sekundenabstand erfasst. Die Messdaten werden von einem Bildschirmschreiber (Computerprogramm JUMO) aufgezeichnet, können

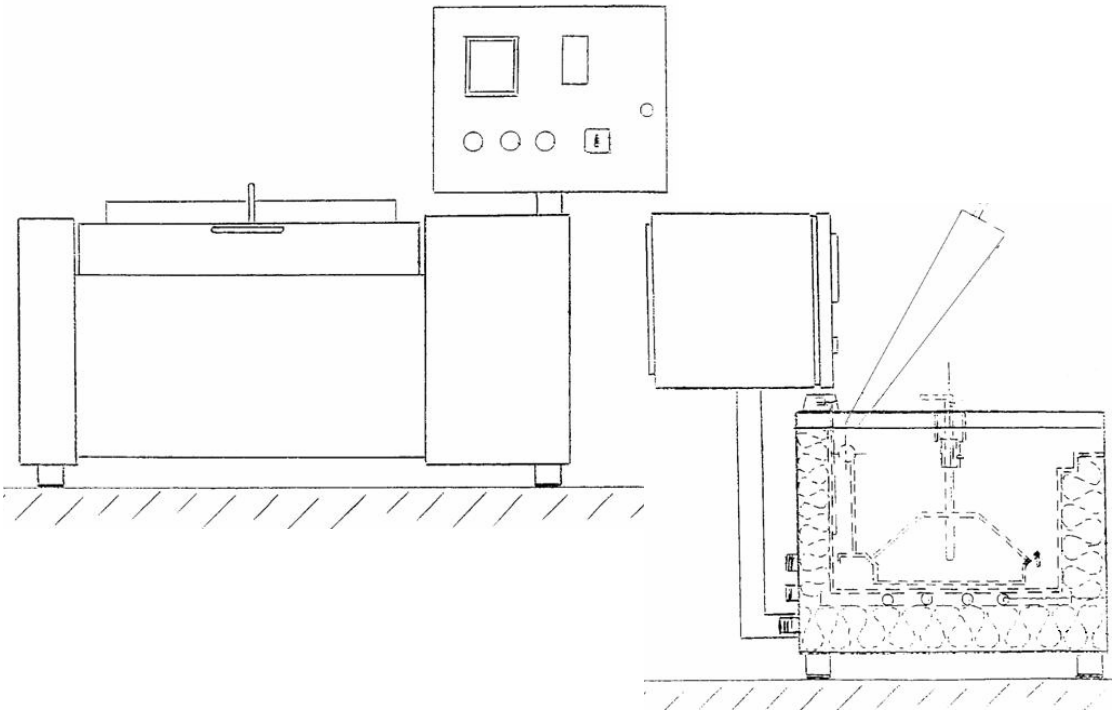
anschließend in den PC eingelesen werden. Für einen schnelleren Zugriff wurde ein Konzept gewählt, das auf einer Datenarchivierung mit Software-gesteuerter Auswertung beruht. Die Messdaten können in verschiedenen Modie gespeichert und nach Bedarf wieder abgerufen werden.

2.2.3.2. Langzeithitzepasteurisierung (62,5 °C, 30 Minuten, Holder)

Dieses altbekannte und kommerziell verfügbare Verfahren dient der Langzeithitzepasteurisierung von Muttermilch. Dabei wird HCMV inaktiviert. Der Inaktivierungsvorgang läuft für eine Zeit von 30 Minuten bei einer Temperatur von 62,5 °C. Eine geringere Temperatur wie z.B. 56 °C reicht bei diesem Verfahren nicht aus, HCMV sicher zu inaktivieren (Welsh et al., 1979).
Die Maschine ist aus Edelstahl aufgebaut und bis zu 20 Flaschen mit Muttermilch können während einem Inaktivierungsvorgang bei diesem Verfahren bearbeitet werden. Das Gerät hat einen Warmwasser- bzw. Kaltwasserzufluss. Wird allerdings Kaltwasser anstatt Warmwasser verwendet, so muss mit einem längeren Aufheizvorgang gerechnet werden.
Über einen Wasserabfluss wird das Wasser wieder abgeleitet. Durch Start des Vorwärmprozesses mittels Magnetventil wird die Warmwasserzuleitung geöffnet und das Warmwasserbad wird bis zu einer bestimmten Grenze aufgefüllt. Die Erwärmung erfolgt durch eine Erhitzung bis zu einer Temperatur von 62,5 °C. Dieser Vorgang wird mit einem akustischen Signal und mit der blinkenden gelben Lampe signalisiert. Jetzt können die Milchfläschchen in die dafür vorgesehene Halterung gestellt werden. Beim Öffnen des Edelstahldeckels wird der Stromkreis unterbrochen und die Heizung wieder ausgeschaltet. Die Probeflasche muss nun noch mit Wasser gefüllt werden. Dabei sollte die Temperatur des Wassers möglichst die gleiche Temperatur wie die Milch betragen. Drückt man nun den Knopf „Pasteurisieren Ein“, so läuft folgender Vorgang automatisch ab: Der Wippmechanismus und die Heizung schalten ein. Bei Erreichen der Pasteurisierungstemperatur wird die 30-minütige Haltezeit gestartet. Während dieser Zeit wird die Temperatur konstant gehalten. Danach schaltet die Heizung aus und das Magnetventil öffnet sich, der Kaltwasserzufluss wird gestartet, der Kühlungsprozess aktiviert. Nach Ablauf

der Nachkühlzeit ertönt wieder ein akustisches Signal und die Lampe „Aus“ beginnt zu blinken. Drückt man diesen Ausschaltknopf, so wird der Behälter automatisch entleert. Jetzt kann man die Probefläschen wieder entnehmen.
Der ganze Prozess wird mit dem Prozessschreiber aufgezeichnet, was als Nachweiß für die ordnungsgemäße Pasteurisierung dient (LABU Muttermilchpasteur 20).

Abb. 6: Langzeithitzeinaktivierungsverfahren nach Holder (62,5 °C, 30 Min.)



2.2.3.3. Kurzzeitpasteurisierung von Muttermilch

Die Milch erhielten wir von stillenden Müttern Frühgeborener (Neonatologie der Universität Tübingen) oder von freiwilligen Milchspenderinnen reifgeborener Kinder.
Dabei handelte es sich entweder um frische Milch oder um eingefrorene, die bei –20 °C gelagert worden war. Für unsere Experimente bietet diese Form der Lagerung keine Nachteile, da alle Parameter, die wir untersuchen wollen, dadurch nicht beeinträchtigt werden.

Pro Versuch werden mindestens 40 ml Muttermilch benötigt. 20 ml dienen der Kontrolle und weitere 20 ml werden für den Inaktivierungsversuch verwendet. Der größte Teil der Versuchsreihen wird als Spiking-Experiment durchgeführt, d.h. zu der Muttermilch wird eine definierte Menge des kryokonservierten HCMV-Laborstammes hinzugefügt, wenn keine natürliche Infektiosität (bei seronegativer Mutter) vorliegt. Das Viruslysat (Lysat „B“ mit einer $TCID_{50/100\ \mu l}$ von $10^{-4.875}$) wird mit Handwärme aufgetaut und es wird eine Menge von jeweils 200 µl Viruslysat zu einem Vielfachen (n = 3-4) von jeweils 20 ml Muttermilch hinzugegeben. Damit wird in der Regel mit einer $TCID_{50}$ von $10^{-3.875}$/ml Nativmilch infiziert. Anschließend werden nun 20 ml der gespikten Muttermilch in einen 250 ml Rundkolben gegeben. Danach erfolgt für eine bestimmte Inkubationszeit und einer bestimmten vorher gewählten Maximaltemperatur die Inaktivierung. Im nächsten Schritt wird die Probe zusammen mit der Kontrolle mit Muttermilch, die nicht inaktiviert wurde,in ein 50-ml-Falcontube überführt und bei 600 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Man erhält dann die Fettschicht, die Molke und das Pellet, das aus Zellen besteht. Die Fettschicht und die Molke werden gemeinsam von den Zellen getrennt. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3200 g und Raumtemperatur für 10 Minuten. Dieser zweite Schritt dient dazu, Fett- und Molkeschicht voneinander zu trennen. Bei einigen Versuchen wurde die Fettschicht mitbearbeitet, d.h. um auch von diesem Teil der Milch das infektiöse Virus isolieren zu können. Hierzu wird das Fett in 2 ml PBS resuspendiert, es werden noch 2ml n-Hexan zur Extraktion hinzugefügt. Die Emulsion wird für fünf Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Man erhält dann eine wässrige Phase und eine Fettphase. Es wird jeweils ein Milliliter der wässrigen Phase bei 50000 g bei 4 °C für 60 Minuten in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Hamprecht et al., 2003).

Die verbleibende Molke wird durch einen 0,22-µm-Poren-Filter steril filtriert. Auch von dieser Fraktion werden jeweils ein Milliliter bei 50000 g bei 4 °C für 60 min in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus, Germany). Diese Zentrifuge ist idealerweise auf 4 °C vorgekühlt. Molke- und Fettfraktion werden vor Zentrifugation in ein Sarstedt-Schraubdeckelgefäß aliquotiert und das Gewicht wird dann auf zwei Stellen

hinter dem Komma austariert, da der Rotor #3331 sehr empfindlich auf etwaige Gewichtsschwankungen reagiert.

Die resultierenden Pellets werden nach Entfernung des Überstandes in 200 µl MEM resuspendiert und jeweils 50 µl davon werden für die Beimpfung eines Wells, der vier Stunden zuvor hergestellten, mit HFF inokulierten Mikrotiterplatte, verwendet. Anschließend erfolgt eine 30-inütige Inokulation bei Raumtemperatur und 400 g. Danach wird der Überstand abgenommen und mit 200 µl neuen MEM beimpft. Die Mikrotiterplatte wird dann bei 37 °C für 18 Stunden inkubiert. Danach kann der oben beschriebene kulturelle IE-Antigen-Immunperoxidasetest erfolgen. Möchte man nach erfolgtem Peroxidasetest die Viruslast der bearbeiteten Fettfraktion berechnen, so geht man nach folgender Formel vor: $(N_{\sum 1\text{-}4} \times 2)/V_{Milch}$ (ml). Die Molke- und Fettfraktion, die nicht zur Zentrifugation mittels Ultrazentrifuge benötigt wird, wird aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Diese Aliquots können im Weiteren dazu dienen, die Enzymaktivitäten der Alkalischen Phosphatase und Lipase aber auch sekretorisches IgA und Lysozym zu bestimmen.

2.2.4. Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgt im Zentrallabor des Universitäts-klinikums Tübingen.

Dieser Test der Firma Bayer® erfasst die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im menschlichem Serum und Plasma (ADVIA® 1650 Chemistry System). Die Alkalische Phosphatase (AP) hydrolysiert das Substrat PNPP (p-Nitrophenylphosphat); dabei entsteht p-Nitrophenol (und anorganisches Phosphat), welches eine gelbe Farbe aufweist. Dieser Farbumschlag entspricht der Aktivität der AP und kann spektrometrisch gemessen werden (Wellenlänge p-Nitrophenol: 410 nm).

$$\text{p-Nitrophenylphosphat} + H_2O \xrightarrow{AP} \text{p-Nitrophenol} + P_i$$

Um den ph-Wert zwischen 10,3 und 10,4 zu halten, wird der Puffer 2-amino-2-methyl-1 Proponal (AMP) verwendet. Außerdem werden zu dem AMP-Puffer

noch Magnesium- und Zinkionen hinzugefügt, um das Enzym zu aktivieren und zu stabilisieren. Die erwarteten Werte für Serum und Plasma liegen zwischen 25 U/l-100 U/L.

2.2.5. Aktivitätsbestimmung der Lipase

Dieser Test erfasst die Aktivität der Lipase in menschlichem Serum und Plasma (nach ADVIA® 1650). Diese Methode misst die Aktivität der Lipase im Serum und Plasma mit Hilfe der enzymatischen Reaktion, wobei Methylresorufin entsteht, welches anschließend spektrometrisch bestimmt werden kann. Diese Reaktion läuft wie folgt ab: aus dem Substrat DGGMR (1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin)ester) entsteht durch die enzymatische Reaktion der Lipase 1,2-o-dilauryl-rac-glycerol und der instabile Glutarylsäure-(6'-methyl resorufin) Ester. Das instabile Produkt zerfällt spontan in Glutarylsäure und Methylresorufin. Die Lipasereaktion ist proportional zu der Produktion von Methylresorufin.
In Vivo wird folgende enzymatische Reaktion von der Lipase katalysiert:

$$\text{Triglycerid} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Diglyceride} + \text{Fettsäure}$$

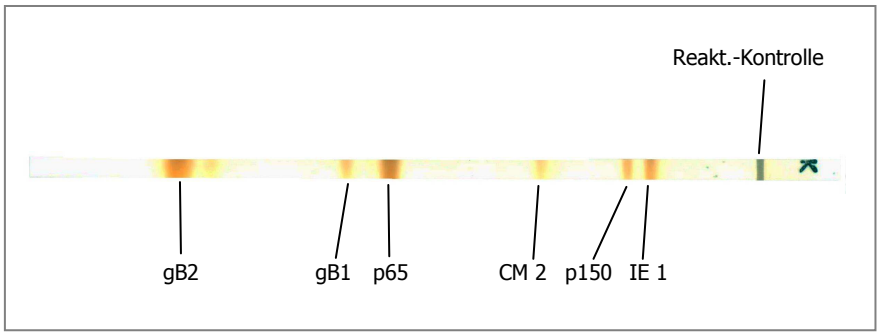
Die erwarteten Werte für Serum und Plasma liegen < 60 U/L.

2.2.6. Rekombinanter HCMV-IgG-Immunblot

Der recomBlot CMV ist ein qualitativer In-vitro-Test zum Nachweis und zur Simultanidentifizierung von phospho- und glykoproteinspezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern gegen das Cytomegalievirus in humanem Serum oder Plasma. Der Test erlaubt durch die elektrophoretische Auftrennung der Antigene, im Unterschied zu Enzymimmunoassays oder Spottests, eine Differenzierung von spezifischen Antikörpern. Das Screening auf HCMV-spezifische Antikörper erfolgt in der Regel mit Hilfe eines ELISAs. Allerdings ist nicht immer eine eindeutige, differenzierte Aussage über den Infektionsstatus (Primärinfektion/ Reaktivierung) möglich (HCMV-IgG-Immunblot, Mikrogen). Der recomBlot CMV bietet hier den Vorteil, dass Reaktivitäten gegen Einzelantigene nachgewiesen

werden können. In der frühen Phase einer Infektion findet man in der Regel Antikörper, die hauptsächlich gegen das Tegumentprotein p150 sowie Nicht-Struktur-Proteine (IE1, CM2, p65) gerichtet sind. Antikörper gegen Glykoprotein B (gB1 und gB2) tauchen erst 6-8 Wochen nach Erstinfektion auf. Bei Reaktivierung hingegen erfolgt ein simultaner Nachweis von glyko- und phosphoproteinspezifischen Antikörpern.

Abb. 7: Teststreifen - Rekombinanter HCMV-IgG-Imunblot



Durch die humorale Immunantwort ist häufig eine differenzierte Interpretation des HCMV-Infektionsstatus möglich. Für diesen speziellen Test werden die spezifischen Cytomegalievirus-Antigene IE1, p150, CM2, p65, gB1 und gB2 mit Hilfe rekombinanter E. coli-Zellen hergestellt. Die verwendeten gereinigten, rekombinanten Antigene werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die HCMV-Proteine werden dann elektophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western-Blotting). Die Membran wird anschließend zur Blockierung freier Bindungsstellen mit einer Proteinlösung inkubiert und gewaschen. Zum Nachweis von HCMV-spezifischen Antikörpern werden die Streifen mit der verdünnten Serumprobe inkubiert, wobei die Antikörper sich an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend abgewaschen und die Streifen in einer zweiten Inkubation mit anti-human-IgG bzw. anti-human-IgM inkubiert, das mit Meerettich-Peroxidase gekoppelt ist. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Reaktivität gegen eines der HCMV-Proteine gefunden wird, erscheint diese als dunkelblaue Bande auf dem

Streifen. Als interne Test-Kontrolle ist am oberen Ende der Streifen (unter der Nummer) eine Bande mit dem Anti-human-Immunglobulin aufgetragen, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.

Die Schwachpositiv-Kontrolle sollte bei jeder Bestimmung mitgeführt werden. Die mit den Schwachpositiv-Serumkontrollen inkubierten Teststreifen dienen als Cutoff und sollten nachfolgende Bandenmuster aufzeigen:
Es sollten folgende Banden zu sehen sein: Reaktions-Kontrolle, p150, weitere Banden können zusätzlich erscheinen. Anschließend werden die Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens mit durchsichtigem Klebeband oberhalb der Markierungslinie geklebt. Nun können an Hand der Schwachpositiv-Kontrolle die Bandenintensitäten bewertet und in den Auswertebogen eingetragen werden.
Damit die Auswertung überhaupt erfolgen kann, müssen die Antigenbanden deutlich erkennbar sein und die Hintergrundreaktion darf nicht zu stark sein.
Die Durchführung des Tests erfolgt nach den Angaben des Herstellers (HCMV-IgG-Immunblot, Mikrogen).

2.2.7. COBAS AMPLICOR CMV MONITOR TEST

Nach DNA-Extraktion der Proben wird die Ziel-DNA im Thermozykler amplifiziert. Das Reaktionsgemisch, welches sich in den A-Röhrchen befindet wird erhitzt, dadurch erfolgt die Denaturierung der Zielsequenzen. Bei Abkühlung des Reaktionsansatzes lagern sich die biotinylierten Primer (LC342 und LC832) an die Zielsequenz an. Eine thermostabile DNA-Polymerase (Thermus aquaticus DNA-Polymerase) verlängert in Gegenwart von Mg^{2+}-Ionen und überschüssiger Desoxynucleotidtriphosphate (Desoxyadenosin, Desoxy-guanosin, Desoxycytidin, Desoxyuridin) die angelagerten Primer entlang der Zielsequenzen und bildet das Amplifikat. Jeder Zyklus verdoppelt die Menge der Ziel-DNA in Form von Amplifikaten. Der COBAS AMPLICOR Analyzer führt die erforderliche Anzahl an Zyklen selbstständig durch.

Die Reihenverdünnung für Monitor-Tests wird folgendermaßen durchgeführt::

- Von der amplifizierten Probe wird je ein Aliquot in drei D-Küvetten pipettiert. Zur Detektion der unverdünnten Zielsequenz wird die erste der drei Küvetten benötigt. Die zweite dient zur Detektion des unverdünnten Quantifizierungsstandards. In die dritte Küvette wird Amplifikat-Verdünnungsreagenz pipettiert, um die erste Verdünnung durchzuführen.
- In zwei D-Küvetten pipettiert man von der ersten Verdünnung je ein Alliquot, welche zur Detektion der ersten Verdünnungen von Zielsequenz und Quantifizierungsstandard benötigt werden.
- Verdünnungen der Zielsequenz und des Quantifizierungsstandards können bei Bedarf durchgeführt werden.

Durch Waschzyklen der Transfernadel wird eine Probenkontamination verhindert.

Die in den Tests enthaltene AmpErase® bietet mit ihrem Enzym Uracil-N-Glykosylase (UNG) einen Schutz vor Probenkontamination durch Amplifikate. UNG katalysiert die enzymatische Zerstörung Desoxyuridin-haltiger, nicht aber Thymidinhaltiger DNA. In natürlich vorkommender DNA ist Desoxyuridin nicht enthalten, potentiell aber in kontaminierten PCR-Amplifikaten. Es stammt aus dem Master Mix, wo anstatt von Desoxyuridintriphosphat Thymidintriphosphat verwendet wird. Das Vorhandensein von Desoxyuridin in den Amplifikaten macht kontaminierte Amplifikate einer Zerstörung durch AmpErase möglich, bevor die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgt.

Nach Gabe eines Alliquots in die D-Küvette wird dazu ein testspezifisches Reagenz gegeben. Die Nachweisreaktion besteht aus drei Inkubationsschritten:

- Hybridisierung: Dies stellt die Bindung von Amplifikaten an komplementärer einzelsträngiger DNA-Fang-Sonde (Nukleinsäuresonden der pol-Region), die an magnetische Mikropartikel gebunden ist, dar.
- Konjugation: Nach erfolgter Auswaschung ungebundenen Materials, bindet die Avidin-Meerrettich-Peroxidase (Av-HRP) an die während der PCR gebildeten biotinylierten Amplifikate.

- Substratkatalyse: Tetramethylbenzidin-Substrat wird durch Meerettich-Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert. Das erzeugte Farbsignal wird photometrisch bestimmt (COBAS AMPLICOR Analyser).

Die Extinktion des Detektionsansatzes und des Leerwertes wird im Photometer gemessen. Der ungefilterte Lichtstrahl wird durch eine Sammellinse und der resultierende Strahl durch die D-Küvette geleitet. Die Intensität des durch die D-Küvette und ihrem Inhalt durchgelassenen Lichtes wird auf der gegenüberliegenden Seite von einer Si-Photodiode gemessen.
Die optische Dichte wird aus der Intensität der Lichttransmission durch die D-Küvette und die Probe und der Intensität der Lichttransmission ohne D-Küvette nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Optische Dichte}_{\text{Probe}} = -\log \frac{\text{Intensität}_{\text{D-Küvette (gesamt)}}}{\text{Intensität}_{\text{Luft (gesamt)}}}$$

wobei Intensität D-Küvette (gesamt) = Lichtintensität durch die D-Küvette und Intensität Luft (gesamt) = Lichtintensität für Luft. Die mit inkubiertem Substrat gemessene optische Dichte des Leerwerts wird von der optischen Dichte des Reaktionsansatzes subtrahiert (COBAS AMPLICOR Analyser).

3. Ergebnisse

3.1. Inaktivierung der Muttermilch und Fraktionierung; Übersicht

Zur Inaktivierung wurde sowohl seropositive als auch seronegative Muttermilch verwendet. Zur Inaktivierung seronegativer Muttermilch wurde diese mit dem Laborstamm AD169 artifiziell infiziert (Spiking). Insgesamt wurden 51 verschiedene seronegative und sieben seropositive Muttermilchproben untersucht. Diese 51 seronegativen Proben stammten von 33 unterschiedlichen Spenderinnen; die sieben seropositiven Proben stammten von vier unterschiedlichen stillenden Müttern. Der Zeitraum der Untersuchung erstreckte sich vom 28.1.03-23.2.04.

In beiden Fällen wurde eine Inaktivierung mit dem Kurzzeithitze-Pasteurisierungsverfahren durchgeführt. Der für diesen Vorgang verwendete nicht kommerzielle Prototyp war von der Firma Lauf in Tübingen speziell für die Inaktivierungsversuche in unserer Abteilung konstruiert worden. Wie schon in 2.10.1. beschrieben wird der Rundkolben bei Start des Gerätes in Rotation versetzt, wodurch an der Innenwand ein Milchfilm generiert wird, der die geometrische Form einer Halbhohlkugel beschreibt. Während des Inaktivierungsvorgangs verbleibt die zu behandelnde Probe in der Temperierkammer und erreicht durch den Einstrom von Heißluft (hot air stream) die gewünschte Temperatur. Durch einen kalten Wasserstrahl (8 °C) auf die rotierende Kolbenoberfläche wird die Milch wieder abgekühlt. Der Prototyp ist auf ein Milchvolumen von 20 ml ausgelegt. Folgende Faktoren bestimmen den Erfolg des raschen Temperaturausgleichs im Reaktionsgefäß:

- $V_{\text{Rundkolben (ml)}}$
- $V_{\text{Milchprobe (ml)}}$
- Rotationsgeschwindigkeit (U/min)

Nur die Feinabstimmung dieser drei Parameter garantiert die Ausbildung eines Milchfilms, der einerseits nicht reißt und andererseits maximal dünn ist. Dies wiederum ist die absolute Voraussetzung für eine schnellstmögliche Temperaturadaptation.

Nach Inaktivierung erfolgt die weitere Aufarbeitung und Fraktionierung der Muttermilch. Nach Zentrifugation und Sterilfiltration erhält man die zellfreie Fraktion der Molke.

Eine Mikrotiterplatte wird anschließend zur Bestimmung der Infektiosität in der Viruskultur mit dieser Molkefraktion beimpft.

Die nicht benötigten Aliquots der Molkefraktion werden zur Enzymbestimmung der Alkalischen Phosphatase und Lipase herangezogen.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität dieser beiden Markerenzyme nach erfolgter Inaktivierung untersucht und gleichzeitig die Kurzzeithitzepasteurisierung mit dem Holder-Verfahren verglichen.

Zu Beginn der Untersuchung wurden unterschiedliche Maximaltemperaturen und Inkubationsdauern des Kurzzeithitzepasteurisierungsverfahrens untersucht. Bezüglich der Dauer der Inkubation sind als Erstes diejenigen aufgeführt, die weniger bzw. mehr als fünf Sekunden betragen.

Abb. 8: Prinzip der Kurzzeithitzepasteurisierung

Konstruiert nach Klaus Lauf, Tübingen. Durch Rotation des Kolbens wird an der Innenwand ein Milchfilm generiert. Hier ist der rotierende Rundkolben vor dem Eintauchen in die Temperierkammer dargestellt.

3.2. Temperaturzeitevaluierung

In den folgenden Tabellen sind die jeweiligen Maximaltemperaturen bei unterschiedlichen Inkubationsdauern (Sekunden) aufgeführt. Gleichzeitig sind die Aktivitäten der AP und Lipase dargestellt.

3.2.1. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C

Es wurde in diesem Experiment eine Maximaltemperatur von 72 °C und eine Inkubationsdauer von 2 Sekunden gewählt. Es wurden neun Proben mittels Spiking-Experiment untersucht.

Tab. 5: Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C

ExpNr = Experimentnummer; K (N_{IEA}+/ml Molke) = in der Kontrolle detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; P (N_{IEA}/ml Molke) = in der Probe detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; AP-K (U/L) = AP-Aktivität in der Kontrolle; AP-P(U/L) = AP-Aktivität in der Probe; Lipase-K (U/L) = Lipase-Aktivität in der Kontrolle; Lipase-P (U/L) = Lipase-Aktivität in der Probe; Lipase-Akt. in % = Lipase-Aktivität in Prozent

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
72° und 2sec	44	2155	0	100,00	27	1	3,70	989	10	1,01
72° und 2sec	46	7352	0	100,00	14	1	7,14	74	3	4,05
72° und 2sec	49	1552	0	100,00	26	1	3,85	2240	30	1,34
72° und 2sec	52	1121	0	100,00	39	1	2,56	3617	52	1,44
72° und 2sec	64	1330	0	100,00	17	1	5,88	56	5	8,93
72° und 2sec	65	1320	0	100,00	19	1	5,26	59	3	5,08
72° und 2sec	66	439	0	100,00	21	1	4,76	61	5	8,20
72° und 2sec	68	1260	0	100,00	23	1	4,35	59	4	6,78
72° und 2sec	71	1768	0	100,00	23	1	4,35	435	10	2,30

Interpretation:

Virusinaktivierung: Hier zeigt sich, dass in der Kultur keine infizierten Kerne mehr vorhanden sind. Es hat eine Inaktivierung von 100% stattgefunden. Selbst wenn in der Kontrolle 7352 Kerne nachzuweisen waren, konnten nach dem Inaktivierungsvorgang keine infizierten Kerne mehr detektiert werden.

Enzymaktivitäten: Betrachtet man die Aktivität der AP, so ist nach erfolgter Inaktivierung lediglich 1U/L enthalten. Dies bedeutet, dass in den untersuchten Proben lediglich eine Aktivität im Bereich von 2,56-7,14% bezüglich der Kontrolle vorhanden ist. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,01-8,93% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.2. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C

Es wurde in diesem Experiment eine Maximaltemperatur von 65 °C und eine Inkubationsdauer von 2 Sekunden gewählt. Es wurden sieben Proben mittels Spiking-Experiment untersucht.

Tab. 6: Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
65° und 2 sec	44	2155	0	100,00	27	4	14,81	989	14	1,42
65° und 2 sec	64	1330	0	100,00	17	1	5,88	56	4	7,14
65° und 2 sec	65	1320	0	100,00	19	1	5,26	59	3	5,08
65° und 2 sec	66	439	0	100,00	21	1	4,76	61	4	6,56
65° und 2 sec	68	1260	0	100,00	23	3	13,04	59	7	11,86
65° und 2 sec	71	1768	0	100,00	23	1	4,35	435	6	1,38
65° und 2 sec	77	457	1	99,78	36	1	2,78	204	7	3,43

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 2 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 65 °C in sechs der sieben untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden. Dies bedeutet, dass bei diesen Proben eine 100%ige Inaktivierung stattgefunden hat. Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung noch ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,78% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 2,78-14,81% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,38-11,86% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.3. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 63 °C

Inkubationsdauer: 2 Sekunden

Tab. 7: Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
63° und 2 sec	44	2155	0	100,00	27	13	48,15	989	17	1,72
63° und 2 sec	46	7352	0	100,00	14	6	42,86	74	5	6,76
63° und 2 sec	68	1260	0	100,00	23	12	52,17	59	6	10,17
63° und 2 sec	81	999	0	100,00	16	9	56,25	228	14	6,14
63° und 2 sec	82	573	0	100,00	18	8	44,44	187	10	5,35

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren bei keiner der fünf untersuchten Proben mehr infizierte Kerne nach erfolgter Virusinaktivierung nachzuweisen (100%ige Inaktivierung).

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 42,86-56,25% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,72-10,17 % bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.4. Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 63 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 63 °C

Inkubationsdauer: 1 Sekunde

Tab. 8: Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 63 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
63° und 1 sec	77	457	0	100,00	36	2	5,56	204	9	4,41
63° und 1 sec	78	202	0	100,00	13	8	61,54	186	8	4,30
63° und 1 sec	80	1386	1	99,93	22	8	36,36	132	8	6,06
63° und 1 sec	81	999	1	99,90	16	8	50,00	228	13	5,70
63° und 1 sec	82	573	0	100,00	18	7	38,89	187	9	4,81
63° und 1 sec	83	1737	0	100,00	20	7	35,00	182	7	3,85

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 1 Sekunde und einer Inaktivierungstemperatur von 63 °C in vier der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei zwei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden. Dies bedeutet jeweils ein Inaktivierungserfolg von 99,90% bzw. 99,93% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 5,56-61,54% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 3,85-6,06% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.5. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 62 °C

Inkubationsdauer: 2 Sekunden

Tab. 9: Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
62° und 2 sec	44	2155	1	99,95	27	19	70,37	989	23	2,33
62° und 2 sec	46	7352	1	99,99	14	11	78,57	74	5	6,76
62° und 2 sec	49	1552	0	100,00	26	7	26,92	2240	32	1,43
62° und 2 sec	52	1121	0	100,00	39	21	53,85	3617	67	1,85
62° und 2 sec	53	383	0	100,00	37	15	40,54	178	18	10,11
62° und 2 sec	64	1330	0	100,00	17	10	58,82	56	5	8,93
62° und 2 sec	65	1320	0	100,00	19	10	52,63	59	3	5,08
62° und 2 sec	66	439	0	100,00	21	13	61,90	61	4	6,56
62° und 2 sec	68	1260	1	99,92	23	8	34,78	59	6	10,17

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 2 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 62 °C in sechs der neun untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei drei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung noch ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden. Dies bedeutet immerhin ein Inaktivierungserfolg von 99,92-99,99% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 26,92-78,57% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,43-10,17% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.6. Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 62 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 62 °C

Inkubationsdauer: 1 Sekunde

Tab. 10: Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 62 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
62° und 1 sec	45	4213	0	100,00	26	24	92,31	1436	26	1,81
62° und 1 sec	49	1552	0	100,00	26	9	34,62	2240	37	1,65
62° und 1 sec	52	1121	0	100,00	39	19	48,72	3617	58	1,60
62° und 1 sec	55	839	0	100,00	26	17	65,38	3207	67	2,09
62° und 1 sec	64	1330	0	100,00	17	5	29,41	56	3	5,36
62° und 1 sec	65	1320	0	100,00	19	19	100,00	59	4	6,78
62° und 1 sec	66	439	0	100,00	21	13	61,90	61	4	6,56
62° und 1 sec	68	1260	0	100,00	23	13	56,52	59	6	10,17
62° und 1 sec	69	4725	6	99,87	28	10	35,71	253	5	1,98
62° und 1 sec	71	1768	2	99,89	23	9	39,13	435	12	2,76
62° und 1 sec	80	1386	2	99,86	22	20	90,91	132	14	10,61
62° und 1 sec	83	1737	0	100,00	20	10	50,00	182	20	10,99
62° und 1 sec	84	1122	0	100,00	25	12	48,00	97	12	12,37

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 1 Sekunde und einer Inaktivierungstemperatur von 62 °C in 10 der 13 untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung sechs infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden und bei zwei weiteren Versuchen waren lediglich noch zwei infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet jeweils ein Inaktivierungserfolg von 99,87% und von 99,86% bzw. von 99,89% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in 12 der untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 29,41-92,31 % bezüglich der Kontrolle. Bei einer Probe konnte eine Aktivität von 100% bezogen auf die Kontrolle erreicht werden. Durch die gewählte Maximaltemperatur ließ sich also ein Anstieg der Aktivität der AP auf den Ausgangswert erreichen.

Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,60-12,37 % bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.7. Inkubationsdauer 9 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer 9 Sekunden

Tab. 11: Inkubationsdauer 9 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 9 sec	52	1121	1	99,91	39	19	48,72	3617	60	1,66
61° und 9 sec	61	1398	0	100,00	50	38	76,00	84	7	8,33
61° und 9 sec	64	1330	0	100,00	17	8	47,06	56	3	5,36
61° und 9 sec	65	1320	0	100,00	19	12	63,16	59	4	6,78
61° und 9 sec	66	439	0	100,00	21	19	90,48	61	3	4,92
61° und 9 sec	68	1260	1	99,92	23	17	73,91	59	4	6,78

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 9 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61 °C in vier der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei zwei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden, was einem Inaktivierungserfolg von 99,91 bzw. 99,92% der Kontrolle entspricht.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 47,06-90,48% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,66-8,33% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.8. Inkubationsdauer 8 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer: 8 Sekunden

Tab. 12: Inkubationsdauer 8 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 8 sec	64	1330	0	100,00	17	5	29,41	56	4	7,14
61° und 8 sec	65	1320	7	99,47	19	11	57,89	59	3	5,08
61° und 8 sec	66	439	0	100,00	21	21	100,00	61	4	6,56
61° und 8 sec	68	1260	0	100,00	23	14	60,87	59	5	8,47
61° und 8 sec	77	457	1	99,78	36	9	25,00	204	8	3,92
61° und 8 sec	81	999	0	100,00	16	12	75,00	228	19	8,33

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 8 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61°C in vier der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung sieben infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden und bei einem weiteren Versuch war noch ein infizierter Kern in der Kultur enthalten. Dies bedeutet jeweils ein Inaktivierungserfolg von 99,47% bzw. 99,78% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in fünf der untersuchten sechs Proben eine Aktivität im Bereich von 25,00-75,00 % bezüglich der Kontrolle. Bei einer Probe konnte die Aktivität bezüglich der Kontrolle zu 100% erhalten bleiben. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 3,92-8,47% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.9. Inkubationsdauer 7 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer: 7 Sekunden

Tab. 13: Inkubationsdauer 7 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 7 sec	55	839	0	100,00	26	19	73,08	3207	58	1,81
61° und 7 sec	61	1398	0	100,00	50	32	64,00	84	7	8,33
61° und 7 sec	64	1330	0	100,00	17	3	17,65	56	7	12,50
61° und 7 sec	65	1320	3	99,77	19	9	47,37	59	5	8,47
61° und 7 sec	66	439	10	97,72	21	23	109,52	61	7	11,48
61° und 7 sec	68	1260	0	100,00	23	10	43,48	50	3	6,00

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 7 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61°C in vier der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung zehn infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden und bei einem weiteren Versuch waren noch drei infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet jeweils ein Inaktivierungserfolg von 97,72 bzw. 99,77% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in fünf der sechs untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 17,65-73,08% bezüglich der Kontrolle. Bei einer Probe wurde eine Aktivität von 109,52% der Kontrolle beobachtet. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,81-12,50% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.10. Inkubationsdauer 6 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer: 6 Sekunden

Tab. 14: Inkubationsdauer 6 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 6 sec	52	1121	1	99,91	39	14	35,90	3617	45	1,24
61° und 6 sec	55	839	0	100,00	26	15	57,69	3207	57	1,78
61° und 6 sec	61	1398	1	99,93	50	27	54,00	84	6	7,14
61° und 6 sec	64	1330	0	100,00	17	13	76,47	56	5	8,93
61° und 6 sec	65	1320	10	99,24	19	13	68,42	59	6	10,17
61° und 6 sec	68	1260	1	99,92	23	15	65,22	59	6	10,17

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 6 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61 °C in zwei der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung zehn infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden, was einem Inaktivierungserfolg von 99,24% entspricht. Bei drei weiteren Versuchen war lediglich noch ein infizierter Kern in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,91-99,93% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 35,90-76,47% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,24-10,17% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.11. Inkubationsdauer 3 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer: 3 Sekunden

Tab. 15: Inkubationsdauer 3 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 3 sec	52	1121	0	100,00	39	17	43,59	3617	71	1,96
61° und 3 sec	56	508	1	99,80	15	7	46,67	1597	120	7,51
61° und 3 sec	57	377	0	100,00	7	9	128,57	1303	153	11,74
61° und 3 sec	58	4503	2	99,96	17	11	64,71	1111	73	6,57
61° und 3 sec	59	1779	5	99,72	18	9	50,00	660	53	8,03
61° und 3 sec	68	1260	0	100,00	23	28	121,74	59	3	5,08

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 3 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61 °C in drei der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,80% der Kontrolle. Bei einem Versuch waren noch fünf infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,72% der

Kontrolle bezogen und bei einem Versuch waren zwei Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten, was einem Inaktivierungserfolg von 99,96% der Kontrolle entspricht.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in vier von den untersuchten sechs Proben eine Aktivität im Bereich von 43,59-64,71% bezüglich der Kontrolle. In zwei Fällen wurde eine Aktivität von 121,74 bzw. 128,57% der Kontrolle beobachtet. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,96-11,74 % bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.12. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer: 2 Sekunden

Tab. 16: Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 2 sec	44	2155	0	100,00	27	25	92,59	989	30	3,03
61° und 2 sec	55	839	0	100,00	26	14	53,85	3207	62	1,93
61° und 2 sec	77	457	0	100,00	36	8	22,22	204	14	6,86
61° und 2 sec	80	1386	0	100,00	22	14	63,64	132	19	14,39
61° und 2 sec	81	999	0	100,00	16	12	75,00	228	32	14,04
61° und 2 sec	83	1737	3	99,83	20	13	65,00	182	11	6,04

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 2 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61 °C in fünf der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnten nach Inaktivierung drei infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,83% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt eine Aktivität im Bereich von 22,22-92,59% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,93-14,39% bezüglich der Kontrolle auf.

3.2.13. Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 61 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 61 °C

Inkubationsdauer: 1 Sekunde

Tab. 17: Inkubationsdauer 1 Sekunde, Maximaltemperatur 61 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 1 sec	68	1260	0	100,00	23	11	47,83	59	3	5,08
61° und 1 sec	81	999	0	100,00	16	13	81,25	228	36	15,79
61° und 1 sec	82	573	1	99,83	18	15	83,33	187	44	23,53
61° und 1 sec	84	1122	2	99,82	25	6	24,00	97	8	8,25
61° und 1 sec	85	427	2	99,53	33	5	15,15	104	14	13,46
61° und 1 sec	86	522	2	99,62	8	9	112,50	326	37	11,35

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 1 Sekunde und einer Inaktivierungstemperatur von 61 °C in zwei der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,83% der Kontrolle. Bei drei Versuchen waren jeweils noch zwei infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,53-99,82% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in fünf untersuchten Fällen eine Aktivität von 15,15-83,33% bezüglich der Kontrolle. In einem Fall konnte eine AP-Aktivität von 112,50% der Kontrolle beobachtet werden. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 5,08-23,53% bezüglich der Kontrolle auf. Bei dieser Maximaltemperatur zeigt sich eine leichte Zunahme der Aktivität der Lipase.

3.2.14. Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C

Spiking-Experiment:

Maximaltemperatur: 60 °C

Inkubationsdauer: 2 Sekunden

Tab. 18: Inkubationsdauer 2 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{TEA}+ /ml Molke)	P (N_{TEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
60° und 2 sec	44	2155	0	100,00	27	31	114,81	989	48	4,85
60° und 2 sec	77	457	1	99,78	36	15	41,67	204	97	47,55
60° und 2 sec	80	1386	0	100,00	22	14	63,64	132	8	6,06
60° und 2 sec	81	999	1	99,90	16	15	93,75	228	49	21,49
60° und 2 sec	82	573	1	99,83	18	19	105,56	187	79	42,25
60° und 2 sec	83	1737	4	99,77	20	22	110,00	182	19	10,44

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 2 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 60 °C in zwei der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei drei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,78-99,90% der Kontrolle. Bei einem Versuch waren noch vier infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,77% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in drei der untersuchten sechs Fälle eine Aktivität im Bereich von 41,67-93,75% bezüglich der Kontrolle. In drei Fällen wurde eine Aktivität von 105,56-114,81% der Kontrolle beobachtet. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 4,85-47,55% bezüglich der Kontrolle auf.

3.3. Standardisierung der Kurzzeitvirusinaktivierung

3.3.1. Übersicht

In diesem Teil sind die Inaktivierungsnachweise bei einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden und bei jeweiliger Maximaltemperatur dargestellt sowie deren Einfluss auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und Lipase. Aus Gründen der Praktikabilität und der Darstellung wurden nur solche Inaktivierungsnachweise miteinander verglichen, die bei einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden durchgeführt worden waren. Auch hier wurden die Versuche wiederum als Spiking-Experimente durchgeführt. Es hat sich auch gezeigt, dass eine Inkubationsdauer von fünf Sekunden für die Durchführung der Kurzzeithitzepasteurisierung und insbesondere in Bezug auf die technische Realisierbarkeit als optimal gilt. Betrachtet man zudem den Inaktivierungserfolg, so zeigt sich, dass bei längerer Inkubationsdauer auch eine größere Wirksamkeit bezüglich der HCMV-Inaktivierung zu verzeichnen ist.

3.3.2. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C

Hier wurde eine Maximaltemperatur von 72 °C bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden gewählt. Für diese Zeit und Temperatur wurden insgesamt neun unterschiedliche Muttermilchproben mittels Spiking-Experiment untersucht.

Tab. 19: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 72 °C

ExpNr = Experimentnummer; K (N_{IEA}+/ml Molke) = in der Kontrolle detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; P (N_{IEA}/ml Molke) = in der Probe detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; AP-K (U/L) = AP-Aktivität in der Kontrolle; AP-P(U/L) = AP-Aktivität in der Probe; Lipase-K (U/L) = Lipase-Aktivität in der Kontrolle; Lipase-P (U/L) = Lipase-Aktivität in der Probe; Lipase-Akt. in % = Lipase-Aktivität in Prozent

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
72° und 5 sec	4	618	0	100,00	55	1	1,82	2245	22	0,98
72° und 5 sec	39	1024	0	100,00	10	1	10,00	2315	26	1,12
72° und 5 sec	40	304	0	100,00	41	1	2,44	2823	23	0,81
72° und 5 sec	41	293	0	100,00	9	1	11,11	1598	28	1,75
72° und 5 sec	42	1169	0	100,00	10	1	10,00	2479	21	0,85
72° und 5 sec	44	2155	0	100,00	27	1	3,70	989	12	1,21
72° und 5 sec	71	1768	0	100,00	23	1	4,35	435	9	2,07
72° und 5 sec	80	1386	0	100,00	22	1	4,55	132	1	0,76
72° und 5 sec	83	1737	0	100,00	20	1	5,00	182	9	4,95

Interpretation:

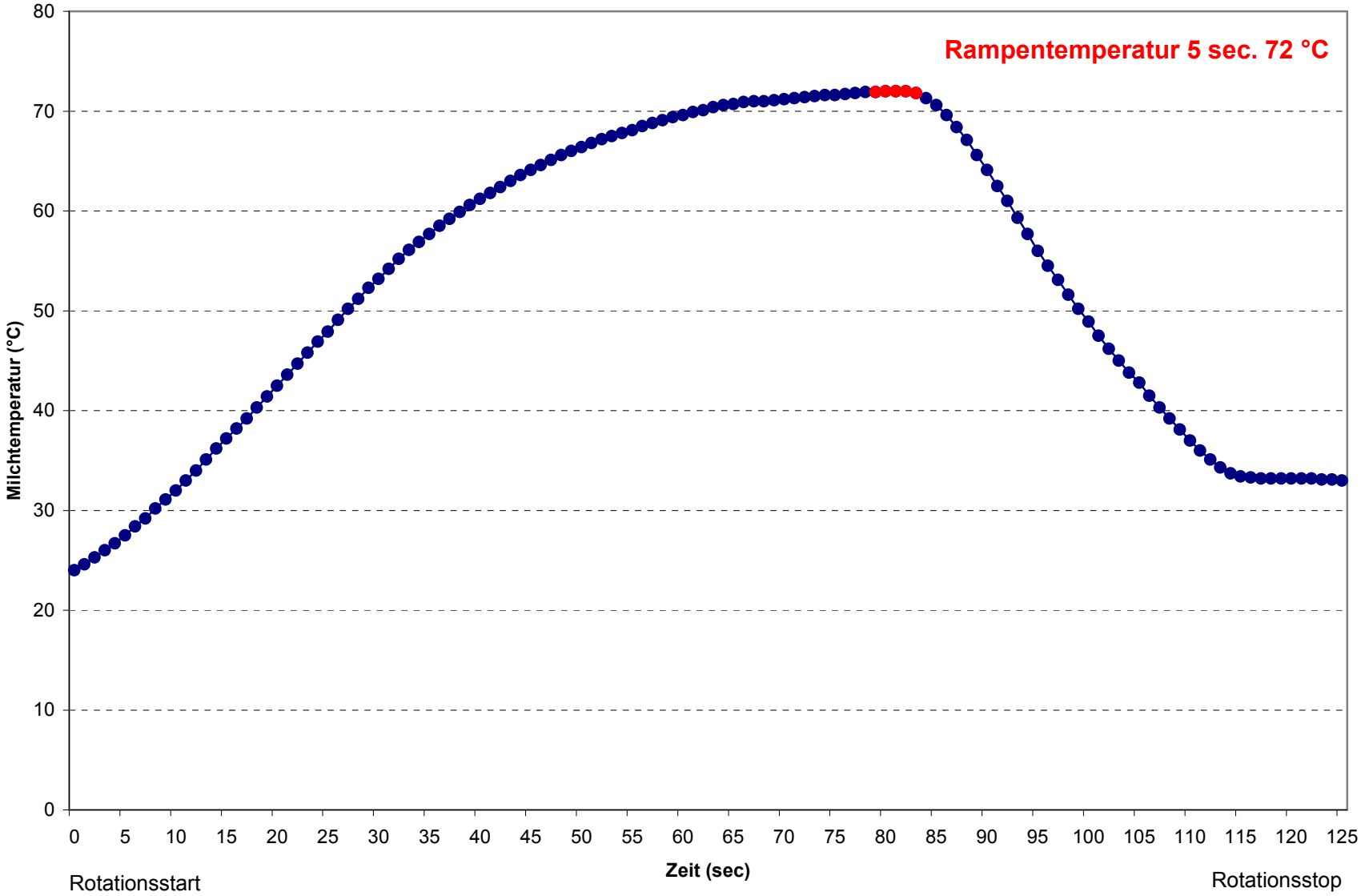
Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 72 °C keine infizierten Kerne mehr vorhanden. Dies bedeutet, dass eine 100%ige Inaktivierung stattgefunden hat.

Enzymaktivitäten: Betrachtet man die Aktivität der AP in den untersuchten Proben, so ist in allen untersuchten Fällen lediglich 1 U/L enthalten. Dies bedeutet jedoch, dass in den untersuchten Fällen eine Aktivität im Bereich von 1,82-11,11% bezüglich der Kontrolle vorhanden ist. Die Lipase zeigt in den untersuchten Fällen eine Aktivität im Bereich von 0,76-4,95% gegenüber der Kontrolle.

Abbildung 9 zeigt einen Temperaturverlauf der Kurzzeithitzepasteurisierung; aus der dargestellten Kurve wird Folgendes ersichtlich: Der Anstieg der Kurve zeigt die Aufheizphase an, wobei sich die Muttermilchprobe in der Temperierkammer befindet und durch einen heißen Luftstrom (hot air stream) auf der gewünschten Temperatur gehalten wird. Die rot dargestellte Linie zeigt die Rampentemperatur an, hier erfolgt die Inaktivierung. Der Abfall der Kurve zeigt den Abkühlungsvorgang durch Einstrom von Kühlwasser.

Bei allen weiteren untersuchten Maximaltemperaturen stellt sich der Kurvenverlauf ähnlich dar.

Abb. 9: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 72 °C



3.3.3. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 70 °C

Es wurde in diesem Experiment eine Maximaltemperatur von 70 °C und eine Inkubationsdauer von 5 Sekunden gewählt. Es wurden fünf Proben mittels Spiking-Experiment untersucht.

Tab. 20: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 70 °C

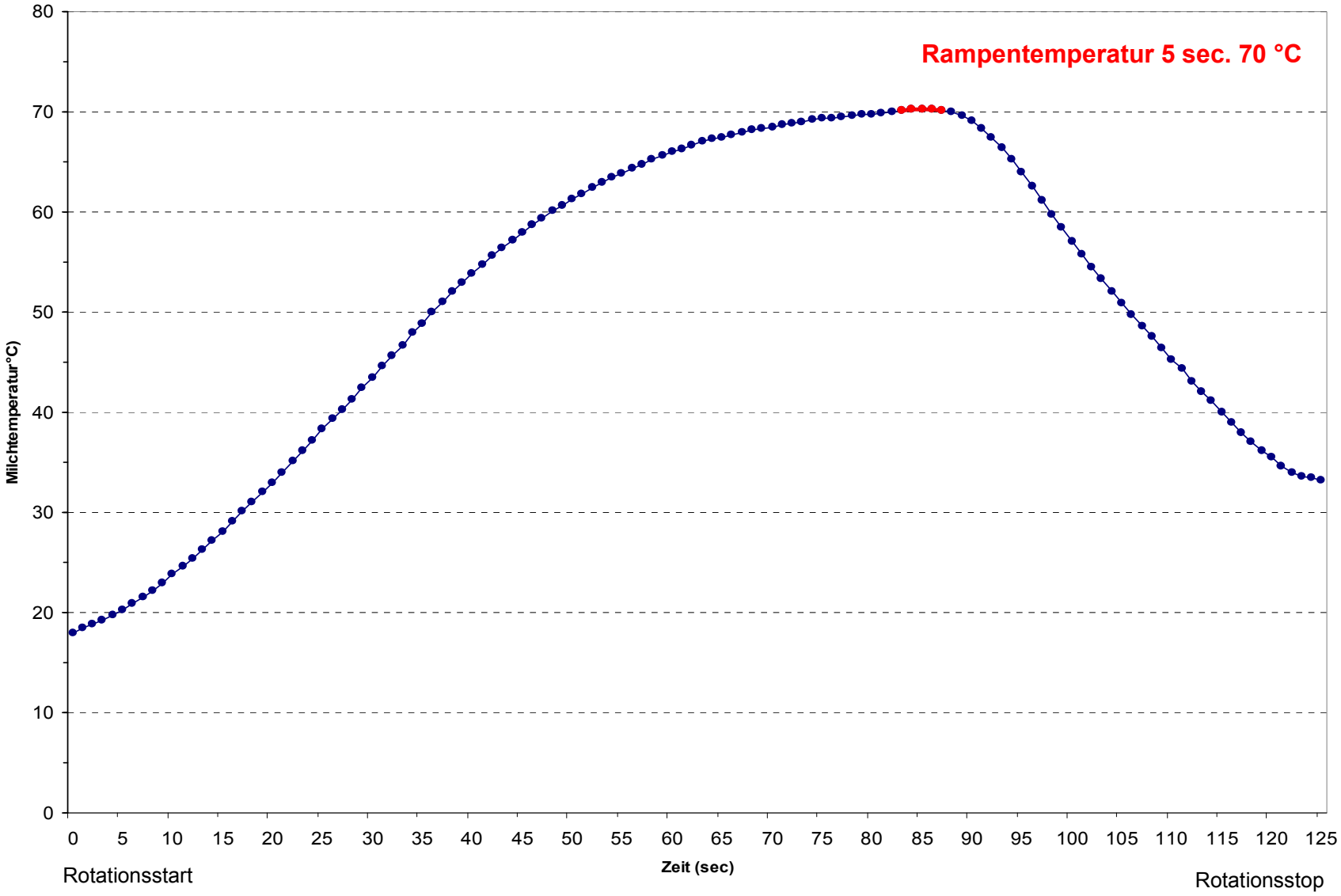
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
70° und 5 sec	86	522	0	100,00	8	1	12,50	326	10	3,07
70° und 5 sec	85	427	0	100,00	33	1	3,03	104	15	14,42
70° und 5 sec	84	1122	0	100,00	25	1	4,00	97	8	8,25
70° und 5 sec	82	573	0	100,00	18	1	5,56	187	6	3,21
70° und 5 sec	81	999	0	100,00	16	1	6,25	228	9	3,95

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 70 °C keine infizierten Kerne mehr vorhanden. Dies bedeutet, dass eine 100%ige Inaktivierung stattgefunden hat.

Enzymaktivitäten: Betrachtet man die Aktivität der AP in den untersuchten Proben, so ist in allen untersuchten Fällen lediglich wie in den oben beschriebenen Experimenten 1 U/L enthalten. Dies bedeutet, dass in den untersuchten Fällen eine Aktivität im Bereich von 3,03-12,50 % bezüglich der Kontrolle vorhanden ist. Die Lipase zeigt in den untersuchten Fällen eine Aktivität im Bereich von 3,07-14,42% gegenüber der Kontrolle.

Abb. 10: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 70 °C



3.3.4. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 66 °C

Es wurde in diesem Experiment eine Maximaltemperatur von 66 °C und eine Inkubationsdauer von 5 Sekunden gewählt. Es wurden sechs Proben mittels Spiking-Experiment untersucht.

Tab. 21: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 66 °C

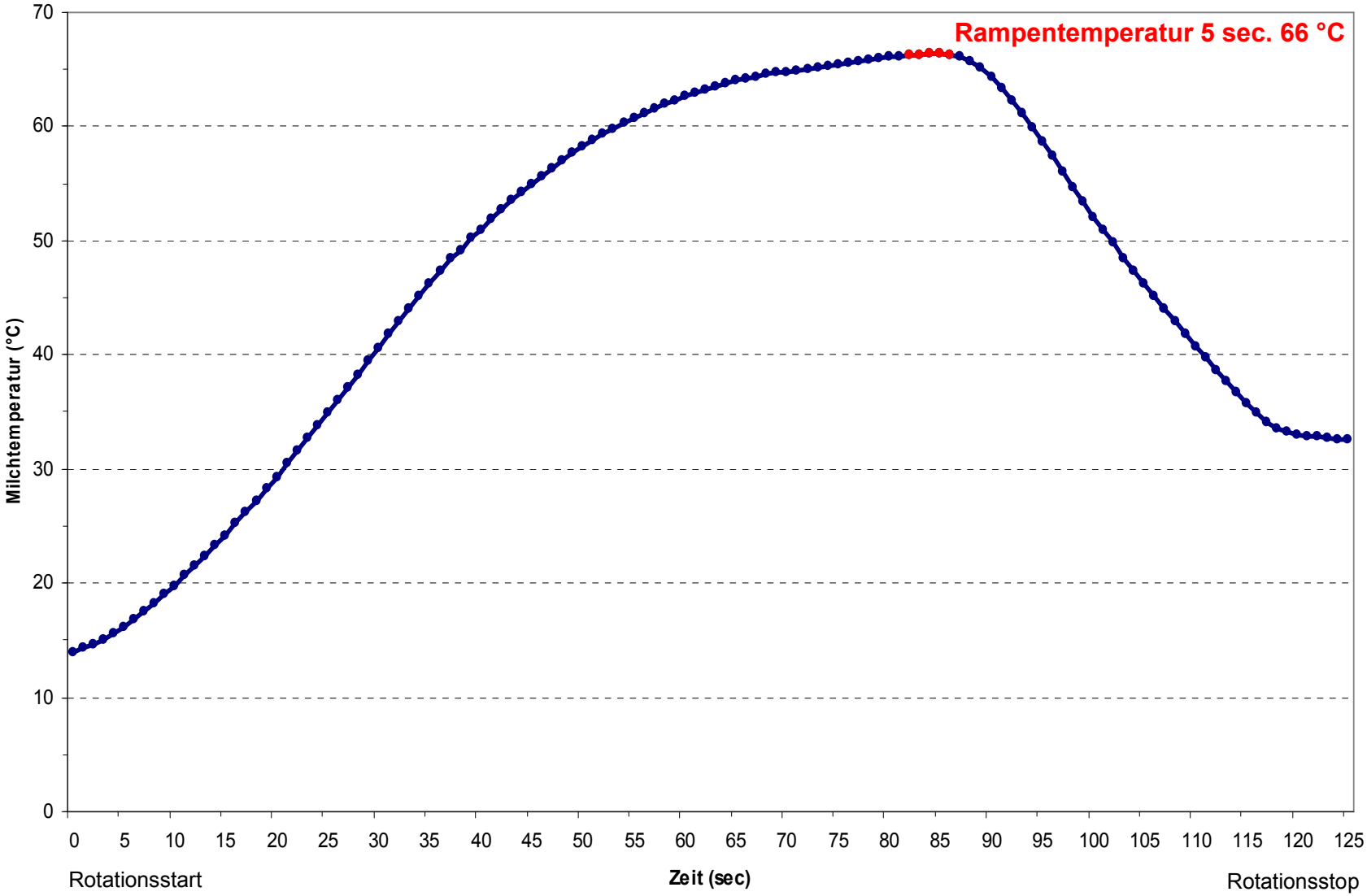
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
66° und 5 sec	4	618	0	100,00	55	6	10,91	2245	48	2,14
66° und 5 sec	81	999	0	100,00	16	1	6,25	228	12	5,26
66° und 5 sec	82	573	0	100,00	18	1	5,56	187	7	3,74
66° und 5 sec	84	1122	0	100,00	25	1	4,00	97	7	7,22
66° und 5 sec	85	427	0	100,00	33	1	3,03	104	11	10,58
66° und 5 sec	86	522	0	100,00	8	1	12,50	326	11	3,37

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 66 °C keine infizierten Kerne mehr vorhanden. Dies bedeutet wieder, dass eine 100%ige Inaktivierung stattgefunden hat.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in den untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 3,03-12,50 % bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 2,14-10,58% der Kontrolle auf.

Abb. 11: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 66 °C



3.3.5. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C

Es wurde in diesem Experiment eine Maximaltemperatur von 65°C und eine Inkubationsdauer von 5 Sekunden gewählt. Es wurden neun Proben mittels Spiking-Experiment untersucht.

Tab. 22: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 65 °C

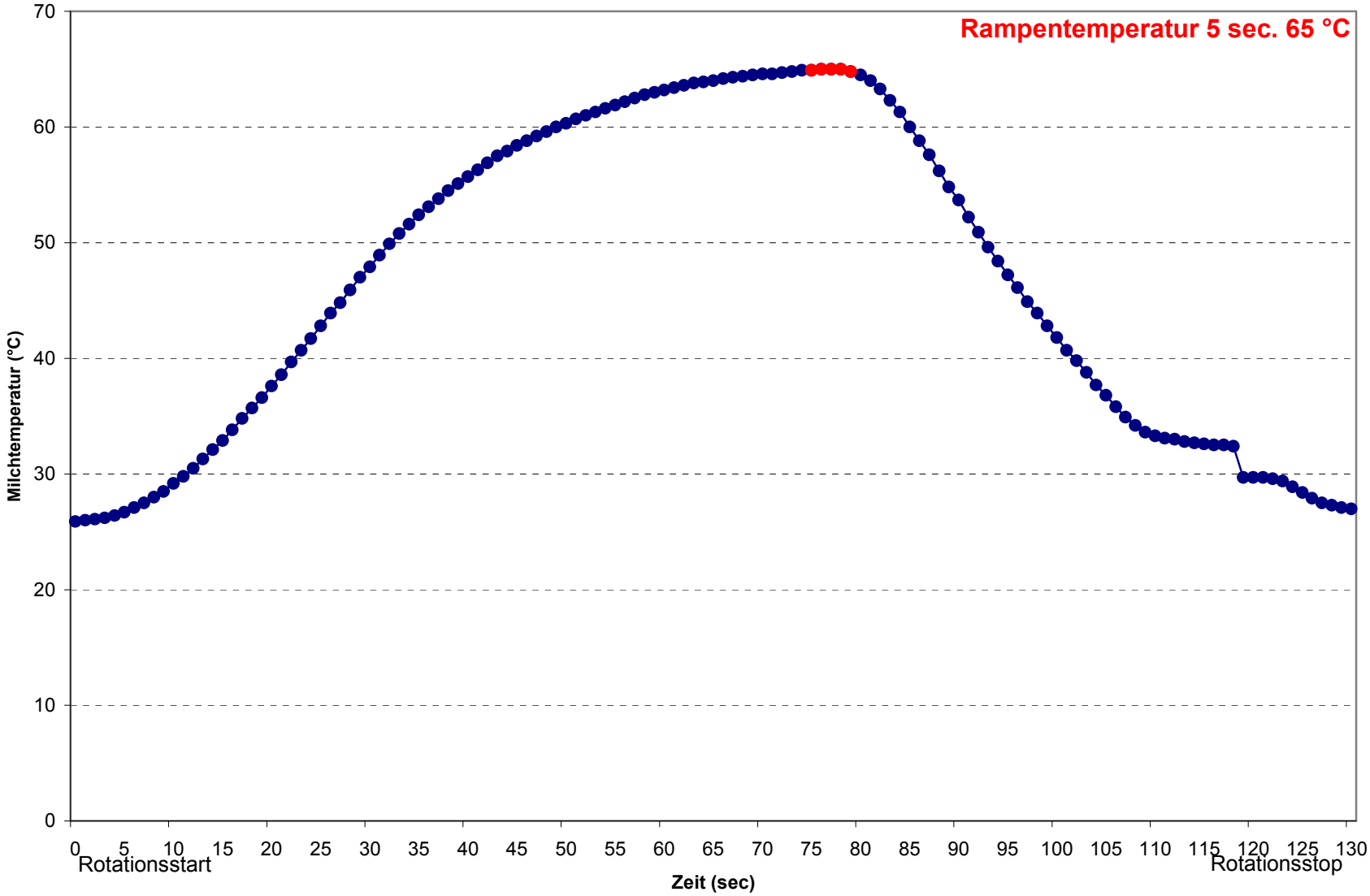
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
65° und 5 sec	2	487	0	100,00	13	4	30,77	120	15	12,50
65° und 5 sec	39	1024	1	99,90	10	1	10,00	2315	41	1,77
65° und 5 sec	40	304	0	100,00	41	1	2,44	2823	24	0,85
65° und 5 sec	41	293	0	100,00	9	1	11,11	1598	26	1,63
65° und 5 sec	42	1169	0	100,00	10	1	10,00	2479	33	1,33
65° und 5 sec	71	1768	0	100,00	23	1	4,35	435	11	2,53
65° und 5 sec	77	457	1	99,78	36	1	2,78	204	7	3,43
65° und 5 sec	80	1386	0	100,00	22	3	13,64	132	3	2,27
65° und 5 sec	83	1737	0	100,00	20	2	10,00	182	8	4,40

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 65 °C in sieben der neun untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden. Dies bedeutet, dass bei diesen Proben eine 100%ige Inaktivierung stattgefunden hat. Bei zwei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung jeweils noch ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden. Dies bedeutet, ein Inaktivierungserfolg von 99,78 bzw. 99,90% (ausgehend von der Kontrolle).

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in den untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 2,44-30,77 % bezüglich der Kontrolle. Somit lässt sich im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen schon ein leichter Anstieg der AP bemerken. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 0,85-12,50% der Kontrolle auf.

Abb. 12: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 65 °C



3.3.6. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 64 °C

Tab. 23: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 64 °C

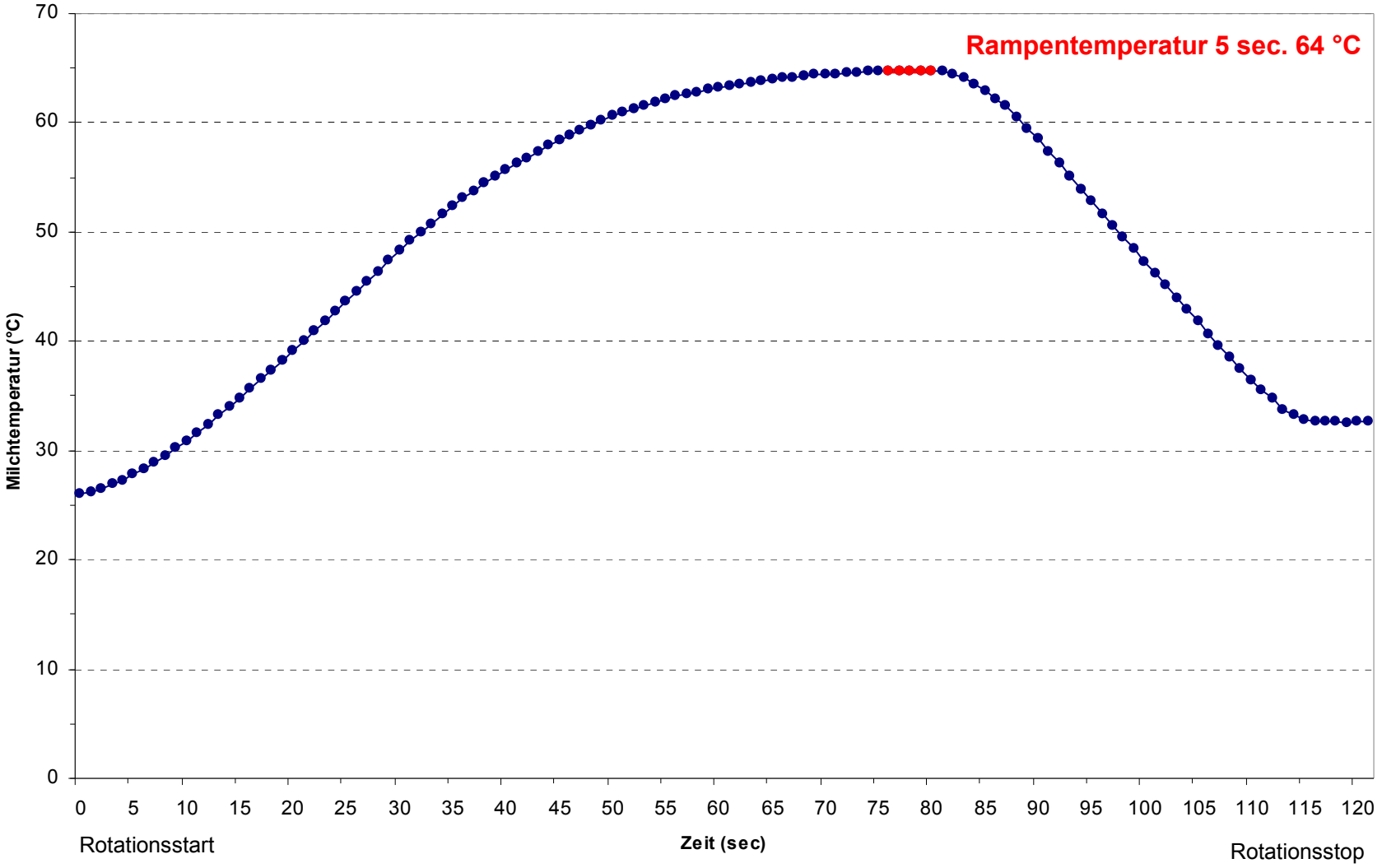
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
64° und 5 sec	4	618	0	100,00	55	19	34,55	2245	50	2,23
64° und 5 sec	26	465	0	100,00	88	39	44,32	2117	39	1,84
64° und 5 sec	27	388	0	100,00	18	6	33,33	1074	19	1,77
64° und 5 sec	77	457	1	99,78	36	10	27,78	204	10	4,90
64° und 5 sec	78	202	1	99,50	13	6	46,15	186	13	6,99

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 64 °C in drei der fünf untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden. Dies bedeutet, dass bei diesen Proben eine 100%ige Inaktivierung stattgefunden hat. Bei zwei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden. Dies bedeutet, ein Inaktivierungserfolg von 99,5 bzw. 99,78% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in den untersuchten Proben bereits eine Aktivität im Bereich von 27,78-46,15 % bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,77-6,99% der Kontrolle auf.

Abb. 13: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 64 °C



3.3.7. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C

Tab. 24: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 63 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
63° und 5 sec	31	1695	0	100,00	13	6	46,15	1793	26	1,45
63° und 5 sec	33	900	1	99,89	14	1	7,14	1082	33	3,05
63° und 5 sec	39	1024	1	99,90	10	1	10,00	2315	32	1,38
63° und 5 sec	41	293	0	100,00	9	1	11,11	1598	39	2,44
63° und 5 sec	42	1169	0	100,00	10	3	30,00	2479	37	1,49

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 63 °C in drei der fünf untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei zwei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden. Dies bedeutet, ein Inaktivierungserfolg von 99,89% bzw. 99,90% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in den untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 7,14-46,15 % bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität von 1,38-3,05% der Kontrolle auf.

3.3.8. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C

Tab. 25: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 62 °C

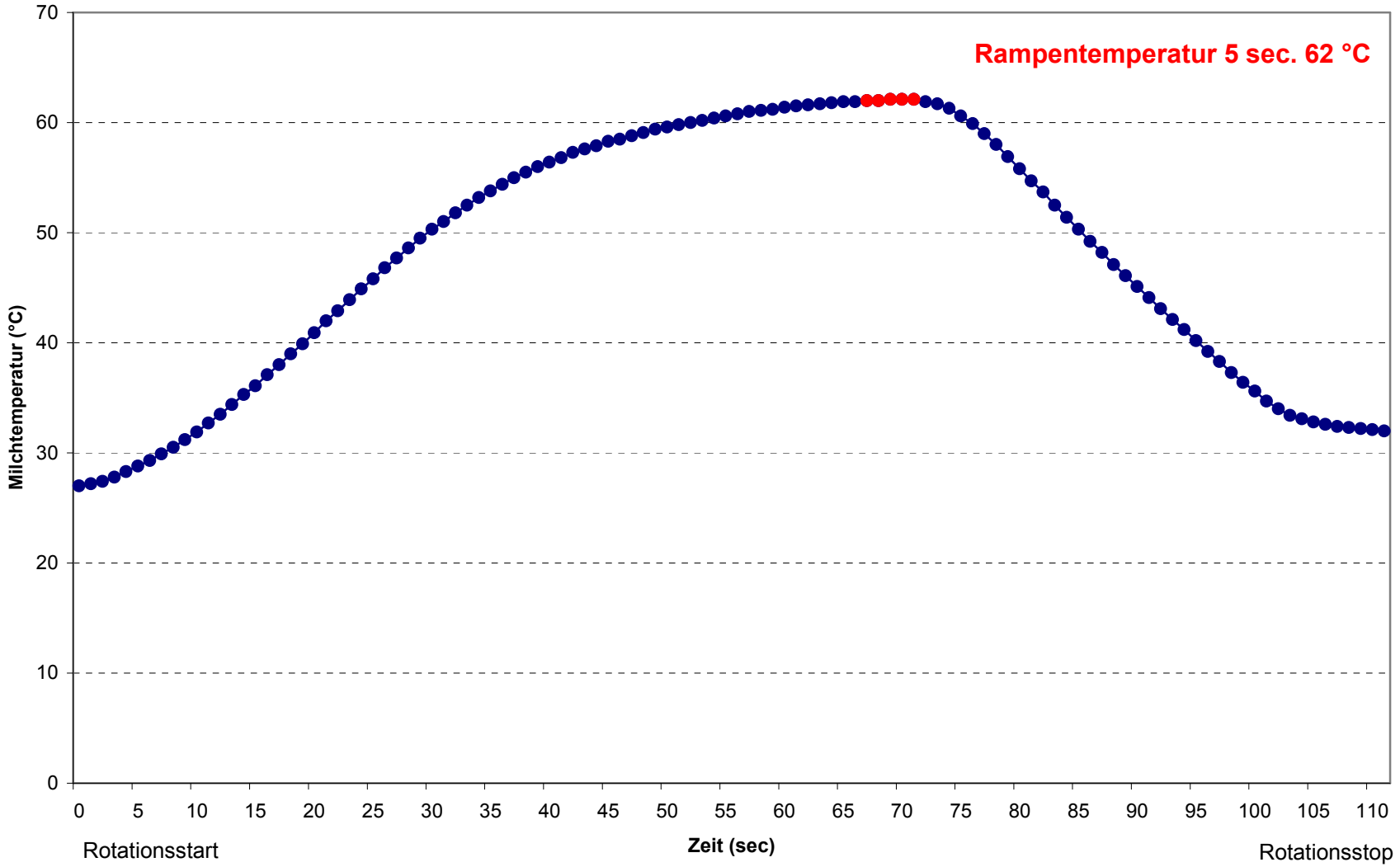
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
62° und 5 sec	4	618	0	100,00	55	39	70,91	2245	57	2,54
62° und 5 sec	7	190	0	100,00	15	5	33,33	3424	50	1,46
62° und 5 sec	8	378	0	100,00	80	73	91,25	1914	54	2,82
62° und 5 sec	16	1784	0	100,00	8	6	75,00	1364	65	4,77
62° und 5 sec	26	465	0	100,00	88	30	34,09	2117	36	1,70
62° und 5 sec	27	388	0	100,00	18	13	72,22	1074	62	5,77
62° und 5 sec	30	1658	0	100,00	38	28	73,68	1236	29	2,35
62° und 5 sec	31	1695	0	100,00	13	8	61,54	1793	27	1,51
62° und 5 sec	33	900	0	100,00	14	2	14,29	1082	37	3,42
62° und 5 sec	35	117	0	100,00	14	6	42,86	1351	28	2,07
62° und 5 sec	36	4050	0	100,00	27	6	22,22	1312	31	2,36
62° und 5 sec	42	1169	1	99,91	10	4	40,00	2479	29	1,17
62° und 5 sec	71	1768	3	99,83	23	9	39,13	435	8	1,84
62° und 5 sec	77	457	0	100,00	36	3	8,33	204	9	4,41

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 62 °C in 12 der 14 untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung drei infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden und bei einem weiteren Versuch war noch ein infizierter Kern in der Kultur enthalten. Dies bedeutet jeweils ein Inaktivierungserfolg von 99,83 bzw. 99,91% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in den untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 8,33-91,25 % bezüglich der Kontrolle. Bei dieser gewählten Maximaltemperatur steigt die Aktivität der AP nochmals an. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,17-5,77% der Kontrolle auf.

Abb. 14: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 62 °C



3.3.9. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

Tab. 26: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 61 °C

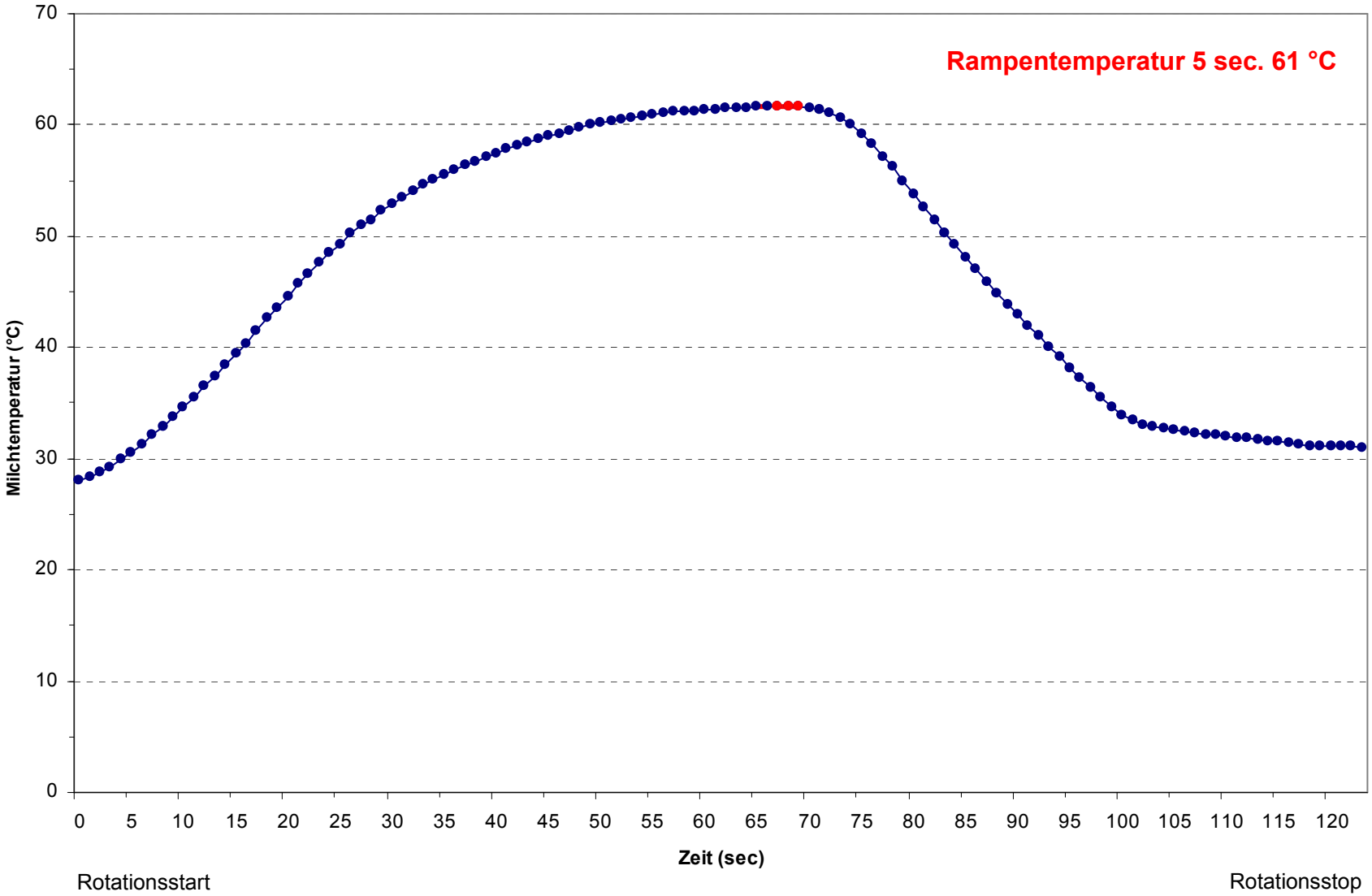
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
61° und 5 sec	31	1695	1	99,94	13	9	69,23	1793	28	1,56
61° und 5 sec	33	900	0	100,00	14	5	35,71	1082	42	3,88
61° und 5 sec	34	2058	0	100,00	48	9	18,75	48	6	12,50
61° und 5 sec	36	4050	1	99,98	27	14	51,85	1312	41	3,13
61° und 5 sec	37	752	0	100,00	20	20	100,00	1829	63	3,44
61° und 5 sec	39	1024	1	99,90	10	5	50,00	2315	47	2,03
61° und 5 sec	40	304	1	99,67	41	18	43,90	2823	48	1,70
61° und 5 sec	41	293	0	100,00	9	4	44,44	1598	29	1,81
61° und 5 sec	42	1169	1	99,91	10	6	60,00	2479	31	1,25
61° und 5 sec	52	1121	1	99,91	39	16	41,03	3617	49	1,35
61° und 5 sec	55	839	0	100,00	26	10	38,46	3207	66	2,06
61° und 5 sec	56	508	0	100,00	15	8	53,33	1597	115	7,20
61° und 5 sec	57	377	0	100,00	7	7	100,00	1303	109	8,37
61° und 5 sec	58	4503	5	99,89	17	14	82,35	1111	92	8,28
61° und 5 sec	59	1779	4	99,78	18	11	61,11	660	57	8,64
61° und 5 sec	68	1260	0	100,00	23	28	121,74	59	5	8,47
61° und 5 sec	75	496	1	99,80	31	37	119,35	251	15	5,98

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 61 °C in acht der 17 untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei sieben der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,94-99,98% der Kontrolle. Bei einem Versuch waren noch fünf infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,89% der Kontrolle und bei einem Versuch waren vier Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten, was einem Inaktivierungserfolg von 99,78% bezogen auf die Kontrolle entspricht.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in 13 der untersuchten 17 Proben eine Aktivität im Bereich von 18,75-82,35% bezüglich der Kontrolle. In vier Fällen konnte eine Aktivität von 100-121,74% der Kontrolle erreicht werden. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 1,25-12,50 % der Kontrolle auf.

Abb. 15: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 61 °C



3.3.10. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C

Tab. 27: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 60 °C

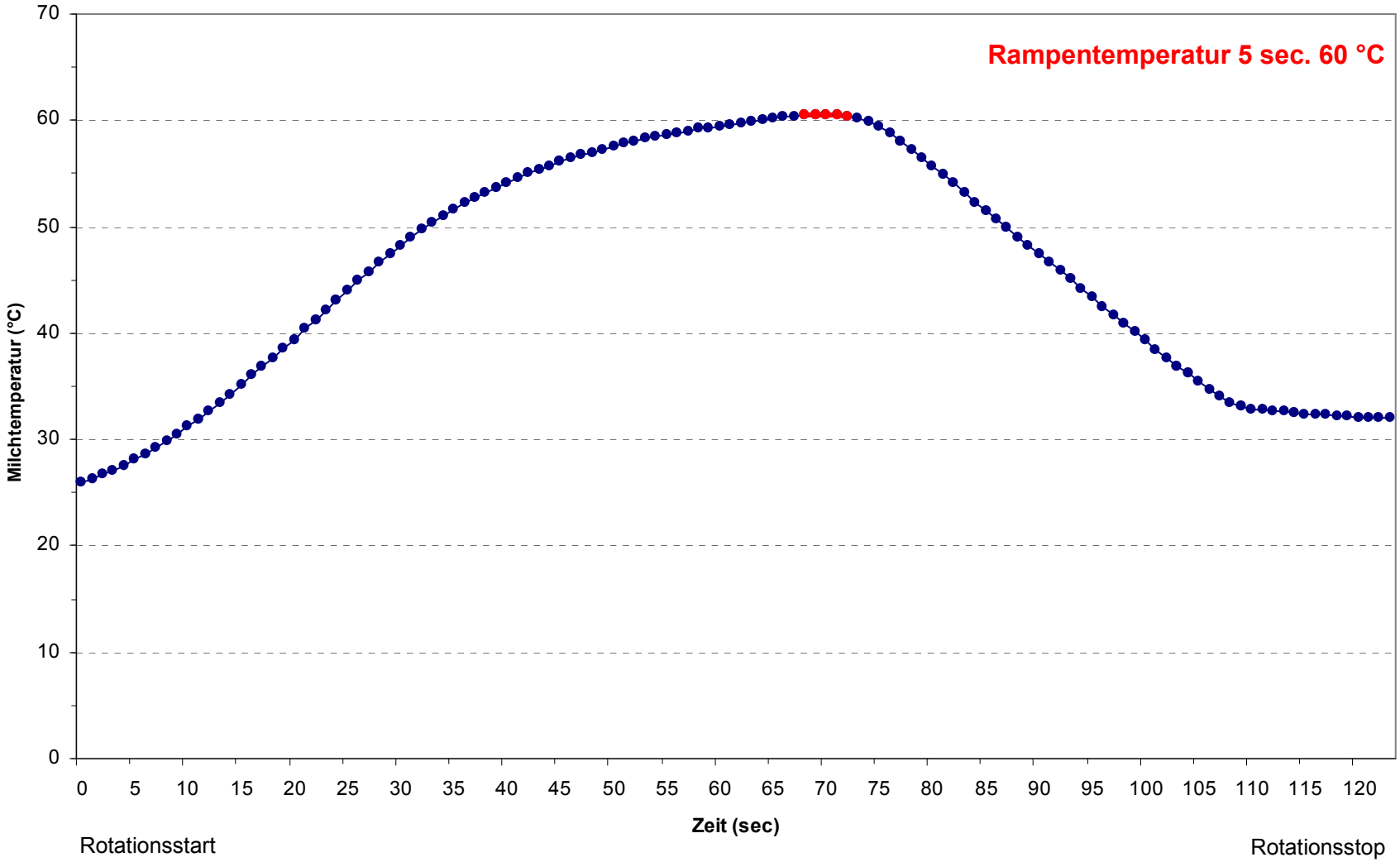
Verfahren	Exp Nr	K (N_{TEA}+ /ml Molke)	P (N_{TEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
60° und 5 sec	2	487	0	100,00	13	10	76,92	120	18	15,00
60° und 5 sec	4	618	2	99,68	55	48	87,27	2245	65	2,90
60° und 5 sec	7	190	0	100,00	15	18	120,00	3424	74	2,16
60° und 5 sec	8	378	0	100,00	80	84	105,00	1914	177	9,25
60° und 5 sec	16	1784	1	99,94	8	7	87,50	1364	270	19,79
60° und 5 sec	19	880	1	99,89	9	8	88,89	758	36	4,75
60° und 5 sec	27	388	0	100,00	18	19	105,56	1074	198	18,44
60° und 5 sec	30	1658	1	99,94	38	47	123,68	1236	36	2,91
60° und 5 sec	33	900	0	100,00	14	5	35,71	1082	34	3,14
60° und 5 sec	34	2058	1	99,95	48	22	45,83	48	8	16,67
60° und 5 sec	37	752	3	99,60	20	19	95,00	1829	56	3,06
60° und 5 sec	42	1169	0	100,00	10	6	60,00	2479	67	2,70
60° und 5 sec	74	1792	2	99,89	27	19	70,37	224	19	8,48
60° und 5 sec	75	496	2	99,60	31	39	125,81	251	15	5,98

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 60 °C in sechs der 14 untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei vier der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,94- 99,89% der Kontrolle. Bei drei Versuchen waren noch zwei infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,60-99,89% der Kontrolle. Bei einem Versuch waren drei Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten, was einem Inaktivierungserfolg von 99,60% der Kontrolle entspricht.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in neun der untersuchten 14 Proben eine Aktivität im Bereich von 35,71-95,00% bezüglich der Kontrolle. In fünf Fällen konnte eine Aktivität von 105,00-125,81% der Kontrolle erreicht werden. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 2,16-19,79% der Kontrolle auf.

Abb. 16: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 60 °C



3.3.11. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 59 °C

Tab. 28: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 59 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
59° und 5 sec	27	388	0	100,00	18	10	55,56	1074	246	22,91
59° und 5 sec	33	900	0	100,00	14	12	85,71	1082	37	3,42
59° und 5 sec	39	1024	2	99,80	10	8	80,00	2315	10	0,43
59° und 5 sec	74	1792	56	96,88	27	32	118,52	224	20	8,93
59° und 5 sec	75	496	3	99,40	31	24	77,42	251	12	4,78
59° und 5 sec	77	457	0	100,00	36	22	61,11	204	98	48,04
59° und 5 sec	80	1386	1	99,93	22	15	68,18	132	15	11,36
59° und 5 sec	82	573	0	100,00	18	16	88,89	187	49	26,20
59° und 5 sec	83	1737	5	99,71	20	16	80,00	182	25	13,74

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 59 °C in vier der neun untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,93% der Kontrolle. Bei einem Versuch waren noch zwei infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,80% bezüglich der Kontrolle. In drei weiteren Versuchen waren jeweils noch drei, fünf und 56 Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten. Dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,40, 99,71 bzw. 96, 88 % der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in acht der untersuchten neun Proben eine Aktivität im Bereich von 55,56-88,89% bezüglich der Kontrolle. In einem Fall konnte eine Aktivität von 118,52% der Kontrolle erreicht werden. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 0,43-48,04 % der Kontrolle auf.

3.3.12. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 58 °C

Tab. 29: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 58 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
58° und 5 sec	8	378	0	100,00	80	88	110,00	1914	1578	82,45
58° und 5 sec	16	1784	0	100,00	8	9	112,50	1364	1106	81,09
58° und 5 sec	17	270	1	99,63	9	10	111,11	2166	227	10,48
58° und 5 sec	19	880	1	99,89	9	9	100,00	758	85	11,21
58° und 5 sec	23	2600	25	99,04	36	15	41,67	1427	86	6,03
58° und 5 sec	27	388	0	100,00	18	14	77,78	1074	776	72,25
58° und 5 sec	74	1792	151	91,57	27	30	111,11	224	30	13,39
58° und 5 sec	75	496	32	93,55	31	37	119,35	251	16	6,37

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 58 °C in drei der acht untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei zwei der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,63 bzw. 99, 89% der Kontrolle. In drei weiteren Versuchen waren jeweils noch 25, 32 und 151 Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten. Dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,04, 93,55 bzw. 91, 57% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in zwei der untersuchten acht Proben eine Aktivität im Bereich von 41,67-77,78% bezüglich der Kontrolle. In sechs Fällen konnte eine Aktivität im Bereich von 100,00-119,35% der Kontrolle erreicht werden. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 6,03-82,45% der Kontrolle auf. Die gewählte Maximaltemperatur führt zu einer weiteren Stabilisierung der Lipaseaktivität, es ist nochmals ein Anstieg zu erkennen.

3.3.13. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 57 °C

Tab. 30: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 57 °C

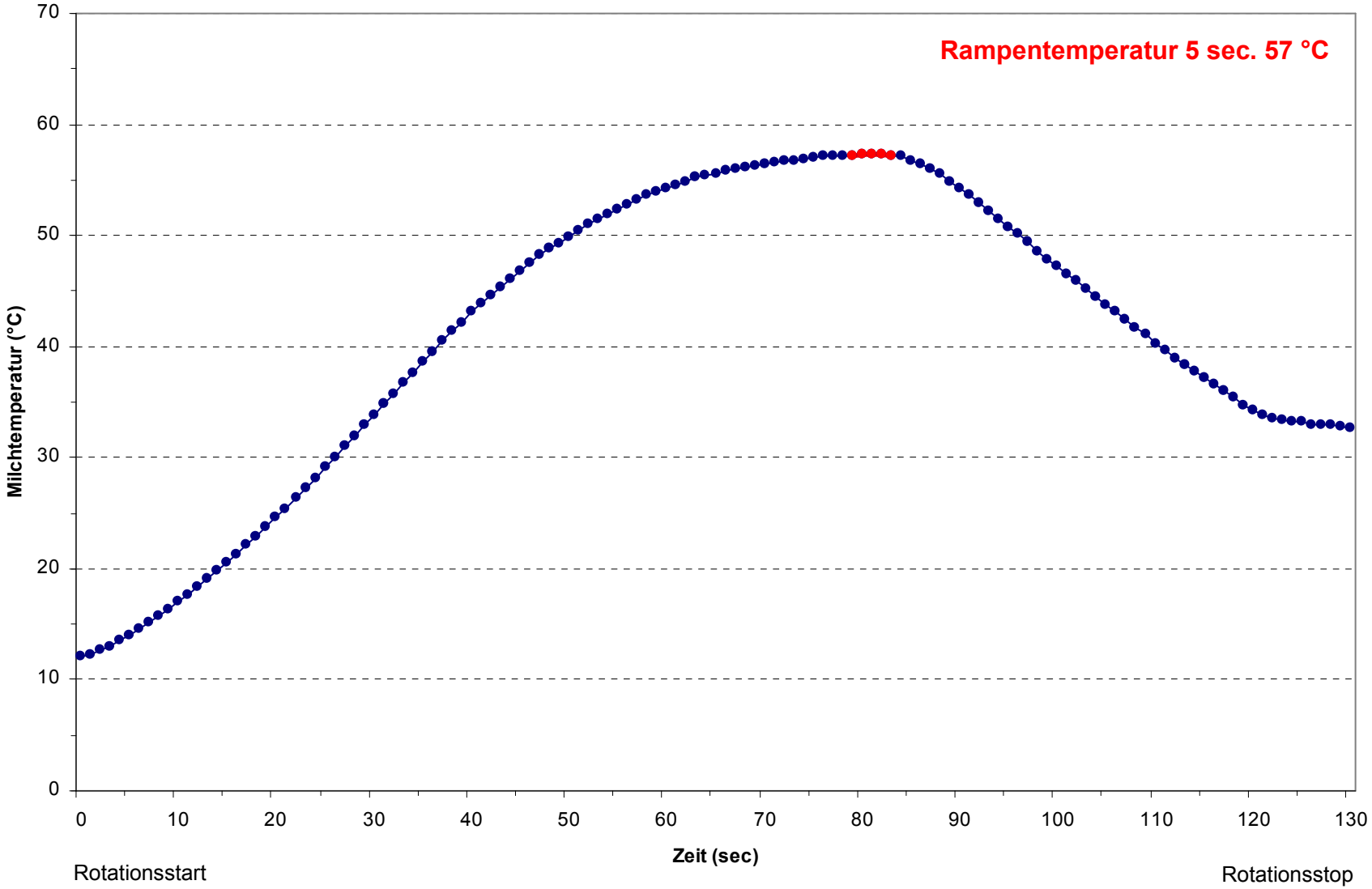
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
57° und 5 sec	80	1386	1	99,93	22	14	63,64	132	41	31,06
57° und 5 sec	82	573	2	99,65	18	19	105,56	187	155	82,89
57° und 5 sec	83	1737	7	99,60	20	22	110,00	182	68	37,36
57° und 5 sec	84	1122	7	99,38	25	21	84,00	97	18	18,56
57° und 5 sec	85	427	12	97,19	33	17	51,52	104	11	10,58

Interpretation:

Virusinaktivierung: Es konnte in keinem der untersuchten fünf Fälle eine Inaktivierung von 100% stattfinden. Bei einem weiteren Fall konnte nach Inaktivierung lediglich ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht immerhin einem Inaktivierungserfolg von 99,93% der Kontrolle. In zwei weiteren Versuchen waren jeweils noch sieben Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten. Dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,38 bzw. 99,60% der Kontrolle. Im letzten dargestellten Versuch in der Tabelle waren noch 12 Kerne in der Viruskultur enthalten, was einem Inaktivierungserfolg von 97,19% entspricht.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in drei der untersuchten fünf Proben eine Aktivität im Bereich von 51,52-84,00% bezüglich der Kontrolle. In zwei Fällen konnte eine Aktivität im Bereich von 105,56-110,00% der Kontrolle erreicht werden. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 10,58-82,89% der Kontrolle auf.

Abb. 17: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 57 °C



3.3.14. Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 56 °C

Tab. 31: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 56 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
56° und 5 sec	16	1784	1	99,94	8	9	112,50	1364	1531	112,24
56° und 5 sec	17	270	27	90,00	9	9	100,00	2166	1534	70,82
56° und 5 sec	19	880	2	99,77	9	9	100,00	758	234	30,87
56° und 5 sec	23	2600	179	93,12	36	14	38,89	1427	200	14,02
56° und 5 sec	24	305	55	81,97	66	66	100,00	1555	173	11,13
56° und 5 sec	27	388	0	100,00	18	16	88,89	1074	880	81,94

Interpretation:

Virusinaktivierung: In der Zellkultur waren nach einer Zeit von 5 Sekunden und einer Inaktivierungstemperatur von 56 °C lediglich in einem der sechs untersuchten Fälle keine infizierten Kerne mehr vorhanden (100%ige Inaktivierung). Bei einer der untersuchten Proben konnte nach Inaktivierung ein infizierter Kern in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 99,94% der Kontrolle. Bei einem Versuch waren noch zwei infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,77% der Kontrolle bezogen. In drei weiteren Versuchen waren jeweils noch 27, 55 und 179 Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten. Dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 90,00, 81,97 bzw. 93,12% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in zwei der untersuchten sechs Proben eine Aktivität im Bereich von 38,89-88,89% bezüglich der Kontrolle. In vier Fällen konnte eine Aktivität im Bereich von 100,00-112,50% der Kontrolle erreicht werden. Die Lipase weist in fünf der untersuchten sechs Proben eine Aktivität im Bereich von 11,13-81,94 % der Kontrolle auf. In einem Fall konnte eine Aktivität von 112,24% erreicht werden.

3.3.15 . Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 55 °C

Tab. 32: Inkubationsdauer 5 Sekunden, Maximaltemperatur 55 °C

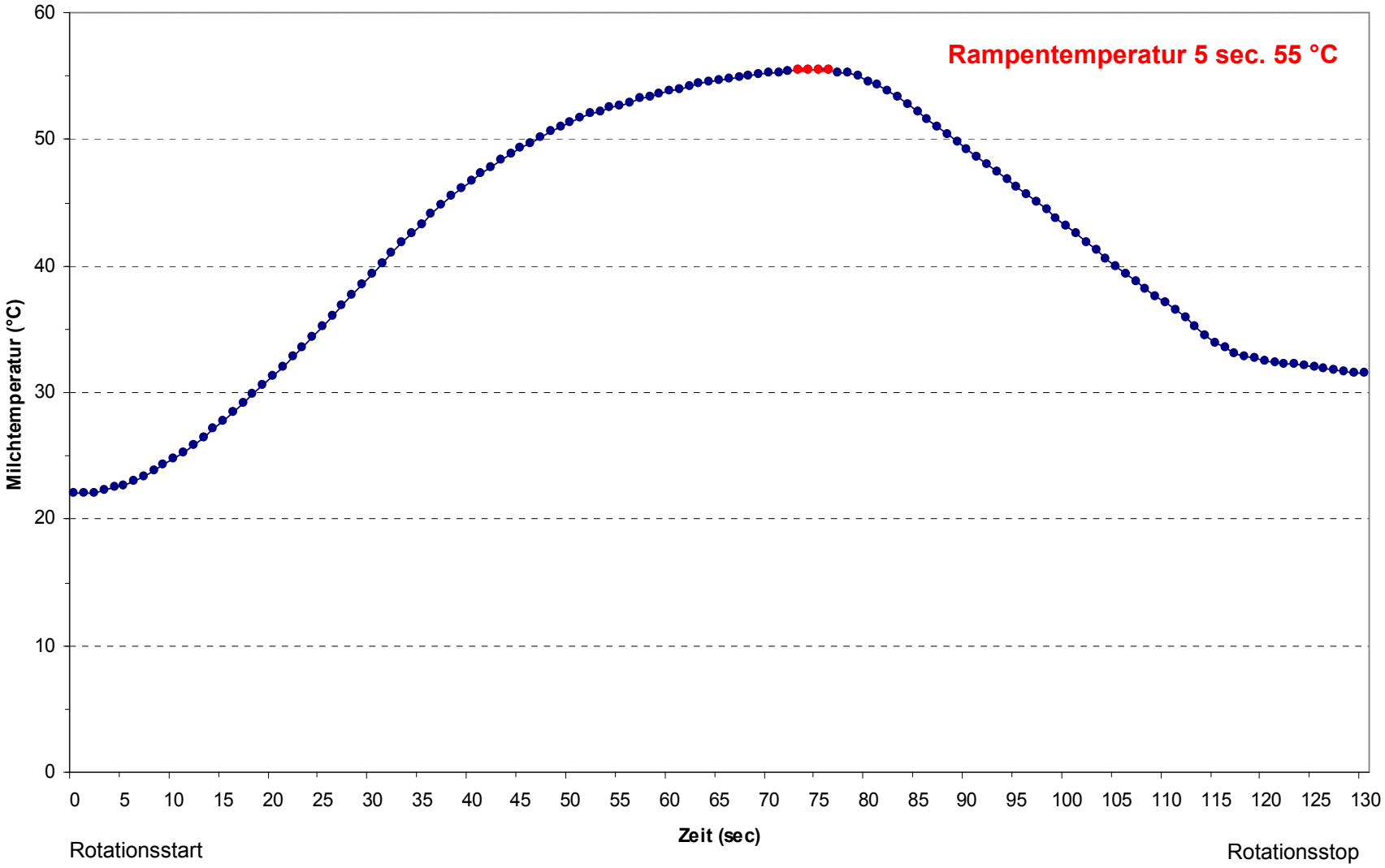
Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+ /ml Molke)	P (N_{IEA}+ /ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
55° und 5sec	19	880	8	99,09	9	8	88,89	758	278	36,68
55° und 5sec	82	573	9	98,43	18	12	66,67	187	112	59,89
55° und 5sec	84	1122	8	99,29	25	22	88,00	97	46	47,42
55° und 5sec	85	427	6	98,59	33	8	24,24	104	99	95,19

Interpretation:

Virusinaktivierung: Bei dieser Maximaltemperatur konnte in keinem der untersuchten Fälle eine 100%ige Inaktivierung erreicht werden. Bei einer der untersuchten vier Proben konnte nach Inaktivierung noch sechs infizierte Kerne in der Viruskultur nachgewiesen werden; dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 98,59% der Kontrolle. Bei zwei Versuchen waren jeweils noch acht infizierte Kerne in der Kultur enthalten. Dies bedeutet ein Inaktivierungserfolg von 99,09 bzw. 99,29% der Kontrolle. In einem weiteren Versuch waren noch neun Kerne nach Inaktivierung in der Kultur enthalten. Dies entspricht einem Inaktivierungserfolg von 98,43% der Kontrolle.

Enzymaktivitäten: Die AP zeigt in vier untersuchten Proben eine Aktivität im Bereich von 24,24-88,89% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität im Bereich von 36,68-95,15 % der Kontrolle auf.

Abb. 18: Temperaturkurve des Milchfilms bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden und einer Maximaltemperatur von 55 °C



3.4. Statistische Auswertung unterschiedlicher Maximaltemperaturen auf Virussicherheit

3.4.1. Übersicht

In diesem Abschnitt soll der Einfluss der Maximaltemperaturen bei jeweils einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden auf die resultierende Virusinfektiosität statistisch ausgewertet werden. Die Maximaltemperaturen sind im Einzelnen:

Tab. 33: Darstellung der unterschiedlichen Maximaltemperaturen

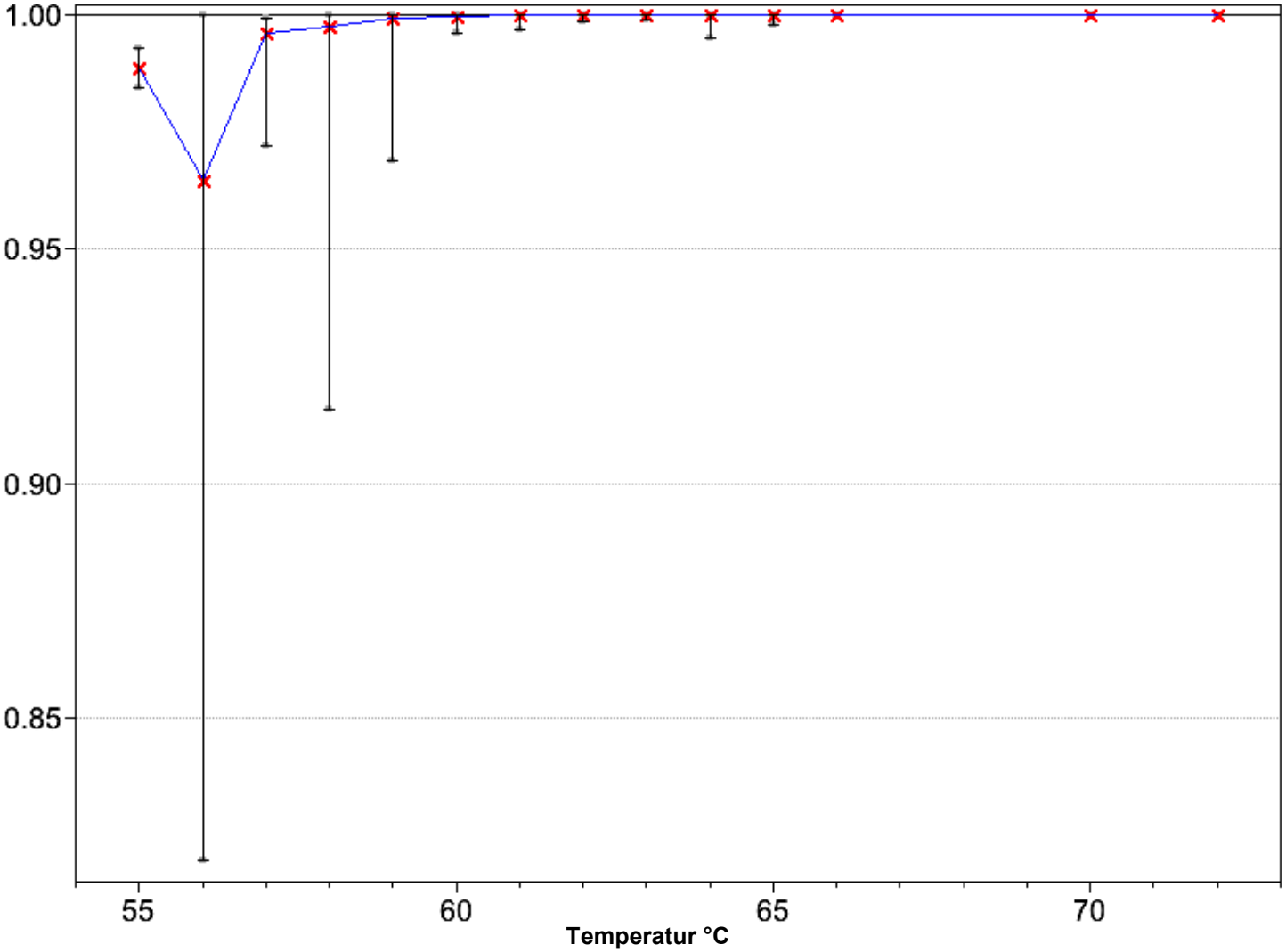
°C	72	70	66	65	64	63	62	61	60	59	58	57	56	55
Sek.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Als Ausgangspunkt für die Untersuchung wurde eine Maximaltemperatur von 72 °C gewählt. Bei dieser Temperatur war nach den Ergebnissen der Voruntersuchung davon auszugehen, dass nach Kurzzeithitzepasteurisierung in der Kultur keine HCMV-Infektiosität mehr nachzuweisen ist. Pro Temperaturschritt wurden mindestens vier unterschiedliche Muttermilchproben untersucht. Von der höchsten Temperatur ausgehend, wurde diese nach und nach in kleinen Schritten reduziert. Wie weit kann die Temperatur nun gemindert werden, damit noch eine ausreichend sichere Virusinaktivierung stattfindet? In Abbildung 19 wird der Einfluss unterschiedlicher Maximaltemperaturen bei der Inkubationsdauer von fünf Sekunden dargestellt (Stat. Auswertung: Prof. Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen). Dabei bezeichnet die x-Achse die Temperatur und die y-Achse die kumulative Häufigkeit der Inaktivierung (bezogen auf die Zahl von infektiösem Virusantigen-präsentierenden Zellen; jeweils vor und nach Inaktivierung; n = 1,0 entspricht 100%iger Inaktivierung). „X“ bezeichnet den Median (p) der unterschiedlichen Temperaturen. Betrachtet man die fünf am niedrigsten gewählten Maximaltemperaturen, also 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C und 59 °C, so ist zu festzustellen, dass die Mediane dieser Temperaturen auch die unsicherste Virusinaktvierung zeigen. Bei diesen Temperaturen ist die

Streubreite der einzelnen Zahlenwerte für infizierte Zellen am größten. Bei der Temperatur von 56 °C hat in einem Fall die Inaktivierung im Vergleich zur Kontrolle auch nur zu 81,97% Erfolg, was sich auch hier in einer niedrigen kumulativen Häufigkeit der Inaktivierung widerspiegelt. Ab einer Temperatur von 60 °C liegen die Mediane aller weiteren Temperaturen bei einer kumulativen Häufigkeit von 1,00, was bedeutet, dass die Virusinaktivierung im Mittel zu 100% funktioniert hat. Auch die Streubreiten sind wesentlich geringer als bei den Temperaturen unter 60 °C. D.h. beispielsweise für eine Temperatur von 60 °C, dass die Inaktivierung zwar nicht in jedem Fall zur 100% funktioniert hat, aber in jedem Fall mit einer Wahrscheinlichkeit mit mehr als 99%. Ab einer Temperatur von 66 °C ist keine Streubreite mehr vorhanden, d.h. die Inaktivierung war in jeder der untersuchten Proben zu 100 % erfolgreich.

Abb. 19: Effizienz der Virusinaktivierung als Funktion der Maximaltemperatur (Rampenzeit von fünf Sekunden)

(Auswertung: Prof. Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen)



3.4.2. Statistische Auswertung der Maximaltemperaturen auf AP-Aktivität

In Abbildung 20 sind für die unterschiedlichen Maximaltemperaturen (Rampenzeit von fünf Sekunden) nun die einzelnen Werte der Aktivitäten der AP dargestellt. Die x-Achse bezeichnet die Maximaltemperaturen, die y-Achse die Aktivitäten der AP in Prozent (bei der y-Achse wurde eine logarithmische Darstellung gewählt). Die eingetragenen Werte oberhalb und unterhalb der errechneten Kurve kennzeichnen die beobachteten Werte. Die Kurve stellt die statistisch errechneten Erwartungswerte dar (Auswertung: Prof. Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen).

Es lässt sich auch wieder hier der Trend erkennen, dass die Aktivität der Alkalischen Phosphatase mit zunehmender Maximaltemperatur abnimmt. Bei einer Temperatur von 60 °C und der Inkubationsdauer von fünf Sekunden liegt der Erwartungswert der AP bei 71,31% und ist damit als ausreichend anzusehen.

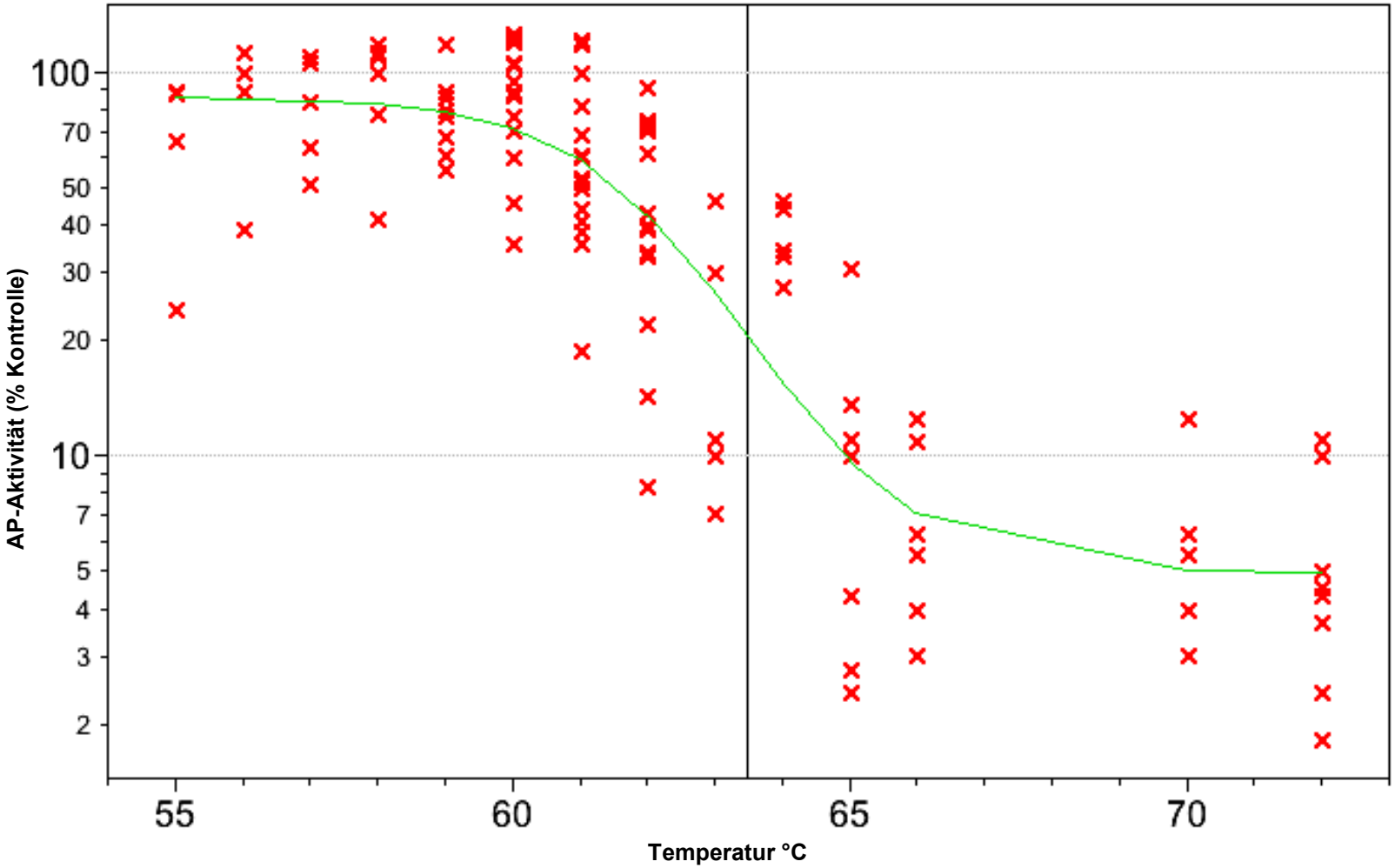
Tab. 34: Abhängigkeit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase von den gewählten Maximaltemperaturen bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden

Exp.Nr.: Nummer des Experiments
Temp: Temperatur
AP-Akt. (erwartet) (%): Aktivität der AP in Prozent
Zahl Exp.: Anzahl der Experimente

Exp.Nr.	Temp	AP-Akt.(erwartet)(%)	Zahl Exp.
1	55	85,67	4
2	56	85,24	6
3	57	84,33	5
4	58	82,44	8
5	59	78,60	9
6	60	71,31	14
7	61	59,10	17
8	62	42,65	14
9	63	26,52	5
10	64	15,44	5
11	65	9,69	9
12	66	7,06	6
13	70	5,03	5
14	72	4,95	9

Abb. 20: Abhängigkeit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase von den gewählten Maximaltemperaturen

(Auswertung: Prof. Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen)



3.4.3. Statistische Auswertung der Maximaltemperaturen auf Lipase-Aktivität

In Abbildung 21 sind für die unterschiedlichen Maximaltemperaturen (Rampenzeit von fünf Sekunden) die einzelnen Werte der Aktivitäten der Lipase dargestellt. Die x-Achse beschreibt die Maximaltemperaturen, die y-Achse die Aktivitäten der Lipase in Prozent (logarithmische Darstellung) (Auswertung: Prof. Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen). Wie in Abbildung 20 stellt die Kurve die Erwartungswerte dar, die in Tabelle 35 nochmals detailliert aufgestellt sind. Die Kurve fällt mit zunehmender Temperatur steil ab, d.h. die Aktivität der Lipase wird geringer. Auch bei einer Maximaltemperatur von 60 °C kann lediglich von einem erwarteten Wert von 5,35% ausgegangen werden. Da aber unterhalb dieser Temperatur kein optimaler Virusinaktivierungserfolg mehr zu verzeichnen ist, muss dieser niedrige Wert bezüglich der Lipaseaktivität toleriert werden.

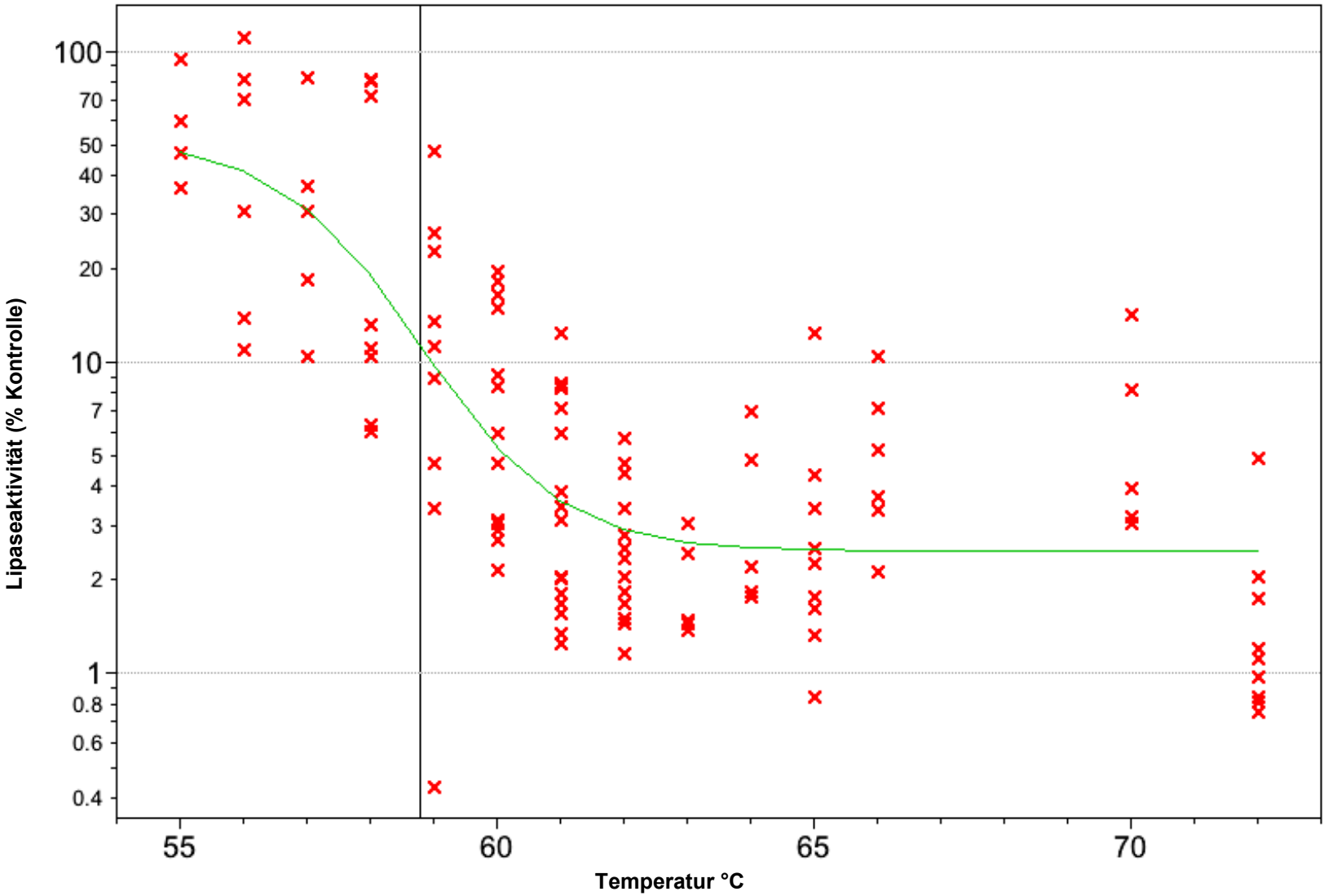
Tab. 35: Abhängigkeit der Aktivität der Lipase von den gewählten Maximaltemperaturen bei einer Inkubationsdauer von 5 Sekunden

Exp.Nr.: Nummer des Experiments
Temp: Temperatur
Lipase-Akt. (erwartet) (%): Aktivität der Lipase in %
Zahl Exp: Anzahl der Experimente

Exp.Nr.	Temp	Lipase-Akt.(erwartet)(%)	Zahl Exp
1	55	47,67	4
2	56	41,58	6
3	57	31,29	5
4	58	18,99	8
5	59	9,82	9
6	60	5,35	14
7	61	3,59	17
8	62	2,92	14
9	63	2,65	5
10	64	2,54	5
11	65	2,50	9
12	66	2,48	6
13	70	2,47	5
14	72	2,47	9

Abb. 21: Abhängigkeit der Aktivität der Lipase von den gewählten Maximaltemperaturen

(Auswertung: Prof. Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen)



3.5. Langzeithitzepasteurisierung (Holder-Pasteurisierung)

Tab. 36: Inkubationsdauer 30 Minuten, Maximaltemperatur 62,5 °C

Verfahren	Exp Nr	K (N_{IEA}+/ ml Molke)	P (N_{IEA}+/ ml Molke)	% Virus-kill	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	% AP-Akt	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
Holder	40	304	0	100,00	41	1	2,44	2823	7	0,25
Holder	41	293	0	100,00	9	1	11,11	1598	9	0,56
Holder	42	1169	0	100,00	10	1	10,00	2479	5	0,20
Holder	46	7352	0	100,00	14	1	7,14	74	3	4,05
Holder	52	1121	0	100,00	39	1	2,56	3617	5	0,14
Holder	53	383	0	100,00	37	1	2,70	178	5	2,81
Holder	64	1330	0	100,00	17	1	5,88	56	2	3,57
Holder	65	1320	0	100,00	19	1	5,26	59	2	3,39
Holder	66	439	0	100,00	21	1	4,76	61	2	3,28
Holder	68	1260	0	100,00	23	1	4,35	59	2	3,39
Holder	69	4725	0	100,00	28	1	3,57	253	6	2,37
Holder	71	1768	0	100,00	23	1	4,35	435	11	2,53
Holder	77	457	0	100,00	36	1	2,78	204	6	2,94
Holder	78	202	0	100,00	13	2	15,38	186	3	1,61
Holder	80	1386	0	100,00	22	1	4,55	132	8	6,06
Holder	82	573	0	100,00	18	1	5,56	187	6	3,21

Interpretation:

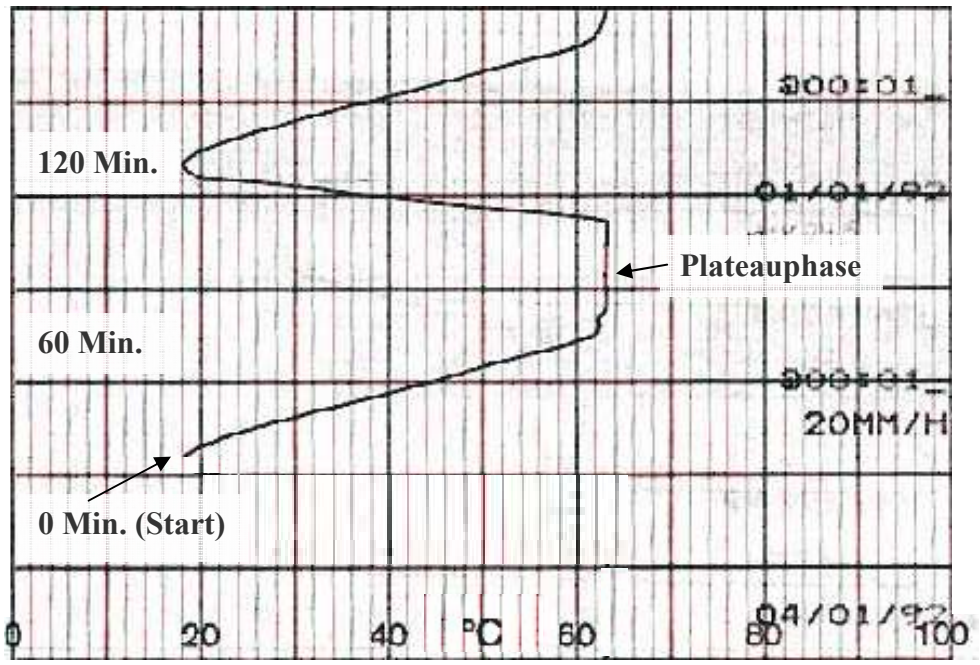
Virusinaktivierung: Insgesamt wurden 16 Muttermilchproben untersucht. Bei allen der untersuchten 16 Proben konnte eine 100%ige Inaktivierung erreicht werden, d.h. dass in der Viruskultur in einem der Fälle infizierte Fibroblastenkerne nachzuweisen waren.

Enzymaktivitäten: Die AP-Aktivität zeigt in den untersuchten 16 Fällen eine Aktivität von 2,44-15,38% bezüglich der Kontrolle. Die Lipase weist eine Aktivität von 0,14-6,06% bezüglich der Kontrolle auf.

3.5.1. Temperaturkurve der Langzeithitzepasteurisierung

Abbildung 22 belegt den Temperaturverlauf der Langzeithitzepasteurisierung. Der erste Anstieg stellt die Vorwärmung des Wasserbades dar. Der steile Abfall zeigt die Montage der Probeflasche und das Einbringen der mit Muttermilch gefüllten Flaschen. Nun wird die Temperatur dieser Probeflasche angezeigt und aufgezeichnet. Diese wird innerhalb kürzester Zeit auf 62,5 °C erhöht und aufgezeichnet. Sobald diese Temperatur erreicht ist, wird sie für 30 Minuten konstant gehalten und anschließend wieder abgekühlt. Der ganze Pasteurisierungsvorgang dauert ca. 100 Minuten.

Abb. 22: Temperaturkurve der Langzeithitzepasteurisierung



3.5.2. Berechnung der Mediane für das Langzeithitzepasteurisierungs-verfahren für die AP

Berechnet man für die Langzeithitzepasteurisierung die Mediane, so errechnet sich für die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ein Median von 4,7%. Der niedrigste Wert liegt für die AP bei 2,44%, der höchste Wert bei 15,38%. Dieser Wert liegt im Vergleich zu den berechneten Erwartungswerten für das Kurzzeithitzepasteurisierungsverfahren sehr viel niedriger. Betrachtet man bei einer Maximaltemperatur von 70 °C und einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden den erwarteten Wert für die Aktivität der AP, so ergibt sich eine Aktivität von 5,03% in der Kurzzeithitzepasteurisierung, welche somit noch höher liegt als die des Langzeithitzepasteurisierungsverfahrens bei einer Temperatur von 62,5 °C.

Bei einer Temperatur von 60 °C liegt der Erwartungswert für die AP bei 71,31%.

3.5.3. Berechnung der Mediane für das Langzeithitzepasteurisierungs-verfahren für die Lipase

Bei der Lipase errechnet sich für das Langzeithitzepasteurisierungsverfahren ein Median von 2,9%. Der niedrigste Wert liegt für die Lipase bei 0,14%, der höchste Wert bei 6,1%. Der Medianwert von 2,9% liegt im Vergleich zu einem

Erwartungswert beim Kurzzeithitzeinaktivierungsverfahren von 5,35 % bei einer Maximaltemperatur von 60 °C noch darunter. Betrachtet man allerdings den höchsten Wert bei dem Holder-Verfahren, so ergibt sich im Gegensatz zu den Werten (> 60 °C) der Lipase beim Kurzzeithitzeinaktivierungsverfahren kein signifikanter Unterschied.

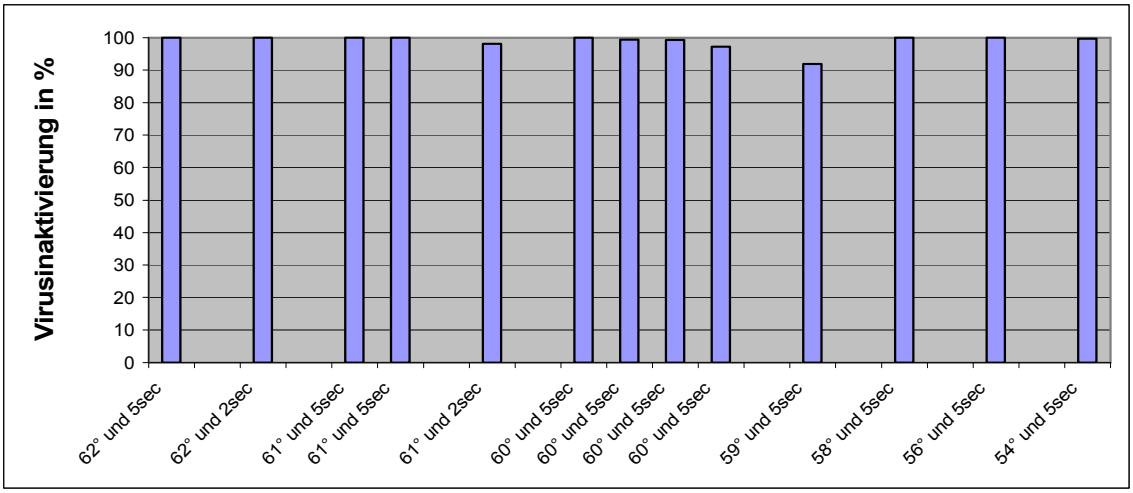
3.6. Kurzzeitpasteurisierung bei natürlich infizierten Muttermilchproben

Tab. 37: Darstellung der seropositiven Muttermilchproben

ExpNr = Experimentnummer; K (N_{IEA}+/ml Molke) = in der Kontrolle detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; P (N_{IEA}/ml Molke) = in der Probe detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; AP-K (U/L) = AP-Aktivität in der Kontrolle; AP-P(U/L) = AP-Aktivität in der Probe; Lipase-K (U/L) = Lipase-Aktivität in der Kontrolle; Lipase-P (U/L) = Lipase-Aktivität in der Probe; Lipase-Akt. in % = Lipase-Aktivität in Prozent

Verfahren	Exp Nr	Tage pp	K (N_{IEA}+/ ml Molke)	P (N_{IEA}+/ ml Molke)	Viruskill in %	AP-K (U/L)	AP-P (U/L)	AP-Akt in %	Lipase-K (U/L)	Lipase-P (U/L)	Lipase-Akt in %
62° und 5sec	18	123	339	0	100,00	82	78	95,12	1608	124	7,71
62° und 2sec	47	11	530	0	100,00	14	5	35,71	213	11	5,16
61° und 5sec	80	88	72	0	100,00	34	27	79,41	348	12	3,45
61° und 5sec	89	41	44	0	100,00	9	8	88,89	203	11	5,42
61° und 2sec	47	11	530	10	98,11	14	5	35,71	213	11	5,16
60° und 5sec	18	123	339	0	100,00	82	106	129,27	1608	716	44,53
60° und 5sec	73	60	151	1	99,34	11	5	45,45	84	13	15,48
60° und 5sec	79	82	517	4	99,23	9	1	88,89	178	5	2,81
60° und 5sec	88	32	2258	63	97,21	39	35	88,89	395	18	2,81
59° und 5sec	79	82	517	42	91,88	9	9	100,00	178	9	5,06
58° und 5sec	18	123	339	0	100,00	82	117	142,68	1608	1029	63,99
56° und 5sec	18	123	339	0	100,00	82	114	139,02	1608	1488	92,54
54° und 5sec	18	123	339	1	99,71	82	112	136,59	1608	1716	106,72

Abb. 23: Grafik zur Darstellung der Virusinaktivierung seropositiver Muttermilchproben



Aus Tabelle 37 und der nachfolgenden Grafik lässt sich auch wie bei den artifiziell infizierten Muttermilchproben erkennen, dass bei einer Maximaltemperatur von 60 °C eine optimale Virusinaktivierung gewährleistet ist. Aus der Tabelle 37 geht zwar hervor, dass auch bei einer Maximaltemperatur von 58 °C und 56 °C eine optimale (also 100%ige) Inaktivierung erreicht werden kann. Allerdings muss bei diesen Temperaturen auch beachtet werden, dass die Viruslast in der Milchprobe <1000 IEA^+-infizierten Fibroblasten liegt.

Die Aktivitäten der beiden Markerenzyme verhalten sich bei der Maximaltemperatur von 60 °C entsprechend wie die Aktivitäten der AP und Lipase bei derselbigen Temperatur nach Inaktivierung mit artifiziell infizierter Muttermilch.

3.7. Immunblot-Test zum Nachweis von spezifischem IgG gegen HCMV in humanem Plasma oder in Muttermilch

3.7.1. Übersicht

Antikörper gegen die viralen Tegument-Phosphoproteine p150 und p65 werden im Regelfall bei jeder HCMV-Infektion gebildet.

Bei einer Primärinfektion können im peripheren Blut sofort Antikörper gegen IE1/1, CM2, p150 und p65 nachgewiesen werden. Es sind jedoch keine

Antikörper gegen das Glykoprotein gB1 und gB2 vorhanden (Schoppel et al., 1997).

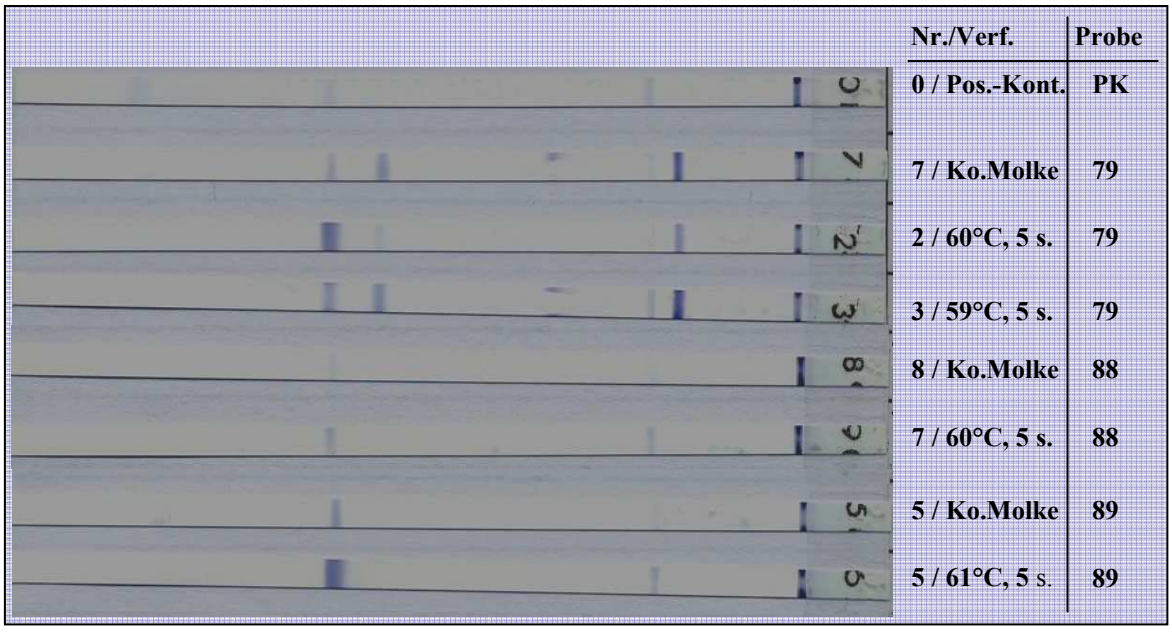
Simultanes Auftreten von p150, p65 sowie dem Glykoprotein gB1 und gB2 ohne weitere Reaktivitäten im peripheren Blut sind typisch für eine länger zurückliegende Infektion (latente Infektion). Die Antikörper gB1 und gB2 treten in der Mehrzahl der Fälle erst etwa 6-12 Wochen nach einer Erstinfektion auf (Schoppel et al., 1997).

Reaktivierungen zeigen in aller Regel simultane Reaktivitäten gegen Phospho- und Glykoproteine, also IgG-Antikörper gegen p150, das Glykoprotein gB1 und gB2 sowie auch gegen CM2, p65 und/oder IE1. Völlig unbekannt ist jedoch bis jetzt das HCMV-spezifische Antikörperprofil in der Muttermilch im Rahmen der HCMV-Reaktivierung.

3.7.2. Rekombinanter HCMV-IgG-Immunblot von Mutter A, B_1, B_2

Abb. 24: Virusspezifisches Antikörperprofil nach Kurzzeithitzeinaktivierung in Muttermilch (Molke); (Mutter A, B1, B2)

Nr./Verf.: Nummer/Verfahren
Pos-Kont.: Positiv-Kontrolle
Ko.Molke: Kontrolle-Molke
PK: Positiv-Kontrolle
s: Sekunden



Tab. 38: Einfluss der Kurzzeithitzeinaktivierung auf HCMV-spezifische Antikörper (Mutter A, B1, B2)

Nr.: Nummer; Zeit p.p.: Zeit post partum

Nr.	Verfahren	Probe/ Mutter	Zeit p.p.	Antikörperprofil					
				IE 1	p150	CM2	p65	gB 1	gB 2
0	Positivkontrolle	PK		Negativ	Positiv+	Negativ	Negativ	Positiv+	Positiv+
7	Kontrolle Molke	79/ A	82	Positiv+++	Positiv+	Negativ	Positiv++	Positiv++	Negativ
2	60 °C, 5 Sek.	79/ A	82	Positiv++	Negativ	Negativ	Positiv+	Positiv++	Negativ
3	59 °C, 5 Sek.	79/ A	82	Positiv+++	Positiv+	Negativ	Positiv++	Positiv++	Negativ
8	Kontrolle Molke	88/ B_1	32	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv+	Negativ
7	60 °C, 5 Sek.	88/ B_1	32	Negativ	Positiv+	Negativ	Negativ	Positiv+	Negativ
5	Kontrolle Molke	89/ B_2	41	Negativ	Positiv+	Negativ	Negativ	Positiv++	Negativ
5	61 °C, 5 Sek.	89/ B_2	41	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv++	Negativ

Bei den in Abb.24 dargestellten Ergebnissen eines rekombinanten HCMV-IgG-Tests wurden drei unterschiedliche Muttermilchproben untersucht, wobei die Proben 88 und 89 von derselben Mutter (B_1, B_2) stammen. Der erste Streifen (Nr. 0) stellt die Positivkontrolle dar. Es treten Antikörper gegen p150, gB 1 und gB 2 auf. Die oberste Bande zeigt die Reaktivitätskontrolle, sie dient zur Überprüfung der Testdurchführung und muss in jedem Fall vorhanden sein. Bei der ersten Muttermilchprobe (Nr. 7) zeigen sich in der Molkekontrolle Antikörper gegen IE 1, p150 (in schwacher Intensität), p65 und gB1. Bei derselben Probe (Nr. 2) zeigen sich nach Inaktivierung der Milchprobe bei 60 °C und fünf Sekunden Antikörper gegen IE 1, p65 und gB1. Die gB1-Bande zeigt hier eine stärkere Intensität. Bei einer Temperatur von 59 °C und fünf Sekunden (Nr. 3) zeigt sich dasselbe Antikörpermuster wie in der Kontrolle. Das virusspezifische Antikörperprofil der Milch bei der ersten Mutter (Teststreifen Nummer 7, 2, 3) ist derart, wie man es im Rahmen einer Virusreaktivierung im peripheren Blut erwarten würde.

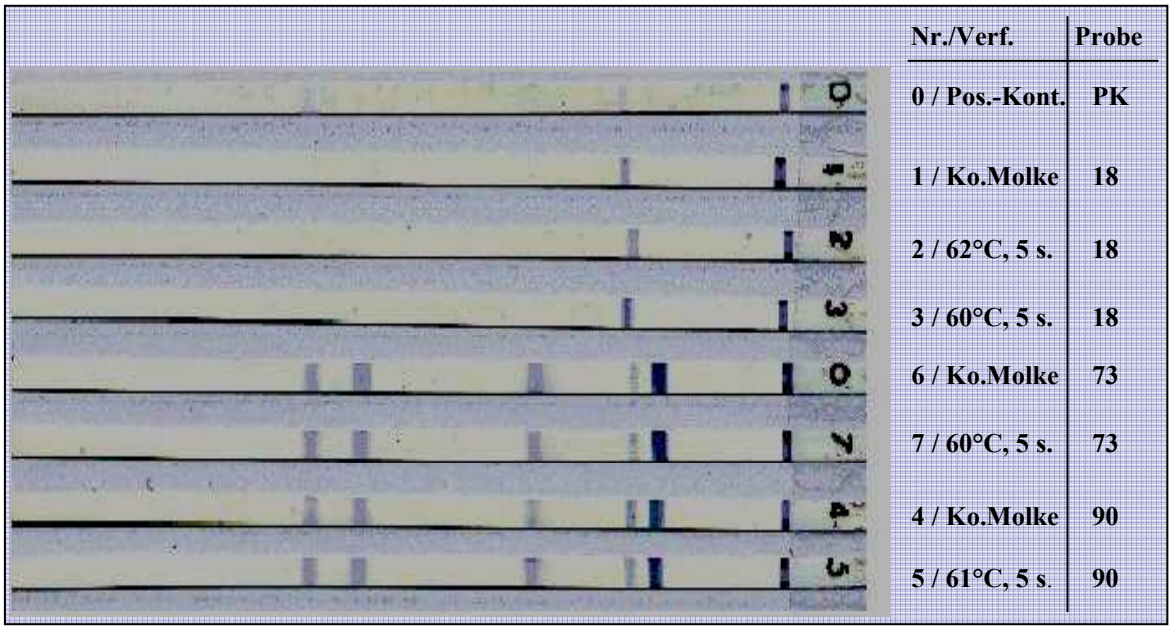
Bei der nächsten Milchprobe (Nr. 8) zeigt sich in der Molkekontrolle lediglich eine Antikörperreaktion gegen gB 1. Nach Inaktivierung bei einer Maximaltemperatur von 60 °C und fünf Sekunden (Nr 7, letzter Streifen) sind Antikörper gegen p150 und gB1 nachweisbar. Dieses Antikörperbandenmuster spricht entweder für eine länger zurückliegende Infektion oder für eine Reaktivierung.

Bei der folgenden Muttermilchprobe zeigen sich im durchgeführten Test in der Molkekontrolle(Nr. 5) lediglich Antikörper gegen gB 1 und mit leichter Intensität

gegen p150. Nach erfolgter Inaktivierung mit einer Maximaltemperatur von 61 °C und einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden (Nr. 5, drittletzter Streifen) ergibt sich dasselbe Bandenmuster wie in der Kontrolle, allerdings mit einer stärkeren Intensität.

3.7.3. Rekombinanter HCMV-IgG-Test von Mutter C, D_1, D_2

Abb. 25: Virusspezifisches Antikörperprofil nachKurzzeithitzeinaktivierung in Muttermilch (Molke); (Mutter C, D1, D2)



Tab. 39: Einfluss der Kurzzeithitzeinaktivierung auf HCMV-spezifische Antikörper (Mutter C, D1, D2)

Nr.	Verfahren	Probe/ Mutter	Zeit p.p.	Antikörperprofil					
				IE 1	p150	CM2	p65	gB 1	gB 2
0	Positivkontrolle	PK	123	Negativ	Positiv+	Negativ	Negativ	Positiv+	Negativ
1	Kontrolle Molke	18/ C	123	Negativ	Positiv++	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
2	62 °C, 5 Sek.	18/ C	123	Negativ	Positiv++	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
3	60 °C, 5 Sek.	18/ C	123	Negativ	Positiv++	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
6	Kontrolle Molke	73/ D_1	60	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Negativ
7	60 °C, 5 Sek.	73/ D_1	60	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Negativ
4	Kontrolle Molke	90/ D_2	88	Positiv++	Positiv++	Positiv+	Positiv++	Positiv+	Negativ
5	61 °C, 5 Sek.	90/ D_2	88	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Positiv++	Negativ

In dieser Abbildung zeigt sich als erster Streifen (Nr. 0) die Positivkontrolle. Hier erkennt man Antikörper gegen p150 und gB 1.

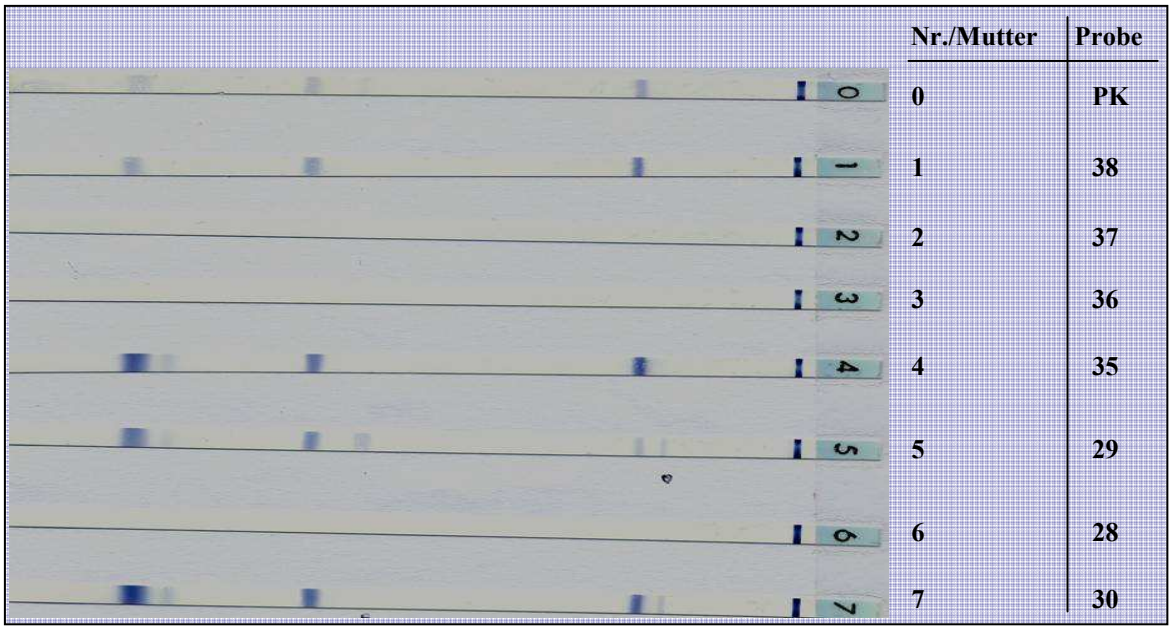
Bei den Streifen 1-3 handelt es sich um die Muttermilchprobe einer seropositiven Mutter (C), eine Non-Transmitterin. Immunblot 1 stellt die Molkekontrolle (Nr. 1) dar. Hier sieht man lediglich eine positive Reaktion gegen p150-Antikörper. Dasselbe Muster zeigt sich auch nach Inaktivierung dieser Muttermilchprobe bei 62 °C und fünf Sekunden (Nr. 2) und nach Inaktivierung bei 60 °C und fünf Sekunden (Nr. 3) Bei dieser Temperatur zeigt sich eine etwas stärkere Intensität dieser Bande. Auffallend bei dieser maternalen Non-Transmitterin ist die Abwesenheit von glykoproteinspezifischen Antikörpern, was im peripheren Blut als Zeichen der Primärinfektion gewertet würde.
Die nächsten 2 Streifen (6,7) zeigen die Muttermilchprobe einer seropositiven Mutter, einer Transmitterin (D_1). Die erste Probe (Nr. 6) zeigt wiederum die Kontrolle an, die zweite Probe die Inaktivierung bei einer Maximaltemperatur von 60 °C und einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden (Nr. 7). Hier zeigen sich in beiden Fällen Antikörper gegen IE 1, p150, CM2, p65 und gB1. Also auch hier das klassische Muster einer Reaktivierung. In den dargestellten Fällen zeigt sich, dass durch Kurzzeithitzeinaktivierung die HCMV-spezifische Immunreaktivität in Muttermilch nicht negativ beeinflusst wurde.

Das Immunblot 4 und 5 zeigen das Antikörpermuster der vorigen Mutter, allerdings zu einem anderen Zeitpunkt (D_2). Der Streifen 4 zeigt die Kontrollprobe (Nr. 4). Hier sind folgende Antikörper nachzuweisen: IE 1, p150, CM2, p65 und gB1. Diese Muster spricht für eine klassische Reaktivierung. Auch nach Inaktivierung dieser Muttermilchprobe (Nr. 5) bei einer Maximaltemperatur von 61 °C und einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden tritt dieses Antikörpermuster auf. CM2 tritt nach Inaktivierung mit stärkerer Intensität auf.

3.7.4. Rekombinanter HCMV-IgG-Test bei Muttermilchproben mit unbekanntem HCMV-Serostatus

Bei einigen Muttermilchproben mit unklarem Serostatus wurde zur Klärung dessen ein rekombinanter HCMV-IgG-Test durchgeführt. Bei den acht Teststreifen handelt es sich jeweils um unterschiedliche Muttermilchproben.

Abb. 26: Rekombinanter HCMV-IgG-Test unterschiedlicher Muttermilchproben



Tab. 40: Aufstellung von verschiedenen Muttermilchproben unterschiedlicher Spenderinnen mit unbekanntem HCMV-Serostatus mit dem rekombinanten HCMV-IgG-Test

Nr./ Mutter	Probe	Zeit p.p.	Antikörperprofil					
			IE 1	p150	CM2	p65	gB 1	gB 2
0	PK		Negativ	Positiv++	Negativ	Negativ	Positiv++	Positiv++
1	38	21	Negativ	Positiv+++	Negativ	Negativ	Positiv++	Positiv++
2	37	27	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
3	36	198	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
4	35	8	Negativ	Positiv+++	Negativ	Negativ	Positiv+++	Positiv+++
5	29	43	Positiv+	Positiv++	Negativ	Positiv+	Positiv++	Positiv++
6	28	38	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
7	30	11	Positiv+	Positiv+++	Negativ	Negativ	Positiv+++	Positiv+++

Der erste Teststreifen (Nr. 0) zeigt die Positivkontrolle; hier treten Antikörper gegen p150, gB 1 und gB 2 auf. Aus Tabelle 39 ist ersichtlich, dass der zweite Teststreifen (Nr. 1) die Antikörper aufweist, die bei einer Reaktivierung auftreten. Diese Muttermilchprobe stammt also von einer seropositiven Spenderin. Bei den folgenden zwei Teststreifen ist keine Antikörperreaktion nachzuweisen; es handelt sich also um eine seronegative Mutter.

Die Teststreifen Nummer vier, fünf und sieben zeigen wiederum das Antikörpermuster einer Reaktivierung. Bei den Muttermilchproben handelt es sich somit um Proben von seropositiven Spenderinnen. Bei Teststreifen Nr. 6 ist keine Antikörperreaktion nachweisbar (seronegative Mutter).

3.8. Quantitative PCR von HCMV-DNA in Muttermilch

Tab. 41: Darstellung des quantitativen HCMV-DNA-Nachweises bei seropositiver Muttermilch

ExpNr = Experimentnummer; K (N_{IEA}+/ml Molke) = in der Kontrolle detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; P (N_{IEA}/ml Molke) = in der Probe detektierte Fibroblastenkerne in der Viruskultur; DNAq-K: DNA quantitativ der Molkekontrolle; DNAq-P: DNA quantitativ der Probe

Verfahren	Exp Nr	K (NIEA+/ ml Molke)	P (NIEA+/ ml Molke)	Viruskill in %	DNAq-K	DNAq-P	%-Kontrolle DNAq
62° und 5sec	18	339	0	100,00	28000	20200	72,14
62° und 2sec	47	530	0	100,00	26000	19300	74,23
61° und 5sec	90	72	0	100,00	7310	5520	75,51
61° und 5sec	89	44	0	100,00	27800	31200	112,23
61° und 2sec	47	530	10	98,11	26000	17000	65,38
60° und 5sec	18	339	0	100,00	28000	27300	97,50
60° und 5sec	73	151	1	99,34	57500	49000	85,22
60° und 5sec	79	517	4	99,23	14700	18400	125,17
60° und 5sec	88	2258	63	97,21	69600	70200	100,86
59° und 5sec	79	517	42	91,88	14700	22200	151,02
58° und 5sec	18	339	0	100,00	28000	21800	77,86
56° und 5sec	18	339	0	100,00	28000	24700	88,21
54° und 5sec	18	339	1	99,71	28000	23200	82,86

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass durch die Kurzzeithitzepasteurisierung keine signifikante Verringerung der DNA-Kopienzahl möglich ist. Bei den untersuchten Proben treten teilweise sehr hohe Kopienzahlen auf. (<1000 entspricht einer niedrigen Kopienzahl; 1000-10000 entspricht einer mittleren Kopienzahl; >10000 entspricht einer hohen Kopienzahl). Eine Schwankungsbreite von 1,5 zwischen der Molkekontrolle und der Probe wird als normal (innerhalb der Grenze des Verfahrens) angesehen.

4. Diskussion

Dass Muttermilch ein potentieller Überträger der HCMV-Infektion sein könnte, wurde erstmals von Diosi et al. formuliert: Aus einer von 49 Muttermilchproben wurde HCMV isoliert (Diosi et al., 1967). Fünf Jahre später machten Hayes et al. folgende Beobachtung: Bei 17 von 63 seropositiven Müttern wurde HCMV aus der Muttermilch isoliert (Hayes et al., 1972). Weitere zwei Jahre später berichteten Stagno et al., dass die hohen Infektionsraten bei HCMV nicht alleine durch die intrauterine Transmission erklärbar seien. Nach ihren Untersuchungen schieden 58% der Kinder, die durch Muttermilch mit HCMV infiziert worden waren, das Virus im Urin aus (Stagno et al., 1980). Nachdem in den 90er Jahren HCMV-negative Blutprodukte für die Neonatologie eingeführt worden waren, wurde der Infektionsweg über die Muttermilch zunehmend bedeutender.

Vom 1. Juli 1995 bis 30. Juni 1998 wurden in Tübingen Mutter-Kind-Paare bezüglich der HCMV-Transmission über Muttermilch untersucht. In die Studie wurden solche Kinder aufgenommen, die weniger als 1500 g wogen und ein Gestationsalter <32. Schwangerschaftswoche aufwiesen. In einer ersten Auswertung gelang Maschmann et al. der Nachweis der lactogenen HCMV-Infektion bei Frühgeborenen. Von den insgesamt 170 Frühgeborenen waren 80 Kinder seronegativer Mütter, 90 Kinder seropositiver Mütter, drei dieser Mütter schieden das Virus nicht in der Muttermilch aus. Das eigentlich Überraschende ist jedoch die extrem hohe Reaktivierungsrate stillender Mütter von Frühgeborenen (Hamprecht et al., 97%; Vochem et al., 93%). Von 87 HCMV-exponierten Frühgeborenen hatten sich 33 infiziert (38%), davon zeigten 16 mindestens 1 Symptom (Hamprecht et al., 2001). Es traten Thrombozytopenie, Granulozytopenie, Hepatopathie sowie Apnoen und Bradykardien auf (Maschmann et al., 2001). Alle infizierten Kinder hatten HCMV-infizierte Muttermilch erhalten. In der Kontrollgruppe von HCMV-negativen Mutter-Kind-Paaren war weder HCMV in der Muttermilch zu detektieren (über Viruskultur und PCR), noch war eine HCMV-Infektion bei einem der Frühgeborenen nachweisbar. Diese Tatsache untermauert die These, dass Muttermilch eine

Hauptursache der postnatalen HCMV-Infektion darstellt (Stagno und Cloud, 1994).

Inwiefern die Entwicklung eines Kindes, welches in der frühgeborenen Phase mit HCMV infiziert wurde, beeinflusst wird, lässt sich bis zum heutigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit voraussagen. So wurde 2002 wurde in einer australischen Arbeitsgruppe diskutiert, ob die HCMV-Transmission über die Muttermilch auf Frühgeborene eine klinisch relevante Rolle spielt (Bryant et al., 2002). Die Arbeitsgruppe bezog sich in ihrem Review hauptsächlich auf die Tübinger Arbeiten von Hamprecht et al., 2001, Maschmann et al., 2001 und Vochem et al., 1998. In der Studie von Hamprecht et al. lag die HCMV-Transmissionsrate bei 37% und die postnatale Infektionsrate bei 38%, die seronegative Kontrollgruppe umfasste 69 stillende Mütter und deren 80 Kinder, wovon keines das Virus im Urin ausgeschieden hat (Hamprecht et al., 2001). Bryant et al. wiesen nochmals besonders darauf hin, dass der größte Teil der Kinder durch Kaiserschnitt entbunden wurde (87%) und somit eine vaginale Infektionsquelle zur Mehrheit ausgeschlossen werden kann. Diese Autoren thematisierten, wie eine Transmission auf Frühgeborene erfolgreich verhindert werden kann (Bryant et al., 2002). Untersuchungen der australischen Arbeitsgruppe haben ergeben, dass nach Kryoinaktivierung über zehn Tage (bei -20°C) immer noch Virus detektiert werden kann, wenngleich diese Methode auch zu einer niedrigeren Transmissions- und Infektionsrate bei Frühgeborenen beitragen kann (Bryant et al., 2002).

In der Studie von Sharland et al. wurden 18 Kinder untersucht, deren Mütter einen positiven HCMV-Serostatus aufwiesen. Das mediane Gestationsalter lag hier bei 28 Wochen. Lediglich bei einem der 18 Kinder konnte HCMV aus der Urinkultur nachgewiesen werden. Das Kind war klinisch asymptomatisch. Aus diesem Ergebnis schlossen die Autoren, dass diese niedrige Infektionsrate im Gegensatz zu Hamprecht et al. damit zusammenhing, dass die Muttermilch, bevor sie an die Kinder weiter gegeben wurde, über 72 Stunden bei -20 °C eingefroren worden war (Sharland et al., 2002).

Scheinbar konträr zu den Ergebnissen von Hamprecht et al., 2001 stehen die Ergebnisse von Yasuda et al., 2003. Die Arbeitsgruppe evaluierte die Kinetik

der Viruslast in der Muttermilch und die Rate der postnatalen HCMV-Transmission. Insgesamt wurden 30 Mütter und ihre 43 Frühgeborenen untersucht. Gestationsalter war <34 Wochen, Gewicht <2000 g. Muttermilch, Serum und Urinproben wurden alle 2 Wochen bis zur Entlassung gesammelt. Diese Proben wurden auf HCMV mittels Real-Time-PCR untersucht. Der größte Teil der Muttermilch wurde jedoch vor Gabe an die Kinder bei -20 °C aufbewahrt. Die Ergebnisse bei dieser Untersuchung stellten sich wie folgt dar: 24 Mütter (mit 34 Kindern) waren HCMV-lgG positiv (80%), 21 davon (mit 30 Kindern) hatten nachweisbare HCMV-DNA in der Muttermilch (87,5). Von insgesamt 30 Kindern, welche mit HCMV positiver Muttermilch gefüttert wurden und wo auch die DNA nachweisbar war, wurde bei 3 Kindern (10%) eine HCMV-Infektion festgestellt. Sie zeigten jedoch keine klinischen Symptome. Bei den sechs seronegativen Müttern war die Muttermilch HCMV-negativ und bei den insgesamt 9 Kindern dieser Mütter war weder im Serum noch im Urin HCMV-DNA nachzuweisen (Yasuda et al., 2003). Die Diskrepanz zwischen dieser niedrigen Transmissionsrate (10%) trotz hoher Reaktivierungsrate von 87,5% und der hohen Transmissionsrate von 37% bei Hamprecht et al., führte die Arbeitsgruppe einerseits auf die Studienpopulation zurück: medianes Gestationsalter 31 gegenüber 29 Wochen und medianes Geburtsgewicht von 1360 g gegenüber 1100 g, andererseits auf die unterschiedliche Behandlung der Muttermilch. Tatsächlich wurde aber in der japanischen Studie die Muttermilch vor Gabe bei -20 °C eingefroren, während bei der deutschen Studie die Muttermilch lediglich bei 4-10 °C bis zur Gabe aufbewahrt wurde. Dieses Procedere hat höchstwahrscheinlich dazu beigetragen, dass die HCMV-Infektion durch die Übertragung von Muttermilch in den untersuchten japanischen Frühgeborenen keine große Rolle spielte (Yasuda et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wie diese japanische Studie zeigte auch eine Untersuchung einer südamerikanischen Arbeitsgruppe: Es wurden Kinder seropositiver Mütter untersucht (n=95) (Gestationsalter: <34. Schwangerschaftswoche). Eine Infektion konnte bei insgesamt 21 Kindern beobachtet werden und im Urin konnte HCMV detektiert werden. Aber nur bei einem Kind traten auch klinische Symptome auf, die möglicherweise auf eine

HCMV-Infektion zurückzuführen waren. Es handelte sich dabei um ein Kind mit einem Geburtsgewicht von 830 g und einem Gestationsalter von 28 Wochen. Die Mutter des Kindes war HIV-positiv. Die Ergebnisse führten die Autoren u.a. auf unterschiedliche Art der Lagerung und Handhabung der Muttermilch im Vergleich zu anderen Studien sowie auf das unterschiedliche Gestationsalter zurück. Während des Untersuchungszeitraumes wurde entweder Muttermilch verwendet, die nach dem Holder-Verfahren pasteurisiert worden war, oder Muttermilch, welche über acht Stunden bei 4 °C über 19 Tage aufbewahrt worden war (Mussi-Pinhata et al., 2004).

In Taiwan weisen 95% der schwangeren Frauen eine Seropositivität bezüglich HCMV auf. Eine Studie von Jim et al. beinhaltete insgesamt 38 Mütter und 42 Kinder, das Gestationsalter lag unter 35 Wochen und das Geburtsgewicht unter 1500 g. Der Untersuchungszeitraum lag zwischen Juli 2000 und Februar 2002. 36 Mütter waren seropositiv (97,3%), eine Mutter war seronegativ und eine weitere wurde aus dem Untersuchungskollektiv ausgeschlossen. Bei der seronegativen Mutter konnte kein Virus in der Muttermilch nachgewiesen werden und ihr Frühgeborenes zeigte keine Zeichen einer Infektion. Bei insgesamt 35 Müttern (97,3%) wurde HCMV-DNA in der Muttermilch nachgewiesen. Sechs Kinder von insgesamt fünf Müttern zeigten eine Infektion und 34 Kinder von 31 Müttern zeigten keine Infektion. Zwischen diesen beiden Gruppen gab es keinen wesentlichen Unterschied bezüglich Gestationsalter, Geburtsgewicht, Geschlecht, Alter der Mutter oder der Art der Entbindung. Bei einer Mutter war zwar eine Virolaktie festzustellen, in diesem Fall fand aber keine Transmission statt. Die Transmissionsrate errechnete sich somit aus fünf von 36 und ergab 13,8%. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die Transmission des Virus auch eine hohe Viruslast fordert. HCMV-DNA wurde in der infizierten Gruppe früher entdeckt als in der nicht infizierten Gruppe. Im Kontrast zu der hohen Prävalenz von seropositiven Müttern und der HCMV-DNA-Detektion in der Muttermilch waren die Infektions-und Transmissionsraten (13,8%) bei diesen untersuchten Patienten wie auch bei Yasuda et al. niedriger als bei anderen Studien (Hamprecht et al., 2001). Dies hängt höchstwahrscheinlich damit zusammen, dass die Muttermilch bei -18 °C

für mehrere Tage eingefroren worden war, bevor sie an die Kinder weitergegeben wurde. (Jim et al., 2004).

Vor dem Hintergrund dieser aktuellen Problematik stellte sich nun Willeitner in einem Review die Frage, ob bezüglich der HCMV-Übertragung durch Muttermilch auf Frühgeborene neue Stillempfehlungen erarbeitet werden müssen; zumal bei neun von zehn HCMV-seropositiven Müttern während der Laktationsperiode eine Ausscheidung des Virus über die Muttermilch stattfindet. Sie beschreibt eine Seroprävalenz bei Müttern von 49% (Deutschland) bis 71% (USA). Nach Recherche der Autorin zeigen die erhobenen Werte bezüglich der HCMV-Ausscheidung durch die Muttermilch eine große Streubreite (16-70%). Willeitner erklärte sich diese Diskrepanz dadurch, dass zur Erhebung dieser Werte einerseits unterschiedliche Milchvolumina verwendet wurden und andererseits unterschiedliche Testverfahren herangezogen wurden. Bezüglich der Transmissionsraten ging die Autorin hauptsächlich auf die Studie von Hamprecht et al., 2001 und Vochem et al., 1998 ein (37-59%). Wenngleich die Übertragung von HCMV via Muttermilch kein sehr häufiges Ereignis sei (wohl unter Nichtberücksichtigung einer Milchvorbehandlung, etwa Gefriertaulagerung), so spräche die Schwere der Krankheit für sich und fordere eine klare Definition bezüglich der Hochrisikogruppe für den Erwerb einer HCMV-Infektion durch den Übertragungsweg Muttermilch. Wie sollte jedoch die Prävention aussehen? Zur Klärung dieser Frage beleuchtete die Verfasserin die unterschiedlichen Verfahren der HCMV-Inaktivierung in der Muttermilch. Bei der Holder-Pasteurisierung kann zwar eine Inaktivierung des Virus erreicht werden, jedoch werden auch andere wichtige Faktoren zerstört. Was die Inaktivierung durch Einfrieren betrifft, sollte untersucht werden, ob eine Reduktion von HCMV dazu führen kann, das klinische Risiko einer Infektion zu reduzieren. Nach Meinung der Autorin umfasste die Studie von Sharland et al. mit 18 Kindern eine zu kleine Studienpopulation, außerdem war der follow-up Zeitraum von 67 Tagen zu gering, um eine klare Aussage treffen zu können. Zur Klärung dieser aufgeworfenen Problematik forderte die Autorin eine prospektive randomisierte klinische Studie, in der Kinder verglichen werden sollen, die entweder unbehandelte, pasteurisierte oder kryoinaktivierte Muttermilch von

seropositiven Müttern erhalten. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob bei Müttern gefährdeter Kinder eine Testung auf HCMV-lgG durchgeführt werden sollte. Die Autorin verlangte eine prospektive Studie mit Frühgeborenen,deren Mütter entweder seropositiv oder seronegativ sind, um die Frequenz von Symptomen von exponierten und nichtexponierten zu vergleichen (Willeitner, 2004).

In Tabelle 41 sind die Studien der letzten Jahre zusammengefasst. Dargestellt hierbei sind u.a. die Verarbeitung der Muttermilchproben, die Transmissionsraten sowie die klinischen Auswirkungen. Dabei waren nur wenige Studien mit den Tübinger Daten vergleichbar (Hamprecht et al., 2005). Wurde die Muttermilch zuerst kryoinaktiviert, so wurde einerseits die Transmissionsrate im Vergleich zu Tübinger Studien reduziert, andererseits sah man auch hier symptomatisch infizierte Kinder aufgrund unzureichender HCMV-Inaktivierung. In der Studie von Meier et al. entwickelten zwei von 21 Kindern „Sepsis-ähnliche Symptome“. Beide konnten erfolgreich mit Ganciclovir behandelt werden (Meier et al., 2005). Miron et al. zeigten eine sehr niedrige Transmissionsrate, aber eines der vier Kinder entwickelte eine schwere HCMV-assoziierte Erkrankung (Miron et al., 2005). Es kommt also in weniger als 10% der gestillten Risiko-Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1000 g und einem Gestationsalter <30. Schwangerschaftswoche zu einer symtomatischen HCMV-Infektion des Frühgeborenen, im Falle einer Infektion können jedoch sehr schwerwiegende Folgen auftreten.

Tab. 42: Daten zur HCMV-Transmission über Muttermilch auf Frühgeborene

GA: Gestationsalter
w: Woche
SLS: sepsis-like symptoms
NEC: nekrotisierende Enterokolitis

Zitat	Nativmilch?	Infektionsrate exponierter Kinder	Symptomatisch infizierte Frühgeborene
Hamprecht et al. 2001; Deutschland	ja	38% (33/87)	12% (4/33); GA: 24, 25, 24, 28 w: SLS
Maschmann et al. 2001; Deutschland	ja	38% (33/87)	12% (4/33) SLS
Mosca et al. 2001; Italien	ja	25% (5/20)	keine
Pugni et al. 2002; Italien	ja	39% (13/33)	8% (1/13) SLS
Miron et al. 2005; Israel	ja	6% (4/70)	25% (1/4) SLS
Meier et al. 2005;	ja	55% (21/55)	9% (2/21) SLS
Sharland, Khare 2002; Großbritanien	Pasteurisiert und/oder kryoinaktiviert bei -20 °C für 72 Stunden	6% (1/18)	keine
Yasuda et al. 2003; Japan	hauptsächlich bei -20 °C kryoninaktiviert	10% (3/30)	0% (0/3)
Cheong et al. 2003; Großbritanien	ja, aber auch bei -20 °C kryoinaktiviert	?	50% (8/16 Diarrhoe und NEC; 4/16 NEC; 2/16 gestorben)
Jim et al. 2004; Taiwan	jede Milch bei -18 °C kryoinativiert	15% (6/40)	83% (5/6)SLS
Mussi-Pinhata et al. 2004; Brasilien	teilweise ja (52%)	22% (21/95)	0% (0/21)
Doctor et al. 2005; Kanada	ja, aber auch bei -20 °C kryoinaktiviert (über 3 Monate)	6% (4/65)	25% (1/4) SLS

Auch Curtis et al. untersuchten die Effizienz der Kryoinaktivierung. Sie untersuchten dazu unterschiedliche Milchproben, die bei -20 °C über 48 Stunden eingefroren worden waren. Sie erhielten folgende Ergebnisse: HCMV konnte aus allen Proben, die über 24 Stunden kryoinaktiviert worden waren, kultiviert werden sowie bei fünf von sieben, die diesem Verfahren für 48 Stunden ausgesetzt wurden. In drei Proben konnte das Virus sogar noch nach zehn Tagen Behandlung detektiert werden. Die Autoren konnten somit belegen,

dass das Verfahren der Kryoinaktivierung zur Elimination von HCMV aus der Muttermilch für Frühgeborene nicht geeignet ist (Curtis et al. 2005).

Auf HCMV als Überträger einer Infektion bei Frühgeborenen weisen auch Kerrey et al. hin. Die Arbeitsgruppe empfiehlt zur Evaluation der HCMV-Viruslast in Muttermilch die Real-Time-PCR. In einer Fallstudie stellten die Autoren ein Kind vor, welches sowohl frische als auch kryoinaktivierte Muttermilch erhalten hatte und dabei schwer an HCMV erkrankt war (Kerrey et al., 2005).

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit stellt sich also die Frage, wie eine postnatale HCMV-Transmission effektiv verhindert werden kann und welches Verfahren hierfür am besten geeignet sein könnte. Zur Erreichung dieses Ziels sollte die Muttermilch so behandelt werden, dass das HCMV-Virus inaktiviert wird, jedoch gleichzeitig die immunologischen und ernährungsphysiologischen Vorteile der Muttermilch erhalten bleiben. Während das Holder-Verfahren zwar das erste Problem effektiv löst und bei der Kryoinaktivierung zwar die Muttermilch schonend behandelt, aber die virale Aktivität nicht vollständig eliminiert wird, könnte die Kurzzeithitzepasteurisierung zur Lösung des Problems beitragen

In einer aktuellen Veröffentlichung im Kontext der vorliegenden Arbeit wird die geschilderte Problematik nochmals aufgegriffen und verschiedene Inaktivierungsmethoden einander gegenübergestellt (Hamprecht et al., 2004) Zu Beginn der Untersuchung wurde bei den verschiedenen Inaktivierungsmethoden der virale DNA-Gehalt in der Molke verglichen. Weder die Kryoinaktivierung noch das Holder-Verfahren oder die Kurzzeithitzeinaktivierung reduzierten die virale DNA-Last wesentlich. Was die Kryoinaktivierung anbelangt, so konnte die HCMV-Infektiosität nur in einem von zehn Versuchen eliminiert werden. Bei gespikter Milch (artifiziell infizierter Milch) wurde die Infektiosität durch Kryoinaktivierung bei -20 °C über zehn Tage um 80% reduziert, dabei waren aber immer noch 28 Plaques in der Mikrokultur nachweisbar. Diese Untersuchungen zeigten, dass hohe Viruslasten in der Milch nur sehr ungenügend eliminiert werden können (Hamprecht et al., 2004).

Diese in vitro Ergebnisse konnten durch einen aktuellen Fallbericht der Tübinger Arbeitsgruppe eindrucksvoll bestätigt werden. Die Autoren konnten zeigen, dass ein ausschließlich mit eingefrorener Muttermilch gefüttertes Frühgeborenes eine schwere HCMV-Infektion erwarb. So musste es am Tag 150 post partum reintubiert werden, nachdem es zuvor Muttermilch vom Tag 42 post partum erhalten hatte. Diese Milch war trotz Gefriertaulagerung über zwei Monate stark mit HCMV-Infektiosität belastet (Maschmann et al., 2006).

Im Gegensatz dazu gelang es beim Holder-Verfahren (n=4) und bei der Kurzzeithitzepasteurisierung (n=8) in jedem der insgesamt 12 Versuche, die Infektiosität vollständig zu eliminieren und auch die HCMV-RNA war danach nicht mehr nachweisbar. Was allerdings die Enzymaktivitäten betrifft, so wurden bei beiden Hitzeinaktivierungsverfahren (Holder-Verfahren und Kurzzeithitzeinaktivierung 5 Sekunden bei 72 °C) die Aktivitäten der AP und Lipase fast komplett zerstört, bei der Kryoinaktivierung über 10 Tage bei -20 °C wurden die Aktivitäten der AP, Lipase und des sIgA nicht beeinflusst.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der Kurzzeithitzepasteurisierung genauer untersucht: Verwendet man Inaktivierungsbedingungen von 62 °C und 2 Sekunden, so konnte die Aktivität der AP sogar teilweise bis zu 79% erhalten bleiben und die der Lipase bis zu 10%. Es hat sich jedoch während dieser Untersuchungen gezeigt, dass eine Inkubationsdauer von fünf Sekunden für die Durchführung der Kurzzeithitzepasteurisierung und besonders in Bezug auf die technische Realisierbarkeit vorzuziehen ist. Deswegen wurden hauptsächlich Rampenzeiten von fünf Sekunden bei unterschiedlichen Inkubationsdauern miteinander verglichen. Es wurden insgesamt 14 unterschiedliche Maximaltemperaturen untersucht. Als höchste Maximaltemperatur wurde 72 °C gewählt. Hier lag die Aktivität der AP nur bei 4,95 % (Mittelwert; Erwartungswert). Wurde die Maximaltemperatur zunehmend verringert, so lag die beobachtete Aktivität der AP bei einer Inkubationstemperatur von 62 °C bei 42,65% und bei einer Inkubationstemperatur von 60 °C immerhin bei 71,31%. Bei dieser gewählten Maximaltemperatur lag die Aktivität der Lipase bei 5,35% (Mittelwert; Erwartungswert). Obwohl der Aktivitätswert für die Lipase noch im

unteren Bereich lag, wird eine Maximaltemperatur von 60 °C als optimal angesehen, da bei allen untersuchten Proben (n=14) ein Inaktivierungserfolg von über 99% erreicht werden konnte. Bei einer weiteren Verringerung der Inkubationstemperatur kann aus virologischer Sicht keine optimale Inaktivierung mehr gewährleistet werden.

Vergleicht man das Holder-Verfahren mit der Kurzzeithitzepasteurisierung, so ergab sich für die Aktivität der AP ein Wert von 4,7 % (Median) und für die Aktivität der Lipase ein Wert von 2,9% (Median). Die Aktivitäten der beiden Markerenzyme liegen also deutlich unter den errechneten Werten der Enzyme für das Kurzzeithitzeinaktivierungsverfahren.

Die oben dargestellten Werte beziehen sich allerdings nur auf die Spiking-Experimente. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass auch bei den natürlich infizierten Muttermilchproben eine Maximaltemperatur von 60 °C bezüglich dem Inaktivierungserfolg und den Aktivitäten der beiden Markerenzyme als optimal anzusehen ist.

Untersuchte man die seropositiven Muttermilchproben auf virusspezifische Antikörper mittels eines rekombinanten HCMV-lgG-Immunblotverfahrens, so konnte man erkennen, dass Transmitterinnen im Vergleich zu Nontransmitterinnen ein anderes Antikörpermuster in der Muttermilch aufweisen. Bei einer Muttermilchprobe einer Non-Transmitterin konnten keine gB-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, sondern lediglich Antikörper gegen p150. Bei den Transmitterinnen dagegen konnten gB-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, was für eine Reaktivierung spricht. Diese bisherige präliminäre Datenkonstellation spricht tendenziell dafür, dass man Nontransmitterinnen sowie Transmitterinnen allein durch ihr Antikörpermuster erkennen kann, was durch weitere Untersuchungen noch belegt werden muss.

Ferner wurden die seropositiven Muttermilchproben mittels quantitativer HCMV-PCR untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass sich durch die Kurzzeithitzepasteurisierung die DNA-Kopienzahl nicht signifikant reduziert. Dies bestätigt frühere Befunde (Hamprecht et al., 2004).

Aufgrund verfügbarer Daten sollte Muttermilch, die an ein noch zu definierendes Kollektiv von Risiko-Frühgeborenen verabreicht wird, einer

Kurzzeithitzepasteurisierung bei einer Maximaltemperatur von 60 °C und einer Inkubationsdauer von fünf Sekunden unterzogen werden. Auch die schwedische Virologin Forsgren kommentierte, dass die Kurzzeithitzeinaktivierung mit der Generierung eines dünnen Milchfilms ein sehr vielversprechender Ansatz sei. Die Elimination von HCMV aus der Muttermilch ohne die wichtigen Inhaltsstoffe zu zerstören ist ein großes Ziel. Deshalb könnte die Kurzzeitpasteurisierung, die die Infektiosität eliminiert, auch für Spendermilch verwendet werden (Forsgren, 2004). Die beiden verfügbaren Alternativverfahren zur HCMV-Inaktivierung können nicht als optimal angesehen werden, da sie entweder nicht virussicher (Gefriertaumethode) oder nicht schonend (Holder-Verfahren) sind.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sowohl das Holder-Verfahren (Ford et al., 1977; Molnar et al., 1969) sowie die Kryoinaktivierung wegen unzureichender Virusinaktivierung nicht empfohlen werden kann.

Weitere biochemische Analysen der Muttermilch nach Kurzzeithitzeinaktivierung (fünf Sekunden bei 60 °C) sind erforderlich, um die Qualität dieses virussicheren Verfahrens zu beschreiben.

5. Zusammenfassung

Während der Laktation wird HCMV mit einer Reaktivierungsrate von 96% über die Muttermilch seropositiver stillender Mütter ausgeschieden. Diese Rate entspricht somit der Seroprävalenz und die postnatale HCMV-Transmission (von bis zu 37%) durch stillende Mütter repräsentiert die Hauptinfektionsquelle für Neugeborene.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit das Verfahren der Kurzzeithitzepasteurisierung <72 °C die HCMV-Übertragung via Muttermilch verhindern kann und inwieweit es sich von dem etablierten Verfahren der Langzeithitzepasteurisierung (Holder-Verfahren) unterscheidet. Die Inaktivierung erfolgte mittels eines Prototyps (Firma Lauf, Tübingen), mit dem die optimalen Inaktivierungsbedingungen (Temperatur; Zeit) eingestellt werden konnten. Insgesamt wurden 51 verschiedene seronegative und sieben seropositive Muttermilchproben untersucht. Die 51 seronegativen Proben stammten von 33 unterschiedlichen Spenderinnen. Die sieben seropositiven Proben von vier unterschiedlichen stillenden Müttern.

Es zeigte sich, dass eine Maximaltemperatur von 60 °C und eine Rampentemperatur von fünf Sekunden als optimal angesehen werden kann, da bei dieser Temperatur ein ausreichender Inaktivierungserfolg zu verzeichnen ist (>99% bei n=14) und die beiden Markerenzyme Alkalische Phosphatase und Lipase eine ausreichende Aktivität aufweisen. AP: 71,31% (Erwartungswert) gegenüber 4,7% (Median) beim Holder-Verfahren. Lipase 5,35% (Erwartungswert) gegenüber 2,9% (Median) beim Holder-Verfahren. Diese Werte beziehen sich auf die Spiking-Experimente, korrelieren aber mit den Werten bei natürlich infizierter Muttermilch.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Verfahren der Kurzzeithitzeinaktivierung zur Verhinderung einer Übertragung von HCMV als derzeit beste Option dient, da auch nach Kryoinaktivierung keine ausreichende Zerstörung von HCMV, im Falle einer maximalen Viruslast (ca. 40-60 Tage post partum), erreicht werden kann und die Kurzzeithitzeinaktivierung sowohl virussicher als auch schonend durchgeführt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. Scand J Infect Dis. 1999; 31: 443-57.

2. Balcarek KB, Warren W, Smith RJ, Lyon MD, Pass RF. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. J Infect Dis. 1993; 167:1433-6.

3. Berkow SE, Freed LM, Hamosh M, Bitman J, Wood DL, Happ B, Hamosh P. Lipases and lipids in human milk: effect of freeze-thawing and storage. Pediatr Res 1984; 18:1257-62.

4. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. Pediatr Infect Dis J. 1992;11:93-9.

5. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. Intervirology 1996; 39:401-12.

6. Bryant P, Morley C, Garland S, Curtis N. Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies: does it matter? Arch Dis Child Fetal Neonatol Ed. 2002; 87:75-7.

7. Cheong JL, Cowan FM, Modi N. Gastrointestinal manifestations of postnatal cytomegalovirus infection in infants admitted to a neonatal intensive care unit over a five year period. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004; 89:367-9.

8. Chuang NN. Alkaline phosphatase in human milk: a new heat-stable enzyme. Clin Chim Acta.1987;169:165-74.

9. COBAS AMPLICOR Analyser, Betriebsanleitung. Roche Diagnostics, Mannheim, 1998.

10. Curtis N, Chau L, Garland S, Tabrizi S, Alexander R, Morley CJ. Cytomegalovirus remains viable in naturally infected breast milk despite frozen for 10 days. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2005; 90:529-30.

11. Daiminger A, Bader U, Eggers M, Lazzarotto T, Enders G. Evaluation of two novel enzyme immunoassays using recombinant antigens to detect cytomegalovirus-specific immunglobulin M in sera from pregnant women. J Clin Virol. 1999; 13:161-71.

12. Diosi P, Babusceac L, Nevinglovschi O, Kun-Stoicu G. Cytomegalovirus infection associated with pregnancy. Lancet. 1967; 2:1063-6.

13. Doctor S, Friedmann S, Dunn MS, Asztalos EV, Wylie L, Mazzuli T, Vearncombe M, O´Brien K. Cytomegalovirus transmission to extremely low-birthweight infants through breast milk. Acta Pediatr. 2005; 94:53-8.

14. Dworsky M, Stagno S, Pass RF, Cassady G, Alford C. Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage. J Pediatr. 1982; 101:440-3.

15. Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF, Alford CA. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. Pediatrics. 1983; 72:295-9.

16. Eggers M, Bader U, Enders G. Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. J Med Virol. 2000; 60:324-30.

17. Ellis LA, Mastro AM, Picciano MF. Milk-borne prolactin and neonatal development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1996; 1:259-69.

18. Embil JA, Ozere RL, Haldane EV. Congenital cytomegalovirus infection in two siblings from consecutive pregnancies. J Pediatr. 1970; 77:417-21.

19. Evans TJ, Ryley HC, Neale LM, Dodge JA, Lewarne VM. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. Arch Dis Child. 1978; 53:239-41.

20. Farber S, Wolbach SB. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (protozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of infants. Am J Pathol. 1932; 8:123-35.

21. Ford JE, Law BA, Marshall VM, Reiter B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. J Pediatr. 1977; 90:29-35.

22. Ford JE, Law BA, Marshall VM, Reiter B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. J Pediatr. 1977; 90:29-35.

23. Forsgren M. Comment on: Cytomegalovirus in breast-milk : reassessment of pasteurization and freeze-thawing. Pediatr Res. 2004; 56:526-8.

24. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? J Pediatr. 1999;135:60-4.

25. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med. 1992; 326:663-7.

26. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus Infection. Clin Infect Dis. 2004; 38:1035-7.

27. Friis H, Andersen HK. Rate of inactivation of cytomegalovirus in raw banked milk during storage at -20 degrees C and pasteurisation. Br Med J (Clin Res Ed). 1982; 285:1604-5.

28. Goelz R, Hamprecht K, Vochem M, Maschmann J, Speer CP, Jahn G, Poets CF. Breast feeding of very preterm infants of HCMV-seropositive mothers. Z Geburtshilfe Neonatol. 2004; 208:118-21.

29. Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TB, Alford ES, Garza C, Goldman AS. Rapid high-temperature treatment of human milk. J Pediatr 1984; 104:380-5.

30. Goldman AS, Garza C, Nichols BL, Goldblum RM. Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. J Pediatr 1982; 100:563-7.

31. Goldman AS. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunmodulating properties. Pediatr Infect Dis J 1993; 12:664-71.

32. Griffiths PD. Current managment of cytomeglaovirus disease. J Med Virol 1993; Suppl 1:106-111.

33. Grose C, Meehan T, Weiner CP. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by virus isolation after amniocentesis. Pediatr Infect Dis J. 1992; 11:605-7.

34. Hamilton TA, Gornicki SZ, Sussman HH. Alkaline phosphates from human milk. Comparison with isoenzymes from placenta and liver. Biochem J.1979; 177:197-201.

35. Hampl W, Mertens T. Zytomegalievirus. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie. Urban & Fischer, 2001:576-81.

36. Hamprecht K, Goelz R, Maschmann J. Breast milk and cytomegalovirus infection in preterm infants. Early Hum Dev. 2005; 81:989-96.

37. Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, Middledorp JM, Speer CP, Jahn G. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurzsation and freeze-thawing. Pediatr Res. 2004; 56:529-35.

38. Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. Lancet. 2001; 357:513-8.

39. Hamprecht K. Epidemilogie und Dynamik der Reaktivierung des humanen Cytomegalovirus (HCMV) während der Laktation. Habilitationsschrift, Medizinische Virologie, Universitätsklinikum Tübingen, 2003.

40. Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, Hahn-Zoric M, Silfverdal SA, Strandvik B, Telemo E. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. Pediatr Int. 2002; 44:347-52.

41. Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, Hahn-Zoric M, Silverdal SA, Strandvik B, Telemo E. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. Pediatr Int. 2002; 44:347-352.

42. Hayes K, Danks DM, Gibas H, Jack I. Cytomegalovirus in human milk. N Engl J Med. 1972; 287:177-8.

43. HCMV-IgG-Immunblot, Betriebsanleitung, Mikrogen, M-Neuried, 2003.

44. Hicks T, Fowler K, Richardson M, Dahle A, Adams L, Pass R. Congenital cytomegalovirus infection and neonatal auditory screening. J Pediatr. 1993;123:779-82.

45. Ho M. Cytomeglovirus infection after solid organ transplantation. In: Becker Y, Darai G, Huang ES. Molecular aspects of human cytomegalovirus diseases. Springer-Verlag, 1993:162-82.

46. Huang ES, Kowalik, TF. The pathogenicity of human cytomegalievirus: an overview. In: Becker Y, Darai G, Huang ES. Molecular aspects of human cytomegalovirus diseases. Springer-Verlag, 1993:1-45.

47. Human Milk Banking Association of North America. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. 2000.

48. Jim WT, Shu CH, Chiu NC, Kao HA, Hung HY, Chang JH, Peng CC, Hsieh WS, Liu KC, Huang FY. Transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. Pediatr Infect Dis J. 2004; 23:848-51.

49. Kerrey BT, Morrrow A, Geraghty S, Huey N, Sapsford A, Schleiss MR. Breast milk as a source for acquisition of cytomegalovirus (HCMV) in a premature infant with sepsis syndrome: detection by real-time PCR. J Clin Virol. 2006; 35:313-6.

50. Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, Jacobs RF, Vaudry W, Pass RF, Kiell JM, Soong SJ, Whitley RJ. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. J Pediatr. 2003; 143: 16-25.

51. LABU Muttermilchpasteur 20. Betriebsanleitung. Labor Buchdrucker, A-Ottensheim, 2000.

52. Lawrence RA, Howard CR. Given the benefits of breastfeeding, are there any contraindications? Clin Perinatol. 1999; 26:479-90.

53. Lawrence RA, Howard CR. Given the benefits of breastfeeding, are there any contraindications? Clin Perinatol. 1999;26:479-90.

54. Lawrence RM, Lawrence RA. Given the benefits of breastfeeding, what contraindications exist? Pediatr Clin North Am. 2001; 48:235-51.

55. Liebhaber M, Lewiston NJ, Asquith MT, Olds-Arroyo L, Sunshine P. Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. J Pediatr.1977; 91:897-900.

56. Manson WG, Weaver LT. Fat digestion in the neonate. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1997; 76:206-11.

57. Maschmann J, Hamprecht K, Dietz K, Jahn G, Speer CP. Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk. Clin Infect Dis. 2001; 33:1998-2003.

58. Maschmann J, Hamprecht K, Weissbrich B, Dietz K, Jahn G, Speer CP. Freeze thawing of breast milk does not prevent cytomegalovirus transmission to a preterm infant. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2006 in press.

59. May JT. Antimicrobial factors and microbial contaminants in human milk: recent studies. J Paediatr Child Health. 1994; 30:470-5.

60. Mazeron MC, Bertrand C, Colimon R, Perol Y. Early detection of cytomegalovirus from pathological matter and feces. Ann Med Interne (Paris). 1987; 138:328-30.

61. Meier J, Lienicke U, Tschirch E, Krüger DH, Wauer RR, Prösch S. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. J Clin Microbiol. 2005; 43:1318:24.

62. Michaels MG, Greenberg DP, Sabo DL, Wald ER. Treatment of children with congenital cytmegalovirus infection with ganciclovir. Pediatr Infect Dis J. 2003; 22: 504-9.

63. Miron D, Brosilow S, Felszer K, Reich D, Halle D, Wachtel D, Eidelman AI, Schlesinger Y. Incidence and clinical manifestations of breast milk-acquired cytomegalovirus infection in low birth weight infants. J Perinatol. 2005; 25:297-8.

64. Molnar M, Frank M, Osvath G. Methods and importance of the collection of human milk at blood tansfusion stations. Orv Hetil. 1969; 110:355-9.

65. Mosca F, Pugni L, Barbi M, Binda S. Transmission of cytomegalovirus. Lancet. 2001; 357:1800.

66. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, do Carmo Rego MA, Pinto PC, da Motta MS, Calixto C. Perinatal or early-postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants under 34 weeks gestation born to CMV-seropositive mothers within a high-seroprevalence population. J Pediatr. 2004; 145:685-8.

67. Peckham CS, Chin KS, Coleman JC, Henderson K, Hurley R, Preece PM. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. Lancet 1983; 1: 1352-5.

68. Plotkin SA. Is there a formula for an effective CMV vaccine? J Clin Virol. 2002; 25 Suppl 2:13-21.

69. Prix L. Phäno- und Genotypische Charakterisierung von Ganciclovir-Resistenten Humanen Cytomegaloviren. Dissertation der Fakultät für Biologie, Universität Tübingen, 1998.

70. Prösch S, Docke WD, Reinke P, Volk HD, Kruger DH. Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/monocyte progenitor cells and mature monocytes. Intervirology. 1999; 42:308-13.

71. Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Kruger DH, Volk HD, Docke WD. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. Virology. 2000; 272:357-65.

72. Pugni L, Caroppo S, Casciatii MC, Dido P, Giardinetti S, Fumagalli M, Barbi M, Mosca F. Breastfeeding and cytomegalovirus (CMV) infection in preterm infants. . Pediatr Res. 2002; 51:380.

73. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. J Clin Virol. 2004; 29: 71-83.

74. Ribbert H: Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. Zentralbl Allg Pathol 1904;15:945-48.

75. Rothe M, Hamprecht K, Lang D, Vornhagen R, Hinderer W, Sonneborn HH, Plachter B, Jahn G. Diagnostic differentiation of primary versus secondary/recurrent infection of human cytomegalovirus by using a recombinant gB ELISA. Biotest Bulletin 2000; 6:147-158.

76. Schanler RJ, Hurst NM, Lau C. The use of human milk and breastfeeding in premature infants. Clin Perinatol 1999; 26:379-98.

77. Schneweis KE. Herpes-Viren. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie Urban & Fischer, 2001:562-75.

78. Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. J Infect Dis. 1997; 175:533-44.

79. Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. J Infect Dis. 1997;175:533-44.

80. Sharland M, Khare M, Bedford-Russell A. Prevention of postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2002; 86:140.

81. Sinclair J, Sissons P. Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. Intervirology. 1996; 39:293-301.

82. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. J Gen Virol. 1995; 76:741-50.

83. Sinzger C, Jahn G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. Intervirology. 1996; 39:302-19.

84. Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc Soc Exp Biol Med. 1956; 92:424-30.

85. Smith MG. Propagation of salivary gland virus of mouse in tissue cultures. Proc Soc Exp Biol Med. 1954; 86:435-40.

86. Speer CP, Hein-Kreikenbaum H. Immunologische Bedeutung der Muttermilch. Monatsschr Kinderheilkd. 1993; 141:10-20.

87. Springer S. Leitlinie für die Einrichtung und zur Arbeitsweise von Frauenmilchbanken. Stillmanagment und Laktation 1. Leipziger Universitätsverlag 1998.

88. Springer S. News about human milk banking in Germany. Adv Exp Med Biol 2000; 478;441-442.

89. Stagno S, Cloud GA. Working parents: the impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:2384-9.

90. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. JAMA. 1986; 256:1904-8.

91. Stagno S, Reynolds DW, Huang ES, Thames SD, Smith RJ, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. N Engl J Med 1977; 296:1254-8.

92. Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. N Engl J Med. 1980; 302 :1073-6.

93. Stagno S, Tinker MK, Elrod C, Fuccillo DA, Cloud G, O´Beirne AJ. Immunglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunsorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. J Clin Microbiol. 1985; 21:930-5.

94. Stagno S. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995:312-353.

95. Taylor-Wiedeman J, Sisson JGP, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. J Gen Virol 1991; 72:2059-64.

96. Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. Pediatr Infect Dis J. 1998: 17:53-8.

97. Vochem M. CMV-Infektionen bei Neugeborenen: Prävalenz, Diagnostik und Therapie. Z Geburtshilfe Neonatol. 2003; 207:114-8.

98. Vollmer B, Seibold-Weiger K, Schmitz-Salue C, Hamprecht K, Goelz R, Kraegeloh-Mann I, Speer CP. Postnatally acquired cytomegalovirus infection via breastmilk: effects on hearing and development in preterm infants. Pediatr Infect Dis J. 2004; 23:322-7.

99. Weller TH. The cytomegalovirus: ubiquitous agents with protean clinical manifestations: N Engl J Med. 1971; 285:203-14.

100. Welsh J, May JT. Breast milk and infant infection. Med J Aust. 1979; 2:66-8.

101. Welsh JK, Arsenakis M, Coelen RJ, May JT. Effect of antiviral lipids, heat, and freezing on the activity of viruses in human milk. J Infect Dis. 1979; 140:322-8.

102. Whitley RJ. Congenital cytomegalovirus infection: epidmiology and treatment. Adv Exp Med Biol. 2004; 549:155-60.

103. Willeitner A. Transmission of cytomegalovirus (CMV) through human milk : are new breastfeeding policies required for preterm infants ? Adv Exp Med Biol. 2004; 554:489-94.

104. Wills ME, Han VE, Harris DA, Baum JD. Short-time low-temperature pasteurisation of human milk. Early Hum Dev. 1982; 7:71-80.

105. Witzel S. Postnatale Transmission des Humanen Cytomegalievirus: Untersuchungen zur zellassoziierten und zellfreien Präsenz von HCMV in Muttermilch. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Universität Tübingen, 2000.

106. Worth GK, Retallack RW, Gutteridge DH, Jefferies M, Kent J, Smith M. Serum and milk alkaline phosphatase in human lactation. Clin Chim Acta. 1981; 115:171-7.

107. Xanthou M, Bines J, Walker WA. Human milk and intestinal host defense in newborns: an update. Adv Pediatr. 1995; 42:171-208.

108. Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Ohshiro M, Kato Y, Matsuura O, Suzuki C, Morishima T. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. Pediatrics. 2003 ; 111 :1333-6.

109. Yow MD, Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus disease - 20 years is long enough. N Engl J Med. 1992;326:702-3.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Jahn, Direktor des Instituts für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. Dr. rer. Nat. Klaus Hamprecht, der mich als Leiter der Arbeitsgruppe intensiv betreut hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, sowie meine zahlreichen Fragen beantworten konnte.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus Dietz, Leiter des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen, danke ich für die kompetente und engagierte Unterstützung bei der Auswertung meiner Daten.

Gedankt sei ebenfalls Herrn Dr. Dr. rer. nat. Ingo Besenthal und seinen Mitarbeitern für die Auswertung der Markerenzyme.

Auch bei den Mitarbeitern der Abteilung Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen, möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Besonders Frau Kisch, die meine Wünsche nach Muttermilch entgegen nahm.

Ebenso danke ich allen Müttern, die durch ihre Milchgabe diese Untersuchungen überhaupt erst ermöglicht haben.

Ein großer Dank gilt auch Andrea Baumeister und Elfriede Mikeler, die mir im Labor eine nette Gesellschaft waren und meine Fragen bezüglich der praktischen Arbeit immer geduldig beantwortet haben.

Zuletzt möchte ich besonders meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und ihr großes Verständnis danken.

Curriculum vitae

Denise Katharina Müller
geboren am 20.09.1978 in Offenburg;
ledig

SCHULAUSBILDUNG

Sept. 1985 - Juni 1998	Hans-Furler-Grundschule und Hans-Furler-Gymnasium in Oberkirch
	Abitur: 22.06.1998

STUDIUM

Okt. 1999 - Apr. 2000	Studium der molekularen Biotechnologie Universität Bielefeld
Apr. 2000 - aktuell	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 2002	Physikum
März 2003	Erstes Staatsexamen
Okt. 2005	Zweites Staatsexamen
24.11.2006	Drittes Staatsexamen

FAMULATUREN / PRAKTISCHES JAHR

Aug. 2002	Prof. Dr. Nolte, Medizinische Klinik, St. Josefsklinik Offenburg
Sept. - Okt. 2003	Prof. Dr. Offensperger, Ambulanz und Notaufnahme der Inneren Medizin St. Josefsklinik Offenburg
März 2004	District General Hospital, Eastbourne (GB) - Associate University Teaching Hospital University of London - Cardiology
Sept. - Okt. 2004	Prof. Dr. Otte, Kinderklinik Bielefeld
ab Okt. 2005	Praktisches Jahr in Esslingen am Neckar

PROMOTION

Apr. 2003 - Okt. 2004	Praktische Laborarbeit: Kurzzeithitze-pasteurisierung zur Inaktivierung von HCMV in der Muttermilch
März 2004	Teilnahme an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie: „ A new gentle method for virus inactivation in human milk.“ Hamprecht K, Müller D, Maschmann J, Dietz K, Goelz R, Besenthal I, Gerhard J.

VERÖFFENTLICHUNGEN im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Hamprecht K, Maschmann J, Muller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, Middledorp JM, Speer CP, Jahn G. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurzsation and freeze-thawing. Pediatr Res. 2004; 56:529-35.