

**Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Vergleich verschiedener Testprinzipien zur Diagnostik und  
Therapiesteuerung der HCMV-Infektion  
bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Ester Szentgyörgyi  
aus  
Budapest  
2006**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Sinzger

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das humane Cytomeglievirus (HCMV)	1
1.2	HCMV-Erkrankung	2
1.2.1	Definition.....	2
1.2.2	HCMV-Infektion bei Immunkompetenten .....	3
1.2.3	HCMV-Infektion in Risikogruppen.....	3
1.2.3.1	Neugeborene.....	3
1.2.3.2	AIDS-Patienten .....	4
1.2.3.3	Transplantierte Patienten.....	4
1.3	Allogene Stammzelltransplantation	5
1.4	Autologe Stammzelltransplantation	6
1.5	Diagnostik	7
1.6	HCMV-Therapie	9
1.7	HCMV-Therapieschema der Universitätsklinik Tübingen	12
1.8	Studiendesign und Fragestellung	13
<b>2</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1	Patientenkollektiv und Probenanzahl	14
2.1.1	Konditionierungstherapie .....	16
2.2	Prinzip der HCMV-PCR	16
2.3	Verwendete Testsysteme	17
2.3.1	COBAS Amplicor CMV Monitor .....	17
2.3.1.1	Gerät und Materialien.....	17
2.3.1.2	Testprinzip.....	23
2.3.1.3	Testvorbereitung.....	23
2.3.1.4	Testablauf .....	26

2.3.1.5	Auswertung .....	29
2.3.2	In-House PCR.....	29
2.3.2.1	Materialgewinnung.....	29
2.3.2.2	PCR .....	29
2.3.2.3	Slot-Blot Hybridisierung der Amplifikate.....	31
2.3.2.4	Auswertung .....	35
2.3.3	LightCycler-PCR .....	36
2.3.3.1	Gerät und Materialien.....	36
2.3.3.2	Testprinzip.....	40
2.3.3.3	Testvorbereitung.....	41
2.3.3.4	Testablauf .....	45
2.3.3.5	Ergebnisse .....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>54</b>
3.1	Vergleich der Tests	54
3.1.1	Probenvolumen und Ausgangsmaterial .....	54
3.1.2	Arbeitsschritte.....	54
3.1.3	Zeitaufwand .....	54
3.1.4	Kosten .....	55
3.1.5	Zuverlässigkeit des LC-Tests .....	55
3.1.5.1	Validität .....	55
3.1.5.2	Reliabilität .....	56
3.1.5.3	Spezifität.....	56
3.1.5.4	Sensitivität.....	57
3.2	Vergleich der Testergebnisse	58
3.2.1	Vergleich der Detektionszeitpunkte .....	58
3.2.1.1	Probenvergleich.....	58
3.2.1.2	Patientenvergleich .....	65
3.2.2	Erstmalige Reaktivierungszeitpunkte im Vergleich .....	67
3.3	Klinischer Vergleich	67
3.3.1	Auswertung der Patientenverläufe.....	67
3.3.1.1	Symptomatische Patienten .....	67

3.3.1.2	Asymptomatische Patienten .....	68
3.3.2	Transplantationsserologie und HCMV .....	68
3.3.3	Transplantationsmodalität und HCMV .....	68
3.3.4	HCMV und opportunistische Infektionen .....	70
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
4.1	Der gegenwärtige Wissenstand	71
4.2	HCMV-Diagnostik	73
4.3	Klinische Bedeutung	77
4.3.1	Detektion .....	77
4.3.2	Analyse der Viruslast.....	78
4.3.3	Semiquantitative und quantitative Ergebnisse.....	80
4.3.4	Therapiesteuerung .....	81
4.4	Schlussfolgerung	82
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>114</b>

**ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND DIAGRAMMVERZEICHNIS****Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: LC-Instrument .....	37
Abbildung 2: Kontaminationsschutz mittels UNG.....	46
Abbildung 3: FRET .....	49
Abbildung 4: Standardkurve.....	53
Abbildung 5: Vergleich HCMV-positiver Proben von CMM, In-House PCR und LC A .....	63

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Patientendaten.....	15
Tabelle 2: CMM: Geräte und Materialien mit ihrer Bezugsquelle.....	19
Tabelle 3: CMM: verwendete Reagenzien und ihre Bestandteile .....	22
Tabelle 4: Master Mix .....	31
Tabelle 5: Prähybridisierungslösung .....	32
Tabelle 6: Markierungs-Kit .....	33
Tabelle 7: Waschlösung 1 .....	34
Tabelle 8: Waschlösung 2 .....	34
Tabelle 9: Puffer 1 .....	34
Tabelle 10: Puffer 3 .....	35
Tabelle 11: Puffer 4 .....	35
Tabelle 12: LC: Geräte und Materialien mit ihrer Bezugsquelle .....	39
Tabelle 13: Master Kit.....	40
Tabelle 14: Master Mix/Probe .....	43
Tabelle 15: Die zu Erreichung der optimalen $MgCl_2$ Konzentration (in mM) noch zum Reaktionsgemisch zuzuführende $MgCl_2$ Konzentration (in $\mu l$ ).....	43
Tabelle 16: Zeitdauer der einzelnen Bearbeitungsschritte .....	54
Tabelle 17: In-House PCR vs. LC A, semiquantitative und quantitative Ergebnisse ....	62
Tabelle 18: LC A vs. LC B, Vergleich der Proben.....	64
Tabelle 19: CMM vs. LC A, paarweise Vergleich der Patienten .....	66

**Diagrammverzeichnis**

Diagramm 1: LC A und CMM: quantitativer Probenvergleich.....	59
Diagramm 2: LC A, gemessene Kopienzahl/ml .....	60
Diagramm 3: CMM, gemessene Kopienzahl/ml .....	60
Diagramm 4: In-House PCR vs. LC A, semiquantitative und quantitative Ergebnisse .	62
Diagramm 5: LC A, gemessene Viruslast/ml bei den zwei verschiedenen Transplantationsmodalitäten .....	69

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrom
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
A-Ringe	Amplifikationsringe
b	Basen
bp.	Basenpaare
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz
BSA	Bovines Serumalbumin
Conc.	Konzentration
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dig-dUTP	Digoxigenin-Desoxyuridintriphospha
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D	Donor (Spender)
dsDNA	doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
ssDNA	einzelstrang Desoxyribonukleinsäure
ED	Einzeldosis
EDTA	Ethyldiaminessigsäure

---

FRET	Fluoreszenz resonance energy transfer
G	Genom
G+C	Guanosin- und Cytosin
GD	Gesamtdosis
GE	Genomäquivalent
Gy	Gray
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Humane Leukozytenantigene
(H)SCT	(Hämatopoetische) Stammzelltransplantation
HSV	Herpes simplex Virus
Ig	Immunglobulin
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
KMT	Knochenmarkstransplantation
mRNA	messenger RNA
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBSCT	Periphere Blutstammzelltransplantation
p.o.	per os
R	Recipient (Empfänger)
RCLB	Red cell lysis buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBI	Ganzkörperbestrahlung



---

Tris	Trishydroxymethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	Units
U/min	Umdrehungen/Minute
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
WCLB	White cell lysis buffer
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
mm	Milimeter
cm	Zentimeter
pM	Picomolar
nM	Nanomolar
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
M	Molar
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
sec	Sekunden
min	Minuten
h	Stunde

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

Die HCMV sind ubiquitär pathogene Keime, die in einer Vielzahl von Wirten vorkommen. Die Isolierung des Virus gelang 1956/57. Seine Morphologie im Elektronenmikroskop und die Entdeckung, dass das Genom aus einer doppelsträngigen DNA besteht, führten zur Einteilung des Virus in die Familie der Herpesviren.

Bisher sind mehr als 100 Herpesvirustypen bekannt, aber nur acht spielen wegen ihrer Humanpathogenität für die Medizin eine wichtige Rolle.

Die Herpesvirusfamilie gliedert sich in drei Untergruppen auf, wobei sich die Gruppen hinsichtlich der Pathogenität, dem Replikationsverhalten und der Art der befallenen Wirtszelle unterscheiden.

Die Alfa Herpesviren stehen für das Herpes simplex Virus Typ 1 und Typ 2 und das Varizella Zoster Virus, die Beta Herpesviren für das humane Cytomegalievirus, das humane Herpesvirus 6 und 7. Als Gamma Herpesviren werden das Epstein Barr Virus und das humane Herpesvirus 8 zusammengefasst.

Wie alle Herpesviren hat auch das Cytomegalievirus ein aus einer doppelsträngigen linearen DNA bestehendes Virus Genom, das mit dem Virus-Core assoziiert ist. Das HCMV-Genom, das komplexeste aller bisher entdeckten humanpathogenen Viren, enthält fast 250 Tausend Basenpaare.

Ein ikosaedrisches Kapsid umgibt das Core und wird von der Virushülle zur Umgebung abgegrenzt. In dieser Hülle befinden sich die für die Interaktion mit der Wirtszelle wichtigen Ankerproteine.

Die initiale Interaktion von HCMV mit der Zielzelle erfolgt über den Kontakt zwischen den Hüllproteinen, Glykoprotein B und Glykoproteinkomplex gCII auf der Virusoberfläche und den Heparansulfaten auf der Zelloberfläche (Mocarski, 1996; Compton, 1993). Das Kapsid gelangt in die Wirtszelle und anschließend wird das Genom mikrotubuligebunden in den Kern transportiert. Hier zirkularisiert die sonst lineare DNA, bleibt aber isoliert von dem Genom der Wirtszelle.

Der zentrale Aspekt der HCMV-Pathogenese beruht auf der Interaktion zwischen dem Cytomegalievirus und verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Wirtes. Die potentesten APCs des Menschen sind vor allem die Monozyten/Makrophagen und

die dendritischen Zellen. Diese scheinen das hauptsächliche Ziel für die Cytomegalieviren darzustellen (Jahn et al., 1999).

## **1.2 HCMV-Erkrankung**

### **1.2.1 Definition**

Auf dem 4. Internationalen Cytomegalie Workshop in Paris 1993 wurde die HCMV-Erkrankung wie folgt definiert:

HCMV-Enteritis: gastrointestinale Symptome wie Diarrhö, Nausea und Emesis,

HCMV-Nachweis durch Histologie oder Immunhistologie.

HCMV-Hepatitis: abnorme Leberfunktion, Nachweis von HCMV in einer Leberbiopsie durch Kultur oder DNA-Hybridisierung, typische histologische Veränderungen.

HCMV-Pneumonie: Dyspnoe, interstitielle Infiltrate im Röntgen-Thorax-Bild, positive HCMV-Kultur aus der bronchoalveolären Lavage (BAL).

Generell wird zwischen Primär- und Sekundärinfektion unterschieden. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang im Organismus an einem noch unbekanntem Ort. Bei Vorliegen einer Immunsuppression kann das Virus endogen reaktiviert werden und eine Sekundärinfektion hervorrufen aber auch eine Reinfektion mit anderen HCMV-Stämmen kann erfolgen.

Die Übertragung erfolgt hauptsächlich über Schmierinfektion oder durch direkten Kontakt mit Infizierten. Als Erregerreservoir dienen hauptsächlich Blut, Speichel, Tränen, Urin, Faeces, vaginales Sekret und Sperma.

Das Risiko für eine Infektion ist besonders in zwei Altersgruppen hoch. Zunächst sind Kinder im Kleinkindalter gefährdet, wobei die Übertragung vor allem über die Mutter erfolgt. In der Bundesrepublik Deutschland und in anderen vergleichbaren Industrieländern werden etwa 25% der Säuglinge infiziert.

Die Infektionsrate steigt dann langsam bis zum zweiten Häufigkeitsgipfel an. Dieser fällt auf das junge Erwachsenenalter bis zum 30. Lebensjahr. Hier erfolgt die Infizierung hauptsächlich durch sexuelle Kontakte. Im Alter von 20–40 Jahren beträgt die Durchseuchungsrate 50–60%.

Zudem variiert die Prävalenz der HCMV-Infektion in Abhängigkeit der Lebensregion und der sozialen Schicht. In Bevölkerungsgruppen der unteren sozioökonomischen

Schicht ist die Rate der Primärinfektionen erhöht (Stagno, 1986). In Entwicklungsländern beträgt schon im Kindesalter die Durchseuchung nahezu 100%.

### **1.2.2 HCMV-Infektion bei Immunkompetenten**

Klinisch kann eine Infektion sehr unterschiedlich verlaufen. Die Inkubationszeit beträgt vier bis acht Wochen. Bei immunkompetenten Infizierten bleibt eine HCMV-Infektion überwiegend asymptomatisch. Eine Therapie ist in den meisten Fällen nicht notwendig. Selten kommt es zu mononukleoseähnlichen Verläufen mit Lymphknotenschwellung und leichtem Krankheitsgefühl. Seltene Komplikationen sind Hepatitis, Pneumonien, aseptische Meningitis und immunologische Veränderungen.

### **1.2.3 HCMV-Infektion in Risikogruppen**

Von der klassischen Epidemiologie und Klinik in der allgemeinen Bevölkerung muss deutlich die spezielle Epidemiologie und Klinik in Risikogruppen unterschieden werden. Ist die Immunität des Wirts durch Unreife, Inkompetenz oder Suppression des Immunsystems herabgesetzt, gilt die primäre wie auch reaktivierte Infektion als gefährdete opportunistische Infektionskrankheit.

Bei Neugeborenen, die an einer Immunschwäche leiden, HIV-Infizierten und Transplantationspatienten sind fulminante Krankheitsverläufe mit letalem Ausgang keine Seltenheit (Khare et Sharland, 2001).

Durch die Zytopathogenität des Virus werden hauptsächlich Lunge, Leber, Pankreas und Niere angegriffen. Nicht selten mündet eine HCMV-Infektion in einem Multiorganversagen (Bissinger et al., 2002).

Eine HCMV-Infektion ist in diesen Patientengruppen immer therapiebedürftig.

#### **1.2.3.1 Neugeborene**

Das HCMV ist der häufigste Erreger pränataler Infektionen. Zu einer pränatalen Infektion kommt es in circa 1% der Geburten wobei 5% dieser Neugeborenen klinische Symptome zeigen. Dabei sind vor allem die durch eine Primärinfektion einer seronegativen Mutter hervorgerufenen, pränatalen Infekte besonders schwerwiegend. Die Neugeborenen leiden dann nicht selten am Vollbild der pränatalen Infektion mit geringem Geburtsgewicht, Mikrozephalie, Hydrozephalus, intraventrikulären Verkalkungen, Labyrinthitis, Hepatitis, Hepatosplenomegalie, hämolytischer Anämie,

Thrombozytopenie, prolongiertem Ikterus und einer interstitiellen Pneumonie (Seige 1995; Wright 1973; Weller 1971). Relativ häufig bleiben bei infizierten Neugeborenen Spätschäden in Form von geistiger Retardierung, Taubheit und Konvulsionsanfälligkeit zurück.

Die perinatalen und postnatalen Infektionen durch infiziertes Zervikal- und Vaginalsekret, Muttermilch und Tröpfcheninfektion verlaufen dagegen meist klinisch stumm. Während die Infektion bei reifen Neugeborenen meist asymptomatisch verläuft, haben Frühgeborene auch nach postnataler Infektion ein hohes Risiko, an einer HCMV-Infektion zu erkranken.

Bei bis zu 20% aller Schwangerschaften treten Sekundär- oder Reinfektionen der seropositiven Mutter auf. Es kommt aber nur selten zu einer Übertragung der Infektion auf das Kind. Diese führt kaum zu einer klinischen Manifestation.

#### 1.2.3.2 AIDS-Patienten

Bei HIV-Patienten gehört die HCMV-Infektion, v.a. in der Spätphase der Erkrankung, zu den häufigsten opportunistischen Infektionen. Meistens handelt es sich um eine endogene Reinfektion mit HCMV, da durch die Grunderkrankung die CD4-Lymphozytenzahl herabgesetzt und somit die Immunabwehr stark reduziert ist. Im Vordergrund steht eine bis zur Erblindung führende Retinitis. Selten manifestiert sich die Infektion an der Leber und Lunge (Drew 1992; Drew et al., 1988).

#### 1.2.3.3 Transplantierte Patienten

Infektionen mit dem HCMV stellen für Patienten nach einer Transplantation eine große Gefahr dar (Halwachs-Baumann et al., 2001; Einsele und Hebart, 1999). Die Patienten können schwere Verläufe der HCMV-Infektion mit anhaltendem Fieber, Leukopenie, Thrombozytopenie, atypische Lymphozytosis und erhöhten Leberwerten zeigen. Zusätzlich führt die HCMV-Infektion möglicherweise zu einer Inhibition des Immunsystems. Dies ist insofern fatal, da das Immunsystem schon durch die Hochdosischemotherapie vor der Transplantation stark geschwächt ist. Diese Inhibierung des Immunsystems wird durch den hemmenden Effekt des HCMV auf die, von den Monozyten abstammenden, unreifen, antigenpräsentierenden, dendritischen Zellen hervorgerufen (Grigoleit et al., 2002).

Trotz Reduktion der Mortalitätsrate von 85% unter unspezifischer Therapie auf 30-40% durch kombinierte Gabe von Ganciclovir und Immunglobulinen, zählt die interstitielle Pneumonie in diesem Patientenkollektiv zu der gefährlichsten Form der HCMV-Erkrankung. Es erkrankten 20-30% der HCMV-infizierten Patienten (Meyers et al., 1986; Nguyen et al., 1999).

Weitere lebensgefährliche Komplikationen der HCMV-Infektion sind gastrointestinale Infektionen mit Gefahr einer Perforation und eine Hepatitis.

Die Wahrscheinlichkeit einer HCMV-Infektion nach allogener Knochenmarkstransplantation beträgt 32–70 %, in den meisten Studien zwischen 40-50% (Hebart et al., 1998; Britt und Alford, 1996).

Dabei erkrankten nach Meyers et al. (1986), Miller et al. (1986), Trenchel et al. (2000) und Wingard et al. (1990) 40% der seronegativen und 70% der seropositiven Patienten bzw. Patienten mit einem seropositiven Spender an HCMV.

Das Infektionsrisiko hängt vom HLA-Status (Lanino et al., 1993), von der Viruslasthöhe (Gor et al., 1998), von der Transplantationsart (Hebart et al., 2001), vom transplantierten Organ, von der Länge und Art der Immunsuppression (Ho, 1991; Meyers et al., 1982; Meyers et al., 1986; Miller et al., 1986; Weiner et al., 1986; Wingard et al., 1988; Wingard et al., 1990), von der GvHD-Reaktion und entscheidend vom serologischen Status des Spenders und des Empfängers ab.

Das Infektionsrisiko ist bis 4 Monate nach der Transplantation am höchsten.

### **1.3 Allogene Stammzelltransplantation**

Nach einer Hochdosischemotherapie werden den Patienten, zur Rekonstruktion der Hämatopoese und des Immunsystems, pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark (allogene Knochenmarkstransplantation) oder nach Stimulation der Blutbildung, aus dem peripheren Blut (allogene Blutstammzelltransplantation) infundiert (Einsele und Kanz, 1999). Bei der allogenen Transplantation stammen die Zellen von einem Spender, der idealerweise dem Empfänger genetisch identisch ist. Dies ist nur bei eineiigen Zwillingen der Fall. Es wird versucht, bei nahen Verwandten, v.a. bei den Geschwistern des Empfängers, den geeigneten Donor zu finden. Ist kein geeigneter Familienspender vorhanden, so wird ein nichtverwandter Spender, der genetisch dem Empfänger weitgehend ähnlich ist, gesucht.

Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation sind die akute lymphoblastische Leukämie, die akute myeloische Leukämie, die chronische myeloische Leukämie und myelodysplastische Syndrome.

Gefahren der allogenen Stammzelltransplantation sind sog. Graft-versus-Host Reaktionen (GvHD), bei der immunkompetente Zellen des Spenders gegen Empfängerzellen reagieren. Durch die prophylaktische Gabe von Immunsuppressiva wird versucht, diese Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Zudem werden Gewebstypisierungen von Spender und Empfänger durchgeführt. Umso größer die Übereinstimmung, desto seltener und diskreter sind die zu erwartenden Nebenwirkungen der Transplantation.

Der aussagekräftigste und somit bedeutendste Parameter bei der Gewebstypisierung ist der Humane-Leukozytenantigen-Komplex (HLA-Komplex). Diese auf allen kernhaltigen Zellen befindlichen Oberflächenproteine sind im höchsten Masse für die Verträglichkeit bzw. für die Abstoßungsreaktion verantwortlich und werden deshalb auch Histokompatibilitätsantigene genannt. Das Risiko einer Abstoßung ist proportional zu den Unterschieden des HLA-Komplexes. Nur bei einer hohen HLA-Identität zwischen Spender und Empfänger ist eine Spende möglich.

Die durch die Hochdosischemotherapie vorbehandelten Empfänger sind einem hohen Infektionsrisiko ausgesetzt. Der langanhaltende Immundefekt der T- und B-Lymphozyten führt zu einer besonders hohen Infektanfälligkeit gegenüber Pilze, Viren und Bakterien. Diese Infektionen nehmen häufig einen fulminanten Verlauf und sind schwer zu beherrschen.

Einen lebensbedrohlichen Verlauf kann die HCMV-Infektion in der Aplasiephase auslösen. Vor allem die interstitielle Pneumonie, die Hepatitis und die ulzerative Collitis gehen in dieser Phase mit einer hohen Letalität einher.

Eine Studie von Schetelig et al. (2003) konnte jedoch aufzeigen, dass die Inzidenz einer HCMV-Erkrankung bei stammzelltransplantierten Patienten nicht maßgeblich von der Konditionierungstherapie abhängt.

#### **1.4 Autologe Stammzelltransplantation**

Bei der autologen Stammzelltransplantation ist der Patient sein eigener Spender. Es handelt sich um eine neuere und schonendere Therapievariante, bei der die Suppression

der Knochenmarksfunktion durch die Chemotherapie verkürzt ist. Die autologe Stammzelltransplantation kommt in der Therapie von Leukämien, soliden Tumoren und Lymphomen zum Einsatz.

Vor der Entnahme der Stammzellen aus dem peripheren Blut des Patienten, wird die Zellbildung durch eine Mobilisierungstherapie durch Zytokine erreicht. Die entnommenen Zellen werden dann speziell aufbereitet und von schädlichen Zellen befreit. Anschließend werden sie dem Patienten wieder zugeführt.

Auch bei dieser Form der Stammzelltransplantation steht als unerwünschte Nebenwirkung die Prädisposition für Virusinfektionen im Vordergrund (Hoffman et al., 2001).

## **1.5 Diagnostik**

Aufgrund der vielfältigen Manifestationsformen der HCMV-Infektion, ist eine rein auf das klinische Bild basierende Diagnostik nicht möglich.

Spezifische Tests sind nötig, um eine Infektion nachzuweisen, wobei neben dem qualitativen Erregernachweis, die quantitative Detektion eine entscheidende Rolle einnimmt (Caliendo et al., 2001). Den indirekten Methoden in Form von virusspezifischen Antikörpern stehen verschiedene Verfahren des direkten Virusnachweises gegenüber.

Der indirekte Nachweis einer HCMV-Infektion gelingt mit Hilfe der Serologie.

Für eine Infektion sprechen der spezifische IgM-Nachweis und ein IgG-Titer-Anstieg (Doerr, 1998). Aufgrund der gestörten humoralen Antwort nach einer Transplantation kann bei Immunsupprimierten auf Antikörpertests zugunsten von Virusdirektnachweisen verzichtet werden (Apperley et al., 1989). Die Methode wird allerdings regelmäßig vor einer Transplantation angewendet, um den Immunstatus bei Spender und Empfänger festzustellen.

Mit ELISA, Komplement-Bindungs-Reaktion, Latexagglutination, Immunoblot und Immunfluoreszenz stehen verschiedene Testmethoden zur Auswahl.

Die direkte Anzucht von HCMV aus embryonalen Fibroblasten aus Urin, Rachenspülwasser, Blut, Muttermilch und Gewebebiopsien mittels Kultur war für lange Zeit die Methode der Wahl in der HCMV-Diagnostik. In der Regel entwickelt sich der cytopathogene Effekt nach 5-7 Tagen, nicht selten aber erst nach 6 Wochen. Diese



Zeitspanne hängt von der Viruskonzentration des Materials ab. Die morphologische Unterscheidung der HCMV-Zellen gegenüber den anderen Herpesviren gelingt eindeutig.

Die prognostische Bedeutung einer positiven Virusisolierung für die Entwicklung einer symptomatischen HCMV-Erkrankung hängt vom untersuchten Material ab. Einerseits scheiden immunsupprimierte Patienten und Kinder das Virus nicht selten im Speichel oder Urin aus, ohne jemals symptomatisch und somit therapiebedürftig zu werden, andererseits ist aber bei dem Nachweis von HCMV in Biopsiematerial und BAL, wegen hoher Wahrscheinlichkeit einer Organmanifestation, eine Therapie notwendig.

Um den Test zu beschleunigen, wird das shell vial assay eingesetzt. Dabei wird durch Zentrifugieren der Proben auf Fibroblasten eine schnellere Infektion und eine höhere Infektionsrate erreicht.

Heutzutage ist es auch möglich, infizierte Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz qualitativ nachzuweisen. Dabei kann die Analysedauer auf 24-48 Stunden verringert werden (Paya et al., 1987; Schirm et al., 1987).

Die zurzeit am gängigsten verwendeten Testsysteme sind der Virus-DNA-Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der pp65-Antigenämie-Assay und die Nucleic-Acid-Sequence-based Amplification (NASBA) (Compton, 1991; Malek et al., 1994). Mit NASBA gelingt die Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen und die Amplifikation von RNA (van Gemen et al., 1993). Der Nachweis der vervielfältigten mRNA des HCMV erwies sich in ersten Studien als erfolgversprechend (Blok et al., 1998; Hebart et al., 2002).

Die PCR und der pp65-Antigenämie-Assay sind hochsensitiv und ermöglichen den quantitativen HCMV-Nachweis schon vor dem Auftreten der ersten Symptome (Einsele et al., 1991; Nitsche et al., 2000) und dadurch eine präemptive Therapie (Hebart et al., 2002).

Das virale pp65 Antigen wird mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Die mRNA des pp65 wird in der Spätphase der HCMV-Replikation gebildet und eignet sich dabei besonders für Verlaufs- und Therapie-Kontrollen nach allogener Stammzelltransplantation (Blok et al., 1998).

Die Zahl der nachgewiesenen pp65-positiven Zellen korreliert mit dem Risiko einer HCMV-Erkrankung und erlaubt eine bessere prognostische Aussage bezüglich einer HCMV assoziierten Erkrankung als der direkte Virusnachweis (Boeckh et al., 1992; Erice et al., 1992). Ein zusätzlicher Vorteil liegt darin, dass für die Durchführung der Detektion bei dieser Methode lediglich ein Mikroskop und eine Zentrifuge notwendig sind. Der pp65-Antigenämie-Assay ist jedoch in seiner Durchführung relativ aufwendig und zeitintensiv.

Dagegen führt die mittlerweile vollautomatische und standardisierte PCR-Methode mittels CMM alle Schritte der HCMV-DNA-Vermehrung automatisch durch. Lediglich die Vorbereitungen müssen noch manuell ausgeführt werden. Die quantitative PCR entspricht zudem den hohen Ansprüchen an Sensitivität und Spezifität (Cortez et al., 2003; Weinberg et al., 2000).

Für die Zukunft ist deshalb zu erwarten, dass die vollautomatischen PCR-Methoden den diagnostischen Goldstandard für die HCMV-Diagnostik darstellen werden (Razonable et al., 2001; Kearns et al., 2001). Nachteilig sind die hohen Kosten, die die nötigen wöchentlichen Screeningverfahren auf HCMV erschweren.

## **1.6 HCMV-Therapie**

Für die Manifestation einer HCMV-Erkrankung ist die Höhe der Viruslast des Infizierten ausschlaggebend. Bei Immunsupprimierten ist für die Prognose der Erkrankung ein frühzeitiger Therapiebeginn entscheidend (Einsele et al., 1999). Zur Erkrankungsprophylaxe stehen bis dato keine geeigneten Therapeutika zur Verfügung.

Die in klinischen Studien erprobten Vakzine mit dem attenuierten Laborstamm HCMV-Towne, mit rekombinanten attenuierten Laborstämmen und mit HCMV-Subunitvakzinen führten nicht zum erhofften Erfolg.

Als wirksame prophylaktische Maßnahme bei Transplantierten wird streng darauf geachtet, dass seronegative Patienten einen seronegativen Spender und HCMV-negative Blutprodukte erhalten.

Bei Immunsupprimierten werden derzeit zwei Therapiestrategien, die Chemoprophylaxe und die präemptive Therapie, angewandt, um eine HCMV-Infektion zu vermeiden bzw. einzudämmen (Stocci, 1999).

Die präemptive Therapie, d.h. eine frühinterventionelle antivirale Therapie, beginnt, sobald ein HCMV-positiver Laborbefund vorliegt. Klinische Symptome werden nicht abgewartet. Durch diese Therapieform kann in den meisten Fällen ein Ausbruch der Erkrankung verhindert werden (Mori et al., 2000).

Möglich ist die Kombination der präemptiven Therapie mit Immunglobulinen. Vor allem in der Therapie der interstitiellen Pneumonie hat sich die gleichzeitige Gabe von Virostatika (Ganciclovir) und Immunglobulinen bewährt (Bratanow et al., 1987; Emanuel et al., 1988; Winston et al., 1991). Immunglobuline als Monotherapeutikum zeigen im Vergleich zu den eingesetzten Virostatika jedoch eine deutlich geringere Wirksamkeit.

Die andere Therapiestrategie, die Chemoprophylaxe, erhalten seropositive Patienten bzw. Patienten mit einem seropositiven Spender ohne HCMV-positiven laborchemischen Befund und ohne klinische Anzeichen einer Erkrankung. Diese vorbeugende Maßnahme wird bis 100 Tage nach Transplantation durchgeführt. Nachteilig zeigte sich eine nach Beendigung der Therapie (nach Tag 100) auftretende HCMV-Spätinfektion (Einsele et al., 2000).

Limitierender Faktor beider Maßnahmen sind die gefährlichen Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente, die eine Langzeittherapie (>3 Monate) erschweren und immer häufiger auftretende therapieresistente Keime (Chou, 2001; Emery und Griffiths, 2000; Emery, 2001; Erice, 1999; Gilbert et al., 2002; Hebart et al., 1998; Ketteler et al., 2000; Limaye et al., 2000).

Es bewährte sich eine risikoangepasste Therapie, bei der entsprechend der Höhe der Viruslast die Medikamentendosis gesteigert oder beibehalten wurde (Mori et al., 2000; Mori et al., 2002).

Gegenwärtig werden in der HCMV-Therapie bei KMT-Patienten hauptsächlich Ganciclovir (Atkinson et al., 1998) und Foscarnet (Hebart und Einsele, 1998) eingesetzt. Alle anderen, hier im Folgenden aufgeführten Virostatika, sind Gegenstand

der Forschung aber noch nicht auf dem Medikamentenmarkt für die HCMV-Therapie zugelassen.

Von den eingesetzten Virostatika ist Ganciclovir am besten beschrieben. Es hemmt selektiv die Replikation von HCMV. Ganciclovir kann nur i.v. verabreicht werden. Als Monotherapie bewährte sich Ganciclovir v.a. bei der durch die HCMV verursachten Hepatitis und Duodenitis (Ahn et al., 1999). Bei der HCMV-Pneumonie zeigte die Kombinationstherapie mit Immunglobulinen eine höhere Wirksamkeit (Bratanow et al., 1987; Emanuel et al., 1988; Winston et al., 1991). Die prophylaktische Verabreichung von Ganciclovir zeigte in einer Arbeit von Verma et al. (2003) eine günstige Auswirkung auf die HCMV-Infektions- und Erkrankungsrate. Therapielimitierend kann sich die durch Ganciclovir hervorgerufene Panzytopenie auswirken, da durch diese opportunistische Infektionen begünstigt werden (Winston et al., 1993).

Das neuere Valganciclovir, ein Prodrug des Ganciclovir, kann im Gegensatz zu Ganciclovir oral verabreicht werden. Die Nebenwirkungen beider Medikamente sind ähnlich, auch im Bezug auf die gefürchtete Neutropenie. Gegenwärtig ist das Valganciclovir jedoch nur bei HCMV-bedingter Retinitis bei Aids-Kranken zugelassen, da keine Therapieschemata für Organtransplantierte existieren.

Bei Nichtansprechen oder Resistenzen auf Ganciclovir und bei durch Ganciclovir hervorgerufener Unverträglichkeit wird das Virostatikum Foscarnet eingesetzt (Aschan et al., 1992; Bowden et al., 1991). Nach allogener Stammzelltransplantation zeigte die präemptive Therapie einer HCMV-Infektion mit Foscarnet die gleiche Effektivität wie die Behandlung mit Ganciclovir, jedoch kam es unter der Therapie mit Foscarnet seltener zu Blutbildveränderungen (Neutropenie) (Reusser et al., 2000).

Nach dem Case-Report von Ohta et al. (2001) konnte Foscarnet bei Ganciclovir-resistenten HCMV erfolgreich eingesetzt werden. So wurde eine während einer Ganciclovirtherapie entstandene HCMV-Retinitis mit Foscarnet eingedämmt. Foscarnet wird durch seine Nephrotoxizität limitiert.

Um die Entstehung resistenter HCMV-Stämme und starke Nebenwirkungen zu vermeiden, empfiehlt sich die Verabreichung von Foscarnet und Ganciclovir in Kombination (Bacigalupo et al., 1996; Jacobson et al., 1994; Manfredi et al., 1996). Cidofovir, das schon gegen die HCMV-Retinitis bei HIV-Infizierten erfolgreich eingesetzt wird, findet neuerdings auch Verwendung gegen HCMV-Infektionen bei

stammzelltransplantierten Patienten. Es zeigten sich moderate renale und gastrointestinale Nebenwirkungen (Platzbecker et al., 2001).

Andere Studien wiesen dem Medikament jedoch nephrotoxische Wirkungen nach und empfahlen die Verabreichung nur bei Nichtansprechen auf die herkömmliche Therapie mit Ganciclovir und Foscarnet (Lea und Bryson, 1996; Ljungman et al., 2001; Khare und Sharland, 2001).

Mit Valacyclovir, das 2002 in einer randomisierten, doppelblinden, Acyclovir-kontrollierten Multicenterstudie bei KMT-Patienten untersucht wurde, steht möglicherweise in baldiger Zukunft ein neues Medikament zur Verfügung.

Das oral verabreichte Valacyclovir konnte in dieser Studie die Inzidenz einer HCMV-Infektion signifikant effektiver senken als das oral eingenommene Acyclovir (Ljungman et al., 2002; Vusirikala et al., 2001).

Einsele et al. zeigten in einer Studie (2002) erfolgsversprechende Ergebnisse auf dem Gebiet der T-Zellimmuntherapie. Dabei wird die antivirale Therapie mit einer Immuntherapie mit HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen ergänzt. Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv und deshalb gegenwärtig nur in einigen Zentren durchführbar (Meijer et al., 2003).

### **1.7 HCMV-Therapieschema der Universitätsklinik Tübingen**

An HCMV erkrankte Patienten wurden an der Universitätsklinik Tübingen mit einer Kombination aus Ganciclovir und HCMV-Hyperimmunglobulin behandelt. Patienten ohne klinische Symptomatik, jedoch mit zwei aufeinander folgenden positiven HCMV-Befunden wurden präemptiv mit Ganciclovir therapiert. Diese Frühtherapie begann innerhalb von 48 Stunden in einer Dosis von 2x 5 mg/kg KG i.v. für zwei Wochen (Einsele et al., 1995). Die Therapie wurde nach 14 Tagen, bei negativem HCMV-Befund, abgesetzt. Waren jedoch noch weiterhin HCMV positive Ergebnisse vorhanden, wurde eine Erhaltungsdosis von 1x 6 mg/kg KG i.v. täglich an 5 Tagen der Woche für weiter 14 Tage verabreicht.

Als Alternative zu Ganciclovir wurde Foscarnet eingesetzt. Voraussetzung war eine blande Nierenfunktion. Die Induktionsdosis von 60 mg/kg 12-stündlich i.v. wurde für 14 Tage verabreicht. Bei persistierender HCMV-Infektion wurde die Foscarnet-Gabe in einer Erhaltungsdosis von 90 mg/kg i.v. für weitere 14 Tage fortgeführt.

## 1.8 Studiendesign und Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer sensitiven, schnellen und günstigen quantitativen PCR-Methode mittels dem LightCycler PCR (LC) für die HCMV-Diagnostik und ihre Evaluierung bei Patienten nach allogener Knochenmarkstransplantation.

Zu diesem Zweck entwickelte unser Labor ein Primer-Sondenpaar für den LC (LC A). Es sollte geprüft werden, ob der LC A allen Anforderungen an ein neues Verfahren zur Diagnostik (beginnende Virämie, Infektionsverlauf) und Therapiemonitoring (Resistenzen, Übertherapien) für HCMV genügt. Es erfolgte eine Gegenüberstellung der LC A-Ergebnisse mit den Ergebnissen der kommerziell erhältlichen standardisierten quantitativen PCR-Verfahren mittels COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM) (Roche, Mannheim) und der hauseigenen In-House PCR.

Zusätzlich verglich diese Arbeit die Ergebnisse des LC A mit einer schon publizierten LC-Methode (LC B), die von Schaade et al. (2000) beschrieben wurde.

So wurden die wöchentlichen Blutproben zunächst parallel im CMM und durch unsere hauseigene semiquantitativen In-House PCR auf HCMV getestet. Anschließend wurden die HCMV positiven Proben im LC A und LC B analysiert.

Zudem sollten praktisch relevante Testeigenschaften wie Durchführbarkeit, Zeitdauer, Fehlerquote und klinische Relevanz des LC A bewertet werden.

Es stellte sich die Frage, ob der LC A tatsächlich in der Lage ist, die herkömmlichen Verfahren zu ersetzen oder zu ergänzen.

Anhand von der Auswertung klinischer Daten aus den Patientenakten und dem Vergleich mit den mittels LC A gemessenen Viruslasten sollten zudem zwischen klinischem Verlauf und messbaren Parametern Zusammenhänge erarbeitet werden. In diesem Rahmen wurden die Transplantationsmodalität, die Transplantationsserologie und die Maximalviruslast mit dem klinischen Verlauf in Verbindung gesetzt.

In keinem Fall wurde der LC zu Therapieentscheidung herangezogen.

## **2 PATIENTEN UND METHODEN**

### **2.1 Patientenkollektiv und Probenanzahl**

Im Zeitraum zwischen dem 01.05.2000 und dem 01.06.2001 wurden insgesamt 540 Blutproben von 95 Patienten nach myeloablativer Therapie und anschließender allogener Stammzell- bzw. Knochenmarkstransplantation im CMM auf HCMV untersucht.

Bei dieser prospektiven Studie wurden die Patienten in der Regel ab dem Tag der Transplantation bis 100 Tage nach Transplantation wöchentlich klinisch auf Zeichen einer HCMV-Infektion untersucht. Zeitgleich wurden laborchemische Blutprobenanalysen veranlasst.

In der Arbeit wurde nur Patienten die 4 oder mehr Blutproben abgegeben haben, berücksichtigt. Diese Anforderung erfüllten 45 Patienten (392 Proben). Diese wurden für die weitere Verlaufsbeobachtung herangezogen. Im Durchschnitt wurden pro Patient 9 (8,7) Proben gesammelt.

Alle Proben stammten von Patienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, Abteilung Innere Medizin II.

Folgend sind die Daten der 45 Patienten tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 1).

		Anzahl
Geschlecht	männlich	23
	weiblich	22
Alter in Jahren	Spannweite	18-60
	Durchschnitt	40,5
Grunderkrankung	AML	16
	CML	7
	ALL	7
	Plasmozytom	5
	Non-Hodgkin Lymphom	1
	Hodgkin-Lymphom	1
	MDS	2
	MDS&AML	1
	Aplastische Anämie	1
	Myelom	1
	Osteomyelofibrose	1
	Nierenzell-Ca	1
Myelodysplast. Syndrom	1	
Transplantation	fremd-allogen	24
	verwandt-allogen	21
Stammzellen	Knochenmark	22
	Periphere Blutstammzellen	23
Serologischer Status vor Tx	Spender + / Empfänger +	30
	Spender + / Empfänger -	2
	Spender - / Empfänger +	7
	Spender - / Empfänger -	6
Beobachtungszeitraum in Tagen	Spannweite	35-342
	Durchschnitt	100,7

Tabelle 1: Patientendaten



### **2.1.1 Konditionierungstherapie**

Eine Konditionierungstherapie, bestehend aus Hochdosischemotherapie und eventuell einer Ganzkörper-Bestrahlung, war die Voraussetzung für die allogene Stammzelltransplantation bei allen in diese Studie aufgenommenen Patienten.

Die Patienten erhielten entweder eine myeloablative Chemotherapie mit Busulfan (4x 1mg/kg KG Tag -7 bis -4) und Cyclophosphamid (2x 60 mg/kg KG Tag -3 bis -4) oder eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (GD 12 Gy, ED 2 Gy, 2x 2 Gy Tag -6 bis -4) kombiniert mit Cyclophosphamid (2x 60 mg/kg KG Tag -3 bis -2).

### **2.2 Prinzip der HCMV-PCR**

Seit 1985 ist die PCR eine bekannte Technik zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen (Saiki et al., 1985). Mittlerweile gehört die Methode zur Routinediagnostik und läuft vollautomatisch ab.

Die Zielnukleinsäure wird mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen und für die Zielsequenz spezifischen Primern (kurze Oligonukleotide) exponentiell vermehrt (amplifiziert). Anschließend wird die amplifizierte DNA mit spezifisch an die Sequenz bindenden Sonden (Hybridisierung) nachgewiesen.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Virusnukleinsäure qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Immer mehr zeigt sich die Bedeutung der quantitativen Erfassung für Verlauf, Klinik und Therapie der HCMV-Infektion.

Zusätzlich sprechen eine hohe Sensitivität und Spezifität für dieses Verfahren (Machida et al., 2000; Quamruddin et al., 2001; Yakushiji et al., 2002; Griscelli et al., 2001; Rollag et al., 2002).

## 2.3 Verwendete Testsysteme

### 2.3.1 COBAS AmpliCor CMV Monitor

#### 2.3.1.1 Gerät und Materialien

##### Gerätebeschreibung des COBAS AmpliCor CMV Monitor (CMM)

Der CMM ist die erste kommerziell verfügbare, vollautomatische und standardisierte PCR-Methode, mit der eine quantitative Viruslastbestimmung möglich ist. Der CMM besteht im Wesentlichen aus 8 Baueinheiten:

In dem Thermozyklerrack haben 2 A-Ringe und zwei Detektionspositionen zur Aufnahme von zwei zusätzlichen A-Ringen Platz.

Der Reagenzienrack enthält den Reagenzienvorrat, der für einen Lauf benötigt wird. Ein Transfermechanismus dient als automatische Pipettierstation und D-Küvetten-Transferkopf.

Der Inkubator (37 °C) ist für die Hybridisierung und Detektion notwendigen Temperatureinstellungen wesentlich.

Die D-Küvetten-Plattform trägt drei Racks mit je 70 Küvetten.

In der Waschstation werden die Mikropartikel mit Hilfe von Magneten, Resuspensions- und Absaugspitzen geschnitten, gewaschen und resuspendiert.

Der Photometer dient zur Messung der optischen Dichte der Farbreaktion.

Die Benutzerschnittstelle besteht aus Tastatur, LCD-Display, Barcodeleser, Drucker und einer seriellen RS-232C-Schnittstelle für ein LIS. Sie dienen der Ein- und Ausgabefunktion des Analyzers.

##### Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien und ihre Bezugsquelle

In der Tabelle 2 sind die für den Versuch verwendeten Geräte und Reagenzien aufgeführt.

Geräte / Materialien	Bezugsquelle
COBAS Amplicor CMV Monitor RS 232	Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ, USA
Computer	Compaq Presario Pentium III
Software-Programm	Roche Diagnostic Systems, Inc. Branchburg, NJ, USA
Drucker Laser Jet III	Hewlett Packard, München
<u>Pipetten</u>	
Multipetten 4780	Eppendorf, Hamburg
Varipetten 4810 (10,100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, Rottenburg
Sterilbank LaminAir, HBB2448	Heraeus, Hanau
<u>Zentrifugen</u>	
Biofuge A	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
COBAS Amplicor CMM Probenaufbereitungskit Nr: 07 6478 7	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM Amplifikationskit Nr: 11 1026 8	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM Detektionskit Nr: 07 6479 5	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM Kontrollkit Nr: 11 1024 1	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM Detektionskit generic Nr: 07 5747 0	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM A-Ring 24-Box Nr:10 4563 6	Roche Diagnostics, Mannheim

Geräte / Materialien	Bezugsquelle
COBAS Amplicor CMM Detektion Rack 12- Box Nr: 10 4564 4	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM Waschpufferkit Nr: 07 5989 9	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor CMM Konjugat-Kit Nr: 07 6421 3	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Latexhandschuhe, Satin Plus	Safeskin, San Diego, USA
Polypropylenröhrchen	Becton Dickinson, Lincoln Park, USA

*Tabelle 2: CMM: Geräte und Materialien mit ihrer Bezugsquelle*

Bestandteile der Reagenzien

Die jeweiligen Bestandteile und Zusammensetzungen der Reagenzien werden in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführt.

<b>Reagenzien</b>	<b>Bestandteile</b>
CMV Monitor Lyseagenz (CMM LYS)	Tris-HCl Puffer 68% Guanidinythiocyanate 3% Dithiothreitol < 1% Glycogen
CMV Monitor Quantifizierungsstandard (CMM QS)	< 0,001% Nicht infektiöse Plasmid DNA < 0,005% Poly rA RNA (synthetisch) EDTA 0,05% Natriumazid
CMV Monitor Probendiluent (CMM DIL)	Tris-HCl-Puffer < 0,005% Poly rA RNA (synthetisch) EDTA 0,05% Natriumazid
CMV Monitor Dextranblau (CMM DB)	< 0,4% Dextranblau 0,05% Natriumazid
Humanplasma (NHP)	Humanplasma 0,1% ProClin® 300
CMV-Negativkontrolle (CMV (-) C)	<0,005% Poly rA RNA EDTA 0,05% Natriumazid
Leicht positive CMV-Kontrolle (CMV L (+) C)	<0,001% Nicht infektiöse Plasmid DNA <0,005% Poly rA RNA EDTA 0,05% Natriumazid

Reagenzien	Bestandteile
Stark positive CMV-Kontrolle (CMV H (+) C)	<0,001% Nicht infektiöse Plasmid DNA <0,005% Poly rA RNA EDTA 0,05% Natriumazid
CMV Monitor MasterMix (CMM MMX)	< 0,01% Nukleotide (dNTPs): dATP, dGTP, dUTP, dCTP Magnesium < 0,01% AmpliTaq® (Taq-Polymerase) < 0,01% AmpErase® Puffer: Erhaltung und Einhaltung des richtigen pH-Wertes und Salzkonzentration. LC 342 und LC 383 (biotinylierte Primer) 0,09% Natriumazid
CMV Monitor Magnesium Lösung (CMM Mg <sup>2+</sup> )	Magnesium
Amplifikationsverdünnungsreagenz (AD3)	EDTA 0,8% Natriumhydroxid
CMV Probensuspension 1 (VM PS1)	MES Puffer <0,5% Dynabeads®-Lösung 0,09% Natriumacid
CMV Probensuspension 2 (VM4)	Natrium Phosphat Puffer <0,2% Detergent 24,9% Natrium thiocyanat
Quantifizierungsstandardprobe 1 (VQ PS1)	MES Puffer <0,1% Dynabeads®-Lösung 0,09% Natriumacid

<b>Reagenzien</b>	<b>Bestandteile</b>
Quantifizierungsstandardprobe 1 (VQ4)	Sodium Phosphat Puffer <0,2% Detergent 24,9% Sodiumthiocyanat
Denaturierungslösung (DN4)	1,6% Sodiumhydroxid EDTA Thymolblau
Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (CN4)	Tris-HCl Puffer < 0,001% Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat Rinderserumalbumin Emulsit 25 0,1% Phenol 1% ProClin 150
Substrat A (SB3)	Citratlösung 0,01% Wasserstoffperoxid 0,1% ProClin 150
Substrat B (SB)	0,1% 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB) 40% Dimethylformamid (DMF) 0,1% ProClin 150
Waschpuffer (WB)	< 2% Phosphat Puffer < 9% Sodiumchlorid EDTA < 2% Waschmittel 0,5% ProClin 300

*Tabelle 3: CMM: verwendete Reagenzien und ihre Bestandteile*

### 2.3.1.2 Testprinzip

Der CMM ermöglichte eine spezifische und quantitative Viruslastbestimmung mittels PCR durch die Verwendung von Primer, die die aminoternale Region der HCMV-Polymerase erkannten.

Durch den Vergleich der Extinktionen der Verdünnungsreihe einer Probe mit der koamplifizierten Standardverdünnungsreihe mit bekannter Viruslast, wurde der Virustiter der Probe ermittelt.

Bei jedem Lauf wurden für die interne Beurteilung drei Kontrollen (CMV-, CMV+, CMV++) im Gerät platziert. Diese nicht infektiösen DNS-Sequenzen hatten die gleiche Primerbindungsstelle und die gleiche Größe wie die Ziel-DNS aber eine unterschiedliche Sondenbindungsregion. Der Hersteller gab den Bereich von HCMV-DNS-Kopien-Anzahl/ml an, die für die Kontrollen ermittelt werden mussten. Falls sich am Ende des Laufes die Werte für die Kontrollen außerhalb dieser Grenzen befanden, war dieser Lauf ungültig und musste wiederholt werden. So konnten durch Amplifikationshemmung hervorgerufene falsch negative oder durch Kontamination verursachte falsch positive Ergebnisse identifiziert werden.

Die zu untersuchenden Proben wurden nach Anleitung des Herstellers außerhalb des Gerätes vorbereitet und mit den notwendigen Testreagenzien im Gerät platziert.

Nach dem Starten des Tests liefen Amplifikation, Denaturierung, Hybridisierung, Waschschrirte und Berechnung der Ergebnisse automatisch ab.

### 2.3.1.3 Testvorbereitung

#### Materialgewinnung

Für diese Arbeit wurde ausschließlich humanes, durch Zentrifugieren aus Vollblut gewonnenes Blutplasma als Probenmaterial verwendet. Dafür wurden die mit EDTA versehenen Vollblutröhrchen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme bei 8000 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma konnte anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei 2-8 °C bis zu 5 Tage bzw. bei -20 °C längere Zeit konserviert werden.

Heparin-Plasma konnte für den Versuch nicht verwendet werden, da Heparin die PCR inhibiert.



### Reagenzienpräparation

Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen A-Ring mit 12 Proben (9 Patientenproben + 3 Kontrollen). Maximal konnten pro Lauf 4 A-Ringe geladen werden also insgesamt 48 Proben, davon 45 Patientenproben und 3 Kontrollen.

Die gebrauchsfertige MasterMix-Lösung wurde durch Pipettieren von 50 µl Magnesium-Lösung (CMM Mg) in ein CMV MONITOR MasterMix Röhrchen (CMM MMX) hergestellt. Nach 10-15maligem Kippen vermischten sich die beiden Lösungen zu der fertigen Mischung. Auf keinen Fall durften MasterMix enthaltende Reagenzien gevortext werden (starke Schaumbildung).

Nach der Pipettierung von 50µl gebrauchsfertigen MasterMix in jedes A-Röhrchen wurden diese in einer Plastiktüte mit Klippverschluss luftdicht bis zum Gebrauch im Kühlschrank (2-8 °C) aufbewahrt.

Zu beachten war, dass vorbereitete A-Ringe bei diesen Temperaturen maximal 16 Stunden verwendbar waren. Aus diesem Grund wurde die MasterMix Lösung vor jedem Lauf frisch zubereitet.

### Extraktion der HCMV-DNA

Zunächst wurde 70%-iges Ethanol aus 11,0 ml 96%-igem Ethanol und 4,0 ml destilliertem Wasser in einem sterilen Einmalgefäß hergestellt.

Für die Herstellung des Lysis-Puffers mussten zuerst die Kristalle im Lysisreagenz völlig gelöst werden. Nachdem der Quantifizierungsstandard (CMM QS) und das Dextranblau (CMM DB) mindestens 5-10 Sekunden gevortext wurden, erfolgte die Zugabe von 100 µl CMM QS und 100 µl CMM DB zu einer Flasche vollständig gelösten Lysis-Reagenz.

600 µl des frisch angefertigten Lysis-Puffers wurden anschließend in 12 Schraubdeckelröhrchen (2,0 ml) pipettiert. Um die Gefäße identifizieren zu können, und eine Verwechslung zu vermeiden, wurden sie durch Nummern, die vorher schon festgelegt und einem bestimmten Patienten zugeordnet waren, markiert. Zusätzlich wurden die Röhrchen mit dem Datum der Blutentnahme versehen.

Waren die Patientenproben tiefgefroren, mussten sie vor der Verarbeitung aufgetaut und mindestens 5 Sekunden gevortext werden. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Patientenplasma in das entsprechende Röhrchen. Nach jeder Zugabe musste das Gefäß

gut gevortext werden, um eine Vermischung der Lösungen zu erreichen. Nach diesem Schritt wurden 800 µl Isopropylalkohol in jedes Röhrchen pipettiert und direkt nach der Zugabe 5-10 Sekunden gevortext. Anschließend wurden alle Röhrchen 15 Minuten bei ca. 16.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Beendigung des Zentrifugierens konnte das blau gefärbte Pellet im Gefäß lokalisiert werden. Um das Isopropylalkohol aus dem Gefäß zu entfernen, wurde mit einer Pipette der Überstand abgesaugt und verworfen. Bei diesem Schritt musste vorsichtig vorgegangen werden, um das Pellet nicht zu verletzen. Für den nächsten Schritt wurde 1 ml des frisch zubereiteten 70%igen Ethanol in jedes Röhrchen gegeben, gevortext und bei 16.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Erneut wurde dann der Überstand vorsichtig entfernt. Nun wurde das Pellet in 400 µl Probendiluent (CMM DIL) resuspendiert und für 10 Sekunden gevortext. Es konnte dabei ungelöstes Material zurückbleiben, da sich das Pellet nicht immer vollständig löste.

Entweder konnten die Proben sofort weiterverarbeitet oder bei 2-8 °C 24 Stunden bzw. bei -20 °C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Bei sofortiger Weiterverarbeitung wurden 50 µl der aufbereiteten Proben zu den vorbereiteten A-Tubes pipettiert und durch einmaliges Wiederaufziehen von MasterMix und Probe vermischt. Zu Beachten war, dass keine Partikel mit in den MasterMix pipettiert wurden. Die A-Tubes wurden verschlossen und in den vorgesehenen Thermocycler des CMM eingesetzt.

Vorher sollte, entsprechend der Probenanzahl, das Gerät mit den für die vollautomatische Amplifikation und Detektion notwendigen Reagenzien bereits beladen sein, da nach Zugabe der Proben zum MasterMix der Versuch innerhalb von 45 Minuten begonnen werden musste. Die Überschreitung dieser Frist hätte falsch-niedrige Ergebnisse zur Folge gehabt.

Durch Betätigung der „Start“-Taste wurde der automatische Testablauf gestartet.

#### Zubereitung der Kontrollproben

Für die interne Kontrolle wurden bei jedem Lauf drei Kontrollen mitgeführt (CMV (-) C, CMV (+) C, CMV (#) C). Wie für die Patientenproben, wurde auch für die Kontrollen jeweils ein entsprechend markiertes 2,0 ml Gefäß mit 600 µl Lysis-Puffer vorbereitet. Das mit den Original-Kontrollröhrchen mitgelieferte Humanplasma wurde gevortext und anschließend jeweils 200 µl in die drei Röhrchen mit dem Lysis-Puffer pipettiert

und erneut 10 Sekunden gevortext. Folgend wurden die Original-Kontrollröhrchen 10 Sekunden gevortext und dann jeweils 50 µl in das entsprechende Gefäß gegeben und sofort 5-10 Sekunden gevortext.

Ab diesem Schritt erfolgte die Weiterverarbeitung der Kontrollen entsprechend der Patientenproben (s.o.).

#### 2.3.1.4 Testablauf

##### Übersicht

Für die quantitative Viruslastbestimmung im CMM wurden nach der Amplifikation und der Denaturierung automatisch vom Gerät Reihenverdünnungen der Proben durchgeführt. Die Extinktion der reihenverdünnten Proben wurde mit einem Quantifizierungsstandard verglichen und so der Titer der Probe errechnet.

Die ersten Ergebnisse lagen ca. 3 Stunden nach Beginn des Laufs vor.

Das Pipettieren der Reagenzien und der Transfer der Reaktionsansätze in den Detektionsküvetten erfolgten vollautomatisch mit einem Transfermechanismus.

Ebenso erfolgten das nach der Hybridisierung und der Konjugatreaktion erforderliche Separieren und Waschen automatisch.

Als letzten Schritt wurde die Messung der Probenextraktion im Photometer des Analyzers bei 660 nm automatisch durchgeführt.

##### Kontaminationsschutz

Durch kontaminierte Pipettenspitzen, Aerosolbildungen oder durch Pipettierfehler können Produkte aus vorherigen PCR in den neuen Lauf übertragen werden. Durch verschlossene Amplifikationsgefäße und durch eine im MasteMix enthaltene Uracil-N-Glycosylase (AmpErase) wurden Kontaminationen im CMM minimiert.

Die AmpErase vernichtete die für frühere Bestimmungen amplifizierte DNS vor dem Erhitzungszyklus durch Katalyse des Abbaus von Desoxyuridin- enthaltender DNS. Die folgende Temperaturerhöhung im Rahmen des Denaturierungszyklus inaktivierte die AmpErase. Die neu gebildeten Amplifikate wurden nicht zerstört.

### Amplifizierung

Die Vervielfältigung der Ziel-DNS erfolgte im Thermozykler. Die für die Amplifikation notwendigen Wechsel zwischen Erwärmung und Abkühlen der A-Ringe wurden in den einzelnen Segmenten des Thermozyklers ermöglicht und die optimale Temperatur automatisch überwacht.

Die Vervielfältigung der Ziel-DNS erfolgte im Wesentlichen in drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Extension.

#### **Denaturierung durch Hitze**

Der erste Schritt der PCR, die Trennung der DNS-Doppelstränge in ihre Einzelstränge, erfolgte durch Hitzedenaturierung. Die die Stränge verbindenden Wasserstoffbrücken wurden durch Erwärmung des Reaktionsansatzes auf über 90 °C getrennt.

#### **Annealing**

Nachdem der Reaktionsansatz abgekühlt war, lagerten sich die 2 spezifische biotinylierten Primer LC 342C und LC 383 an Beginn und Ende der Zielsequenz an, um diese zu markieren. Sie waren komplementär zur Zielsequenz der DNS.

#### **Extension**

Eine erneute Erwärmung des Reaktionsansatzes auf 72 °C führte durch den Thermus aquaticus, einer thermostabilen DNA-Polymerase, zur Verlängerung der Primer entlang der Zielsequenz. Es resultierten mit dem Original identische DNA-Doppelstränge. Für diesen Schritt waren als Katalysatoren Magnesium und überschüssig vorhandene Desoxynukleotidtriphosphate notwendig.

### Detektion

Bevor die Detektion begonnen wurde, musste eine Reihenverdünnung der einzelnen Proben erstellt werden. Dazu wurde je ein Aliquot der amplifizierten Probe aus jedem A-Röhrchen in drei D-Küvetten automatisch pipettiert.

Die erste Küvette diente zur Detektion der unverdünnten Zielsequenz, die zweite zur Detektion des unverdünnten Quantifizierungsstandards. Die dritte entsprach der ersten Verdünnung und wurde mit Amplifikat-Verdünnungsreagenz versehen.

Je ein Aliquot der ersten Verdünnung wurde in zwei weitere D-Küvetten pipettiert.

Diese dienten zur Detektion der ersten Verdünnung von Zielsequenz und

Quantifizierungsstandard. Auf diese Weise konnten nach Bedarf weitere Verdünnungen der Zielsequenz erstellt werden.

Nach dem Transfer eines Aliquots der durch alkalische Lösung chemisch denaturierten Proben in die D-Küvetten, begann die Detektion. Die Nachweisreaktion bestand aus vier Inkubationsschritten: Hybridisierung, Konjugation, Substratkatalyse und Farbmessung

### **Hybridisierung**

Bei diesem Teilschritt banden die bei der PCR gebildeten Amplifikate an zuvor zugeführte komplementäre einzelsträngige DNA-Fangsonden. Diese waren magnetisch geladene, mit HCMV-spezifischen Oligonukleotiden (LC 359) beschichtete Mikropartikel, die zur Zielsequenz komplementäre Bindungsstellen aufwiesen. Bei den folgenden Waschsritten wurden freie Amplifikate entfernt, während die an die magnetisch geladenen Fangsonden gebundenen Amplifikate durch einen Magneten im Röhrchen zurückgehalten wurden.

### **Konjugation**

Nach Zugabe von Avidin-Meerrettich-Peroxidase band diese an die biotinylierten Amplifikate.

### **Substratkatalyse**

Es erfolgte die Zugabe von Tetramethylbenzidin-Substrat und Wasserstoffperoxid zu dem Reaktionsreagenz. Tetramethylbenzidin wurde durch Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei Meerrettich-Peroxidase als Katalysator wirkte. Dabei entstand ein blaues Farbsignal.

### **Farbmessung**

Das bei der Oxidierung entstandene Farbsignal wurde, nachdem die D-Küvetten automatisch in ein Photometer transferiert wurden, bei 660 nm gemessen. Die optische Dichte der Probe wurde aus der Intensität der Lichttransmission durch die D-Küvette mit Probe und der Intensität der Lichttransmission durch Luft (ohne D-Küvette) nach der folgenden Gleichung berechnet:

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

Die Absorption des Leerwerts (Luft) wurde von der optischen Dichte des Reaktionsansatzes (Probe) in jeder D-Küvette subtrahiert.

#### 2.3.1.5 Auswertung

Insgesamt wurden im CMM 540 Plasmaproben von 95 Patienten auf HCMV untersucht. Von diesen waren 72 Proben (27 Patienten) HCMV positiv. Nachdem die Patienten, von denen weniger als 4 Proben zur Verfügung standen, aus der Studie ausgeschlossen wurden, blieben 45 Patienten (392 Proben) mit 4 oder mehr Proben übrig. Davon waren 67 Proben HCMV positiv (25 Patienten).

Die quantitativen Ergebnisse der Detektion wurden als Konzentration in Kopienanzahl/ml Blutplasma angegeben. Im dynamischen Messbereich von 400-100.000 Kopien/ml verlief die Nachweismethode linear. Die gemessene Viruslast befand sich in einem Messbereich zwischen 400 und 210.000 Genomäquivalent (GE). Der Median lag bei 5990 GE.

### 2.3.2 In-House PCR

#### 2.3.2.1 Materialgewinnung

Für die DNA-Extraktion wurden 3-5 ml EDTA Vollblutröhrchen verwendet. Die DNA-Extraktion wurde mit QIAamp Blood Kit 250 durchgeführt (s. Kapitel DNA-Extraktion mit QIAGEN-Säulen).

#### 2.3.2.2 PCR

Die in unserem Labor durchgeführte PCR wurde nach Einsele et al. (1991) durchgeführt und bei Löffler (1994) beschrieben.

Das für HCMV spezifische PCR-Amplifikat hat eine Länge von insgesamt 147 bp. und liegt im Bereich des immediate-early-Genes 1 auf dem 4. Exon. Als PCR-Inhibitionskontrolle wurde parallel ein humaner HLA-DR $\beta$ -1-Gen-Abschnitt amplifiziert. Ampuwa diente als Negativkontrolle und somit als Spezifitätskontrolle.

#### **Herstellung einer Eichkurve zur semiquantitativen Auswertung**

Eine Eichkurve wurde, zur semiquantitativen Auswertung der HCMV-Signale der Patientenproben, durch parallel amplifizierte HCMV-DNA erstellt (Hebart et al., 1996). Die hierfür verwendete DNA ist ein Teil aus dem Genom des Stammes AD 169 aus

dem immediate early-Gen 1, 4. Exon. Das verwendete Insert pCM 6018 wurde mit Hilfe des bakteriellen Vektors pACYC 184 (Rüger et al., 1984) kloniert. Nach der photometrischen Vermessung konnte dieses Insert als Standard eingesetzt werden. Folgende Verdünnungsreihe wurde aus einer Stammkonzentration von 230ng/ $\mu$ l klonierter HCMV-DNA hergestellt:

+++	100 fg/5 $\mu$ l (~ 3000 Viruskopien)
++	10 fg/5 $\mu$ l (~ 300 Viruskopien)
+	1 fg/5 $\mu$ l (~ 30 Viruskopien)
-	0,1 fg/5 $\mu$ l (~ 3 Viruskopien)

### **Erstellung der Proben mit Hilfe von Ampuwa**

Von der DNA- bzw. Patientenprobe wurden 80-120 ng in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und dann mit Ampuwa auf 10 ml aufgefüllt.

### **Primer**

Die zwei für die Vervielfältigung der HCMV-DNA eingesetzten Primer, banden an das immediate-early-Gen-1 (IE-Gen 1) auf dem 4. Exon.

“forward primer“: 5´-AGCTGCATGA TGT GAGCAAG-3´

“reverse primer“: 5´-GAAGGCTGAG TTCTTGGTAA-3´

Die Primer zur Amplifikation der Human-DNA stammten beide aus Bereichen des 2. Exons vom DR $\beta$ -1-Gen. Das Amplifikationsprodukt hatte eine Länge von 101 bp.

Die Primer wurden im hauseigenen DNA-Synthesizer hergestellt.

### PCR-Ansatz

Die Erstellung des Master Mix erfolgte nach Tabelle 4. Das Gesamtvolumen pro Probe betrug 50  $\mu$ l (40  $\mu$ l PCR-Mix + 10  $\mu$ l DNA).

	Stammkonzentration	Einzelkonzentration	Volumen
HCMV-Primer-Mix	Pr.1 und 2 je 250 ng/ $\mu$ l	je 150 ng	0,6 $\mu$ l
DR $\beta$ -Primer-Mix	Pr.1 und 2 je 5 ng/ $\mu$ l	je 18 ng	3,6 $\mu$ l
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu$ l	1,5 U/ $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
dNTPs (dATP,dCTP, dGTP, dTTP)	je 25 mM/250 $\mu$ l	0,5 mM	1,0 $\mu$ l
10 x Puffer			5,0 $\mu$ l
Tris pH 9,6	100 mM	10 mM	
NaCl	500 mM	50 mM	
MgCL <sub>2</sub>	100 mM	10 mM	
BSA (BovinesSerum Albumin)	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	5 $\mu$ g/50 $\mu$ l	
Ampuwa			29,5 $\mu$ l

Tabelle 4: Master Mix

### PCR-Verlauf

Anschließend wurde das gesamte Reagenz mit 70 $\mu$ l Mineralöl überschichtet. Es folgten eine einmalige Initialdenaturierung durch Hitze (94 °C) und dann 34 Zyklen PCR mit hintereinander abfolgender Denaturierung bei 94 °C, Annealing und Extension bei 66 °C. Abschließend erfolgte eine einmalige Hitzedenaturierung (95 °C). Die Proben wurden auf Eis gelegt, um eine erneute Zusammenlagerung der denaturierten Einzelstränge zu verhindern. Nach 30 min wurden die Proben unter Öl abgezogen. 43 $\mu$ l je Probe wurden in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt.

#### 2.3.2.3 Slot-Blot Hybridisierung der Amplifikate

##### Fixierung der Nukleinsäuren und Prähybridisierung

Die Nukleinsäuren wurden mit Hilfe einer Miliblot-Kammer auf eine Hybond N+-Nylonmembran fixiert. Die beiden Slot-blot-Membranen für HCMV- und DR $\beta$ -DNA



wurden gemeinsam für 30 min auf der Horizontalwippe im Wärmeschrank bei 42 °C mit einer speziellen Lösung prähybridisiert (Tabelle 5).

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Denhardts-Lösung	50x	5x	50 ml
SSP	30x	6x	100 ml
SDS	10%	0,02%	1 ml
N-Lauroylsarcosin	10%	0,1%	5 ml
a.b.	-	-	344 ml

*Tabelle 5: Prähybridisierungslösung*

#### 50x Denhardts-Lösung

2 g BSA in 100 ml Ampuwa lösen, 2 g Ficoll 400 und 2 g PVP 40 (Polyvinylpyrrolidon) in 100 ml Ampuwa lösen. Anschließend 30 min kochen. Abgekühlt beides 1:1 mischen.

#### 30x SSPE

Natriumchlorid	4,5 M
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	0,3 M
EDTA	0,03 M

#### 10% Natriumdodecylsulfat (SDS)

10 g SDS in 90 ml Ampuwa bei 68 °C im Wasserbad lösen, pH auf 7,2 mit 0,1 N NaOH einstellen.

#### 10% N-Lauroylsarcosin

5 g N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz in 50 ml Ampuwa lösen, sterilfiltrieren.

### **Markierung der HCMV-Detektionsoligonukleotide**

Für den Nachweis der zwei Amplifikate wurden spezifische Sonden eingesetzt, die mit einem Boehringer-Markierungs-Kit mit dig-dUTP markiert waren.

Sonden:

HCMV (Oligo-Sequenz):

5`-GGGTGCACTG CAGGCTAAGG CCCGTGCTAA AAAGGATGA-3`

DRβ (Oligo-Sequenz):

5`-AGGCGGGCCG CGGTGGACAC CTACTIONGAGG-3`

Die Markierung der Sonden erfolgte nach folgendem Ansatz (Tabelle 6). Das Endvolumen betrug 25  $\mu$ l.

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Oligo-nukleotid	30 pM	30 pM	1,5 $\mu$ l
Reaktionspuffer	5x	1x	5,0 $\mu$ l
CoCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2,5 $\mu$ l
Termin. Transferase	25 U/ $\mu$ l	25 U/ $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
dig-dUTP	1 mM	0,1 mM	2,5 $\mu$ l
Ampuwa			12,5 $\mu$ l

Tabelle 6: Markierungs-Kit

### Hybridisierung

Die Membranen wurden durch eine 30minütige Inkubation im Wärmeschrank (42 °C) mit dig-dUTP markierten Sonden hybridisiert.

#### Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung + 1 pmol/ml dig-dUTP markierte Sonde

### Waschschritte

Nachfolgend mussten die ungebundenen Sonden durch mehrere Waschschritte entfernt werden. Dazu dienten Waschlösung 1 und Waschlösung 2 (Tabelle 7 und Tabelle 8).

Es mussten folgende Waschttemperaturen zur optimalen Entfernung unspezifisch gebundener Sonden beachtet werden:

Waschttemperatur für HCMV: 65 °C

Waschttemperatur für DR $\beta$ -1: 55 °C

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
SSPE	30x	2x	66,7 ml
SDS	10%	0,1%	10 ml
a.b.			923,3 ml

Tabelle 7: Waschlösung 1

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
SSPE	30x	6x	200 ml
SCD	10%	1%	100 ml
a.b.			700 ml

Tabelle 8: Waschlösung 2

Anschließend wurden die Membranen bei Raumtemperatur in Puffer 1 (Tabelle 9) äquilibriert und in Puffer 2 inkubiert. Puffer 2 verhinderte unspezifische Bindungen der für die folgende Detektion eingesetzten Antikörper an die Membranen.

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Tris pH	1 M	100 mM	200 ml
NaCl	5 M	150 mM	60 ml
a.b.			1740 ml

Tabelle 9: Puffer 1

### Puffer 2

1% Boehringer Blocking-Reagenz Nr.1093657 in 200 ml Puffer 1 bei 70 °C lösen.

### **Herstellung und Inkubation der Antikörperlösung**

Zum Nachweis der dig-UTP markierten Sonden wurden die Membranen in Polypropylenfolie eingeschweißt und in alkalischem Phosphatase-gekoppeltem Anti-Digoxigenin-Antikörper (4µl / Membran) inkubiert. Die Fab-Fragmente stammten von Schaf-IgG. Erneut erfolgte eine Waschung mit Puffer 1 (Tabelle 9) und dann eine Äquilibrierung mit Puffer 3 (Tabelle 10).

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Tris pH 9,5	1 M	100 mM	50 ml
NaCl	5 M	100 mM	10 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 M	50 mM	25 ml
a.b.			415 ml

Tabelle 10: Puffer 3

### Farbentwicklung zur Detektion der Amplifikationsprodukte

Die Farbentwicklung entstand nachdem die erneut in eine Polypropylenfolie eingeschweißten Membranen in einer Farblösung inkubiert wurden.

Farblösung:

BCIP: 50 mg/ml gelöst in Dimethylformamid      34 µl/Membran

NBT: 75 mg/ml      35 µl/Membran

Puffer 3      10 ml/Membran

Sobald sich auf der Membran alle Signale der Eichkurve abzeichneten, wurde die Farbreaktion gestoppt. Dies dauerte in der Regel 2-4 Stunden. Nun erfolgte die letzte Inkubation in Puffer 4 (Tabelle 11).

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Tris pH 8	1 M	10 mM	5 ml
EDTA	0,5 M	1 mM	1 ml
a.b.			494 ml

Tabelle 11: Puffer 4

Die Folie wurde über Nacht lichtgeschützt getrocknet und anschließend zur Aufbewahrung in Polypropylenfolie eingeschweißt.

Die Auswertung dieses Tests wurde mit Hilfe einer jeweils parallel amplifizierten, klonierten Eichkurve durchgeführt. Ein semiquantitativer Vergleich der HCMV-Signalstärke aus Vollblut erfolgte mit den Signalen von 100 fg, 10 fg, 1 fg und 0,1 fg klonierter HCMV-DNA.

#### 2.3.2.4 Auswertung

60 im CMM positiv getestete Proben (25 Patienten) wurden in der In-House PCR analysiert.

Von den 325 CMM negativen Proben waren in der In-House PCR 30 Proben getestet worden.

Die quantitativen Ergebnisse der Detektion wurden als einfach, zweifach oder dreifach positives Signal angegeben. Folgende Symbole wurden gewählt:

PCR-Slot-blot-Membran:

+++	~ 100 fg Virus-DNA
++	~ 10 fg Virus-DNA
+	~ 1 fg Virus-DNA
-	~ keine positiven Signale

### 2.3.3 LightCycler-PCR

#### 2.3.3.1 Gerät und Materialien

##### Gerätebeschreibung des LightCycler (LC)

Der LC besteht im Wesentlichen aus zwei Funktionsteilen, aus der PCR-Komponente und der Photometer-Komponente (Abbildung 1). Die PCR-Komponente beinhaltet den Rotor und die Hitzekammer. Der Rotor fasst 32 Glaskapillaren, die die Proben beinhalten. Diese Glaskapillaren dienen auch als Küvetten bei der späteren photometrischen Vermessung.

Die Form der Glaskapillaren ermöglicht, dass schon geringste Probenvolumina (10-20 µl) für die Analyse ausreichen. Die Hitzekammer wird von einer Heizspirale mit warmer und kalter Luft versorgt. Die Luft dient als Wärmetransfermedium und führt zum schnelleren Zyklusablauf. Zusätzlich ist das Verhältnis zwischen Kapillaroberfläche und Volumen so gewählt, dass eine sehr schnelle Wärmeübertragung auf die Proben ermöglicht wird. Die für die PCR notwendigen Temperaturwechsel werden somit schnell vollzogen. Es resultieren kurze PCR Zyklen, mit 15-20 Sekunden Dauer. Ein Hochgeschwindigkeitsventilator am Boden der Hitzekammer führt zur gleichmäßigen Luftverteilung und -zirkulation. Überschüssige Luft entweicht über eine Öffnung in der Seite der Kammer. Ein integriertes Meßsystem, ausgestattet mit einem Wärmesensor, der direkt bei den Glaskapillaren am Rotor angebracht ist, kontrolliert und überwacht die in der Kammer vorherrschende Temperatur.

Innerhalb der Photometer-Komponente dient eine blaue Hochleistungsdiode (blaue LED) als Energiequelle für die Anregung der Proben. Ein spezielles optisches System filtert und sammelt das emittierte Licht der Diode zu einer Lichtstärke von 1 mW bei 470 nm Wellenlänge. Die so erzeugten homogenen 470 nm Lichtstrahlen werden auf die in der Glaskapillare befindliche Probe gerichtet. Spezielle (dichroic) Spiegel lenken das von den Proben kommende Licht zu einem von drei Detektionskanälen. Welcher Kanal das Licht empfängt, ist abhängig von den Eigenschaften des verwendeten Leuchtstoffes. Im LC finden 3 Leuchtstoffe Verwendung. Für diese Arbeit wurde LC-Red 640 verwendet.

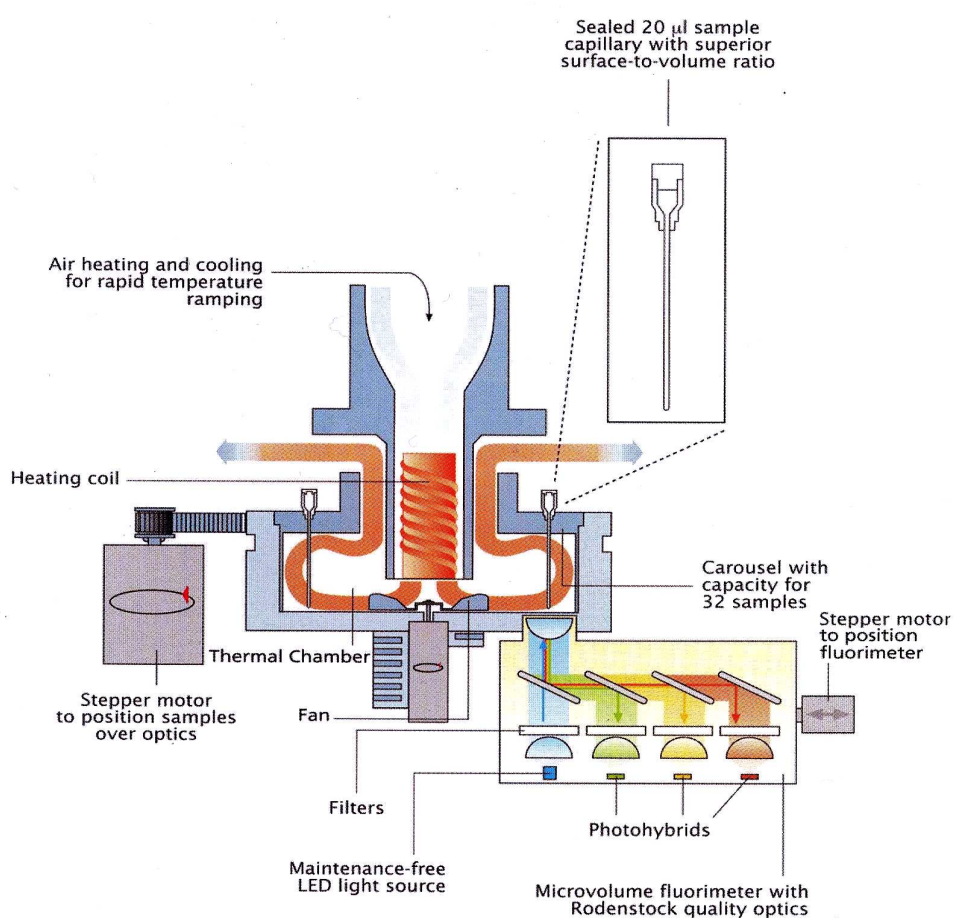


Abbildung 1: LC-Instrument Verwendete Geräte und Materialien und ihre Bezugsquelle

Geräte/Materialien	Bezugsquelle
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
Rotor	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
LightCycler Zentrifuge	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
Hardware: PC mit Pencil Processor 64 MB SDRAM 24x CD-Rom Drive Tastatur Internal lomage ZIP Drive	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
Software: Windows NT 4.0	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
Monitor	
Hewlett-Packard Color Inkjet Drucker	
LightCycler Glaskapillaren + Plastikkappen	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
LightCycler Kits: LightCycler Control Kit DNA LightCycler FastStart Enzyme LightCycler Reaktion Mix Hybridization Proben MgCl <sub>2</sub> Steriles H <sub>2</sub> O	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
LightCycler Color Compensation Set	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
LightCycler-Red 640 N- hydroxysuccinimideester	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
PCR Matrize	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
Primer	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim

Geräte/Materialien	Bezugsquelle
Adapter	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
Kühlbox	Roche Diagnostics GmbH Roche Molecular Biochemicals D-68298 Mannheim
<u>Pipetten</u> Multipipetten 4780 Varipipetten 4810 (10,100, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Röhrchen 1,5ml, safe-look	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank LaminAir, HBB2448	Heraeus, Hanau
Latexhandschuhe, Satin Plus	Safeskin, San Diego, USA
Kittel	
Mundschutz, Surgine	Johnson & Johnson, Arlington, USA

Tabelle 12: LC: Geräte und Materialien mit ihrer Bezugsquelle

### Verwendete Primer und Sonden

Die in unserem Haus für den LC entwickelten Primer (LC A), banden spezifisch an das HCMV-immediate early-1 Gen (IE 1 Gen) auf dem 4. Exon.

LC A:

Primer:

5'-AGCTGCATGATGTGAGCAAG,

5'- GAAGGCTGAGTTCTTGGTAA

Sonden:

5'- AGCACGGGCCTTAGCCTGCA X

5'- TGCACCCCCCAACTTGTTAGC p

Zum Vergleich wurde dem LC A das von Schaade et al. (2000) etablierte und publizierte, für das HCMV Glykoprotein B Gen spezifische, Primer- und Sondenpaar (LC B) gegenübergestellt.

LC B:

Primer:

5'- ATAGGAGGCGCCACGTATTC

5'- TACCCCTATCGCGTGTGTTC

Sonden:

5'- CGTTTCGTCGCTACGCRTACAT X

5'- ACACCACTTATCTYCTGGGCAGC p



### Bestandteile der Reagenzien und ihre Beschreibung

Ausgenommen der Primer wurden alle für die PCR nötigen Reagenzien vom Hersteller mitgeliefert („Master Kit“). Die einzelnen Komponenten des „Master Kit“ konnten bei -25 °C für 3 Monate im Gefrierfach bzw. nach dem Auftauen bei 2-8 °C für maximal 1 Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Bestandteile des „Master Kit“ sind folgend tabellarisch zusammengestellt (Tabelle 13).

Reagenzien	Stammkonzentration
1a LightCycler-FastStart Enzyme	64 µl
1b LightCycler-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes: Reaktionspuffer dNTP Mix (dUTP) MgCl <sub>2</sub> , 10 mM	64 µl
2 MgCl <sub>2</sub> , 25mM	1 ml
3 steriles H <sub>2</sub> O	1 ml

*Tabelle 13: Master Kit*

Der „LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes“, eine speziell für den LC entwickelte fertige „Hot Start“ Reaktionsmischung, ermöglichte in Verbindung mit einer „FastStart Taq DNA Polymerase“ eine steuerbare Primerverlängerung.

Dadurch wurde verhindert, dass bei Raumtemperatur möglicherweise an unspezifische Sequenzen bindende Primer verlängert wurden.

Die für die weitere PCR nötigen Reagenzien (Sonden, MgCl<sub>2</sub> und steriles H<sub>2</sub>O) wurden nach Anweisung des Versuchsprotokolls (Roche Diagnostics) verarbeitet („Master Mix“).

#### 2.3.3.2 Testprinzip

Der LC, ein neues vollautomatisches Verfahren zur spezifischen Bestimmung der quantitativen Viruslast, ermöglichte eine online-Detektion der PCR-Produkte. Das Besondere am LC war das neuartige Detektinsverfahren mit fluoreszenzmarkierten Primer, nach dem Prinzip des „fluoreszenz resonance energy transfer“ (FRET). Dabei

entstand ein Energietransfer zwischen zwei benachbarten Fluoreszenzen, ohne Emission eines Photons. Alle Versuchsschritte liefen im geschlossenen System ab, um eine Kontamination zu vermeiden.

Die von uns entwickelten und eingesetzten Primer (LC A) erkannten spezifisch das HCMV-IE1 Gen (4. Exon).

Als Vergleich wurde ein weiteres, in der Publikation von Schaade et al. (2000) im Journal of Clinical Microbiology 38 (4006-4009) beschriebenes, Primerpaar (LC B) getestet. Diese Primer banden spezifisch das Glykoprotein B Gen des HCMV.

Die online-Detektion der Amplifizierung gelang durch Aufzeichnung der Fluoreszenz während jedem Zyklus. Dies geschah mit Hilfe zweier sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden, die mit verschiedenen Farben markiert waren.

Insgesamt konnten im LC 32 DNA-Proben pro Lauf analysiert werden, inbegriffen der 5 Standardproben (Verdünnungsreihe + 1 negative Kontrollprobe), die jeweils für die interne Kontrolle mitbearbeitet wurden.

### 2.3.3.3 Testvorbereitung

#### Materialgewinnung

Die DNA-Extraktion erfolgte aus 3-5 ml EDTA-Vollblutröhrchen mit QIAamp Blood Kit 250. Darin enthalten waren Qiagen-Säulen, 2ml-Sammelröhrchen, die Reagenzien AL 1 und AL 2, AW-Puffer und die Qiagen-Protease.

#### DNA-Extraktion mit QIAGEN-Säulen

Zunächst wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 40 ml „red cell lysis buffer“ (RCLB) lysiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten auf einer Wippe und anschließend 10 Minuten in der Zentrifuge bei 1500 U/min durchmischt, der Überstand abgekippt und das Pellet resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt viermal wiederholt.

Zusammensetzung von RCLB:

#### Stammkonzentration:

Tris, pH 7,6 500 mM

MgCl<sub>2</sub> 250 mM

NaCl 500 mM

#### Endkonzentration:

Tris, pH 7,6 10 mM

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

NaCl 10 mM

Als nächster Schritt erfolgte die Leukozytenlyse, durch Zugabe von 200 µl AL-Puffer (40 µl vorgeheiztes Reagenz (70 °C) AL 2 + 160 µl Reagenz AL 1, gut gevortext) und 25 µl Protease (125 mg Protease + 6,5 ml Aqua dest.) zu 200 µl Pellet. Das Gemisch wurde für 20 Minuten in einem Wasserbad (70 °C) inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 210 µl 100%-igem Ethanol. Das Lysat wurde dann auf die in einem 2 ml Sammelröhrchen stehende Qiagensäule aufgetragen und bei 8000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Die gefällte DNA blieb im Filter der Säule zurück.

Nach mehreren Waschschritten mit AW-Puffer (196 ml 100%iges Ethanol + 84 ml AW-Puffer-Konzentrat ergibt 280 ml Endvolumen) und anschließender Zentrifugation bei 12.000 U/min für 10 Sekunden, wurde die DNA gereinigt.

Die Säulen wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Die enthaltene DNA wurde in 100 µl 70 °C warmen destillierten Wasser gelöst. Danach folgte die Eluierung durch eine 1minütige Zentrifugation bei 8000 U/min.

Die Messung der optischen Dichte erfolgte im Photometer nachdem die DNA mit Ampuwa 1:100 (10 µl DNA + 990 µl Ampuwa) verdünnt wurde. Bei einer Wellenlänge von 260 nm die optische Dichte der DNA/RNA, bei 270 nm die der Salze, bei 280 nm die der Proteine und bei 320 nm die Löslichkeit.

Damit für die PCR gleiche Ausgangswerte erreicht wurden, mussten alle Proben eine definierte DNA-Konzentration enthalten (80-120 ng DNA/µl). Diese wurden durch Verdünnung einzelner Proben mit Aqua dest. erreicht. So konnten die Signale zueinander und zu einer Eichkurve in Relation gebracht werden.

### Reagenzienpräparation

#### **Erstellung des „LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes“ („Hot-Start“Reaktionsmischung)**

Der „LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes“ wurden durch Mischen des „LC-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes“ (1b) mit dem „LC-FastStart Enzyme“ (1a) hergestellt. Dazu mussten zunächst alle Einzelkomponente gründlich gevortext und dann das gesamte Volumen (ca. 64 µl) der „LC-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes“ (1b) in das „LC-FastStart Enzyme“ (1a) pipettiert werden. Durch mehrmaliges Aufziehen wurde die Lösung vorsichtig durchmischt.

Die so entstandene „Hot Start“ Reaktionsmischung reichte für 32 Proben mit 20 µl Endvolumen.

### Erstellung des „Master Mix“

Die Erstellung des „Master Mix“ erfolgte durch Pipettieren der einzelnen Bestandteile in ein 2 ml Röhrchen nach Tabelle 14.

Bestandteile	Volumen/Probe in $\mu\text{l}$
Steriles $\text{H}_2\text{O}$	3,65
$\text{MgCl}_2$	3,20
LC-FastStart DNA Master Hybridizations Probes	2,00
Beta-Globin Primer Mix	0,30
Beta-Globin Hybridization Proben Mix, LC Red 640 markiert	0,60
Primer	0,25
Gesamtvolumen	10,00

Tabelle 14: Master Mix/Probe

Anschließend wurde das Röhrchen gut gevortext und in eine Kühlbox platziert, um einen vorzeitigen Reaktionsbeginn zu vermeiden.

Für eine effiziente Amplifizierung musste  $\text{MgCl}_2$  zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben werden.  $\text{Mg}^{2+}$  wirkte als Co-Faktor für die „Taq DNA-Polymerase“, durch Bildung löslicher Komplexe mit dNTPs, welche dann von der Polymerase als Substrat erkannt wurden.

Der „LightCycler-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes“ enthielt bereits eine Ausgangskonzentration  $\text{MgCl}_2$  (1 mM), die aber auf die optimale  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration (5 mM) eingestellt werden musste. Tabelle 15 gibt die  $\text{MgCl}_2$ -Volumina in  $\mu\text{l}$  wieder, die bei Zugabe zu 20  $\mu\text{l}$  PCR-Volumen, die zu erreichende  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration ergeben.

Zu erreichende $\text{MgCl}_2$ - Konzentration in mM	1	2	3	4	5
Erforderliche Zugabe von 25mM $\text{MgCl}_2$ -Volumen in $\mu\text{l}$	0,0	0,8	1,6	2,4	3,2

Tabelle 15: Die zu Erreichung der optimalen  $\text{MgCl}_2$  Konzentration (in mM) noch zum Reaktionsgemisch zuzuführende  $\text{MgCl}_2$  Konzentration (in  $\mu\text{l}$ )

Zu beachten war jedoch, dass eine zu hohe  $MgCl_2$ -Konzentration die dsDNA stabilisieren und dadurch zu einer inkompletten Denaturierung der Ziel-DNA bzw. zu einer unspezifischen Primerhybridisierung führen konnte.

### **Fertigstellung der Reaktionsgemische in den Glaskapillaren**

Entsprechend der Probenanzahl (Patientenproben + Verdünnungsreihe + 1 Negativkontrolle) wurden nummerierte Glaskapillaren in einen gekühlten Adapter gestellt und in jede jeweils 10  $\mu l$  „Master Mix“ pipettiert.

Anschließend wurde, um eine Kontamination der Sterilbank zu vermeiden, die Laborbank gewechselt, ein neues Paar sterile Handschuhe angelegt und mit anderen Pipetten weitergearbeitet.

Nachdem die Patientenproben, die Verdünnungsreihe und die Negativkontrolle gründlich gevortext wurden, erfolgte die jeweilige Zugabe von 10  $\mu l$  in die einzelnen Glaskapillaren. Danach wurden die Kapillaren mit einem Plastikdeckel verschlossen.

### **Beladen des LC**

Die Kapillaren wurden anschließend in den Rotor platziert und bei 2000 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Nun wurde der Rotor samt den Glaskapillaren in den LC deponiert, die Reihenfolge der Kapillaren nochmals kontrolliert und der Deckel des LC verschlossen. Der Lauf wurde gestartet.

### Zubereitung der Negativkontrolle und der Verdünnungsreihe

Für die interne Kontrolle wurden in jedem Lauf eine Negativkontrolle und eine Verdünnungsreihe mitanalysiert. Als Negativkontrolle diente steriles  $H_2O$  (10  $\mu l$ ). Die Verdünnungsreihe wurde frisch vor jedem Lauf zubereitet. Dazu wurde humanes Genom DNA in Wasser nach folgendem Prinzip aufgelöst:

$$\begin{aligned} 1:10 &= 1,5 \text{ ng}/\mu l \\ 1:100 &= 150 \text{ pg}/\mu l \\ 1:1.000 &= 15 \text{ pg}/\mu l \\ 1:10.000 &= 1,5 \text{ pg}/\mu l \end{aligned}$$

### Erstellung des Versuchsprotokolls

Bevor die Aufbereitung der Proben begann, wurde das Versuchsprotokoll im Computer erstellt, damit nach der Fertigstellung der Reagenzien der PCR-Lauf ohne Verzögerung begonnen werden konnte.

Die Programmierung des Experiments und Eingabe der Patientenproben nahm ca. 15 Minuten in Anspruch. Es mussten die Patientenproben, die Verdünnungsreihe und die Negativkontrolle tabellarisch eingegeben werden. Anschließend erfolgte die Einstellung des LC-Experiments für den jeweiligen Lauf.

#### 2.3.3.4 Testablauf

##### Übersicht

Die folgenden PCR-Schritte (Amplifizierung, Hybridisierung und Detektion) liefen im LC vollautomatisch ab. Die ersten Ergebnisse lagen nach ca. 20 Minuten vor.

Durch die Verwendung zweier jeweils mit LC-Red 640 oder Fluoreszein markierten sequenzspezifischen Hybridisierungsproben gelang eine spezifische online-Detektion der PCR-Produkte. Die Messung der Probenextraktion erfolgte im Photometer des Gerätes bei einer Wellenlänge von 640 nm.

##### Kontaminationsschutz

Mögliche Kontaminationsquellen waren verunreinigte Laborbänke, Pipetten und andere Laboreinrichtungen, wie der Untersucher selbst. Diese Verunreinigungen konnten von vorherigen PCR-Präparationen und Läufen, von Plasmid-DNS oder von Kreuzkontaminationen zwischen einzelnen Proben verursacht werden.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde mit Mundschutz, Kittel und sterilen Handschuhen gearbeitet. Zusätzlich wurden die DNA-Präparation, die Reagenzienvorbereitung und die Probenvorbereitung jeweils unter verschiedenen Sterilbänken und mit verschiedenen sterilen Pipetten durchgeführt. Auch wurden alle verwendeten Materialien vor ihrem Gebrauch autoklaviert. Nachdem alle nötigen Reagenzien unter sterilen Bedingungen in die Glaskapillaren pipettiert wurden, wurden diese mit einem Plastikverschluss fest verschlossen. Ab diesem Zeitpunkt blieben die Glaskapillaren bis zum Ende des Laufes ungeöffnet, alle weiteren Schritte der PCR wurden im geschlossenen System durchlaufen. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Glaskapillaren im verschlossenen Zustand verworfen.

Einen weiteren Schutz vor Kontamination durch Verschleppung bot die Verwendung der, aus dem Bakterium BMTU 3346 isolierte, hitzelabile Uracil-DNA Glycosylase

(UNG). Das UNG spaltete chemisch veränderte PCR-Produkte von früheren Amplifikationen ohne dabei die ursprünglichen Matrizen oder Primer zu verändern. Der Wirkmechanismus beruhte auf eine durch UNG verursachter Inaktivierung der kontaminierten DNA. Während der PCR wurden alle dTTP-Nukleotide durch dUTP ersetzt. Bei durch Verschleppung verursachter Kontamination fanden sich bei der nächsten Amplifizierung durch dUTP chemisch veränderte PCR-Produkte. Damit diese nicht mehr als erneute PCR-Matrize dienen, wurden vor der nächsten Amplifikation alle neuen PCR-Produkte mit UNG behandelt (eine Einheit UNG pro 20  $\mu$ l LC-Reaktionsmischung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann nach Anweisung verarbeitet). Die Behandlung führte dazu, dass sich bei einer Kontamination UNG an U-DNA hybridisierte. Diese apyrimidine Nukleotide wurden bei alkalischer pH und Hitze gespalten und konnten so nicht mehr als PCR-Matrize dienen und zu falsch positiven Ergebnissen führen (Abbildung 2).

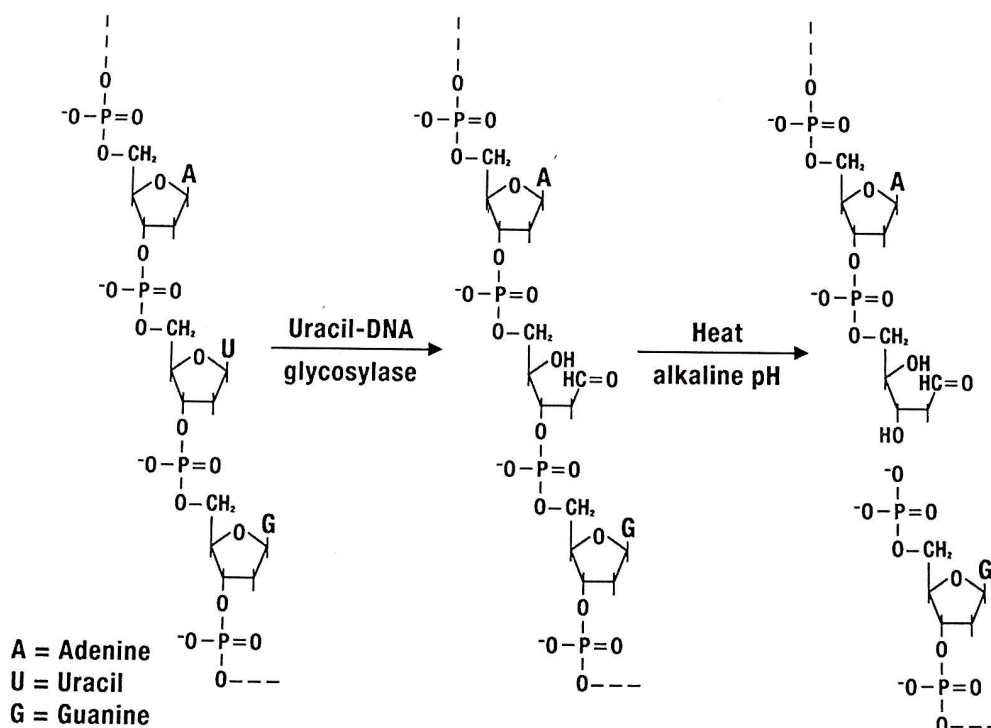


Abbildung 2: Kontaminationsschutz mittels UNG

Eine weitere Möglichkeit der Kontamination durch unspezifisches Annealing und Primer-Verlängerung durch die DNA-Polymerase bei Raumtemperatur wurde mittels „LC-FastStart Taq DNA Polymerase“ verhindert. Die „FastStart Taq DNA

Polymerase“, eine modifizierte Form der hitzestabilen „Taq DNA Polymerase“, war durch hitzelabile Blockaden (Anti-Taq Antikörper) an ihren Aminosäureresten bei Raumtemperatur inaktiviert. Dadurch wurde verhindert, dass bei Raumtemperatur möglicherweise an unspezifische Sequenzen bindende Primer verlängert wurden. Der „Hot Start“, d.h. die Primerverlängerung, begann mit der Entfernung der blockierenden Gruppen, durch Erwärmung des Reaktionsgemisches auf 95 °C.

### Amplifizierung

Die Vervielfältigung der Ziel-DNA erfolgte vollautomatisch in der Hitzekammer.

Die für die Amplifizierung erforderlichen Temperaturen wurden vor jedem Versuch im Versuchsprotokoll festgelegt und dann automatisch überwacht.

Am Anfang jedes Laufes erfolgte eine einmalig Inkubation bei 95 °C für 9 Minuten, um die „FastStart Taq DNA-Polymerase“ zu aktivieren (s.o.). Die anschließende Trennung der doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge erfolgte durch Hitzedenaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden. Bei dieser Temperatur lösten sich die die Stränge verbindenden Wasserstoffbrücken. Nachdem die Temperatur auf 55 °C abgekühlt war, lagerten sich die Primer an spezifischen Sequenzen der DNA-Matrize an (Annealing). Dieser Vorgang dauerte 5-15 Sekunden. Erst jetzt erfolgte die Hybridisierung der zwei mit Farbstoff markierten Sonden nebeneinander, an die DNA. Die zwei Farben, LC-Red 640 und Fluoreszein, kamen so in unmittelbare Nachbarschaft zu einander. Das dadurch entstandene optische Signal wurde am Ende der Annealing-Phase, wenn das Maximum der Intensität des emittierten Lichtes erreicht war, vom Photometer registriert (s.u.). Diesem Schritt folgte eine erneute Temperaturerhöhung auf 72 °C und die Verlängerung der Primer durch die Polymerase, entlang der Zielsequenz (Elongation). Danach nahm die DNA wieder ihre ursprüngliche doppelsträngige Form an, die Sonden lösten sich voneinander ab und das optische Signal erlosch.

### Detektion

Zwei speziell entwickelte, sequenzspezifische Sonden (Donor und Akzeptor), markiert mit zwei Farbstoffen, machten die online-Detektion im LC möglich. Sie erfolgte nach dem Prinzip des fluoreszenz resonance energy transfer (FRET).

FRET ist ein von der Entfernung zwischen zwei benachbarten Fluoreszenzen (mit Farbstoff markierte, sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonden) abhängiger



Energietransfer, der ohne die Emission eines Photons entsteht. Dazu müssen der Donor und der Akzeptor in direkter Nachbarschaft zueinander liegen. Das Spektrum des Akzeptors muss die Fluoreszenzemission des Donors überlappen. Der detektierte Farbausschlag vom Donor und vom Akzeptor muss gleich ausgerichtet sein.

Der Donor war am 3'Ende mit Fluoreszein und der Akzeptor am 5'Ende mit LC-Red 640 markiert. Beide Sonden hybridisierten in enge Nachbarschaft zueinander an der Zielsequenz und brachten so die zwei Farbstoffe in direkte Nähe aneinander. Nachdem das Fluoreszein (Donor) von einer blauen Lichtquelle aus dem LC angeregt wurde, entstand grünes Fluoreszein-Licht einer etwas längeren Wellenlänge. Diese Energie wurde auf die sich in der Nachbarschaft befindliche mit LC-Red 640 markierte Sonde (Akzeptor) übertragen (Energietransfer). Der Akzeptor wurde angeregt und emittierte Fluoreszenz einer anderen Wellenlänge (Abbildung 3). Diese Fluoreszenz wurde anschließend, nach der Annealing, vom Photometer bei einer Wellenlänge von 640 nm gemessen. Es entstand nur dann ein messbares Signal, wenn ein FRET stattfinden konnte, also nur, wenn die Sonden nah genug zueinander binden konnten. Diese Tatsache garantierte die hohe Spezifität dieses Detektionsverfahrens. Die Höhe der gemessenen Fluoreszenz war proportional zu der Menge der während der PCR produzierten DNA.

Dieses Verfahren ermöglichte eine Echtzeit-PCR, bei der schon während der Amplifizierung die sequenzspezifische Analyse und Detektion der PCR-Produkte gelang.

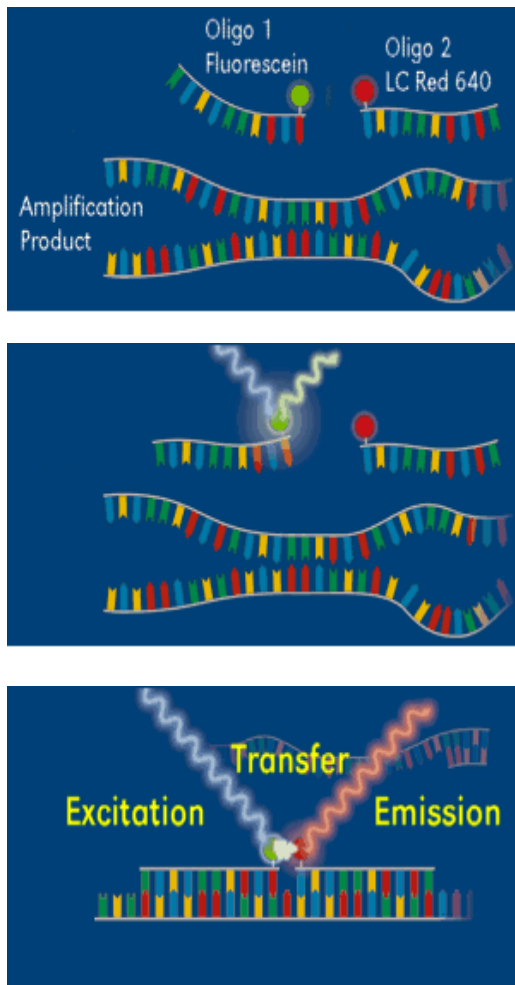


Abbildung 3: FRET

#### 2.3.3.5 Ergebnisse

##### Auswertung

##### **Quantifizierung**

Nachdem der LC gestartet wurde, erschienen am Monitor in Echtzeit die aktuelle Fluoreszenz-Wertigkeit und die Entwicklung der Fluoreszenz für jede Probe (durch unterschiedliche Farben optisch dargestellt), wie auch die aktuellen Temperaturen während dem Lauf. Nach der Beendigung des Laufes erschienen ein Temperaturdiagramm (Temperatur vs. Zyklus) und ein Fluoreszenzdiagramm (Fluoreszenz vs. Zyklus) für die Quantifizierung der Ergebnisse.

Der LC bot zwei Methoden für die Quantifizierung. Beide Methoden benutzten Standard-Kurven (Konzentration vs. Zyklus) für die Kalkulierung der

Kopienkonzentration in unbekanntem Proben. Der Unterschied lag aber in der Wahl des Schwellenzyklus für das Diagramm. Bei der „Second Derivate Maximum Method“ erfolgt die Auswertung automatisch, ohne den Einfluss des Benutzers. Nur durch die Wahl der Standardproben wurde die Quantifizierung beeinflusst.

Vorteile dieser Quantifizierungsmethode waren eine schnelle Kalkulierung und die hohe Reproduzierbarkeit.

Die „Fit Points Method“ ermöglichte eine manuelle Auswertung: „baseline“, „noise band“, „crossing-point“ und „crossing-line“ wurden vom Benutzer mitdefiniert.

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung mit der „Fit Point“ Methode durchgeführt.

Die Quantifizierung gelang mit der Erstellung einer Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe von HCMV –DNA, die als Kontrolle diente. In einem Diagramm, in dem die Fluoreszenz gegen die Zyklus-Nummer aufgetragen wurde, konnten drei Segmente der Kurve unterschieden werden: die frühe „background“ Phase begann, wenn die Signale der PCR-Produkte die Hintergrundsignale des Systems überstiegen. Danach folgte die exponentielle Phase (logarithmische Phase), in der die Summe der PCR-Produkte exponentiell anstieg. Die exponentielle Phase in diesem Diagramm wurde auch als logarithmisch-lineare (log-lineare) Phase genannt. Schließlich endete der Kurvenverlauf in einer Plateauphase.

Signifikante Unterschiede der Signalstärke und damit der Kopienanzahl der Proben, konnten nur im log-linearen Kurvenssegment deutlich identifiziert werden, während in der späteren Plateauphase keine deutliche Unterscheidung der Signale möglich war.

Abhängig von der Anfangskonzentration der Ziel-DNA in der Probe, begann der Signalintensitätsanstieg in verschiedenen Zyklen. Umso höher die Kopienkonzentration war, desto weniger PCR Zyklen waren nötig, um ein Fluoreszenzsignal zu erzielen, d.h. schon in einem früheren Zyklus begann der Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Die während der log-linearen Phase ablaufende Amplifikation kann mathematisch durch die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$N_n = N_0 \times E^n$$

$N_n$ : Kopienkonzentration einer Probe, bei Zyklus  $n$

$N_0$ : Anfangskonzentration einer Probe

$E$ : gesamte Reaktionseffizienz

$n$ : der „Crossing Point“ ausgedrückt in Zyklusnummern

Demnach wurden für eine verlässliche Quantifizierung der Probenkonzentrationen (Kopienanzahl) die frühen Zyklen, in denen der exponentielle Anstieg stattfand, herangezogen. Spätere Zyklen (Plateau-Phase) waren für die Ermittlung der Endsumme der PCR-Produkte bedeutend.

Für die Entstehung der Plateau-Phase bei späteren Zyklen waren die begrenzte Konzentration der Polymerase und die Bildung einer zunehmenden Menge von Reaktionsnebenprodukten und dadurch verursachte Reaktionshemmung verantwortlich. Zusätzlich führte die zunehmende Konkurrenz zwischen re-Annealing von PCR-Produkten und Primerhybridisierung zu Reaktionshemmung.

Die kontinuierliche Messung von jedem Zyklus ermöglichte eine genaue Identifizierung der Zyklen, in denen sich die PCR in der log-linearen Phase befand, d.h. sich die PCR-Produkte verdoppelten. In dieser Phase konnte das Signal leicht vom Hintergrund unterschieden werden und lieferte somit verlässliche Informationen über die Anfangskonzentration der Zielsequenz.

Folgende 3 Schritte mussten für die Quantifizierung durchgeführt werden:

Als erstes wurde die „Baseline“-Anpassung zur Subtraktion des Hintergrunds vor der Quantifizierung durchgeführt.

Als zweiter Schritt erfolgte die Platzierung der „Noise band“ zur Trennung von Daten ohne Informationsgehalt (Hintergrundrauschen) von verwertbaren Daten. Dazu musste die rote „Noise band“ mit der Maus an die Stelle bewegt werden, die die Grenze zwischen Hintergrundrauschen und auswertbaren Daten darstellte. Eine optimale Positionierung der „Noise band“ war gegeben, wenn er alle Kurven im unteren Bereich der log-linearen Phase kreuzte. Damit bildete das „Noise band“ die untere Grenze der

log-linearen Phase. Ab jetzt wurde das Hintergrundrauschen ausgeblendet. Nur noch der Teil der Kurve, die zur Quantifizierung herangezogen wurde, war sichtbar.

Um die Quantifizierung nur auf die log-lineare Phase zu begrenzen, musste neben der unteren Begrenzung („Noise band“) des logarithmischen Kurvesegments als letzter Schritt auch sein Verlauf und die obere Grenze festgelegt werden. Dazu diente die „Crossing line“. Mit Hilfe der Maus wurde die grüne „Crossing Line“ so platziert, dass der „Error“-Wert möglichst klein blieb. Dieser Fehler-Wert gab einen Anhaltspunkt für die Abweichungen zwischen den einzelnen Proben an, z. B. bedingt durch Pipettierfehler. Ein Wert über 0,6 bedeutete eine Konzentrationsabweichung von über 50%. Es entstand eine nicht sichtbare Gerade am log-linearen Bereich der Kurve. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der „Crossing Line“ wurde als „Crossing Point“ bezeichnet. Um die nicht sichtbare Gerade anzulegen, wurden Messpunkte („Fit Points“) festgelegt, die sich in der log-linearen Phase der Kurve befanden. In der Regel wurden mit 2 Punkten gute Ergebnisse erzielt. Die Anzahl der Punkte („Number of points“) sollte nicht größer sein als die Zahl der Datenpunkte, die bei der Probe mit der niedrigsten Konzentration in das log-lineare Segment der Kurve fielen. Ebenfalls konnte die obere Grenze der log-linearen Phase durch Setzen von „Fit Points“ ermittelt werden. Dabei war es wichtig, dass die ausgewählten „Fit Points“ sich tatsächlich nur auf der linearen Phase der Kurve beschränkten.

### **Erstellung der Standardkurve**

Nach Beendigung der PCR wurden alle kalkulierenden Schritte automatisch von der LC Software ausgearbeitet, um eine Standardkurve zu erstellen (Abbildung 4). Dazu wurden die „Crossing Points“ (Zyklusnummer) der Standardproben gegen die bekannten logarithmischen Konzentrationen der Standardproben aufgetragen. Die „Crossing Line“ stand für Zyklusnummern, bei denen die Fluoreszenz-Höhe immer unverändert gleich blieb, d.h. immer die gleiche Menge PCR-Produkte in den Proben zu messen waren. Anschließend wurden anhand der Standardkurve die unbekanntes Patientenproben quantifiziert und die berechneten Werte mit den dazugehörigen Patientennamen tabellarisch aufgelistet.

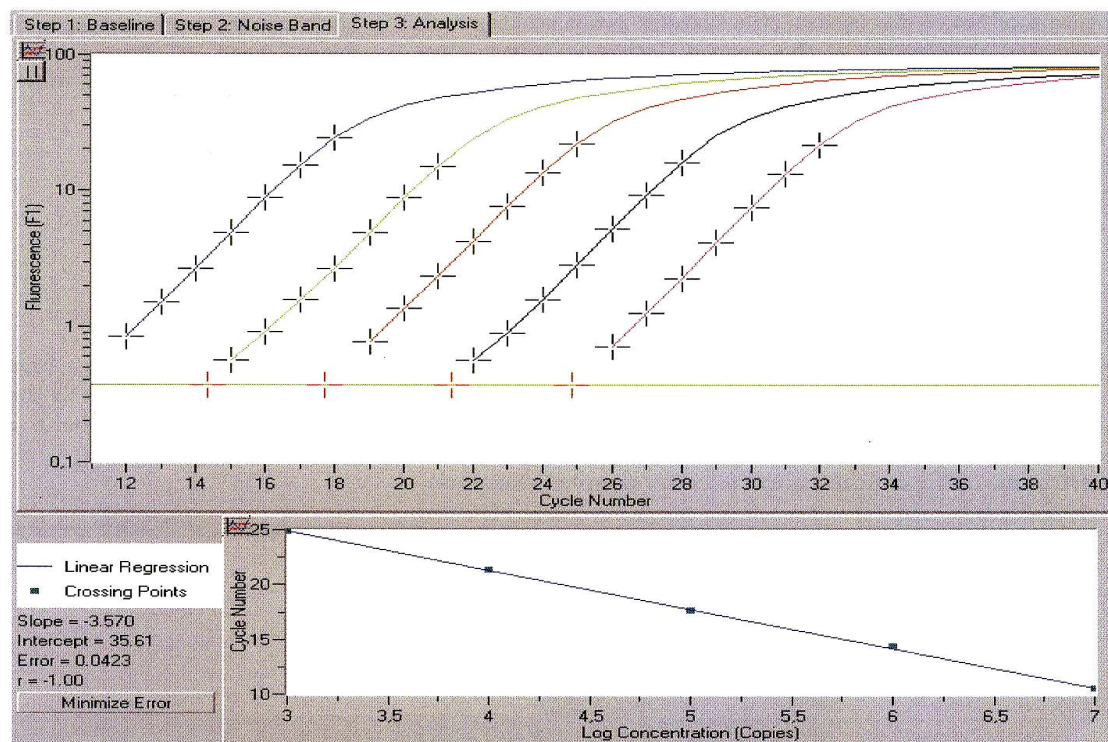


Abbildung 4: Standardkurve

### Interpretation der Messergebnisse

Insgesamt wurden im LC mit beiden Primer-Sondenkombinationen (LC A und LC B) jeweils 64 im CMM als HCMV positiv gewertete Blutproben (25 Patienten) analysiert. 36 im CMM als HCMV negativ getestete Proben wurden zusätzlich im LC A analysiert. Insgesamt wurden im LC A 100 Patientenproben von insgesamt 28 Patienten untersucht. Die quantitativen Ergebnisse der Detektion wurden als Konzentration in Kopienanzahl/ml Blutplasma angegeben. Im dynamischen Messbereich von 250-250.000 Kopien/ml (LC A) bzw. 150-500.000 (LC B) Kopien/ml verlief die Nachweismethode linear. Die Sensitivität zeichnete sich bei 25 GE (LC A) bzw. 150 GE (LC B) ab. Die gemessene Viruslast befand sich in einem Messbereich zwischen 250 und 690.000 GE (LC A) bzw. zwischen 250 und 540.000 GE (LC B). Der Median lag bei 1199 GE (LC A) bzw. 2100 GE (LC B).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Vergleich der Tests

##### 3.1.1 Probenvolumen und Ausgangsmaterial

Im Gegensatz zu In-House PCR und LC, bei denen die DNA-Extraktion mit QIAGEN-Säulen aus 5 ml Vollblutproben erfolgen musste, waren bei CMM schon 200 µl Patientenplasma für die Extraktion ausreichend.

##### 3.1.2 Arbeitsschritte

Der Versuchsablauf im LC erfolgte nach Beschreibung des Herstellers benutzerfreundlich und unkompliziert. Amplifikation und Detektion liefen im LC automatisch ab. Eine persönliche Überwachung des Laufes war nicht notwendig, da das Gerät Software-gesteuert sich selbst überwachte.

##### 3.1.3 Zeitaufwand

Im LC dauerte ein Zyklus ca. 20-60 Sekunden und ein PCR-Lauf mit 40 Zyklen demnach ca. 14-40 Minuten.

Der LC benötigte insgesamt ca. 90 Minuten für einen Lauf, inklusive der außerhalb des Gerätes durchzuführenden Vorbereitung der Proben. Maximal konnten in dieser Zeit 32 Patientenproben analysiert werden. In dieser Angabe ist die DNA-Extraktion aus Vollblut mit QIAGEN nicht inbegriffen. In der Tabelle 16 wurden die einzelnen Bearbeitungsschritte und ihre jeweilige Zeitdauer aufgeführt.

<b>Bearbeitungsschritt</b>	<b>Dauer in Minuten</b>
Anfertigung der Verdünnungsreihe	5 min
Reagenzienpräparation	25 min
Beladen des LC und Softwareprogrammierung	15 min
LC-Lauf	45 min

*Tabelle 16: Zeitdauer der einzelnen Bearbeitungsschritte*

Im Vergleich dazu waren herkömmliche Detektionsverfahren langsamer. Für die Analyse im CMM wurde für die Probenvorbereitung außerhalb des Gerätes ca. 1 Stunde für 12 und ca. 2 Stunden für 24 Patientenproben benötigt. Die Inbetriebnahme des Gerätes und die automatische Amplifikation und Detektion dauerte ca. 5 Stunden, wobei schon nach drei Stunden die ersten Ergebnisse geliefert wurden. Weitere Ergebnisse folgten in einem Durchsatz von 50 Detektionen pro Stunde. Die Bearbeitungszeit belief sich somit auf insgesamt 6 Stunden (12 Proben) bzw. 7 Stunden (24 Proben).

Die Analyse in der In-House PCR benötigte pro Lauf, abhängig von der Probenzahl, 10-12 Stunden.

Weitere Testverfahren und ihre Dauer sind nachfolgend aufgeführt:

2-4 Wochen für die Viruskultur

24-48 Stunden für die Schnellkultur

6-8 Stunden im pp65-Antigenämie-Assay

6-7 Stunden im NucliSens pp67-Assay

### **3.1.4 Kosten**

Der LC ist eine im Vergleich zu anderen Methoden sehr günstige Variante der HCMV-Diagnostik. Zwar ist das Gerät in seiner Anschaffung nicht wesentlich preisgünstiger als der CMM aber im Gegensatz zu CMM, bei dem ein Lauf (12 Proben) ca. 100 Euro kostet, beträgt der Preis für einen LC Test (32 Proben) nur 10 Euro. Die Kosten für die In-House PCR betragen pro Lauf ca. 6 Euro (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Löffler).

### **3.1.5 Zuverlässigkeit des LC-Tests**

#### **3.1.5.1 Validität**

Bei jedem Lauf mussten im LC 4 Standard-Kontrollen als Verdünnungsreihe und eine Negativkontrolle (dest. H<sub>2</sub>O) mitanalysiert werden.

Am Ende musste jeder Lauf auf die stetig abnehmenden Werte seiner Verdünnungsreihe und auf ein DNA-freies Ergebnis der Negativkontrolle überprüft werden.



Waren diese Voraussetzungen erfüllt, galt ein Lauf als valide. War jedoch die Verdünnungsreihe nicht innerhalb der vorgegebenen Grenzen oder die Negativkontrolle HCMV positiv, so galt der Lauf als ungültig und musste wiederholt werden.

Insgesamt waren 3 Läufe im LC A invalid. Davon war bei 2 Läufen (12 Proben) die Negativkontrolle kontaminiert und in einem Lauf (10 Proben) die Standardverdünnungsreihe ungültig. Nach erneuter Herstellung einer Verdünnungsreihe, Verwendung einer neuen Negativkontrolle und Wiederholung der Pipettierungsschritte zeigten alle diese Proben valide Ergebnisse.

Waren nur einzelne Proben eines Laufes ungültig, so wurden nur diese Proben wiederholt analysiert. Dieser Fall trat im LC A bei 3 Proben auf. Die anderen Proben des Laufes zeigten valide Ergebnisse. Nach der Wiederholung der Pipettierungsschritte zeigten 2 Proben valide Ergebnisse und somit ist anzunehmen, dass der Fehler wahrscheinlich im Pipettierungsschritt lag.

Nur eine Probe war trotz zweimaliger Wiederholung wiederkehrend invalid und wurde aus der Studie ausgeschlossen.

Im LC B mussten ebenfalls drei Läufe wiederholt werden, zwei wegen der Kontamination der Negativkontrolle und ein Lauf wegen ungültiger Verdünnungsreihe. Nach der Wiederholung der Pipettierungsschritte ergaben alle drei Läufe valide Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass die Ursache der Fehler in dieser Phase der Probezubereitung zu vermuten ist.

Im LC B waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine einzelnen Proben ungültig.

#### 3.1.5.2 Reliabilität

16 Proben (8 HCMV positive und 8 HCMV negative) wurden jeweils im LC A und im LC B doppelt bestimmt. In der Wiederholung kam es weder im LC A noch im LC B zu abweichenden Resultaten.

#### 3.1.5.3 Spezifität

Da der tatsächliche Wert der Messung unbekannt war und die Vergleichssysteme nicht als absoluter Maßstab zu betrachten waren, gestaltete sich die Spezifitätsbestimmung bei diesem Methodenvergleich schwierig. Wir definierten Proben, die in zwei der drei

Vergleichsverfahren (CMM, In-House PCR und LC A bzw. LC B) negative Ergebnisse zeigten, als HCMV negativ und betrachteten diese als reelle Bezugsgröße.

Um die Spezifität des LC A zu bestimmen, wurden 41 Proben (20 Patienten), die im CMM und im In-House PCR, im In-House PCR und LC A oder im CMM und LC A HCMV negativ waren, gewertet. 37 Proben waren im LC A und jeweils einer der anderen Methoden HCMV negativ und 4 waren im LC A HCMV positiv, obwohl CMM und In-House PCR negative Ergebnisse ergaben. Somit betrug die Spezifität des LC A 90,2 %.

Die Spezifität des LC B wurde nach dem gleichen Schema ermittelt. Von 31 negativen Proben zeigten im LC B 30 Proben ebenfalls ein negatives Resultat. Eine Probe wurde als falsch positiv gewertet. Dieses Ergebnis entsprach einer Spezifität von 96,8%.

#### 3.1.5.4 Sensitivität

Für die Bestimmung der Sensitivität wurden nur Proben verwendet, die in allen drei Verfahren, d.h. im CMM, in der In-House PCR und im LC A getestet wurden.

Als HCMV positiv galt eine Probe, wenn sie in zwei der drei Analysemethoden positive Ergebnisse ergab.

Um die Sensitivität des LC A zu bestimmen, wurden 56 Proben (25 Patienten), die im CMM und in der In-House PCR, in der In-House PCR und im LC A oder im CMM und im LC A positiv waren, gewertet.

44 Proben waren im LC A und in jeweils einer der anderen Messmethoden (CMM oder In-House PCR) HCMV positiv. 12 Proben waren im LC A falsch-negativ, obwohl CMM und In-House PCR HCMV positive Ergebnisse ergaben. Die Sensitivität des LC A betrug demnach 78,6 %.

Die Sensitivität des LC B wurde analog ermittelt.

Insgesamt wurden 54 Proben (25 Patienten), die im CMM und in der In-House PCR, in der In-House PCR und im LC B oder im CMM und im LC B positiv waren, gewertet. 48 Proben waren im LC B und in jeweils einer der anderen Methoden HCMV positiv analysiert worden. 6 Proben wurden im LC B falsch-negativ gewertet. Dies entsprach einer Sensitivität von 88,8%.

## 3.2 Vergleich der Testergebnisse

### 3.2.1 Vergleich der Detektionszeitpunkte

#### 3.2.1.1 Probenvergleich

##### CMM und LC A: Vergleich der Proben

Der direkte Vergleich von CMM und LC A war bei 100 Proben von 28 Patienten möglich. Von diesen 100 Proben waren im CMM 64 Proben als HCMV positiv und 36 als HCMV negativ bewertet worden. Im LC A waren von diesen 100 Proben 49 als HCMV positiv und 51 als HCMV negativ getestet worden.

Die Ergebnisse sind in der Vierfeldertafel 1 zusammengefasst.

		CMM		Summe
		Pos	Neg	
LC A	Pos	44	5	49
	Neg	20	31	51
	Summe	<b>64</b>	<b>36</b>	<b>100</b>

Vierfeldertafel 1: CMM vs. LC A, Vergleich der Proben

Die Übereinstimmung lag bei  $44+31=75$  von 100 (75%).

##### CMM und LC A: quantitativer Vergleich der Proben

In beiden Verfahren sind jeweils 100 Proben auf HCMV getestet worden. Insgesamt waren 44 Proben mit beiden Methoden positiv.

Im Diagramm 1 wird das Verhältnis zwischen den quantitativen Ergebnissen der 44 im LC A und im CMM gemessenen positiven Proben aufgeführt.

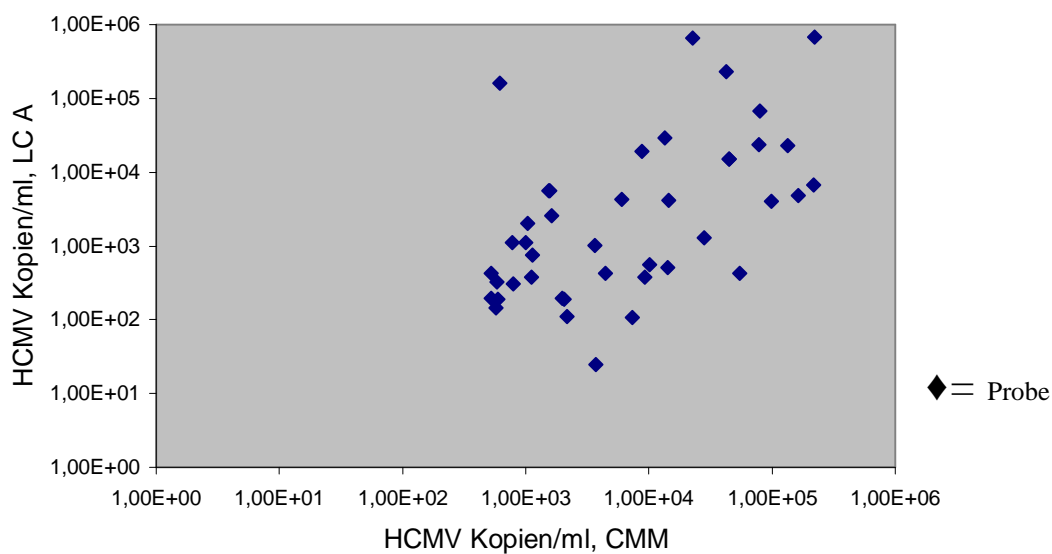


Diagramm 1: LC A und CMM: quantitativer Probenvergleich

Im Diagramm 2 und Diagramm 3 werden die quantitativen Ergebnisse der 44 im LC A und im CMM übereinstimmend positiven Proben dargestellt. Die Kopienzahl pro ml ist logarithmisch aufgeführt.

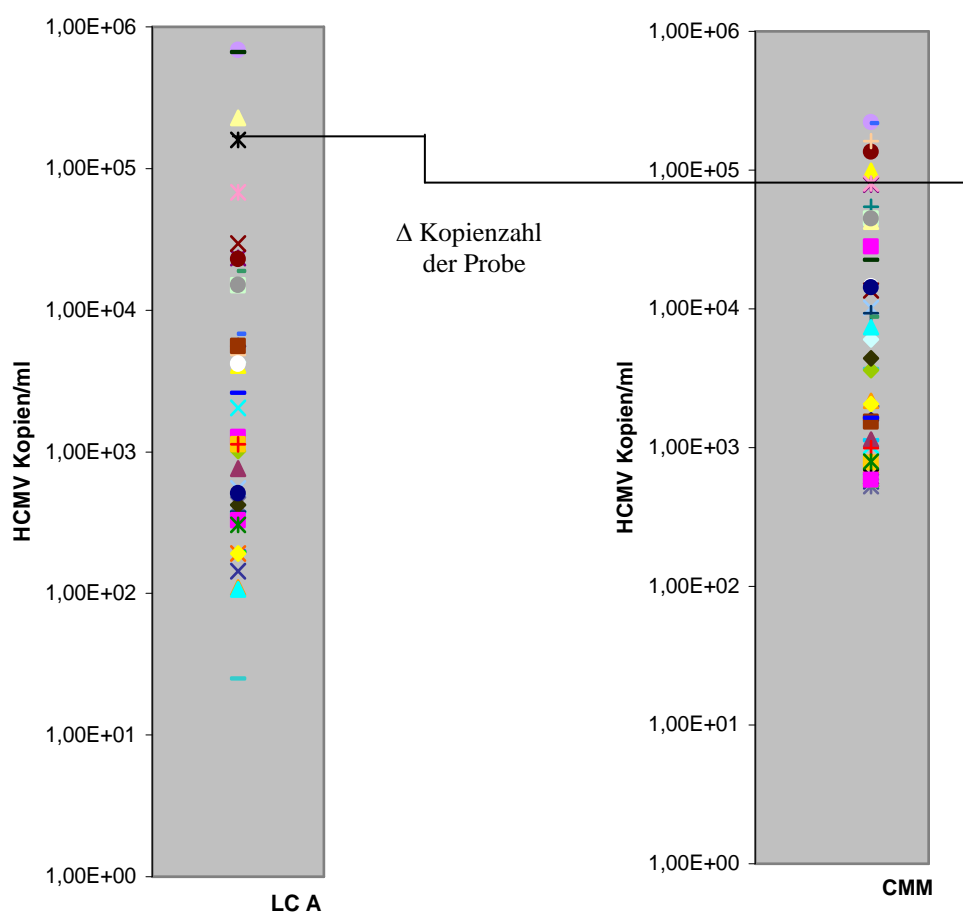


Diagramm 2: LC A, gemessene Kopienzahl/ml

Diagramm 3: CMM, gemessene Kopienzahl/ml

Der Median lag beim LC A bei 1199 Kopien/ml und beim CMM bei 5990 Kopien/ml.

Es wurde deutlich, dass der LC sowohl höherer Viruskonzentrationen ( $>10^5$  Kopien/ml), wie auch niedrige Viruskonzentrationen ( $<10^2$  Kopien/ml) zu detektieren in der Lage war, während der CMM in diesen Grenzbereichen keine Messwerte angab.

Der CMM-Hersteller weist auf dieses Problem hin und empfiehlt, bei Konzentrationen über  $10^5$  Kopien/ml, eine Verdünnung der jeweiligen Probe und anschließend eine erneute Analyse mittels CMM vorzunehmen.

### In-House PCR und LC A: Vergleich der Proben

Insgesamt wurden 90 Proben mit beiden Methoden analysiert. Im LC A waren 48 Proben HCMV positiv und 42 HCMV negativ gewertet worden. In der In-House PCR fielen 40 Proben HCMV positiv und 50 HCMV negativ aus.

9 Proben wurde in der In-House PCR als „grenzwertig“ („(+)“) positiv befundet. Im klinischen Alltag kann eine Blutprobe entweder positiv oder negativ sein, die Formulierung „grenzwertig“ wird nicht verwendet. Aus diesem Grund wurden grenzwertige Ergebnis als negative Ergebnisse gewertet.

Die Ergebnisse sind in der Vierfeldertafel 2 zusammengefasst.

		In-House PCR		Summe
		Pos	Neg	
LC A	Pos	33	15	48
	Neg	7	35	42
Summe		40	50	90

*Vierfeldertafel 2: In-House PCR vs. LC A, Vergleich der Proben*

Die Übereinstimmung lag bei  $33+35=68$  von 90 (75,5%).

### Quantitative und Semiquantitative Resultate

Insgesamt wurden 33 Proben in der In-House PCR und im LC A positiv getestet. Einem einfach positiven PCR-Signal („+“) der In-House PCR entsprachen 19 im LC A gemessene Proben mit einer mittleren Viruslast von ca. 2500 G/ml. 8 Proben, mit einer mittleren Viruslast von ca. 12000 G/ml, entsprachen einem zweifach positiven PCR-Signal („++“) und 6 Proben einem dreifach positiven PCR-Signal („+++“). Diesen 6 Proben konnte eine durchschnittliche Viruslast von ca. 271000 G/ml zugeordnet werden.

In der Tabelle 17 wurden die im LC A gemessenen Viruslasten den parallel bestimmten In-House PCR-Ergebnissen gegenübergestellt.

		In-House PCR		
		+	++	+++
<b>LC A</b>	Anzahl der im LC getesteten Proben, die dem folgenden PCR Signal entsprechen	19	8	6
	Durchschnittliche Viruslast in G/ml	2538	12422,5	270747,33
	Spannweite	25-23361	107-67682	4841-685420

Tabelle 17: In-House PCR vs. LC A, semiquantitative und quantitative Ergebnisse

Bei dem Vergleich der semiquantitativen Ergebnisse der In-House PCR mit den quantitativen Ergebnissen des LC A wurde deutlich, dass von „PCR+“ über „PCR ++“ bis „PCR +++“ auch die mittels LC A gemessene Viruslast anstieg (Diagramm 4).

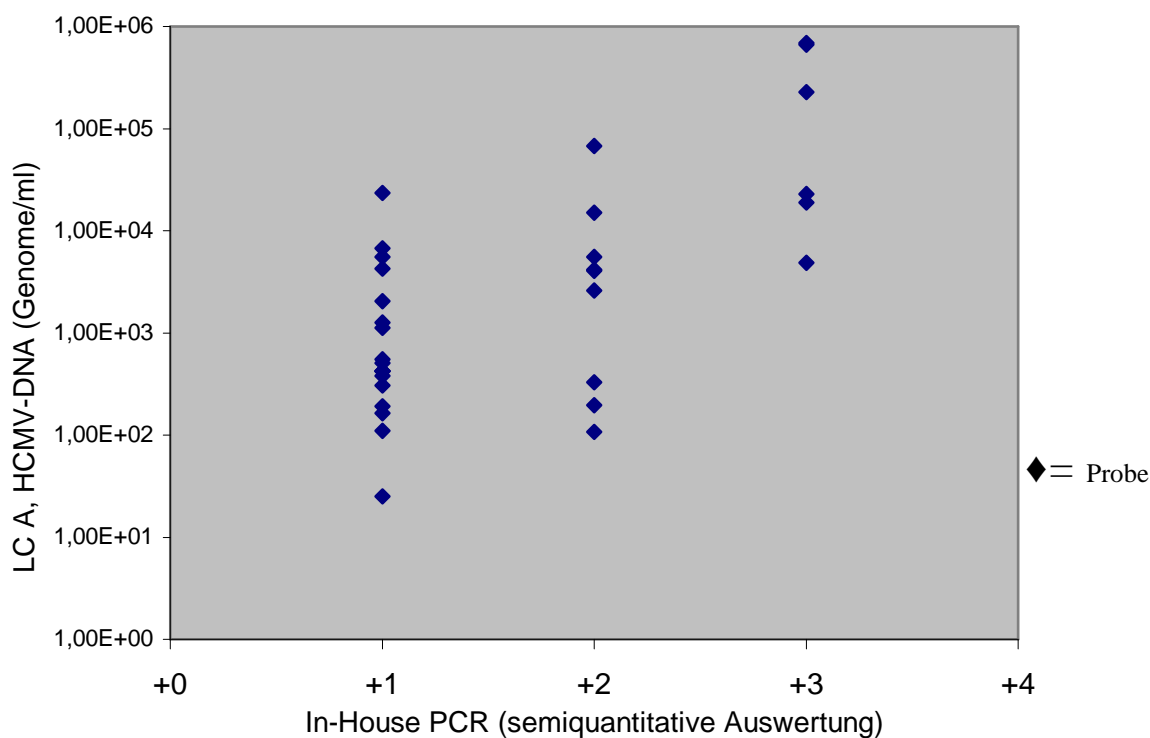


Diagramm 4: In-House PCR vs. LC A, semiquantitative und quantitative Ergebnisse

### Vergleich von CMM, LC A und In-House PCR

Von den insgesamt 90 Proben, die in allen drei Verfahren analysiert wurden, waren 67 Proben in mindestens einer Methode HCMV positiv. Die Verteilung der 67 Befunde sind in Abbildung 5 (Venn-Diagramm) dargestellt.

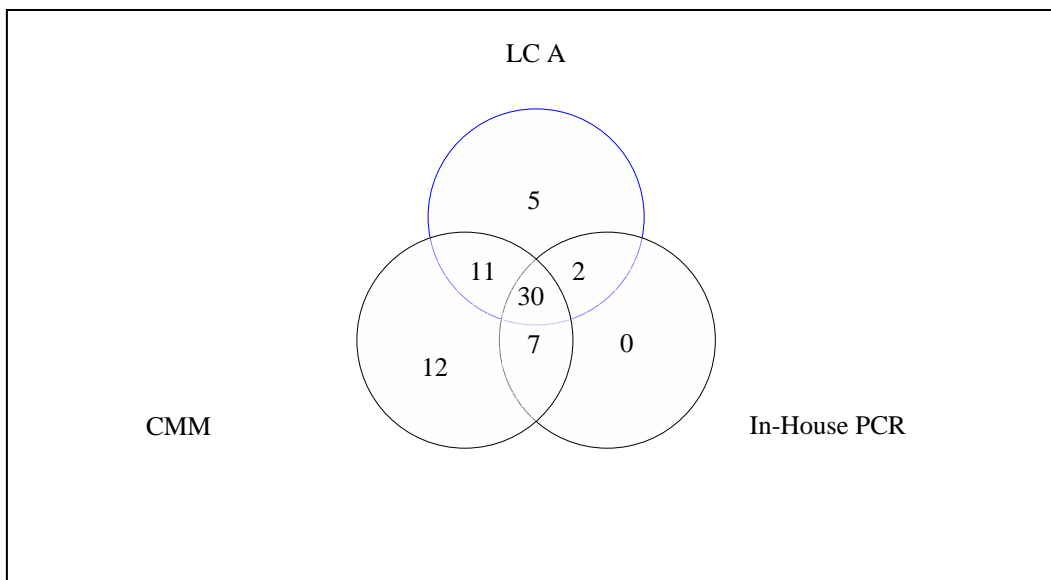


Abbildung 5: Vergleich HCMV-positiver Proben von CMM, In-House PCR und LC A

30 Proben waren in allen drei Methoden positiv getestet worden. 12 Proben waren nur im CMM und 5 nur im LC A positiv, ohne dass noch einer der anderen Verfahren ein positives Ergebnis gemessen hätte. Keine Probe war nur in der In-House PCR positiv. Bei 12 Proben wurden im LC A und im CMM, nicht jedoch in der In-House PCR, positive Ergebnisse gemessen. Im LC A und in der In-House PCR waren 2 Proben positiv getestet worden, obwohl der CMM ein negatives Ergebnis gemessen hatte. 7 Proben waren im CMM und in der In-House PCR, nicht aber im LC A, positiv.

### Vergleich von LC A und LC B

Insgesamt wurden 86 Proben von 28 Patienten in beiden Systemen auf HCMV untersucht.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.



		LC B		Summe
		Pos	Neg	
LC A	Pos	31	17	48
	Neg	6	31	37
	ungültig	1	0	1
	Summe	38	48	86

Tabelle 18: LC A vs. LC B, Vergleich der Proben

31 Proben waren im LC A und im LC B positiv. Bei 31 Proben zeigten beide Methoden ein negatives Ergebnis. 6 Blutproben wurden im LC A negativ aber im LC B positiv getestet. 17 Proben ergaben im LC B negative Ergebnisse, obwohl sie im LC A positiv getestet wurden.

Die Übereinstimmung lag bei  $31+31 = 62$  von 86 (72%).

#### CMM und LC B: Vergleich der Proben

Insgesamt sind 85 Blutproben (28 Patienten) im CMM und im LC B paarweise auf HCMV analysiert worden.

48 HCMV positive und 21 HCMV negative Ergebnisse stimmten in beiden Methoden überein, während der LC B eine im CMM negative Probe als positiv wertete und 15 Proben als negativ, obwohl sie im CMM positiv getestet wurden.

Die Ergebnisse sind in der Vierfeldertafel 3 zusammengefasst.

		CMM		Summe
		Pos	Neg	
LC B	Pos	48	1	49
	Neg	15	21	36
	Summe	63	22	85

Vierfeldertafel 3: CMM und LC B, Vergleich der Proben

Die Übereinstimmung betrug  $48+21=69$  von 85 (81,1%).

### In-House PCR und LC B: Vergleich der Proben

Insgesamt wurden 85 Proben (28 Patienten) im LC B und in der In-House PCR analysiert. 34 Proben wurden von beiden Methoden übereinstimmend als HCMV positiv und 29 als HCMV negativ gewertet. Bei 22 Proben wurden gegensätzliche Ergebnisse ermittelt: 7 Proben wurden vom LC B HCMV negativ getestet, obwohl sie in der In-House PCR positive Resultate ergaben. 15 in der In-House PCR HCMV negative Proben waren im LC B HCMV positiv analysiert worden.

Die Ergebnisse sind in der Vierfeldertafel 4 zusammengefasst.

		In-House PCR		Summe
		Pos	Neg	
LC B	Pos	34	15	49
	Neg	7	29	36
	Summe	<b>41</b>	<b>44</b>	<b>85</b>

Vierfeldertafel 4: In-House PCR und LC B, Vergleich der Proben

Die Übereinstimmung betrug  $34+29=63$  von 85 (74,1%).

#### 3.2.1.2 Patientenvergleich

##### LC A

Bei 25 Patienten wurde in mindestens einer Blutprobe HCMV-DNA mittels CMM nachgewiesen. 20 Patienten waren im gesamten Beobachtungszeitraum HCMV negativ. Bei 24 von den 25 im CMM positiv getesteten Patienten wurde auch im LC A eine HCMV-Infektion nachgewiesen.

Ein im CMM HCMV positiver Patient hatte trotz mehrmaligen Wiederholungen im LC A ungültige Ergebnisse ergeben.

Von den 20 im CMM HCMV negativ analysierten Patienten wurden im LC A nur 3 Patienten getestet. Diese ergaben im LC A ausnahmslos HCMV negative Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 19 zusammengefasst.

		CMM		Summe
		Pos	Neg	
LC A	Pos	24	0	24
	Neg	0	3	3
	ungültig	1	0	1
	Summe	25	3	28

Tabelle 19: CMM vs. LC A, paarweise Vergleich der Patienten

Die Übereinstimmung lag bei  $24+3=27$  von 28 (96,4%).

Bei 21 von 25 im CMM getesteten Patienten wurde eine antivirale Therapie aufgrund der HCMV positiven Ergebnisse eingeleitet. Außer dem einen Patienten, bei dem der LC A mehrmals ungültige Ergebnisse ergab, wurden alle virämischen Episoden der therapierten Patienten mittels LC A erkannt.

Wären die Ergebnisse des LC A für die Therapieentscheidung berücksichtigt worden, so hätten alle HCMV infizierten Patienten, außer einem, eine Therapie erhalten. Der vom LC nicht als HCMV infiziert erkannte Patient erhielt eine 14 Tage dauernde antivirale Therapie mit 410 mg Ganciclovir i.v. einmalig und anschließend 820 mg Ganciclovir i.v. für 14 Tage. Er zeigte im gesamten Verlauf keine Anzeichen einer HCMV-Erkrankung.

### LC B

Im LC B wurden ebenfalls alle 25 im CMM HCMV positiv getesteten Patienten analysiert. Bei 23 Patienten zeigte sich auch im LC B eine HCMV-Infektion. Der Patient, der im LC A mehrmals ungültige Ergebnisse zeigte, war im LC B HCMV positiv. Bei den beiden, vom LC B als HCMV negativ detektierten Patienten, wurde mittels CMM eine einwöchige Virämie mit Viruslasten um  $10^2$  und  $10^3$  G/ml nachgewiesen. Sie zeigten im gesamten Verlauf keine Anzeichen einer HCMV-Erkrankung.

### **3.2.2 Erstmalige Reaktivierungszeitpunkte im Vergleich**

Bei insgesamt 10 Patienten wurde der Zeitpunkt der ersten und der letzten positiven Blutprobe im LC A und im CMM bestimmt. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob es möglich ist, mit dem LC A eine HCMV-Infektion schon zu einem früheren Zeitpunkt zu erkennen als mit der herkömmlichen Methode.

Durch die Bestimmung der letzten positiven Blutprobe sollte geprüft werden, ob die Ausheilung einer HCMV-Infektion mit dem LC A bereits eher feststellbar wird als mit dem CMM. Davon versprach man sich eine Optimierung der Therapiesteuerung, durch früheres Einsetzen aber auch früheres Absetzen der antiviralen Therapie. Bei zwei Patienten konnte der LC A schon zu einem früheren Zeitpunkt als der CMM eine Virämie messen und bei ebenfalls zwei Patienten konnte der LC A noch zu einem Zeitpunkt eine Virämie feststellen, an dem der CMM schon negative Ergebnisse detektierte. Dennoch konnte weder für die Zeitspanne bis zur erstmaligen Reaktivierung noch für die Zeitspanne bis zur letzten Reaktivierung zwischen beiden Testverfahren ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

## **3.3 Klinischer Vergleich**

### **3.3.1 Auswertung der Patientenverläufe**

#### **3.3.1.1 Symptomatische Patienten**

Von den 25 HCMV positiven Patienten zeigten 3 Patienten die Symptome einer HCMV-Erkrankung. Zwei der Patienten erkrankten an einer interstitiellen Pneumonie und einer an einer HCMV-Retinitis.

Die HCMV-Retinitis trat als Symptom der zweiten HCMV-Reaktivierung nach Transplantation auf. Der Patient wurde bei der ersten HCMV-Reaktivierung zunächst mit Ganciclovir 2x 250 mg i.v. therapiert und anschließend mit einer Erhaltungsdosis von 250 mg weiterbehandelt. Zum späteren Zeitpunkt ist die Therapie mit Cidofovir 250 mg erweitert worden, um die neu aufgetretene HCMV-Retinitis zu bekämpfen. Der zweite Patienten erhielt bei der ersten HCMV-Reaktivierung zunächst Ganciclovir 375 mg i.v., dann eine Dosiserhöhung auf 2x 375 mg und schließlich, nach Ansprechen auf die Therapie, eine Erhaltungsdosis von 450 mg i.v. Bei der erneuten HCMV-

Reaktivierung erhielt der Patient Foscarnet 5390 mg (2x 2695 mg) i.v. und nach einer Dosissteigerung 6000 mg i.v.

Der dritte Patient erhielt Ganciclovir 700 mg (2x 350 mg) i.v. und dann 400 mg (2x 200 mg) i.v.

Die HCMV-Serologie war bei allen drei Patienten D+/R+.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Schwere des Krankheitsbildes und der im LC A gemessenen Peak-Werte (HCMV-DNA Genome /ml) festgestellt werden.

Alle drei Patienten starben, wobei zwei Patienten den Folgen (Multiorganversagen) einer opportunistischen Pilzinfektion erlagen. Ein Patient starb an ARDS, als Folge der generalisierten HCMV-Infektion.

### 3.3.1.2 Asymptomatische Patienten

In der Posttransplantationsphase fielen 22 Patienten durch eine asymptomatische HCMV-Infektion auf und wurden nach dem Schema des UKT (s. Kapitel 1.7) antiviral behandelt.

Die Serokonstellation war bei 17 Patienten D+/R+, bei 4 R+/D- und bei 1 D-/R-.

### 3.3.2 Transplantationsserologie und HCMV

Von den 25 HCMV positiven Patienten hatten 20 Patienten die Transplantations-Serologie D+/R+, 4 Patienten waren D-/R+ und einer D-/R-. Von den 20 HCMV negativen Patienten waren 10 D+/R+, 3 D-/R+, 5 D-/R- und 2 D+/R-.

Es konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Transplantationsserologie und dem HCMV-Infektionsrisiko festgestellt werden.

### 3.3.3 Transplantationsmodalität und HCMV

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Transplantationsmodalität und Zeitpunkt der HCMV-Infektion festzustellen, wurde jeweils der Zeitpunkt der ersten HCMV positiven Blutprobe bestimmt und dann zwischen den beiden Patientengruppen (familiär-allogen und fremd-allogen) verglichen.

24 Patienten erhielten eine fremd-allogene Transplantation und 21 Patienten eine familiär-allogene, HLA identische Transplantation.

11 familiär-allogen transplantierte und 14 fremd-allogen transplantierte Patienten wurden in der Posttransplantationsphase HCMV positiv.

In der Gruppe der familiär-allogenen transplantierten Patienten konnte durchschnittlich nach 34 [Spannweite 16-58] Tagen die erste Episode einer HCMV-Virämie beobachtet werden. Dagegen wurde bei den Patienten, die sich einer fremd-allogenen Transplantation unterzogen hatten, durchschnittlich nach 21,85 [Spannweite 7-52] Tagen HCMV-DNA im Blut festgestellt.

Bei der Gegenüberstellung der zwei Transplantationsmodalitäten (HLA-identisch vs. Mismatch) und der mittels LC A gemessenen Peak-Werte von den 25 HCMV positiven Patienten wurde kein Zusammenhang deutlich (siehe Diagramm 5).

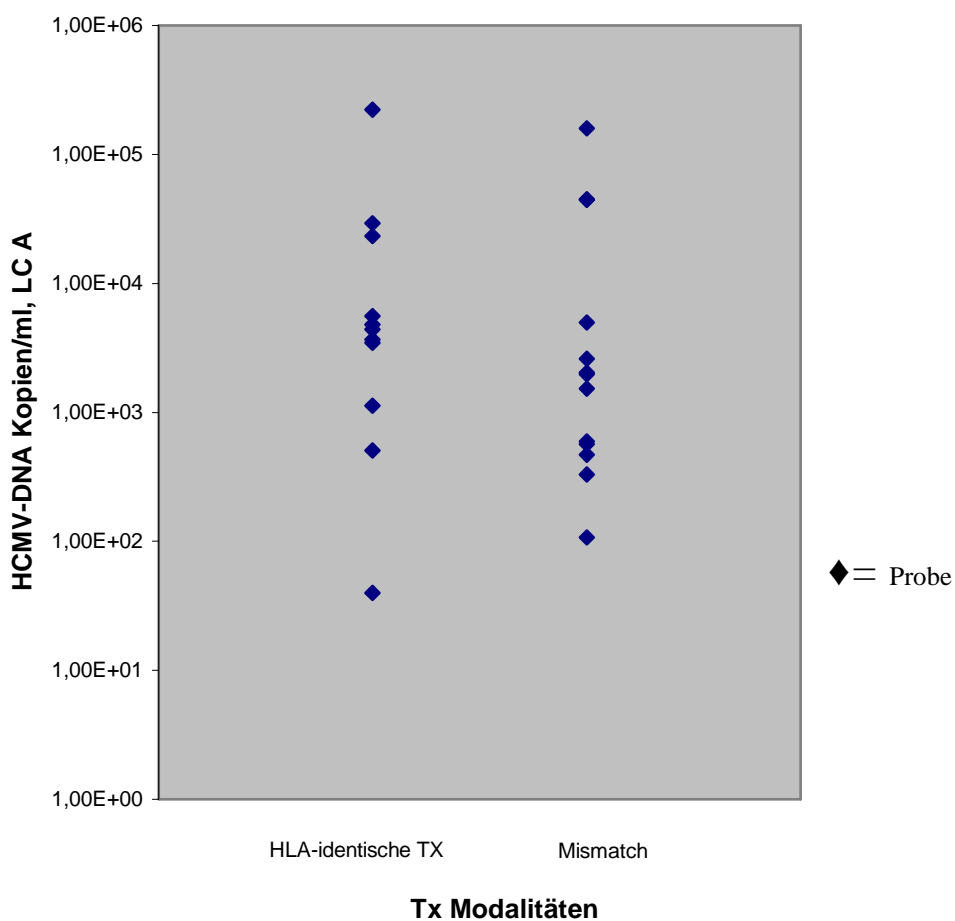


Diagramm 5: LC A, gemessene Viruslast/ml bei den zwei verschiedenen Transplantationsmodalitäten

### **3.3.4 HCMV und opportunistische Infektionen**

Zwei HCMV positive Patienten erkrankten an einer generalisierten Pilzinfektion und starben an den Folgen, an Lungen- bzw. Lungen- und Nierenversagen. Ein Patient erkrankte und ein anderer Patient erlag an einer Infektion unbekannter Ursache.

Diese vier Patienten waren alle HCMV positiv, zeigten jedoch keine Symptome einer HCMV-Erkrankung.

Von den HCMV negativen Patienten erkrankte ein Patient an einer Varizellen Zoster Virus-Infektion und verstarb an den Folgen. Ein Patient starb an den Folgen einer Pneumonie, verursacht durch Adenoviren. Ein weiterer Patient erlag den Folgen einer interstitiellen Pneumonie unklarer Ursache. Ein Patient erkrankte an Toxoplasmose gondii, einer an Aspergillose und einer an Post Zoster Neuralgie.

Demnach zeigten in dieser Arbeit HCMV positive Patienten im Vergleich zu HCMV negativen Patienten kein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Der gegenwärtige Wissenstand

Nicht nur die Tatsache, dass die HCMV-Infektion zu den häufigsten infektionsbedingten Komplikationen bei stammzelltransplantierten Patienten gehört (Meyers et al., 1986), sondern auch die Gefährlichkeit der symptomatischen HCMV-Erkrankung verlangen die Entwicklung einer optimalen hochempfindlichen und hochspezifischen Nachweismethode, die nicht nur für die Detektion des Erregers verwendet, sondern auch für die Therapieüberwachung eingesetzt werden kann.

Trotz der Einführung neuer antiviraler Therapeutika ist die Mortalitätsrate der symptomatischen HCMV-Infektion, insbesondere der interstitiellen Pneumonie sehr hoch (Boeckh et al., 1996 b; Einsele et al., 1995; Ljungman et al., 1992). Hinzu kommt, dass die Nebenwirkungen der momentan eingesetzten Medikamente (Acyclovir, Ganciclovir und Foscarnet) häufig zu Therapieeinschränkungen und sogar zu Therapieabbruch führen und eine antivirale Prophylaxe bzw. Behandlung bei Hochrisikopatienten erschweren.

Obwohl die klinische Notwendigkeit einer wirksamen Prävention der HCMV-Erkrankung bei stammzelltransplantierten Patienten unumstritten ist, gibt es noch keine einheitlich standardisierte Therapierichtlinie.

Gegenwärtig steht fest, dass die präemptive Behandlung die Therapie der Wahl darstellt, denn nur die erfolgreiche Eindämmung einer noch asymptomatisch HCMV-Infektion verhindert die mit einer hohen Letalität einhergehenden Komplikationen einer manifesten HCMV-Erkrankung (Dunn et al., 1991; Einsele et al., 1995; Ljungmann et al., 1996).

Die quantitative PCR und der Antigenämie-Assay erwiesen sich dabei für die Detektion als besonders geeignet, da sie eine HCMV-Infektion signifikant früher als herkömmliche Methoden nachweisen konnten (Boeckh et al., 1992; Einsele et al., 1991; Avery et al., 2000; Matsunaga et al., 1999; Boivin et al., 2000).



Vorteile der frühinterventionellen Therapie zeigen sich in einer signifikanten Reduktion der HCMV-Erkrankung und in einer Reduktion der transplantationsbedingten Mortalität vor dem Tag 100 (early onset) (Einsele et al., 1995; Peggs et al., 2000).

Einsele et al. (2000) stellten jedoch fest, dass bei einer langfristigen (> 4 Wochen) präemptiven Therapie ein signifikant erhöhtes Risiko für symptomatische HCMV-Infektionen und nicht-virale opportunistische Infektionen nach dem Tag 100 (late onset) zu beobachten sind.

Mit Acyclovir, Ganciclovir und Foscarnet stehen drei geeignete Virostatika für die HCMV-Therapie zur Verfügung. Das Ziel bleibt jedoch die Entwicklung eines Medikaments mit starker Potenz und geringer Toxizität.

Deshalb vergleichen viele Studien die Vorzüge und Nachteile der oben genannten Medikamente, um die bestmögliche Therapie gewährleisten zu können.

Ganciclovir erwies sich im Vergleich zu Acyclovir als stärker wirksam (Meyers et al., 1988; Prentice et al., 1994). So führte Ganciclovir zu einer signifikanten Senkung der HCMV-Infektionen. Ein Überlebensvorteil konnte jedoch nicht erzielt werden (Goodrich et al., 1993; Winston et al., 1993). Als erschwerend kam die, durch die Hämatotoxizität von Ganciclovir verursachte, sekundäre Neutropenie hinzu, die zu einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen führte (Salzberger et al., 1997). Der Versuch einer Foscarnetprophylaxe bei stammzelltransplantierten Patienten zeigte einen hohen Grad an Nebenwirkungen (81% der Patienten), wie gastrointestinale Störungen, starke Kopfschmerzen und Urethritis (Ordemann et al., 2000).

2002 wurde in einer Studie von Reusser et al. aufgezeigt, dass mit der frühinterventionellen Therapie mit Foscarnet die gleiche Wirkung erlangt werden konnten wie mit dem präemptiv eingesetzten Ganciclovir. Dabei zeigte aber Foscarnet signifikant weniger Nebenwirkungen und dadurch auch weniger Therapieabbrüche. Trotzdem ist momentan noch unklar, ob Foscarnet aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils zukünftig Ganciclovir aus der präemptiven Therapie verdrängen wird.

Ein weiterer Ansatz für die HCMV-Therapie basiert auf der Erkenntnis, dass vor allem Patienten mit einer gestörten Immunantwort an den drastischen Komplikationen einer HCMV-Infektion erkranken. Schon 1992 konnten Riddell et al. feststellen, dass die zelluläre Immunabwehr eine wichtige Rolle für die Ausprägung des Krankheitsverlaufs

spielt. Neue Strategien auf dem Gebiet der adoptiven T-Zellimmuntherapie wurden entwickelt (Walter et al., 1995) und zeigen vielversprechende Ergebnisse (Einsele et al., 2002).

#### **4.2 HCMV-Diagnostik**

Da eine ideale Nachweismethode für HCMV neben einer hohen Sensitivität und Spezifität, auch Kosteneffektivität sowie eine leichte und schnelle Durchführbarkeit bieten muss, besteht noch Bedarf an einer Verbesserung der schon vorhandenen Methoden.

Um die Eignung des LC für die Routinediagnostik beurteilen zu können, wurden seine Eigenschaften herkömmlichen Nachweisverfahren gegenübergestellt. Neben dem Nachweis infektiöser HCMV-DNA mittels PCR-Verfahren stehen noch der Nachweis von infektiösem Virus, der Nachweis viraler Antigene und der Nachweis von spezifischen Antikörpern für die gängige HCMV-Diagnostik zur Verfügung. Schon längere Zeit sind Untersuchungen bekannt, die belegen, dass bei HIV-, HBV- und HCV-Infektionen quantitative Analysen zu einer besseren Einschätzung des Krankheitsverlaufs und folglich zu einem genaueren Therapiemonitoring führen als qualitative Verfahren (Berger und Preiser, 2002). Es zeichnet sich jetzt mehr und mehr auch bei HCMV-Studien ab, dass qualitative Nachweismethoden für den klinischen Gebrauch weniger geeignet sind. Vielmehr ist es von Bedeutung, die Quantität der Virämie zu bestimmen, denn vor allem die Höhe der Viruslast, also die Quantität, ist für die Pathogenese der Infektion entscheidend (Poirier-Toulemonde et al., 1997; Naitou et al., 1998; Vanpoucke et al., 1999; Leruez-Ville et al., 2003). Eine gegensätzliche Meinung vertreten Mendez et al. (1998), die keine Vorteile der quantitativen PCR gegenüber der qualitativen Analyse in der frühen Diagnostik einer HCMV-Erkrankung aufzeigen konnten.

Nicht nur aus dem Grund, dass nur ein qualitativer, nicht jedoch ein quantitativer Nachweis von Viren möglich ist, nimmt man immer mehr Abstand von der Zellkultur als mögliche Methode der HCMV-Diagnostik. Auch die Tatsache, dass bei einem nicht unerheblichen Teil der Patienten erst mit der Entwicklung von Symptomen einer HCMV-Erkrankung oder sogar erst zu späteren Zeitpunkten positive Ergebnisse

detektiert wurden, führte zu alternativen Verfahren der Diagnostik und Therapiemonitoring (Einsele et al., 1995; Goodrich et al., 1993; Winston et al., 1993).

Der seit 1988 mögliche hochsensitive Nachweis von HCMV-Antigen in Granulozyten, anhand des viral kodierten Proteins pp65, hat mittlerweile eine feste Stellung in der Diagnostik von HCMV-Infektionen eingenommen.

Einen großen Nachteil birgt der Test bei transplantierten Patienten, aufgrund der bei diesen Patienten vorherrschenden erniedrigten Leukozytenzahlen (Machida et al., 2000; Masaoka et al., 2001; Boivin et al., 2000). Flexman et al. (2001) räumten in ihrer Untersuchung deshalb negative Auswirkungen für Laboratorien ein, die nur mit dem pp65-Assay ihre transplantierten Patienten auf HCMV untersuchten. Preiser et al. (2001) lehnten in ihrer Arbeit die Verwendung dieses Verfahrens bei stammzelltransplantierten Patienten sogar entschieden ab. Andere bevorzugen bei dieser Patientengruppe molekularbiologische Nachweismethoden (Halwachs-Baumann et al., 2001).

Problematisch ist bei diesem Verfahren zudem, dass die Aufarbeitung der Proben einen Einfluss auf das Ergebnis hat und somit ein Vergleich zwischen den verschiedenen Labors nur schwer möglich ist (Landra et al., 1995; Perez et al., 1995 a; Perez et al., 1995 b). Für die optimale Sensitivität muss innerhalb von 3 Stunden nach Blutentnahme die Detektion begonnen werden (Boeckh et al., 1994 a), da schon nach 6 Stunden die Anzahl der nachzuweisenden viralen Antigene um 80% reduziert ist (Gerna et al., 1992; Thé et al., 1992).

Um den Test quantitativ auswerten zu können und ihn zwischen verschiedenen Labors vergleichbar zu machen muss der Anteil der pp65-positiven Zellen ermittelt werden. Dies ist hauptsächlich mit automatisierten Techniken möglich, da eine Auszählung pp65-positiver Zellen zu subjektiven, nicht standardisierbaren Ergebnissen führen würde (Landry et al., 1995).

Die Methode ist, bedingt durch ca. 2 Stunden Arbeitsaufwand pro Ansatz, zeit- und kostenaufwendig und deshalb nur bei einer großen Anzahl von Proben rentabel und sinnvoll (van der Meer et al., 1996). Die Ergebnisse liegen ca. nach 6 Stunden vor. Das Verfahren ist hochsensitiv und hat eine gute prognostische Aussagekraft ist jedoch nicht standardisiert (Boeckh et al., 1992; Erice et al., 1992).

IgM- und IgG-Nachweise sind preisgünstige, schnelle und einfach automatisierbare Methoden zur HCMV-Detektion.

Der Nachweis von HCMV-spezifischer IgG beweist einen Kontakt mit dem Virus und führt somit zum indirekten Nachweis einer HCMV-Infektion. IgM stellt eine frühere Antwort des Immunsystems auf eine Infektion dar als IgG. Dieses Verfahren setzt voraus, dass die Immunantwort des Körpers adäquat ist. Das ist jedoch bei transplantierten Patienten nicht gegeben.

Die routinemäßige Bestimmung des serologischen Status (HCMV-IgG) des Spenders vor Transplantation kann zur Einschätzung des Erkrankungsrisikos und des Ansprechens auf eine präemptive Therapie führen. In einer Studie von Matthes-Martin et al. (2003) entwickelten signifikant mehr stammzelltransplantierte Patienten, deren Spender HCMV-IgG negativ waren, eine symptomatische HCMV-Erkrankung, als transplantierte Patienten mit einem seropositiven Donor. Patienten mit einem IgG positiven Spender hatten zudem ein besseres outcome bei der präemptiven Therapie. Spezifität und Sensitivität der Tests liegen zwischen 80 und 100% (Ljungman 1995; Landini et al., 1995).

Zukunftsweisend ist der Versuch, rekombinante Antigene für die Serologie zu entwickeln. Erst dann wird es möglich sein, die erlangten Ergebnisse miteinander zu vergleichen, was momentan aufgrund der unterschiedlichen Kits nur schwer möglich ist. Gegenwärtig ist hierbei noch die Komplexität der Immunantwort gegen HCMV der limitierende Faktor.

Der Anspruch an eine hohe Spezifität einer Nachweismethode beruht auf der Tatsache, dass die antivirale Behandlung mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet ist und somit nicht länger als unbedingt notwendig verabreicht werden sollte. Deshalb ist es von großer Bedeutung, gesunde Patienten (Patienten ohne Virämie) auch als solche zu erkennen, ein effizientes Therapiemonitoring durchzuführen und Übertherapien zu vermeiden (Einele et al., 1995; Hebart et al., 1996; Leruez-Ville et al., 2003).

Die Virusreplikation ist ein dynamischer und sich schnell ändernder Vorgang. Nur engmaschige (wöchentliche), häufige quantitative Kontrollen sichern die optimale Patientenüberwachung und Therapiesteuerung (Kuhn et al., 1994; van der Meer et al., 1996; Hadaya et al., 2003).

Deshalb gehört es heute zum Standard, Patienten nach Stammzelltransplantation wöchentlich im Screeningverfahren auf HCMV zu untersuchen.

Dabei ist ein hochsensitiver Virus-Nachweis maßgebend, denn eine Detektion der Virus-DNA schon vor Auftreten der ersten Symptome, ermöglicht die frühinterventionelle (präemptive) Therapie mit Virostatika (Boeckh et al., 1997; Bowen et al., 1997; Einsele et al., 1991; The et al., 1992).

Diesen Anforderungen entsprechen am ehesten die Bestimmung der mRNA (Greijer et al. 2001; Oldenburg et al., 2000; Witt et al., 2000; Boriskin et al., 2002) und die DNA-Quantifizierung durch quantitative PCR (Aitken et al., 1999; Barret-Muir et al., 2000; Caliendo et al., 2000; Masaoka et al., 2001; Pellegrin et al., 1999; Piiparinen et al., 2001; Piiparinen et al., 2002; Razonable et al., 2001; Tong et al., 2000; Einsele et al., 1991; Ljungman et al., 1994; Machida et al., 2000).

Zudem ist es entscheidend, dass die Nachweismethoden standardisiert sind und dadurch zentrumsübergreifende Studien zur Bekämpfung der HCMV-Infektion möglich werden, um einheitliche Therapiestrategien zu entwickeln.

Eine relevante Rolle spielen zusätzlich der Kosten- und Zeitaufwand eines Nachweiserfahrens, denn nur eine günstige und bedienungsfreundliche Methode eignet sich zur Routinediagnostik von HCMV bei Risikopatienten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der LC dank seiner Testeigenschaften alle Anforderungen, die für ein Verfahren in der Routinediagnostik im Klinikalltag erforderlich sind, erfüllt. Nicht nur die anwenderfreundliche Bedienung und die schnelle Aufarbeitung der Proben (innerhalb von 90 Minuten erhält man alle Testergebnisse), sondern auch das gering einzusetzende Probenvolumen und die im Vergleich zum CMM deutlich niedrigeren Kosten (10 Euro vs. 100 Euro pro Lauf) sprechen für die LC-Methode. Die vollautomatische PCR und die weiteren technischen Vorteile des LC ermöglichen einen hohen Probendurchsatz in kürzester Zeit, ohne die Invaliditätsrate zu steigern und führen dadurch zu einer hohen Wirtschaftlichkeit.

Unter der Bedingung, dass die DNA-Extraktion innerhalb von 24 Stunden nach Blutabnahme erfolgt, sind die Proben 3 Monate bei  $-25^{\circ}\text{C}$  bzw. bis zu 5 Tagen bei  $2$  bis  $8^{\circ}\text{C}$  haltbar. Dies bietet eine große Flexibilität.

Pang et al. kamen in ihrer Arbeit (2003) zu ähnlichen Ergebnissen. In dieser Studie wurde ein Vergleich zwischen LC, CMM und pp65 Antigenemia-Assay bezüglich quantitativer Detektion von HCMV bei solid-organtransplantierten Patienten durchgeführt.

Eine wichtige Grundvoraussetzung für die Eignung des LC als routinediagnostische Methode sollte durch eine baldige Standardisierung erfüllt werden, damit zukünftig neue antivirale Chemotherapeutika durch Multicenter-Studien evaluiert werden können.

### **4.3 Klinische Bedeutung**

#### **4.3.1 Detektion**

Am UKT diente, wie in vielen anderen Zentren, lange Zeit die In-House PCR als Nachweismethode für eine HCMV-Infektion bei stammzelltransplantierten Patienten. Gegenwärtig wird der CMM für die HCMV-Diagnostik eingesetzt.

Die In-House PCR und der CMM entsprechen weitgehend den Anforderungen an Sensitivität und Spezifität, die an ein Nachweisverfahren gestellt werden. Die Spezifität des CMM wurde in Studien mit 100% und die der In-House PCR mit 98,2% beschrieben (Ljubicic, 2002). Der in dieser Arbeit verwendete LC A wurde daher mit dem CMM und der In-House PCR unseres Hauses verglichen.

Der Vergleich auf Patientenebene zeigte einen hohen Grad an Konkordanz (96,4%). Wären die LC A Ergebnisse therapieentscheidend gewesen, wären alle Patienten, außer einem, antiviral behandelt worden. Zudem wies der vom LC A nicht als HCMV positiv identifizierte Patient nur eine niedrige Viruslast (< 400 G/ml) auf. Eine Therapie wäre somit bei einem festgelegten Cut off ohnehin zu diskutieren gewesen.

Bei der paarweisen Gegenüberstellung der im CMM, in der In-House PCR und im LC A gemessenen Proben wurden in 78,6 % (44 von 56 Proben) übereinstimmende HCMV positive Ergebnisse erreicht. Bei 12 Proben kam es zu falsch negativen Resultaten. 37 von 41 Proben (90,2 %) wurden im LC A als richtig negativ und 4 Proben als falsch positiv gewertet.

Die in unserem Labor entwickelten Primer (LC A), die spezifisch den HCMV-immediate early 1 Gen (IE 1 Gen) auf dem 4 Exon erkennen, konnten dem hohen Anspruch an Sensitivität und Spezifität nicht genügen.

Aus diesem Grund muss dieses Primerpaar (LC A) bezüglich der Spezifität und der Sensitivität verbessert werden.

Entscheidend für die HCMV-Diagnostik ist weiterhin, wie früh eine Infektion angezeigt wird, also die erstmalig detektierte Reaktivierung. In dieser Arbeit wurde der LC A gegenüber dem CMM nicht statistisch signifikant früher oder später positiv. Beide Methoden sind bezüglich des Detektionszeitpunktes gleichwertig.

Mehrere Studien mit vergleichbaren Untersuchungen ergaben ähnliche Resultate für den LC und wiesen auf die Eignung des LC zur Verlaufsbeobachtung in der präemptiven Therapie, sowie auf die Eignung als sensitives Screeningverfahren bei HCMV-Infektionen von stammzelltransplantierten Patienten hin (Pang et al., 2003; Schaade et al., 2000; Razonable et al., 2001; Kearns et al., 2001).

Mengelle et al. (2003) kamen in ihrer Arbeit bei solid organtransplantierten Patienten zu vergleichbaren Ergebnissen.

#### **4.3.2 Analyse der Viruslast**

Betrachtet man die Vielzahl der Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und dem Risiko einer HCMV-Erkrankung bei organtransplantierten und HIV-Infizierten beschrieben haben (Aitken et al., 1999; Cope et al., 1997 a u. b; Hassan-Walker et al., 1999; Sia et al., 2000 b; Caliendo et al., 2002; Tong et al., 2000), wäre zu erwarten, dass auch bei symptomatisch an HCMV erkrankten stammzelltransplantierten Patienten die Viruslast insgesamt höher ist als bei asymptomatisch verlaufenden Infektionen. Gor et al. (1998) und Rollag et al. (2002) ermittelten in ihren Arbeiten eine signifikante Korrelation zwischen hoher Viruslast und HCMV-Erkrankungsrisiko bei stammzelltransplantierten Patienten.

Andere Studien zeigten hingegen, dass bei stammzelltransplantierten Patienten kein Zusammenhang zwischen Erkrankungsrisiko und der Höhe der Viruskonzentration besteht (Bovin et al., 1997; Saltzman et al., 1992), bzw. dass die für organtransplantierte Patienten erlangten Ergebnisse nicht auf stammzelltransplantierte Patienten übertragbar sind (Emery et al., 2000b; Flexman et al., 2001).

Obwohl bekannt ist, dass auch niedrige Viruslasten mit einer symptomatischen Erkrankung einhergehen können (Boeckh et al., 1992; Boivin et al., 1998 a; Gor et al.,

1998), fordern immer mehr Untersucher aufgrund ihrer Studienergebnisse, neben einer regelmäßigen und häufigen Kontrolle, auch einen Cut off für Viruslasten in der HCMV-Diagnostik. So könnte mit Hilfe der Viruslast entschieden werden, ob eine antivirale Therapie begonnen wird.

Als möglicher Cut off könnte die Viruskonzentration von  $4,0 \log_{10}$  G/ml gelten. Gor et al. (1998) untersuchten in ihrer Studie die Risiken für eine HCMV-Erkrankung abhängig der Viruslast bei stammzelltransplantierten Patienten: Patienten mit Viruslasten unter  $3,5 \log_{10}$  G/ml erkrankten in weniger als 10% der Fälle an einer symptomatischen HCMV-Erkrankung, während bei Viruslasten zwischen  $3,5$  und  $4,5 \log_{10}$  G/ml 60% der Patienten symptomatisch wurden. Patienten, die Viruslasten über  $5,0 \log_{10}$  G/ml aufwiesen, erkrankten sogar zu 80%.

Beim CMM ist die Detektionsschwelle bei 400 G/ml festgelegt. Diese Grenze scheint sinnvoll zu sein, denn keiner der Patienten, die in der Studie von Ljubicic (2002) Viruslasten unter diesem Schwellenwert vorwiesen, erkrankte an einer symptomatischen HCMV-Infektion. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Caliendo et al. (2000).

Auch für leber- (Cope et al., 1997 a) und nierentransplantierte Patienten (Aitken et al., 1999; Cope et al., 1997 b) sind Cut offs festgelegt.

In dieser Arbeit konnte, aufgrund der kleinen Fallzahl von symptomatisch erkrankten Patienten, keine verwertbare These aufgestellt werden. Von den insgesamt 3 an HCMV erkrankten Patienten hatten alle drei Viruskonzentrationen von  $>10^4$  G/ml.

Der LC verfügt noch nicht über diese Eigenschaft, Viruslasten bis zu einer festgesetzter Mindestgrenze als negativ zu detektieren. Deshalb werden Patienten, die nur eine minimale Virämie vorweisen, als HCMV positiv detektiert. Diese Tatsache birgt die Gefahr von Übertherapien.

Neben der Viruslast scheint auch die Wachstumsrate des Virus eine wichtige Rolle für die Pathogenese der HCMV-Erkrankung zu spielen (Sanchez et al., 2001). Diese Tatsache könnte die Erklärung sein, warum stammzell- und organtransplantierte Patienten trotz niedriger initialer Viruslasten im späteren Verlauf rasch ansteigende Werte zeigten. Dies gilt insbesondere für Transplantierte, die wegen einer schweren GvHD eine starke immunsuppressive Therapie erhielten (Boeckh et al., 1998). In



solchen Situationen wird deutlich, dass sich wöchentliche Screeningverfahren nicht ausreichend für die optimale Verlaufsbeobachtung und Therapiemonitoring eignen.

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Transplantationsmodalität und den durch den LC A gemessenen HCMV peak viral load festgestellt werden. Beim Vergleich zwischen den verschiedenen Transplantationsmodalitäten betreffend dem Zeitpunkt für das Auftreten der ersten HCMV positiven Blutprobe wurde ermittelt, dass in der Gruppe der familiär-allogen transplantierten Patienten durchschnittlich nach 34 [Spannweite 16-58] Tagen die erste Episode einer HCMV-Virämie auftrat, während bei den Patienten, die sich einer fremd-allogenen Transplantation unterzogen hatten, durchschnittlich nach 21,85 [Spannweite 7-52] Tagen HCMV-DNA im Blut fest zu stellen war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in kurzen Zeitintervallen durchgeführte Tests (Eisele et al., 2000) und Parameter wie die Viruslast und Wachstumsrate die Überwachung von Risikopatienten erleichtern. Unklar ist noch, in welchem Masse der peak viral load den Ausbruch und den klinischen Krankheitsverlauf einer HCMV-Infektion beeinflusst und ob die unterschiedlichen Transplantationsmodalitäten den Zeitpunkt einer HCMV-Infektion oder den peak viral load beeinflussen.

Zukünftige Studien sollten sich zusätzlich mit Schwellenwerte für eine präemptive Therapie befassen und untersuchen, in welchem Masse die Viruslast als Grundlage für die präemptive Therapie dienen kann und in wiefern sie sich auf den Verlauf einer HCMV-Krankheiten auswirkt.

#### **4.3.3 Semiquantitative und quantitative Ergebnisse**

Durch den Vergleich des LC A mit der In-House PCR wurde geklärt, ob die semiquantitativen Ergebnisse des In-House PCR mit den quantitativen Ergebnissen des LC A korrelieren. Es konnte gezeigt werden, dass Proben, die in der In-House PCR mittel- und hochgradig positiv waren („++“ oder „+++“), mit höheren quantitativen Viruslasten im LC A bewertet wurden, als nur einfach positive Proben („+“).

#### 4.3.4 Therapiesteuerung

Das frühe und wirksame Antherapieren von HCMV infizierten Patienten und eine möglichst kurze virostatistische Therapie sind die zu realisierende Ziele in der HCMV-Therapie. Zudem sollen Resistenzen, die mit zunehmender Therapielänge und vor allem bei Therapieunterbrechungen auftreten, vermieden werden (Chou, 2001; Emery und Griffiths, 2000 c; Erice, 1999; Gilbert et al., 2002; Hebart et al., 1998; Ketteler et al., 2000; Limaye et al., 2000; Emery et al., 2001). Die optimale Therapiesteuerung vermeidet Über- und Untertherapien und die dadurch entstehenden Nebenwirkungen bzw. Reaktivierungen und führt zu Identifizierung von Patienten mit Resistenzen gegen die verabreichten Medikamente.

Da die HCMV-Konzentration nach Ansprechen auf eine zweiwöchige intravenöse Ganciclovir-Therapie exponentiell abfällt (Cope et al., 1997 b; Razonable et al., 2001) können nur schnelle und häufige laborchemische Kontrollen der aktuellen Viruslast eine optimale Steuerung und Überwachung der antiviralen Therapie garantieren.

Es ist bewiesen, dass HCMV-Kulturen für das Therapiemonitoring nicht geeignet sind, da sie unter antiviraler Therapie in den meisten Fällen (85-93%) negativ werden (Einsele et al., 1991; Yuen, et al., 1995).

Die quantitative HCMV-PCR eignet sich dagegen durch ihre nachgewiesene Sensitivität hervorragend zur Therapieüberwachung (Hebart et al., 1996). Ein Anstieg der HCMV positiven Zellen unter virostatistischer Therapie kann zuverlässig identifiziert werden. So können mögliche Resistenzen und Rückfälle aufgrund inadäquater Suppression der Viruslast früh erkannt und bekämpft werden.

Wie im Kapitel 4.3.2 erörtert wurde, ist die Höhe der Viruslast für den Ausbruch der symptomatischen HCMV-Infektion und ihren Verlauf relevant. Ihre Messung kann Aufschluss über die Pathogenese der HCMV-Infektion geben und dadurch ein besserer Therapieerfolg erreicht werden (Gor et al., 1998; Emery et al., 2000 b). Es liegen bereits erste Studien vor, die abgestufte Therapiekonzepte (die je nach Höhe der Viruslast verschiedene Medikamente mit unterschiedlichen Dosierungen vorsehen) untersuchen (Mori et al., 2002). Durch solche Therapiekonzepte soll die Nebenwirkungsrate der antiviralen Therapien reduziert werden, ohne ihre Wirksamkeit zu reduzieren.

Einsele et al. (1991) konnten zudem nachweisen, dass aufgrund eines negativen PCR-Ergebnisses, die antivirale Therapie gestoppt werden kann, ohne den Patienten zu gefährden. Diese Tatsache besitzt große klinische Relevanz, da durch rechtzeitiges Absetzen der nebenwirkungsreichen Virostatika Übertherapien vermieden werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie viele Tage nach Therapiebeginn der LC A und der CMM bei jeweils den gleichen Proben ein negatives Testergebnis zeigten. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Detektionsverfahren festgestellt werden.

Werden die erhobenen Ergebnisse zusammengefasst, dann wird deutlich, dass der LC als Verfahren für das Therapiemonitoring geeignet ist. Es sind aber noch Untersuchungen bezüglich der Definierung eines Cut offs, Festlegung eines Schwellenwertes für Viruslasten, die eine Therapie erfordern und Detektionszeitpunkte, ab wann eine Therapie wieder abgesetzt werden kann, nötig, um eine optimale Verlaufsbeobachtung und Einschätzung der Behandlung zu gewährleisten.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Der LC ist im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren schneller, günstiger und einfacher durchführbar. Durch die unkomplizierte Handhabung werden Kontaminationen verringert und Kosten eingespart. Der LC eignet sich ebenso zur Diagnostik einer HCMV-Infektion, wie zur Initiierung und Steuerung einer präemptiven Therapie bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation. Das Therapiemonitoring wird durch die Möglichkeit der Quantifizierung erleichtert und ein Nichtansprechen auf eine Therapie oder ein Rückfall können früh erkannt werden. Darüber hinaus scheint durch die Quantifizierung der Viruslast eine bessere Einschätzung der Prognose und eine optimierte individuelle HCMV-Therapie möglich zu sein.

Nachteilig ist die Tatsache, dass der LC noch nicht standardisiert ist. Für die noch notwendigen zentrumsübergreifende Studien, die für die Entwicklung optimaler Therapieschemata durchgeführt werden sollten, ist die Standardisierung jedoch unerlässlich.

In dieser Arbeit stellte sich die Notwendigkeit für eine Festlegung von Detektionsgrenzen heraus. Durch das Fehlen eines unteren Schwellenwertes für die Viruslast wurden Patienten, die nur eine geringe Viruslast besaßen, als HCMV positiv diagnostiziert. Hierbei besteht die Gefahr einer Übertherapie.

Das in unserem Haus entwickelte Primerpaar (LC A) stellte sich im Vergleich zu dem von Schaade et al. (2000) publizierten Verfahren (LC B) bezüglich Spezifität und Sensitivität als verbesserungswürdig heraus. Zwar wären mittels LC A alle HCMV infizierten Patienten, außer einem, identifiziert worden. Beim Probenvergleich bestanden jedoch deutliche Defizite hinsichtlich der Spezifität und der Sensitivität. Weiterhin sollten sich zukünftige Studien mit der Definierung eines Cut offs für die Viruslast, die eine Therapieeinleitung zur Folge haben, befassen.

Die schon bei solid-organtransplantierten Patienten beschriebene Beobachtung, dass die Höhe und die Wachstumsrate der Viruslast einen guten Prognosefaktor darstellen, sollte bei stammzelltransplantierten Patienten durch Studien belegt werden.

Noch ungeklärt ist die Frage, bei welcher Viruslast eine antivirale Chemotherapie beendet werden könnte, ohne den Patienten zu gefährden. Die wenigen Studien zu diesem Thema beziehen sich hauptsächlich auf solid organtransplantierte Patienten. Diese Erkenntnisse sind jedoch nicht auf stammzelltransplantierte Patienten übertragbar und erfordern somit gesonderte Untersuchungen für diese Patientengruppe.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war die Evaluation eines von uns entwickelten Primer-Paares für den LightCycler Instrument (LC A) zur Früherkennung einer HCMV-Infektion bei allogenen stammzelltransplantierten Patienten und die Prüfung der Eignung zur adäquaten Therapiemonitoring.

Als Vergleichssystem diente der Cobas CMV Monitor (CMM), die In-House PCR und ein schon publiziertes Primer-Paar (Schaade et al., 2000) für den LightCycler (LC B). Insgesamt wurden 392 Patientenproben von insgesamt 45 Patienten nach allogener Stammzelltransplantation untersucht.

Beim Vergleich der Resultate der Probenanalysen zwischen LC A und CMM fand sich eine Übereinstimmung von 75%. Bei dem Vergleich der Resultate der von LC A und In-House PCR analysierten Proben ergab sich eine Übereinstimmung von 75,5%.

Die Spezifität des LC A betrug 90,2%, die Sensitivität lag bei 78,6%.

Beim Patientenvergleich konnte zwischen LC A und CMM eine Korrelation von 96,4% festgestellt werden.

Wäre anhand der LC A-Resultate eine Therapie eingeleitet worden, so wären bis auf einen, alle HCMV infizierten Patienten, einer Behandlung unterzogen worden.

Keine der Methoden zeigte ein virämisches Ereignis signifikant früher an und auch bei der Beobachtung von Patienten unter antiviraler Therapie wurde kein Nachweisverfahren signifikant früher negativ.

Wegen zu niedriger Fallzahl (nur 3 Patienten erkrankten an einer klinischen HCMV-Infektion und wiesen dabei Viruskonzentrationen von  $>10^4$  auf) konnte auch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Virushöhe und der Wahrscheinlichkeit für eine symptomatischen HCMV-Erkrankung festgestellt werden.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Transplantationsmodalität und den durch den LC A gemessenen HCMV Peak-Werten festgestellt werden.

Beim Vergleich zwischen den verschiedenen Transplantationsmodalitäten wurde ermittelt, dass in der Gruppe der familiär-allogenen transplantierten Patienten durchschnittlich nach 34 [Spannweite 16-58] Tagen die erste Episode einer HCMV-

Virämie auftrat, während fremd-allogen Transplantierte durchschnittlich nach 21,85 [Spannweite 7-52] Tagen eine Virämie entwickelten.

HCMV-infizierte Patienten zeigten kein signifikant häufigeres Auftreten nicht-viraler opportunistischer Infektionen im Vergleich zu Patienten ohne Virusinfektion.

Der LC eignet sich zur Initiierung und Steuerung einer präemptiven antiviralen Therapie bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.

Die neue LC Methode (LCA) bietet eine schnelle, spezifische, kostengünstige und bedienerfreundliche Analysemöglichkeit.

Jedoch zeigte der LC A, verglichen mit der qualitativen In-House PCR und der quantitativen CMM eine signifikant niedrigere Sensitivität.

Es ist bekannt, dass Patienten mit einer Viruslast von  $<3,5 \times 10^3$  G/ml nur in weniger als 10% der Fälle eine klinisch relevante HCMV-Infektion entwickeln. Aus diesem Grund fordern immer mehr Untersucher einen Cut off für Viruslasten.

Es ist vorauszusagen, dass die Definierung eines Cut off Gegenstand zukünftiger Studien sein wird. So könnte mit Hilfe der Viruslast entschieden werden, ob eine antivirale Therapie indiziert ist. Die Anzahl von Übertherapien könnte reduziert werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahn, J.H., Lee, J.H., Lee, K.H., Kim, W.K., Lee, J.S., Bahng H., Jung, H.Y., Kim, Y.S., Kim, O., Kim, S.H. (1999)  
Successful treatment with ganciclovir for cytomegalovirus duodenitis following allogenic bone marrow transplantation.  
*Korean J. Intern. Med.* 14, 91-94
- Aitken, C., Baret- Muir, W., Millar, C., Templeton, K., Thomas, J., Sheridan, F., Jeffries, D., Yaqoob, M., Breuer, J. (1999)  
Use of molecular assays in diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease following renal transplantation  
*J.Clin. Microbiol.* 37, 2804-2807
- Aritaki, K., Ohyashiki, J.H., Suzuki, A., Ojima, T., Abe, K., Shimizu, N., Yamamoto, K., Ohyashiki, K., Hoshika, A. (2001)  
A rapid monitoring system of human herpesvirus reactivation by LightCycler in stem cell transplantation.  
*Bone Marrow Transplant.* 28, 975-80
- Aschan, J., Ringden, O., Ljungman, P., Lönnqvist, B., Ohlman, S. (1992)  
Foscarnet for treatment of cytomegalic infection in bone marrow transplant recipients.  
*Scand. J. Infect. Dis.* 24, 143-150
- Aubert, G., Hassan-Walker, A.F., Madrigal, J.A., Emery, V.C., Morte, C., Grace, S., Koh, M.B., Potter, M., Prentice, H.G., Dodi, I.A., Travers, P.J. (2001)  
Cytomegalovirus-specific cellular immune responses and viremia in recipients of allogenic stem cell transplants.  
*J. Infect. Dis.* 184, 955-63

- Avery, R.K., Adal, K.A., Longworth, D.L., Bolwell, B.J. (2000)  
A survey of allogeneic bone marrow transplant programs in the United States regarding cytomegalovirus prophylaxis and preemptive therapy.  
*Bone Marrow Transplant.* 26, 763-767
- Bacigalupo, A., Bregante, S., Tedone, E. (1996)  
Combined foscarnet-ganciclovir treatment for cytomegalovirus infections after allogeneic hemopoetic stem cell transplantation.  
*Transplantation* 62, 376-380
- Barrett- Muir, W., Breuer, J., Millar, C., Thomas, J., Jeffries, D., Yaqoob, M., Aitken, C. (2000)  
CMV viral load measurements in whole blood and plasma-which is best following renal transplantation?  
*Transplant.* 70, 116-119
- Berger, A. und Preiser, W. (2002)  
Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV.  
*Antimicrob. Chemotherap.* 49, 713-721
- Bissinger, A.L., Sinzger, C., Kaiserling, E., Jahn, G. (2002)  
Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease.  
*J. Med. Virol.* 67, 200-206
- Blok, M.J., Goossens, V.J., Vanherle, S.J., Top, B., Tacke, N., Middeldorp, J.M., Christiaans, M.H., van Hooff, J.P., Bruggeman, C.A. (1998)  
Diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal-allograft recipients by nucleic acid sequence-based amplification  
*J. Clin. Microbiol.* 36(5), 1341-1346



- Boeckh, M., Bowden, R.A., Goodrich, J.M., Pettinger, M., Meyers, J.D. (1992)  
Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogenic marrow transplantation.  
*Blood*. 80, 1358-1364
- Boeckh, M., Gallez- Hawkins, G.M., Myerson, D., Zaia, J.A., Bowden, R.A. (1997)  
Plasma polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogenic marrow transplantation.  
*Transplantation* 64, 108-113
- Boeckh, M., Stevens- Ayers, T., Bowden, R.A (1996)  
Cytomegalovirus pp65 antigenemia after autologus marrow and peripheral blood stem cell transplantation.  
*J. Infect. Dis.* 174, 907-912
- Boeckh, M. und Boivin, G. (1998)  
Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications.  
*Clin. Microbiol. Rev.* 11, 533-554
- Boeckh, M., Woogerd, P.M., Stevens-Ayers, T., Ray, C.G., Bowden, R.A.  
(1994)  
Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia.  
*J. Clin. Microbiol.* 32, 832-834
- Boivin, G., Belanger, R., Delage, R., Beliveau, C., Demers, C., Goyette, N., Roy, J. (2000)  
Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the COBAS  
AMPLICOR CMV MONITOR PCR test after blood and marrow allogenic transplantation.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 4356-4360
- Boivin, G., Handfield, J., Toma, E., Murray, G., Lalonde, R., Bergeron, M.G. (1998)  
Comparative evaluation of the cytomegalovirus DNA load in polymorphonuclear  
leukocytes and plasma of human immunodeficiency virus-infected subjects.  
*J. Infect. Dis.* 177, 355-360

- Boivin, G., Quirk, M.R., Kringstad, B.A., Germain, M., Jordan, M.C. (1997)  
Early effects of ganciclovir therapy on the quantity of cytomegalovirus DNA in leukocytes of immunocompromised patients.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 860-862
- Boriskin, Y., Fuller, K., Powels, R.L., Vipond, I.B., Rice, P.S., Booth, J.C., Caul, E.O., Butcher, P.D. (2002)  
Early detection of cytomegalovirus (CMV) iUL21.5: a two site evaluation.  
*J. Clin. Virol.* 24, 13-23
- Bowden, R.A., Reusser, P., Cays, M., Meyers, J.D. (1991)  
The use of foscarnet for treatment of cytomegalovirus-associated marrow suppression after marrow transplantant.  
Chicago, Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapie  
(Abstract 777)
- Bowen, E.F., Sabin, C.A., Wilson, P., Griffith, P.D., Davey, C.C., Johnson, M.A., Emery, V.C. (1997)  
Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease.  
*AIDS.* 11, 889-893
- Bratanow, N.C., Ash, R.C., Turner, P.A. (1987)  
Successful treatment of serious cytomegalovirus (CMV) disease with 9 (1,3- dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (ganciclovir) DHPG and intravenous immunoglobulin (IVIG) in bone marrow transplantant (BMT) patients.  
*Exp. Hematol.* 15, 541 (Abstract 254)
- Britt, W.J., Alford, A.C. (1996)  
Cytomegalovirus.  
*Fields Virology, Third Edition* 77, 2493-2523

- Butt, N.M., Clark R.E. (2001)  
High frequency of positive surveillance for cytomegalovirus (CMV) by PCR in allograft recipients at low risk of CMV.  
*Bone Marrow Transplant.* 27, 615-619
- Caliendo, A.M., Schuurman, R., Yen Lieberman, B., Spector, S.A., Andersen, J., Manjiry, R., Crumpacker, C., Lurain, N.S., Erice, A. (2001)  
Comparison of quantitative and qualitative PCR assay for cytomegalovirus DNA in plasma.  
*J. Clin. Microbiol.* 39, 1334-1338
- Caliendo, A.M., St. George, K., Allegra, J., Bullotta, A.C., Gilbane, L., Rinaldo, C.R. (2002)  
Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays.  
*J. Clin. Microbiol.* 40, 1581-1586
- Caliendo, A.M., St. George, K., Kao, S., Allegra, J., Tan, B., LaFontaine, R., Biu, L., Rinaldo, C.R. (2000)  
Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype Amplicor CMV Monitor Test in transplant recipients  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 2122-2127
- Chou, S.W. (2001)  
Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications.  
*Transplant. Infect. Dis.* 3 (Suppl.2), 20-24
- Compton, J. (1991)  
Nucleic acid sequence-based amplification  
*Nature* 350 (6313), 91-92
- Compton, T., Nowlin, D.M., Cooper, N.R. (1993)  
Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.  
*Virology* 193, 834-841

- Cope, A.V., Sabin, C., Burroughs, A., Rolles, K., Griffiths, P.D., Emery, V.C. (1997a)  
Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation.  
*J. Infect. Dis.* 176, 1484-1490
- Cope, A.V., Sweny, P., Sabin, C., Rees, L., Griffiths, P.D., Emery, V.C. (1997b)  
Quantity of cytomegalovirus viraemia is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation.  
*J. Med. Vir.* 52, 200-205
- Cortez, K.J., Fischer, S.H., Fahle, G.A., Calhoun, L.B., Childs, R.W., Barrett, A.J., Bennett, J.E. (2003)  
Clinical trial of quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus in peripheral blood of allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients.  
*J. Infect. Dis.* 188, 967-972
- Drew, W.L. (1988)  
Cytomegalovirus infections in patients with AIDS.  
*J. Infect. Dis.* 158, 449-456
- Drew, W.L. (1992)  
Cytomegalovirus infection in patients with AIDS.  
*Clin. Infect. Dis.* 14, 608-615
- Dunn, D.L., Mayoral, J.L., Gillingham, K.J., Loeffler, C.M., Brayman, K.L., Kramer, M.A., Erice, A., Balfour, J., Fletcher, C.V., Bolman, R.M. (1991)  
Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients with ganciclovir.  
*Transplantation* 51, 98-106
- Einsele H., Ehninger G., Steidle M., Vallbracht A., Müller M., Schmidt H., Saal J.G., Waller H.D., Müller C.A. (1991)  
Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease.  
*Lancet* 338, 1170-1172

- Einsele H, Hebart H. (1999)  
Cytomegalovirus infection following stem cell transplantation.  
*Haematologica* 84 ( Suppl EHA 4), 46-49
- Einsele, H., Hebart, H., Bock, T., Müller, C., Fleckenstei, B., Mach, M., Stamminger, T., Jahn, G., Sinzger, C., Koszinowski, U., Meyer–Konig, U., Mertens, T., Plachter, B., Reddehase, M.J., Schmidt, C.A. (1999)  
Empfehlung zur Diagnostik und Therapie der Zytomegalievirus Infektion nach Stammzelltransplantation.  
Forschungsverbund Komplikationen der Organtransplantation durch Herpesviren.  
*Dtsch. Med. Wochenschr.* 124, 501-506
- Einsele, H., Hebart, H., Kauffmann- Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Loeffler, J., Bokemeyer, C., Müller, C.A., Kanz, L. (2000)  
Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemitive therapy for CMV infection.  
*Bone Marrow Transplant.* 25, 757-763
- Einsele, H., Kanz, L. (1999)  
Allogene Stammzelltransplantation.  
*Internist* 40, 1249-1256
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loeffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.-G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., Hebart, H. (2002)  
Infusion of cytomegalovirus (CMV)–specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy.  
*Blood.* 99, 3916-3922
- Einsele, H., Ehninger, G., Hebart, H., Wittkowsky K.M., Schuler, U., Jahn, G., Mackes, P., Herter, M., Klingebiel, T., Loeffler, J. (1995)  
Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapie after bone marrow transplantation.  
*Blood.* 338, 1170-1172

- Emanuel, D., Cunningham, I., Jules-Elysee, K., Brochstein, J.A., Kernan, N.A., Laver J., Stover, D., White, D.A., Fels, A., Polsky, B. (1988)  
Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin.  
*Ann. Intern. Med.* 109, 777-782
- Emery, V.C. (2001)  
Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance.  
*J. Clin. Virol.* 21, 223-228
- Emery, V.C. und Griffiths, P.D. (2000 a)  
Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8039-8044
- Emery, V.C., Cope, A.V., Bowen, F., Gor, D., Griffiths, P.D. (1999)  
The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo.  
*J. Exp. Med.* 190, 177-182
- Emery, V.C., Sabin, C.A., Cope, A.V., Gor, D., Hassan-Walker, A.F., Griffiths, P.D. (2000b)  
Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation.  
*Lancet* 355, 2032-2036
- Erice, A., Holm, M.A., Gill, P., C., Henry, S., Dirksen, C.L., Dunn, D.L., Hillam, R.P., Balfour, H.H. (1992)  
Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes.  
*J. Clin. Microbiol.* 30, 2822-2825
- Erice, A. (1999)  
Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs.  
*Clin. Microbiol. Rev.* 12, 286-297

- Flexman, J., Kay, I., Fonte, R., Herrmann, R., Gabbay, E., Palladino, S. (2001)  
Differences between the quantitative antigenemia assay and the cobas amplicor monitor quantitative PCR assay for detecting CMV viraemia in bone marrow and solid organ transplant patients.  
*J. Med. Virol.* 64, 275-282
- Gema, G., Baldanti, F., Zella, D., Furione, M. (1995)  
Detection of cytomegalovirus DNA : how, when and where?  
*Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 99, 11-15
- Gema, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G., Milanesi, G. (1992)  
Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients.  
*J. Infect. Dis.* 166, 1236-1244
- van Gemen, B., Kievits, T., Nara, P., Huisman, H.G., Jurriaans, S., Goudsmit, J., Lens, P. (1993)  
Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequencebased amplification  
*AIDS* 7 ( *Suppl 2*), 107-110
- Gilbert, C., Bestman- Smith, J., Boivin, G. (2002)  
Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms.  
*Drug Resist. Updat.* 5, 88-114
- Goodrich, J.M., Bowden, R.A., Fisher, L., Keller, C., Schoch, G., Meyers, J.D. (1993)  
Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplantation.  
*Ann. Intern. Med.* 118, 173-178
- Gor, D., Sabin, C., Prentice, H.G., Vyas, N., Man, S., Griffiths, P.D., Emery, V.C. (1998)  
Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GvHD and CMV disease.  
*Bone Marrow Transplant.* 21, 597-605

- Gregory, W.W., Menegus, M.A. (1983)  
Practical protocol for cytomegalic isolation: use of MRC-5 cell monolayers incubated for 2 weeks  
*J. Clin. Microbiol.* 17, 605-609
  
- Greijer, A., Verschuuren, E.A.M., Harmsen, M.C., Dekkers, C.A.J., Adriaanse, H.M.A., The, T.H., Middeldorp, J.M. (2001)  
Direct quantitation of human cytomegalovirus immediate-early and late mRNA levels in blood of lung transplant recipients by competitive nucleic acid sequence-based amplification.  
*J. Clin. Microbiol.* 39, 251-259
  
- Grigoleit U., Riegler S., Einsele H., Laib- Sampaio K., Jahn G., Hebart H., Brossart P., Frank F., Sinzger C. (2002)  
Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte- derived immature dendritic cells.  
*Br. J. Haematol.* 119, 189-198
  
- Griscelli, F., Barrois, M., Chauvin, S., Lastere, S., Bellet, D., Bourhis, J.H. (2001)  
Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real time PCR.  
*J. Clin. Microbiol.* 39, 4362-4369
  
- Hadaya, A., Wunderli, W., Defferenz, C., Martin, P.Y., Mentha, G., Binet, I., Perrin, L., Kaiser, L. (2003)  
Monitoring of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients by an ultrasensitive plasma PCR assay.  
*J. Clin. Microbiol.* 41, 3757-3764
  
- Hallwachs- Baumann, G., Wilders- Truschnig, M., Enzinger, G., Eibl, M., Linkesch, W., Dombusch, H.J., Santner, B.I., Marth, E., Kessler, H.H. (2001)  
Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assay.  
*J. Clin. Virol.* 20, 49-57



- Hassan-Walker, A.F., Kidd, I.M., Sabin, C. (1999)  
Quantity of human cytomegalovirus (CMV) DNAemia as a risk factor for CMV disease in renal allograft recipients: relationship with donor/recipient serostatus, receipt of augmented methylprednisolone and antithymocyte globulin (ATG).  
*J. Med. Virol.* 58, 182-187
- Hebart, H., Brugger, W., Grigoleit, U., Gscheidle, B., Löffler, J., Schäfer, H., Kanz, L., Einsele, H., Sinzger, C. (2001)  
Risk for cytomegalovirus disease in patients receiving polymerase chain reaction-based preemptive antiviral therapy after allogenic stem cell transplantation depends on transplantation modality.  
*Blood.* 97, 2183-3185
- Hebart, H., Einsele, H. (1998)  
Diagnosis and treatment of cytomegalovirus infection.  
*Curr. Opin. Hematol.* 5, 483-487
- Hebart, H., Rudolph, T., Loeffler, J., Middeldorp, J., Ljubicic, T., Jahn, G., Einsele, H. (2002)  
Evaluation of the NucliSens CMV pp67 assay for detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogenic stem cell transplantation.  
*Bone Marrow Transplant.* 30, 181-187
- Hebart, H., Kanz, L., Jahn, G., Einsele, H. (1998)  
Management of Cytomegalovirus Infection after solid-organ or stem-cell transplantation.  
*Drugs.* 55, 59-72
- Hebart, H., Müller, C., Löffler, J., Jahn, G., Einsele, H. (1996)  
Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation.  
*Bone Marrow Transplant.* 17, 861-868

- Ho, M. (1991)  
Cytomegalovirus: biology and infection.  
*Plenum press, New York, 2. Aufl., 249-258*
  
- Hoffmann, M., Heinrich, D., Hackenberg, U., Mewes, D., Hellstem, P., Uppenkamp, M. (2001)  
Komplikationen nach Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation. Retrospektive Untersuchung an einem nicht selektionierten Patientenkollektiv.  
*Med. Klinik. 96, 196-201*
  
- Jacobson, M.A., Kramer, F., Bassiakos, Y. (1994)  
Randomized phase I trial of two different combination foscarnet and ganciclovir chronic maintenance therapy regimens for AIDS patients with cytomegalovirus retinitis: AIDS clinical Trials Group Protocol 151.  
*J. Infect. Dis. 170, 189-193*
  
- Jahn, G., Stenglein, S., Riegler, S., Einsele, H., Sinzger, C. (1999)  
Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages.  
*Intervirology 42, 365-372*
  
- Kearns, A.M., Guiver, M., James, V., King, J. (2001)  
Development and evaluation of a real time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus.  
*J. Virol. Methods. 95, 121-131*
  
- Ketteler, M., Preuschhof, L., Mertz, A., Stoffler-Meilicke, M., Schafer, H., Distler, A., Offermann, G. (2000)  
Fatal cytomegalovirus pneumonia after preemptive antiviral therapy in renal transplant recipient.  
*Clin. Nephrol. 54, 418-424*
  
- Khare, M.D., Sharland, M. (2001)  
Cytomegalovirus treatment options in immunocompromised patients.  
*Expert. Opin. Pharmacother. 2 (8), 1247-57*

- Kuhn, J.E., Wendland, T., Schafer, P., Mohring, K., Wieland, U., Elgas, M., Eggers, H.J. (1994)  
Monitoring of renal allograft recipients by quantitation of human cytomegalovirus genomes in peripheral blood leukocytes.  
*J. Med. Virol.* 44, 398-405
- Landini, M.P., Mach, M. (1995)  
Searching for antibodies specific for human cytomegalovirus: is it diagnostically useful? When and how?  
*Scand. J. Infect. Dis Suppl.* 99, 18-23
- Landry, M.L., Ferguson, D., Cohen, S., Huber, K., Wetherill, P. (1995)  
Effect of delayed specimen processing on cytomegalovirus antigenemia test results.  
*J. Clin. Microbiol.* 33, 257-259
- Lanino, E., Anasetti, C., Longton, G., Etzioni, R., Bowden, R., Hanson, J.A. (1993)  
Prevention of cytomegalovirus disease with ganciclovir in recipients of marrow transplants from unrelated donors.  
*Blood.* 82, 1359 (Suppl.1, Abstract)
- Lea, A.P., Bryson, H.M. (1996)  
Cidofovir  
*Drugs.* 52, 225-230
- Leruez- Ville, M., Ouachee, M., Delaruae, R., Sauget, A.S., Blanche, S., Buzyn, A., Rouzioux, C. (2003)  
Monitoring of cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma.  
*J. Clin. Microbiol.* 41, 2040-2046
- Limaye, A.P., Corey, L., Koelle, D.M., Davis, C.L., Boeckh, M. (2000)  
Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants.  
*Lancet* 356, 645-649

- Ljubicic, T. (2002)  
Evaluation des Cobas Amplicor CMV Monitor in der Diagnostik und Therapiesteuerung der HCMV-Infektion bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.  
*Inaugural- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Universität Tübingen*
- Ljungman, P. (1995)  
Cytomegalovirus pneumonia: presentation, diagnosis and treatment.  
*Semin. Respir. Infect.* 10, 209-215
- Ljungman, P., de La Camara, R., Milpied, N., Volin, L., Russel, C.A., Crisp, A., Webster, A. (2002)  
Randomized study of valgacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogenic bone marrow transplants.  
*Blood.* 99, 3050-3056
- Ljungman, P., Deliliers, G.L., Platzbecker, U., Matthes– Martin, S., Bacigalupo, A., Einsele, H., Ullman, J., Musso, M., Trenchel, R., Ribaud, P., Bomhauser, M., Cesaro, S., Crooks, B., Dekker, A., Gratecos, N., Klingebiel, T., Tagliaferri, E., Ullman, A.J., Wacker, P., Cordonnier, C. (2001)  
Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogenic stem cell transplant recipients. The Infectious Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.  
*Blood.* 97, 388-392
- Ljungman, P., Lore, K., Aschan, J., Klaesson, S., Lewensohn- Fuchs, I., Lonqvist, B., Ringden, O., Winiarski, J., Ehmst, A. (1996)  
Use of semiquantitative PCR for cytomegalovirus DNA as a basis for preemptive antiviral Therapy in allogenic bone marrow transplant patients.  
*Bone Marrow Transplant.* 17, 583-587
- Ljungman, P., Engelhard, D., Link, H., Biron, P., Brandt, L., Brunet, S., Cordonnier, C., Debusscher, L., de Laurenzi, A., Kolb, H.J. (1992)  
Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group.  
*Clin. Infect. Dis.* 14, 831-835

- Löffler, J. (persönliche Mitteilung), 2003
  
- Maachida U., Kami M., Fukui T., Kazuyama Y., Kinoshita M., Tanaka Y., Kanda Y., Ogawa S., Honda H., Chiba S., Mitani K., Muto Y., Osumi K., Kimura S., Hirai H. (2000)  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 2536-2542
  
- Machida, U., Kami, M., Fukui, T., Kazuyama, Y., Kinoshita, M., Tanaka, Y., Kanda, Y., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Muto, Y., Osumi, K., Kimura, S., Hirai, H. (2000)  
Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 2536-42
  
- Malek, L., Sooknanan, R., Compton, J. (1994)  
Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)  
*Methods Mol. Biol.* 28, 253-260
  
- Manfredi, R., Mastroianni, A., Coronado, O.V., Chiodo F. (1996)  
The treatment of AIDS-related cytomegalovirus disease with ganciclovir and foscarnet association. Three case reports.  
*Recent. Prog. Med.* 87, 545-548
  
- Masaoka, T., Hiraoka, A., Ohta, K., Tatsumi, N., Watanabe, S., Hotta, T., Yabe, H., Kato, S., Aikawa, A., Ohara, T., Hasegawa, A., Tanabe, K., Toma, H., Yasuoka, A., Oka, S. (2001)  
Evaluation of the AMPLICOR CMV, COBAS AMPLICOR CMV monitor and antigenemia assay for cytomegalovirus disease.  
*Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 12-16
  
- Matsunaga, T., Sakamaki, S., Ishigaki, S., Kohda, K., Takeda, M., Katoh, J., Kuroda, H., Hirayama, Y., Kusakabe, T., Akiyama, T., Kuga, T., Niitsu, Y., Masaoka, T., Sagawa, T., Matsumoto, Y. (1999)  
Use for PCR serum in diagnosing and monitoring cytomegalovirus reactivation in bone marrow transplant recipients.  
*Int. J. Hematol.* 69, 105-111

- Matthes- Martin, S., Lion, T., Aberle, S.W., Fritsch, G., Lawitschka, A., Bittner, B., Frommlet, F., Gadner, H., Peters, C. (2003)  
Pre-emptive treatment of CMV DNAemia in paediatric stem cell transplantation: the impact of recipient and donor CMV serostatus on the incidence of CMV disease and CMV- related mortality.  
*Bone Marrow Transplant.* 31, 803-808
- Meijer, E., Boland, G.J., Verdonck, L.F. (2003)  
Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogenic stem cell transplants.  
*Clin. Microbiol. Rev.* 16, 647-657
- Mendez, J., Espy, M., Smith, T.F., Wilson, J., Wiesner, R., Paya, C.V. (1998)  
Clinical significance of viral load in the diagnosis of cytomegalovirus disease after liver transplantation.  
*Transplantation.* 65, 1477-81
- Mengelle, C., Pasquier, C., Rostaing, L., Sandres- Saunes, K., Puel, J., Berges, L., Righi, L., Bouquies, C., Izopet, J. (2003)  
Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia.  
*J. Med. Virol.* 69, 225-31
- Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (Hrsg), (2000)  
Rapid Cycle Real –Time PCR. Methods and Applications.  
*Springer, New York*
- Meyers, J.D., Floumoy, N., Thomas, E.D. (1986)  
Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation  
*J. Infect. Dis.* 153, 478-488
- Meyers, J.D., Reed, E.C., Shepp, D.H. (1988)  
Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation.  
*New Engl. J. Med.* 318, 70-75

- Miller, W., Flynn, P., McCullough, J., Balfour, H.H., Golman, A., Haake, R., Mc Glave, P., Ramsey, N., Kersey, J. (1986)  
Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-versus-host-disease.  
*Blood.* 67, 1162-1167
- Mocarski, E.S. (1996)  
Cytomegaloviruses and their replication.  
in: Fields B.N.: Virologie  
*Lippincott- Raven Publishers, Philadelphia*
- Mori, T., Okamoto, S., Matsuoka, S., Yajima, T., Wakui, M., Watanabe, R., Ishida, A., Iwao, Y., Mukai, M., Hibi, T., Ikeda, Y. (2000)  
Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation.  
*Bone Marrow Transplant.* 25, 765-769
- Mori, T., Okamoto, S., Watanabe, R., Yajima, T., Iwao, Y., Yamazaki, R., Nakazato, T., Sato, N., Iguchi, T., Nagayama, H., Takayama, N., Hibi, T., Ikeda, Y. (2002)  
Dose-adjusted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time Polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.  
*Bone Marrow Transplant.* 29, 777-782
- Naitou, H., Mimaya, J., Horikoshi, Y., Takashima, Y., Amano, K., Morita, T. (1998)  
Qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus DNA in sera by PCR as a clinical marker.  
*Biol. Pharm. Bull.* 21, 1371-5
- Nguyen, K., Champlin, R., Giralt, S., Rolsten, K., Raad, I., Jacobson, K., Ippoliti, C., Hecht, D., Tarrand, J., Luna, M., Whimbey, E. (1999)  
Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients.  
*Clin. Infect. Dis.* 29, 618-623

- Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt, C.A., Landt, O., Ellerbok, H., Pauli, G., Siegert, W. (2000)  
Detection of human cytomegalovirus DNA by real time quantitative PCR.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 2734-2737
- Ohta, H., Matsuda, Y., Tokimasa, S., Sawada, A., Kim, J.Y., Sashihara, J., Amo, K., Miyagawa, H., Tanaka-Taya, K., Yamamoto, S., Tano, Y., Aono, T., Yamanishi, K., Okada, S., Hara, J. (2001)  
Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis after stem cell transplantation: effective monitoring of CMV infection by quantitative analysis of CMV mRNA.  
*Bone Marrow Transplant.* 27, 1141-5
- Oldenburg, N., Lam, K.M.C., Khan, M.A., Top, B., Tacke, N.M.M., McKie, A., Mikhail, G.W., Middeldorp, J.M., Wright, A., Banner, N.R., Yacoub, M. (2000)  
Evaluation of human cytomegalovirus gene expression in thoracic organ transplant recipients using nucleic acid sequenced-based amplification.  
*Transplantation* 70, 1209-1215
- Ordemann, R., Naumann, R., Geissler, G., Kroschinsky, F., Bomhauser, M., Schwerdtfeger, R., Ehninger, G. (2000)  
Foscarnet-an alternative for cytomegalovirus prophylaxis after allogeneic stem cell transplantation ?  
*Ann. Hematol.* 79, 432-436
- Pang, X.L., Chui, L., Fenton, J., LeBlanc, B., Preiksaitis, J.K. (2003)  
Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS amplicor CMV monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation.  
*J. Clin. Microbiol.* 41, 3167-74
- Paya, C.V., Wold, A.D., Smith, T.F. (1987)  
Detection of Cytomegalovirus infection in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell culture.  
*J. Clin. Microbiol.* 25, 755-757



- Peggs, K.S., Preiser, W., Kottaridis, P.D., McKeag, N., Brinks, N.S., Tedder, R.S., Goldstone, A.H., Linch, D.C., Mackinnon, S. (2000)  
Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation.  
*Br. J. Haematol.* 111, 782-790
- Pellegrin, I., Garrigue, I., Binquet, C., Chene, G., Neau, D., Bonot, P., Bonnet, F., Fleury, H., Pellegrin, J.L. (1999)  
Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus positive patients.  
*J. Clin. Microbiol.* 37, 3124-3132
- Perez, J.L., de Ona, M., Niubo, J., Villar, H., Melon, S., Garcia, A., Martin, R. (1995 a)  
Comparison of several fixation methods for cytomegalovirus antigenemia assay.  
*J. Clin. Microbiol.* 33, 1646-1649
- Perez, J.L., Niubo, J., Ardanuy, C., Carvajal, A., Garcia, A., Salva, J., Martinez- Lacasa, J.T., Escriba, J.M., Martin, R. (1995 b)  
Comparison of three commercially available monoclonal antibodies directed against pp65 antigen for cytomegalovirus antigenemia assay.  
*Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 21-25
- Piipainen, H., Hockerstedt, K., Gronhagen-Riska, C., Lappalainen, M., Suni, J., Lautenschlager, I. (2001)  
Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients  
*J. Clin. Virol.* 22, 111-116
- Piipainen, H., Hockerstedt, K., Lappalainen, M., Suni, J., Lautenschlager, I. (2002)  
Monitoring of viral load by quantitative plasma-PCR during active cytomegalovirus infection of individual liver transplant patients.  
*J. Clin. Microbiol.* 40, 2945-2952

- Platzbecker, U., Bandt, D., Thiede, T., Helwig, A., Freiberg- Richter, J., Schuler, U., Plettig, R., Geissler, G., Rethwilm, A., Ehninger, G., Bomhauser, M. (2001)  
Successful preemptive cidofovir treatment for CMV antigenemia after dose-reduced conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation.  
*Transplantation*. 15, 880-885
- Poirier- Toulemonde, A.S., Imbert- Marcille, B.M., Ferre- Aubineau, V., Besse, B., Le Roux, M.G., Cantarovich, D., Billaudel, S. (1997)  
Successful quantification of cytomegalovirus DNA by competitive PCR and detection with capillary electrophoresis.  
*Mol. Cell. Probes*. 11, 11-23
- Preiser, W., Brauninger, S., Schwerdtfeger, R., Ayliffe, U., Garson, J.A., Brink, N.S., Franck, S., Doerr, H.W., Rabenau, H.F. (2001)  
Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants.  
*J-Clin-Virol*. 20, 59-70
- Preiser, W., Rabenau, H.F., Vogel, J.U., Brixner, W., Doerr, H.W. (2002)  
Performance characteristics of an automated PCR assay for the quantification of cytomegalovirus DNA in Plasma.  
*J. Virol. Methods*. 101, 149-157
- Prentice, H.G., Gluckman, E., Powles, R.P (1994)  
The impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival in allogeneic bone marrow transplantation.  
*Lancet* 343, 749-753
- Quamruddin, A.O., Oppenheim, B.A., Guiver, M., Mutton, K.J., Chopra, R. (2001)  
Screening for cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic bone marrow transplantation using a quantitative whole blood polymerase chain reaction (PCR) method: analysis of potential risk factors for CMV infection.  
*Bone Marrow Transplant*. 27, 301-306

- Razonable, R.R., Brown, R.A., Espy, M.J., Rivero, A., Kremers, W., Wilson, J., Groettum, C., Smith, T.F., Paya, C.V. (2001)  
Comperative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high – throughput automated system.  
*J Clin Microbiol.* 39, 4472-4476
- Reusser, P., Einsele, H., Lee, J., Volin, L., Rovira, M., Engelhard, D., Finke, J., Cordonnier, C., Link, H., Ljungman, P. (2002)  
Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemitive therapy of cytomegalovirus infection after allogenic stem cell transplantation.  
*Blood.* 99, 1159-1164
- Roberts, T.C., Brennan, D.C., Buller, R.S., Gaudreault-Keener, M., Schnitzler, M.A., Stemhell, K.E., Garlock, K.A., Singer, G. G., Storch, G.A. (1998)  
Quantitative polymerase chain reaction to predict occurence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients.  
*J. Infect. Dis.* 178, 626-635
- Roche Molecular Biochemicals  
LightCycler System, Real Time PCR- as flexible as you are.
- Roche Molecular Biochemicals (October 2000)  
LightCycler Operator`s Manual, Version 3.5
- Rollag, H., Sagedal, S., Kristiansen, K.I., Kvale, D., Holter, E., Degre, M., Nordal, K.P. (2002)  
Cytomegalovirus DANN concentration in plasma predicts development of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients.  
*Clin. Microbiol. Infect.* 8, 431-434

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985)  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
*Science* 230, 1350-1354
- Saltzman, R.L., Quirk, M.R., Jordan, M.C. (1992)  
High levels of circulating cytomegalovirus DNA reflect visceral organ disease in viremic immunosuppressed patients other than marrow recipients.  
*J. Clin. Invest.* 90, 1832-1838
- Salzberger, B., Bowden, R.A., Hackman, R.C., Davis, C., Boeckh, M. (1997)  
Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome.  
*Blood*. 9, 2502-2008
- Sanchez, J.L., Kruger, R.M., Paranjothi, S., Trulock, E.P., Lynch, J.P., Hicks, C., Shannon, W.D., Storch, G.A. (2001)  
Relationship of cytomegalovirus viral load in blood to pneumonitis in lung transplant recipients.  
*Transplantation* 72, 733-735
- Schaade, L., Kockelkom, P., Ritter, K., Kleines, M. (2000)  
Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 4006-4009
- Schetelig, J., Oswald, O., Steuer, N., Radonic, A., Thulke, S., Held, T.K., Oertel, J., Nitsche, A., Siegert, W. (2003)  
Cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia.  
*Bone Marrow Transplant.* 32, 695-701

- Schirm, J., Timmerije, W., van der Bij, W., The, T.H., Wilterdink, J.B., Tegzess, A.M., van Son, W.J., Schroder, F.P. (1987)  
Rapt detection of infectious cytomegalovirus in blood with the aid of monoclonal antibodies.  
*J. Med. Virol.* 23, 31-40
  
- Seige, G. (1995)  
Zytomegalie, 645-647  
in: Sizmann, F.C.: Pädiatrie  
Hippocrates, Stuttgart
  
- Sia, I.G., Wilson, J.A., Espy, M.J., Paya, C.V., Smith, T.F. (2000 a)  
Evaluation of the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR test for detection of viral DNA in specimens taken from patients after liver transplantation.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 600-606
  
- Sia, I.G., Wilson, J.A., Espy, M.J., Paya, C.V., Smith, T.F. (2000 b)  
Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation.  
*J. Infect. Dis.* 181, 717-720
  
- Stagno, S., Pass, R.F., Cloud, G., Britt, W.J., Henderson, R.E., Walton, P.D., Veren, D.A., Page, F., Alford, C.A. (1986)  
Primary Cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome.  
*JAMA* 256, 1904-1908
  
- Stocchi, R., Ward, K.N., Fanin, R., Bacarani, M., Apperley, J.F. (1999)  
Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogenic bone marrow transplantation.  
*Haematologica* 84, 71-79

- The, T.H., Ploeg, M., van der Berg, A.P., van den Vlieger, A.M., Giessen, M. van der Son, W.J. (1992)  
Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes-a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction.  
*Transplantation* 54, 193-198
- Tong, C.Y., Cuevas, L.E., Williams, H., Bakran, A. (2000)  
Comparison of two commercial methods for measurement of cytomegalovirus load in blood samples after renal transplantation.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 1209-1213
- Trenchel, R., Ross, S., Hushing, J., Ottinger, H., Elmaagacli, A., Rogendorf, M., Schaefer, U.W., Runde, V. (2000)  
Reduced risk for persisting cytomegalovirus pp65 antigenemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT.  
*Bone marrow Transplant.* 25, 665-672
- Van der Meer, J.T., Drew, W.L., Browden, R.A., Galasso, G.J., Griffith, P.D., Jabs, D.A., Katlama, C., Spector, S.A., Withley, R.J. (1996)  
Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis and Cytomegalovirus Infection.  
*Antiviral. Res.* 32, 119-40
- Vanpoucke, H., Van Vlem, B., Vanholder, R., Van Renterghem, L. (1999)  
Significance of qualitative polymerase chain reaction combined with quantitation of viral load in the diagnosis and follow-up of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation.  
*Intervirology.* 42, 398-404
- Verma, A., Devine, S., Morrow, M., Chen, Y.H., Mihalov, M., Peace, D., Stock, W., Pursell, K., Wickrema, A., Yassine, M., Jessop, E., Van Besien, K. (2003)  
Low incidence of CMV viremia and disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Role of pretransplant ganciclovir and post-transplant acyclovir.  
*Bone Marrow Transplant.* 31, 813-816

- Vusirikala, M., Wolff, S.N., Stein, R.S., Brandt, S.J., Morgan, D.S., Greer, J.P., Schuening, F.G., Dummer, J.S., Goodman, S.A. (2001)  
Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus infection after allogenic stem cell transplantation: a single institution retrospective cohort analysis.  
*Bone marrow transplant.* 28, 265-270
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J. (1995)  
Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.  
*N. Engl. J. Med.* 333, 1038-1044
- Weinberg, A., Hodges, T.N., Li, S., Cai, G., Zamora, M.R. (2000)  
Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 768-772
- Weiner, R.S., Bortin, M.M., Gale, R.P., Gluckman, E., Kay, H.E., Kolb, H.J., Hartz, A.J., Rimm, A.A. (1986)  
Interstitial pneumonitis after bone marrow transplantation . Assessment for risk factors.  
*Ann. Intern. Med.* 104, 168-175
- Weller, T.H. (1971)  
The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations I+II.  
*N. Engl. J. Med.* 104, 168-175
- Wingard, J.R., Mellits, E.D. Sostrin, M.B., Chen, D.V.H., Burns, W.H., Santos, G.H., Vriesendorp, H.M., Beschoner, W.E., Saral, R. (1988)  
Interstitial pneumonitis after allogenic bone marrow transplantation: nine-year experience at a single institution.  
*Medicine (Baltimore)* 67, 175-186

- Wingard, J.R., Pianadosi, S., Burns, W.H., Zahurak, M.L., Santos, G.W., Saral, R. (1990)  
Cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients given intensive cytoreductive therapy.  
*Rev. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 7), 793-804
- Winston, D.J., Ho, W.G., Bartoni, K., Du Mond, C., Ebeling, D.F., Buhles, W.C., Champlin, R.E. (1993)  
Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of placebo-controlled, double-blind trial.  
*Ann. Intern. Med.* 118, 179-184
- Winston, D.J., Ho, W.G., Champlin, R.E. (1991)  
Ganciclovir and intravenous immunoglobulin in bone marrow transplants, S.337-348  
in: Gale, R.P., Champlin, R.E.: New strategies in bone marrow transplantation.  
*Wiley-Liss, New York*
- Witt, D.J., Kemper, M., Stead, A., Sillekens, P., Ginocchio, C.C., Espy, M.J., Paya, C.V., Smith, T.F., Roeles, F., Caliendo, A.M. (2000)  
Analytical performance and clinical utility of a nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of cytomegalovirus infection.  
*J. Clin. Microbiol.* 38, 3994-3999
- Wright, H.T. Jr. (1973)  
Cytomegalovirus, 353-388  
in: Kaplan, A.S.: The herpesviruses  
*Academic, New York*
- Wuchter, P.T. (2002)  
Evaluation des Hybrid-Capture Systems (v 2.0) zur sensitiven Detektion der CMV-Infektion bei Patienten nach allogener und autologer Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation.  
*Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, Universität Tübingen*



- Yakushiji, K., Gondo, H., Kamezaki, K., Shigematsu, K., Hayashi, S., Kuroiwa, M., Taniguchi, S., Ohno, Y., Takase, K., Numata, A., Aoki, K., Kato, K., Nagafuji, K., Shimoda, K., Okamura, T., Kinukawa, N., Kasuga, N., Sata, M., Harada, M. (2002)  
Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogenic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction.  
*Bone Marrow Transplant.* 29, 599-606
- Yuen, K.Y., Lo, S.F.K., Chiu, E.K.W. (1995)  
Monitoring of leukocyte cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by nested PCR.  
*J. Clin. Microbiol.* 33, 2530-2534

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. med. Herrmann Einsele möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit danken.

Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Löffler möchte ich für die grosse Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen sowie für seine engagierte Betreuung danken.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Ingrid Kumbier bedanken, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit Engelsgeduld meine Probleme und Fragen löste.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des GvH Labors für die ausgezeichnete Unterstützung, die gute Atmosphäre und die ermunternden Worte.

Herrn Meisner vom Institut für Medizinische Informationsbearbeitung der Universität Tübingen danke ich für die Beratung der statistischen Auswertung meiner Daten.

An die Firma Roche geht ein grosser Dank für die Bereitstellung des Cobas Amplicor CMV Monitor und des LightCyclers sowie für die zahlreichen Lieferungen der Testkits und Infomaterial. Ohne ihre grosszügige Unterstützung wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Bei meiner Mutter und Schwester bedanke ich mich ganz herzlich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung, durch die mein Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich wurden und die mich bei allen Vorhaben stets unterstützt und an mich geglaubt haben.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank Bernd Heinrich, für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

## 7 LEBENSLAUF

Ester Szentgyörgyi, geboren am 21.08.1975 in Budapest, Ungarn

1981–1984	Grundschule, Budapest, Ungarn
1984	Umzug nach Deutschland
1984–1985	Grundschule, Holzwickede (NRW)
1985–1987	Hauptschule, Holzwickede
1987–1990	Ernst Barlach Gymnasium, Unna (NRW)
1990–1995	Gymnasium Ottobrunn – München (Bayern)
1995	Allgemeine Hochschulreife
1995–1996	Pädagogikstudium an der Ludwig– Maximilians Universität München
1996–1998	Medizinstudium an der Semmelweisuniversität Budapest, Ungarn
1998	Ärztliche Vorprüfung
1998–1999	Medizinstudium an der Technischen Universität Dresden
8/1999	Erste Ärztliche Prüfung
1999–2003	Medizinstudium an der Eberhard – Karls– Universität Tübingen
5/2000–6/2001	Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit
4/2002	Zweite Ärztliche Prüfung
4/2002–3/2003	Praktisches Jahr im Krankenhaus Bad Cannstatt, Stuttgart und im Kantonsspital Basel, CH
28/05/2003	Dritte Ärztliche Prüfung
1/2004–12/2005	Assistenzärztin im Spital Flawil, CH
Seit 1/2006	Assistenzärztin im Klinikum Friedrichshafen