

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

**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

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Tatjana Ljubicic  
aus  
Reutlingen  
2003

---

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Sinzger

---

## **Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit**

---

## - INHALTSVERZEICHNIS -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
1	EINLEITUNG..... 1
1.1	DAS HUMANE CYTOMEGALIEVIRUS ..... 1
1.2	EPIDEMIOLOGIE UND PATHOGENESE DES HCMV ..... 2
1.3	PROBLEMATIK DER HCMV-INFEKTION..... 3
1.4	PATIENTENKOLLEKTIVE ..... 4
1.4.1	STAMMZELLTRANSPLANTIERTE PATIENTEN ..... 4
1.4.2	HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION (HSCT)..... 5
1.4.3	PROBLEME DER STAMMZELLTRANSPLANTATION ..... 6
1.4.4	ORGANTRANSPLANTIERTE PATIENTEN..... 6
1.4.5	AIDS-PATIENTEN ..... 7
1.4.6	NEUGEBORENE ..... 8
1.5	DIAGNOSTIK..... 9
1.6	PROPHYLAXE ..... 11
1.7	THERAPIE ..... 13
1.8	THERAPIE-SCHEMA AM UKT..... 16
1.9	DEFINITION DER HCMV-ERKRANKUNG..... 16
1.10	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT ..... 17
2	MATERIAL UND METHODEN..... 18
2.1	MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN ..... 18
2.1.1	GERÄTE..... 18
2.1.2	VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE UND –MATERIALIEN..... 18
2.2	DNA-ISOLATION MIT QIAGEN-SÄULEN ..... 20
2.2.1	ERYTHROZYTENLYSE ..... 20
2.2.2	LEUKOZYTENLYSE ..... 21

---

2.2.3	DNA-FÄLLUNG.....	21
2.2.4	WASCHVORGANG .....	21
2.2.5	DNA-ELUIERUNG .....	22
2.2.6	DNA-VERMESSUNG.....	22
2.3	POLYMERASEKETTENREAKTION .....	23
2.3.1	EINFÜHRUNG.....	23
2.3.2	HERSTELLUNG EINER EICKURVE ZUR SEMI- QUANTITATIVEN AUSWERTUNG.....	23
2.3.3	EINSTELLUNG DER PROBEN MIT HILFE VON AMPUWA .....	24
2.3.4	PRIMER .....	24
2.3.5	PCR-ANSATZ.....	25
2.3.6	PCR-VERLAUF MIT 34 ZYKLEN .....	27
2.4	SLOT-BLOT HYBRIDISIERUNG DER AMPLIFIKATE .....	27
2.4.1	FIXIERUNG DER NUKLEINSÄUREN AUF EINER NYLONMEMBRAN .....	27
2.4.2	PRÄHYBRIDISIERUNG .....	28
2.4.3	MARKIERUNG DER HCMV-DETEKTIONSOLIGO- NUKLEOTIDE .....	29
2.4.4	HYBRIDISIERUNG .....	30
2.4.5	WASCHSCHRITTE.....	30
2.4.6	ABBLOCKEN POSITIVER LADUNGEN .....	31
2.4.7	HERSTELLUNG UND INKUBATION DER ANTI- KÖRPERLÖSUNG .....	32
2.4.8	FARBENTWICKLUNG ZUR DETEKTION DER AMPLIFIKATIONSPRODUKTE .....	33
2.4.9	ZEICHENERKLÄRUNG .....	34
2.5	COBAS AMPLICOR CMV MONITOR .....	35
2.5.1	EINFÜHRUNG.....	35
2.5.2	ÜBERSICHT .....	35
2.5.3	BESONDERHEITEN ZUR PROPHYLAXE VON KONTAMINATIONEN .....	35
2.5.4	REAGENZIENPRÄPARATION.....	36

---

2.5.5	PROBENVORBEREITUNG.....	37
2.5.6	AMPLIFIKATION IM THERMOZYKLER .....	45
2.5.7	DETEKTION .....	45
2.5.8	ERGEBNISSE .....	50
2.5.9	STATISTISCHE ANALYSE.....	50
3	ERGEBNISSE .....	52
3.1	STUDIENAUFBAU.....	52
3.1.1	ZEITRAHMEN UND UMFANG.....	52
3.1.2	KONDITIONIERUNGSTHERAPIE.....	52
3.1.3	ANTIVIRALE PROPHYLAXE .....	53
3.1.4	PATIENTENKOLLEKTIV .....	53
3.2	VERGLEICH DER IN-HOUSE PCR UND DES CMM .....	56
3.2.1	DURCHFÜHRUNG, ZEITAUFWAND UND ZUVER- LÄSSIGKEIT DES TESTS .....	56
3.2.2	BESTIMMUNG DER SPEZIFITÄT .....	58
3.3	VERGLEICH DER TESTERGEBNISSE .....	58
3.3.1	PROBEN (BESTIMMUNG AUS PLASMA) .....	58
3.3.2	PROBEN (BESTIMMUNG AUS BEREITS EXTRAHIERTER DNA).....	59
3.3.3	SEMIQUANTITATIVE UND QUANTITATIVE RESULTATE.....	60
3.3.4	PATIENTEN.....	60
3.3.5	ERSTMALIGE REAKTIVIERUNGSEREIGNISSE IM VERGLEICH .....	62
3.3.6	THERAPIESTEUERUNG.....	64
3.3.7	PROBEN (BESTIMMUNG AUS VOLLBLUT) .....	66
3.4	KLINISCHER VERGLEICH.....	67
3.4.1	MERKMALE HCMV-INFIZIERTER PATIENTEN .....	67
3.4.2	TRANSPLANTATIONSMODALITÄT UND HCMV-INFEKTION .	68
3.4.3	KINETIK DER HCM-VIRUSLAST .....	68

---

4	DISKUSSION .....	77
4.1	STAND DER FORSCHUNG.....	77
4.2	ROUTINEDIAGNOSTIK .....	80
4.3	DETEKTION .....	82
4.4	DETEKTIONSZEITPUNKT.....	86
4.5	THERAPIESTEUERUNG.....	88
4.6	ANALYSE DER VIRUSLAST.....	91
4.7	STEROIDE UND VIRUSLAST .....	96
4.8	TRANSPLANTATIONSMODALITÄT UND REAKTIVIERUNG.....	97
4.9	OPPORTUNISTISCHE INFEKTIONEN .....	97
4.10	ZUKÜNFTIGER EINSATZ .....	98
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	100
	LITERATURVERZEICHNIS .....	102
	DANKSAGUNG .....	130
	LEBENS LAUF.....	132

---

## - ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrom
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
A-Ringe	Amplifikationsringe
b	Basen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p- Toluidinsalz
BSA	Bovines Serum Albumin
Conc.	Konzentration
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dig-dUTP	Digoxigenin-Desoxyuridintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D	Donor (Spender)
ED	Einzeldosis
EDTA	Ethyldiaminessigsäure
G	Genome
G+C	Guanosin und Cytosin
GD	Gesamtdosis
Gy	Gray
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HAART	Highly active antiretroviral therapy
(H)CMV	(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
U (Units)	(Enzymeinheit)
U/min	Umdrehungen/Minute
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
WCLB	White cell lysis buffer
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
cm	Zentimeter
pM	Picomolar
nM	Nanomolar

---

---

$\mu\text{M}$	Mikromolar
mM	Millimolar
M	Molar (Mol/l)
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
sec	Sekunden
min	Minuten
h	Stunden

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das humane Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist der Erreger der Zytomegalie (Speicheldrüsenkrankheit) und zählt neben den Herpes-simplex-Viren Typ 1 und 2, dem Epstein-Barr-Virus, dem Varizella-Zoster-Virus und den humanen Herpes-Virus 6, 7 und 8 zur Familie der humanpathogenen Herpesviren.

Das Cytomegalievirus, das auch als humanes Herpesvirus 5 bezeichnet wird, gehört zur Subfamilie der Betaviren. Die Vertreter dieser Subfamilie zeichnen sich durch ein enges Wirtsspektrum, eine langsame Vermehrungsrate und eine späte Zytopathologie aus (Kayser et al., 1993). HCMV-infizierte Zellen weisen intranukleäre Einschlüsse (Eulenaugenzellen) auf, die zu der Bezeichnung „Cytomegalic inclusion disease (CID)“ (Hanshaw, 1968) und später zum Terminus „Cytomegalievirus“ (Weller et al., 1957) führten.

Das Genom des HCMV gilt als das grösste in der Familie der Herpesviren. Es besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA mit einer Grösse von ca. 65-68nm. Dies entspricht ungefähr 240 kb bzw. einem relativen Molekulargewicht von 150 Millionen Dalton (Gelen et al., 1978). Die für mehr als 200 Proteine kodierende DNA besitzt einen hohen Anteil an G+C-Sequenzen und lässt sich in 2 Abschnitte, eine sogenannte unique long und eine unique short Region, einteilen.

Während des 18 bis 24 Stunden dauernden Replikationszyklus des HCMV (Mach et al., 1989) werden aufeinanderfolgend die Gene immediate-early (IE), early (E) und late (L) translatiert. Schätzungen gehen davon aus, dass bereits 4 Stunden nach der Infektion 20% des viralen Genoms exprimiert sind (Chua et al., 1981).

Die IE-Gene, die bei Infektion einer Wirtszelle bereits nach einer Stunde nachgewiesen werden können, werden zuerst transkribiert. Sie können ihre

---

eigene Regulation, die Expression anderer viraler und zellulärer Gene beeinflussen (Blanton et al., 1981). Dem IE1-Gen des immediate early-Bereichs, auch als Major Immediate Early (MIE) bezeichnet, kommt die Bedeutung des Hauptgens zu. Es hat eine Basenlänge von ca. 2800 bp, eine Grösse von 72 kd (Akrigg et al., 1985) und kodiert für den grössten Teil der IE-RNA. Es häuft sich zunächst am endoplasmatischen Retikulum an, wo es phosphoryliert und anschliessend zum Zellkern transportiert wird (Otto et al., 1988).

4-12 Stunden nach einer HCMV-Infektion werden die early-Gene exprimiert, zu denen virale DNA-Polymerasen wie auch DNA-bindende Proteine gehören (Kouzarides et al., 1987). Nach der Replikation viraler DNA folgt die Expression der late-Gene, zu denen Strukturproteine des Viruskapsids und Glykoproteine der Virushülle gehören (Hampl und Mertens, 2001; Jahn et al., 1987).

Cytomegalieviren zeichnen sich durch eine hohe Speziespezifität und eine sehr geringe Wirtsbreite aus. Die Anzucht des HCMV gelingt nur in humanen Zellen, obwohl auch eine Reihe animaler Cytomegalieviren existieren (Becker et al., 1993).

## **1.2 Epidemiologie und Pathogenese des HCMV**

Die Übertragung des ubiquitär auftretenden HCMV (Colimon und Michelson, 1990) erfolgt durch Schmierinfektionen oder direkten Kontakt mit infizierten Personen. Als Erregerreservoir dienen im wesentlichen Blut, Urin, Faeces, Speichel, zervikale und vaginale Sekrete, Sperma, Muttermilch und Tränen. Durchseuchungsgipfel treten im Kleinkindalter durch Schmierinfektion und in der Adoleszenzphase durch beginnende Sexualaktivität auf.

Die Prävalenz von HCMV-Infektionen variiert in Abhängigkeit von der Region und sozialer Schicht. So sind beispielsweise in mitteleuropäischen Breitengraden 40-70% der Erwachsenen infiziert. In Entwicklungsländern wie

---

auch in unteren sozioökonomischen Schichten liegt die Prävalenz mit 90-100% deutlich höher. Die mittlere Inkubationszeit beträgt 4-8 Wochen (Gärtner und Enders, 1990).

Die postnatale HCMV-Infektion (Primärinfektion und Reaktivierung) verläuft bei intaktem Immunsystem meist inapparent. Wenn bei hoher Infektionsdosis klinische Zeichen auftreten, handelt es sich in der Regel um Fieber und/oder ein mononukleoseähnliches Krankheitsbild. Gelegentlich kommt es zu einer begleitenden Hepatitis mit erhöhten Leberwerten und einer Polyneuritis Guillain-Barre (Enders et al., 1988).

Wie alle Herpesviren besitzt auch das HCMV die Fähigkeit zur lebenslangen Persistenz im befallenen Wirtsorganismus. So sind zu einem späteren Zeitpunkt endogene Reaktivierungen wie auch Reinfektionen mit anderen HCMV-Stämmen in Form von Sekundärinfektionen möglich (Winston et al., 1985).

### **1.3 Problematik der HCMV-Infektion**

Bedingt durch die optimale Anpassung des Virus an seinen Wirt verlaufen sowohl Primär- als auch Sekundärinfektionen meist asymptomatisch. Ist aber die Immunität des Wirts durch Unreife, Inkompetenz oder Suppression des Immunsystems herabgesetzt, gilt die primäre wie auch reaktivierte Infektion als gefürchtete opportunistische Infektionskrankheit. Sie kann schwere, auch letal verlaufende Erkrankungen zur Folge haben. Da sich das HCMV durch seine Zytopathogenität auszeichnet, kommt es zur Gewebeerstörung einzelner Organe, wobei v.a. Lunge und Leber betroffen sind. Unklar ist dabei, ob ausser HCMV-spezifischen nicht zusätzlich auch indirekte Faktoren beteiligt sind (Emanuel, 1990): Autoimmune Prozesse aufgrund molekularer Mimikries zwischen HCMV-Proteinen und HLA-Antigenen der Klassen I (Beck et al., 1988) und II (Fujinami et al., 1988) wären durchaus vorstellbar.

---

## 1.4 Patientenkollektive

### 1.4.1 Stammzelltransplantierte Patienten

Die primäre und reaktivierte HCMV-Infektion tritt bei 40% der seronegativen und 70% der seropositiven Patienten oder bei Patienten, die das Transplantat eines seropositiven Spenders erhalten haben, auf (Meyers et al., 1986; Miller et al., 1986; Trenchel et al., 2000; Wingard, et al., 1990). Gewöhnlich ist das Risiko in den ersten 4 Monaten nach Transplantation am grössten.

Die interstitielle Pneumonie, die bei 20-30% der infizierten Patienten auftritt, zählt zur ernsthaftesten Form der HCMV-Erkrankungen. Ohne eine spezifische Therapie ist sie in bis zu 85% letal (Meyers et al., 1986). Zwar hat die kombinierte Gabe von Ganciclovir und Immunglobulin die Mortalitätsrate deutlich reduzieren können, mit 30-48% ist sie aber immer noch sehr hoch (Nguyen et al., 1999).

Ausser der Lunge können Leber, Gastrointestinaltrakt (Bombi et al., 1987; Reed et al., 1990), seltener Gehirn und Netzhaut befallen sein (Meyers et al., 1986; Müller et al., 1994). Letztere steht v.a. bei Aids-Patienten im Vordergrund, während sie nach Organtransplantationen selten auftritt (Drew, 1988).

Als Risikofaktoren für symptomatische Infektionen gelten dabei nicht HLA-idente Spender (Lanino et al., 1993), die Viruslasthöhe (Gor et al., 1998), eine HCMV-positive Spender- und/oder Empfänger-Serologie, seropositive Granulozytentransfusionen und die Graft-versus-host-disease (GvHD). Auch die Art, Dauer der Konditionierung und Immunsuppression spielen eine Rolle (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).

---

#### **1.4.2 Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)**

Die intravenöse Infusion hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmark (KMT), peripheren Blut (PBSCT) oder postpartalem Nabelschnurblut ist heute eine weltweit anerkannte Behandlungsmethode für viele angeborene und erworbene Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, solider Tumoren, und schwerer Autoimmunerkrankungen (Bortin und Rimm, 1989; Goldman et al., 1988; Krivit et al., 1992; Ramsay et al., 1991).

Grundsätzliche Unterschiede bestehen zwischen autologer und allogener Stammzelltransplantation. Zwar sind die hämatologischen Abläufe bei beiden identisch, indem die neuen Stammzellen das alte hämatopoetische System ersetzen, biologisch besteht jedoch ein grosser Unterschied: Autolog werden Patienteneigene-, allogene Spender-Stammzellen transfundiert.

Bei den allogenen Transplantationen ist der Spender im Idealfall ein Zwilling, da Spender und Empfänger genetisch identisch sind (syngene Transplantation). Existiert kein Zwilling, wird unter nahen Verwandten, v.a. den Geschwistern des Empfängers, nach geeigneten Spendern gesucht.

Um eine möglichst hohe genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger zu erzielen, wird eine Humane-Leukozytenantigene-Gewebetypisierung (HLA) vorgenommen. Das HLA-System ist eine Gruppe genetisch determinierter Gewebsantigene des Menschen, die auf den Zellen fast aller menschlicher Gewebe vorkommen und sich besonders gut auf Blutlymphozyten nachweisen lassen. Da sie eine wichtige Rolle bei Abstossungsreaktionen spielen, werden sie auch als Histokompatibilitätsantigene bezeichnet. Das Risiko einer Abstossung ist dabei proportional zu den Unterschieden der Histokompatibilitätsantigene. Deshalb ist nur bei weitgehender HLA-Identität zwischen Spender und Empfänger eine Transplantation möglich.

Ist kein Familienspender zur Transplantation geeignet, besteht noch die Möglichkeit einer Fremdspende. Die Auswahl des Spenders richtet sich dabei nach weitgehend ähnlicher HLA-Typisierung.

---

### **1.4.3 Probleme der Stammzelltransplantation**

Auch nach der Regeneration der Hämatopoese besteht beim Empfänger in Folge der Immunsuppression nach autologer und ganz besonders allogener HSCT ein Defekt der T- und B- Zell-Funktionen, der mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht. Bei der allogenen HSCT wird dieser Immundefekt durch eine mit der GvHD assoziierten Immundysregulation verstärkt, da eine erhöhte immunsuppressive Therapie erforderlich wird. Für die GvHD sind alloreaktive T-Lymphozyten des Spenders verantwortlich, die gegen Antigene des Empfängergewebes gerichtete Antikörper bilden und zu dessen Zerstörung führen (Herold, 2000).

Die akute GvHD ist mit einer erhöhten Inzidenz an HCMV-Infektionen sowohl bei seropositiven als auch bei seronegativen Patienten assoziiert (Meyers et al., 1986; Miller et al., 1986). Gleichzeitig wird auch die Schwere der HCMV-Infektion verstärkt (Meyers et al., 1982; Meyers et al., 1986). Umgekehrt wird aber das Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD durch eine HCMV-Infektion nicht getriggert (Meyers et al., 1986).

Parallel zum Graft-versus-host-Effekt besteht ein Graft-versus-Tumor-Effekt. Hier wendet sich das Immunsystem gegen eventuell noch vorhandene Tumorzellen des Wirts und unterstützt die Radio-Chemotherapie. So steht dem höheren Risiko transplantationsbedingter Komplikationen umgekehrt das kleinere Risiko eines Rezidivs gegenüber (Fritze und Matzdorff, 1999).

### **1.4.4 Organtransplantierte Patienten**

Organtransplantierte zeigen in mehr als der Hälfte der Fälle eine HCMV-Infektion (Ho, 1991). Dabei hängt das Risiko von der Transplantationsart, vom serologischen Status des Spenders und Empfängers vor Transplantation, der Dauer und Art der Immunsuppression ab. Auch das transplantierte Organ selbst beeinflusst die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung. So ist das Risiko für Lungen-, Herz-, und Lebertransplantierte am grössten. Besonders gefährdet sind Patienten, die aufgrund einer steroidresistenten Abstoßung mit mono- oder polyklonalen Anti-T-Zell-Antikörpern behandelt wurden (Dunn et al., 1994;

---

Winston et al., 1995). Auch die Viruslasthöhe spielt eine Rolle (Cope et al., 1997a und b; Kuhn et al., 1994).

Meist manifestiert sich die Infektion auch hier mit grippeähnlichen Symptomen, Fieber, Neutro- und Thrombopenie. Aber auch Lunge, Gastrointestinaltrakt und Leber können befallen werden (Vinters und Ferreiro, 1993). Neben diesen direkten werden dem HCMV auch indirekte Auswirkungen zugeschrieben. So wird durch die immunsuppressive Wirkung des Virus das Risiko für opportunistische Superinfektionen erhöht (Fishman et al., 1995; Hadley et al., 1995; Rubin et al., 1994). Die Infektion transplantiert Organe von seropositiven Spendern kann über indirekte Mechanismen auch zu Schädigungen bzw. Verlust des transplantierten Organs führen. Dabei scheint das Verhältnis zwischen HCMV und der Transplantatabstossung bidirektional zu sein: Während das Virus die Abstossung fördert, verursachen die bei der Abstossung gebildeten inflammatorischen Enzyme neben den eingesetzten Immunsuppressiva ein erhöhtes Risiko für HCMV-Infektionen (Keenan et al., 1991; Kowdley et al., 1996; Lautenschlager et al., 1995; Reinke et al., 1994; Rubin et al., 1990).

#### **1.4.5 Aids-Patienten**

HCMV-Infektionen gehören zu den häufigsten opportunistischen Infektionen bei HIV-Patienten (Drew, 1992; Jacobson und Mills, 1988), die v.a. in der Spätphase der Erkrankung bei einem Abfall der CD4-Lymphozytenzahl <50-100/µl auftreten (Boppana et al., 1995).

Da die meisten Patienten zu früheren Zeitpunkten eine Primärinfektion durchgemacht haben, handelt es sich v.a. um Reaktivierungen im Rahmen der beeinträchtigten T-Zell-Funktion.

Im Vordergrund der klinischen Manifestationen steht die HCMV-Retinitis (Drew et al., 1988), die zur Erblindung führen kann. Seit der Einführung der „Highly Active Antiretroviral Therapy“ (HAART) mit Protease-Inhibitoren und Hemmstoffen der HIV-Reverse-Transkriptase hat diese an Häufigkeit abgenommen. Gleichzeitig wurde aber unter HAART ein Auftreten intraokulärer Entzündungen beobachtet, die als Antwort des Immunsystems auf

---

persistierende virale Proteine in HCMV-Läsionen der Retina interpretiert werden (Jacobson et al., 1997).

Andere Krankheitsmanifestationen wie Infektionen der Lunge, des Gastrointestinaltrakts (Brady et al., 1988) und des zentralen Nervensystems treten selten auf. Bei letzterer liegen wahrscheinlich synergistische Effekte zwischen HCMV und HIV vor (Wiley et al., 1988).

Neben der direkt durch das Virus hervorgerufenen Erkrankung ergibt sich eine ungünstige Prognose der HCMV-Infektion (Robain et al., 2001) durch den Befall CD4-positiver Zellen (Fiala et al., 1993). Auf diese Weise kommt es zu einer Verstärkung des HIV-assoziierten Immundefekts.

HCMV-infizierte mononukleäre Zellen können zudem Zytokine produzieren, die in einer gesteigerten HIV-Replikationsaktivität münden (Clouse et al., 1989). Zudem wird durch eine verstärkte Fc-Rezeptor-Expression HCMV-infizierter Zellen die Koinfektion durch das HIV-1 erleichtert (McKeating et al., 1990).

So wird dem HCMV eine wichtige Rolle als Cofaktor bei der AIDS-Progression zugeschrieben (Robain et al., 2001; Spector et al., 1999).

#### **1.4.6 Neugeborene**

Das HCMV ist der häufigste Erreger pränataler Infektionen. Die Übertragung erfolgt in der Regel diaplazentar. Je nach Population kommt es bei 0,7-4% seronegativer Frauen zu einer HCMV-Primärinfektion während einer Schwangerschaft. Als Folge pränataler Infektionen sind ca. 1-2% aller Neugeborenen infiziert, bei denen etwa 5% manifeste Symptome einer HCMV-Erkrankung aufweisen (Seige, 1995). HCMV kann schwere generalisierte Organmanifestationen mit hoher Letalität, aber auch Spätschäden bei zunächst asymptomatischen Neugeborenen verursachen. Typische Symptome sind geringes Geburtsgewicht, Hepatosplenomegalie, prolongierter Ikterus, hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, Meningoenzephalitis, Mikrozephalie, Hydrocephalus, Chorioretinitis, periventrikuläre Verkalkungen und eine interstitielle Pneumonie (Seige, 1995; Weller, 1971; Wright, 1973).

---

Etwa 90-95% der Virusausscheider sind bei Geburt asymptomatisch, 5-20% behalten Spätschäden wie Taubheit, Optikusatrophie, psychomentele und statomotorische Retardierung und Konvulsionen zurück (Stagno et al., 1982).

HCMV-Reaktivierungen oder Sekundärinfektionen von HCMV-seropositiven Schwangeren sind relativ häufig (10-20%), eine Infektion des Feten ist mit 0,2-2% deutlich seltener (Hampl und Mertens, 2001). Treten fetale Infektionen auf, führen diese kaum zu klinischen Manifestationen.

Die perinatale Infektion tritt 10-20mal häufiger als die pränatale auf. Sie wird via Geburtskanal durch HCMV-infiziertes Zervikal- und Vaginalsekret bei ca. 10% der Schwangeren übertragen. Weitere postpartale Infektionsquellen stellen die Muttermilch, die Transfusion von Blut- und Blutprodukten und die Tröpfcheninfektion durch das postnatale Umfeld dar (Reynolds et al., 1973). Während die Infektion bei reifen Neugeborenen meist asymptomatisch verläuft, haben Frühgeborene auch nach postnataler Infektion ein hohes Risiko, an einer HCMV-Infektion zu erkranken.

## **1.5 Diagnostik**

Je nach Patient und Fragestellung ergeben sich für die HCMV-Diagnostik unterschiedliche Vorgehensweisen. Den indirekten Methoden in Form von virusspezifischen Antikörpern stehen verschiedene Verfahren des direkten Virusnachweises gegenüber. Letztere gewinnen zunehmend an Bedeutung.

Den Goldstandard stellte lange Zeit die direkte Anzucht von HCMV dar. Diese gelang durch Kultur embryonaler Fibroblasten aus Urin, Rachenspülwasser, Blut, Muttermilch und Gewebebiopsien. Die Infektion zeigte sich anhand des charakteristischen zytopathischen Effekts (Gregory und Menegus, 1983). Nachteilig ist eine bis zu 4wöchige Kulturdauer.

Eine abgekürzte Version ist die sog. shell-vial-culture, eine Kombination aus kurzer Virusanzucht und Antigennachweis. Durch Zentrifugation der Proben auf Fibroblasten kommt es sowohl zu schnelleren Infektionen als auch zu höheren Infektionsraten (Gleaves et al., 1987). Auf diese Weise gelingt ein

---

Virusnachweis innerhalb von 24 Stunden (Swenson und Kaplan, 1985) über gegen ein HCMV-Antigen gerichtete Antikörper.

Ein weiterer HCMV-Direktnachweis ist der pp65-Antigen-Assay. Bei dieser Methode werden Granulozyten aus dem peripheren Blut isoliert, als Cytosin-Präparate aufgearbeitet und mit Antikörpern gegen das pp65-Antigen inkubiert. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird durch Immunfluoreszenz, APAAP oder Immunperoxidase sichtbar gemacht (van der Bij, 1988). Eine Quantifizierung der Ergebnisse erfolgt durch die Angabe HCMV pp65-positiver Zellen pro Slide (ca. 100000 Granulozyten). Das pp65-Antigen wird von der infizierten Zelle zu einem sehr frühen Zeitpunkt synthetisiert (Chee et al., 1990).

Mit der Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) (Compton, 1991; Malek et al., 1994) steht seit einigen Jahren ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen zur Verfügung, das auch zur Amplifikation von RNA geeignet ist (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 mRNA des pp67, einem 67kd-Phosphoprotein, welches in der Spätphase der HCMV-Replikation gebildet wird, scheint dabei besonders für Verlaufs- und Therapie-Kontrollen nach allogener Stammzelltransplantation geeignet zu sein (Blok et al., 1998; Hebart et al., 2002).

Spätestens mit Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) hielt die Molekularbiologie Einzug in die diagnostischen Labors. Bei dieser seit Mitte der achtziger Jahre zur Verfügung stehenden Methode (Saiki et al., 1985) werden bestimmte erregerspezifische Nukleinsäurebereiche enzymatisch vervielfältigt, um eine Detektion mit bis dato unerreichter Sensitivität zu ermöglichen.

Nachdem ihre Zuverlässigkeit für den Nachweis von HCMV-Infektionen bei transplantierten Patienten von Einsele et al. (1991) und anderen aufgezeigt wurde, konnte sie sich auf diesem Gebiet immer mehr durchsetzen.

---

Die Weiterentwicklung von Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren erlaubt nicht nur den spezifischen Erregernachweis, sondern auch seine quantitative Erfassung. Eine Möglichkeit dazu bietet der seit Mitte der neunziger Jahre zugelassene Cobas Amplicor CMV Monitor von Roche. Mehr und mehr zeichnet sich in ersten Studien ab, dass die quantitative Erfassung der viralen Nukleinsäure wichtige Hilfestellungen bei der Therapiesteuerung und der Erfassung von Resistenzsituationen liefert (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).

Über die Serologie kann die HCMV-Infektion indirekt nachgewiesen werden. Für eine Primärinfektion wie auch Reaktivierung sprechen der spezifische IgM-Nachweis und ein IgG-Titer-Anstieg (Doerr, 1998). Aufgrund der gestörten humoralen Antwort nach einer Transplantation kann bei Immunsupprimierten auf Antikörperteste zugunsten von Virusdirektnachweisen verzichtet werden (Apperley et al., 1989). Vor der Transplantation werden diese allerdings routinemässig zur Bestimmung des Immunstatus bei Spendern und Empfängern eingesetzt, um HCMV-Übertragungen auf seronegative Empfänger zu vermeiden. Zur Antikörperdiagnostik werden meist ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) oder RIA (Radioimmunoassay) verwendet.

## **1.6 Prophylaxe**

Generell wird zwischen der Prävention einer HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung und der Behandlung einer Erkrankung unterschieden. Die Prävention umfasst prophylaktische und die Virusreplikation supprimierende Massnahmen.

Eine aktive Immunprophylaxe der HCMV-Infektion steht bisher nicht zur Verfügung. Zwar ist die Existenz zweier HCMV-Lebendvakzinen schon seit geraumer Zeit bekannt (Neer et al., 1979), diese sind aufgrund mangelnder Wirksamkeit jedoch nie eingesetzt worden. Vakzinen mit dem attenuierten Laborstamm HCMV-Towne, mit rekombinanten attenuierten Laborstämmen und mit HCMV-Subunitvakzinen werden derzeit in klinischen Studien erprobt, haben aber Erwartungen bis dato nicht erfüllen können.

---

Wirksame Massnahmen der Infektionsprävention sind bei HCMV-seronegativen Patienten, die einen HCMV-seronegativen Spender haben, die strikte Gabe HCMV-negativer bzw. leukozytendepletierter Blutprodukte (Bowden et al., 1986).

Bei HCMV-seropositiven Patienten oder Patienten, die das Transplantat eines seropositiven Spenders erhalten, kommen 2 antivirale Strategien, die antivirale Chemoprophylaxe und die präemptive Therapie, zum Einsatz.

Die prophylaktische Gabe von Ganciclovir bis zum Tag 100 nach Transplantation wird bei Patienten durchgeführt, bei denen Virus und Erkrankung nicht nachweisbar sind.

Dagegen wird bei der präemptiven (Ganciclovir)Therapie beim ersten HCMV-Nachweis aus Blut oder anderen Sekreten (z.B. BAL, Urin) eine Therapie eingeleitet. Dies erfolgt zu einem Zeitpunkt, an dem die Infektion noch klinisch asymptomatisch verläuft, so dass der Ausbruch einer HCMV-Erkrankung in den meisten Fällen verhindert werden kann.

Beide Strategien sind mit 2 Hauptproblemen verbunden: zum einen eine hohe Toxizität mit Neutropenie, die zusätzliche opportunistische Infektionen fördert (Salzberger et al., 1997), zum anderen eine hohe Rate von HCMV-Spätinfektionen nach Tag 100 (Einsele et al., 2000). Die Ursache scheint eine verzögerte HCMV-spezifische Immunantwort nach Transplantation zu sein, die aber für einen kompletten Schutz vor HCMV-Erkrankungen in der späten Transplantationsphase notwendig ist (Li et al., 1994).

Unter Langzeittherapien (>3 Monate) wie bei einer HIV-Erkrankung, wurden Selektionen therapieresistenter HCMV-Varianten beschrieben (Chou, 2001; Emery und Griffiths, 2000c; Emery, 2001; Erice, 1999; Gilbert et al., 2002; Hebart et al., 1998; Ketteler et al., 2000; Limaye et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit der HCMV-Prophylaxe ohne vergleichbare Myelotoxizität besteht mit Foscarnet, welches darüber hinaus auch bei

---

Ganciclovir-resistenten Viren eingesetzt werden kann. Nephrotoxizität und Elektrolytverschiebungen erweisen sich gelegentlich als therapielimitierend.

Die Immunglobulinprophylaxe ist bei seropositiven und -negativen Empfängern (mit HCMV-positivem Spender) möglich, der medikamentösen Prophylaxe aber deutlich unterlegen.

Die passive Immunisierung in Form von HCMV-Hyperimmunglobulin-Präparaten vermochte die HCMV-Erkrankungsrate in bestimmten Patientenkollektiven zu reduzieren (Reed et al., 1988), aufgrund hoher Kosten bei nur begrenztem Benefit wird diese Strategie heute jedoch nicht mehr empfohlen (Ljungman et al., 1998).

In klinischer Erprobung befindet sich derzeit die adoptive Immuntherapie mit HCMV-spezifischen CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (Einsele et al., 2002).

## **1.7 Therapie**

Die heute gängigen Therapiekonzepte zur Bekämpfung des HCMV umfassen neben der Infektionsprävention und Behandlung der manifesten Erkrankung zunehmend auch die präemptive Therapie (s.1.6).

In der Zwischenzeit stehen einige Virostatika gegen HCMV zur Verfügung. Die grössten Erfahrungen liegen für Ganciclovir vor, das als synthetisches Nukleosid-Analogon von Guanin die Replikation von Herpesviren hemmt. Die selektive HCMV-Wirksamkeit wird durch die Aktivität einer viralen Kinase (UL97) und Inhibition der viralen DNA-Polymerase (UL54) bestimmt.

Die wichtigste Nebenwirkung besteht in einer reversiblen Panzytopenie durch toxische Myelosuppression, die sich unter Umständen als therapielimitierend erweisen kann (Bowden et al., 1987; Goodrich et al., 1991; Winston et al., 1993). Opportunistische bakterielle und fungale Infekte können durch die Ganciclovir-bedingte Neutropenie getriggert werden (Winston et al., 1993).

---

Die praeemptive Therapie mit Ganciclovir vermochte zwar die Inzidenz der HCMV-Erkrankung zu senken, zeigte jedoch keinen Überlebensvorteil der behandelten Patienten (Goodrich et al., 1991; Winston et al., 1993).

So konnte durch die Ganciclovirtherapie an Nierentransplantierten bewiesen werden, dass vor der Markteinführung des Medikaments das Risiko einer HCMV-Infektion und Transplantatverlusts bei Patienten mit Hochrisikokonstellation (D+/R-) im Vergleich zu den Nichtrisiko-Patienten signifikant um 1,32 höher lag. Nach der Einführung zeigte sich das gleiche Risiko in beiden Kollektiven (Schneeberger et al., 2000).

Andererseits stellte sich aber heraus, dass länger als 4 Wochen dauernde Behandlungen mit Virostatika (v.a. Ganciclovir) zu einer deutlichen Inzidenzzunahme an HCMV-Erkrankungen nach Tag 100 (late onset) führten. Auch sekundäre bakterielle und fungale Infektionen wurden dadurch getriggert (Einsele et al., 2000; Li et al., 1994).

In Kombination mit Immunglobulinen zeigte sich Ganciclovir effektiver als in der Monotherapie. Dies galt insbesondere für die interstitielle Pneumonie (Bratanow et al., 1987; Emanuel et al., 1988; Winston et al., 1991). Gegen Hepatitis und Enteritis kann Ganciclovir als Monotherapie eingesetzt werden.

Seit Oktober 2001 ist Valganciclovir, ein Prodrug des Ganciclovirs, das im Organismus rasch zu Ganciclovir hydrolysiert, erhältlich. Im Unterschied zu Ganciclovir bietet es die Vorteile einer oralen Gabe, da es maximale Konzentrationen zwischen 59-67% der parenteral verabreichten Ganciclovir-Konzentrationen erreichen kann. Derzeit ist es nur für die HCMV-Retinitis bei Aids-Patienten zugelassen. Eine Studie belegte eine vergleichbare Wirkung beider Medikamente (77% Ganciclovir versus 71% Valganciclovir). Auch Nebenwirkungen wie Neutropenie zeigten ähnliche Ergebnisse (13% Ganciclovir versus 14% Valganciclovir). Allerdings wurden Diarrhoen unter Valganciclovir häufiger beschrieben (Martin et al., 2002). Ob Valganciclovir die gleiche Wirksamkeit bei stammzelltransplantierten Patienten aufweist, muss gegenwärtig unbeantwortet bleiben.

---

Mit Foscarnet, das im Unterschied zu Ganciclovir keine intracelluläre Aktivierung durch virale Enzyme benötigt, steht ein weiteres antivirales Medikament zur Verfügung. Indikationen sind Nichtansprechen oder Resistenzen gegen Ganciclovir, Leuko- und/oder Thrombopenie und eine schwere HCMV-Retinitis (Aschan et al., 1992; Bowden et al., 1991). Eine wichtige Nebenwirkung dieses Chemotherapeutikums ist eine Nephrotoxizität mit Einschränkung der Nierenfunktion (Bregante et al., 2000).

Über das Auftreten von Ganciclovir- und Foscarnet-resistenten Stämmen wurde bereits berichtet (Reusser et al., 1996a).

Einige Studien konnten belegen, dass eine Kombinationstherapie aus Ganciclovir und Foscarnet Resistenzentwicklungen verhindern kann, ohne die Häufigkeit systemischer toxischer Reaktionen zu erhöhen (Bacigalupo et al., 1996; Jacobson et al., 1994; Manfredi et al., 1996).

Neuerdings wird auch Cidofovir erfolgreich gegen HCMV eingesetzt (Lea und Bryson, 1996). Im Gegensatz zu Ganciclovir bedarf es keiner Aktivierung durch die UL97-Phosphotransferase des HCMV und wird bei Unwirksamkeit und Unverträglichkeit von Ganciclovir und Foscarnet eingesetzt.

So zeigten in einer Studie 66% der Patienten, die zuvor erfolglos mit herkömmlichen Substanzen behandelt wurden, unter Cidofovir eine Virusclearance. Aufgrund der Nephrotoxizität der Substanz muss die Cidofovir-Gabe einem strengen Algorithmus folgen (Probenecid-Gabe, Hydrierung des Patienten). Trotz dieser Massnahmen zeigten 39% der Patienten erhebliche Nebenwirkungen, darunter 26% irreversible Nierenschäden. Die nephrotoxische Wirkung war bei Patienten, die das Medikament aufgrund einer HCMV-Erkrankung (35%) erhalten hatten höher als bei Patienten, bei denen es präemptiv eingesetzt wurde. Dabei zeigte die primäre präemptive Therapie eine nephrotoxische Nebenwirkungsrate von 12% im Vergleich zur sekundären mit 29% (Ljungman et al., 2001).

---

## 1.8 Therapie-Schema am UKT

Alle Patienten nach Stammzelltransplantationen wurden mittels wöchentlicher PCR auf eine HCMV-Infektion untersucht. Waren 2 PCR-Tests in Folge positiv, wurde innerhalb von 24-48 Stunden eine antivirale Frühtherapie mit Ganciclovir in einer Induktionsdosis von 2x 5 mg/kg KG i.v. für 14 Tage eingeleitet (Einsele et al., 1995).

Konnte daraufhin keine HCMV-DNA mehr nachgewiesen werden, wurde die Therapie beendet, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Bei persistierender HCMV-Infektion wurde Ganciclovir in einer Erhaltungsdosis von 6 mg/kg KG i.v. einmal täglich an 5 Tagen pro Woche für weitere 14 Tage verabreicht.

Falls Ganciclovir nicht toleriert oder aufgrund unerwünschter Wirkungen nicht eingesetzt werden konnte, wurde bei normaler Nierenfunktion alternativ Foscarnet eingesetzt. Die Induktionsdosis von 60 mg/kg 12-stdl. 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. Patienten mit HCMV-Erkrankung wurden in einer Kombinationstherapie aus Ganciclovir und HCMV-Hyperimmunglobulin behandelt.

## 1.9 Definition der HCMV-Erkrankung

Eine Erkrankung an HCMV wird nach den Richtlinien des 4. Internationalen Cytomegalie-Workshops in Paris 1993 wie folgt diagnostiziert:

- HCMV-Pneumonie: Dyspnoe, interstitielle Infiltrate im Röntgen-Thorax-Bild, positive HCMV-Kultur aus BAL.
- HCMV-Hepatitis: abnorme Leberfunktionsstörung, Nachweis von HCMV in einer Leberbiopsie durch Kultur oder DNA-Hybridisierung, typische histologische Veränderungen.
- HCMV-Enteritis: gastrointestinale Syndrome wie Diarrhoe, Nausea und Emesis, HCMV-Nachweis durch Histologie oder Immunhistologie.

---

## 1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist eine Verbesserung der Therapie der HCMV-Infektion nach einer Stammzelltransplantation und eine Untersuchung bezüglich der klinischen Bedeutung der Viruslast.

Durch die Weiterentwicklung der PCR steht mittlerweile ein in-vitro-Assay zur Verfügung, der nicht nur einen spezifischen Erregernachweis, sondern auch eine quantitative Erfassung des Erregers gestattet. Die pro Milliliter Plasma gemessene Menge der Replikationsäquivalente ermöglicht neben der Diagnose einer beginnenden Virämie auch Rückschlüsse auf den Infektionsverlauf. Zusätzlich erhält der Behandelnde durch den Parameter der Viruslast klarere Aussagen und Hilfestellungen zur Notwendigkeit einer antiviralen Therapie, sowie deren Fortsetzung und Steuerung. Darüber hinaus können mögliche Resistenzsituationen leichter erkannt werden. Eine Übertherapie mit toxischen Virostatika, wie derzeit unter der PCR häufig, liesse sich dadurch reduzieren. Es stellt sich somit die Frage, ob dieser Assay tatsächlich in der Lage ist, die herkömmliche PCR zu ersetzen oder zu ergänzen. Der erste Teil der Aufgabenstellung befasst sich daher mit einer Gegenüberstellung dieser neuen Methode des HCMV-Nachweises mit der standardisierten PCR unseres Labors. Zusätzlich sollten praktisch relevante Testeigenschaften wie Durchführbarkeit, Zeitdauer, Fehlerquote und klinische Relevanz bewertet werden.

Im zweiten Teil der Aufgabenstellung wurde die klinische Bedeutung der Viruslast bestimmt. Durch die Viruslastmessung sollen wissenschaftliche Fragen beantwortet werden, die derzeit noch ungeklärt sind. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang Einflüsse der Steroide auf die Viruslast, Prognoseparameter wie Anfangs- und Maximalviruslast für HCMV-Erkrankungen, der Verlauf der Viruslast unter antiviraler Therapie und Einflüsse der HCMV-Infektion auf das Auftreten opportunistischer Infektionen.

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material und Bezugsquellen

#### 2.1.1 Geräte

Cobas Amplicor CMV Monitor RS 232	Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ, USA
Computer	Compaq Presario Pentium III Hewlett Packard, München
Drucker, Laser Jet III Programm: Amplilink, for Microsoft Office	Roche Diagnostic Systems, Inc. Branchburg, NJ, USA Millipore, Eschborn Rische & Herfurth, Hamburg BRL, Gaithersburg, USA Edmund Bühler, Tübingen bio-med, Theres bio-med, Theres Dr. Lange, Berlin
Blotting-Kammer, Miliblot S	
Folienschweissgerät, Polystar 244	
Gelkammer, Horizon 11.14	
Horizontalwippe, WS 5	
PCR-Prozessor, Thermocycler 60	
PCR-Kompressor-Umwälzkühler	
Photometer, LS 500	
<u>Pipetten:</u>	
Multipette, 4780	Eppendorf, Hamburg
Varipetten, 4810 (10/100/1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad, GFL 1086	Bender & Hobein, Rottenburg
Sterilbank, LaminAir HBB2448	Heraeus, Hanau
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, Rottenburg
Waage, U 4800 P	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank, B 5060	Heraeus, Hanau
<u>Zentrifugen:</u>	
Biofuge A	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.2 Verbrauchsgegenstände und –materialien

Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Anti-Digoxenin-AP, Fab-Fragmente	Boehringer, Mannheim
BCIP	Boehringer, Mannheim
Blockierungsreagenz	Boehringer, Mannheim
BSA	Sigma, Deisenhofen

---

Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) Nr. 0764787, Probenvorbereitungskit	Roche Diagnostics, Mannheim
Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) Nr.1110268, Amplifikationskit	Roche Diagnostics, Mannheim
Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) Nr.1110241, Kontrollkit	Roche Diagnostics, Mannheim
Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) Nr.0764795, Detektionskit	Roche Diagnostics, Mannheim
Cobas Amplicor DK Nr.0757470, Detektionskit	Roche Diagnostics, Mannheim
Cobas Amplicor CN Nr.0764213, Konjugat Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Cobas Amplicor WB Nr.0759899, Waschbuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
COBAS Amplicor, A-Ringe Nr.2057026	Roche Diagnostics, Mannheim
Combitips (0,5ml, 1ml, 20 ml)	Eppendorf, Hamburg
dig-dUTP, Alkali-stabil	Boehringer, Mannheim
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Promega, Madison, USA
EDTA Triplex III	Merck, Darmstadt
Eppendorf-Röhrchen 1,5ml, safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
HCL	Merck, Darmstadt
Hybond-N+-Membran, Version 2.0	Amersham, Braunschweig
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Latexhandschuhe puderfrei, Satin Plus	Safeskin, San Diego, USA
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Mineralöl, light white oil	Sigma, Deisenhofen
Mundschutz, Surgine	Johnson & Johnson, Arlington, USA
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NBT	Boehringer, Mannheim
Pasteurpipetten 2ml	Hirschmann, Eberstadt
QIAamp Blood Kit, 250	Qiagen, Hilden
<u>Reaktionsgefäße</u>	
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen 15 ml, 50ml (Falcon)	Becton Dickinson, Lincoln Park, USA
safe-lock-Gefäße, 1,5µl	Eppendorf, Hamburg
SDS	Serva, Heidelberg
Terminale Transferase	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase	Amersham, Braunschweig

---

---

## 2.2 DNA-Isolation mit Qiagen-Säulen

Im verwendeten QIAamp Blood Kit 250 waren enthalten:

Qiagen-Säulen, 2ml-Sammelröhrchen, die Reagenzien AL1 und AL2, AW-Puffer und die Qiagen-Protease.

### 2.2.1 Erythrozytenlyse

Zur DNA-Extraktion wurden 3-5ml Vollblut verwendet. Es handelte sich dabei um EDTA-Blut. Andere Gerinnungshemmer wie z.B. Heparin waren nicht zulässig, da sie in der folgenden Polymerasekettenreaktion zur Hemmung der Amplifikation führen können.

Da kurz nach KMT die Leukozytenzahl um den Faktor 5 reduziert ist, wurde das gesamte in einer Ampulle enthaltene EDTA-Blut eingesetzt. Auf diese Weise konnte eine ausreichende DNA-Isolierung gewährleistet werden.

Das Blut wurde in 50ml-Polypropylenröhrchen umgefüllt und mit „red cell lysis buffer“ (RCLB) auf 40ml aufgefüllt. Dessen hypotone Eigenschaften führten zur Erythrozytenlyse.

**Tab.1:** RCLB

	<b>Stammkonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Tris, pH 7,6</b>	500 mM	10 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	250 mM	5 mM
<b>NaCl</b>	500 mM	10 mM

Die Proben wurden 10 min lang auf der Horizontalwippe geschüttelt. Danach erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 1500 U/min. Der Überstand wurde abgekippt, und das Pellet resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 Mal durchgeführt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die weiteren Schritte an einem speziellen, nur zu DNA-Extraktionen verwendeten Ort durchgeführt.

---

### 2.2.2 Leukozytenlyse

200µl Pellet wurden in ein 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Zur Leukozytenlyse wurden 200µl stark schäumenden AL-Puffers und 25µl Protease hinzugefügt.

Das Röhrchen wurde im Anschluss sofort gut gevortext, um eine effiziente Lyse und eine grosse DNA-Ausbeute zu gewährleisten.

#### **AL-Puffer [pro Probe]**

40µl vorgeheiztes Reagenz (70°C) AL2 + 160µl Reagenz AL1, gut gevortext.

#### **Qiagen-Protease**

125mg Protease + 6,5ml Aqua dest. ergibt eine Endkonzentration von 19,23mg/ml.

Eine wichtige Voraussetzung war eine von DNase- und RNase-Aktivitäten freie Qiagen-Protease. Das Gemisch wurde 10-20 min im Wasserbad bei 70°C inkubiert.

### 2.2.3 DNA-Fällung

Nach der Inkubationszeit wurden 210µl Ethanol (100%) zugegeben. Das Lysat wurde gevortext und auf eine in einem 2ml-Sammelröhrchen stehende Qiagen-Säule aufgetragen. Nun wurde 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert.

Die gefällte DNA blieb im Filter der Säule zurück.

### 2.2.4 Waschvorgang

Die Säule wurde in ein zweites 2ml-Sammelröhrchen gestellt, mit 500µl AW-Puffer gewaschen und 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Anschliessend wurde der Inhalt des Sammelröhrchens abgekippt und der Waschvorgang wiederholt. Zur Reinigung der DNA von AW-Puffer wurde zusätzlich 10 sec bei 12000 U/min zentrifugiert.

---

### **AW-Puffer**

196ml 100%iges Ethanol + 84ml AW-Puffer-Konzentrat ergibt 280ml Endvolumen.

#### **2.2.5 DNA-Eluierung**

Die Säulen wurden in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach vorsichtigem Öffnen der Säulen wurde die enthaltene DNA in 100µl 70°C warmen destillierten Wasser gelöst. Anschliessend erfolgte die Eluierung durch eine 1minütige Zentrifugation bei 8000 U/min.

#### **2.2.6 DNA-Vermessung**

Nach homogenem Lösen der DNA wurden die optischen Dichten der einzelnen Proben mit Hilfe eines Spektralphotometers vermessen. Zuvor wurden die Proben durch Zugabe von 990µl Ampuwa zu 10µl eluierter DNA-Probe 1:100 verdünnt.

Im Photometer wurde die optische Dichte bei folgenden Wellenlängen bestimmt: 260nm (DNA/RNA), 270nm (Salze), 280nm (Proteine) und 320nm (Löslichkeit).

Das Verhältnis der Absorption bei 260nm zu 280nm gab Aufschluss über die Eluat-Reinheit: Eine Ratio von 1,7 bis 2,0 kennzeichnete reine DNA. War sie geringer, war eine Kontamination mit Proteinen wahrscheinlich. Zusätzlich wurde die in 1ml Probe enthaltene Menge an DNA im Photometer bestimmt.

In Relation zu den gemessenen Werten wurden die Proben stets auf gleiche Konzentrationen mit Hilfe von Aqua dest. eingestellt, nämlich 80-120ng DNA/µl. Der Einsatz einer definierten DNA-Menge war für die spätere semiquantitative Auswertung der PCR eine Voraussetzung. Nur dann konnten die Signale zueinander und zu einer Eichkurve in Relation gebracht werden.

---

## **2.3 Polymerasekettenreaktion**

### **2.3.1 Einführung**

Die folgende PCR wurde nach Einsele et al. (1991) durchgeführt und bei Löffler (1994) beschrieben. Das PCR-Amplifikat zur Bestimmung der HCMV-DNA liegt im Bereich des immediate-early-Genes 1,4 Exon und hat eine Länge von 147 bp.

Simultan erfolgte im jeweils gleichen Ansatz eine Amplifikation eines humanen HLA-DR $\beta$  1-Gen-Abschnitts mit einer Länge von 327 bp. Dieser diente als PCR-Inhibitionskontrolle in der jeweiligen Probe. Zur Kontrolle der Spezifität wurde in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle (Ampuwa) eingesetzt.

Da die PCR eine sehr hohe Sensitivität besitzt, ist das Risiko einer Kontamination sehr hoch. Um diese Gefahr soweit wie möglich zu reduzieren, wurden die DNA-Isolation, die Probeneinstellung und der PCR-Ansatz räumlich getrennt durchgeführt. Alle Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

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

Durch parallel amplifizierte HCMV-DNA wurde eine Eichkurve erstellt. So war eine semiquantitative Auswertung der HCMV-Signale der Patientenproben möglich (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 hat eine Länge von 11076 bp und wurde mit Hilfe des bakteriellen Vektors pACYC 184 (Rüger et al., 1984) kloniert. Nach Aufreinigung und photometrischer Vermessung konnte dieses Insert als Standard eingesetzt werden.

Folgende Verdünnungsreihe wurde aus einer Stammkonzentration von 230ng/ $\mu$ l klonierter HCMV-DNA hergestellt:

---

**Tab.2:** Slot-Blot-Signale der Eichkurve

+++	100 fg/ 5µl (~ 3000 Viruskopien)
++	10 fg/ 5 µl (~ 300 Viruskopien)
+	1 fg/ 5µl (~ 30 Viruskopien)
-	0,1 fg/ 5µl (~ 3 Viruskopien)

Die Verdünnung erfolgte in 100ng/5µl zellulärer HCMV-negativer DNA

### 2.3.3 Einstellung der Proben mit Hilfe von Ampuwa

80-120ng DNA- bzw. Patientenprobe wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschliessend wurde mit Ampuwa auf 10ml aufgefüllt.

### 2.3.4 Primer

Die zur Amplifikation der HCMV-Genom-Segmente verwendeten Primer banden beide an eine in verschiedenen HCMV-Stämmen hochkonservierte Region, dem immediate-early-Gen 1,4 Exon (Jiwa et al., 1989). Da diese in sehr zahlreichen HCMV-Stämmen vorkommt, ist sie zur Detektion sehr gut geeignet. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 147 bp.

**Tab.3:** HCMV-Primersequenzen

“forward primer “:	5´-AGCTGCATGA TGT GAGCAAG-3´
Primerlänge	20 bp (Basenpaar 1767-1786)
“reverse primer“:	5´-GAAGGCTGAG TTCTTGGTAA-3´
Primerlänge	20 bp (Basenpaar 1894-1913)

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

---

**Tab.4:** DR $\beta$ -Primersequenzen:

“forward primer “:	5´-ACTGGAACAG CCACAAGGAC-3´
Primerlänge	20 bp (Basenpaar 1767-1786)
“reverse primer“:	5´-CCGCTGCACT GTGAAGCTCT-3´
Primerlänge	20 bp (Basenpaar 1894-1913)

Diese DR $\beta$ -Primersequenzen dienten dem Ausschluss von PCR-Inhibitoren und der Kontrolle einer ausreichend eingesetzten Menge an Patienten-DNA. Kurz nach Transplantation war dies aufgrund einer geringen DNA-Menge wichtig. Somit wurde zu jeder Probe neben HCMV-DNA ein Fragment DR $\beta$ -Gen amplifiziert.

Die Primer wurden im hauseigenen DNA-Synthesizer hergestellt und im Spektralphotometer in ihrer jeweiligen Konzentration bestimmt. Für optimale Amplifikationsbedingungen wurde dieselbe Stammkonzentration von “Forward“- und “Reverse-Primer“ vorausgesetzt. Diese lag im Falle der HCMV-Primer bei 250ng/ $\mu$ l, für die DR $\beta$ -1 Primer bei je 5ng/ $\mu$ l.

### **2.3.5 PCR-Ansatz**

Um eine Kontamination der Proben zu verhindern, wurden DNA-Extraktion, Probeneinstellung und das Pipettieren des PCR-Ansatzes räumlich getrennt durchgeführt. Pipettieren und Aliquotieren der Nukleotide, der Enzyme und Puffer bzw. des Mastermix erfolgten unter einer Sterilbank mit separaten Pipetten, Mundschutz und sterilen Handschuhen.

Alle benötigten Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert.

**Tab.5:** PCR-Mix/Probe

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
HCMV-Primer-Mix	Pr.1 und 2 je 250ng/ $\mu$ l	je 150ng	0,6 $\mu$ l
DR $\beta$ -Primer-Mix	Pr.1 und 2 je 5ng/ $\mu$ l	je 18ng	3,6 $\mu$ l
dNTPs (dATP,dCTP, dGTP, dTTP)	je 25 mM/250 $\mu$ l	0,5 mM	1,0 $\mu$ l
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu$ l	1,5 U/ $\mu$ l	0,3 $\mu$ l
10 x Puffer	s.u.	s.u.	5,0 $\mu$ l
Ampuwa	-	-	29,5, $\mu$ l

Gesamtvolumen PCR-Mix/Probe: 40  $\mu$ l

Volumen der DNA-Probe: 10  $\mu$ l

Endvolumen/Probe: 50  $\mu$ l

**Tab.6:** 10x PCR-Puffer

	Stammkonzentration	Endkonzentration
Tris pH 9,6	100 mM	10 mM
NaCl	500 mM	50 mM
MgCL <sub>2</sub>	100 mM	10 mM
BSA (Bovines Serum Albumin)	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	5 $\mu$ g/50 $\mu$ l

Nach Zugabe der Substanzen zum Mastermix wurde sorgfältig gevortext. Anschliessend wurde jede Probe mit 70 $\mu$ l Mineralöl überschichtet. War die Probenzahl sehr gross, wurden die schon Mastermix enthaltenden Proben auf Eis gestellt. Dies sollte den Reaktionsbeginn hinauszögern, bis alle Proben PCR-bereit waren.

---

### 2.3.6 PCR-Verlauf mit 34 Zyklen

**Tab.7:** PCR- Protokoll

Schritte	Zeitdauer	Temperatur in °C
Initialdenaturierung (einmalig)	240 sec	94
Denaturierung	60 sec	94
Annealing, Extension	180 sec	66
term. Denaturierung, einmalig	300 sec	95

Nach Beenden der terminalen Denaturierung wurden die Proben sofort auf Eis gelegt. So wurde eine erneute Zusammenlagerung der denaturierten Einzelstränge verhindert. 30 min später konnten die Proben unter Öl abgezogen werden. 43µl je Probe wurden in ein neues 1,5ml-Eppendorf-Gefäss überführt.

## 2.4 Slot-blot Hybridisierung der Amplifikate

### 2.4.1 Fixierung der Nukleinsäuren auf einer Nylonmembran

Eine Hybond N+-Nylonmembran wurde nach 20minütigem Einweichen in Ampuwa in eine Miliblot-Kammer eingespannt. In jeden Kammerschlitz wurden jeweils 10µl amplifizierte Probe pipettiert. Anschliessend wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe ein Vakuum erzeugt, so dass die Proben in die Membran eingezogen wurden. Zusätzlich wurden jeweils 100µl Aqua dest. pro Kammerschlitz zugegeben.

Nach kurzem Trocknen der Membran erfolgte eine 12 sec lange Vernetzung der Proben mit Hilfe von UV-Licht bei 254nm Wellenlänge. Die Intensität dabei betrug 0,12 J/cm<sup>2</sup>.

Anschliessend wurde die Membran in eine Plastikbox mit 0,4N NaOH gelegt. Nachdem sich die Membran mit NaOH vollgesaugt hatte, wurde der Überstand NaOH-Lösung abgekippt. Bei RT folgte eine Inkubationsdauer von 20 min, jede Bewegung der Membran wurde sorgfältig vermieden.

---

### 2.4.2 Prähybridisierung

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.

**Tab.8:** Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung

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

#### 50xDenhardts-Lösung

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

#### 30xSSPE

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

#### 10% Natriumdodecylsulfat (SDS)

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

---

## 10% N-Lauroylsarcosin

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

### 2.4.3 Markierung der HCMV-Detektionsoligonukleotide

Um die beiden Amplifikationsprodukte (HCMV-IE 1,4 Exon und HLA-DR $\beta$ 1, 2.Exon) nachzuweisen, wurden spezifisch bindende Sonden eingesetzt.

**Tab.9:** Sonden

1. HCMV (Oligo-Sequenz):	5`-GGGTGCACTG CAGGCTAAGG CCCGTGCTAA AAAGGATGA-3` Länge 40bp
2. DR $\beta$ (Oligo-Sequenz):	5`-AGGCGGGCCG CGGTGGACAC CTACTGCAGA-3` Länge 30bp

Die Oligonukleotide wurden durch einen Boehringer-Markierungs-Kit mit dig-dUTP 4 h bei 37 °C markiert.

Er setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

**Tab.10:** Markierungsansatz:

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

---

Endvolumen:	25,0µl
Lagerung:	-20 °C
Dauer der Markierung:	4 h bei 37 °C
Einsatz der Sonde:	1 pmol/ml Hybridisierungslösung

#### 2.4.4 Hybridisierung

Zur Hybridisierung der Membranen wurden dig-dUTP markierte Sonden eingesetzt. Durch eine 30minütige Inkubation der Membranen im Wärmeschrank (42°C) erfolgte die Hybridisierung. Die Inkubation der Membranen wurde getrennt in 2 verschiedenen Hybridisierungslösungen (DRß und HCMV) durchgeführt.

#### Hybridisierungslösung:

Prähybridisierungslösung + 1 pmol/ml dig-dUTP markierte Sonde.

#### 2.4.5 Waschschritte

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden wie folgt gewaschen:

- 2 Mal je 5 min bei RT in Waschlösung 1

**Tab.11:** Waschlösung 1

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

- 2 Mal je 7 min in Waschlösung 2

Dabei war die genaue Einhaltung bestimmter Waschttemperaturen wichtig.

Folgende Waschttemperaturen sind zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden geeignet:

- Waschtemperatur für HCMV: 65°C
- Waschtemperatur für DRβ-1: 55°C

**Tab.12:** Waschlösung 2

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

Vor der eigentlichen Detektion wurden die Membranen (von nun an gemeinsam) kurz in Puffer 1 bei RT auf der Horizontalwippe äquilibriert.

**Tab.13:** Puffer 1:

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

#### **Herstellung von 1 M Tris:**

12,11g werden in 100ml Ampuwa gelöst. HCl conc. ermöglicht die pH-Wert-Einstellung.

#### **2.4.6 Abblocken positiver Ladungen**

Um unspezifische Bindungen des für die immunhistochemische Detektion eingesetzten Antikörpers an den Membranen zu verhindern, wurden diese für 30 min bei RT auf der Horizontalwippe in Puffer 2 inkubiert.

---

**Puffer 2:**

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

Danach erfolgte eine weitere Äquilibrierung der Membranen in Puffer 1.

**2.4.7 Herstellung und Inkubation der Antikörperlösung**

Zum Nachweis der dig-UTP markierten Sonden wurden die Membranen in Polypropylenfolie eingeschweisst und für 30min in Alkalischer Phosphatasegekoppeltem Anti-Digoxigenin-Antikörper bei RT auf der Horizontalwippe inkubiert. Die Fab-Fragmente stammten von Schaf-IgG.

Diese Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

**Tab.14:** Antikörperlösung

	Stammkonzentration	Endkonzentration	Volumen
Anti-Digoxigenin-AP	750 U/ml	150 U/ml	4 µl/Membran
Puffer 1	-	-	20 ml/Membran

Die Membranen wurden bei RT 2 Mal für 10 min in Puffer 1 auf der Horizontalwippe gespült. Anschliessend wurde die Membran kurz in Puffer 3 äquilibriert.

**Tab.15:** Puffer 3

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

---

#### 2.4.8 Farbentwicklung zur Detektion der Amplifikationsprodukte

Nachdem die Membranen erneut in Polypropylenfolie eingeschweisst wurden, erfolgte eine Inkubation der Membranen in der unten beschriebenen Farblösung für 2-4 h (abhängig vom Alter der Hybridisierungslösungen) in einem dunkel abgeschlossenen Raum. Dabei erfolgte keine Bewegung der Membranen.

**Tab.16:** Farblösung:

BCIP: 50mg/ml gelöst in Dimethylformamid	34 µl/Membran
NBT: 75mg/ml	35 µl/Membran
Puffer 3	10ml/Membran

Die Farbreaktion wurde gestoppt, sobald alle Signale der Eichkurve auf der Membran deutlich sichtbar waren. Anschliessend wurde die Membran kurz in Puffer 4 inkubiert.

**Tab.17:** Puffer 4

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

Die Membran wurde über Nacht getrocknet und am darauffolgenden Tag zur Aufbewahrung in Polypropylenfolie eingeschweisst. Aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit musste sie bis dato im Dunkeln aufbewahrt werden.

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

---

### 2.4.9 Zeichenerklärung

Im Rahmen der Auswertungen wurden folgende Symbole gewählt:

PCR-Slot-blot-Membran:

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

---

## **2.5 COBAS AMPLICOR CMV Monitor**

### **2.5.1 Einführung**

Der Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) ist ein in vitro Nukleinsäuren-Amplifikations-Test zur Quantifizierung der viralen DNA des HCMV in klinischen Plasmaproben am Cobas Amplicor Analysensystem. Dabei besteht das Funktionsprinzip aus einer integrierten automatisierten Amplifikation, Verdünnung und Detektion.

### **2.5.2 Übersicht**

Im CMM zu analysierende Proben müssen zuvor ausserhalb des Gerätes unter Verwendung von speziellen standardisierten CMM Testkits vorbereitet werden. Danach werden die Proben auf dem Gerät platziert, die notwendigen Testreagenzien geladen und das Gerät gestartet. Der weitere Ablauf erfolgt nun vollautomatisch.

Nach Amplifikation der Nukleinsäuren werden die Amplifikate denaturiert und automatische Reihenverdünnungen erstellt. Im nächsten Schritt erfolgt eine Hybridisierung der Amplifikate an spezifische Nukleinsäuresonden, die an magnetische Mikropartikel gebunden sind. Der Nachweis dieser gebundenen Amplifikate wird kolometrisch durch eine Reaktion mit Avidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP) und einem Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat erzielt.

Der Virustiter einer Probe wird durch einen Vergleich der Extinktionen ihrer reihenverdünnter Proben mit einem koamplifizierten Quantifizierungsstandard mit bekannter Viruslast bestimmt. Die Detektionsschwelle des Tests liegt bei 400 Kopien/ml Plasma. Der Test verläuft zwischen 400 bis  $2 \times 10^5$  Kopien pro ml linear.

### **2.5.3 Besonderheiten zur Prophylaxe von Kontaminationen**

Eine Besonderheit des Systems stellt die Amperase (Uracil-N-Glykosylase) dar. Sie gewährleistet einen Probenschutz durch eine selektive enzymatische

---

Zerstörung potenziell kontaminierender Amplifikate, z.B. aufgrund von Aerosolbildung, Pipettierfehlern und verunreinigten Pipettenspitzen. Dabei wird Desoxyuridinhaltige, nicht aber Thymidinhaltige Nukleinsäure zerstört. Desoxyuridin ist als Baustein in natürlicher Nukleinsäure nicht enthalten, kommt aber in den Amplifikaten vor, da im Mastermix Thymidintriphosphat durch Desoxyuridintriphosphat ersetzt wurde. Auf diese Weise werden Carry-over-Produkte aus früheren Amplifikationen während des 1. Denaturierungszyklus gezielt abgebaut und inaktiviert. Die Zielnukleinsäure wird dabei nicht beeinträchtigt, da die Amperase bei Temperaturen über 55°C inaktiv ist. Neu gebildete Amplifikate werden bei einer Temperatur von 72°C gehalten und werden somit vor ihrem Nachweis nicht zerstört. Nach der Amplifikation wird das Enzym durch Denaturierungslösung chemisch inaktiviert.

Die Vorbereitung der Proben und Mastermix-Reagenzien in einem von Amplifikation und Detektion räumlich getrennten Laborbereich gewährleistete eine zusätzliche Probenkontaminationsprävention.

#### **2.5.4 Reagenzienpräparation**

Zunächst wurde der Mastermix durch spezielle, gebrauchsfertige Amplicor-Testkits vorbereitet. Diese enthielten die in Tabelle 18 aufgeführten Bestandteile, die eine spezifische Amplifikation der Zielsequenz ermöglichen:

**Tab. 18:** Bestandteile des Mastermix

▪	< 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

---

Entsprechend der Probenmenge wurde eine Anzahl an A-Ringen ausgewählt. Ein A-Ring konnte 12 Proben aufnehmen, maximal war der Einsatz von 4 Ringen je Lauf möglich. Da pro Lauf eine "low-copy" (+), eine "high-copy" (+++) und eine Negativkontrolle (-) mitgeführt werden musste, konnten maximal 45 Proben und 3 Kontrollen pro Lauf auf HCMV-DNA untersucht werden.

Bei den Kontrollen handelte es sich um nicht infektiöse DNA-Sequenzen mit den gleichen Primerbindungsstellen und Basensequenzlänge wie die Ziel-DNA. Unterschiede bestanden aber in Sequenzen der Sonden-Bindungsregion.

Die Kontrollen wurden gemeinsam mit den Proben amplifiziert und detektiert, um Inhibitionen der PCR und Fehler bei der Probenvorbereitung aufzudecken.

Der Gebrauchs-Mastermix wurde durch Pipettieren von 50µl Magnesiumlösung in ein Mastermix-Tube mit den in Tabelle 18 aufgeführten Inhaltsstoffen immer frisch zubereitet. Gemischt wurde im Anschluss durch gründliches 10-15maliges Kippen des Tubes.

Nach Zugabe von 50µl Mastermix in jedes A-Röhrchen wurden die A-Ringe in einer speziellen Plastik-Tüte mit Klippverschluss luftdicht bis zum Gebrauch bei 2-8°C gelagert. Insgesamt waren Lagerungen bis zu 16 h bei 2-8°C möglich.

## **2.5.5 Probenvorbereitung**

### **2.5.5.1 DNA-Extraktion aus Plasma**

Zur DNA-Isolierung wurde EDTA-Plasma verwendet. Dieses wurde bei RT durch eine 15minütige Zentrifugation bei 8000xg aus Vollblut gewonnen. Heparinplasma durfte wegen einer möglichen Inhibition der nachfolgenden Amplifikation nicht verwendet werden.

Die Proben sollten innerhalb von 24 h nach Blutabnahme zentrifugiert werden. Anschliessend wurden sie entweder direkt weiterverarbeitet oder bei 2-8°C gelagert. (Haltbarkeit der Proben bei 2-8°C: 5 Tage).

Die folgenden Angaben gelten für einen A-Ring mit 9 Proben und 3 Kontrollen.

---

#### 2.5.5.1.1 Herstellung von 70%igem Ethanol

Zuerst wurde 70%iges Ethanol aus 11,0ml 96%igem Ethanol und 4,0ml destilliertem Wasser in einem sterilen Einmalgefäss frisch hergestellt.

#### 2.5.5.1.2 Herstellung des Lysispuffers

Anschliessend wurde der Lysispuffer durch Zugabe von 100µl (CMM QS) und 100µl (CMM DB) zu einer Flasche Lysis-Reagenz (CMM LYS) hergestellt. Vor Zugabe von (CMM QS) und (CMM DB) mussten beide 5-10 sec gevortext werden. Der Lysispuffer sollte vor Zugabe von (CMM QS) vollständig aufgelöst sein.

#### CMM LYS (CMV Monitor Lysis Reagenz)

- Tris-HCl Puffer
- 68% Guanidinthiocyanat
- 3% Dithiothreitol
- < 1% Glykogen

#### CMM QS (CMV Monitor Quantifizierungsstandard)

- < 0,001% Nicht infektiöse Plasmid-DNA
- < 0,005% Poly- rA-RNA (synthetisch)
- EDTA
- 0,05% Natriumazid

#### CMM DB (CMV Monitor Dextranblaureagenz)

- < 0,4% Dextranblau
- 0,05% Natriumazid

Danach wurde der Reaktionslösung ein Quantifizierungsstandard (QS) mit bekannter Kopienzahl zugefügt. Beim QS handelt es sich um eine nicht

---

infektiöse DNA-Sequenz mit gleicher Primerbindungsstelle wie die Ziel-DNA. Allerdings verfügt er über eine andere Sondenbindungsstelle (SK 535). So ist eine Unterscheidung zwischen beiden möglich.

#### 2.5.5.1.3 Weitere Präparation des Gebrauchs-Lysispuffers

Pro Ansatz (Probe, Kontrolle) wurden 600µl frisch zubereitetes Gebrauchs-Lysis-Reagenz in ein 2,0ml Sarstedt-Schraubdeckel-Tube pipettiert. Danach wurden 200µl Patientenserum zum Lysispuffer enthaltenden Reagenz hinzugefügt, anschliessend wurde gut gemischt.

#### 2.5.5.1.4 Kontrollen

In einem nächsten Schritt erfolgte die Herstellung der Kontrollen. Dazu wurde zunächst Humanplasma sorgfältig gevortext. In das für die Negativkontrolle markierte Röhrchen mit dem enthaltenen Lysispuffer wurden 200µl Humanplasma (NHP) zugegeben und mindestens 10 sec gevortext. Analog wurde für die Low-pos-(+)- und High-pos-(+++)-Kontrolle verfahren. Anschliessend wurden 50µl der HCMV(-)-Kontrolle, der HCMV(+)-Kontrolle und der HCMV (+++)-Kontrolle in das entsprechende Tube pipettiert. Entscheidend war ein sofortiges Mischen nach der Zugabe der Kontrollen.

#### NHP (Negatives Humanplasma)

- Humanplasma
- 0,1% ProClin® 300

#### HCMV (-) Kontrolle

- <0,005% Poly-rA-RNA
- EDTA
- 0,05% Sodiumazid

---

HCMV L (+) C (CMV Monitor Low (+) Kontrolle)

- <0,001% Nicht infektiöse Plasmid-DNA
- <0,005% Poly-rA-RNA
- EDTA
- 0,05% Natriumazid

HCMV H (+++) C (CMV Monitor High (+++) Kontrolle)

- <0,001% Nicht infektiöse Plasmid-DNA
- <0,005% Poly-rA-RNA
- EDTA
- 0,05% Natriumazid

2.5.5.1.5 Zugabe von Isopropylalkohol

In jedes Tube wurde 800µl Isopropylalkohol pipettiert. Nach Zugabe des Alkohols wurde jeweils sofort für 5-10 sec gemischt.

2.5.5.1.6 Pelletbildung durch eine Zentrifugation

Durch 15minütige Zentrifugation (RT) der Proben und Kontrollen mit 12500-16000xg entstand am Tubeboden ein Pellet. Bei Zentrifugationen unter 12500xg waren Probenverluste durch mangelnde Pelletbildung möglich.

2.5.5.1.7 Zugabe von 70%igem Ethanol

Nach sorgfältigem Abpipettieren aller Überstände wurde pro Ansatz 1ml frisch zubereitetes 70%iges Ethanol zugegeben.

---

#### 2.5.5.1.8 Zentrifugation

Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 15000xg für 5 min bei RT. Wie oben beschrieben, wurde erneut der Überstand abpipettiert und verworfen.

Weder durfte das Pellet beim Abpipettieren verletzt, noch Ethanolreste im Tube belassen werden, da letzteres zu Störungen der Amplifikation geführt hätte.

#### 2.5.5.1.9 Resuspension des Pellets

Das Pellet jeder Probe bzw. Kontrolle wurde mit 400µl Probendiluent (CMM DIL) resuspendiert und 10 sec intensiv gevortext. Ungelöstes Material durfte zwar zurückbleiben, in der Regel wurde jedoch bis zur vollständigen Pelletauflösung gevortext.

Wurden präparierte Proben nicht innerhalb von 4 h verwendet, konnten diese laut Hersteller bei -20°C bis zu 1 Woche aufbewahrt werden.

#### HCMV DIL (CMV Monitor Probendiluent)

- Tris-HCl-Puffer
- < 0,005% Poly-rA-RNA (synthetisch)
- EDTA
- 0,05% Natriumazid

#### 2.5.5.1.10 Starten des CMM

Anschliessend wurden 50µl der Patienten- und Kontrollproben in die bereits Mastermix enthaltenden A-Ringe pipettiert. Nach Einsatz der A-Ringe in den vorgesehenen Thermocycler wurde der CMM für den entsprechenden Lauf programmiert und gestartet.

Vorher sollte, entsprechend der Probenanzahl, das Gerät mit den für die vollautomatische Amplifikation und Detektion notwendigen Reagenzien bereits beladen sein, da zwischen der Probenzugabe zum Mastermix und dem Start der Amplifikation maximal 45 min vergehen durften. Die Überschreitung dieser Frist hätte falsch-niedrige Ergebnisse zur Folge gehabt.

---

Es handelte sich um folgende Reagenzien mit Inhaltsstoffen:

VM PS1 (CMV Probensuspension 1)

- MES Puffer
- <0,5% Dynabeads®-Lösung
- 0,09% Natriumazid

VM4 (CMV Probensuspension 2)

- Natrium Phosphat Puffer
- <0,2% Detergent
- 24,9% Natriumthiocyanat

VQ PSI (Quantifizierungsstandardprobe 1)

- MES Puffer
- <0,1% Dynabeads®-Lösung
- 0,09% Natriumazid

VQ 4 (Quantifizierungsstandardprobe 2)

- Natrium Phosphat Puffer
- <0,2% Detergent
- 24,9% Natriumthiocyanat

AD3 (Amplifikationsverdünnungsreagenz)

- EDTA
- 0,8% Natriumhydroxid

---

#### DN (Denaturierungslösung)

- 1,6% Natriumhydroxid
- EDTA
- Thymolblau

#### CN (Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat)

- Tris-HCl Puffer
- < 0,001% Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat
- Rinderserumalbumin
- Emulsit 25
- 0,1% Phenol
- 1% ProClin 150

#### SB3 (Substrat A)

- Citratlösung
- 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 0,1% ProClin 150

#### SB (Substrat B)

- 0,1% 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)
- 40% Dimethylformamid (DMF)
- 0,1% ProClin 150

#### 2.5.5.2 DNA-Extraktion aus Vollblut

Bei 50 Proben wurde parallel zur DNA-Extraktion aus Plasma eine DNA-Extraktion aus Vollblut (Leukozyten) durchgeführt. In diesem Fall wurde eine Konzentration von 800.000 Leukozyten/200µl Vollblut (4000 Leukozyten/µl) für

---

die DNA-Extraktion vorausgesetzt. Für die Bestimmung der Leukozytenzahl/ $\mu\text{l}$  wurde den Patienten am Untersuchungstag ein Blutbild abgenommen.

Eine wichtige Voraussetzung war der Probenverarbeitungsbeginn spätestens 4 h nach Blutabnahme.

Nach der Gleichung:  $C=n/V$  wurde das einzusetzende Volumen an Vollblut bestimmt, um eine Konzentration von 800.000 Leukozyten /200 $\mu\text{l}$  zu erhalten.

Dabei galt für die oben genannte Formel:

- Konzentration  $C=4000$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  (s.o.)
- Anzahl Zellen  $n$ =Neutrophilenzahl aus Laborjournalbericht
- Volumen  $V$ =einzusetzendes Blutvolumen in ml

Nach Berechnung des einzusetzenden Volumens wurde dieses in ein Polypropylenröhrchen pipettiert und bei 8000x g für 15 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand musste sorgfältig mittels Pipette entfernt werden, um die Leukozytenmanschette unter dem Überstand nicht zu beschädigen.

Das Leukozytenpellet wurde in ein 2,0ml Sarstedt-Tube überführt und mit 200 $\mu\text{l}$  PBS versetzt, anschliessend wurde gut gevortext. Das in PBS aufgelöste Pellet wurde nun anstelle von 200 $\mu\text{l}$  Plasma in der in 2.5.5.1 beschriebenen DNA-Extraktion aus Plasma eingesetzt. Die weitere Probenpräparation entsprach der DNA-Extraktion aus Plasma.

### **2.5.5.3 DNA-Extraktion aus extrahierter DNA**

In diesem Fall wurde eingefrorene DNA, die nach dem in 2.2 beschriebenen Verfahren extrahiert wurde, als Probenmaterial eingesetzt.

Die mit Hilfe von Aqua dest. auf 80-120ng DNA/ $\mu\text{l}$  eingestellten Proben wurden nach dem Auftauen (Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) gut gevortext. Nach Entnahme von 200 $\mu\text{l}$  wurden die Proben als Ausgangsmaterial entsprechend der in 2.5.5.1 beschriebenen Anleitung eingesetzt. Ausser im Ausgangsmaterial gab es keine weiteren Unterschiede zur DNA-Extraktion aus Plasma.

---

### **2.5.6 Amplifikation im Thermozykler**

Der aus 3 Schritten (Denaturierung, Annealing, Extension) bestehende PCR-Zyklus erfolgte im Thermocycler des Analyzers.

#### **PCR-Schritt 1: Denaturierung durch Hitze (Temperatur > 90°C)**

Durch Hitze erfolgte eine Aufteilung doppelsträngiger DNA in 2 Einzelstränge, indem Wasserstoffbrücken getrennt wurden.

#### **PCR-Schritt 2: Annealing - Bindung der Primer an eine Zielsequenz**

Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde eine Zielsequenz durch Anlagerung von 2 spezifischen biotinylierten Primern (LC 342 und LC 383), die Beginn und Ende signalisierten, markiert. Die Primer sind durch Denaturierung gewonnene Einzelstränge und komplementär zur Zielsequenz der DNA.

#### **PCR-Schritt 3: Extension (Verlängerung)**

Bei Anlagerung der Primer an komplementäre DNA-Sequenzen wurde die Temperatur auf 72°C erhöht. Die Taq-Polymerase vervollständigte nun die DNA-Stränge. Das Resultat waren neue, mit dem Original identische DNA-Doppelstränge.

### **2.5.7 Detektion**

Die Detektion gliederte sich in folgende Schritte:

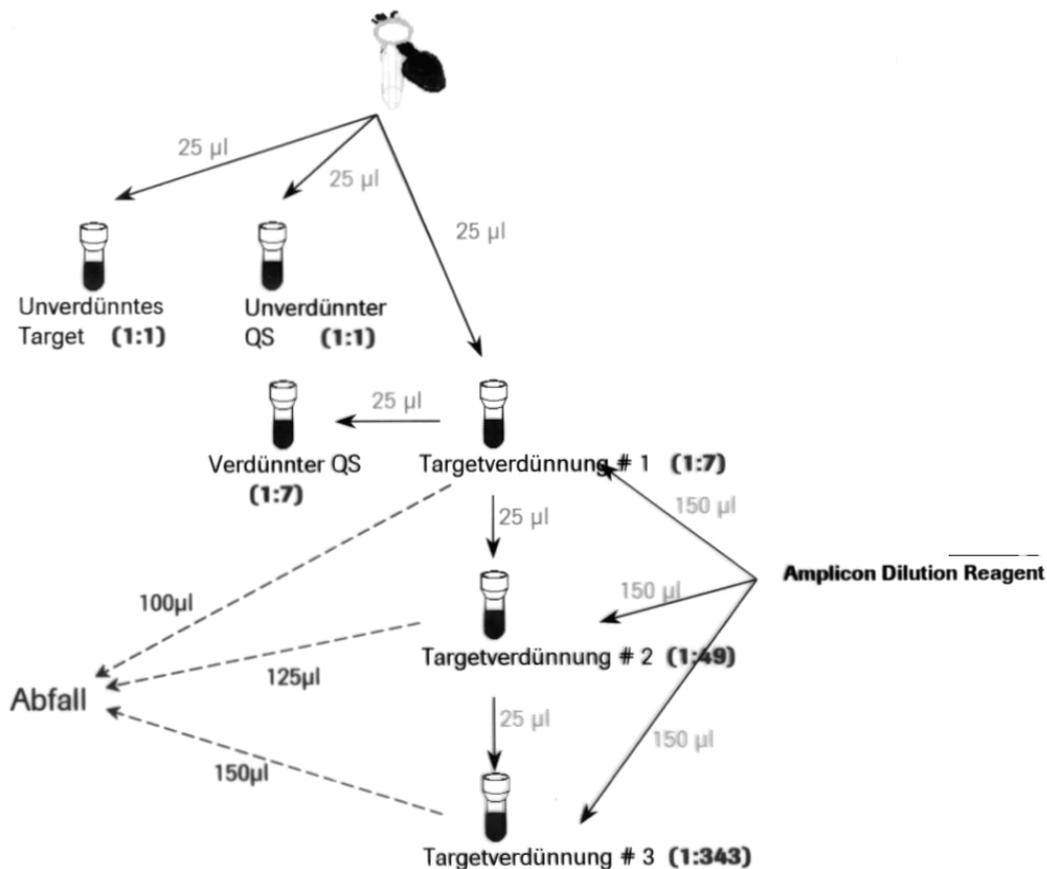
- Denaturierung
- Hybridisierung: Bindung freier Amplifikate an komplementäre einzelsträngige DNA-Fangsonden, die durch magnetische Mikropartikel immobilisiert sind
- Konjugation: Avidin-Meerrettich-Peroxidase (Av-HRP) bindet an biotinylierte Primer
- Substratoxidation
- Absorptionsmessung

### 2.5.7.1 Denaturierung

Im Anschluss an die Amplifikation wurden alle doppelsträngigen Amplifikate in den A-Röhrchen durch Zugabe einer alkalischen Lösung chemisch denaturiert. Ein Aliquot aus jedem A-Röhrchen wurde nun automatisch in 3 Detektionsröhrchen (D-Cups) übertragen. Jedes D-Cup wurde in einen 37°C-Inkubator transportiert.

Die 1. D-Küvette diente zur Detektion der unverdünnten Zielsequenz, die 2. zur Detektion des unverdünnten Quantifizierungsstandards. In die 3. D-Küvette wurde ein Amplifikatverdünnungsreagenz gegeben, um die 1. Verdünnung durchzuführen. Je ein Aliquot der 1. Verdünnung wurde danach in 2 D-Küvetten pipettiert. Diese dienten der Detektion der ersten Verdünnungen von Zielsequenz und Quantifizierungsstandard. Weitere Verdünnungen erfolgten nach obigem Schema, das die folgende Abbildung graphisch darstellt.

**Abb. 1:** Verdünnungsschema



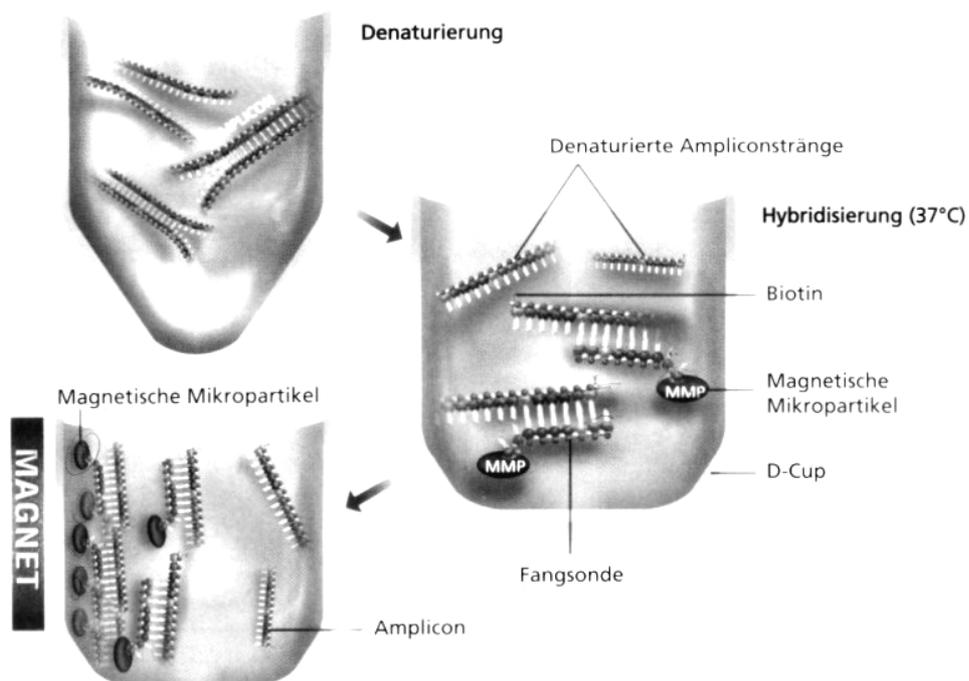
---

### 2.5.7.2 Hybridisierung

Anschließend wurde eine Hybridisierungslösung zugegeben. Diese enthielt magnetische und mit HCMV-spezifischen Oligonukleotid-Fangsonden (LC 359) beschichtete Mikropartikel. Die Sonden zeigten zur Zielsequenz komplementäre Bindungsstellen.

In der Hybridisierungsreaktion erfolgte die Bindung freier Amplifikate an die beschichteten Mikropartikel. Während der 4 folgenden Waschschrte in der Waschstation wurden ungebundene Amplifikate entfernt, während die gebundenen über die magnetischen Sonden durch einen aussen befindlichen Magneten im Röhrchen fixiert wurden.

**Abb. 2:** Denaturierung und Hybridisierung

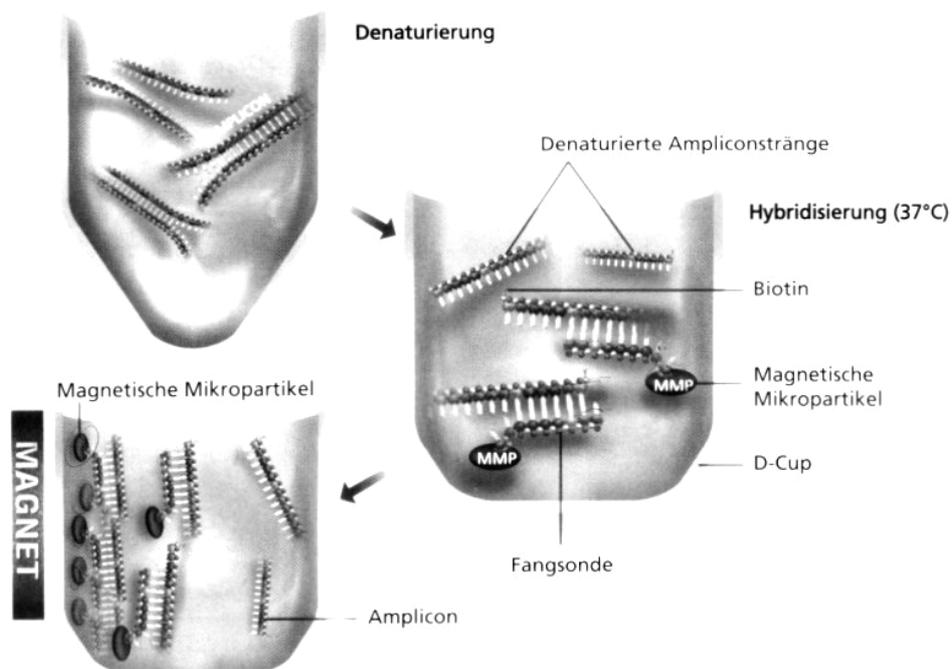


---

### 2.5.7.3 Konjugation mit Avidin-Meerrettich-Peroxidase

Nach Zugabe von Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat in die D-Cups erfolgte eine 2. Inkubation bei 37°C. Durch Avidin mit einer grossen Affinität zum Biotin der biotinylierten Amplicons, erfolgte eine Kopplung der Amplifikate mit dem Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat.

**Abb.3:** Konjugation



### 2.5.7.4 Substratoxidation

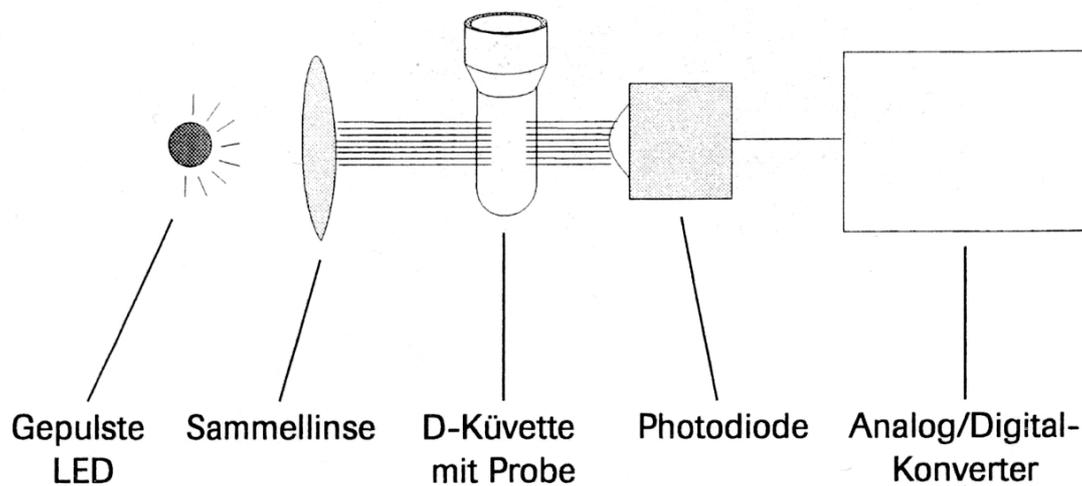
In einem 3. Inkubationsschritt wurden den D-Cups Tetramethylbenzidin (TMB) und  $H_2O_2$  als Substrat zugegeben. In Anwesenheit von  $H_2O_2$  katalysierte die gebundene Meerrettich-Peroxidase die Oxidation von TMB, wodurch ein blauer Farbkomplex entstand.

---

### 2.5.7.5 Absorptionsmessung im Photometer

Nach der letzten Inkubation wurden die D-Cups in ein Photometer transferiert und die Absorption bei 660nm gemessen. Dabei wurde die Absorption des Substratleerwerts von der Reaktionslösung in jedem D-Cup abgezogen.

**Abb. 4:** Photometer



Diese Leerwert-korrigierten Extinktionswerte stellen Rohdaten dar, aus denen das System den Titer der Zielsequenzen nach folgender Gleichung berechnet:

$$Titer = \frac{Extinktion(T) \times VF(T)}{Extinktion(QS) \times VF(QS)} \times Kopienzahl(QS) \times Probenfaktor$$

---

Dabei entspricht in der oben stehenden Formel:

Titer	Konzentration der Zielsequenz (Kopien/ml) in der Probe
Kopienzahl (QS)	Konzentration des QS (Kopien/ml) in der Probe
Probenfaktor	Faktor zur Umwandlung Kopien/PCR in Kopien/ml
Extinktion (T)	Extinktion der Probe innerhalb eines linearen Bereichs des Photometers, welche nach der Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die grösste Gesamt-OD ergibt
Extinktion (QS)	Extinktion des QS innerhalb eines linearen Bereichs des Photometers, welche nach der Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die grösste Gesamt-OD ergibt.
VF(T)	Zur Bestimmung der Gesamt-OD verwendete Verdünnung der Probe
VF(QS)	Zur Bestimmung der Gesamt-OD verwendete Verdünnung des QS

Die Endergebnisse wurden an eine spezielle mit dem CMM Analyzer verbundene Amplilink-Software verschickt und konnten dort abgefragt werden.

### 2.5.8 Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Quantifizierungen wurden als Konzentrationen in Kopien/ml angegeben. Die Detektionsschwelle des Tests liegt bei 400 Kopien/ml Plasma. In einem Messbereich von 400-100000 Kopien pro ml Blutplasma verläuft diese Nachweismethode linear.

### 2.5.9 Statistische Analyse

In den Auswertungstabellen werden normalverteilte kontinuierliche Variablen durch die statistischen Kenngrössen Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Nicht normalverteilte Variablen werden durch Minimum, Maximum, Spannweite und Median beschrieben. Diskrete Variablen werden durch

---

Häufigkeiten und relative Häufigkeiten gekennzeichnet. Die hier dargestellten Ergebnisse von statistischen Testverfahren dienen nicht zum Nachweis von konkreten, zu Beginn der Studie aufgestellten Hypothesen und erlauben deshalb grundsätzlich keine Aussagen über statistische Signifikanzen. Die Ergebnisse von statistischen Testverfahren werden ohne Anpassung für multiples Testen unter Angabe von zweiseitigen p-Werten aufgestellt. P-Werte von unter 0,05 werden in diesem Bereich als statistisch auffällig interpretiert. Die statistischen Analysen wurden mit dem Auswertungssystem JMP 4.0 für Windows durchgeführt.

Beim Vergleich der beiden diagnostischen Testverfahren wurde auch die Zahl der durchgeführten Proben als Untersuchungseinheit gewählt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich darunter immer eine erhebliche Anzahl von Proben befanden, die von den gleichen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden. Diese Proben wurden bei der statistischen Analyse genauso als unabhängig voneinander betrachtet, wie Proben, die von verschiedenen Patienten gewonnen wurden. Ein statistischer Nachweis dieser Unabhängigkeitsaussage ist nicht möglich. Aus klinischer Sicht kann aber davon ausgegangen werden, dass das Ergebnis einer Probe an sich bei einem Patienten bei beiden diagnostischen Tests unabhängig vom Ergebnis eines gleichartigen Tests beim gleichen Patienten zu einem früheren Zeitpunkt ist. Aus diesem Grund wurde auch in der statistischen Auswertung die Unabhängigkeitsannahme beibehalten. Zusätzlich erfolgte aber immer eine Analyse auf Patientenebene.

---

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Studienaufbau**

#### **3.1.1 Zeitrahmen und Umfang**

Im Rahmen einer prospektiven Studie wurden wöchentlich von 1/99 bis 4/00 51 stammzelltransplantierte Patienten untersucht. So wurden 799 Proben parallel in der in-house PCR und im Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) analysiert. Für die Therapieentscheidung wurden ausschliesslich die Ergebnisse der in-house PCR herangezogen, Ergebnisse des CMM blieben unberücksichtigt.

Zusätzlich wurden im Zeitraum 11/98 bis 4/00 retrospektiv 282 Blutproben von 25 Patienten gemessen, die entweder eine hohe Viruslast entwickelt hatten oder an HCMV erkrankt waren.

Die Proben stammten von Patienten, die sich in der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, entweder einer Knochenmarkstransplantation (KMT) oder einer Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSCT) unterzogen hatten. Die Patienten wurden dabei mindestens von Tag 0 bis +100 regelmässig auf HCMV-DNA kontrolliert. Risikopatienten (HLA-differenter Spender, starke Immunsuppression, D+/R-) wurden über diesen Zeitraum hinaus beobachtet.

Zeitgleich erfolgte in der Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten eine Virusanzucht aus Blut, Rachenspülwasser und Urin.

#### **3.1.2 Konditionierungstherapie**

Allogen transplantierte Patienten wurden im Rahmen einer Konditionierungstherapie, bestehend aus Hochdosischemotherapie und evtl. einer Ganzkörperbestrahlung auf die Stammzelltransplantation vorbereitet.

---

Die Patienten erhielten entweder eine myeloablative Chemotherapie mit Busulfan (4 x 1mg/kg KG Tag -7 bis -4) und Cyclophosphamid (2 x 60 mg/kg KG Tag -3 bis -4) oder eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (GD 12 Gy, ED 2 Gy, 2x2 Gy Tag -6 bis -4) kombiniert mit Cyclophosphamid (2x 60 mg/kg KG Tag -3 bis -2).

### **3.1.3 Antivirale Prophylaxe**

Zum Zeitpunkt der Konditionierung wurde bei allen Patienten zur Prophylaxe einer Herpes-simplex-Infektion eine Therapie mit Acyclovir (4 x 400 mg/d p.o.) eingeleitet. Diese wurde in der Regel bis zum Tag +100 nach HSCT fortgesetzt.

Patienten mit HCMV-negativem Spender und Empfänger wurden ausschliesslich mit HCMV-negativen oder leukozytendepletierten Blutprodukten behandelt. Dagegen erhielten Patienten mit anderen prätransplantären Serokonstellationen Blutprodukte, die nicht auf HCMV untersucht wurden. Ihre Überwachung und Therapie erfolgte im Rahmen einer präemptiven Frühtherapie (siehe auch 1.6.).

### **3.1.4 Patientenkollektiv**

Insgesamt wurden 51 Patienten prospektiv mit beiden Nachweismethoden auf HCMV-DNA im Blut untersucht. Daraus resultierte ein Probenvolumen von 799 (Mittelwert 15,67, Median 13 [Spannweite 4-28]) Proben pro Patient).

Retrospektiv wurden von 25 Patienten 282 Blutproben parallel in in-house PCR und CMM auf Virus-DNA analysiert (Mittelwert 11,3, Median 12 [Spannweite 5-17] Proben pro Patient).

Eine Zusammenfassung der Patientenmerkmale zeigen Tabelle 19 und 20.

**Tab.19:** Merkmale (n=51) prospektiver Patienten

		Anzahl Patienten
Geschlecht	männlich	31
	weiblich	20
Alter in Jahren	Durchschnitt	40,1
	Median	41
	Spannweite	19-65
Grunderkrankung	AML	12
	ALL	6
	CML	16
	CLL	1
	Plasmozytom	7
	MDS	4
	NHL	3
	SAA	1
	Osteomyelofibrose	1
Transplantation	fremdallogen, HLA-ident.	16
	fremdallogen, HLA-mismatch	7
	fam.-allogen, HLA-ident.	21
	fam.-allogen, HLA-mismatch	7
Stammzellen	Knochenmark	23
	Periphere Blutstammzellen	28
HCMV- Serostatus vor Transplantation	D +/- R+	17
	D +/- R-	8
	D -/ R+	12
	D -/ R-	14
Beobachtungszeitraum pro Patient (in Tagen)	Durchschnitt	133
	Median	116
	Spannweite	18-260

---

**Tab. 20:** Merkmale (n=25) retrospektiver Patienten

		Anzahl Patienten
Geschlecht	männlich	13
	weiblich	12
Alter in Jahren	Durchschnitt	37,9
	Median	40,5
	Spannweite	19-53
Grunderkrankung	AML	11
	ALL	5
	CML	5
	CLL	1
	Plasmozytom	1
	MDS	1
	SAA	1
Transplantation	fremdallogen, HLA-ident.	11
	fremdallogen, HLA-mismatch	2
	fam.-allogen, HLA-ident.	8
	fam.-allogen, HLA-mismatch	4
Stammzellen	Knochenmark	16
	Periphere Blutstammzellen	9
HCMV- Serostatus vor Transplantation	D +/- R+	15
	D +/- R-	3
	D -/ R+	6
	D -/ R-	1
Beobachtungszeitraum pro Patient in Tagen	Durchschnitt	144,8
	Median	122,5
	Spannweite	40-221

---

## **3.2 Vergleich der in-house PCR und des CMM**

### **3.2.1 Durchführung, Zeitaufwand und Zuverlässigkeit des Tests**

#### **3.2.1.1 Probenvolumen und Ausgangsmaterial**

Im Vergleich zur in-house PCR benötigt der CMM statt 5ml nur 200µl Probenvolumen als Ausgangsmaterial. Dabei muss EDTA-Plasma verwendet werden. Heparinisiertes Blut und Serum führen zu falsch-niedrigen Messergebnissen. Nach Boom et al. (1999) kann die Verwendung von Serum anstelle von Plasma deutlich geringere Viruslasten zur Folge haben.

#### **3.2.1.2 Haltbarkeit des Probenmaterials**

Nach Blutabnahme muss die Zentrifugation des Vollbluts innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Plasma darf bis zur Durchführung des Tests 1 Tag bei RT, 5 Tage bei 2-8°C oder -20°C bis - 80°C alt sein. Tiefgefrorene Proben dürfen insgesamt maximal 3mal aufgetaut werden.

#### **3.2.1.3 Arbeitsschritte**

Die DNA-Extraktion im CMM zeichnet sich durch eine ausgesprochen leichte und schnelle Durchführbarkeit aus. Amplifikation und Detektion laufen vollautomatisch in einem Gerät ab, eine Überwachung des Systems verläuft Software-gesteuert und ist daher nicht notwendig.

#### **3.2.1.4 Zeitaufwand**

Die Extraktion der DNA erfordert bei einem Volumen von 12 Proben ca. 1,5, bei 24 Proben ca. 2,5 Stunden. Erste Testergebnisse liegen nach PCR-Beginn innerhalb von 3 bis 4 Stunden vor. Weitere folgen mit einem Durchsatz von 50 Detektionen/Stunde. So werden bei 12 Proben ca. 5, bei 24 Proben ca. 6 Stunden benötigt.

---

Durch verschiedene Betriebsarten ist auch die gleichzeitige Durchführung von Amplifikation und Detektion möglich. Auf diese Weise können bis zu 96 Ergebnisse pro Lauf erzielt werden.

Der Zeitaufwand alternativer Testverfahren ist 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
- 24 Stunden in der in-house DNA-PCR

### **3.2.1.5 Zuverlässigkeit des Tests**

#### **1. Validität**

In der in-house PCR und im CMM wurden insgesamt 1081 Proben auf HCMV untersucht. Bei jedem Lauf mussten im CMM 2 Quantifizierungskontrollen [low copy (+), high copy (++)] als Interner Standard sowie eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Jedes Testergebnis musste am Ende auf stetig abnehmende Werte seiner Target- und Verdünnungsreihen kontrolliert werden. Auch die Kontrollproben sollten innerhalb vorgegebener Grenzwerte liegen. War eine Kontrolle fehlerhaft, galt der gesamte Lauf als ungültig.

Als valide galten somit nur Ergebnisse ohne Fehlermeldungen (Software).

Ein invalides Testresultat wurde im CMM bei 5 von 1081 Proben (0,46%), wenn Plasma als Ausgangsmaterial verwendet wurde, angezeigt. Jede Probe war mit 8 vom jeweiligen Lauf aufbereitet worden, die alle valide Ergebnisse zeigten. Auch die Kontrollen lagen innerhalb ihrer zulässigen Grenzwerte.

Da alle 5 Proben bei Wiederholung der DNA-Extraktion valide Ergebnisse zeigten, lag die Ursache wahrscheinlich in diesem Arbeitsschritt.

---

## 2. Reliabilität

100 Blutproben von 45 Patienten wurden mit dem CMM doppelt bestimmt. Jeweils 50 zeigten in der ersten Messung positive bzw. negative Ergebnisse. In der Wiederholungsmessung kam es zu keiner Abweichung der Resultate.

### 3.2.2 Bestimmung der Spezifität

Um die Spezifitäten von der in-house PCR und dem CMM zu ermitteln, wurden 13 Patienten mit negativem Spender und Empfänger im Verlauf beobachtet. Insgesamt wurden 113 Blutproben mit beiden Systemen getestet. Dabei waren in der in-house PCR 2 Proben HCMV-positiv, was einer Spezifität von 98,2% entspricht (95%-KI: 93,8-99,8%). Im CMM zeigte dagegen keine der getesteten Proben ein positives Ergebnis. Dies entspricht einer Spezifität von 100% (95%-KI: 96,8-100%).

## 3.3 Vergleich der Testergebnisse

### 3.3.1 Proben (Bestimmung aus Plasma)

51 Patienten wurden prospektiv mindestens bis zum Tag +100 nach Transplantation beobachtet. Dies hatte 643 Blutproben zur Folge, die parallel in der in-house PCR und im CMM untersucht wurden (Tabelle 21). Mit Doppelmessungen ausgewählter Proben erhöhte sich das Probenvolumen auf 799. In Tabelle 21 wurden Wiederholungsmessungen allerdings nicht berücksichtigt. Als negativ gewertet wurden fraglich positive Ergebnisse der in-house PCR (+), ebenso wie im CMM gemessene Proben mit Viruslasten unter 400 G/ml.

**Tab.21:** Vierfeldertafel parallel bestimmter Proben (prospektiv)

	<b>in house-PCR positiv</b>	<b>in house-PCR negativ</b>	<b>insgesamt</b>
<b>CMM positiv</b>	57 (53,8%)	19 (3,5%)	76
<b>CMM negativ</b>	49 (46,2%)	518 (96,5%)	567
<b>Insgesamt</b>	106	537	643

Von den 106 in-house PCR-positiven Proben waren zusätzlich 57 (53,8%) CMM-positiv. 76 Proben zeigten im CMM positive Resultate, von denen 57 (75%) auch in der in-house PCR positive Ergebnisse lieferten. Somit stimmten 575 Resultate (89,4%) überein, während 68 (10,6%) unterschiedlich ausfielen. Der Unterschied zwischen den einzelnen Nachweismethoden ist statistisch auffällig (Mc-Nemar-Test,  $p=0,0003$ ).

### 3.3.2 Proben (Bestimmung aus bereits extrahierter DNA)

Retrospektiv wurden 250 Proben von 25 Patienten parallel in beiden Nachweisverfahren auf HCMV untersucht (Tabelle 22). Mit Doppelmessungen einzelner Patientenproben erhöhte sich die Zahl auf 282.

**Tab.22:** Vierfeldertafel parallel bestimmter Proben (retrospektiv)

	<b>in-house PCR positiv</b>	<b>in-house PCR negativ</b>	<b>insgesamt</b>
<b>CMM positiv</b>	123 (95,3%)	34 (28,1%)	157
<b>CMM negativ</b>	6 (4,7%)	87 (71,9%)	93
<b>Insgesamt</b>	129	121	250

Von 129 in-house PCR-positiven Proben waren 123 (95,3%) CMM-positiv. In 157 Proben konnte der CMM Virus-DNA festgestellt, von denen in der Parallelbestimmung 123 (78,3%) positiv ausgefallen waren. Insgesamt stimmten in beiden Nachweisverfahren 210 Ergebnisse (84%) überein, 40 (16%) zeigten unterschiedliche Resultate. Auch hier ist der Unterschied statistisch auffällig (Mc-Nemar-Test,  $p < 0,0001$ ).

---

### 3.3.3 Semiquantitative und quantitative Resultate

In der Tabelle 23 wurden die im CMM gemessenen Viruslasten den parallel bestimmten in-house PCR-Ergebnissen gegenübergestellt. Hier wurden auch die Ergebnisse von Doppelmessungen einbezogen.

**Tab. 23:** Quantitative Viruslast (CMM) und in-house PCR-Signale

	1+	2+	3+
Anzahl an im CMM gemessenen Proben, die dem folgenden PCR-Signal entsprechen	35	28	8
Median (Virustiter in G/ml)	3549	8553	12976
Spannweite	422 - 20100	464 - 46100	2200 - 41700

Insgesamt zeigten 71 Proben in beiden Verfahren ein positives Ergebnis. Von diesen waren in der in-house PCR 35 (49,3%) einfach, 28 (39,4%) zweifach und 8 (11,3%) dreifach positiv ausgefallen.

Einem einfach positiven Signal (+) der in-house PCR konnte im Durchschnitt eine Viruslast von ca. 3500 G/ml, einem zweifach positivem Signal (++) ca. 8500 G/ml und einem dreifach positiven Signal (+++) ca. 13000 G/ml im CMM zugeordnet werden. Die mittels CMM gemessene Viruslast stieg somit innerhalb der semiquantitativen in-house PCR-Einstufung von + über ++ bis +++ . Diese Zunahme ist statistisch auffällig ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.4 Patienten

Von 73 Patienten zeigten 42 eine im CMM nachgewiesene HCMV-Infektion, während 31 im gesamten Untersuchungszeitraum negativ blieben. Dagegen detektierte die in-house PCR bei 48 Patienten HCMV-DNA, bei 25 Patienten konnte sie keine Infektion nachweisen.

Die Patienten wurden nach den Ergebnissen der Parallelbestimmung in Tabelle 24 in 4 Gruppen unterteilt: Patienten, die in beiden Methoden positiv waren (n=41), Patienten mit positiver in-house PCR und negativem CMM-Test (n=7),

Patienten mit negativer in-house PCR und positivem CMM-Test (n=1) und Patienten, die in beiden Methoden negative Resultate (n=24) lieferten.

**Tab. 24:** Vergleich der Ergebnisse auf Patientenebene

	<b>in-house PCR positiv</b>	<b>in-house PCR negativ</b>	<b>Insgesamt</b>
<b>CMM positiv</b>	41 (85,41 %)	1 (4 %)	42
<b>CMM negativ</b>	7 (14,59 %)	24 (96 %)	31
<b>Insgesamt</b>	48	25	73

Die Konkordanz der Testergebnisse war hier 89,04%. 85,41% der Ergebnisse stimmten mit positiver PCR, 96% mit negativer PCR überein.

Bei 41 von 48 in-house PCR-positiven Patienten wurde eine antivirale Therapie aufgrund konsekutiv positiver Ergebnisse eingeleitet. Dabei sind alle virämischen Episoden der therapierten Patienten mittels CMM bestätigt worden. Die 7 von 48 in-house-PCR-positiven Patienten, die aufgrund nur eines einmalig positiven Resultats nicht behandelt wurden (s. 1.8), waren alle CMM-negativ.

Basierend auf der in house-PCR erhielten 32 Patienten keine antivirale Therapie. Nur bei einem dieser Patienten wurde im CMM HCMV-DNA nachgewiesen (Tabelle 25).

**Tab. 25:** Vergleich Patienten mit antiviraler Therapie

	<b>Therapie ja</b>	<b>Therapie nein</b>	<b>Insgesamt</b>
<b>CMM - positiv</b>	41	1	42
<b>CMM - negativ</b>	0	31	31
<b>Insgesamt</b>	41	32	73

---

Wären die Ergebnisse des CMM für die Therapieentscheidung berücksichtigt worden, wäre insgesamt ein Patient mehr therapiert worden. Bei diesem Patienten wurde eine 2 Wochen dauernde Virämie mit Viruslasten um  $10^2$  und  $10^3$  G/ml nachgewiesen. Im weiteren Verlauf kam es zu keiner Erkrankung.

### **3.3.5 Erstmalige Reaktivierungsereignisse im Vergleich**

Von insgesamt 73 Patienten hatten 41 sowohl in der in-house PCR als auch im CMM positive Resultate für HCMV gezeigt. Bei diesen Patienten wurde der Zeitpunkt der ersten positiven Blutprobe in beiden Nachweisverfahren bestimmt. In die Studie wurden nur Patienten einbezogen, bei denen neben der Viruslast der 1. positiven Blutprobe auch das letzte (noch) negative Ergebnis bestimmt worden war. Zwischen beiden Proben durfte die Zeitspanne nicht mehr als 14 Tage betragen. Traten bei Patienten weitere Virämien zu späteren Zeitpunkten auf, wurden diese in die Untersuchung zusätzlich einbezogen.

Insgesamt wurden 34 virämische Episoden von 30 Patienten ausgewertet (Tabelle 26). Da bei 8 Patienten ein vorangehendes negatives Ergebnis fehlte, und bei 3 Patienten ein zu grosses Zeitintervall zwischen beiden Proben bestand, wurden 11 Patienten von der Untersuchung ausgeschlossen. Die Zeitspanne bis zur erstmaligen Reaktivierung war zwischen beiden Testverfahren vergleichbar (Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test,  $p=0,06$ ).

**Tab. 26:** Zeitpunkt erstmaliger Reaktivierungen im Vergleich

[Tage nach KMT]

Patient	PCR	CMM	Krankheit	Art d. Krankheit
1	36	36	nein	
2	23	30	nein	
3	27	36	nein	
4.A	-90 *	-83 *	nein	
4.B	6	17	nein	
5.A	68	68	nein	
5.B	177	169	nein	
6	187	187	nein	
7	134	113	nein	
8	33	33	nein	
9	53	39	45	HCMV-IP
10	15	15	72	HCMV-IP
11	72	68	78	HCMV-IP
12	31	31	78	HCMV-IP
13	36	36	nein	
14	43	43	nein	
15.A	14	14	nein	
15.B	98	85	125	HCMV-IP
16	46	40	nein	
17	48	48	78	HCMV-Colitis
18	43	50	nein	
19	29	29	41	HCMV-IP
20	30	16	nein	
21.A	43	43	nein	
21.B	118	118	nein	
22	34	34	nein	
23	50	39	nein	
24	41	41	nein	
25	41	41	nein	
26	36	36	nein	
27	29	29	nein	
28	23	8	14	HCMV-IP
29	25	25	32	HCMV-IP
30	30	21	185	HCMV-IP
Mittelwert	47,9	45,7	74,8	
Median	36	36	75	
Spannweite	-90 bis 187	-83 bis 187	14 bis 125	

\*Anmerkung: Negative Werte bedeuten in diesem Fall Tage **vor** KMT

---

### 3.3.6 Therapiesteuerung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Eignung des CMM zur Steuerung antiviraler Therapien untersucht. Dabei wurden hier nur die Patienten eingeschlossen, die während einer Therapie nach initial positiven Resultaten auch ein HCMV-Clearing zeigten. Ausserdem durfte die Zeitspanne zwischen dem letzten positiven und dem ersten negativen Ergebnis nicht mehr als 14 Tage betragen. Zusätzliche antivirale Therapien zu späteren Zeitpunkten wurden ebenfalls beurteilt.

Insgesamt wurden 27 Therapiezyklen von 23 Patienten analysiert (Tabelle 27). Dabei mussten 18 Patienten von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da 7 Patienten bis zu ihrem Tod virämisch waren, 4 Patienten eine zu grosse Zeitspanne aufwiesen, und 7 Patienten im gesamten Beobachtungszeitraum PCR-positiv blieben.

Die Tabelle 27 zeigt, dass eine antivirale Therapie auf Grundlage der in-house PCR durchschnittlich 39,74 (Median 37, Spannweite -83 bis 115) Tage nach Transplantation eingeleitet wurde.

Betrachtet man nun die Zeitdauer bis zum ersten negativen Testergebnis wird deutlich, dass unter antiviraler Therapie die in-house PCR nach 33,11 (Median 24, Spannbreite 5 bis 210) Tagen, der CMM hingegen erst nach 34,19 (Median 30, Spannweite 5 bis 210) Tagen Therapie negativ wurde. Der CMM blieb somit durchschnittlich einen Tag (im Median 6 Tage) länger positiv als unsere in-house PCR (Wilcoxon-matched pairs signed ranks Test,  $p=0,266$ ).

**Tab. 27:** Zeitspanne bis zum 1. negativen Testergebnis nach Therapiebeginn

[Tage nach Transplantation]

Patient	Therapiebeginn	1. negative PCR	Differenz	1. negativer CMM	Differenz
1	46	48	2	55	9
2	20	230	210	230	210
3	37	54	17	54	17
4	36	41	5	41	5
5.A	-83 *	-40 *	43	-40 *	43
5.B	7	44	37	44	37
6	21	53	32	53	32
7	76	92	16	92	16
8	32	56	24	66	34
9	74	86	12	86	12
10	31	79	48	79	48
11	45	65	20	65	20
12	34	50	16	50	16
13	26	62	36	62	36
14.A	49	74	25	86	37
14.B	79	88	9	99	20
15	46	76	30	76	30
16	48	70	32	70	32
17.A	29	71	42	64	35
17.B	78	133	55	139	61
18	30	44	14	44	14
19.A	31	62	31	62	31
19.B	115	133	18	133	18
20	52	61	9	59	7
21	43	50	7	50	7
22	21	36	15	36	15
23	50	139	89	131	81
Mittelwert	39,74	72,48	33,11	73,56	34,19
Median	37	62	24	64	30
Spannweite	-83 bis 115	-40 bis 230	5 bis 210	-40 bis -230	5 bis 210

\*Anmerkung: Negative Werte bedeuten in diesem Fall Tage vor KMT

---

### 3.3.7 Proben (Bestimmung aus Vollblut)

Bei 50 Proben wurde parallel eine HCMV-Bestimmung aus Plasma und Vollblut (Leukozyten) mittels CMM durchgeführt (Tabelle 28).

**Tab. 28:** Ergebnisse der Parallelbestimmungen aus Plasma und Leukozyten

<b>HCMV-Assay Ergebnisse</b>	<b>CMM (Leukozyten) positiv</b>	<b>CMM (Leukozyten) negativ</b>	<b>Summe</b>
<b>CMM (Plasma) positiv</b>	10	1	11
<b>CMM (Plasma) negativ</b>	7	32	39
<b>Summe</b>	17	33	50

Von 11 Plasma-positiven Proben waren 10 (90,9%) zusätzlich Leukozyten-positiv. 17 Proben aus Leukozyten waren positiv, von denen 10 Proben aus Plasma (58,8%) positiv ausfielen. Bei 7 Proben mit positivem Leukozyten-, aber negativem Plasma-Ergebnis zeigte die in-house PCR 5 (71,4%) positive und 2 (28,6%) negative Resultate.

Eine Blutprobe (3%) zeigte bei der Plasmabestimmung ein positives Resultat, während in Leukozyten keine HCMV-DNA detektiert werden konnte. Die Parallelbestimmung dieser Probe in der in-house PCR sowie eine CMM-Wiederholungsmessung (Plasma) mit neuer DNA-Extraktion fielen positiv aus. Die Ergebnisse der HCMV-Bestimmung aus Plasma und Leukozyten zeigten eine 84%ige Übereinstimmung (Mc-Nemar-Test,  $p=0,0703$ ).

Ein invalides Testresultat wurde bei 9 (15,25%) von 50 Proben festgestellt. In allen Fällen hatten die 2 Kontrollen [low copy (+) und high copy (++)] wie auch die anderen Proben des Laufs valide Resultate gezeigt. Bei allen 9 Proben war das ungültige Ergebnis wahrscheinlich durch eine Neutropenie kurz nach Transplantation verursacht worden. Um die laut Protokoll geforderte Anzahl von

---

4000 Leukozyten/ml zu gewährleisten, musste eine entsprechend grosse Blutmenge eingesetzt werden. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstands war aber das Sediment am Tubeboden so gross, dass eine Identifizierung des darin enthaltenen Pellets unmöglich war. Setzte man den gesamten Rückstand ein, kam es zu invaliden Resultaten.

## **3.4 Klinischer Vergleich**

Nachdem die Patientenproben mit beiden Nachweisverfahren auf eine HCMV-Infektion untersucht wurden, erfolgte eine Auswertung klinischer Daten aus den Patientenakten. Anschliessend wurden die erhobenen Daten mit den im CMM gemessenen Viruslasten verglichen.

### **3.4.1 Merkmale HCMV-infizierter Patienten**

#### **1. Symptomatische Patienten**

13 von 73 Patienten zeigten eine symptomatische HCMV-Infektion. Dabei erkrankten 10 Patienten an interstitieller Pneumonie, 1 Patient an HCMV-Kolitis, 1 Patient an HCMV-Hepatitis und 1 Patient an HCMV-Retinitis. 9 hatten sich einer KMT (4 familiär-allogen, 5 fremd-allogen), und 4 einer PBSCT (3 familiär-allogen, 1 fremd-allogen) unterzogen. 6 Patienten zeigten die Serokonstellation D+/R+, 7 Patienten D-/R+.

In der Posttransplantationsphase fielen 2 Patienten durch 2, 1 Patient durch 3 Virämien auf. 2 Ereignisse galten als voneinander unabhängig, wenn zwischen beiden eine Zeitspanne von mindestens 4 Wochen lag. In diesem Zeitraum musste ein wöchentliches HCMV-Screening durchgeführt worden sein, bei denen das Ergebnis jeweils negativ ausgefallen war. Der Zeitabstand zwischen 2 Ereignissen hatte durchschnittlich 7 (Spannweite 5-10) Wochen betragen.

---

## 2. Asymptomatische Patienten

In der Posttransplantationsphase fielen 28 Patienten durch eine asymptomatische HCMV-Infektion auf. Davon hatten sich 13 einer KMT (4 familiär-allogen, 9 fremd-allogen) und 15 einer PBSCT (11 familiär-allogen, 4 fremd-allogen) unterzogen. Die HCMV-Serologie war bei 20 Patienten D+/R+. 6 Patienten zeigten D-/R+ und 2 Patienten D+/R-.

### 3.4.2 Transplantationsmodalität und HCMV-Infektion

Bei 26 familiär-allogen und 18 fremd-allogen transplantierten Patienten wurde jeweils der Zeitpunkt der ersten HCMV-positiven Blutprobe bestimmt und sodann zwischen den beiden Patientengruppen verglichen. Auf diese Weise sollte der Einfluss der Transplantationsmodalität auf den Zeitpunkt der HCMV-Infektion untersucht werden. In der Gruppe der familiär-allogen transplantierten Patienten konnte durchschnittlich nach 71,12 (Median 43 [Spannweite 6-199]) Tagen die erste Episode einer HCMV-Virämie beobachtet werden. Dagegen wurde bei Patienten, die sich einer fremd-allogenen Transplantation unterzogen hatten, durchschnittlich nach 38,78 (Median 29,5 [Spannweite 8-99] Tagen HCMV-DNA im Blut festgestellt. Dieser Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch auffällig (U-Test für unverbundene Stichproben,  $p=0,0062$ ).

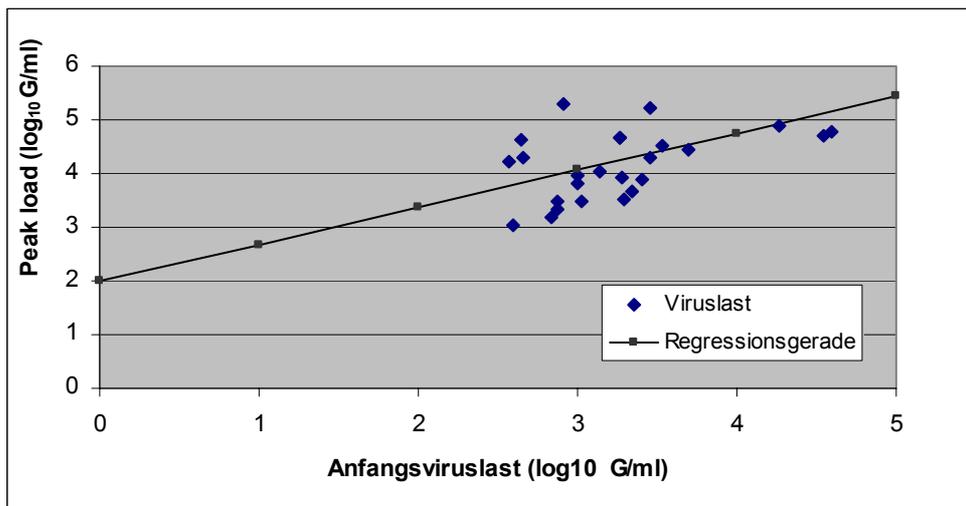
### 3.4.3 Kinetik der HCM-Viruslast

Auf der Suche nach Markern, die in der Posttransplantationsphase Hochrisikopatienten für HCMV-Erkrankungen identifizieren, wurden die Infektionsverläufe von 41 virämischen Patienten analysiert. Dazu wurde die mit dem CMM gemessene Viruslast der ersten positiven Blutprobe, die Wachstumsrate der Anfangsviruslast und die peak viral load aus den jeweiligen Patientenverläufen bestimmt. Mögliche Zusammenhänge zwischen klinischer Entwicklung (Erkrankung versus Nicht-Erkrankung) und Höhe der Viruslast wurden untersucht.

### 3.4.3.1 Anfangsviruslast als Prognoseparameter für die Maximalviruslast

Auf der Suche nach Prognosefaktoren für den individuellen Infektionsverlauf wurde analysiert, ob die Höhe der Anfangsviruslast Einfluss auf die Höhe der Maximalviruslast nimmt (Abbildung 5). Hierfür konnten nur Patienten gewertet werden, die unterschiedliche Initial- und Maximalviruslasten zeigten. Dieses Kriterium erfüllten 23 von 41 Patienten. Die gemessenen Anfangsviruslasten reichten von 0,53 bis 4,6  $\log_{10}$  G/ml bei einem Mittelwert von 3,26 (Median 3,27)  $\log_{10}$  G/ml. Dagegen zeigten die Maximalviruslasten eine Spannweite von 3,05 bis 5,29  $\log_{10}$  G/ml bei einem Mittelwert von 4,29 (Median: 4,24)  $\log_{10}$  G/ml.

**Abb. 5:** Korrelation zwischen Anfangs- und Maximalviruslast



Die Abbildung 5 zeigt eine positive Korrelation zwischen Anfangs- und peak viral load (Pearson-Korrelationskoeffizient=0,47). Dieser Unterschied ist statistisch auffällig (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben,  $p=0,0001$ ).

---

### **3.4.3.2 Anfangsviruslast**

Durch Vergleich der Anfangsviruslasten zwischen 28 asymptomatischen und 13 erkrankten Patienten wurde überprüft, ob die Höhe dieser Viruslast eine Prognose für den klinischen Verlauf einer HCMV-Infektion ermöglicht. Dabei konnten nur Patienten in die Untersuchung eingeschlossen werden, bei denen vor der ersten positiven noch die vorangehende negative Blutprobe bestimmt wurde. Zwischen beiden durfte der Zeitabstand nicht mehr als 14 Tage betragen. Diese Kriterien erfüllten 14 asymptomatische und 8 symptomatische Patienten.

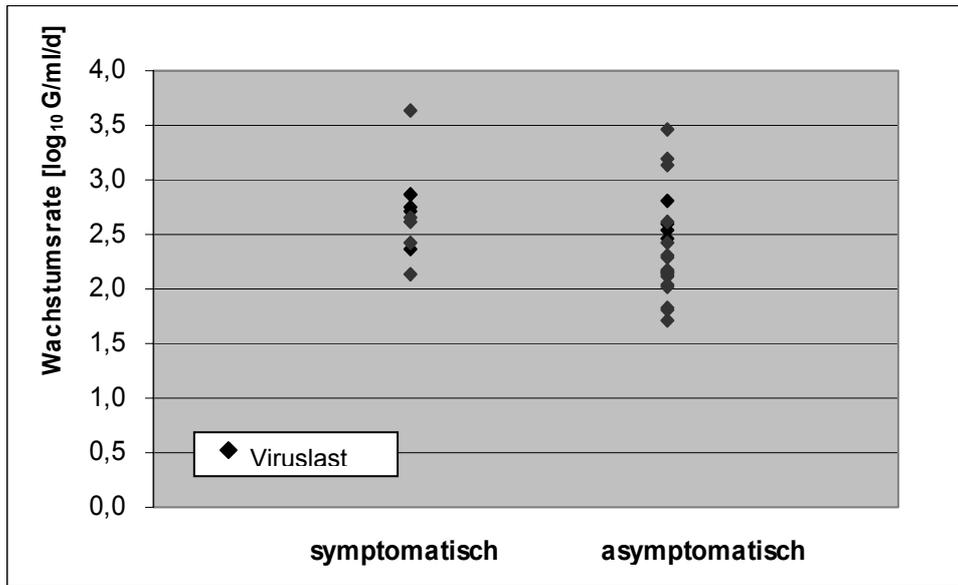
Die Initialviruslast der HCMV-erkrankten Patienten (Mittelwert 4,23, Median 3,50 [Spannweite 3,27-5,05  $\log_{10}$  G/ml]) zeigte vergleichbare Werte (U-Test,  $p=0,1741$ ) wie die der asymptomatisch Infizierten (Mittelwert 3,45, Median 3,18 [Spannweite 2,87-4,13])  $\log_{10}$  G/ml.

### **3.4.3.3 Anfangsviruslastwachstumsrate**

Da zwischen der Viruslast der ersten positiven Blutprobe und dem letzten (noch) negativen Ergebnis ein Zeitraum liegt, in welchem evtl. vorhandene Viruslasten unentdeckt bleiben, wurde eine Anfangsviruslastwachstumsrate bestimmt. In Anlehnung an Emery et al. (2000b) wurde diese berechnet, indem die Differenz zwischen der Initialviruslast und dem vorangehenden negativen Ergebnis gebildet und mit der Anzahl dazwischen liegender Tage dividiert wurde. Zur Berechnung der Wachstumsrate waren nur Proben mit einem Zeitintervall  $\leq 14$  Tage zulässig. So wurden 31 von 41 HCMV-infizierten Patienten in die Studie aufgenommen.

Die Wachstumsrate (Abbildung 6) von 21 Patienten mit asymptomatischer Infektion (Mittelwert 2,66, Median 2,29 [Spannweite: 1,71-3,45]  $\log_{10}$  G/ml/Tag) und 10 Patienten mit manifester Erkrankung (Mittelwert 2,92, Median 2,68 [Spannweite 2,14-3,63]  $\log_{10}$  G/ml/Tag) war statistisch auffällig (U-Test,  $p=0,0384$ ).

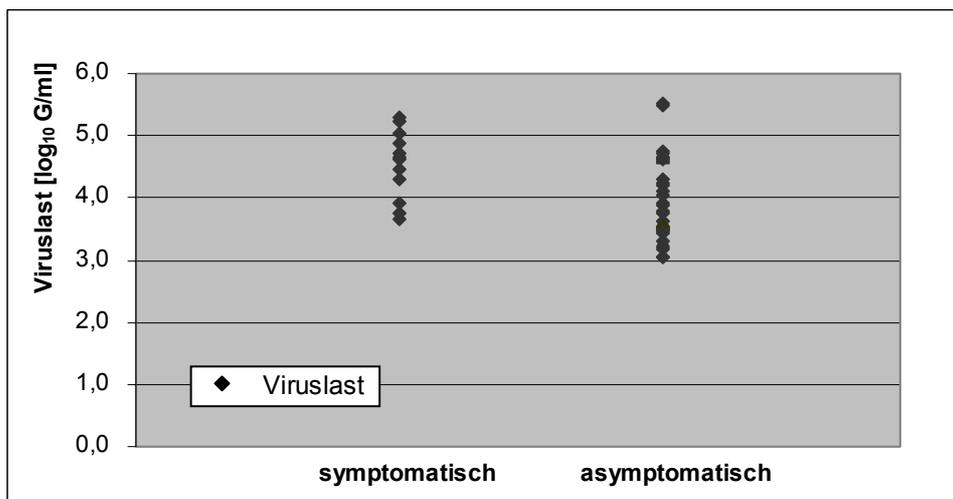
**Abb.6:** Wachstumsrate im Vergleich



#### 3.4.3.4 Maximalviruslast

Durch Vergleich der Maximalviruslast von HCMV-infizierten Patienten sollte überprüft werden, ob die Zahl der Krankheitserreger einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt. Zu diesem Zweck wurde die peak viral load von 12 symptomatischen sowie 32 asymptomatischen Patienten miteinander verglichen (Abbildung 7). Traten im Beobachtungszeitraum zusätzliche virämische Episoden auf, wurden sie in die Untersuchung eingeschlossen.

**Abb.7:** Peak viral load im Vergleich



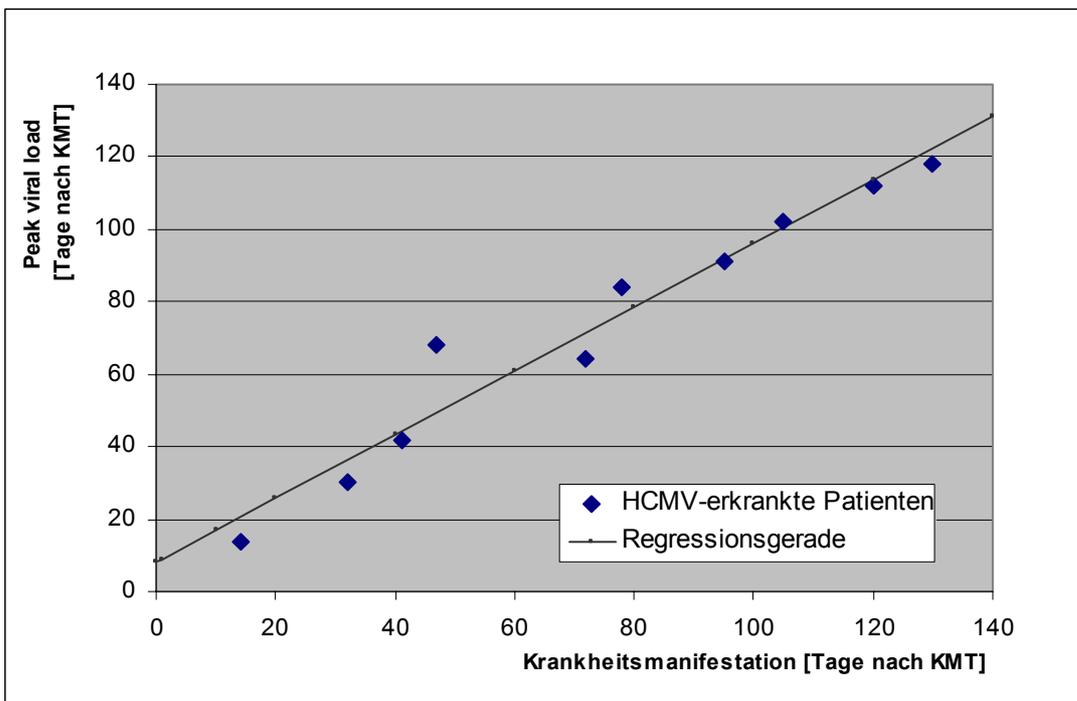
---

Statistisch auffällig (U-Test,  $p=0,0095$ ) war eine höhere peak viral load von 12 erkrankten Patienten (Mittelwert 4,80, Median 4,64 [Range 3,67- 5,29]  $\log_{10}$  G/ml) gegenüber 32 Patienten mit asymptomatischer Infektion (Mittelwert 4,55, Median 3,84 [Range 3,03- 5,53]  $\log_{10}$  G/ml).

### 3.4.3.5 Zeitintervall zwischen peak viral load und Erkrankung

Bei 10 von ursprünglich 13 HCMV-erkrankten Patienten konnte das exakte Zeitintervall zwischen Diagnosestellung und peak viral load bestimmt werden (Abbildung 8). Die Diagnose einer HCMV-Erkrankung wurde durchschnittlich 73,4 (Median 75 [Range 14-130]) Tage nach Transplantation gestellt, während die peak viral load im Mittel 76 (Median 84 [Range 14-118]) Tage nach Transplantation gemessen wurde.

**Abb.8:** Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Maximalviruslast



Die Abbildung 8 zeigt eine positive Korrelation zwischen Zeitpunkt der HCMV-Erkrankung und peak viral load (Pearson-Korrelationskoeffizient=0,97).

---

#### **3.4.3.6 Peak viral load und Virämiedauer**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Dauer einer virämischen Episode und ihrer peak viral load zu evaluieren, wurden 29 Patienten untersucht. Eingeschlossen wurden nur die Infektionsperioden, bei denen Beginn und Ende genau definiert werden konnten. Zwischen beiden Blutproben durfte das Zeitintervall nicht mehr als 14 Tage betragen.

Die Berechnung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten zwischen peak viral load und Virämiedauer ergab 0,79. Dieser Zusammenhang erwies sich als statistisch auffällig (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,0001$ ).

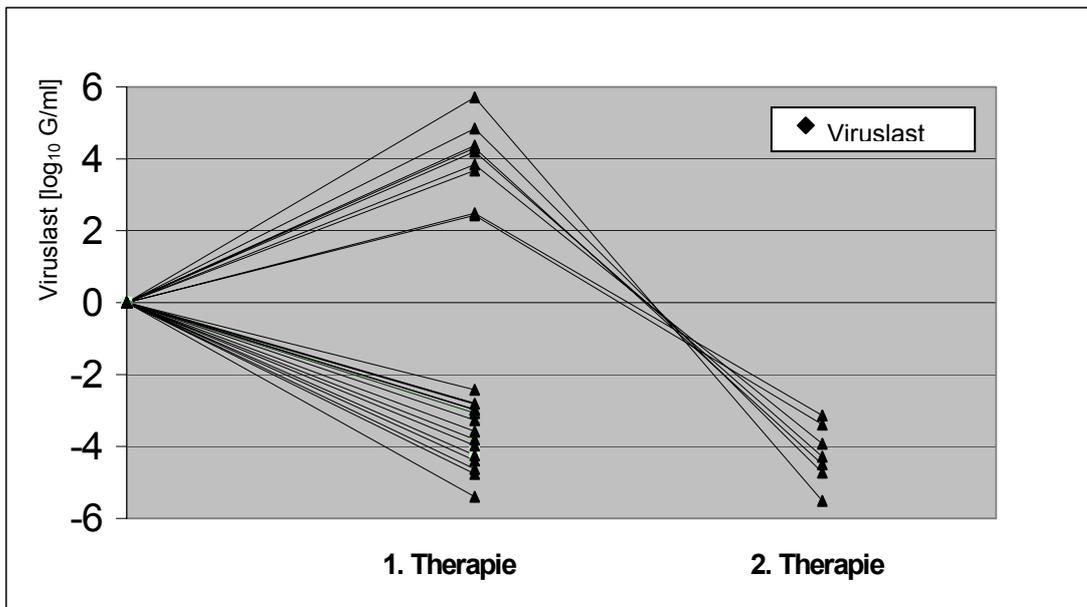
#### **3.4.3.7 Viruslast unter antiviraler Therapie**

Um den Behandlungserfolg nach einer antiviralen Therapie besser einschätzen zu können, wurden die Viruslasten HCMV-infizierter Patienten vor und nach einer 14-tägigen Therapie miteinander verglichen. Es konnten nur Patienten eingeschlossen werden, bei denen genau vor und nach Therapiebeginn die Viruslast bestimmt wurde. Diese Bedingung traf insgesamt für 29 Patienten zu, deren durchschnittliche Viruslast vor Therapiebeginn 3,72 (Median 3,70 [Range 2,63 - 5,53])  $\log_{10}$  G/ml betragen hatte. Von diesen zeigten 20 nach einer 14-tägigen Therapie eine Abnahme, 9 dagegen eine Zunahme der Viruslast (Abbildung 9). Durchschnittlich verkleinerte sich die Viruslast um -1,31 (95% KI:  $\pm 1,35$ ) (Median -3,16 [Spannweite: -5,4 bis +5,71])  $\log_{10}$  G/ml. Pro Tag bedeutete dies eine Viruslastabnahme um -0,09 (95% KI:  $\pm 0,1$ ; Median -0,23 [Spannweite -0,39 bis +0,41])  $\log_{10}$  G/ml (Wilcoxon-matched pairs signed ranks-Test,  $p=0,263$ ).

Bei 9 Patienten mit einer Viruslastzunahme trotz antiviraler Medikation wurde die Viruslast nach einer weiteren 14-tägigen Therapie untersucht. Bei einer Ausgangsviruslast von durchschnittlich 4,19 (Median 4,28 [Spannweite 3,76-5,57])  $\log_{10}$  G/ml, zeigten nun 7 Patienten eine Abnahme, während 2 Patienten in diesem Zeitraum an einer HCMV-IP und an Leberversagen verstarben (Abbildung 9). Durchschnittlich verringerte sich die Viruslast der verbliebenen 7

Patienten bei der 2. Therapie um -4,21 (95% KI:  $\pm 0,60$ ) (Median -4,28 [Spannweite -3,14 bis -5,57])  $\log_{10}$  G/ml (Wilcoxon-matched pairs signed-ranks-Test,  $p=1,000$ ).

**Abb.9:** Viruslast unter antiviraler Therapie



Im zweiten Teil unserer Analyse beobachteten wir Non-Responder mit persistierend hohen Viruslasten unter antiviraler Therapie (Tabelle 29). Auf diese Weise sollte die Frage geklärt werden, ob diese Patienten einem grösseren Risiko für die Entwicklung von HCMV-Krankheiten ausgesetzt sind.

**Tab. 29:** HCMV-Erkrankungen bei fehlender Virusclearance

Clearance	Erkrankung		Summe
	ja	nein	
ja	2	24	26
nein	6	3	9
Summe	8	27	35

Das relative Risiko berechnet sich aus:  $(6/9) / (2/26) = 8,67$ .

---

Demzufolge sind bei Patienten ohne Viruseliminierung unter Therapie 8,67mal häufiger HCMV-Erkrankungen aufgetreten als bei Patienten mit Clearing.

### 3.4.3.8 Steroideinfluss auf die Viruslast

Immunsupprimierte Patienten sind mehrere Monate einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen wie dem HCMV ausgesetzt. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Infektionsverläufe von 38 HSCT-transplantierten Patienten nach einer Steroidtherapie (unabhängig von der verabreichten Dosis) untersucht. Dazu wurden die im CMM gemessenen Viruslasten vor und 7 Tage nach Therapiebeginn miteinander verglichen.

Die Erhöhung der Viruslast 7 Tage nach Therapiebeginn war dabei statistisch auffällig (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,0001$ ).

### 3.4.3.9 HCMV als Risikofaktor für weitere Infektionen

33 HCMV-infizierte Patienten wurden auf nicht-virale opportunistische Infektionen (fungal, bakteriell) untersucht (Tabelle 30). Dabei wurden nur Patienten mit übereinstimmenden Ergebnissen der in-house PCR sowie des CMMs in die Untersuchung eingeschlossen.

**Tab. 30:** HCMV und opportunistische Infektionen

Opportun. Infektion	HCMV-Infektion		Summe
	ja	nein	
ja	18	4	22
nein	6	5	11
Summe	24	9	33

---

Im Chi-Quadrat-Test zeigten Patienten mit HCMV-Infektion kein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen ( $p=0,12$ ). Insgesamt litten 71,4% ( $n=20$ ) an einer fungalen, 28,6% ( $n=8$ ) Patienten an einer bakteriellen Infektion.

Das relative Risiko berechnet sich aus  $(18/24) : (4/9) = 1,68$ . Demnach haben HCMV-infizierte Patienten ein 1,68fach erhöhtes Risiko für eine opportunistische Infektion.

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Stand der Forschung

Trotz bedeutender Fortschritte in der Diagnostik, der Prophylaxe und der Therapie auf dem Gebiet der HCMV-Infektion zählt sie zu den wichtigsten Ursachen für infektbedingte Komplikationen und Tod nach allogener Stammzelltransplantation (Meyers et al., 1986). Auch unter Kombinationstherapien aus Ganciclovir und Hochdosisimmunglobulinen führen symptomatische HCMV-Infektionen immer noch zu einer hohen Mortalitätsrate. Dies gilt insbesondere für die interstitielle Pneumonie (Ljungman et al., 1992). Vor Ausbruch der HCMV-Krankheit muss daher bei Hochrisikopatienten eine virostatische Therapie eingeleitet werden. So können Häufigkeit und Schwere der Erkrankung reduziert werden (Dunn et al., 1991).

Aus diesem Grund wurden in den vergangenen Jahren neue Verfahren entwickelt, die eine frühe, schnelle und sensitive Diagnostik der HCMV-Infektion ermöglichen. Dabei erwiesen sich v.a. die PCR und Antigenämie-Assays als besonders geeignet, da sie eine HCMV-Infektion signifikant früher als herkömmliche Methoden nachweisen konnten. So wurde das Zeitalter der präemptiven Therapie eingeläutet (Boeckh et al., 1992; Einsele et al., 1991).

Mit Einführung potent wirksamer Virostatika begann die Ära der antiviralen Chemoprophylaxe. Bei dieser Behandlungsstrategie werden alle Patienten mit Risikokonstellation für eine HCMV-Erkrankung ab Engraftment bis zum Tag 100 nach Transplantation antiviral behandelt. Die Wahl des geeigneten Virostatikums ist bis heute Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ältere Studien vermochten zwar einen Benefit Acyclovir-behandelter Patienten nachzuweisen, im Vergleich zu Ganciclovir erwies es sich jedoch als schwächer wirksam (Meyers et al., 1988; Prentice et al., 1994).

---

Die erhöhte Wirksamkeit der Ganciclovirprophylaxe führte zu einer signifikanten Senkung der HCMV-Infektionen und -Erkrankungen, ein Überlebensvorteil konnte jedoch auch mit diesem Medikament nicht erzielt werden (Goodrich et al., 1993; Winston et al., 1993). Aufgrund der Hämatotoxizität von Ganciclovir kam es zu sekundären Neutropenien, die in einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen mündeten (Salzberger et al., 1997). Zudem wird der Ganciclovirprophylaxe eine verspätete Stimulierung spezifischer zytotoxischer T-Zellen zugeschrieben. Dies ermöglicht den Ausbruch interstitieller Pneumonien noch Jahre nach einer Stammzelltransplantation (Li et al., 1994; de Medeiros et al., 2000; Peggs et al., 2000).

Eine Prophylaxe mit Foscarnet wurde in einer Studie von Ordemann et al. (2000) an stammzelltransplantierten Patienten untersucht. Dabei zeigten 81% der Patienten Nebenwirkungen wie gastrointestinale Störungen, starke Kopfschmerzen und Urethritis. Dies hatte bei 38% der behandelten Patienten eine Dosisreduktion zur Folge, bei 28,5% gar einen Therapieabbruch. Trotz Foscarnet-Einnahme wurde eine Infektionsrate von 23,8% und damit ein insgesamt schlechter Therapieerfolg erzielt.

Eine generelle Prophylaxe aller Patienten ist aufgrund schwerer Nebenwirkungen und Risiken also nicht zu empfehlen (Boeckh et al., 1996): Aufgrund einer Erkrankungsrate von 30% der Hochrisikopatienten (Trenschel et al., 2000), hätte dies zudem eine Übertherapie von 70% der Behandelten zur Folge (Boeckh et al., 1994b).

Diese Nachteile der Prophylaxe lenkten das Augenmerk verstärkt auf die präemptive Therapie mit Ganciclovir. Darunter versteht man einen Therapiebeginn beim Nachweis einer HCMV-Infektion mittels sensitiver Methoden wie der PCR oder des Antigenämie-Assays (Einsele et al., 1995; Ljungmann et al., 1996). Befürworter dieser Strategie argumentieren mit einer signifikanten Reduktion der HCMV-Erkrankung und transplantationsbedingten Mortalität vor dem Tag 100 (early onset) (Einsele et al., 1995). Niedrigere

---

Kosten, seltener auftretende Neutropenien und nicht-virale opportunistische Infektionen gelten als weitere Vorteile.

Demgegenüber ist aber bei einer langfristigen (> 4 Wochen) Frühintervention ein signifikant erhöhtes Risiko für HCMV-Erkrankungen (late onset) und nicht-virale opportunistische Infektionen nach Tag 100 zu verzeichnen (Einsele et al., 2000).

Diese Ergebnisse wurden von Machado et al. (2000) bestätigt: Nach Substitution der Prophylaxe durch die präemptive Therapie beobachteten sie eine Verschiebung der interstitiellen Pneumonie von Tag 55 auf 92 nach Transplantation.

Reusser et al. (2002) zeigten für präemptiv eingesetztes Foscarnet die gleiche Wirksamkeit wie Ganciclovir. Dabei traten aber in der Foscarnet-behandelten Gruppe signifikant weniger Nebenwirkungen wie Neutropenie ( $p=0,04$ ) auf. Die Zahl der Therapieabbrüche war dadurch signifikant geringer ( $p=0,03$ ). Ob Foscarnet aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofils Ganciclovir zukünftig aus der präemptiven Therapie verdrängen wird, kann momentan nicht beantwortet werden.

Nach heutigem Wissensstand spielt die zelluläre Immunantwort eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Virusinfektion (Riddell et al., 1992). Da schwere Krankheitsverläufe nach einer HCMV-Infektion fast ausschliesslich bei Patienten mit gestörter Immunität auftreten, wurden neue Strategien auf dem Gebiet der adoptiven T-Zellimmuntherapie entwickelt (Walter et al., 1995). Jüngste Studien zeigen erfolgversprechende Ergebnisse bei der Kontrolle und Viruseliminierung der HCMV-Infektionen (Einsele et al., 2002).

Die klinische Notwendigkeit einer wirksamen Prävention der HCMV-Erkrankung ist aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität bei stammzelltransplantierten Patienten unumstritten. Dennoch besteht bis heute kein Konsens hinsichtlich der optimalen Prävention. In vielen Zentren wird eine präemptive Therapie durchgeführt, da die Zahl der behandelten Patienten bei zufriedenstellender

---

Erkennungsrate deutlich gesenkt werden konnte. Heute werden meist der pp65-Antigenämie-Assay oder die DNA-PCR aufgrund ihrer hohen Sensitivität als Grundlage für die antivirale Frühintervention verwendet (Avery et al., 2000). Die hohe Sensitivität bedingt allerdings eine niedrigere Spezifität. Dadurch werden einigen Patienten HCMV-Infektionen nachgewiesen, die nie an HCMV erkranken.

Aus diesem Grund werden neue Verfahren evaluiert, die den positiv prädiktiven Wert der bisherigen Methoden verbessern sollen. Das Ziel ist eine Selektion der Risikopatienten sowie eine Reduktion der Übertherapien.

Besonders geeignet scheinen dabei die Bestimmung der mRNA (Greijer et al. 2001; Oldenburg et al., 2000; Witt et al., 2000) und eine DNA-Quantifizierung (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) zu sein.

Das kommerziell erhältliche CMM Testsystem ist ein gut etabliertes und standardisiertes Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Durch Messung der DNA-Menge können Anhaltspunkte auf die Virusreplikation und Virusaktivität gegeben werden. So erhält der behandelnde Arzt bessere Hilfestellungen bei der Therapiesteuerung.

Untersucht wurde in dieser Studie die Eignung des neuen Nachweisverfahrens, eine präemptive Therapie bei Stammzelltransplantierten zu initiieren bzw. eine laufende Therapie zu überwachen.

## **4.2 Routinediagnostik**

Um die Eignung des CMM für die Routinediagnostik beurteilen zu können, wurden seine Eigenschaften herkömmlichen Nachweisverfahren für HCMV gegenübergestellt.

Die Strategie einer präemptive Frühtherapie auf Grundlage einer konventionellen oder Kurzzeit-Kultur ist inzwischen weitgehend aufgegeben worden. So konnten verschiedene Studien belegen, dass sie bei 12-13% der Patienten erst zeitgleich mit der Manifestation der HCMV-Erkrankung oder erst

---

zu späteren Zeitpunkten positiv wurde. Dadurch kam es bei dieser Patientengruppe zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate (Einsele et al., 1993; Einsele et al., 1995; Goodrich et al., 1993; Winston et al., 1993).

Der pp65-Antigenämie-Test hat einige im klinischen Alltag nachteilige Eigenschaften. Für eine optimale Sensitivität muss innerhalb von 3 Stunden nach Blutabnahme mit dem Nachweisverfahren begonnen werden (Boeckh et al., 1994a), da bereits nach 6 Stunden die Anzahl der nachzuweisenden viralen Antigene um 80% reduziert ist (Gerna et al., 1992; Thé et al., 1992).

Vor dem Engraftment ist dieser Test aufgrund der niedrigen Leukozytenzahl häufig nicht möglich (Machida et al., 2000; Masaoka et al., 2001). Einige Untersucher halten daher molekularbiologische Nachweismethoden bei stammzelltransplantierten Patienten für besser geeignet (Halwachs-Baumann et al., 2001). Andere lehnen Antigenämie-Tests bei dieser Patientengruppe entschieden ab (Preiser et al., 2001).

Weitere Nachteile dieser Methode liegen in einem hohen Arbeitsaufwand (ca. 2 Stunden/Ansatz), der diesen Assay erst bei regelmässiger Untersuchung grösserer Probenvolumina sinnvoll macht. Dieser Arbeitsaufwand birgt hohe Kosten (van der Meer et al., 1996). Die subjektive Interpretation der Testergebnisse durch Auszählung pp65-positiver Zellen bedingt zudem eine unzureichende Standardisierung des Tests (Landry et al., 1995).

Die Vorteile dieser Methode liegen in der Durchführbarkeit mit in jedem zytologischen Labor vorhandenen Geräten (Mikroskop, Zytocentrifuge). Testergebnisse liegen innerhalb von 6 Stunden vor.

Verglichen mit unserer in-house PCR zeigt der CMM eine schnelle und leichte Durchführung bei guter Standardisierung. Der geringe Zeit- und Arbeitsaufwand ermöglichen erste Testergebnisse innerhalb von 6 Stunden.

Da die meisten der in klinischen Studien verwendeten PCR-Assays (aus Plasma, Leukozyten oder Vollblut) lokal entwickelt wurden (Cope et al., 1997a; Roberts et al., 1998), ist diese Methode nur unzureichend standardisiert. Dies

---

erschwert den Vergleich von Studienergebnissen verschiedener Zentren. Generelle Aussagen über den klinischen Nutzen dieses Tests sind daher nur unter Vorbehalt möglich (Boivin et al., 2000; Grundy et al., 1996).

Insgesamt stellt der CMM dank seiner Testeigenschaften ein im Klinikalltag sehr gut geeignetes Verfahren dar. Aufgrund einer unproblematischen Probengewinnung, einem gering einzusetzenden Probenvolumen (200µl) und einer einfachen Durchführbarkeit, handelt es sich um eine anwenderfreundliche Methode. Da Plasma als Ausgangsmaterial eingesetzt wird, ist auch eine Untersuchung in Neutropenie möglich (Masaoka et al., 2001).

Die Automatisierung des CMM, die einen hohen Probendurchsatz und eine hohe Wirtschaftlichkeit gewährleistet, zählt ebenso wie die niedrige Zahl an invaliden Testergebnissen (5 von 1081 Proben entsprechend 0,46% bei Extraktion aus Plasma) zu weiteren Vorteilen.

Unter der Bedingung, dass eine Zentrifugation des Vollbluts innerhalb von 24 Stunden nach Blutabnahme erfolgt, sind die Proben bis 5 Tage (2 bis 8 °C bzw. –20 bis –80 °C) haltbar. Dies ermöglicht eine grössere Flexibilität in der Probenverarbeitung.

Der Hauptvorteil des CMM liegt in seiner Standardisierung. Durch Multicenter-Studien könnten zukünftig neue antivirale Strategien oder neue antivirale Chemotherapeutika evaluiert werden. In der Zwischenzeit liegen bereits erste Untersuchungen über Viruslasten vor, bei denen eine präemptive Therapie eingeleitet werden soll. So wurden 1000 G/ml für stammzelltransplantierte Patienten vorgeschlagen (Quamruddin et al., 2001). Bei Organtransplantierten wird der Cut off dagegen wesentlich höher angesetzt: Er reicht von 2000-5000 G/ml (Caliendo et al., 2002) bis 130000 G/ml (Aitken et al., 1999).

### **4.3 Detektion**

Eine ideale Nachweismethode vereint die Eigenschaften einer hohen Sensitivität, Spezifität, Kosteneffektivität sowie einer leichten und schnellen Durchführbarkeit.

---

Aufgrund der hohen Sensitivität der in-house PCR wird sie an vielen Zentren wie auch am UKT für den Nachweis einer HCMV-Infektion bei stammzelltransplantierten Patienten eingesetzt. Der in dieser Arbeit verwendete CMM wurde daher mit der in-house PCR unseres Hauses verglichen.

Bei der paarweisen Gegenüberstellung der Resultate von in-house PCR und CMM (Plasma) zeigte sich eine weitgehende Konkordanz. So lag der Grad der Übereinstimmung bei Proben aus prospektiven Patientenverläufen bei 89,4% ( $p=0,0003$ ) gegenüber retrospektiven Verläufen mit 84% ( $p<0,0001$ ).

Auch der Vergleich auf Patientenebene zeigte einen hohen Grad an Übereinstimmung (89,04%). Basierend auf dem CMM wären 42 von 73 Patienten antiviral behandelt worden. Verglichen mit unserer in-house PCR hätte somit ohne einen Cut off für eine Frühintervention ein Patient mehr eine Therapie erhalten. Da dieser Patient aber nur niedrige Viruslasten zeigte ( $< 3000$  G/ml), wäre eine Therapie bei einem festgelegten Cut off fraglich gewesen.

Diese Resultate lassen auf eine Eignung des CMM in der präemptiven Therapie wie auch als Bestätigungstest nach einer sensitiveren in-house PCR schliessen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erfahrungen anderer Autoren mit vergleichbaren Untersuchungen überein (Caliendo et al., 2000; Caliendo et al., 2002; Flexman et al., 2001; Masaoka et al., 2001; Piiparinen et al., 2001).

Bei der paarweisen Gegenüberstellung von Plasma- und Leukozyten-Bestimmungen im CMM zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung in 84% übereinstimmende Ergebnisse. Jedoch erreichten sie kein statistisch signifikantes Niveau ( $p=0,0703$ ). Die höhere Sensitivität des CMM aus Leukozyten ist mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar (Boivin et al., 2000; Gerna et al., 1991; Nolte et al., 1995; Sia et al., 2000a; Woo et al., 1997).

Auch wenn die PCR aus Leukozyten HCMV-Infektionen früher nachweisen kann (Gerna et al., 1991; Nolte et al., 1995), korreliert sie aufgrund einer

---

niedrigen Spezifität nicht immer mit einer aktiven Virusreplikation (Gerna et al., 1991; Koehler et al., 1997; Tanabe et al., 1997). Im Vergleich zur PCR aus Leukozyten oder Vollblut scheint die Plasma-PCR besser mit einer HCMV-Erkrankung zu korrelieren (Mori et al., 2002; Spector et al., 1995; Wolf et al., 1993). In der Vergangenheit wurden dabei zahlreiche Hypothesen formuliert, um die Anwesenheit von Virus-DNA in Plasma zu erklären. Einige Autoren vermuten eine zellfreie Virusvermehrung als Ausbreitungsform. Die Detektion von pp65 in PBLs wäre dabei durch eine Phagozytose des zellfreien Virus durch zirkulierende Leukozyten (Spector et al., 1992; Wolf et al., 1991) oder durch eine direkte Infektion der Leukozyten erklärbar. Andere Autoren gehen von einer Lyse HCMV-infizierter Zellen wie Leukozyten und Endothelzellen aus (Boeckh et al., 1997; Gerna et al., 1994).

Trotz einer höheren Sensitivität, früheren Positivität und Negativität unter Therapie (Boivin et al., 2000) ist ein Virusnachweis aus Leukozyten mittels CMM bei stammzelltransplantierten Patienten ungeeignet. Gründe hierfür liegen in einer drohenden Übertherapie und einer mangelnden Einsatzfähigkeit in der neutropenischen Phase nach Transplantation. In der vorliegenden Studie zeigten 15,25% aller Proben aus Leukozyten (versus 0,46% aus Plasma) nicht valide Ergebnisse. Alle Proben stammten aus der neutropenischen Phase.

Ein weiterer Nachteil des CMM aus Leukozyten (CMML) ist das häufige Auftreten von sporadischen, nicht konsekutiv positiven Ergebnissen (5/11 bei CMML versus 3/76 bei CMM aus Plasma). Diese Beobachtung wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Gozlan et al., 1996; Tong et al., 1998; Yuen et al., 1995) und scheint das Ergebnis von Kontaminationen, Fluktuationen der Virusreplikation oder einer Viruslast nahe der Detektionsschwelle des Tests zu sein. Daher ist bei positiven Ergebnissen im CMM(L) verglichen mit dem CMM aus Plasma ein Bestätigungstest notwendig (Tong et al., 1998).

Die Spezifitätsbestimmung ist bei einem Methodenvergleich wie diesem schwierig, da unsere in-house PCR als Vergleichssystem keine reelle Bezugsgröße darstellt. Zur Spezifitätsbestimmung wurden 13 HCMV-

---

seronegative Patienten, die Stammzellen von HCMV-negativen Spendern erhielten, in die Studie eingeschlossen. Aufgrund einer fehlenden Primärinfektion ist eine HCMV-Reaktivierung dieser Patienten unmöglich. Eine Neuinfektion im Beobachtungszeitraum wäre prinzipiell zwar möglich, ist aber sehr unwahrscheinlich.

Insgesamt standen von den 13 Patienten 113 Proben zur Verfügung. In unserer in-house PCR zeigten 2 Proben ein positives Ergebnis, während der CMM alle 113 Proben negativ testete. Daraus ergibt sich eine Spezifität von 100% für den CMM (95%-KI: 93,8-100%) und von 100% für unsere in-house PCR (95%-KI: 96,8-99,8%). Diese Ergebnisse stimmen mit den Erfahrungen anderer Autoren überein. So führten Caliendo et al. (2000) eine Untersuchung an 100 HCMV-seropositiven und -negativen gesunden Blutspendern durch. Da alle Proben im CMM negativ getestet wurden, resultierte daraus eine Spezifität von 100%. Auch andere Untersucher dokumentierten eine 100%ige Spezifität für den CMM (Pellegrin et al., 1999; Tong et al., 1998).

Die beim CMM festgelegte Detektionsschwelle von 400 G/ml scheint ein sinnvoller Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität zu sein. In der vorliegenden Studie zeigten 8 Patienten zu 8 Zeitpunkten Viruslasten unter 400 G/ml, erkrankten jedoch nicht. Zu diesem Ergebnis kamen auch Caliendo et al. (2000).

Durch den Vergleich der Resultate beider Nachweisverfahren sollte analysiert werden, ob die semiquantitative Einstufung unserer in-house PCR mit den quantitativen Ergebnissen des CMM korreliert. Zu diesem Zweck wurden 71 Proben (Plasma), die in beiden Testsystemen ein positives Ergebnis gezeigt hatten, miteinander verglichen. Dabei zeigten in der in-house PCR mittel- („++“) und hochgradig („+++“) positive Proben statistisch auffällig ( $p < 0,01$ ) höhere Viruslasten im CMM als Proben, die nur als einfach positiv („+“) bewertet wurden.

Auch Caliendo et al. (2000) beobachteten eine hohe Korrelation zwischen der Anzahl positiver Zellen im Antigenämie-Test und der Viruslast im CMM.

---

Zahlreiche Studien haben den CMM mit anderen standardisierten quantitativen Nachweismethoden verglichen. So konnten Razonable et al. (2001) und Schaade et al. (2000) eine hohe Korrelation zwischen dem CMM und dem LightCycler von Roche feststellen. Auch Vergleiche zwischen dem Murex Hybrid Capture CMV DNA Assay 2.0 (Aitken et al., 1999; Barrett-Miur et al., 2000; Preiser et al., 2001) sowie dem Quantiplex CMV bDNA 2.0 (Pellegrin et al., 1999) mit dem CMM lieferten hochgradige Übereinstimmungen. Bei niedrigen Viruslasten war die Konkordanz zwischen den Methoden jedoch geringer. Da sich stammzell- gegenüber organtransplantierten Patienten durch niedrigere Viruslasten auszeichnen, ist dieses Phänomen v.a. für diese Patientengruppe klinisch relevant. Weitere Untersuchungen solcher Diagnostikschemas unter Einschluss der o.g. quantitativen Nachweismethoden lässt auf eine weitere Verbesserung der präemptiven Therapie hoffen.

#### **4.4 Detektionszeitpunkt**

Ein wichtiges Testkriterium ist die Frage, wie früh eine Infektion angezeigt wird. Daher wurde diese Eigenschaft in der Beurteilung des CMM eingeschlossen. In der vorliegenden Arbeit war der Detektionszeitpunkt beider Nachweisverfahren vergleichbar (CMM durchschnittlich 45,7 Tage nach Transplantation versus in-house PCR nach 47,9 Tagen;  $p=0,06$ ).

Ähnliche Erfahrungen machten Caliendo et al. (2000), die von einer guten zeitlichen Übereinstimmung zwischen Antigenämie-Assays und dem CMM berichten.

Untersuchungen an HIV-Patienten zeigen, dass Infektionen mittels CMM 46 (Pellegrin et al., 1999) bzw. 48 Tage (Boivin et al., 1998b) vor einer HCMV-Erkrankung nachgewiesen werden konnten, während bei solid Organtransplantierten eine erste positive Blutprobe 12,5 Tage vor der Krankheitsmanifestation dokumentiert wurde (Aitken et al., 1999).

In einer weiteren (Multicenter-) Studie an organ- und stammzelltransplantierten Patienten wurden die jeweilig routinemässig durchgeführten in-house Tests mit

---

dem CMM verglichen. Es stellte sich heraus, dass sensitivere in-house Assays (aus Leukozyten) aktive HCMV-Infektionen früher und/oder häufiger als der CMM detektieren konnten. War die Sensitivität der Methoden aber vergleichbar, erfolgte der Nachweis simultan (von Müller et al., 2002).

Obwohl der CMM aus Plasma gegenüber Nachweismethoden aus Leukozyten später positiv wird, scheinen die HCMV-Infektionen dennoch früh genug nachgewiesen zu werden. Dem Behandelnden wird somit ausreichend Spielraum eingeräumt, eine Therapie einzuleiten, ohne aber die Patienten durch Übertherapien unnötigen Risiken auszusetzen.

Besondere Beachtung verdient in dieser Studie ein Fall, in dem nur der CMM eine HCMV-Infektion nachweisen konnte. Hier zeigte der Patient Symptome einer interstitiellen Pneumonie trotz negativer Resultate der in-house PCR. Die Diagnose konnte durch eine BAL eindeutig gesichert werden. In diesem Fall lag eine dokumentierte Mutation des Virus im Amplifikationsbereich des PCR-Primers (HCMV-IE-Antigen Exon 4) vor. Unter Berücksichtigung dieser Mutation waren bei Wiederholung alle in-house PCR-Ergebnisse positiv. Solche Mutationen treten selten auf, führen aber zu falsch-negativen PCR-Resultaten. Die geringere Anfälligkeit des CMM liegt in der Amplifikation einer 365 bp langen Sequenz innerhalb der HCMV-DNA-Polymerase (UL54) (DiDomenico et al., 1996; Hiyoshi et al., 1997).

Aufgrund dieser Resultate ist der CMM zur Einleitung präemptiver Therapien unserer in-house PCR vergleichbar. Da angenommen wird, dass eine hohe Viruslast zu einer Erkrankung führt, könnte aber durch den CMM besser zwischen Patienten, die wahrscheinlich erkranken und solchen, die nur asymptomatisch bleiben, unterschieden werden.

Der Test ist ebenfalls als Bestätigungstest von etwas sensitiveren Methoden wie der in-house PCR geeignet. Hier könnte der CMM zur Risikoabschätzung von infizierten Patienten herangezogen werden, da er besser zwischen Patienten mit drohender Erkrankung und solchen, die wahrscheinlich nur

---

asymptomatisch reaktivieren, differenzieren kann. Zu den gleichen Ergebnissen kommen ebenfalls andere Untersucher (Aitken et al., 1999; Barrett-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).

## 4.5 Therapiesteuerung

Eine gute Steuerung der antiviralen Therapie ist wesentlich, da auf diese Weise Über- und Untertherapien vermieden werden, die schwere Nebenwirkungen und Risiken für den Patienten zur Folge haben können. Daher wird immer noch nach Methoden und Markern gesucht, die einen Therapieerfolg sicher beurteilen können. Da inzwischen Resistenzen gegen alle gängigen Virostatika bekannt sind (Erice, 1999; Ketteler et al., 2000) und diese mit der Dauer der Therapie zunehmen (Emery und Griffiths, 2000c; Hebart et al., 1998; Limaye et al., 2000), muss eine möglichst kurze Therapie angestrebt werden ohne den Patienten dadurch zu gefährden. Genauso wichtig ist eine Identifizierung von Patienten, die nach einer 14tägigen Therapie eine Fortsetzung benötigen oder sogar Resistenzen gegen Virostatika entwickelt haben.

Kulturen werden bei 85-93% der Patienten unter antiviraler Behandlung negativ und sind somit für eine Therapiesteuerung ungeeignet (Einsele et al., 1991; Yuen, et al., 1995). Im Gegensatz dazu können sensitive Methoden wie Antigenämie-Assays und PCR-Tests durch Abfall positiver Zellen bzw. Signale die Wirksamkeit einer Therapie überwachen (Hebart et al., 1996). Auch das Beenden einer antiviralen Therapie auf der Grundlage eines negativen PCR-Ergebnisses führt zu keiner Gefährdung der Patienten (Einsele et al., 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie viele Tage nach Therapiebeginn die in-house PCR und der CMM negative Ergebnisse zeigten. Eine antivirale Therapie wurde durchschnittlich 39,74 Tage nach Transplantation eingeleitet. Negative Resultate lagen bei der in-house PCR nach 33,11, beim CMM nach 34,19 Therapietagen vor. Kein Test zeigte also eine frühere Negativierung ( $p= 0,266$ ).

---

Boivin et al. (2000) beobachteten bei antiviral behandelten Patienten nach HSCT eine frühere Negativierung von Tests aus Leukozyten (pp65 und CMM aus Vollblut) gegenüber Tests aus Plasma (CMM). Allerdings erreichten ihre Ergebnisse kein signifikantes Niveau.

Da es sich beim HCMV um ein schnell replizierendes Virus mit einer in vitro Verdoppelungszeit von ca. einem Tag handelt (Emery et al., 1999; Emery et al., 2000a) und die HCMV-Last nach einer 14tägigen intravenösen Ganciclovir-Therapie exponentiell abfällt, sind schnelle Nachweismethoden wie der CMM gut geeignet, den aktuellen Status quo der Viruslast widerzuspiegeln. Durch diesen Parameter könnten Therapien dem Patienten besser angepasst werden. Nebenwirkungsreiche Übertherapien könnten vermieden, Untertherapien, Resistenzen oder Rückfälle früh erkannt werden.

Diese Aussagen decken sich mit den Erfahrungen anderer Autoren (Aitken et al., 1999; Masaoka et al., 2001; Quamruddin et al., 2001; Razonable et al., 2001; Roberts et al., 1998).

Da die klinische Antwort auf eine Ganciclovirtherapie mit einem Abfall der Viruslast verbunden ist (Cope et al., 1997b; Razonable et al., 2001), könnte sie als Parameter zur Überwachung antiviraler Therapien verwendet werden. Ähnliche Resultate wurden auch von anderen Autoren erbracht. So beobachteten Barret-Miur et al. (2000) einen >70%igen Abfall, Aitken et al. (1999) sogar einen >90%igen Viruslastabfall nach einer 14tägigen Ganciclovirtherapie mittels CMM.

Andere Autoren betonen zudem den hohen Nutzen des CMM bei der Überwachung antiviraler Therapien, da Resistenzen aufgrund inadäquater Suppression der Viruslast früh erkannt werden können (Caliendo et al., 2000; Razonable et al., 2001).

In einigen Veröffentlichungen wurde bei ca. 30% der transplantierten Patienten bis zu 3 Wochen nach Beginn einer antiviralen Therapie eine Zunahme der Antigenämie beobachtet (Boeckh et al., 1996; Gerna et al., 1998). Diese scheint zumindest bei asymptomatischen Patienten auf keine Resistenzen gegen die

---

Medikation hinzuweisen und erfordert auch keinen Wechsel der antiviralen Behandlung. Die Ursachen für dieses Phänomen sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Diskutiert werden eine Phagozytose vom HCMV-pp65Matrixprotein infizierter Leukozyten nach Lyse (Gerna et al., 1992) oder zirkulierende infizierte Endothelzellen (Grefte et al., 1993; Percivalle et al., 1993).

Vor diesem Hintergrund sollte diese Arbeit überprüfen, ob auch hier eine entsprechende Zunahme der Viruslast unter antiviraler Therapie beobachtet werden konnte. Zu diesem Zweck untersuchten wir 29 Patienten 14 Tage vor und nach antiviraler Medikation. Dabei konnten wir einen Abfall der Viruslast bei 20 Patienten, bei 9 (31%) jedoch eine Zunahme feststellen. Nur einer von neun Patienten erkrankte an HCMV. Somit scheint auch die Viruslast bei einem Teil der Patienten zunächst unter antiviraler Therapie anzusteigen. Auch die in unserer Studie beobachtete Häufigkeit stimmt dabei mit den Literaturangaben überein. Lassen sich diese Ergebnisse in weiteren Studien reproduzieren, so kann die Viruslast als Marker für etwaige Resistenzen erst nach einer 3wöchigen antiviralen Therapie herangezogen werden (Boeckh et al., 1998). Da aber Resistenzen insbesondere bei langen antiviralen Therapien (>100 Tage) und niedriger Dosierung beobachtet werden, bei Kurzzeittherapien (14-21 Tage) dagegen selten sind (Bowen et al., 1998; Chou et al., 1995; Drew et al., 1991), kann der Behandelnde zwischen beiden Phänomenen unterscheiden.

Resistenzen gegen antivirale Chemotherapeutika (Chou, 2001; Emery und Griffiths, 2000c; Erice, 1999; Gilbert et al., 2002; Hebart et al., 1998; Ketteler et al., 2000; Limaye et al., 2000) treten bevorzugt nach einer Langzeittherapie auf, insbesondere wenn Therapieunterbrechungen oder suboptimale Dosierungen vorliegen (Emery, 2001). Vor diesem Hintergrund sollte diese Arbeit untersuchen, ob Patienten, denen unter antiviraler Therapie keine Infektionskontrolle bzw. Virusclearance gelingt, ein erhöhtes Risiko für eine HCMV-Erkrankung zeigen. Zu diesem Zweck wurde bei 35 Patienten ein Therapiemonitoring durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass 6 von 9 erkrankten Patienten keine Viruseliminierung unter antiviraler Therapie gelang.

---

Damit waren diese gegenüber Patienten mit erfolgreicher Viruskontrolle einem 8,67fach erhöhten Risiko für eine HCMV-Krankheit ausgesetzt.

Darüber hinaus kann die Messung der Viruslast auch Hilfestellungen hinsichtlich der Pathogenese der HCMV-Erkrankung liefern: Durch die fehlende Viruslastsuppression bzw. durch steigende Viruslasten unter Therapie kommt es zu hohen Viruslasten, die ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen bergen (Gor et al., 1998; Emery et al., 2000b).

## **4.6 Analyse der Viruslast**

Zahlreiche Studien haben die Korrelation zwischen Viruslast und HCMV-Krankheit bei immunsupprimierten Patienten analysiert. Während bei organtransplantierten und HIV-infizierten Patienten ein Zusammenhang zwischen hoher Viruslast und HCMV-Erkrankung in vielen Studien befürwortet wird (Aitken, et al., 1999; Cope et al., 1997a; Cope et al., 1997b; Fox et al., 1995; Hassan-Walker et al., 1999; Roberts et al., 1998; Sia et al., 2000b), gingen die Meinungen darüber bei stammzelltransplantierten Patienten lange Zeit weit auseinander. Einige Untersucher konnten eine signifikante Korrelation zwischen hoher Viruslast und HCMV-Krankheit feststellen (Gor et al., 1998), andere jedoch nicht (Boivin et al., 1997; Saltzman et al., 1992).

Zu erwarten wäre, dass auch bei stammzelltransplantierten Patienten, die an HCMV erkranken, die Viruslast insgesamt höher ist als bei denjenigen, die nur eine asymptomatische Infektion erleiden.

Unterstützt wird diese Annahme von Emery et al. (2000b) in einer Studie an Nieren-, Leber-, und stammzelltransplantierten Patienten. Sie konnten eine signifikant höhere Anfangsviruslast, Viruslastwachstumsrate und peak viral load bei erkrankten gegenüber asymptomatischen Patienten feststellen und demonstrierten eine positive Korrelation zwischen initial gemessener und peak viral load. Auch Rollag et al. (2002) berichten von einer signifikant höheren Initialviruslast symptomatischer gegenüber asymptomatischen Patienten.

In der vorliegenden Arbeit können wir diese Aussagen an stammzelltransplantierten Patienten weitgehend bestätigen. So zeigten

---

symptomatische Patienten in der Tat eine höhere Anfangsviruslast-wachstumsrate ( $p=0,0384$ ) und peak viral load ( $p=0,0095$ ) als asymptomatische. Ebenso war eine hohe Anfangsviruslast mit einer hohen peak viral load verbunden. Nicht bestätigen konnten wir hingegen eine initial höhere Viruslast erkrankter gegenüber asymptomatischen Patienten ( $p=0,1741$ ).

Das sich vermehrende Virus scheint demzufolge die Prognose einer HCMV-Infektion bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt festzulegen. Diese Vermutung ist nicht nur hinsichtlich der Pathogenese der Erkrankung wichtig. Die kontinuierliche Kontrolle der Virusreplikation kann ebenso wie die Festlegung eines Cut offs für Viruslasten und ihrer Wachstumsraten auf eine Verbesserung der präemptiven Therapie hoffen lassen. So könnte mit Hilfe der Viruslast entschieden werden, ob eine antivirale Therapie begonnen werden sollte. Auch eine Abschätzung des Behandlungserfolgs und eine Beurteilung, ob sich Resistenzen gegen die verwendete Medikation ergeben, wären somit möglich. Dies deckt sich mit den Erfahrungen anderer Autoren. So bestimmten Gor et al. (1998) bei stammzelltransplantierten Patienten Viruslasten, die das Risiko für eine HCMV-Krankheit definieren. Sie konnten zeigen, dass Viruslasten unter  $3,5 \log_{10}$  G/ml mit einem Risiko von kleiner als 10%, Viruslasten zwischen  $3,5$  und  $4,5 \log_{10}$  G/ml mit einem 6fach erhöhten Risiko und Viruslasten über  $5,0 \log_{10}$  G/ml mit einem 80%igen Risiko für HCMV-Erkrankungen verbunden waren. Auch für leber- (Cope et al., 1997a) und nierentransplantierte Patienten (Aitken et al., 1999; Cope et al., 1997b) existieren solche Abschätzungen.

Weiter postulierten Gor et al. (1998) in einer Studie an Stammzelltransplantierten, dass das Risiko für eine HCMV-Erkrankung pro  $0,25 \log_{10}$  Viruslastzunahme um 1,43 zunimmt. Auch Sanchez et al. (2001) beobachteten bei lungentransplantierten Patienten ein 1,92fach erhöhtes Risiko für eine HCMV-IP bei einer Viruslastzunahme pro  $\log_{10}$ .

Eine andere Studie legte für HCMV-infizierte Patienten einen Cut off für die Anfangsviruslast und ihre Wachstumsrate fest. Die Untersucher kamen zu dem

---

Schluss, dass eine präemptive Therapie auf Grundlage dieser Werte nur 25 von 127 infizierten Patienten unnötig therapiert hätte. Die Durchführung der Prophylaxe-Strategie am gleichen Patientengut hätte dagegen eine Übertherapie von 310 Patienten bedeutet (Emery et al., 2000b).

Nichtsdestotrotz ist bekannt, dass auch eine niedrige Viruslast mit einer HCMV-Erkrankung assoziiert sein kann (Boeckh et al., 1992; Boivin et al., 1998a; Gor et al., 1998). In zahlreichen Studien wird insbesondere auf die Bedeutung der Virusaktivität in der Pathogenese der HCMV-Erkrankung hingewiesen (Sanchez et al., 2001). So werden in der Literatur stammzell- und organtransplantierte Patienten beschrieben, die vor ihrer Erkrankung trotz niedriger initialer Viruslasten durch rapide ansteigende Werte auffielen. Dies gilt insbesondere für Transplantierte mit schwerer GvHD, die stark immunsupprimiert werden (Boeckh et al., 1998). Eine präemptive Therapie dieser Patienten auf Grundlage eines wöchentlich durchgeführten Screenings wäre demzufolge unzureichend. Tests in kürzeren Zeitintervallen (Einsele et al., 2000) oder Parameter wie die Viruslast und Wachstumsrate könnten die Überwachung dieser Risikopatienten erleichtern (siehe auch 5.7.).

Die Analyse der Viruslast birgt darüber hinaus weitere Vorteile. So beobachteten Muheim et al. (2002) in einer Studie an 63 HCMV-infizierten organtransplantierten Patienten, dass nach einer antiviralen Therapie diejenigen einen Rückfall erlitten, die während der ersten virämischen Episode hohe Viruslasten gezeigt hatten. Die Höhe der Plasmavirämie am Ende einer Induktionstherapie konnte dabei am besten zwischen Patienten, die eine protrahierte Infektion zeigen werden oder nicht, unterscheiden.

Zahlreiche Studien haben der peak viral load eine grosse Bedeutung für die Pathogenese der HCMV-Erkrankung beigemessen. Gegenwärtig ist davon auszugehen, dass auch bei Stammzelltransplantierten eine Erkrankung mit einer hohen Viruslast einhergeht. Noch unbeantwortet ist jedoch die Frage, welche klinische Relevanz die peak viral load für den erkrankten Patienten selbst hat.

---

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zeitpunkte Diagnosestellung der Erkrankung und Messung der peak viral load von 10 Patienten miteinander verglichen. Es stellte sich dabei heraus, dass eine Erkrankung häufig mit der peak viral load einhergeht. Nach unserer Untersuchung erkrankt ein Patient während einer virämischen Episode zum Zeitpunkt seiner höchsten Viruslasten. Diese Aussage steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Blank et al. (2000) und Shinkai et al. (1997), allerdings an HIV-Patienten. Bei einigen Patienten konnten beide zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation keine oder nur noch sehr wenige HCMViruskopien im Blut feststellen, während die peak-Werte Wochen bis Monate vorher gemessen wurden.

Aufgrund der geringen Fallzahl unserer Untersuchung müsste diese Aussage sicherlich an grösseren Patientenkollektiven überprüft werden. Prinzipiell wären auch Unterschiede zwischen HIV- und stammzelltransplantierten Patienten vorstellbar.

Im zweiten Teil unserer Überlegungen stellten wir uns die Frage, ob aus der Höhe der peak viral load Informationen über die Länge einer virämischen Episode gewonnen werden könnten. Zu diesem Zweck haben wir den peak-Wert von 29 HCMV-infizierten Patienten mit der jeweiligen virämischen Episode verglichen. Zwischen beiden Variablen konnten wir eine Korrelation von 0,79 nachweisen. Dieser Zusammenhang erwies sich als statistisch auffällig ( $p < 0,0001$ ). So übt die Höhe der peak viral load über die Virämiedauer Einfluss auf die Therapiedauer aus. Auch Razonable et al. (2001) konnten in einer Studie an Lebertransplantierten eine positive Korrelation zwischen der Viruslasthöhe und der Zeitdauer bis zur Viruseliminierung feststellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Quantifizierung der Virus-DNA zur Identifizierung von Hochrisikopatienten beitragen könnte. Darüber hinaus scheint die zu bestimmten Zeitpunkten gemessene Viruslast Prognosen über den individuellen Infektionsverlauf der Patienten zu ermöglichen. Wichtige pathogenetische Mechanismen für eine HCMV-Erkrankung können durch die Viruslast besser verstanden werden. So zeigten Gor et al. (1998), dass

---

Patienten mit D-/R+ signifikant höhere Viruslasten gegenüber Patienten mit anderen Serogruppen (D+/R+ und D+/R-) ausbilden. Diese Beobachtung könnte durch einen adoptiven T-Zelltransfer des Spenders auf den Empfänger erklärt werden, der mit einer verminderten Virusreplikation einhergeht (Grob et al., 1987).

Zukünftige Studien müssen nun Schwellenwerte für präemptive Therapien etablieren und untersuchen, ob diese Therapieform auf der Grundlage der Viruslast tatsächlich für die Prävention von HCMV-Krankheiten geeignet ist. Erste Ansätze existieren bereits für organtransplantierte Patienten (Aitken et al., 1999; Caliendo et al., 2002; Tong et al., 2000), jedoch sind diese nicht auf stammzelltransplantierte Patienten übertragbar. Diese bilden verglichen mit Patienten nach Organtransplantation geringere Viruslasten aus (Emery et al., 2000b; Flexman et al., 2001) und sind insbesondere bei einer schweren GvHD durch rapide ansteigende Viruslasten gefährdet. Autoren wie Boivin et al. (2000) fordern daher für stammzelltransplantierte Patienten einen möglichst niedrigen Cut off.

Auch abgestufte Therapiekonzepte wären vorstellbar, die je nach Höhe der Viruslast unterschiedliche Medikamente und Dosierungen vorsehen, um die Nebenwirkungsrate antiviraler Therapien zu reduzieren. Erste Studien liegen bereits vor (Mori et al., 2002).

Fest steht, dass in der Diagnostik anderer Virusinfektionen die quantitative Analyse der Viruslast von grosser Bedeutung ist. So ist die Bestimmung der Viruslast ein in der HIV-Medizin unentbehrlicher diagnostischer Parameter bezüglich der Krankheitsprognose, Indikationsstellung zur und Kontrolle der antiviralen Therapie. Ähnliche Ansätze existieren auch für HBV und HCV (Berger und Preiser, 2002).

---

## 4.7 Steroide und Viruslast

Ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus für eine HCMV-Erkrankung bei Empfängern von Gewebe- oder Organtransplantaten ist eine fehlende Immunität und/oder Immunsuppression. Vor diesem Hintergrund stellten wir uns die Frage, ob sich immunsuppressive Therapien in der Viruslast widerspiegeln. Zu diesem Zweck wurden die Viruslasten von 38 Patienten vor und 7 Tage nach Beginn einer Steroidtherapie (unabhängig von der verabreichten Dosis) miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass Patienten nach 7tägiger Medikation eine höhere Viruslast zeigten als vor Therapiebeginn ( $p < 0,0001$ ). Risikosituationen wie eine immunsuppressive Therapie können also die Wirksamkeit einer präemptiven Therapie limitieren.

Eine Studie von Nichols et al. (2001) bestätigt unsere Untersuchungen. So konnten Steroide als Hauptrisikofaktor für eine zunehmende Antigenämie unter antiviraler Therapie identifiziert werden. Patienten, die 1-2mg/kg KG Steroide erhielten, zeigten ein 4fach erhöhtes Risiko für die Verdopplung ihrer Viruslast unter Therapie. Hatten die Patienten eine Dosis  $>2\text{mg/kg KG}$  erhalten, war ein 10fach erhöhtes Risiko für eine Viruslastverdopplung nachweisbar.

Cope et al. (1997a) zeigten an Lebertransplantierten, dass die kumulative Steroiddosis einen Risikofaktor für die HCMV-Krankheit darstellt und das Risiko signifikant ( $p=0,01$ ) mit der verabreichten Gesamtdosis zunimmt (odds ratio 1,30/1g Steroide). Bei steroidbehandelten Patienten stellten sie zudem eine Erkrankung bei bereits 10fach niedrigeren Viruslasten gegenüber nicht Immunsupprimierten fest.

Bei HCMV-infizierten transplantierten Patienten sollte daher -wenn möglich- eine Steroidreduktion durchgeführt werden (Cope et al., 1997a). Studien, die ein Benefit dieses Managements zeigen, liegen vor (Gomez et al., 1999). Alternativen wären eine frühere Intervention im Vergleich zu nicht Immunsupprimierten, ein strafferes Therapiemonitoring oder eine Ganciclovirprophylaxe (Sullivan et al., 2001). Da aber die Ganciclovirprophylaxe mit den bereits beschriebenen Risiken verbunden ist, und eine Steroidreduktion nicht immer möglich ist, erscheint uns in dieser Risikosituation eine antivirale

---

Frühintervention auf der Basis von in kurzen Zeitintervallen (Einsele et al., 2000) durchgeführten Untersuchungen als die sinnvollste Alternative.

## **4.8 Transplantationsmodalität und Reaktivierung**

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass Patienten, die das Knochenmark nicht-verwandter Spender erhalten, ein erhöhtes Risiko zeigen, sowohl an einer HCMV-Infektion zu erkranken als auch daran zu versterben (Ljungman et al., 1998). Dies lässt sich u.a. durch Studien von Autoren erklären, die eine signifikant höhere Viruslast bei fremd-allogen gegenüber familiär-allogen transplantierten Patienten feststellten (Wuchter, 2001).

Von Bedeutung ist ferner die Frage, ob auch Unterschiede im Reaktivierungsbeginn zwischen Patienten mit verschiedenen Transplantationsmodalitäten bestehen. Zu diesem Zweck wurden die Reaktivierungszeitpunkte der Patienten im CMM verglichen. Es stellte sich heraus, dass Patienten, die Stammzellen eines verwandten Spenders erhalten hatten spätere HCMV-Infektionszeitpunkte zeigten ( $p=0.0062$ ), als Patienten mit nicht-verwandtem Spender. Auch diese Beobachtung könnte ein Grund für die höhere Morbiditäts- und Mortalitätsrate der fremd-allogen transplantierten Patienten sein: Infektionen zu späteren Zeitpunkten müssten aufgrund einer weiter fortgeschrittenen Immunrestitution günstiger verlaufen.

## **4.9 Opportunistische Infektionen**

Seit langer Zeit werden dem HCMV neben direkten Wirkungen in Form von Infektion und Erkrankung zahlreiche indirekte Nebenerscheinungen zugeschrieben. So wird durch die immunsuppressive Wirkung des Virus das Risiko für opportunistische nicht-virale Superinfektionen erhöht (Fishman et al., 1995; Grow et al., 2002; Hadley et al., 1995; Husni et al., 1998). Nach einer Studie von Nichols et al. (2002) zeigen dafür insbesondere Patienten mit einer Primärinfektion (D+/R-) ein erhöhtes Risiko. In der Literatur werden insbesondere Superinfektionen durch *Pneumocystis carinii*, *Nocardia asteroides*, *Listeria monocytogenes* und eine Vielzahl an Pilzen beschrieben (Rubin, 1989).

---

Vor diesem Hintergrund untersuchten wir 33 Patienten mit einer HCMV-Infektion auf zusätzliche fungale oder bakterielle Infektionen im weiteren Verlauf. Dabei konnten wir kein ( $p = 0,12$ ) erhöhtes Auftreten opportunistischer Infektionen nach einer HCMV-Infektion feststellen. HCMV-infizierte Patienten zeigten aber ein 1,68fach erhöhtes Risiko für nicht-virale Superinfektionen gegenüber Patienten ohne Infektion. Fungale Infektionen dominierten mit 71,4% ( $n=20$ ) deutlich gegenüber bakteriellen mit 28,6% ( $n=8$ ).

#### **4.10 Zukünftiger Einsatz**

Der Cobas Amplicor CMV Monitor ist eine neue Nachweismethode für das HCMV. Im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren zeichnet er sich durch eine schnellere und einfachere Durchführbarkeit aus. Einen zusätzlichen Vorteil bietet seine Standardisierung. Dadurch ist in Zukunft eine Evaluierung neuer antiviraler Strategien und Chemotherapeutika in Multicenter-Studien möglich. Die Quantifizierung der viralen DNA erleichtert zudem das Therapiemonitoring. Ein Nichtansprechen auf eine Therapie oder ein Rückfall nach primärem Ansprechen werden für den Behandelnden frühzeitig nachweisbar.

Nach den Daten der vorliegenden Arbeit sowie anderer Studien eignet sich der CMM in der Diagnostik, als Basis für eine präemptive Therapie sowie als Bestätigungstest anderer sensitiverer Verfahren (Caliendo et al., 2000; Caliendo et al., 2002; Flexman et al., 2001; Masoka et al., 2001; Piiparinen et al., 2001). Darüber hinaus scheint das Monitoring der Virusmenge sowie eine Therapieeinleitung und -steuerung nach der Viruslast eine Abschätzung der Prognose und eine stärker individuell angepasste Therapie zu ermöglichen.

Da die Viruslast zudem eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HCMV-Erkrankung zu spielen scheint (Gor et al., 1998; Emery et al., 1999; Emery et al., 2000b), könnte sie in Zukunft helfen, unser bisheriges Wissen und Verständnis über das HCMV zu vertiefen. Neue Erkenntnisse könnten so erfolgreiche und nebenwirkungsarme Behandlungsstrategien eröffnen.

---

Die Aufgabe zukünftiger Studien liegt nun in einer Evaluierung eines Cut offs für die Viruslast und ihrer Wachstumsrate, die eine Therapieeinleitung zur Folge haben.

Eine weitere gegenwärtig noch ungeklärte Frage ist, bei welcher Viruslast eine antivirale Chemotherapie beendet werden könnte, ohne den Patienten unnötigen Risiken auszusetzen. Nur wenige Studien haben sich mit diesen Fragen beschäftigt und wurden hauptsächlich an solid organtransplantierten Patienten durchgeführt. Da diese Erkenntnisse jedoch nicht auf stammzelltransplantierte Patienten übertragen werden können, sind weitere Studien auf diesem Gebiet dringend erforderlich.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war die Evaluation des Cobas Amplicor CMV Monitor (CMM) zur Frühdiagnostik einer HCMV-Infektion bei stammzelltransplantierten Patienten sowie eine Untersuchung bezüglich der klinischen Bedeutung der Viruslastbestimmung. Zu diesem Zweck wurden 51 stammzelltransplantierte Patienten wöchentlich von 01/99 bis 04/00 parallel mittels in-house PCR und CMM auf HCMV untersucht. Darüber hinaus wurden in einer retrospektiven Studie Proben von 25 Patienten mit hoher Viruslast oder HCMV-Krankheit mit beiden Nachweismethoden gemessen. So wurden insgesamt 1081 Proben von 73 Patienten analysiert.

Der CMM zeichnete sich durch eine leichte und schnelle Durchführbarkeit aus. Jeweils 50 CMM- positive und -negative Ergebnisse zeigten in einer Wiederholungsmessung keine abweichenden Resultate. Wurde im CMM Plasma als Ausgangsmaterial eingesetzt, zeigten sich wenige nicht verwertbare Ergebnisse (0,46%). Dagegen waren 15,25% der Proben aus Vollblut ungültig.

Die mit beiden Methoden durchgeführte Analyse zeigte bei 643 prospektiven Proben eine Übereinstimmung von 89,4% ( $p=0,0003$ ). Bei 250 retrospektiven Proben fiel sie mit 84% ( $p < 0,0001$ ) etwas geringer aus. Bezüglich der untersuchten Patienten ergab sich eine Übereinstimmung von 89,04%.

Die Parallelbestimmung von 50 Proben mittels CMM aus Plasma und Vollblut ergab eine Konkordanz von 84%. Diese Ergebnisse erreichten kein statistisch signifikantes Niveau ( $p=0,0703$ ). Die Spezifität der in-house PCR lag bei 98,2% (95%-KI: 93,8-99,8%), die des CMM bei 100% (95%-KI: 96,8-100%).

Bei 41 von 48 in-house PCR-positiven Patienten wurde aufgrund konsekutiv positiver Resultate eine antivirale Therapie eingeleitet. Im Vergleich zur in-house PCR wäre bei einer auf CMM-Ergebnissen basierenden Frühintervention

---

ein Patient mehr therapiert worden. Der Detektionszeitpunkt beider Methoden erwies sich als vergleichbar ( $p=0,06$ ). Keiner der CMM-negativen Patienten erkrankte, wohingegen ein in house PCR-negativer Patient eine HCMV-Pneumonie erlitt. Dieses falsch-negative Ergebnis war auf eine Mutation des Virusgenoms im Amplifikationsbereich des PCR-Primers zurückzuführen.

Beim Monitoring von Patienten unter antiviraler Therapie wurde kein Nachweisverfahren früher negativ ( $p=0,266$ ). 6 der 9 Patienten, denen trotz antiviraler Therapie keine Viruseliminierung gelang, erkrankten an HCMV. Diese Patienten zeigten gegenüber Patienten mit Virusclearing ein 8,67fach erhöhtes Risiko für eine Erkrankung.

Symptomatische Patienten zeichneten sich gegenüber asymptomatischen Patienten durch eine statistisch auffällig höhere Anfangsviruslastwachstumsrate ( $p=0,0384$ ) und peak viral load ( $p=0,0095$ ) aus. Die Anfangsviruslast beider Gruppen war dagegen vergleichbar ( $p=0,1741$ ). Zwischen der Initial- und Maximalviruslast war eine Korrelation von 0,47 zu verzeichnen ( $p=0,0001$ ). Die peak viral load und die Dauer der virämischen Episode zeigten eine Korrelation von 0,79 ( $p<0,0001$ ). Zwischen Erkrankungszeitpunkt und Messung der peak viral load wurde eine Korrelation von 0,97 gemessen.

Bei steroidbehandelten Patienten konnte (unabhängig von der verabreichten Dosis) 7 Tage nach Therapiebeginn eine statistisch auffällig höhere Viruslast ( $p<0,0001$ ) als vor Therapieeinleitung beobachtet werden. HCMV-infizierte Patienten zeigten kein häufigeres Auftreten nicht-viraler opportunistischer Infektionen gegenüber Patienten ohne Virusinfektion ( $p=0,12$ ).

Der CMM stellt somit ein geeignetes Verfahren zur Initiierung und Steuerung einer antiviralen Therapie dar. Der Test ist zudem in der Lage, das individuelle Risiko für eine HCMV-Erkrankung zu ermitteln. Ebenso scheint er Prognosen über die zu erwartende Länge einer virämischen Episode und Therapie zu ermöglichen.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

**Aitken, C., Barret-Muir, Millar, C. Templeton, K., Thomas, J., Sheridan, F., Jeffries, D, Yaqoob, Breuer, J. (1999)**

Use of molecular assays in diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease following renal transplantation  
J.Clin. Microbiol. 37(9), 2804-807

**Akrigg, A., Wilkinson, G.W.G., Oram, J.D. (1985)**

The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD 169  
Virus Res. 2, 107-121

**Apperley, J.F., Dowding, C., Hibbin, J., Buiter, J., Matutes, E., Sissons, P.J., Gordon, M., Goldman, J.M. (1989)**

The effect of cytomegalovirus on hemopoiesis: in vitro evidence for selective infection of marrow stromal cells  
Exp. Hematol. 17(1), 38-45

**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

**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(1), 116-119

**Basgoz, N., Preiksaitis, J. (1995)**

Post-transplant lymphoproliferative disorder  
Infect. Dis. Clin. North. Am. 9, 901-923

---

**Beck, S., Barrel, B.G. (1988)**

Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I-antigens

Nature, 331, 269-272

**Becker, Y., Darai, G., Huang, E.-S. (1993)**

Molecular aspects of human cytomegalovirus diseases

Springer, Berlin, Heidelberg, New York

**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(5), 713-721

**van der Bij, W., Torensma, R., van son, W.J., Anema, J., Schirm, J., Tegzess, A.M., The, T.H. (1988)**

Rapid immundiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes

J. Med. Virol. 25, 179-188

**Blank, B.S.N., Meenhorst, P.L., Mulder, J.W., Weverling, G.J., Putter, H., Pauw, W., van Dijk, W.C., Smits, P., Lie-A-Ling, S., Reiss, P., Lange, J.M.A. (2000)**

Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients

J.Clin. Microbiol. 38, 563-569

**Blanton, R.A., Tevethia, M.J. (1981)**

Immunoprecipitation of virus specific immediate early and early polypeptides from cells lytically infected with human cytomegalovirus strain AD 169.

Virology 112, 262-273

**Blok, M.J., Goossens, V.J., Vanherle, S.J., Top, B., Tacken, 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 allogeneic marrow transplantation

Blood 80, 1358-1364

---

**Boeckh, M., Woogerd, P.M., Stevens-Ayers, T., Ray, C.G., Bowden, R.A. (1994a)**

Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia  
J. Clin. Microbiol. 32 (3), 832-834

**Boeckh, M., Myerson, D., Bowden, R.A. (1994b)**

Early detection of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant: methodological aspects and implications for the therapeutic interventions  
Bone Marrow Transplant. 14, S 66-70

**Boeckh, M., Gooley, T.A., Myerson, D., Cunningham, T., Schoch, G., Bowden, R.A. (1996)**

Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study  
Blood 88, 4063-4071

**Boeckh, M., Gallez-Hawkins, G.M., Myerson, D., Zaia, J., Bowden, R.A. (1997)**

Plasma polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA after allogeneic bone marrow transplantation: comparison with PCR using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia and viral culture  
Transplantation 64, 108-113

**Boeckh, M. und Boivin, G. (1998)**

Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications  
Clin. Microbiol. Rev. 11, 533-554

**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

**Boivin, G., Handfield, J., Toma, E., Murray, G., Lalonde, R., Bergeron, M.G. (1998a)**

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., Handfield, J., Toma, E., Murray, G., Lalonde, R., Tevere, V.J., Sun, R., Bergeron, M.G. (1998b)**

Evaluation of the Amplicor cytomegalovirus test with specimens from human immunodeficiency virus-infected subjects  
J. Clin. Microbiol. 36, 2509-2513

---

**Boivin, G., Bélanger, R., Delage, R., Béliveau, C., Demers, C., Goyette, N., Roy, J. (2000)**

Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the Cobas Amplicor Monitor CMV Monitor PCR Test after blood and marrow allogeneic transplantation

J. Clin. Microbiol. 38, 4356-60

**Bombi, J.A., Cardesa, A., Lebaria C., Rives, A., Carreras, E., Granena, A., Jimenez de Anta, M.T. (1987)**

Main autopsy findings in bone marrow transplantant patients

Arch. Pathol. Lab. Med. 111,125-129

**Boom, R., Sol, C., Weel, J., Gerrits, Y., De Boer, M., Wertheim-van Dillen, P. (1999)**

A highly sensitive assay for detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and electrochemiluminescence

J. Clin. Microbiol. 37, 1489-1497

**Boppana, S.B., Polis, M.A., Kramer, A.A., Britt, W., Koenig, S. (1995)**

Virus-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with HCMV retinitis

J. Infect. Dis. 171, 182-185

**Bortin, M.M. und Rimm, A.A. (1989)**

Increasing utilization of bone marrow transplantation. II. Results of the 1985-1987 survey

Transplant. 48(3), 453-458

**Bowden, R.A., Sayers, M., Flournoy N., Newton, B., Banaji, M., Thomas, E.D., Meyers, J.D. (1986)**

Cytomegalovirus immune globulin and seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation

New. Engl. J. Med. 314, 1006-1010

**Bowden, R.A., Digel, J., Reed, E.C. Meyers, J.D. (1987)**

Immunosuppressive effects of ganciclovir on in vitro lymphocyte responses

J. Infect. Dis. 156, 899-903

**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., Emery, V.C., Wilson, P., Johnson, M.A., Davey, C.C., Sabin, C.A., Farmer, D., Griffiths, P.D. (1998)**

Cytomegalovirus polymerase chain reaction viremia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis  
Aids 12(6), 605-611

**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)

**Bregante, S., Bertilson, S., Tedone, E., Van Lint, M.T., Trespi, G., Mordini, N., Berisso, G., Gualandi, F., Lamparelli, T., Figari, O., Benvenuto, F., Raiola, A.M., Bacigalupo, A. (2000)**

Foscarnet prophylaxis of cytomegalovirus infections in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation (BMT): a dose finding study  
Bone Marrow Transplantat. 26, 23-29

**Caliendo, A.M., St. George, K., Kao, S., Allega, 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

**Caliendo, A.M., St. George, K., Allega, 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(5), 1581-1586

**Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Hornsnell, T., Hutchinson, K.M., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E., Satchwell, S.C., Tomlinson, P., Weston, K.M., Barell, B.G. (1990)**

Analysis of the protein content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD 169  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154, 125-170

**Chou, S.W., Guentzel, S., Michels, K.R., Miner, R.C. und Drew, W.L. (1995)**

Frequency of UL 97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates  
J. Infect. Dis. 172, 239-242

**Chou, S.W. (2001)**

Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications  
Transplant. Infect. Dis. 3 (Suppl.2), 20-24

---

**Chua, C.C., Carter, T.H., St Jeor, S. (1981)**

Transcription of the human cytomegalovirus genome in productively infected cells

J. Gen. Virol. 56, 1-11

**Clouse K.A., Robbins P.B., Fernie, B., Ostrove J.M., Fauci A.S. (1989)**

Viral antigen stimulation of the production of human monokines capable of regulating

J. Immunol. 143, 470-475

**Colimon, R. und Michelson, S. (1990)**

Human cytomegalovirus: pathology, diagnosis, treatment

Adv. Nephrol. Necker, Hosp. 19: 333-356

**Compton, J. (1991)**

Nucleic acid sequence-based amplification

Nature 350 (6313), 91-92

**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

**DiDomenico, N., Link, H., Knobel, R., Caratsch, T., Weschler, W., Loewy, G., Rosenstraus, M. (1996)**

Cobas Amplicor: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR

Clin. Chem. 42, 1915-1923

**Doerr, H.W. (1998)**

Cytomegalievirus (CMV-bzw. HCMV)

In: Thomas, L. (Hrsg): Labor und Diagnose

Th-Books-Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main

**Drew, W.L. (1988)**

Cytomegalovirus infections in patients with AIDS

J. Infect. Dis. 158, 449-456

---

**Drew, W.L., Miner, R.C., Busch, D.F., Follansbee, S.E., Gullet, J., Mehalko, S.G., Gordon, S.M., Owen, W.F., Matthews, T.R., Buhles, W.C. (1991)**

Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection  
J. Infect. Dis. 163, 716-719

**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

**Dunn, D.L., Gillingham, K.J., Kramer, M.A. (1994)**

A prospective randomized study of acyclovir versus ganciclovir plus human immune globulin prophylaxis of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation  
Transplantation, 57, 876-884

**Egan, J.J., Carroll, K.B., Yonan, N., Woodcock, A., Crisp, A. (2002)**

Valacyclovir prevention for cytomegalovirus reactivation after heart transplantation: a randomized trial  
J. Heart Lung Transplant. 21, 460-466

**Einsele, H., Steidle, M., Vallbracht, A., Saal, J.G., Ehninger, G., Müller, C.A. (1991)**

Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique  
Blood 77, 1104-1110

**Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Fischer, I., Bihler, S., Gerneth, F., Vallbracht, A., Schmidt, H., Waller, H.D., Müller, C.A. (1993)**

Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation  
Blood, 82, 1672-

**Einsele, H., Ehninger, G., Hebart, H., Wittkowsky K.M., Schuler, U., Jahn, G., Mackes, P., Herter, M., Klingebiel, T., Löffler, J. (1995)**

Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation.  
Blood 338 (8776), 1170-1172

---

**Einsele, H., Hebart, H., Kauffmann-Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Löffler, J., Bokemeyer, C., Muller, C.A., Kanz, L. (2000)**

Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection

Bone Marrow Transplant. 25(7), 753-763

**Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleith, U., Moris, A., Rammensee, H.J., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., Hebart, H. (2002)**

Infusion of cytomegalovirus specific T-cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy

Blood 99 (11), 3916-3922

**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

**Emanuel, D. (1990)**

Treatment of cytomegalovirus disease

Sem. Hematol. 27 (suppl 1), 22-27

**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. und Griffiths, P.D. (2000a)**

Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8039-8044

**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

**Emery, V.C. und Griffiths, P.D. (2000c)**

Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 8039-8044

**Emery, V.C. (2001)**

Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance

J. Clin. Virol. 21(3), 223-228

---

**Enders, G. (Hrsg.) (1988)**

Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft  
Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

**Erice, A., Chow, S.W., Biron, K. (1989)**

Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients  
New Engl. J. Med. 320, 289-293

**Erice, A. (1999)**

Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs  
Clin. Microbiol. Rev. 12(2), 286-297

**Fiala, M., Graves, M.C., Grody, W.W., Vinters, H.V. (1993)**

Role of cytomegalovirus infection in acquired immunodeficiency syndrome, with emphasis on neurological and ophthalmological complications  
In: Molecular aspects of human cytomegalous diseases  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York

**Fishman, J.A. (1995)**

Pneumocystis carinii and parasitic infections in transplantation  
Infect. Dis. Clin. North. Am. 9, 1005-1044

**Flexman, J., Kay, J., 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 the CMV viraemia in bone marrow and solid organ transplant patients (2001)  
J. Med. Virol. 64, 275-282

**Fox, J.C., Kidd, I.M., Griffiths, P.D., Sweny, P., Emery V.C. (1995)**

Longitudinal analysis of cytomegalovirus load in renal transplant recipients using a quantitative polymerase chain reaction: correlation with disease  
J. Gen. Virol. 76, 309-319

**Fritze, D., Matzdorff, K. (1999)**

Hämatologie, 1312-1470  
in: Innere Medizin, Duale Reihe  
Hippokrates Verlag Stuttgart im Georg Thieme Verlag

**Fujinami, R.S., Nelson, J.A., Walker, L., Oldstone, M.B. (1988)**

Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR $\beta$  chain: a means for graft rejection and immunosuppression  
J Virol 62, 100-105

---

**Gärtner, L., Enders, G. (1990)**

Infektionen in der Schwangerschaft mit Folgen für die Embryonal- und Fetalentwicklung  
MTA, 5, 3-10

**Gelen, J.L.M.C., Wali, C., Wertheim, P., van der Noordaa, J. (1978)**

Human cytomegalovirus DNA, molecular weight and infectivity  
J. Virol. 26, 813-816

**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 sequence-based amplification  
AIDS 7 ( Suppl 2), 107-110

**Gerna, G., Zipeto, D., Parea, M., Revello, M.G., Silini, E., Percivalle, E., Zavattoni, M., Grossi, P., Milanese, G. (1991)**

Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia  
J. Infect. Dis. 164, 488-498

**Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G., Milanese, 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 (6), 1236-1244

**Gerna, G., Furione, M., Baldanti, F. und Sarasini, A. (1994)**

Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients  
J. Clin. Microbiol. 32, 2709-2717

**Gerna, G., Zavattoni, M., Percivalle, E., Grossi, P., Torsellini, M., Revello, M.G. (1998)**

Rising levels of human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ transplant recipients with primary HCMV infection  
J. Clin. Microbiol. 36; 1113-1116

**Gilbert, C., Bestman-Smith, J., Boivin, G. (2002)**

Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms  
Drug Resist. Updat. 5(2), 88-114

---

**Gleaves, C.A., Reed E.C., Hackman, R.C., Meyers, J.D. (1987)**

Rapid diagnosis of invasive cytomegalovirus infection by examination of tissue specimens in centrifugation culture

Am. J. Clin. Pathol. 88, 354-358

**Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Champlin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobson, S.J., Marmont, A.M., McGlave, P.B., Messner, H.A., Rimm, A.A., Rozman, C., Speck, B., Tura, S., Weisner, R.S., Botin, M.M. (1988)**

Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk of relapse associated with T-cell depletion

Ann. Intern. Med. 108, 806-814

**Gomez, E., De Ona, M., Melon, S., Alvarez, R., Laures, A., Rodriguez, M., Pobes, A., Alvarez-Grande, I. (1999)**

Control of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients treated with prednisolone, azathioprine and cyclosporine using intensive monitoring and decreased immunosuppression

Nephron 82(3), 238-245

**Goodrich, J.M., Mori, M., Gleaves, C.A., Du Mond, C., Cays, M., Ebeling, D.F., Buhles, W.C., DeArmond, B., Meyers, J.D. (1991)**

Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation

N. Engl. J. Med. 325, 1601-1607

**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

**Gozlan, J., Laporte, J.P., Lesage, S., Labopin, M., Najman, A., Gorin, N.C., Petit, J.C. (1996)**

Monitoring of cytomegalovirus infection and disease in bone marrow recipients by reverse transcription-PCR and comparison with PCR and blood and urine cultures

J. Clin. Microbiol. 34(9), 2085-2088

---

**Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W. und The, T.H. (1993)**  
Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection  
J. Infect. Dis. 167, 270-277

**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

**Grob, J.P., Grundy, J.E., Prentice, H.G., Griffiths, P.D., Hoffbrand, A.V., Hughes, M.D., Tate, T., Wimperis, J.Z., Brenner, M.K. (1987)**  
Immune donors can protect marrow-transplant recipients from severe cytomegalovirus infections.  
Lancet 1 (8536), 774-776

**Grow, W.B., Moreb, J.S., Roque, D., Marion, K., Leather, H., Reddy, V., Khan, S.A., Finiewicz, K.J., Nguyen, H., Clancy, C.J., Mehta, P.S., Wingard, J.R. (2002)**  
Late onset of invasive aspergillus infection in bone marrow transplant patients at a university hospital  
Bone Marrow Transplant. 29(1), 15-19

**Grundy, J.E., Ehrnst, A., Einsele, H., Emery, C., Hebart, H., Prentice, H.G., Ljungman, P. (1996)**  
A three-center European external quality control study of PCR for detection of cytomegalovirus DNA in blood  
J. Clin. Microbiol. 34, 1166-1170

**Hadley, S., Karchmer, A.W. (1995)**  
Fungal infections in solid organ transplant recipients  
Infect. Dis. Clin. North. Am. 9, 1045-1074

**Halwachs-Baumann, G., Wilders-Truschnig, M., Enzinger, G., Eibl, M., Linkesch, W., Dornbusch, H.J., Santner, B.I., Marth, E., Kessler, H.H. (2001)**  
Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays  
J. Clin. Virol. 20, 49-57

---

**Hampl, W. und Mertens, T. (2001)**

Zytomegalievirus, 576-581

in: Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulverer  
Urban und Fischer, 8.Auflage

**Hanshaw, J.B. (1968)**

Cytomegalievirus, 2-23

In: Gard, S., Hallauer, C., Meyer, K. F.: Virology monographs;  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York

**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., 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

**Hebart, H., Kanz, L., Jahn, G., Einsele, H. (1998)**

Management of Cytomegalovirus Infection after solid-organ or stem-cell Transplantation  
Drugs 55 (1), 59-72

**Hebart, H., Rudolph, T., Löffler, 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 allogeneic stem cell transplantation  
Bone Marrow Transplant. 30(3), 181-187

**Herold, G. (2000)**

Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung  
Selbstverlag, Köln

**Hiyoshi, M., Tagawa, S., Takubo, T., Tanaka, K., Nakao, T., Higeno, Y., Tamura, K., Shimaoka, M., Fujii, A., Higashihata, M., Yasui, Y., Kim, T., Hiraoka, A., Tatsumi, N. (1997)**

Evaluation of the Amplicor CMV test for direct detection of cytomegalovirus in plasma specimens  
J. Clin. Microbiol. 35, 2692-2694

---

**Ho, M., Miller, G., Atchinson, R.W. (1985)**

Ebstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection  
J Infect. Dis. 152, 876-886

**Ho, M. (1991)**

Cytomegalovirus: biology and infection 249-258  
2. Aufl., Plenum press, New York

**Husni, R.N., Gordon, S.M., Longworth, D.L., Arrogliia, A., Stillwell, P.L., Avery, R.K., Maurer, I.R., Metita, A., Kirby, T. (1998)**

Cytomegalovirus infection is a risk factor for invasive aspergillosis in lung transplant recipients  
Clin. Infect. Dis. 26(3), 753-755

**Jacobson, M.A., Mills, J. (1988)**

Serious cytomegalovirus disease in the acquired immuno-deficiency syndrome (AIDS)  
Ann. Intern. Med. 108, 585-594

**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

**Jacobson, M.A., Zegans, M., Pavan, P.R., O'Donnell, J.J., Sattler, F., Rao, N., Owens, S., Pollard, R. (1997)**

Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy  
Lancet, 349, 1143-1145

**Jahn, G., Kouzarides, T., Mach, M., Scholl, B.C., Plachter, B., Traupe, B., Preddie, E., Satchwell, S.C., Fleckenstein, B., Barrell, B.G. (1987)**

Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus  
J. Virol. 61, 1358-1367

**Jiwa, N.M., van Gemert, G.W., Raap, A.K., van der Rijke, F.M., Mulder, A., Lens, P.F., Salimans, M.M.M., Zwaan, F.E., van Dorp, W., van der Ploeg, M. (1989)**

Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction  
Transplantation 48, 72-77

**Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Lindemann, J. (1993)**

Medizinische Mikrobiologie  
8. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York

---

**Keenan, R.J., Lega, M.J., Dummer, J.S., Paradis, I.L., Dauber, J.H., Rabinowich, H., Yousem, S.A., Hardesty, R.L., Griffith, B.P., Duquesnoy, R.J. (1991)**

Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonay transplantation  
Transplantation, 514, 33-438

**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

**Koehler, M., St. George, K., Ehrlich, G.D., Mirro, J., Neudorf, S.M., Rinaldo, C. (1997)**

Prevention of CMV disease in allogeneic BMT recipients by CMV antigenemia-guided preemptive therapy  
J. Pediatr. Hematol. Oncol. 19, 43-47

**Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S.C., Weston, K., Tomlinson, P., Barell, B.G. (1987)**

Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene  
J. Virol. 61, 125-133

**Kowdley, K.V., Fawaz, K.A., Kaplan, M.M. (1996)**

Extrahepatic biliary stricture associated with cytomegalovirus in aliver transplant recipient  
Transpl. Int. 9(2), 161-163

**Krivot, W., Shapiro, E., Hoogerbrugge, P.M., Moser, H.W. (1992)**

State of art review. Bone marrow transplantation treatment for storages diseases  
Bone Marrow Transplant. 10 [Suppl 1], 87

**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 keukocytes  
J. Med. Virol. 44, 398-405

**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)

**Lautenschlager, I., Nashan, B., Schlitt, H.J., Ringe, B., Wonigeit, K., Pichlmayr, R. (1995)**

Early intragraft inflammatory events of liver allografts leading to chronic rejection  
Transpl. Int. 8, 446-451

**Lea, A.P., Bryson, H.M. (1996)**

Cidofovir  
Drugs 52, 225-230

**Li, C.R., Greenberg P.D., Gilbert, M.J., Goodrich, J.M., Riddell, S.R. (1994)**

Recovery of a HLA-restricted cytomegalovirus (CMV-) specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplantant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis  
Blood 83, 1971-1979

**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

**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

**Ljungman, P., Lore, K., Aschan, J., Klaesson, S., Lewensohn-Fuchs I., Lonnqvist, B., Ringden, O., Winiarski, J., Ehrnst, A. (1996)**

Use of a semiquantitative PCR for cytomegalovirus DNA as a basis for preemptive antiviral therapy in allogeneic bone marrow transplant patients  
Bone Marrow Transplant. 17, 583-587

**Ljungman, P., Aschan, J., Lewensohn-Fuchs, I., Calens, S., Larsson, K., Lonnqvist, B., Mattson, J., Spaelid, E., Winiarski, J., Ringden, O. (1998)**

Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogenic stem cell transplant recipients  
Transplantation 66, 1330-1334

---

**Ljungman, P., Deliliers, G.L., Platzbecker, U., Metthes-Martin, S., Bacigalupo, A., Einsele, H., Ullmann, J., Musso, M., Trenchel, R., Ribaud, P., Bornhauser, M., Cesaro, S., Crooks B., Dekker, A., Gratecos, N., Klingebiel, T., Tagliaferri, E., Ullmann, A.J., Wacker, P. Cordonnier, C. (2001)**

Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients  
Blood 97 (2), 388-392

**Ljungman, P., de La Camara, R., Milpied, N., Volin, L., Russell, C.A., Crisp, A., Webster, A. (2002)**

Randomized study of valgancyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants  
Blood 99(8), 3050-3056

**Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. (1990)**

Use of uracil DNA glucosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions  
Gene 93, 125-128

**Löffler, J.H. (1994)**

Vergleich von PCR, Plasma-PCR und Antigentest zum Nachweis von Cytomegalievirusinfektionen nach Knochenmarkstransplantation  
Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen

**Mach, M., Stamminger, T., Jahn, G. (1989)**

Human cytomegalovirus: recent aspects from molecular biology  
J. Gen. Virol. 70, 3117-3146

**Machado, C.M., Dulley, F.L., Vilas Boas, L.S., Castelli, J.B., Macedo, M.C.A., Silva, R.L., Pallota, R., Saboya, R.S., Pannuti, C.S. (2000)**

CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment or preemptive ganciclovir therapy  
Bone Marrow Transplant. 26, 413-417

**Machida, U., Kami, M., Fukui, T., Kazuyama, Y., Kinoshita, M., Tanaka, Y., Kanda, Y., Ogawa, S., Honda, H., Chiba, S., Mitani, K., Muto, Y., Kazuoki, O., Satoshi, K., 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, 2536-2542

**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
- Martin, D.F., Serra-Modero, J., Walmsley, S., Wolitz, R.A., Macey, K., Georghiou, P., Robinson, C.A., Stempien, M.J. (2002)**  
A controlled trial of valaciclovir as induction therapy for CMV-retinitis  
N. Engl. J. Med., 346, 1119-1126
- 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, A., 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
- McKeating, J.A., Griffiths, P.D., Weiss, R.A. (1990)**  
HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor  
Nature, 343, 659-661
- de Medeiros, C.R., Moreira, V.A., Pasquini, R. (2000)**  
Cytomegalovirus as a cause of very late interstitial pneumonia after bone marrow transplantation  
Bone Marrow Transplant. 26 (4), 443-4
- van der Meer, J.T., Drew, W.L., Bowden, R.A., Galasso, G. J., Griffiths, P.D., Jabs, D.A., Katlama, C., Spector, S.A., Whitley, R.J. (1996)**  
Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis and Cytomegalovirus Infection  
Antiviral Res.32 (3), 119-140
- Meyers, J.D., Flournoy, N., Thomas, E.D. (1982)**  
Nonbacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: A review of ten years` experience  
Rev. Infect. Dis. 4, 1119-1132
- Meyers, J.D., Flournoy, 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

**Mori, T., Okamoto, S., Watanabe, R., Yajima, T., Iwao, Y., Yamazaki, R., Nakazato, T., Sato, N., Nagayama, H., Takayama, N., Hibi, T., Ikeda, Y. (2002)**

Dose-adjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation  
Bone marrow transplantation 29, 777-782

**Muheim, C., Vogel, G., Seydoux, C., Gillet, M., Mosimann, F., von Segesser, L., Sahli, R., Estrade, C., van Melle, G., Meylan, P.R.A. (2002)**

Determination of protracted cytomegalovirus infection in solid organ transplant patients  
Transplant. 74, 226-236

**Müller, G.A., Müller, C.A., Einsele H. (1994)**

Cytomegalovirus infection: how to manage the immunocompromised transplant patient?  
Nephrol. Dial. Transplant. 9, 3-4

**von Mueller, L., Hampl, W., Hinz, J., Meisel, Reip, A., Engelmann, E., Heilbronn, R., Gärtner, B., Krämer, O., Einsele, H., Hebart, H., Ljubicic, T., Löffler, J., Mertens, T. (2002)**

High variability between results of different in-house tests for cytomegalovirus (CMV) monitoring and of a standardized quantitative plasma CMV PCR assay  
J. Clin. Microbiol. 40, 2285-2287

**Nguyen, K. Champlin, R., Giral, 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

**Nichols, W.G., Corey, L., Gooley, T., Drew, W.L., Miner, R., Huang, M. (2001)**

Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load and outcomes  
Blood 97(4), 867-874

- 
- Nichols, W.G., Corey, L., Gooley, T., Davis, C., Boeckh, M. (2002)**  
High risk of death due bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary infection  
J. Infect. Dis. 185(3), 273-282
- Nolte, F.S., Emmens, R.K., Thurmond, C., Mitchell, P.S., Pascuzzi, C., Devine, S.M., Saral, R., Wingard, J.G. (1995)**  
Early detection of human cytomegalovirus viremia in bone marrow transplant recipients with DNA amplification  
J. Clin. Microbiol. 33, 1263-1266
- Oldenburg, N., Lam, K.M.C., Khan, M.A., Top, B., Tacken, 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., Bornhauser, M., Schwerdtfeger, R., Ehninger, G. (2000)**  
Foscarnet-an alternative for cytomegalovirus prophylaxis after allogeneic stem cell transplantation ?  
Ann. Hematol.79, 432-436
- Otto, S.M., Sullivan-Tailyour, G., Malone, C.L., Stinski, M.F. (1988)**  
Subcellular localisation of the major immediate-early protein of human cytomegalovirus at early times after infection  
Virology 162, 478-482
- Peggs, K.S., Preiser, W., Kottaridis, P.D., McKeag, N., Brink, N.S., Tedder, R.S., Goldstone, A.H., Linch, D.C., Mc Kinnon, S. (2000)**  
Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation  
Br. J. Haematol. 111(3), 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
- Percivalle, E., Revello, M.G., Vago, L., Morini, F., Gerna, G. (1993)**  
Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement  
J. Clin. Invest. 92, 663-670
-

- 
- Piiparinen, 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(1), 111-116
- Piiparinen, 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(8), 2945-2952
- Preiser, W., Brauninger, S., Schwerdtfeger, R., Ayliffe, U., Garson, J.A., Brinks, 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 (1-2), 59-70
- 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
- Prentice, H.G. und Kho, P. (1997)**  
Clinical strategies for the management of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant  
Bone Marrow Transplant. 19, 135-142
- 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
- Ramsay, N.K.C., Davies, S. (1991)**  
Bone marrow transplantation for acute leukemia  
Baillieres Clinical Haematol. 4, 483
- Razonable, R., Brown, R.A., Espy, M.J., Rivero, A., Kremers, W., Wilson, J. Groetturm, C., Smith, T.F., Paya, C.V. (2001)**  
Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems  
J. Clin. Microbiol. 39 (12), 4472-4476
-

- 
- Reed, E.C., Bowden, P.S. Dandliker, K.E., Meyers, J.D. (1988)**  
Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bmt  
Ann. Intern. Med. 109, 783-788
- Reed, E.C., Wolford, J.L., Kopecky, K.J., Lilleby, K.E., Dandliker, P.S., Todaro, J.L., McDonald, G.B., Meyers, J.D. (1990)**  
Ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus gastroenteritis in bone marrow transplant patients. A randomized, placebo-controlled trial.  
N. Engl. J. Med. 289, 1-5
- Reinke, P., Fietze, E., Ode-Hakim, S. (1994)**  
Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection  
Lancet, 344, 1737-8
- Reusser, P., Cordonnier, C., Einsele, H., Engelhard, D., Link, D., Locasciulli, A., Ljungman, P. (1996a)**  
European survey of herpesvirus resistance to antiviral drugs in bone marrow transplant recipients  
Bone Marrow Transplant, 17, 813-817
- Reusser, P., Hostettler, B., Attehböfer R. (1996b)**  
Ganciclovir-resistente Zytomegalievirusinfektion: 2 Fälle mit unterschiedlicher Bedeutung  
Schweiz. Med. Wochenschr. 126, 1179-1784
- 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 the preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation  
Blood, 99 (4), 1159-1164
- Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M., Alford, C.A. (1973)**  
Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection  
N. Engl. J. Med. 289, 1-5
- Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., Greenberg, P.D. (1992)**  
Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T-cell  
Science 257, 238-241
- Robain, M., Boufassa F., Hubert, J.-B., Persoz, A., Burgard, M., Meyer, L. and the Seoco/Hemoco study groups (2001)**  
Cytomegalovirus seroconversion as a cofactor for progression of Aids  
Aids 15, 251-256

---

**Roberts, T.C., Brennan, D.C., Buller, R.S., Gaudreault-Keener, M., Schnitzler, M.A., Sternhell, K.E., Garlock, K.A., Singer, G. G., Storch, G.A. (1998)**

Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients  
J. Infect. Dis. 178, 626-635

**Rollag, H., Sagedal, S., Kristiansen, B., Kvale, D., Holter, E., Degre, M., Nordal, K.P. (2002)**

Cytomegalovirus DNA concentration in plasma predicts development of cytomegalovirus disease in kidney transplant patients  
J. Clin. Microbiol. 8, 431-434

**Rubin, R.H. (1989)**

The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation  
JAMA, 261(24), 3607-3609

**Rubin, R.H. (1990)**

Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients  
Rev. Infect. Dis. 12 (Suppl. 7), S754-S766

**Rüger, R., Bornkamm, G.W., Fleckenstein, B. (1984)**

Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome  
J. Gen. Virol. 65, 1352-1356

**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(4), 733-735

**Schaade, L., Kockelkorn, P., Ritter, K., Kleines, M. (2000)**

Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by lightcycler PCR  
J. Clin. Microbiol. 38(11), 4006-4009

---

**Schneeberger, H., Aydemir, S., Muller, R., Illner, W.D., Pfeiffer, M., Theodorakis J., Zanker, B., Land, W. (2000)**

Hyperimmunoglobulin prophylaxis, monitoring and preemptive ganciclovir treatment eliminate the risk of CMV infection to improve patient and renal allograft survival

Transpl. Int. 13 (Suppl.1), 354-358

**Seige, G. (1995)**

Zytomegalie

In: Sizmann, F.C. (Hrsg.): Pädiatrie: 645-647

Hippocrates, Stuttgart

**Seropian, S., Ferguson, D., Salloum, E., Cooper, D., Landry, M.L. (1998)**

Lack of reactivity to CMV pp65 antigenemia testing in a patient with CMV disease following allogeneic bone marrow transplant

Bone Marrow Transplant. 22, 507-509

**Shinkai, M., Bozzette, S.A., Powderly, W., Frame, P., Spector, S.A. (1997)**

Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at a risk for developing human cytomegalovirus disease

J. Infect. Dis. 175(2), 302-308

**Sia, I.G., Wilson, J.A., Espy, M.J., Paya, C.V., Smith, T.F. (2000a)**

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. (2000b)**

Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation

J. Infect. Dis. 181, 717-720

**Spector, S.A., Merrill, R., Wolf, D., Dankner, W.M. (1992)**

Detection of human cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplification

J. Clin. Microbiol. 30, 2359-2365

**Spector, S.A., Hsia, K., Wolf, D., Shinkai, M., Smith, I. (1995)**

Molecular detection of human cytomegalovirus and determination of genotypic ganciclovir resistance in clinical specimens

Clin. Infect. Dis. 21 (Suppl. 2), S170-173

---

**Spector, S.A., Hsia, K., Grager, M., Pilcher, M., Cabral, S., Stempien, M.J. (1999)**

Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS  
J. Virol. 73, 7027-7030

**Stagno, S., Pass R.F., Dworsky, M.E. (1982)**

Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection  
N. Engl. J. Med. 306, 945-9

**St. Jeor und Maciejewski (1993)**

Viruses and bone marrow, edited by Neal S. Young  
Marcel Dekker Inc., New York, Basel, HongKong

**Sullivan, K.M., Dykewicz, C.A., Longworth, D.L., Boeckh, M., Baden, R., Rubin, R.H., Sepkowitz, K.A. (2001)**

Preventing opportunistic infections after hematopoietic stem cell transplantation: The centers for disease control and prevention, infectious diseases society of America, and American society for blood and marrow transplantation. Practice guide-lines and beyond  
Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program) 392-421

**Swenson P.D., Kaplan, M.H. (1985)**

Rapid detection of cytomegalovirus in cell culture by indirect immunoperoxidase staining with monoclonal antibody to an early nuclear antigen  
J. Clin. Microbiol. 21, 669-673

**Tanabe, K., Tokumoto, T., Ishikawa, N., Koyama, I., Takahashi, K., Fuchinoue, S., Kawai, T., Koga, S., Yagisawa, T., Toma, H., Ota, K., Nakajima, H. (1997)**

Comparative study of CMV antigenemia assay, polymerase chain reaction, serology, and shell vial assay in the early diagnosis and monitoring of CMV infection after renal transplantation  
Transplantation 64, 1721-1725

**Thé, T.H., van der Ploeg, M., van der Berg, A.P., Vlieger, A.M., van der Giessen, M., van 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., Williams, H. and Bakran, A. (1998)**

Use of laboratory assays to predict cytomegalovirus disease in renal transplant recipients  
J. Clin. Microbiol. 36, 2681-2685

---

**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 transplantation  
J.Clin. Microbiol. 38(3), 1209-1213

**Trenschel, 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 (6), 665-672

**Vinters, H.V., Ferreiro, J.A. (1993)**  
Pathology of human Cytomegalovirus infection  
In: Molecular aspects of human Cytomegalovirus disease  
Springer, Heidelberg. Berlin, New York

**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  
New Engl. J. Med. 333, 1038-1044

**Weller, T.H., Macaculey, J.E., Criag, J.M., Wirth, P. (1957)**  
Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants illnesses resembling cytomegalic inclusion disease  
Proc. Exp. Biol. (NY) 94, 4-12

**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

**Wiley, C., Grafe, M.R. Kennedy, C., Nelson, J.A. (1988)**  
Human immunodeficiency virus (HIV) and JC virus in an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients with progressive multifocal leukoencephalopathy  
Acta Neuropathol. (Berl.) 76, 338-346

**Wingard, J.R., Mellits, E.D. Sostrin, M.B., Chen, D.V.H., Burns, W.H., Santos, G.H., Vriesendorp, H.M., Beschorner, 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-S804
- Wirgart, B.Z., Claesson, K., Eriksson, B.M., Brundin, M., Tufveson, G., Totterman, T. and Grillner, L. (1996)**  
Cytomegalovirus (CMV) DNA amplification from plasma compared with CMV pp65 antigen (ppUL83) detection in leukocytes for early diagnosis of symptomatic CMV infection in kidney transplant recipients  
Clin. Diagn. Virol. 7, 99-110
- Winston, D.J., Huang, E.S., Miller, M.J., Lin, C.H. Ho, W.G., Gale, R.P., Champlin, R.E. (1985)**  
Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation  
Ann. Intern. Med. 102, 16-20
- 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. (Hrsg.): New strategies in bone marrow transplantation  
Wiley-Liss, New York
- 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., Wirin, D., Shaked, A. (1995)**  
Randomised comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long-term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients  
Lancet, 346, 69-74
- 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

---

**Woo, P.C.Y., Lo, S.K.F., Yuen, K.Y., Peiris, J.S.M., Siau, H., Chiu, E.K.W., Liang, R.H.S., Chan, T.K. (1997)**

Detection of CMV DNA in bone marrow transplant recipients: plasma, versus leukocyte cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by nested PCR

J. Clin. Pathol. 50, 231-235

**Wolf, D.G., Spector, S.A. (1993)**

Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma

Transplantation 56, 330-334

**Wright, H.T. Jr. (1973)**

Cytomegalovirus, 353-388

IN: Kaplan, A.S. (Hrsg.) 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

**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 an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit danken. Mein ganz besonderer Dank gilt seiner engagierten Betreuung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein ebensolcher Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Holger Hebart für die wertvollen Ratschläge und Unterstützung bei der Durchführung und insbesondere Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Löffler möchte ich für die grosse Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen sowie für seine engagierte Betreuung danken. Ohne ihn hätte diese Promotion nicht annähernd so viel Freude bereitet.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Ingrid Kumbier bedanken, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat in mancher schweren Stunde zur Seite stand.

Herrn Meisner und Frau Guenon vom Institut für Medizinische Informationsbearbeitung der Universität Tübingen danke ich für die ausführliche und hervorragende Beratung der statistischen Auswertung meiner Daten.

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

Michael Wirth möchte ich besonderen Dank für die kritische Durchsicht dieser Arbeit aussprechen.

---

Meinem Bruder Marko Ljubicic danke ich für die grosse Hilfsbereitschaft (!) bei der Gestaltung der vorliegenden Arbeit.

Bei meinen Eltern 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 haben.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank Markus, der immer für mich da war.

---

## LEBENS LAUF

Tatjana Ljubcic, geboren am 20.5.1974 in Reutlingen

1980 - 1984	St.-Wolfgang-Grundschule, Reutlingen
1984 - 1993	Friedrich-List-Gymnasium, Reutlingen
1993 - 1995	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1995 - 2002	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/97	Ärztliche Vorprüfung
08/98	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/98 - 04/00	Durchführungen der Experimente der vorliegenden Arbeit
05/00 - 08/00	Auslandssemester an der Universität Basel, CH
03/00	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/00 - 05/01	Praktisches Jahr an der Universität Basel, CH und am Katharinenhospital, Stuttgart
30/04/02	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 10/02	AIP in der SANA-Herzchirurgie, Stuttgart