
Rationale und rationelle EBV-Diagnostik im Leistungssport. Evaluation von Quer- und Längsschnittdaten bei Ausdauerathleten unterschiedlicher Leistungsklassen¹

Torben Pottgiesser*, Olaf Schumacher*,
Bernd Wolfarth** (Projektleiter Sportmedizin),
Georg Bauer*** (Projektleiter Virologie)

* Medizinische Universitätsklinik Freiburg,
Abt. Rehabilitative und Präventive Sportmedizin

** TU München, Abt. Präventive und Rehabilitative Sportmedizin

*** Klinikum der Universität Freiburg,
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Abt. Virologie,

1 Problem

Bei abnehmender Leistungsfähigkeit im Sport und Verlust von Trainings- und Wettkampfform wird häufig an eine akute Epstein-Barr Virus (EBV)-Infektion gedacht, besonders wenn Leistungsminderung und grippeähnliche Symptome gleichzeitig vorliegen. Gängige serologische Testmethoden liefern nicht in jedem Fall ein eindeutiges Ergebnis, weil sie nur den klassischen, nicht aber den aberranten serologischen Konstellationen Rechnung tragen. Mögliche Symptome einer akuten EBV-Infektion sind fieberhafte Angina tonsillaris, Pharyngitis, Lymphadenopathie und Splenomegalie. Diese sind in ihrem Erscheinungsbild sehr variabel, so dass der Differentialdiagnostik und adäquaten Serologie eine große Bedeutung zukommt, um das Bild der infektiösen Mononukleose klar von anderen Krankheitsbildern abzugrenzen.

Da in der Sportmedizin keine klaren Daten über Prävalenz, Inzidenz und Umgang mit serologischen Besonderheiten von EBV-Infektionen existieren, ist die Verunsicherung bei betroffenen Athleten, Trainern und betreuenden Ärzten immens. Dieses Projekt wurde beantragt, um die aktuelle Situation von EBV-Infektionen bei Ausdauerathleten an einem großen athletischen Probandengut mit altersentsprechender, nicht leistungssportlich aktiver Kontrollgruppe zu evaluieren. Heute ist mit dem Lineassay ein Testsystem verfügbar, das in Kombination mit der Aviditätsbestimmung besonders auch die nicht seltenen aberranten serologischen Konstellationen eindeutig zu diagnostizieren vermag (Bauer, 2001). Jedoch ist die Gültigkeit dieses neuen Testsystems, das auf rekombinant hergestellten Virusantigenen basiert, für eventuelle Besonderheiten bei Hochleistungssportlern noch

¹ VF 0407/01/64/2003

nicht überprüft worden. Mit dieser Studie sollte ein praxisrelevantes virologisches Prozedere ausgearbeitet werden, mit dessen Hilfe frische EBV-Infektionen schnell und sicher diagnostiziert bzw. ausgeschlossen werden können.

2 Methode

Erster Teil dieses Projektes war eine Fall-Vergleichs-Studie, in der der aktuelle EBV-Status von 202 Ausdauerathleten mit 200 Normalpersonen verglichen wurde. Im Rahmen der jährlichen sportmedizinischen Routineuntersuchung wurde bei Athleten der Disziplingruppen Biathlon, Ski nordisch und Radsport unterschiedlicher Bundes- und Landeskader jeweils eine Blutprobe entnommen und sachgerecht zur Serumgewinnung verarbeitet. Die 200 Seren der Kontrollgruppe stammen von altersentsprechenden, nichtrauchenden Studenten mit einer wöchentlichen sportlichen Aktivität von weniger als acht Stunden.

Im Fokus des zweiten Teil des Projektes stand die Untersuchung der EBV-Antikörpertiterverläufe von 15 Bundeskader-Ausdauerathleten im Vergleich zu zwölf Normalpersonen mit je vier bis sechs Seren eines Probanden, erhoben über einen Zeitraum von einem halben bis einem Jahr. Für die Normalpersonen galten die Auswahlkriterien wie die der Fall-Vergleichs-Studie.

In beiden Teilen der Studie wurde zur Ermittlung des EBV-Serostatus der Recomline EBV-IgG-Assay der Firma Mikrogen verwendet. Dieser Immunoassay mit rekombinant hergestellten Antigenen p72 (EBNA-1: EBV nuclear antigen), p18, p23 (VCA: virus capsid antigen), p138, p54 (EAs: early antigens) und BZLF1 (Sonderanfertigung für diese Studie) gilt als neuer Goldstandard in der EBV-Serologie (Bauer, 2001). Der EBV-Serostatus lässt sich anhand des Bandenmusters des Lineassays meist mit einem einzigen IgG-Test eindeutig bestimmen, da die Auswahl der Antigene auf dem Teststreifen sowohl den typischen als auch den aberranten serologischen Verläufen Rechnung trägt.

Die Sicherheit der serologischen Aussage kann in Einzelfällen noch durch Aviditätsbestimmung der IgG-Antikörper erhöht werden, die die Stabilität der Antigen-Antikörper Komplexe beschreibt (Andersson et al., 1994; Wolter et al., 1997; Bauer, 2001). So bietet sich eine zusätzliche Unterscheidung von frischen, kürzlichen und länger zurückliegenden Infektionen (die vorhandenen Antikörper sind bei Erstinfektionen niedrig avide, bei länger zurückliegenden Infektionen hoch avide). In beiden Teilen der Studie wurde für aberrante serologische Konstellationen eine Aviditätsbestimmung durchgeführt.

Für die Auswertung der Fall-Vergleichs-Studie erfolgte eine Kategorisierung des EBV-Status anhand des Bandenmusters der IgG-Antikörper und in Einzelfällen zusätzlich anhand der Avidität wie folgt: negativ (keine sicher positiven AK-Banden vorhanden), Erst-

infektion (p138-, p54-, p23-, BZLF1-IgG in jeder möglichen Kombination positiv, späte Marker p72-, p18-IgG noch negativ) kürzlich abgelaufen (Infektion, die länger als drei Wochen, aber weniger als zwei Monate zurückliegt, späte Marker können schon positiv sein, aber gering avid), klassisch abgelaufen (späte Marker p72-, p18-IgG deutlich vorhanden in Kombination mit positiver p23-Bande, p138-, p54-, BZLF1-IgG können in einigen Fällen positiv sein), abgelaufen ohne p72-IgG (der Marker p72-IgG ist nicht sicher nachweisbar, p18-IgG aber hoch avid), abgelaufen ohne p18-IgG (der Marker p18-IgG ist nicht sicher nachweisbar, p72-IgG aber hoch avid), unklar (nicht sicher positiv, Verunreinigung von Serum oder Testansatz möglich, Wiederholung sinnvoll). In Abbildung 1 werden exemplarisch die wichtigsten Serotypen und die Bestimmung des EBV-Serostatus mit dem Lineassay illustriert, wobei die erwähnten aberranten Konstellationen hier nicht berücksichtigt werden.

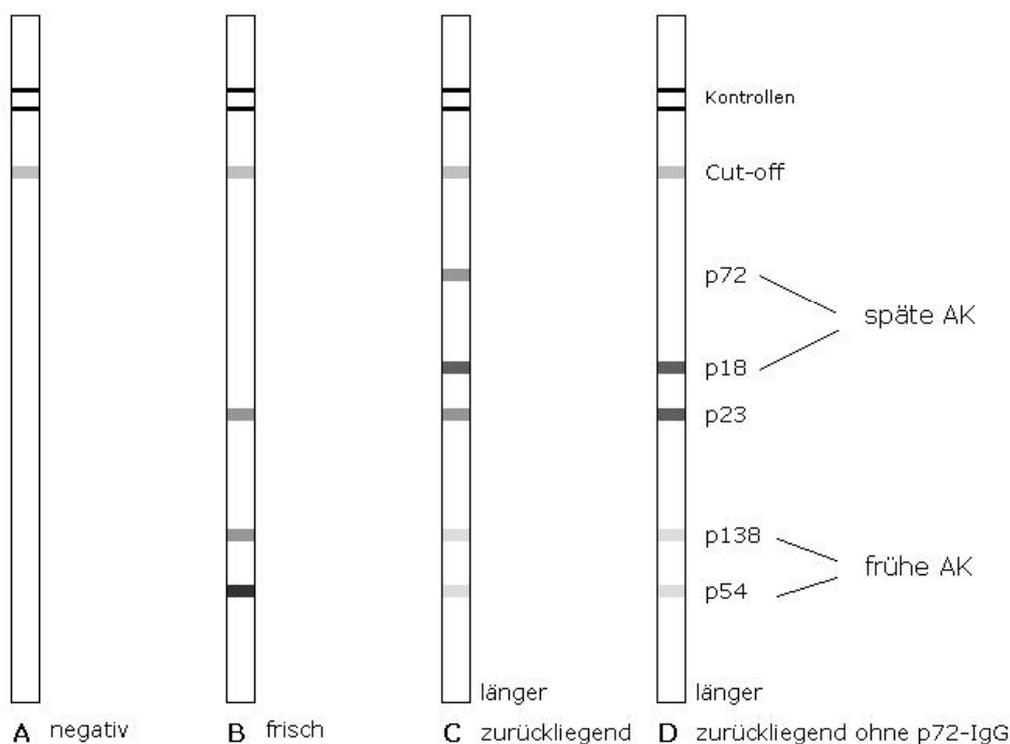


Abb. 1: Bestimmung des Serostatus mit Hilfe des Lineassay

Alle Teststreifen wurden zur quantitativen Auswertung mit einem Scansystem und einer Auswertesoftware erfasst. Gerade in der Longitudinalstudie erlaubt diese neue quantitative Methode eine genauere Verlaufsbeobachtung als die herkömmliche qualitative Auswertung der Teststreifen.

Zum Methodenvergleich und zur Qualitätskontrolle wurde für alle Seren der Fall-Vergleichs-Studie außerdem eine Testung mit dem herkömmlichen Verfahren der Immunfluoreszenztechnik (IFT) gegen VCA-IgG und EBNA-1-Antikörper durchgeführt.

3 Ergebnis

In der Fall-Vergleichs-Studie wurden im Sport-Kollektiv 35 (17,3 %) negative, eine (0,5 %) akute, elf (5,4 %) kürzlich abgelaufene, 122 (60,4 %) klassisch abgelaufene, 24 (11,9 %) abgelaufene Infektionen ohne p72-IgG, drei (1,5 %) abgelaufene Infektionen ohne p18-IgG und sechs (3,0 %) unklare Fälle gefunden. In der Gruppe der Normalpersonen wurden 31 (15,5 %) negative, eine (0,5 %) akute, eine (0,5 %) kürzlich abgelaufene, 135 (67,5 %) klassisch abgelaufene, 22 (11,0 %) abgelaufene Infektionen ohne p72-IgG, sechs (3,0 %) abgelaufene Infektionen ohne p18-IgG und vier (2,0 %) unklare Fälle gefunden. Zwischen Athleten und altersentsprechenden Normalpersonen konnte in der Gesamtbetrachtung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,144$) (Abbildung 2). In den Abbildungen 3 und 4 ist die quantitative Auswertung der Lineassay-Streifen dargestellt.

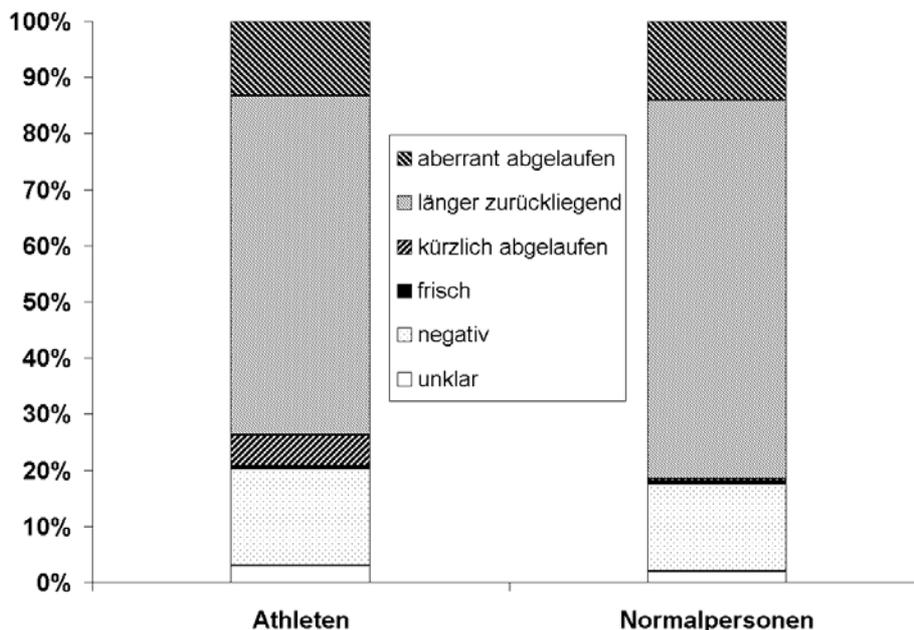


Abb. 2: Anteil der Infektionsstadien in den untersuchten Gruppen, abgelaufene Infektionen ohne p72-IgG und abgelaufene Infektionen ohne p18-IgG wurden als aberrant abgelaufene Infektionen zusammengefasst

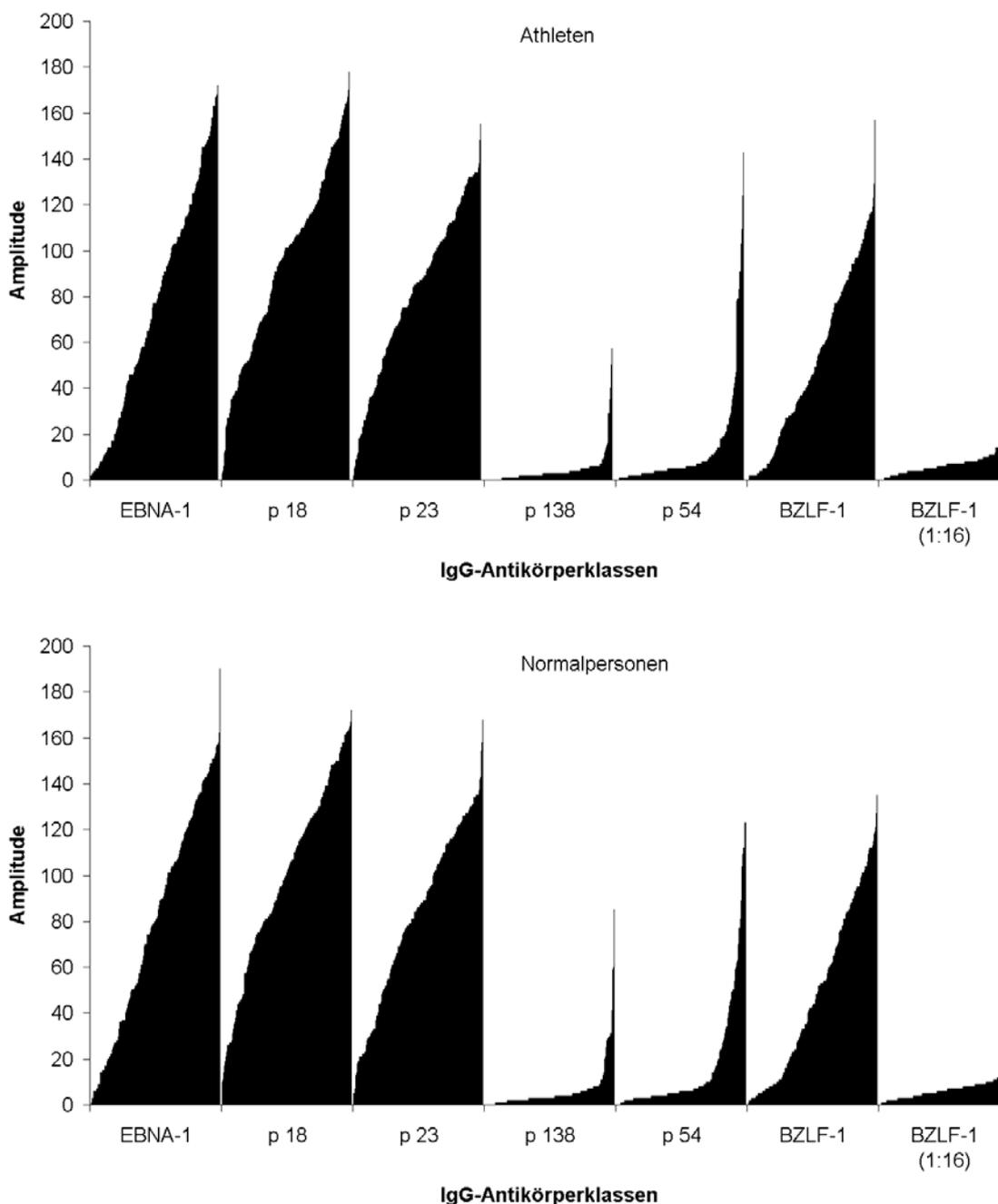


Abb. 3/4: (3 = Athleten), (4 = Normalpersonen): Quantitative Auswertung der Lineassay-Streifen durch Messung der optischen Dichte der Banden mit einem Scansystem (Amplitude). Die hier sichtbaren Muster bilden sich aus gemessenen Amplitudenwerten und sind nach den verschiedenen Antikörperklassen und der Größe der Amplitudenwerte geordnet, so stellt jede Säule 161 (Athleten) bzw. 165 (Normalpersonen) nach Größe geordnete Fälle dar

Im Kollektiv der Athleten wurden 19 (9,4 %) Fälle gefunden, die mit der herkömmlichen Immunfluoreszenztechnik aufgrund des Fehlens der EBNA-1-Antikörper als frische oder persistierende Infektion falsch diagnostiziert worden wären. In der Kontrollgruppe wurden

19 (9,5 %) solcher Fälle gefunden. Auch in Hinblick auf das Vorkommen dieser problematischen Serumkonstellationen in der IFT EBV Serologie (negatives EBNA-1 bei positivem VCA-IgG im IFT) unterscheiden sich Athleten und Normalpersonen nicht voneinander.

Für den zweiten Teil der Studie gilt festzuhalten, dass in der Verlaufsbeobachtung zwischen Athleten und Normalpersonen bei sechs von 15 Athleten Antikörpertiter im Verlauf einer Saison leicht ansteigen. Bei den seropositiven Normalpersonen ist ein solcher Anstieg im Verlauf nicht zu beobachten.

4 Diskussion

Die hier gefunden Ergebnisse lassen nicht darauf schließen, dass die bei Ausdauerathleten bekannten Veränderungen des Immunsystems die EBV-Serologie im Vergleich zur Normalbevölkerung erschweren. Bei beiden Gruppen traten in gleicher Weise aberrante Konstellationen auf, die jedoch mit dem Lineassay eindeutig diagnostiziert worden sind. Der Vergleich der Methoden in dieser Studie hat gezeigt, dass die im IFT als akute oder persistierende Infektionen fehlbestimmten Fälle (negatives Anti-EBNA-1 durch fehlende Bildung oder sekundären Verlust; Bauer, 2001; Vetter et al., 1994) mit dem Lineassay unter Verwendung des zweiten späten Markers p18-IgG sicher bestimmt werden können. Einerseits wird in der IFT ein zurückliegender Fall bei fehlendem EBNA1 irrtümlich als frisch angenommen, doch als Fehldiagnose beim Lineassay durch den zweiten späten Marker p18-IgG verhindert. Weiterhin wird in solch einem Fall durch die Aviditätsbestimmung die Sicherheit der Aussage weiter erhöht, da p18-IgG und p23-IgG hoch avide sind und es sich damit um eine zurückliegende Infektion handeln muss.

Bei fraglichen Infektionsstadien von Athleten sollte in gleicher Weise wie bei Normalpersonen verfahren werden, da der momentane Goldstandard der EBV-Serologie, der IgG-Lineassay, eindeutige Ergebnisse ermöglicht und zwischen beiden Gruppen dieses Projektes bei über 400 getesteten Seren kein signifikanter Unterschied bestanden hat. In Einzelfällen kann bei seltenen aberranten Infektionstypen zusätzliche Gewissheit durch Hinznahme der Aviditätsbestimmung erlangt werden.

Dieser Immunoassay liefert im Gegensatz zur aufwendigeren IFT-Methode schon bei einem einzigen Test auf IgG-Antikörper eine eindeutige serologische Diagnose. Damit wird die wesentlich grössere Aussagekraft des Lineassays mit einer gleichzeitigen, zeitgemässen Kostendämpfung auf rund 50 % gekoppelt.

Die Ergebnisse der Longitudinalstudie zeigen, dass es über einen längeren Beobachtungszeitraum von ca. einem Jahr zu keinen wesentlichen Änderungen oder Schwankungen der Antikörperkonzentrationen kommt. Der leichte Anstieg einiger Antikörperklassen der

Athletenpopulation haben in keinem der Fälle den Serostatus eines Probanden so verändert, dass die Serologie in irgendeiner Weise erschwert worden wäre oder zu einer anderen Diagnose geführt hätte. Die Bedeutung dieser kinetischen Besonderheit muss noch geklärt werden. Auch bei diesen Testpersonen hat der Lineassay in jedem Fall eine eindeutige serologische Aussage erlaubt.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse lassen ein festgelegtes virologisches Arbeitsschema zur eindeutigen Testung auf den Epstein-Barr-Virus-Serostatus sinnvoll erscheinen. Die genaue Darstellung dieses Schemas ist in ausführlicher Form als Publikation geplant. In der Sportmedizin sollte die EBV-Serologie mit dem IgG-Lineassay erfolgen, da dieser eindeutig zwischen Seronegativität, akuter und länger zurückliegender Infektion unterscheiden kann und zugleich ein kostengünstiges Verfahren ist.

In Zukunft könnte durch eine bundesweite Serviceleistung im Rahmen eines EBV-Referenzzentrums die Versorgung von Spitzenathleten dahingehend verbessert werden, dass bei fraglichen Infektionen innerhalb von zwei bis drei Tagen eine eindeutige serologische Aussage getroffen werden kann. So könnte sowohl die Leistungsfähigkeit, als auch die Gesundheitsfürsorge betreffend ein bedeutender Fortschritt in der Versorgung von Spitzensportlern innerhalb Deutschlands erzielt werden.

5 Literatur

- Andersson, A., Vetter, V., Kreutzer, L. & Bauer, G. (1994). Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J Med Virol*, 43, (3), 238-244.
- Bauer, G. (2001). Simplicity through complexity: Immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clin Lab*, 47 (5-6), 223-230.
- Vetter, V., Kreutzer, L. & Bauer, G. (1994). Differentiation of primary from secondary anti-EBNA-1-negative cases by determination of avidity of VCA-IgG. *Clin Diag Viro*, 2, 29-39
- Wolter, T., Gassmann, C., Vetter, V. & Bauer, G. (1997). Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows to improve serological diagnosis of infections. *Clin Lab*, 43, 125-135

