

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

**Etablierung und Evaluierung einer vollautomatisierten
HCMV- DNA- Extraktionsmethode mittels MagNA Pure,
quantitative Amplifizierung mittels COBAS Amplicor
und klinische Anwendung in einer Phase I/II- Studie**

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

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

**vorgelegt von
Timo Gentner
aus
Tübingen
2004**

Dekan: Professor Dr. med. C. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Einsele

2. Berichterstatter: PD Dr. med. C. Sinzger

INHALTSANGABE

Inhaltsangabe	III
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)	1
1.1.1 Biologie des HCMV.....	1
1.1.2 Geschichte	1
1.1.3 Ablauf der Replikation	2
1.1.4 Epidemiologie und Pathogenese des HCMV	3
1.2 Die HCMV- Infektion und ihre Problematik.....	4
1.3 Risikogruppen	4
1.3.1 Stammzelltransplantierte Patienten.....	4
1.3.1.1 Die Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)	4
1.3.1.2 Probleme der Stammzelltransplantation	5
1.3.1.3 HCMV nach HSCT	6
1.3.2 Organtransplantierte Patienten	8
1.3.3 AIDS- Patienten	9
1.3.4 Neugeborene	9
1.4 Diagnostik	11
1.5 Prophylaxe	13
1.6 Therapie	14
1.6.1 Medikamente.....	14
1.6.2 Therapie am UKT	17
1.6.3 Therapie im Rahmen der Valganciclovirstudie	17
1.7 Definition der HCMV- Erkrankung.....	18
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material und Bezugsquellen	21
2.1.1 Geräte	21

2.1.2 Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.2 Gewinnen von Plasma	24
2.3 COBAS Amplicor CMV Monitor	24
2.3.1 Einführung	24
2.3.2 Übersicht.....	25
2.4 Manuelle Probenvorbereitung.....	26
2.4.1 Herstellung 70%igen Ethanols, Isopropanol.....	26
2.4.2 Herstellung und Verwendung des Lysepuffers	27
2.4.3 Proben und Kontrollen.....	28
2.4.4 Zugabe von Isopropylalkohol.....	29
2.4.5 Pelletgewinnung durch Zentrifugation	29
2.4.6 Zugabe von Ethanol	29
2.4.7 Erneute Zentrifugation	29
2.4.8 Resuspendierung des Pellets	30
2.4.9 Fertigstellung des Gebrauchs- Mastermix	30
2.4.10 Zugabe der Proben.....	30
2.5 Probenvorbereitung mit dem MagNA Pure LC	32
2.5.1 Einführung	32
2.5.2 Vorbereitung des MagNA Pure.....	33
2.5.3 Vollautomatisiertes Protokoll	34
2.5.3.1 Einführung	34
2.5.3.2 Proben und Reagenzien.....	34
2.5.3.3 Prolog	35
2.5.3.4 Protokollstart	35
2.5.3.5 Lyse	35
2.5.3.6 Proteinase K	36
2.5.3.7 Magnetic Glass Particles (MGP).....	36
2.5.3.8 Waschschrift 1	37
2.5.3.9 Waschschrift 2.....	37
2.5.3.10 Waschschrift 3	38
2.5.3.11 Elution	38
2.5.3.12 Ende der Extraktion.....	38

2.5.3.13 Post- Elution	39
2.5.4 Vorstufen der Vollautomatisierung.....	39
2.5.4.1 Protokoll A	39
2.5.4.2 Protokoll B	40
2.5.4.3 Protokoll C	40
2.6 Ablauf im COBAS Amplicor.....	40
2.6.1 Vorbereitung des Geräts.....	40
2.6.2 Amplifikation.....	42
2.6.3 Besonderheiten	44
2.6.3.1 Der Quantifizierungsstandard (QS).....	44
2.6.3.2 AmpErase® (Uracil- N- Glycosylase).....	45
2.6.4 Detektion	46
2.6.4.1 Denaturierung.....	46
2.6.4.2 Reihenverdünnung.....	46
2.6.4.3 Hybridisierung	48
2.6.4.4 Konjugation mit Avidin- Meerrettich- Peroxidase (AMP)	49
2.6.4.5 Substratzugabe	50
2.6.4.6 Absorptionsmessung im Photometer.....	51
2.6.5 Auswertung.....	51
2.7 Erstellen von Verdünnungsreihen	53
2.7.1 Verdünnungsreihe 1.....	53
2.7.2 Verdünnungsreihe 2.....	53
2.7.3 Verdünnungsreihe 3.....	53
2.7.4 Verdünnungsreihe 4.....	53
2.8 Patienten	54
3 Ergebnisse	56
3.1 Protokoll A	56
3.2 Protokoll B	59
3.2.1 Direktvergleich mit der manuellen Extraktion	59
3.2.2 Reproduzierbarkeit.....	63
3.2.3 Verdünnungsreihe.....	64

3.2.4 Kontrollen	65
3.3 Protokoll C	68
3.3.1 Reproduzierbarkeit.....	68
3.3.2 Bestimmung der genauen Sensitivitätsgrenze	73
3.3.4 Standard (QS)	75
3.3.5 Kontrollen	75
3.3.6 Klinische Erprobung	78
3.3.7 Vergleich zur In- House- PCR und zur pp65- Bestimmung.....	78
3.4 Einfluss des Einfrierens auf die Proben.....	81
3.5 Zeitaufwand und Kosten.....	83
4 Diskussion	85
4.1 Stand der Forschung	85
4.1.1 Allgemeines	85
4.1.2 Chemoprophylaxe	85
4.1.3 Präemptive Therapie	87
4.1.4 Diagnostische Möglichkeiten	89
4.1.5 Bedeutung der Viruslast	90
4.1.6 Resistenzen	92
4.1.7 Automatisierung.....	93
4.2 Ergebnisse	94
4.2.1 Leistungsvergleich MagNA Pure versus manuelle Extraktion	94
4.2.1.1 Übereinstimmung der ermittelten Viruslasten.....	94
4.2.1.2 Vergleich der ermittelten Extinktionswerte des QS, der Proben und der Kontrollen.....	95
4.2.1.3 Sensitivität	96
4.2.1.4 Spezifität	97
4.2.1.5 Reproduzierbarkeit.....	98
4.2.1.6 Linearität	99
4.2.1.7 Zuverlässigkeit	99
4.2.1.8 Zeitaufwand und Kosten.....	100
4.2.1.9 Eignung für den Klinikalltag.....	100

4.2.1.10 Zukunft	101
4.3 Klinische Erprobung	101
5 Zusammenfassung.....	104
Literaturverzeichnis	106
Lebenslauf	134
Danksagung.....	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD	Amplifikationsverdünnungsreagens
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Avidin- Merrettich- Peroxidase
AP1	Activating protein 1
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMT	Bone marrow transplantation
BU	Budenosid
CD	Cluster of differentiation
CID	Cytomegalic inclusion disease
CML	Chronisch- myeloische Leukämie
CMM	CMV Monitor
CMV	Cytomegalievirus
CN	Avidin- Meerrettich- Peroxidase- Konjugat
CV	Variabilitätskoeffizient
CY	Cyclosporin
D	Donor
DB	Dextranblaureagens
D- Cup	Detektionsröhrchen
DFM	Dimethylformamid
DIL	Probendiluent
DN	Denaturierungslösung
DNA	Desoxy ribo nucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EBV	Epstein- Barr- Virus
FLU	Fludarabin
G	Genomäquivalente
GvHD	Graft versus host disease
H	High
HAART	Highly active antiretroviral therapy

HCV	Hepatitis C Virus
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Human immundeficiency virus
HLA	Humane Leukocyten- Antigene
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
IE	Immediate early
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Interstitielle Pneumonie
KMT	Knochenmarktransplantation
L	Low
LC	LightCycler
LYS	Lyse- Reagens
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEL	Melphalan
MGPs	Magnetic glass particles
MIE	Major immediate early
MMX	Mastermix
mRNA	Messenger ribo nucleic acid
NA	Nucleic acid
NASBA	Nucleic acid sequence- based amplification
NF- κ B	Nuklearfaktor κ B
NHL	Non- Hodkin- Lymphom
NHP	negatives Humanplasma
PBSCT	Peripheral blood stem cell transplantation
PCR	Polymerase chain reaction
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
QS	Quantifizierungsstandard
R	Recipient
RNA	Ribo nucleic acid
RT	Reverse transcription

SAA	schwere aplastische Anämie
SB	Substrat
TBI	Total body irradiation, Ganzkörperbestrahlung
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
U _L	Unique long
U _S	Unique short
UV	Ultraviolett
VM	Probensuspension
VQ	Quantifizierungsstandardprobe
ZNS	Zentralnervöses System
nm	Nanometer
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
sec	Sekunden
min	Minuten
h	Stunden

1 Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

1.1.1 Biologie des HCMV

Das humane Cytomegalievirus zählt neben den Herpes- Simplex- Viren Typ 1 und Typ 2, Varicella- Zoster- Virus, Epstein- Barr- Virus (EBV) und den humanen Herpesviren 6 (HHV- 6), 7 und 8, zur Familie der humanpathogenen Herpesviren.

HCMV wird auch als humanes Herpesvirus 5 bezeichnet und gehört zur Subfamilie der β - Herpesviren, die sich durch ein enges Wirtsspektrum, einen relativ langen Vermehrungszyklus und eine späte Cytopathologie auszeichnet (Modrow und Falke, 1997; Kayser et al., 1993).

HCMV- infizierte Zellen vergrößern sich und weisen intranukleäre Einschlüsse auf, sogenannte Eulenaugen (Modrow und Falke, 1997), die zur Bezeichnung Cytomegalic inclusion disease (CID) und später zum Terminus Cytomegalievirus führten.

Das Genom des HCMV gilt als das Größte unter den bekannten Herpesviren. Es besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA, ist beim Wildtyp etwa 245.000 Basenpaare lang, bei einem Molekulargewicht von ca. 150 Mio. Dalton (Gelen et al., 1978; St. George et al., 2000). Das Core, bestehend aus dem Genom und einer Proteinmatrix wird durch ein icosaedrisches Capsid geschützt, und wird abschließend von einer Hülle, bestehend aus Tegument und Membran umgeben. Die DNA codiert für etwa 200 Proteine (Chee et al., 1990). Sie lässt sich in zwei Abschnitte einteilen, eine unique long (UL) und eine unique short (US).

1.1.2 Geschichte

Protozoenähnliche Zellen mit großen Einschlüssen wurden erstmals 1881 durch Ribbert beobachtet, der die Nieren eines totgeborenen syphilliskranken Säuglings untersuchte (Ribbert, 1904). 1921 prägten Goodpasture und Talbot den Begriff Cytomegalie und vermuteten eine virale Ursache. Sie verglichen die

Zellveränderungen mit Hautläsionen bei Varicella Zoster (Goodpasture und Talbot, 1921). Die Häufigkeit der CID wurde 1932 durch Farber und Wolbach verdeutlicht, die bei 22 von 183 obduzierten Säuglingen und Kleinkindern mit unterschiedlicher Todesursache, intranukleäre und cytoplasmatische Einschlüsse fanden (Farber und Wolbach, 1932). 1950 zeigten Smith und Vellios, dass die Infektion auch in utero auftreten kann (Smith und Vellios, 1950). Die erste elektronenmikroskopische Darstellung von Viruspartikeln gelang Minder 1953 (Minder, 1953). Smith, Rowe und Weller isolierten 1956 bzw. 1957 unabhängig voneinander HCMV- Stämme (Smith, 1956; Rowe et al., 1956; Weller et al., 1957). Weller schlug als Bezeichnung den Begriff Cytomegalievirus vor.

1.1.3 Ablauf der Replikation

Nach dem Andocken an einen bislang nicht identifizierten Zellrezeptor, CD13 ist daran beteiligt (Soderberg et al., 1993), fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran. Das Nukleokapsid dringt in die Wirtszelle ein und wandert zum Zellkern. Ein Teil der Tegumentproteine wird in den Nukleus verschoben, der Rest bleibt im Zytoplasma. Die Virus- DNA gelangt in den Zellkern und die alpha- beta- gamma- Abfolge der Genexpression schließt sich an. Die immediate- early- oder alpha- Gene können in der infizierten Zelle bereits nach einer Stunde nachgewiesen werden. Sie beeinflussen ihre eigene Regulation und die Expression anderer viraler und zellulärer Gene (Blanton und Tewethia, 1981). Das IE1- Gen, oder auch major immediate early (MIE) kontrolliert die Produktion der immediate early- Genprodukte (Sorg und Stamminger, 1998). Die Aktivierung des MIE ist notwendig für die Einleitung des Replikationszyklus und für die Reaktivierung von HCMV. Prostaglandine, Tumornekrosefaktor α (TNF α), NF- κ B, AP1, Interleukin- 1 β (IL- 1 β), IL- 6 und IL- 10 regulieren den MIE- Promoter hoch (Kline et al., 1998; Hummel und Abecassis, 2002; Paya, 2001). Sie alle sind Produkte aktivierter Makrophagen. Die akute Entzündung könnte daher ein positiver Trigger der HCMV- Reaktivierung sein. MIE- Genprodukte steigern die IL- 6- Produktion. Das könnte bei der HCMV- induzierten Entzündung eine Rolle spielen (Iwamoto und Konicek, 1997;

Lautenschlager et al., 1997a). Vier bis zwölf Stunden nach einer Infektion werden die early- oder beta- Gene exprimiert. Sie codieren unter anderem für virale DNA- Polymerasen und auch DNA- bindende Proteine (Kouzarides et al. 1987). Nach der Replikation viraler DNA folgt die Expression der late- oder gamma- Gene, zu denen Strukturproteine des Viruskapsids und Glycoproteine der Virushülle gehören (Hampl und Mertens, 2001; Jahn et al., 1987). Seine endgültige Hülle könnte das Virus durch die Zellmembran erhalten (Zini et al, 1999). Untersuchungen zeigen, dass die in vivo Replikation sehr viel schneller abläuft als bisher vermutet, bei einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von etwa einem Tag (Emery et al., 1999).

1.1.4 Epidemiologie und Pathogenese des HCMV

HCMV tritt ubiquitär, weltweit und saisonunabhängig auf (St. George et al., 2000; Colimon und Michelson, 1990). Die Übertragung erfolgt durch Schmierinfektion oder direkten Kontakt mit infizierten Personen. Als Erregerreservoir dienen im Wesentlichen Blut, Urin, Faeces, Speichel, zervikale und vaginale Sekrete, Sperma, Muttermilch und Tränen. Die Durchseuchung erfolgt mit zwei Gipfeln, einer während der frühen Kindheit, der andere bei Aufnahme sexueller Tätigkeit (Oethinger, 2000).

Die Seroprävalenz variiert zwischen 30% und 100% in Abhängigkeit von Alter, geografischer Lokalisation, ethnischem und sozioökonomischem Status. In Entwicklungsländern liegt sie bei nahe 100%, die Infektionen erfolgen früh im Leben. In entwickelten Ländern liegt die Prävalenz niedriger, in Mitteleuropa bei 40- 70%. Die Infektionen werden zweigipflig während Jugend und im frühen Erwachsenenalter erworben, mit höheren Durchseuchungsraten in unteren sozioökonomischen Schichten, aber auch in Kindergärten (Stagno und Cloud, 1994). Die mittlere Inkubationszeit liegt bei etwa 4- 8 Wochen (Modrow und Falke, 1997; Hamprecht et al., 2001). Wie andere Herpesviren auch persistiert HCMV in latenter Form lebenslang im Organismus. Es kann während der Erstinfektion, Reaktivierung und Superinfektion mit einem unterschiedlichen Stamm über Monate bis Jahre ausgeschieden und übertragen werden, auch wenn diese asymptomatisch verlaufen (St. George et al., 2000).

1.2 Die HCMV- Infektion und ihre Problematik

Bedingt durch die optimale Anpassung des Virus an seinen Wirt verlaufen sowohl Primär-, als auch Sekundärinfektion meist asymptomatisch. Oft manifestiert sich ein Mononukleose- ähnliches Krankheitsbild, gekennzeichnet durch Fieber, Kopfschmerzen, Lymphocytose, Krankheitsgefühl, Lethargie und Myalgie für einige Wochen. Eine milde Hepatitis kann begleitend auftreten, Pneumonien und zentralnervöse Beteiligung sind selten. Pharyngitis, Transaminasenerhöhungen, Lymphadenopathie und Splenomegalie treten weniger häufig auf, als bei Infektionen mit dem Epstein- Barr- Virus. Ist die Immunität des Wirts aber durch Unreife, Inkompetenz oder Suppression des Immunsystems herabgesetzt, können schwere, teilweise auch letale Verläufe beobachtet werden. Die Cytopathogenität von HCMV führt zur Gewebszerstörung der befallenen Organe, indirekte Faktoren können verstärkend beteiligt sein (Ljungman et al., 2002b; Bissinger et al., 2002). Diskutiert wird eine Beteiligung von HCMV an malignen Prozessen (Doniger et al, 1999; Mattila et al., 2001; Cobbs et al., 2002), Arteriosklerose (Degre, 2002), Diabetes mellitus (Guo und Jia, 1998; Ahlfors et al., 1999), vaskuläre Demenz (Lin et al., 2002b), koronarer Herzerkrankung (Humar et al., 2000; Siennicka et al., 2001) und Autoimmunprozessen (Varani et al., 2002; Newkirk et al., 2001).

1.3 Risikogruppen

1.3.1 Stammzelltransplantierte Patienten

1.3.1.1 Die Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT)

Die Gabe hämatopoetischer Stammzellen, gewonnen aus Knochenmark (BMT), peripherem Blut (PBSCT) oder postpartalem Nabelschnurblut, ist heute die Behandlung der Wahl bei zahlreichen angeborenen und erworbenen Störungen des hämatopoetischen Systems, bei Neoplasien und Autoimmunerkrankungen (Tabbara et al, 2002). Ziel ist es, ein erkranktes, fehlerhaftes Knochenmark mittels Stammzellen durch ein gesundes Knochenmark zu ersetzen und dadurch eine neue Lymphohämatopoese zu schaffen.

Man unterscheidet die autologe Stammzelltransplantation, hierfür werden patienteneigene Stammzellen verwendet und die allogene Stammzelltransplantation, bei der die Stammzellen eines Spenders verabreicht werden. Im Idealfall wäre der allogene Spender ein eineiiger Zwilling, Spender und Empfänger wären genetisch identisch, eine syngene Transplantation. Existiert jedoch kein Zwilling, so wird unter nahen Verwandten, insbesondere den Geschwistern, nach geeigneten Spendern gesucht. Falls kein verwandter Spender ermittelt werden kann, besteht die Möglichkeit der Fremdspende. Um eine möglichst hohe genetische Übereinstimmung zu erzielen, wird eine humane Leukocyten-antigene- (HLA) Gewebetypisierung durchgeführt. Das HLA- System ist eine autosomal kodominant vererbliche Gruppe von Gewebeantigenen (membran-assoziierte Glycoproteine), die auf den Zellen fast aller menschlicher Gewebe vorkommen und sich besonders gut auf Leukocyten, vor allem Blutlymphocyten, nachweisen lassen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Abwehrmechanismen, der Erkennung von körpereigenen und körperfremd und damit auch der Abstoßungsreaktion nach Transplantation. Man versucht daher, für eine Transplantation eine weitgehende Kompatibilität, bestenfalls eine HLA-Identität, zwischen Spender und Empfänger zu erreichen.

1.3.1.2 Probleme der Stammzelltransplantation

Die Graft- versus- host- disease (GvHD) ist eine der Hauptkomplikationen nach allogener HSCT, insbesondere, wenn der Spender nicht verwandt und HLA-ident ist. Man unterscheidet die akute und die chronische GvHD. Die akute GvHD manifestiert sich als Dermatitis, Hepatitis und Enteritis. Ursächlich erkennen T- Zellen des Spenders die HLA- Antigene des Empfängers als fremd. Neben den Organschädigungen kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen (Tabbara et al., 2002; Remberger et al., 2002).

Parallel zur GvHD zeigt sich ein Graft- versus- Tumor- Effekt. Das neue Immunsystem wendet sich gegen eventuell noch vorhandene Tumorzellen und unterstützt so die Radiochemotherapie (Fritze und Matzdorff, 1999; Remberger et al., 2002).

Nach einer HSCT, auch nach hämatopoetischer Rekonstitution (Einsele et al., 2001), sind sowohl die zelluläre (Ozdemir et al, 2002), als auch die hormonelle Immunantwort gestört. Auf zellulärer Ebene betrifft das die T- Zell- Antwort und die Funktion der T- Helfer- Zellen. Hormonell sind IgG2 und IgG4 erniedrigt und die Umschaltung von IgM- auf IgG- Produktion ist gestört (Tabbara et al., 2002). Immunschwäche, Neutropenie, eine GvHD und die dagegen notwendige immunsuppressive Therapie, sowie Schleimhautschädigungen im Rahmen der Konditionierung führen zu einer erhöhten Infektanfälligkeit für Bakterien in der aplastischen Frühphase und für Viren und Pilze, besonders während der ersten drei Monate (Herold, 2002; Einsele et al., 2001). Das Immunsystem stabilisiert sich ohne suppressive Therapie nach etwa 6- 12 Monaten (Tabbara et al., 2002).

Weitere Probleme entstehen durch die Toxizität der Konditionierung, Rezidive und Graft Failure. Auch eine venöse Verschlusskrankheit der Leber wird als häufige Komplikation beschrieben (Tabbara et al., 2002).

1.3.1.3 HCMV nach HSCT

Das Risiko für eine HCMV- Infektion nach Stammzelltransplantation hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Der HCMV- Serostatus von Spender oder Donor (D) und Empfänger bzw. Recipient (R) vor Transplantation ist der wichtigste. Am geringsten ist das Risiko für seronegative Empfänger eines seronegativen Transplantats (R-/D-), werden für den Empfänger nur HCMV- seronegative oder leukocytenfreie Blutprodukte verwendet, ist eine Infektion sehr unwahrscheinlich (Zaia, 2002a, Ljungman et al., 2002a; Boeckh et al., 1999; Einsele et al., 2001). Selten kann jedoch auf den Serostatus des Spenders Rücksicht genommen werden. Wird dann auf einen seropositiven Spender (R-/D+) zurückgegriffen, liegt das Übertragungsrisiko zwischen 20 und 40% (Ljungman, 2002). Die Gabe von Immunglobulinen hat darauf keinen Einfluss. (Ruutu et al., 1997). Bei seropositiven Empfängern (R+/D-, R+/D+) liegt das Risiko für eine Reaktivierung bei etwa 75%, für eine Erkrankung ohne präemptive Therapie zwischen 20 und 30% (Ljungman et al., 2002a). Weitere Risikofaktoren für eine Infektion bzw. Reaktivierung sind nicht HLA- idente Spender und fehlende

Verwandtschaft (Lanino et al., 1993; Ljungman et al., 1998a; Einsele et al., 2001; Meijer et al., 2002), T- Zell- freie Transplantate (Zaia, 2002b; Einsele et al., 2001), CD34- selektierte Stammzellen (Hebart et al., 2001b; Holmberg et al., 1999), Art und Dauer der Konditionierung und Immunsuppression, GvHD (Lin et al. 2002a), das Patientenalter (>20 Jahre) und das Ausbleiben der lymphoiden Rekonstitution (Zaia, 2002a). Positiven Einfluss haben die Verwendung hämatopoetischer Stammzellen aus peripherem Blut (PBSCT) (Trenschel et al., 2000), seropositive Spender bei seropositiven Empfängern (Lin et al., 2002a), und die Gabe prophylaktischer Granulocyt- Transfusionen an den Empfänger bei seropositiven Spendern (Vij et al., 2003).

Aufgrund von Verbesserungen bei Prävention und Management von HCMV- Infektionen ist die Inzidenz der HCMV- Erkrankung nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation von 20- 30% in den frühen 1990ern auf heute 5- 10% gesunken (Zaia, 2002a). Typischerweise tritt eine HCMV- Erkrankung 30 bis 100 Tage nach Transplantation auf (St. George et al., 2000; Einsele et al., 2001). Die Mortalitätsrate liegt immer noch bei 30- 50% (Nguyen et al., 1999; Tabbara et al., 2002).

Außerdem stellen sich neue Probleme wie Rückfälle nach Therapie, ein Durchbrechen der Viruslast unter Therapie und das vermehrte späte Auftreten von HCMV- Erkrankungen nach Tag 100 (Median 169 Tage) bei fast 18% der Patienten (Boeckh et al., 2003). Eine HCMV- Erkrankung vor hämatopoetischer Rekonstitution ist selten, oft assoziiert mit anderen opportunistischen Infektionen und ist prognostisch ungünstig (Limaye et al., 1997).

Klinische Krankheitsbilder sind neben der Hauptmanifestation interstitielle Pneumonie (IP), Ösophagitiden, Gastroenteriden und Hepatitiden (Marre et al., 2000; Einsele et al., 2001). Seltener treten eine HCMV- Retinitis (Crippa et al., 2001), eine Enzephalitis oder eine Polyradikulitis in Erscheinung (Maschke et al., 2002; Wolf et al., 2003).

Auch ein HCMV- Syndrom, gekennzeichnet durch Fieber und Knochenmarksuppression wird beschrieben (Ljungman, 2002). Ferner kann HCMV eine Graft failure induzieren (Ljungman et al, 2002c).

1.3.2 Organtransplantierte Patienten

Seronegative Empfänger seropositiver Organe haben das höchste Risiko für eine HCMV- Erkrankung. Gleiches gilt für Patienten, die gegen die Abstoßungsreaktion eine immunsuppressive Therapie erhalten. Aber auch Sepsis, (post-) operativer Stress und Katecholaminausschüttung allein können über Cytokine (1.1.3) eine Reaktivierung bewirken (Paya, 2001). HCMV- Erkrankungen nach Organtransplantationen bedeuten längere Klinikaufenthalte und höhere Kosten. (Falagas et al., 1997, Kim et al., 2000). Eine hohe Viruslast und ein schneller Anstieg (Sia et al., 2000; Emery et al., 2000), Antikörpergabe gegen T- Zell-Rezeptoren sowie Interaktionen mit HHV- 6, HHV- 7 (Kidd et al., 2000) und Hepatitis C (HCV) (Razonable et al., 2002) sind weitere negativ beeinflussende Faktoren. Das transplantierte Organ selbst spielt auch eine wichtige Rolle. So ist das Risiko bei Lungen-, Herz-, Leber-, Nieren- und Pankreastransplantationen am größten (Paya, 2001). Außerdem ist HCMV assoziiert mit Gefäßschäden und Arteriosklerose (Valantine, 2001), einer erhöhten Abstoßungsgefahr, und einem erhöhten Risiko für sekundäre bakterielle und fungale Infektionen (Lautenschlager et al., 1997b, Ljungman et al, 2002c; van der Bij und Eich, 2001; Lopez- Rocafort und Brennan, 2001).

Auch bei diesem Patientenkollektiv werden vermehrt späte HCMV- Erkrankungen beobachtet (Paya, 2001; Razonable et al., 2001; Slifkin et al., 2001). Inzidenz und Schwere der Erkrankungen sind zunehmend, vermutet wird auch ein negativer Einfluss subklinischer Virusreplikation auf den Erfolg der Transplantation (Paya, 2001; de Maar et al., 2002). Die Erkrankung manifestiert sich meist im transplantierten Organ (Marre et al., 2000), grippeähnliche Beschwerden, Fieber, Neutro- und Thrombopenie treten als allgemeine Symptome auf und werden auch als HCMV- Syndrom bezeichnet (Ljungman, 2002). Das Verhältnis zwischen Abstoßungsreaktion und HCMV scheint bidirektional zu sein. Während eine HCMV- Infektion die Abstoßung fördert (Ljungman, 2002), verursachen die bei der Abstoßung entstehende Entzündung und die notwendige Immunsuppression ein erhöhtes Risiko für HCMV- Infektionen.

1.3.3 AIDS- Patienten

HCMV- Erkrankungen gehören zu den häufigsten opportunistischen Infektionen bei AIDS- Patienten. Vor der Einführung der Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), lag die Inzidenz bei Patienten mit CD4- Lymphocytenzahlen kleiner 50 Zellen pro Mikroliter bei 20- 40%. Mit HAART hat die Inzidenz um 80% abgenommen (Salmon- Ceron, 2001). Patienten, die nicht auf HAART ansprechen, bleiben eine Risikogruppe. Die häufigste Manifestation ist die CMV- Retinitis (59%), gefolgt von ZNS- und systemischer Beteiligung (14%) (Salmon- Ceron, 2001) und gastrointestinaler Beteiligung. Bei ZNS- Manifestation und Polyradikulomyelopathien liegen vermutlich synergistische Effekte von HCMV und HIV vor (St. George et al., 2000; Kolson und Gonzales- Scarano, 2001). Außerdem werden intraokulare Entzündungen beobachtet, die als Immunantwort auf inaktive Retina- Läsionen durch HCMV interpretiert werden (Cassoux et al., 1999; Karavellas et al., 1998; Jacobson et al., 1997).

Risikofaktoren für eine Erkrankung sind Alter, vergangene Jahre seit Erstdiagnose AIDS, weibliches Geschlecht, Homosexualität, CD4- Lymphocytenzahlen < 50, Toxoplasmose und neurologische Erkrankungen (Balslev et al., 1997; Saillour et al., 1997). Neben der direkten Pathogenität des Virus, werden auch CD4- positive Zellen durch HCMV befallen, der HIV- assoziierte Immundefekt wird verstärkt (Robain et al., 2001). HCMV interagiert mit HIV, so gibt es eine gekreuzte Transaktivierung von HIV durch HCMV- Proteine und Co- infektionen von Zellen und Organen, vereinfacht durch verstärkte Fc- Rezeptor- Expression durch HCMV und einen Corezeptor auf Zelloberflächen, ein HCMV- Protein (St. George et al., 2000; McKeating et al., 1990). HCMV spielt eine wichtige Rolle bei der AIDS- Progression (Robain et al., 2001; Spector et al., 1999).

1.3.4 Neugeborene

Das HCMV ist der häufigste Erreger congenitaler und pränataler Virus- infektionen. Eine Übertragung von Mutter auf Kind kann während der Schwangerschaft, während der Geburt und durch Muttermilch erfolgen, wobei

die Viruslast in der Muttermilch höher ist, als in den Milchzellen (Numazaki, 1997; Hamprecht et al., 2001). Der genaue Übertragungsweg auf den Fetus ist unbekannt. Diskutiert werden Lücken in der Plazentabariere und eine direkte Infektion des Syncytiotrophoblast (Hemmings et al., 1998). Durch die hormonelle Umstellung während der Schwangerschaft kann HCMV reaktiviert werden, etwa 10% aller Schwangeren werden zu Virusausscheidern (Modrow und Falke, 1997). Das Risiko für eine Primärinfektion der Schwangeren wird auf ca. 3% geschätzt (Marre et al., 2000). Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Fetus ist bei Primärinfektionen mit 40% weit höher als bei Reaktivierungen mit 10- 20% (St. George et al., 2000; Hampl und Mertens, 2001). Die Inzidenz für eine congenitale HCMV- Infektion liegt zwischen 0.15 und 2% (Gaytant et al., 2002). Die Schwere der Infektion hängt aber nicht davon ab, ob es sich um eine Primärinfektion oder eine Reaktivierung handelt (Gaytant et al., 2002). Man schätzt, dass etwa zehn Prozent der infizierten Kinder, teilweise noch asymptomatisch bei Geburt, früher oder später vielfältige Symptome aufweisen (Modrow und Falke, 1997). Hierzu zählen Hepatosplenomegalie, hämolytische Anämie, Ikterus, Hörschäden, Taubheit, geistige und körperliche Entwicklungsstörungen, interstitielle Pneumonie, Blutbildungsstörungen, insbesondere Thrombocytopenie, petechiale Purpura, Myocarditis, Mikrocephalie, Chorioretinitis, Optikusatrophie, Blindheit, spastische Lähmung, Zahndefekte, Gallengangsatresie, Meningoencephalitis, Krämpfe, kardiovaskuläre Defekte, niedriges Geburtsgewicht und periventrikuläre Verkalkungen. (Modrow und Falke, 1997; Marre et al., 2000; St. George et al., 2000; Oethinger et al., 2000). Bei einer perinatalen Infektion, das heißt zwei Wochen vor oder nach der Geburt, bzw. Infektionen im frühen Säuglingsalter, treten Symptome, wenn überhaupt, dann meist in sehr abgeschwächter Form auf. Frühgeborene haben dabei ein höheres Risiko. Gefürchtet sind primäre Infektionen in den ersten vier Schwangerschaftsmonaten mit schweren Organmanifestationen und teils letalen Verläufen (Marre et al., 2000). Bis zum dritten Lebensmonat des Säuglings korreliert die Virusscheidung im Urin mit dem Risiko einer Erkrankung (St. George et al., 2000).

1.4 Diagnostik

Je nach Patient und Fragestellung ergeben sich für die HCMV- Diagnostik verschiedene Möglichkeiten und Vorgehensweisen. Man unterscheidet indirekte Nachweismethoden von direkten.

Die direkte Anzucht von HCMV mittels Kultur gelingt aus zahlreichen Materialien, wie Urin, Rachenspülwasser, Zervixsekret, Sperma, Muttermilch, Trachealsekret, Liquor, Kammerwasser, Blutzellen und Gewebebiopsien. Die Isolierung erfolgt mittels humaner Fibroblastenkulturen, die charakteristischen cytopathischen Veränderungen (1.1.1) treten nach ein bis vier Wochen Inkubation auf (Oethinger et al., 2000; St. George et al., 2000).

Beschleunigen lässt sich die Dauer durch die sogenannte shell- vial- Culture. Eine Kombination aus kurzer Zellkultur und immunologischem Nachweis viraler Frühantigene (Immediate early- Proteine) durch spezifische monoklonale Antikörper. Die Proben werden auf Fibroblasten zentrifugiert, wobei Infektionen schneller und in höheren Raten auftreten. Durch Immunfluoreszenz werden die Antigen- Antikörper- Komplexe sichtbar gemacht, ein Ergebnis liegt nach ein bis zwei Tagen vor (Marre et al., 2000; Modrow und Falke, 1997). Bei neutropenen Patienten ist die shell- vial- Culture nicht sensitiv genug (Thorner, 2002).

Eine Möglichkeit des direkten Antigennachweises bietet seit den frühen 1990ern der pp65- Antigen- Assay. Granulozyten aus Blut oder Liquor, aber auch Monozyten oder Endothelzellen (St. George et al. 2000) werden isoliert, aufgearbeitet und mit Antikörpern gegen das pp65- Antigen inkubiert. Auch hier wird durch Immunfluoreszenz der Antigen- Antikörper- Komplex sichtbar gemacht. Eine Quantifizierung erfolgt durch die Angabe der pp65- positiven Zellen pro Slide (ca. 100.000 Granulozyten) und korreliert mit der Viruslast im Blut (Thorner, 2002). Der Assay ist sensitiv, aber zeitaufwendig. Eine Automatisierung ist nicht möglich, die Proben müssen schnell verarbeitet werden, außerdem ist er bei ausgeprägter Neutropenie nicht mit ausreichender Sensitivität durchführbar (St. George et al., 2000; Thorner, 2002; Zaia, 2002a).

Ein weiteres Verfahren ermöglicht den Nachweis von Nukleinsäuren. Kary Mullis entwickelte 1985 die Polymerasekettenreaktion (PCR) und bekam dafür 1993 den Chemie- Nobelpreis (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986).

Erregerspezifische Nukleinsäureabschnitte werden enzymatisch vervielfältigt und anschließend detektiert, bei höchster Sensitivität. Sie können aus zahlreichen Materialien gewonnen werden, u.a. Vollblut, Plasma, Leukocyten, Liquor, Urin, BAL, Nabelschnurblut, Fruchtwasser und organischem Gewebe (Hengel, 2000). Die Zuverlässigkeit des Tests wurde durch Untersucher wie Einsele et al. (1991) aufgezeigt und konnte sich immer mehr durchsetzen. Weiterentwicklungen des Nukleinsäure- Amplifikations- Verfahrens, wie der COBAS Amplicor CMV Monitor, erlauben nicht nur den spezifischen Erregernachweis, sondern auch eine quantitative Bestimmung der Viruslast, deren Erfassung im Rahmen von Resistenzentwicklungen und Therapiesteuerung immer mehr Bedeutung gewinnt (Cunha et al., 2002; Shinkai et al., 1997; Humar et al., 1999; Sia et al., 2000; Humar et al., 2002; Grangeot- Keros und Cointe, 2001; Berger und Preiser, 2002; Boeckh et al., 2003; Zaia, 2002a; Emery et al., 1999; Limaye et al., 2001; Piiparinen et al., 2002; Jabs et al., 2002; Gourelain et al., 2003; Sanchez et al., 2001; Funato et al., 2001). Der LightCycler von Roche und die sogenannte Real- Time- PCR könnten in naher Zukunft sehr schnelle und quantitative Bestimmungen möglich machen. Sensitivität, Spezifität, positive und negative prädiktive Werte von pp65-Antigenämie und PCR sind vergleichbar (Caliendo et al., 2000; Camargo et al., 2001). Jedoch liegt der erste positive Befund bei pp65- Antigenämie im Median bei 42 Tagen, bei der PCR bei 35 Tagen nach KMT (Zaia, 2002a). Die HCMV-Pneumonie manifestiert sich ohne Therapie nach etwa 50- 60 Tagen, das heißt die sichere Zeitspanne ist bei der PCR eine Woche länger. Desweiteren kann ein Nachweis von mRNA erfolgen. Hierfür stehen RT (reverse transcription)-PCR und NASBA (Nucleic Acid Sequence- based Amplification) zur Verfügung. Prognostische Aussagekraft hat wohl insbesondere der Nachweis von mRNA der Spätphaseproteine, wie pp67 (Blok et al., 1998; Lam et al., 1998; Gerna et al., 1999).

Der Hybrid Capture- Assay von Digene stellt einen weiteren molekularen Test mit hoher Sensitivität dar (Mazzulli et al., 1999; Hebart et al., 2001a). Die DNA aus Leukocyten wird denaturiert und mit einer RNA- Probe hybridisiert. Die DNA- RNA- Hybride werden gebunden und mit multiplen Antikörpern konjugiert.

Über Chemiluminiszenz kann letztlich ein Signal detektiert werden, das die Anwesenheit von HCMV reflektiert.

Indirekt kann man eine HCMV- Infektion über die Serologie nachweisen. Werden IgG- Antikörper gefunden, spricht das für eine erfolgte Auseinandersetzung mit dem Virus und seine bestehende Latenz. Ein IgG- Titeranstieg und der Nachweis von IgM deuten auf eine Primärinfektion oder Reaktivierung hin (Thorner, 2002; Minamishima und Minematsu, 1998; Grangeot- Keros und Cointe, 2001). Bedeutung findet die Serologie bei Transplantationspatienten lediglich in der routinemäßigen Bestimmung des Immunstatus von Spender und Empfänger vor Transplantation aus bereits angesprochenen Gründen. Bei Immunschwäche oder immunsuppressiver Therapie hat sie nur bedingte Aussagekraft und ist daher unzureichend (St. George et al., 2000; Hengel, 2000).

Ferner kann HCMV histologisch durch seine charakteristischen Zellveränderungen im betroffenen Gewebe und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht keine Unterscheidung unter den Herpesviren (St. George et al., 2000).

1.5 Prophylaxe

Die Prävention der HCMV- Infektion und der HCMV- Erkrankung umfasst prophylaktische und die Virusreplikation unterdrückende Maßnahmen. Allgemeine präventive Maßnahmen gegen eine Infektion sind Hygiene und geschützter Sexualverkehr (St. George et al., 2000). Eine aktive Immunprophylaxe steht bisher nicht zur Verfügung. Existierende Impfstoffe sind nicht ausreichend wirksam. Weitere Impfstoffe werden in klinischen Studien erprobt und entwickelt (Adler et al., 1999; Pass und Burke, 2002; Gonczol und Plotkin, 2001; Temperton, 2002; Berencsi et al., 2001). Bereits angesprochen wurde die empfohlene Verwendung HCMV- freier Blutprodukte bei Risikopatienten.

Medikamentös stehen zwei antivirale Strategien zur Verfügung, die präemptive Therapie und die Chemoprophylaxe. Letztere stellt die Gabe immunologischer oder die Virusreplikation unterdrückende Substanzen direkt nach Transplantation dar. Ziel der präemptiven Therapie ist es, den Ausbruch einer Erkrankung

nach erfolgter Infektion oder Reaktivierung zu verhindern. So wird bei erfolgtem Nachweis von HCMV die Therapie eingeleitet, zu einem Zeitpunkt, bei dem die Infektion in der Regel noch klinisch asymptomatisch verläuft. Das erfordert aber ein möglichst sensitives HCMV- Screening (Einsele et al., 1995). Beide Strategien können auch kombiniert werden, so kann nach Risikoabschätzung ein Hochrisikopatient prophylaktisch, ein Patient mit geringerem Risiko präemptiv behandelt werden. Problematisch bei der präemptiven Therapie ist die Festlegung eines Cutoff- Wertes, ab dem die Therapie eingeleitet werden soll. Bislang existiert keine Empfehlung. Die präemptive Therapie setzt sich trotz Kontroversen, zumindest nach HSCT mehr und mehr durch (Avery et al., 2000). Auf Probleme wie die Compliance, den organisatorischen Aufwand und die Kosten beider Strategien soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

1.6 Therapie

1.6.1 Medikamente

Es stehen zahlreiche Virostatika zur Behandlung zur Verfügung.

Die größten Erfahrungen liegen für Ganciclovir vor. Der Wirkstoff gehört zu den Nukleosid- Analoga. Das abnorme Nukleosidanalogen von Guanin ist im Zuckeranteil verändert. Cytomegalieviren bilden eine virale Kinase (UL97), die bevorzugt Ganciclovir phosphoryliert und damit aktiviert (St. George et al., 2000). Auf diese Weise werden, verglichen mit Acyclovir, höhere Spiegel aktivierter Metabolite bereitgestellt. Der Antimetabolit hemmt als falsches Substrat die virale DNA- Polymerase (UL54). Ganciclovir wird intravenös verabreicht. Es kann zwar auch oral gegeben werden, jedoch ist die Bioverfügbarkeit dann äußerst gering. Außerdem besteht die Möglichkeit eines operativ einsetzbaren intravitrealen Implantats, das erfolgreich bei Retinitis eingesetzt wird (Kuo et al., 2003) und nach einigen Monaten ausgetauscht wird. Wichtigste Nebenwirkung von Ganciclovir ist eine toxische Myelodepression mit daraus resultierender reversibler Pancytopenie, die Neutropenie kann sich als therapielimitierend erweisen (Lüllmann und Mohr, 1999). Hinzu kommt eine Myelosuppression durch HCMV (Randolph- Habecker et al., 2002). Die

Neutropenie kann sekundäre bakterielle und fungale Infekte triggern (Marre et al., 2000). Ein initialer Anstieg der Viruslast kann auftreten (Zaia, 2002a) und muss keine Resistenz zur Ursache haben (Nichols et al., 2001). Bei HSCT-Patienten hat sich gezeigt, dass eine prophylaktische Therapie die Mortalitätsrate nicht senkt (Reusser, 2002), dem positiven Effekt auf die Inzidenz und Schwere von Erkrankungen steht der negative Effekt der Knochenmarktoxizität gegenüber (Winston et al., 1993). Die präemptive Therapie zeigt ebenfalls ein Absenken der Inzidenz und Schwere von HCMV-Erkrankungen ohne unnötige Medikamentengabe (Einsele et al., 1995; Koehler et al., 1997). Die Langzeit-Überlebensrate und die HCMV-bedingten Todesfälle beider Strategien weisen aber keine Unterschiede auf (Boeckh et al., 1996; Stocchi et al., 1999). Eine frühe Therapie bedeutet ferner das vermehrte Auftreten später Erkrankungen nach Tag 100, vermutlich als Folge einer mangelhaften Entwicklung der HCMV-spezifischen Immunantwort (Einsele et al., 2001; St. George et al., 2000; Zaia, 2002a). Außerdem fördern Langzeittherapien, die länger als drei Monate dauern, die Selektion therapieresistenter Viren (Reusser, 2002; Paya, 2002; Chou, 2001; Emery, 2001; Gilbert et al., 2002; Limaye et al., 2000; St. George et al., 2000). Die Vorstufe Valganciclovir, die im Körper rasch zu Ganciclovir hydrolysiert wird, hat eine hohe orale Bioverfügbarkeit und erreicht mit etwa 60% hohe Wirkstoffspiegel (Jung und Dorr, 1999; Brown et al., 1999). Wirksamkeit und Nebenwirkungen, insbesondere die Neutropenie, zeigen ähnliche Ergebnisse, allerdings werden häufiger Diarrhoen beschrieben (Martin et al., 2002; Curran und Noble, 2001; Lalezari et al., 2002). Zugelassen ist es bislang nur zur Therapie der HCMV-Retinitis bei HIV-Patienten (Cocohoba und McNicholl, 2002). Für andere Patientengruppen laufen derzeit vielversprechende Studien, unter anderem hier am UKT für die Gruppe nach HSCT.

Auch Acyclovir ist ein Guanin-Analogon mit verändertem Zuckeranteil. Die Aktivierung erfolgt durch eine Herpesvirus-codierte Thymidinkinase und zelluläre Kinasen. Das aktivierte Anti-Metabolit kumuliert in den virusinfizierten Zellen und hemmt ebenfalls die virale DNA-Polymerase. Es führt nicht zur Myelosuppression, hat aber auch nicht die Potenz von Ganciclovir. Prophylaxe

mit Acyclovir zeigt ein Absinken der HCMV- Infektionen nach HSCT, das heißt weniger präemptive Therapie mit toxischeren Substanzen (Ljungman, 2002), die Inzidenz von Erkrankungen bleibt aber unverändert (Zaia, 2002a). Die Effizienz von Valacyclovir bei HSCT- Patienten wird derzeit getestet.

Foscarnet bedarf keiner intrazellulären Aktivierung durch das Virus. Es blockiert die Pyrophosphat- Bindungsstelle der viralen DNA- Polymerase und der reversen Transkriptase. Die renale Ausscheidung führt zu Nierenfunktionsstörungen (Bregante et al, 2000) und Foscarnet sollte daher ganz schweren Fällen vorbehalten sein (Lüllmann und Mohr, 1999) Die Anwendung kann bei Nichtansprechen, Nichtverwendbarkeit oder Resistenzen gegen Ganciclovir erfolgen, bei genauer Überwachung des Wasser- Elektrolythaushalts (Zaia, 2002a). Über kombinierte Foscarnet- und Ganciclovir- Resistenzen wird berichtet (Reusser et al., 1996). Eine Kombinationstherapie könnte Resistenzentwicklungen entgegen wirken und senkt die Myelosuppression (Bacigalupo et al., 1996; Manfredi et al., 1996).

Cidofovir, ein Cytidin- Analogon mit breiter antiviraler Wirksamkeit kann bei Unwirksamkeit von Ganciclovir und Foscarnet erfolgreich eingesetzt werden (Lea und Bryson, 1996; Ketteler et al., 2000). Aufgrund seiner Nephrotoxizität muss die Cidofovirgabe nach einem strengen Algorithmus mit Probenecidgabe und Hydrierung erfolgen (St. George et al., 2000).

Als Reservemittel steht Fomivirsen zur Verfügung, es hemmt die virusinduzierte Proteinsynthese (Lüllmann und Mohr, 1999, Marwick, 1998).

Der Nutzen von Immunglobulinen ist umstritten. Bei HCMV- Pneumonien gilt die Kombination mit Ganciclovir als Goldstandard (Zaia, 2002a; Nichols und Boeckh, 2000), eine Studie zeigte aber keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen Gabe von Ganciclovir (Machado et al, 2000). Bei anderen Manifestationen zeigt sich ebenfalls kein Vorteil (Ljungman et al., 1998a; Zaia, 2002a). Andere Studien ermitteln jedoch einen Überlebensvorteil, sowie eine verminderte Inzidenz von HCMV- Erkrankungen bei prophylaktischer Gabe (St. George et al., 2000). Nachteilig sind die hohen Kosten.

Als vielversprechende Alternative und Ergänzung zur medikamentösen Therapie wird derzeit die adoptive Immuntherapie mit HCMV- spezifischen T-

Zellen erprobt (Einsele et al., 2002). Dazu werden ex- vivo HCMV- spezifische Spender- T- Zellen gezüchtet, die bei intravenöser Gabe gut vertragen werden. Teilweise wird sogar eine T- Zell- Proliferation und ein Anstieg an HCMV- spezifischen CD4+- Zellen beobachtet. Die Inzidenz von HCMV- Erkrankungen bei Hochrisikopatienten wird gesenkt (St. George et al., 2000).

Zahlreiche neue Medikamente befinden sich in der Entwicklung und Erprobung.

1.6.2 Therapie am UKT

Alle Patienten nach HSCT erhalten eine orale Acyclovir- Prophylaxe (400mg 4x pro Tag) bis Tag 60 nach HSCT zur Vermeidung von Herpes Simplex Infektionen. Die Patienten werden wöchentlich für mindestens 100 Tage durch PCR auf HCMV gescreent. Bei zwei positiven Befunden in Folge startet die präemptive Therapie mit einer Induktionsdosis von Ganciclovir 5mg/ oder alternativ Foscarnet 60mg/ kg Körpergewicht (KG) intravenös (i.v.) jeweils alle zwölf Stunden für 14 Tage. Bei negativer PCR wird die Therapie anschließend beendet, bei persistierender Infektion erfolgt die Gabe einer Erhaltungsdosis von Ganciclovir 6mg/ oder alternativ Foscarnet 90mg/ kg KG i.v. an jeweils 5 Tagen die Woche für weitere 14 Tage. Wieder wird bei negativer PCR die Therapie abgebrochen, sollte sie jedoch weiterhin positiv sein, wird auf das jeweils andere Medikament umgestellt. Bei Nichtansprechen kann kombiniert oder auf Cidofovir zurückgegriffen werden (Einsele et al., 2001). Zuletzt bleibt die Möglichkeit der oben genannten adoptiven Immuntherapie.

1.6.3 Therapie im Rahmen der Valganciclovirstudie

Die Patienten werden ab HSCT Mittwochs für mindestens 100 Tage durch eine quantitative PCR mittels COBAS Amplicor CMV Monitoring auf HCMV gescreent. Im Anschluss an das erste positive Ergebnis, das heißt einer Viruslast > 400/ml, startet am darauffolgenden Freitag die präemptive Therapie. Randomisiert bekommt der Patient die erste Woche entweder Ganciclovir 5mg/ kg KG i.v. alle zwölf Stunden oder Valganciclovir 900mg alle zwölf Stunden. Für die zweite Woche findet ein Crossover statt, das heißt es wird auf das jeweils

andere Medikament in gleicher Dosis umgewechselt. Parallel findet ab Therapiebeginn Montags und Freitags eine quantitative PCR statt. Sollte die PCR am Tag 11 nach Therapiebeginn negativ ausfallen, wird die Therapie nach Tag 14 abgebrochen. Ist sie aber positiv, wird die Therapie mit dem zuletzt erhaltenen Medikament für mindestens eine Woche fortgesetzt, die Dosis wird aber nur noch alle 24h gegeben, das heißt halbiert. Die PCR erfolgt nur noch Freitags. Bei einem positiven PCR- Befund an Tag 15, wird die Therapie für eine weitere Woche fortgesetzt. Fällt der Befund negativ aus, kann abgebrochen werden. Ab Woche 5 kann nach Hausschema weiterverfahren werden. Die quantitative PCR muss jedoch weiterhin wöchentlich fortgeführt werden bis mindestens Tag 100 nach HSCT und mindestens für 28 Tage nach erfolgtem Therapieende. Während der ersten vier Wochen wird der Patient außerdem auf zahlreiche weitere Parameter hin untersucht, unter anderem auch pharmakokinetisch.

1.7 Definition der HCMV- Erkrankung

Auf der 4. internationalen CMV- Konferenz in Paris wurden 1993 erstmals Definitionen aufgestellt (Ljungman und Griffiths, 1993) und 1995 auf der Nachfolgekonzferenz in Stockholm überholt (Ljungman und Plotkin, 1995). Folgende Definitionen wurden 2002 von Per Ljungman (Ljungman et al., 2002b) veröffentlicht, um auf die Veränderungen, neue Methoden und wissenschaftliche Erkenntnisse zu reagieren. Definiert werden die folgenden HCMV-Manifestationen demnach wie folgt:

Für die Diagnose einer Pneumonie sind Symptome und Zeichen der Lungenentzündung und die Detektion von HCMV in einer Bronchoalveolären Lavage (BAL) oder Lungengewebe notwendig. Der parallele Nachweis von fungalen Pathogenen und ihren radiologischen Zeichen spricht eher für eine Pilz- Pneumonie als für HCMV.

Klinische Symptome des oberen und unteren Verdauungstrakts (z.B. Diarrhoe, Nausea, Emesis), ein endoskopischer Befund makroskopischer Schleimhautläsionen und der Nachweis von HCMV in einer Biopsie definieren die gastro-intestinale HCMV Erkrankung.

Die Diagnose HCMV- Hepatitis erfordert ein erhöhtes Bilirubin und/ oder erhöhte Leberenzyme, die Abwesenheit jeglicher anderer dokumentierter Ursache einer Hepatitis und den Nachweis von HCMV im Lebergewebe.

Zentralnervöse Symptome und der Virusnachweis im Liquor definieren die ZNS- Erkrankung.

Typische Läsionen im ophthalmologischen Befund reichen bei der HCMV- Retinitis für die Diagnosestellung.

Bei HCMV- bedingter Nephritis, Cystitis, Myocarditis, Pancreatitis und anderen Organmanifestationen müssen für eine HCMV- Erkrankung jeweilige organ- typische Symptome, charakteristische Zellveränderungen und Virusnachweis in einer Biopsie vorliegen. Der Nachweis von HCMV im Urin reicht für die Diagnose HCMV- Cystitis, auch in Verbindung mit Symptomen, nicht aus.

Grundsätzlich sollte der Virusnachweis mittels Kultur, Histopathologie, Immunohistochemie oder in situ- Hybridisierung erfolgen. Ein positiver PCR- Befund beweist aufgrund seiner hohen Sensitivität keine Erkrankung. Einzige Ausnahme ist der PCR- Nachweis von HCMV im Liquor bei ZNS- Manifestation. Das HCMV- Syndrom nach Organtransplantationen erfordert zumindest die Kombination von Fieber für zwei Tage innerhalb eines Abschnitts von vier Tagen, bei einer Temperatur größer als 38 °C, Neutropenie oder Thrombocyto- penie und den Nachweis von HCMV im Blut.

Die Definition eines HCMV- Syndroms nach Stammzelltransplantation fällt schwer. Fieber und Knochenmarksuppression treten auf. Die Symptome können aber auch durch HHV- 6, HHV- 7 und Adenoviren hervorgerufen werden. Einer Verwendung des Begriffs HCMV- Syndrom sollte daher zumindest der Ausschluss von HHV- 6 vorangehen.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Verbesserung von Diagnostik und Therapie der HCMV- Infektion nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

Für die Amplifikation und Detektion pathogenspezifischer Nukleinsäuren wurden mittlerweile zahlreiche automatisierte Systeme entwickelt. Die zuvor erforderliche Extraktion der Nukleinsäuren wird jedoch in den meisten Labors

weiterhin manuell durchgeführt, ist arbeits- und zeitaufwendig und stellt hohe technische Anforderungen an das Laborpersonal. Die Probenvorbereitung stellt heute in den meisten molekularen Assays die Schwachstelle dar. Eine Automatisierung könnte helfen, menschliche Fehler zu vermeiden, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und das Verfahren zu standardisieren. Ferner könnten Arbeitszeit und damit auch Kosten reduziert werden.

Die Viruslast gewinnt immer größere klinische Bedeutung. Der COBAS Amplicor gestattet mit dem CMV Monitor eine quantitative und spezifische PCR. Neben der Diagnose einer beginnenden Virämie ermöglicht die Viruslast Rückschlüsse auf den Infektionsverlauf, der behandelnde Arzt bekommt Hilfestellung zur Notwendigkeit einer Therapie, sowie deren Fortsetzung und Steuerung. Resistenzentwicklungen können leichter erkannt werden. Die Gefahr einer Übertherapie mit cytotoxischen Virostatika lässt sich möglicherweise reduzieren. Eine Automatisierung der manuellen Extraktion, im folgenden auch als Handextraktion bezeichnet, würde Ergebnisse vom Laborpersonal unabhängig und damit verlässlicher und vergleichbarer machen.

Mit dem MagNA Pure LC System steht ein Pipettierroboter zur vollautomatischen Nukleinsäureextraktion zur Verfügung.

In dieser Arbeit soll eine Kompatibilität beider Systeme entwickelt werden. Dabei soll das MagNA Pure LC System zunächst mit der manuellen Extraktion verglichen werden, um diese dann vollständig zu ersetzen. Ziel ist ein vollautomatisierter quantitativer Nachweis von HCMV- DNA. Nach der Evaluierung der Methode soll die klinische Erprobung ihre Leistungsfähigkeit unter Beweis stellen.

2 Material, Methoden und Patienten

2.1 Material und Bezugsquellen

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

<u>Gerät, Programm</u>	<u>Hersteller, Ort</u>
COBAS Amplicor und Zubehör:	
Cobas Amplicor 35- 2485	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Computer	Compaq Presario
Drucker, Laser Jet III	Hewlett Packard, München
Programm: Amplilink, for Microsoft Office	Roche Diagnostics Instrument Centre Tegimenta AG, Schweiz
MagNA Pure und Zubehör:	
MagNA Pure LC JE 379	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Computer, Vectra VL	Hewlett Packard, München
Drucker, Deskjet 970 Cxi	Hewlett Packard, München
Programm: MagNA Pure LC Ver. 2.1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sonstige Geräte:	
Sterilbank, HERAsafe	Heraeus, Hanau
Photometer, Gene Quant II, RNA/ DNA Calculator	Pharmacia Biotech
Varipetten, Reference (10/100/1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus- akku	Hirschmann Laborgeräte
Vortex Mixer VM- 300	neolab Migge, Heidelberg
Ika MS1 Minishaker	Ika Works Inc., Wilmington, USA
Rotixa/ KS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Ort
COBAS Amplicor:	
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
MagNA Pure:	
MagNA Pure LC Reagent Tub (small) No. 3004066	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Medium Reagent Tub 30 No. 3045501	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Reagent Tub (large) No. 3004040	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Tub Lid (small, medium) No. 3004082	Roche Diagnostics, Mannheim

MagNA Pure LC Tub Lid (large) No. 3004074	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Reaction Tip (large) No. 3004171	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Reaction Tip (small) No. 3004180	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Sample Cartridge No. 3004112	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Cartridge Seal No. 3118827	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Processing Cartridge No. 3004147	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Tip Stand No. 3004155	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Waste Bag No. 3004201	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit No. 3038505	Roche Diagnostics, Mannheim
Sonstige:	
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Stripette 25/ 10/ 5ml	Costar Corporation, Cambridge, USA
EDTA KE/ 9ml Monovette	Sarstedt AG, Nümbrecht
Eppendorf- Röhrchen 1,5/ 2ml safe- lock	Eppendorf, Hamburg
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Falcon- Tubes 15ml/ 50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Latexhandschuhe Safeskin medium	Kimberly- Clark, San Diego, USA
Pipettenspitzen Safeseal 1000/ 100/ 10µl	Biozym Diagnostik GmbH, Hess
Schraubdeckel- Probenröhrchen 2ml	Biozym Diagnostik GmbH, Hess

2.2 Gewinnen von Plasma

Sowohl für die manuelle DNA- Extraktion, als auch für die DNA- Extraktion mittels MagNA Pure wurde Plasma benötigt. Zur Gewinnung wurden 10 ml EDTA- Blut bei 3000/ min 20 min lang zentrifugiert. Im Anschluss wurden aus dem Überstand 2 ml Plasma in ein Eppendorf Gefäß pipettiert, entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut.

2.3 COBAS Amplicor CMV Monitor

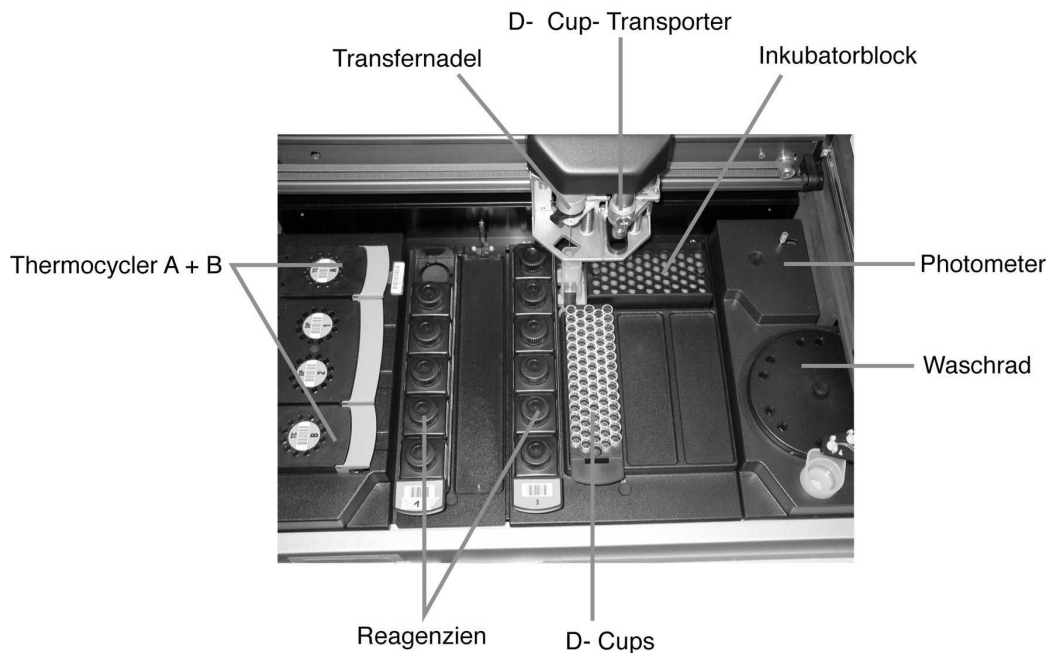
Grafik 1: COBAS Amplicor, Außenansicht



2.3.1 Einführung

Seit 1995 steht mit dem COBAS Amplicor ein Gerät zur automatisierten und standardisierten in vitro- Nukleinsäuren- Amplifikation, Detektion und Auswertung zur Verfügung. Mittlerweile existieren qualitative Test für Hepatitis C Virus (HCV), Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoea, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, sowie quantitative Tests für Hepatitis B Viren, HCV, HIV1 und CMV. Im Gerät integriert sind ein Thermocycler, ein Pipettierroboter, ein Inkubatorblock, eine Waschstation, sowie ein Photometer.

Grafik 2: COBAS AmpliCor, Innenansicht und Aufbau



2.3.2 Übersicht

Um die Plasmaproben mit dem COBAS CMV Monitor zu analysieren, müssen diese vorher unter Verwendung spezieller standardisierter Kits außerhalb des Geräts vorbereitet werden. Nach der Platzierung der Proben im Gerät, dem Bestücken mit Reagenzien und der Datenerfassung im zugehörigen Computersystem AmpliLink, kann das Gerät gestartet werden. Der weitere Ablauf erfolgt dann vollautomatisch.

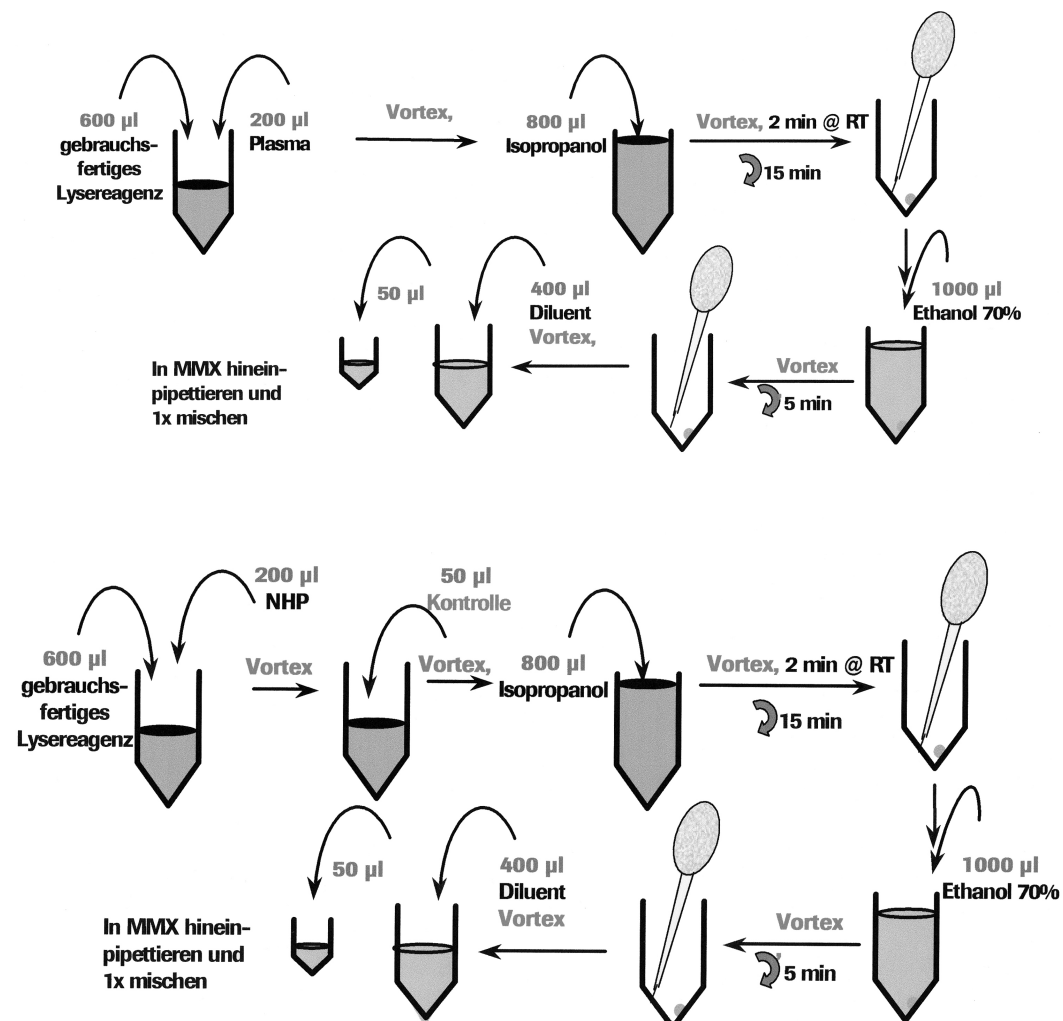
Nach der Amplifikation im Thermocycler werden die Amplifikate denaturiert und anschließend reihenverdünnt. Es folgt eine Hybridisierung an spezifische Sonden, die an magnetische Mikropartikel gebunden sind. Der Nachweis dieser gebundenen Amplifikate erfolgt colorimetrisch durch Reaktion von Avidin-Meerrettich- Peroxidase (AMP) und Tetramethylbenzidin (TMB)- Substrat.

Durch die parallele Amplifikation eines Quantifizierungsstandards (QS) in bekannter Kopienzahl, wird die Viruslast der Probe anhand eines Vergleichs der Extinktionswerte berechnet. Dabei liegt die untere Detektionsgrenze bei einer Viruslast von 400 Kopien/ ml Plasma. Im Bereich 400 bis 100.000 Kopien verläuft der Test linear.

2.4 Manuelle Probenvorbereitung

Die manuelle Probenvorbereitung erfolgte gemäß dem Roche- Protokoll für den COBAS Amplicor CMV- Monitor.

Grafik 3: Ablauf der manuellen Extraktion*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.4.1 Herstellung 70%igen Ethanols, Isopropanol

100%iger Ethanol und destilliertes Wasser wurden im Verhältnis 7:3 in einem sterilen Einmalgefäß vermischt. Isopropanol wurde ebenfalls in ein steriles Einmalgefäß überführt.

2.4.2 Herstellung und Verwendung des Lysepuffers

Das Lysereagens (CMM Lys) wurde in der Hand erwärmt, bis alle Kristalle aufgelöst waren. Der Quantifizierungsstandard (CMM QS) und die Färbelösung (CMM DB) wurden 5- 10 sec, auch über Kopf, gevortext. Jeweils 100 µl CMM QS und CMM DB wurden der Lyse- Reagens zugegeben. Nach erneutem Vortexen war der Lyse- Puffer fertiggestellt. Jeweils 600 µl pro Ansatz (Proben und Kontrollen) wurden in ein zuvor nach Proben beschriftetes Eppendorf Gefäß pipettiert. Geöffnete Reagenzien durften nur für diese Probenaufbereitung verwendet werden, die Reste wurden verworfen.

Tabelle 3: Zusammensetzung CMM LYS

CMM LYS (CMV Monitor Lyse Reagens)
Tris- Hcl- Puffer
68% Guanidinthiocyanat
3% Dithiothreitol
< 1% Glycogen

Tabelle 4: Zusammensetzung CMM QS

CMM QS (CMV Monitor Quantifizierungsstandard)
< 0,001% Nicht infektiöse Plasmid DNA
< 0,005% Poly rA RNA (synthetisch)
EDTA
0,05% Sodiumacid

Tabelle 5: Zusammensetzung CMM DB

CMM DB (CMV Monitor Dextranblaureagens)
< 0,4% Dextranblau
0,05% Sodiumacid

2.4.3 Proben und Kontrollen

Auf die Probenvorbereitung wurde bereits eingegangen. Für jeden Lauf wurde eine negative (-), eine schwach positive (+) und eine stark positive Kontrolle (#) erstellt. Zunächst wurde Humanplasma (NHP) gevortext. Jeweils 200 µl Plasma pro Probe oder 200 µl NHP pro Kontrolle wurden dem jeweiligen markierten Gefäß mit Lyse- Puffer zugegeben, anschließend wurde mindestens 10 sec gevortext. Jeweils 50 µl der Kontrollen CMV (-) C, CMV L (+) C und CMV H (#) C wurden in das entsprechende Tube pipettiert. Entscheidend war ein sofortiges Vortexen für 5- 10 sec. Reste wurden verworfen.

Tabelle 6: Zusammensetzung NHP

NHP (Negatives Humanplasma)
Humanplasma (getestet auf HCV- und HIV- Antikörper und HBs- Antigen)
0,1% ProClin® 300

Tabelle 7: Zusammensetzung HCMV (-)

HCMV (-) Kontrolle (CMV Monitor (-) Kontrolle)
<0,005% Poly rA RNA
EDTA
0,05% Sodiumacid

Tabelle 8: Zusammensetzung HCMV (+)

HCMV L (+) C (CMV Monitor Low (+) Kontrolle)
<0,001% Nicht infektiöse Plasmid DNA
<0,005% Poly rA RNA
EDTA
0,05% Sodiumacid

Tabelle 9: Zusammensetzung HCMV (#)

HCMV H (#) C (CMV Monitor High (#) Kontrolle)
<0,001% Nicht infektiöse Plasmid DNA
<0,005% Poly rA RNA
EDTA
0,05% Sodiumacid

2.4.4 Zugabe von Isopropylalkohol

In jedes Tube wurden 750 µl Isopropylalkohol pipettiert. Direkt nach Zugabe wurde für 5- 10 sec gevortext.

2.4.5 Pelletgewinnung durch Zentrifugation

Proben und Kontrollen wurden 15 min lang bei 14000/ min und Raumtemperatur (25 °C) zentrifugiert. So entstand am Boden der Tubes ein blaues Pellet. Die Überstände wurden sorgfältig durch abpipettieren entfernt. Bei Zentrifugationen unter 12500/ min hätte die Gefahr einer mangelnden Pellet- Bildung und des Probenverlustes bestanden.

2.4.6 Zugabe von Ethanol

Je 1000 µl des zubereiteten 70%igen Ethanol wurden pro Ansatz in die Tubes pipettiert. Eine Trübung durch präzipitierende Nukleinsäuren war möglich.

2.4.7 Erneute Zentrifugation

Es folgte eine weitere Zentrifugation über 5 min bei 14000/ min und Raumtemperatur (25 °C). Wieder musste der Überstand sorgfältig abpipettiert werden. Ethanolreste hätten später die Amplifikation stören können. Das Pellet durfte dabei nicht verletzt werden oder verloren gehen.

2.4.8 Resuspendierung des Pellets

Das Pellet wurde in 400 µl Probendiluent (CMM DIL) resuspendiert. Ungelöstes Material konnte zurückbleiben, in der Regel wurde aber bis zur vollständigen Auflösung des Pellets mindestens 10 sec intensiv gevortext. Die präparierten Proben mussten innerhalb von vier Stunden verwendet werden, konnten aber auch für eine Woche bei -20 °C eingefroren werden. Allerdings war laut Hersteller nur ein einmaliges Einfrieren und Auftauen erlaubt.

Tabelle 10: Zusammensetzung CMM DIL

CMM DIL (CMV Monitor Probendiluent)
Tris- HCl- Puffer
< 0,005% Poly rA RNA (synthetisch)
EDTA
0,05% Sodiumacid

2.4.9 Fertigstellung des Gebrauchs- Mastermix

Die Magnesiumlösung (CMM Mg²⁺) wurde mittels Vortexen gründlich gemischt. Für je 12 Proben und Kontrollen wurden 50 µl Magnesiumlösung in ein Mastermix Tube (CMM Mastermix) pipettiert, anschließend wurde durch 10- 15maliges Kippen gemischt. Auf keinen Fall durfte der Mastermix gevortext werden.

2.4.10 Zugabe der Proben

In jedes A- Ring- Tube wurden 50 µl des Gebrauchs- Mastermix und 50 µl der jeweiligen Probe oder Kontrolle überführt. Dabei durften keine Partikel in den Mastermix überführt werden. Durch Auf- und Abziehen wurden Mastermix und Probe gemischt. Anschließend wurden die A- Ring- Tubes verschlossen. In einer Plastiktüte mit luftdichtem Verschluss durfte der Gebrauchs- Mastermix bis zu 16 Stunden bei 2- 8 °C aufbewahrt werden. Nach Zugabe der Proben und Kontrollen war ein Start im COBAS Amplicor aber innerhalb von 45 min erforderlich. Anderenfalls wären falsch niedrige Ergebnisse die Folge gewesen.

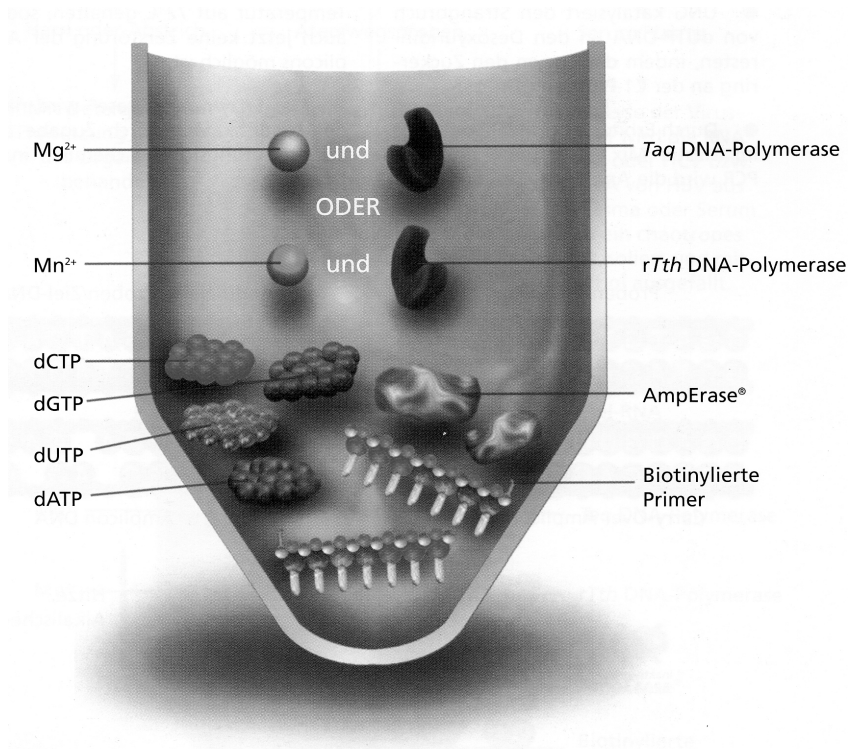
Tabelle 11: Zusammensetzung CMM MMX

CMM MMX (CMV Monitor Mastermix)
< 0,05% Nukleotide (dNTPs): dATP, dGTP, dUTP, dCTP
< 0,01% AmpliTaq® (Taq-Polymerase)
< 0,01% AmpErase®
< 0,01% LC 342 C und LC 383 (biotinylierte Primer)
Tris HCl Puffer
Glycerol

Tabelle 12: Zusammensetzung CMM Mg²⁺

CMM Mg ²⁺ (CMV Monitor Magnesium Reagens)
< 2% Magnesiumchlorid
Farbstoff Fuchschwanz
0,09% Sodiumacid

Grafik 4: Gebrauchsmastermix*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.5 Probenvorbereitung mit dem MagNA Pure LC

Grafik 5: MagNA Pure, Außenansicht

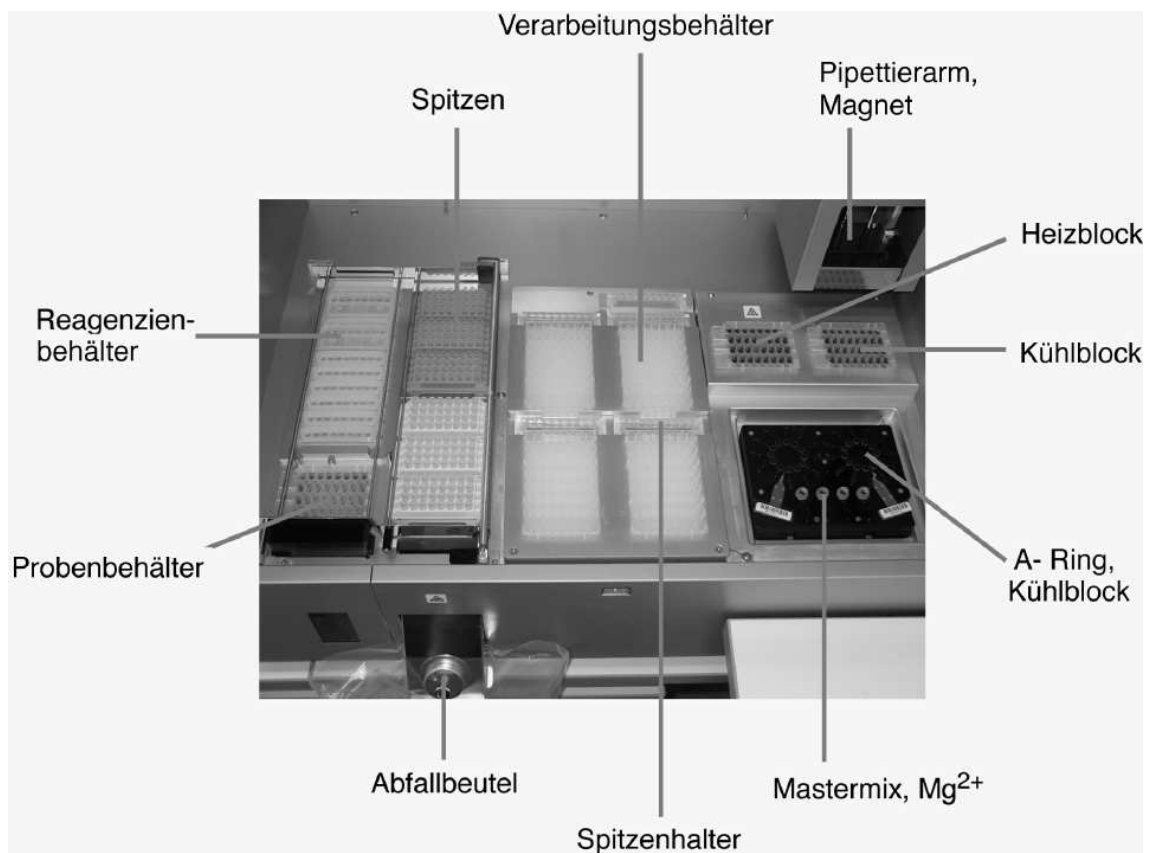


2.5.1 Einführung

Mit dem MagNA Pure LC von Roche steht ein Gerät zur Verfügung, das die Extraktion von Nukleinsäuren, sowohl von DNA, als auch von RNA aus den unterschiedlichsten Materialien wie Plasma, Blut, Serum und Gewebeproben erlaubt. Der vollautomatisierte Pipettierroboter arbeitet dabei bei einer maximalen Abweichung der Pipettiermenge von 2% sehr genau und zeigt sich kontaminationssicher. 32 Proben können parallel extrahiert werden. Im Anschluss ist eine Post- Elution möglich, dabei können Mastermix und Proben für die Amplifikation vorbereitet werden. Ursprünglich für den LightCycler konzipiert, existiert mittlerweile auch ein Einsatz, der die Probenvorbereitung in A- Ringe für den COBAS Amplicor ermöglicht.

Die Extraktion am MagNA Pure erfordert keine Zentrifugation oder andere manuelle Arbeitsschritte. Nach Lyse und Proteinabbau werden die Nukleinsäuren an magnetische Glaspartikel (MGPs) gebunden. Mit Hilfe mehrerer Waschvorgänge werden die Nukleinsäuren dann aufgereinigt und abschließend wieder von den magnetischen Glaspartikeln gelöst. Im Kühlblock warten sie dann auf ihre Weiterverarbeitung.

Grafik 6: MagNA Pure, Innenansicht und Aufbau



2.5.2 Vorbereitung des MagNA Pure

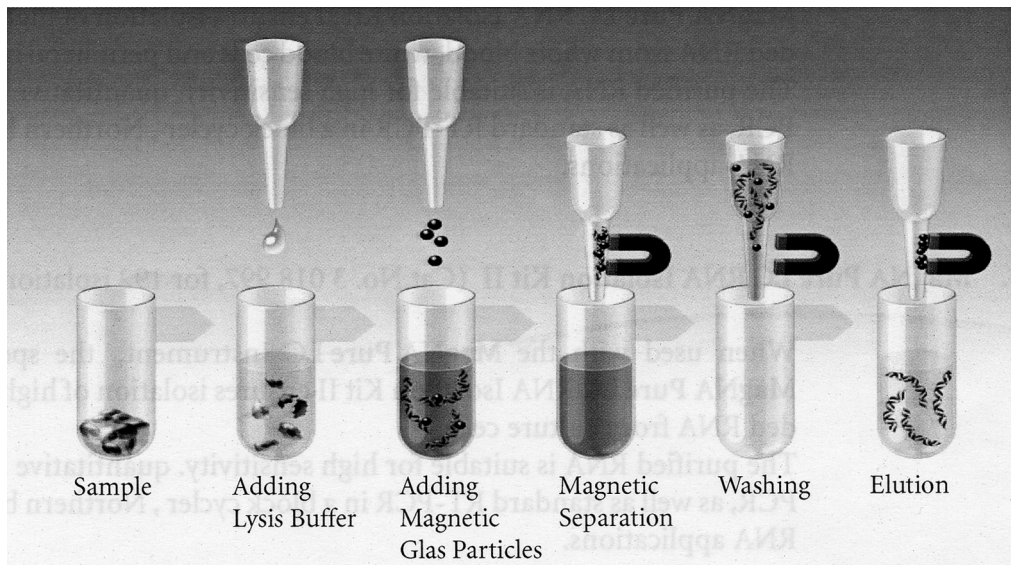
Wartungen wurden gemäß Anleitung durchgeführt. Die Proben wurden nach Aufruf des Programms und der Protokollart (Total NA Serum, Plasma, Blood), nach Festlegung der Volumina von Probe (200 µl), Elution (100 µl) und Dilution (300 µl) im Gerät erfasst. Das Programm errechnete daraus die Bedarfsmenge aller Reagenzien. Nach bildlicher Anleitung wurde das Gerät dementsprechend mit allen Verbrauchsmaterialien bestückt.

2.5.3 Vollautomatisiertes Protokoll

2.5.3.1 Einführung

Nach einigen Vorprotokollen, die später genauer erklärt werden, wurde ein bis auf wenige Schritte vollautomatisiertes Protokoll zur Probenvorbereitung erarbeitet. Grundlage war das Programm Total NA Serum, Plasma, Blood des MagNA Pure LC.

Grafik 7: Extraktion im MagNA Pure*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.5.3.2 Proben und Reagenzien

Zunächst wurden bis auf den Lysis/ Binding Buffer und die Magnetic Glass Particles alle Reagenzienbehälter gemäß Anleitung befüllt. Als Dilution Buffer wurde der CMM DIL verwendet. Die Proteinase K musste in 5 ml Elutionspuffer gelöst und damit gebrauchsfertig gemacht werden. In gelöster Form war sie nur vier Wochen bei 2- 8 °C haltbar. Die ersten drei Positionen (A1, B1, C1) der Sample Cartridge wurden mit 150 µl gevortextem NHP befüllt, die weiteren Positionen mit 200 µl der jeweiligen zu analysierenden und im MagNA Pure erfassten Plasmaproben. Der Lysis/ Binding Buffer wurde mit dem QS versetzt. Dabei wurden 22 µl QS pro ml Lysis/ Binding Buffer in ein steriles Einmalgefäß pipettiert. Wichtig war das gründliche Vermischen durch 10 sec langes

Vortexen. Ebenso gründlich mussten die MGPs vermischt werden, um eine möglichst homogene Lösung zu erhalten. Lysis/ Binding Buffer und MGP wurden in die zugehörigen Behälter des MagNA Pure umpipettiert und auf den entsprechenden Positionen im Gerät platziert. Zuletzt mussten die drei Kontrollen auf A1, B1 und C1 fertiggestellt werden. Dazu wurden je 50 µl der zuvor gemischten Kontrollen CMV (-) C, CMV L (+) C und CMV H (#) C in die entsprechenden Positionen A1, B1, C1 der Sample Cartridge pipettiert, CMV L (+) C zuletzt, da anderenfalls die Negativkontrolle unterhalb des Referenzbereiches ausgefallen wäre. Gemischt wurde durch dreimaliges Auf- und Abziehen. Die Sample Cartridge wurde auf ihre Position gestellt und das Gerät nach nochmaliger Kontrolle aller Positionen gestartet.

2.5.3.3 Prolog

Während des Prologs wurde ein Teil der Reagenzien für den späteren Ablauf in die Process Cartridge vorgelegt. Jede Probenreihe (8 Proben) bekam eine eigene Process Cartridge zugewiesen, für jede Probe standen damit 6 Plätze für die einzelnen Arbeitsschritte in 6 Reihen zur Verfügung. Jeweils 450 µl Waschpuffer III pro Probe wurden in die 5. und 6. Reihe, 450 µl Waschpuffer II pro Probe wurden in die 4. Reihe, 850 µl Waschpuffer I pro Probe in die 3. Reihe und 100 µl Proteinase K pro Probe in die 1. Reihe der Process Cartridge pipettiert. Mit neuen Spitzen wurden je 150 µl Magnetic Glass Particles in die zweite Reihe überführt. Die Spitzen wurden anschließend verworfen.

2.5.3.4 Protokollstart

Je 100 µl Elutionspuffer pro Probe wurden in die zugehörige Position der Elution Cartridge im Heizblock pipettiert. Der Dilutionspuffer CMM DIL wurde in einer Menge von 300 µl pro Probe in der Cartridge im Coolblock vorgelegt.

2.5.3.5 Lyse

Den Proben in der Sample Cartridge wurden 300 µl Lysis/ Binding Buffer- QS-Gemisch zugegeben. Durch Auf- und Abziehen wurde 10 sec lang gemischt.

Der Lysis/ Binding Buffer bewirkte eine komplette Lyse der Probe durch Denaturierung aller Proteine. Die Nukleinsäuren wurden freigesetzt und gleichzeitig stabilisiert. Anschließend wurde das Gemisch auf Klumpenbildung überprüft.

Tabelle 13: Zusammensetzung Lysis/ Binding Buffer

Lysis/ Binding Buffer
Guanidiumthiocyanat
Triton X 100
Keine weiteren Angaben

2.5.3.6 Proteinase K

Die lysierten Proben wurden in die erste Reihe der Process Cartridge pipettiert und durch Auf- und Abziehen 120 sec lang mit der bereits vorgelegten Proteinase K gemischt. Die Proteinase K verdaute dabei die denaturierten Proteine.

Tabelle 14: Zusammensetzung Proteinase K

Proteinase K
Proteinase K
Keine weiteren Angaben

2.5.3.7 Magnetic Glass Particles (MGP)

Anschließend wurde das Gemisch den Magnetic Glass Particles in der zweiten Reihe der Process Cartridge zugegeben. Wieder wurde durch Auf- und Abziehen 30 sec lang gemischt. Dabei banden die Nukleinsäuren an die Oberfläche der MGP. Es handelte sich dabei um Silica- Partikel mit Eisenkern, auf die Magnetit aufkristallisiert worden war. Mittels eines Sinterungsverfahrens wurde außerdem eine Schicht aus porösen Glasschuppen aufgebracht. Als Folge der chaotropischen Salzverhältnisse und der großen ionischen Stärke

des Lysis/ Binding Buffers wurden die Nukleinsäuren an die Glasoberfläche gebunden. Es folgte eine Inkubationsphase, die 6 min dauerte.

Tabelle 15: Zusammensetzung MGP

MGP
Magnetic Glass Particles
Isopropanol
keine weiteren Angaben

2.5.3.8 Waschschrift 1

Die MGPs wurden in die Spitzen abgetrennt und in den Waschpuffer I in Reihe drei der Process Cartridge pipettiert. Ungebundene Substanzen, wie denaturierte Proteine und die PCR- Inhibitoren Heparin und Hämoglobin, wurden entfernt.

Tabelle 16: Zusammensetzung Waschpuffer 1

Waschpuffer I (Wash Buffer I)
Guanidiniumhydrochlorid
Ethanol
keine weiteren Angaben

2.5.3.9 Waschschrift 2

Der Vorgang wiederholte sich zweimal im Waschpuffer II in den Reihen vier und fünf. Dabei wurden verbliebene Verunreinigungen entfernt und die Salzkonzentration verringert.

Tabelle 17: Zusammensetzung Waschpuffer 2

Waschpuffer II (Wash Buffer II)
Ethanol
keine weiteren Angaben

2.5.3.10 Waschschrift 3

Zuletzt wurden die Proben in Reihe 6 im Waschpuffer drei aufbereitet, die letzten Verunreinigungen wurden entfernt und die Salzkonzentration weiter reduziert.

Tabelle 18: Zusammensetzung Wasch Puffer 3

Waschpuffer III (Wash Buffer III)
keine Angaben

2.5.3.11 Elution

Die MGP- Total NA- Komplexe wurden dem Elutionspuffer im Heizblock zugegeben und 6 min lang bei erhöhter Temperatur inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden anschließend 2 min lang im Elutionspuffer abgetrennt und am Ende mit neuen Spitzen, in 100 µl Elutionspuffer gelöst, in den Coolblock überführt. Eventuell noch vorhandene MGP wurden mit Hilfe des Magneten endgültig entfernt.

Tabelle 19: Zusammensetzung Elution Buffer

Elutionspuffer (Elution Buffer)
keine Angaben

2.5.3.12 Ende der Extraktion

Das Gerät zeigte an, welche Proben korrekt extrahiert wurden. Ein Ausdruck war möglich. Wahlweise konnten die Proben verschlossen und bis zu einer Woche bei -20 °C eingefroren oder gleich per Post- Elution weiterverarbeitet werden.

2.5.3.13 Post- Elution

Für die Post- Elution wurden eigene Programme für alle möglichen Probenzahlen von 4- 24 erstellt. Die A- Ringe wurden im zugehörigen Coolblock platziert. Mastermix (CMM MMX) und Magnesium (CMM Mg²⁺) bekamen durch das Programm Positionen im Coolblock zugewiesen, mussten aber vorher in ein 2 ml Schraubdeckel- Gefäß umpipettiert werden. Auf ausreichende Spitzen musste geachtet werden. Zunächst wurden Eluat und CMM DIL durch zehnmaliges Auf- und Abziehen gemischt. Die Spitzen wurden verworfen. 50 µl Magnesium wurden in den Mastermix pipettiert. Das Gerät stoppte nach Nadelabwurf automatisch. Durch mehrmaliges Kippen mit Deckel mussten Mastermix und Magnesium von Hand vermischt werden, da durch Auf- und Abziehen keine ausreichende Mischung möglich war. Nach Bestätigung im Programm fuhr dieses fort. Je 50 µl gebrauchsfertiger Mastermix wurden in die zugehörigen A- Ring- Tubes pipettiert. Anschließend wurden je 50 µl Probe aus dem Coolblock in den zugehörigen A- Ring- Tube pipettiert und durch 5maliges Auf- und Abziehen mit der Mastermixlösung vermischt. Nach Verschluss der Deckel konnten die A- Ringe im COBAS Amplicor platziert und die Analyse gestartet werden. Das Programm zeigte fehlerhafte Proben an, ein Ausdruck war möglich. Der MagNA Pure konnte mittels Desinfektionslösungen oder integriertem UV- Licht gereinigt werden.

2.5.4 Vorstufen der Vollautomatisierung

2.5.4.1 Protokoll A

Während der ersten Versuche wurden 12 µl QS und 12 µl DB direkt der Probe im Sample Cartridge zugegeben. Aufgrund eines Rechenfehlers war die eingesetzte Menge im Verhältnis zur manuellen Extraktion zu groß, korrekterweise hätten je 6,5 µl QS und DB pro Probe eingesetzt werden müssen. Der Lysis/ Binding Buffer wurde unverändert eingesetzt. Der weitere Ablauf der Extraktion erfolgte unverändert. Die Verdünnung des Eluats und die Post- Elution wurden allerdings manuell durchgeführt.

2.5.4.2 Protokoll B

Im Unterschied zum vollautomatisierten Protokoll wurde die Lyse außerhalb des Geräts durchgeführt. Dabei wurde der QS ebenfalls dem Lysis/ Binding Buffer zugegeben. Die Proben wurden aber zunächst in Eppendorf Behälter pipettiert. 300 µl Lysis/ Binding Buffer- QS- Gemisch wurden zugegeben. Anschließend wurde 5 sec gevortext. Die Proben wurden in die Sample Cartridge umgefüllt. Als Programm wurde Total NA Serum, Plasma, Blood External Lysis gewählt, einziger Unterschied ist die Probenmenge (500 µl) und das Überspringen des Lyse- Schritts im Programm. Der CMM DIL wurde von Hand in den Coolblock vorgegeben. Die Post- Elution wurde teilweise manuell durchgeführt. So wurden der Mastermix von Hand durch Magnesiumzugabe gebrauchsfertig gemacht. Außerdem wurden Eluat und CMM DIL durch mehrmaliges Auf- und Abziehen manuell gemischt.

2.5.4.3 Protokoll C

Außer der manuellen Vorgabe des CMM DIL in den Coolblock entsprach das Protokoll der vollautomatisierten Version.

2.6 Ablauf im COBAS Amplicor

2.6.1 Vorbereitung des Geräts

Initial wurde das Gerät mit einem Waschvorgang gestartet, bei dem alle Leitungen, sowie die Transfernadel per Hochdruck gereinigt wurden. Letztere wurde vom Gerät auch auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Im weiteren Ablauf diente die Hochdruckreinigung der Nadel der Kontaminationssicherheit. Die durch die Amplilink Software angezeigten erforderlichen Wartungen wurden gemäß Anleitung von Roche durchgeführt. Der regelmäßige Austausch aller Leitungen, Schläuche, der Transfernadel, des Waschpufferfilters, sowie die Reinigung des Geräts boten ebenfalls Schutz vor Kontaminationen und gewährleisteten die zuverlässige Funktion des Gerätes. Die Proben wurden im

System dem jeweiligen A- Ring zugehörig erfasst. Danach wurde das Gerät mit den erforderlichen, im späteren Verlauf beschriebenen Reagenzien bestückt. Dabei musste der Waschpuffer im Verhältnis 1:9 mit entionisiertem Wasser verdünnt werden. Den Reagenzien VQ4 und VM4 mussten jeweils 2,5 ml VQ PS1 und VM PS1 zugegeben werden um sie gebrauchsfertig zu machen. Ebenso mussten zur Reagens SB3 5 ml SB zugefügt werden. Der Inhalt der Gefäße, sowie deren Ablaufdatum wurden vom System angezeigt und beim Starten des Laufs auf ausreichende Menge hin überprüft. Dabei waren pro Probe bzw. Kontrolle erforderlich:

Tabelle 20: Erforderliche Tests oder Menge an Reagenzien

Reagens	Erforderliche Tests bzw. Menge
DN	1
CN	6
SB	6
VQ	2
VM	4
AD	3
Waschpuffer	Ca. 3,5l für 24 Proben

Im COBAS Amplicor hätten bis zu 72 Proben oder sechs A- Ringe parallel analysiert werden können, wobei mindestens drei Kontrollen hätten mitgeführt werden sollen, von Roche empfohlen werden drei Kontrollen pro A- Ring (12 Plätze). In dieser Arbeit wurden aber maximal zwei A- Ringe parallel im Grundmodus analysiert. Nachdem die A- Ringe im Gerät platziert und per Strichcode- Analyse erfasst wurden, konnte das Gerät gestartet werden. Der weitere Ablauf erfolgte vollautomatisch.

Tabelle 21: Zusammensetzung Waschpuffer

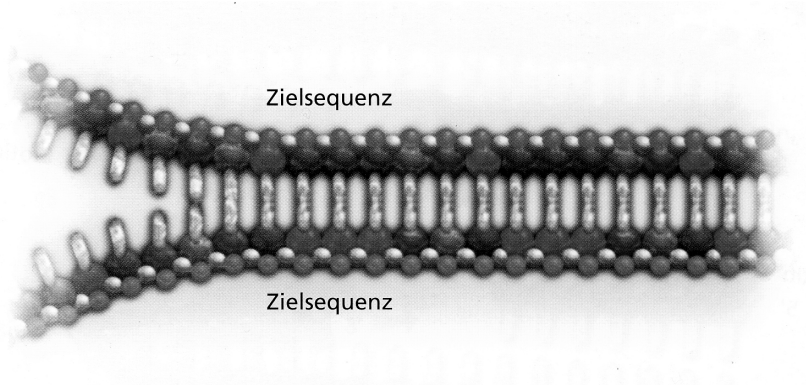
Waschpuffer (Wash Buffer)
< 2% Phosphatpuffer
< 9% Natriumchlorid
EDTA
< 2% Reinigungsmittel
0,5% ProClin 300

2.6.2 Amplifikation

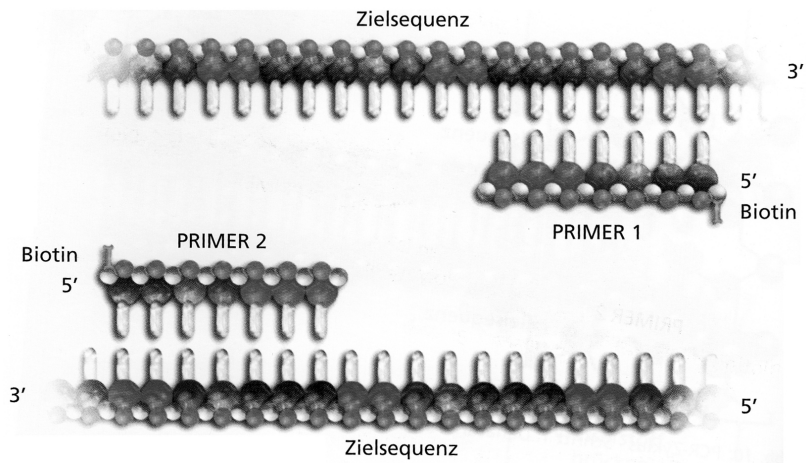
Die Amplifikation im Thermocycler lief in einem PCR- Zyklus, bestehend aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Extension, ab.

Zunächst erfolgte im ersten Schritt die Denaturierung durch Hitze. Bei einer Temperatur größer als 90 °C teilte sich die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge auf, indem Wasserstoffbrücken getrennt wurden. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf etwa 60 °C wurde im zweiten Schritt, dem Annealing, die Zielsequenz durch Anlagerung zweier spezifischer biotinylierter Primer (LC342, LC383) markiert. Die Primer waren synthetisch gewonnene, kurze DNA- Einzelstränge, komplementär zur Ziel- DNA und markierten am jeweiligen Einzelstrang deren Beginn und Ende. Die Ziel- DNA entsprach einem 362 Basen langen Abschnitt im hochkonservierten N- Terminus des HCMV- DNA- Polymerase- Gens. Waren die Primer gebunden, wurde die Temperatur im dritten Schritt, der Extension (Verlängerung) auf etwa 72 °C erhöht. Das Enzym Taq (Thermus aquaticus) DNA- Polymerase vervollständigte die DNA- Stränge, indem es in 5'- 3'- Richtung komplementäre Nukleotide (dNTPs) an die Primer anlagerte. Am Ende des ersten Zyklus hatte man zwei neue DNA- Doppelstränge, die mit der Original- DNA- Zielsequenz identisch waren. Mit Zunahme der Zyklenzahl diente immer öfter ein Strang mit definierter Länge als Vorlage für die Neusynthese, die entstandenen Kopien nennt man Amplicons.

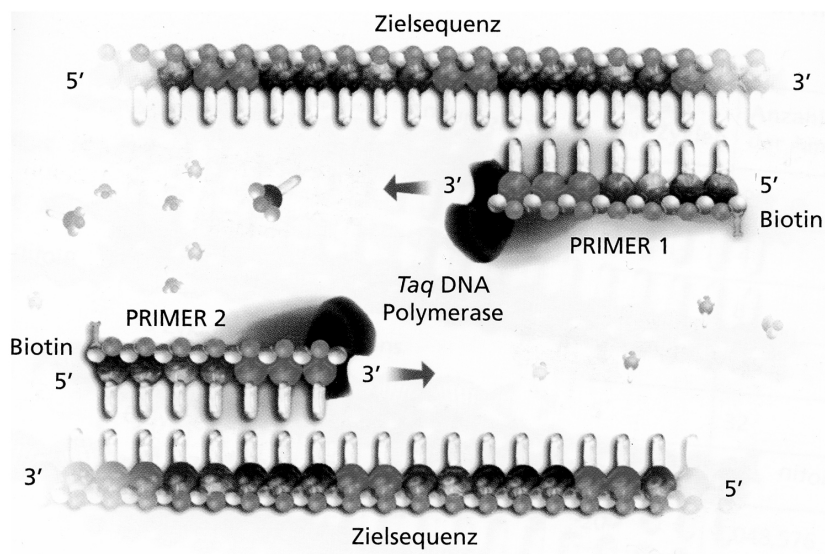
Grafik 8: Denaturierung*



Grafik 9: Annealing*

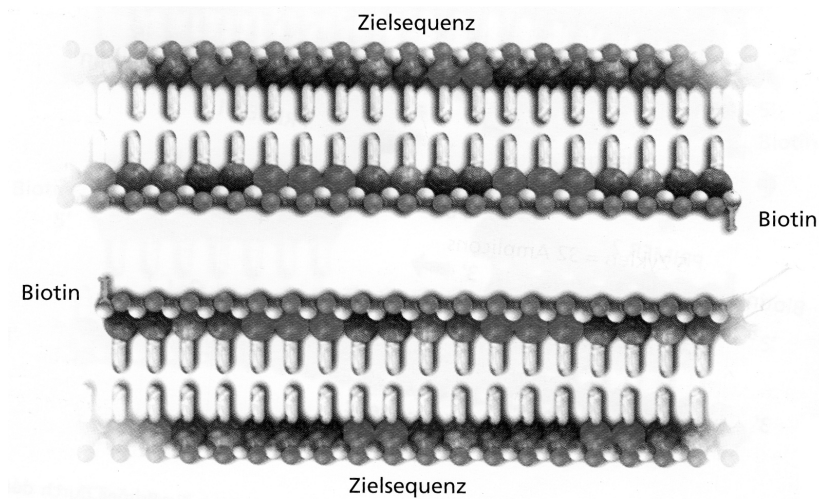


Grafik 10: Extension*

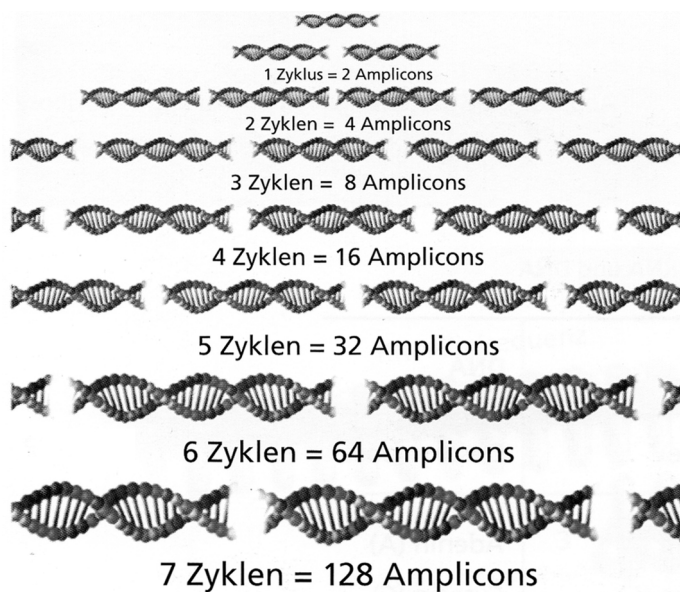


* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

Grafik 11: Amplicon*



Grafik 12: Vervielfältigung der Amplicons*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

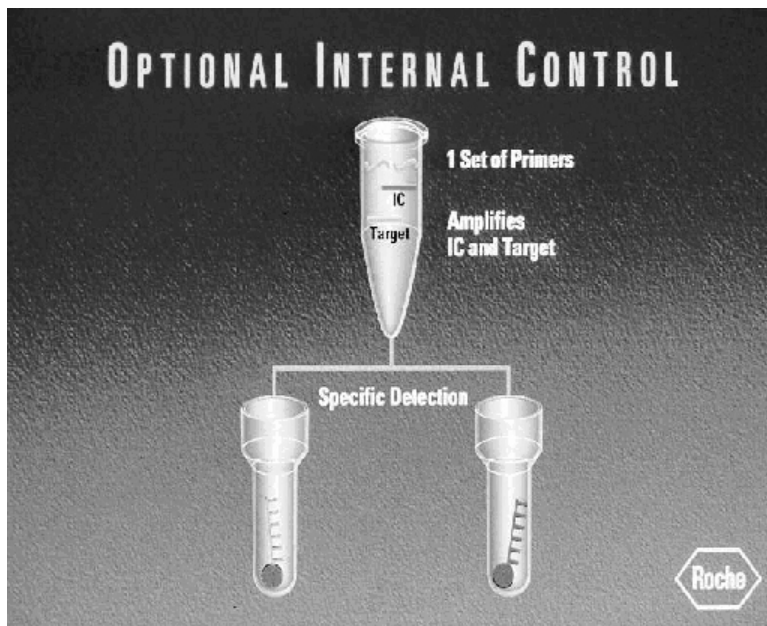
2.6.3 Besonderheiten

2.6.3.1 Der Quantifizierungsstandard (QS)

Der Quantifizierungsstandard (QS) bestand aus nichtinfektiöser DNA. Diese hatte die gleiche Länge, wie die Ziel- DNA der PCR im HCMV- Genom, die gleichen Bindungsstellen für die beiden Primer (LC342, LC383), aber eine andere Sondenbindungsstelle (SK535). Das ermöglichte nach der gemein-

samen PCR eine getrennte Detektion. Der Standard wurde in bekannter Kopienzahl zugefügt und lief sowohl die gesamte Probenvorbereitung, als auch die Amplifikation mit. Somit waren eine interne Inhibitionskontrolle und die Quantifizierung der Viruslast möglich.

Grafik 13: Interne Kontrolle*

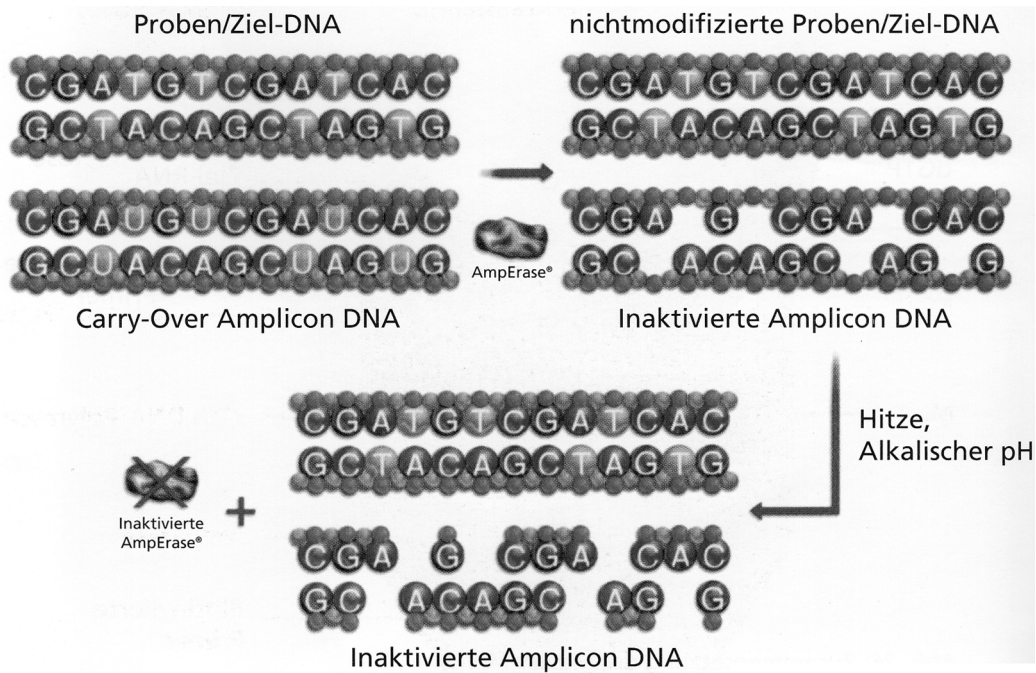


* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.6.3.2 AmpErase® (Uracil- N- Glycosylase)

Amplifizierte Produkte enthalten Desoxyuridin, natürliche DNA dagegen Desoxythymidin, da der Mastermix statt Desoxythymidintriphosphat Desoxyuridintriphosphat als Baustein für die Extension enthält. Im Mastermix befand sich auch das Enzym AmpErase® oder Uracil- N- Glycosylase, das selektiv alle Desoxyuridin- haltigen Amplifikate, sogenannte carry- over Produkte aus früheren Amplifikationen, vor dem ersten Zyklus der PCR zerstört. Da das Enzym oberhalb 55 °C inaktiv ist, betraf das nicht die neuen Amplicons, die immer über dieser Temperatur gehalten wurden. Am Ende der Amplifikation wurde die AmpErase® durch Zugabe einer Denaturierungslösung chemisch inaktiviert. So wurde ein Kontaminationsschutz bei Aerosolen, Pipettierfehlern oder verunreinigten Pipettenspitzen gewährleistet.

Grafik 14: AmpErase®*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.6.4 Detektion

2.6.4.1 Denaturierung

Im Anschluss an die Amplifikation wurden alle Amplicons durch Zugabe einer alkalischen Lösung (DN4) denaturiert. Wegen der hohen ph- Werte brachen die Wasserstoffbrücken, es entstanden wieder Einzelstränge.

Tabelle 22: Zusammensetzung DN4

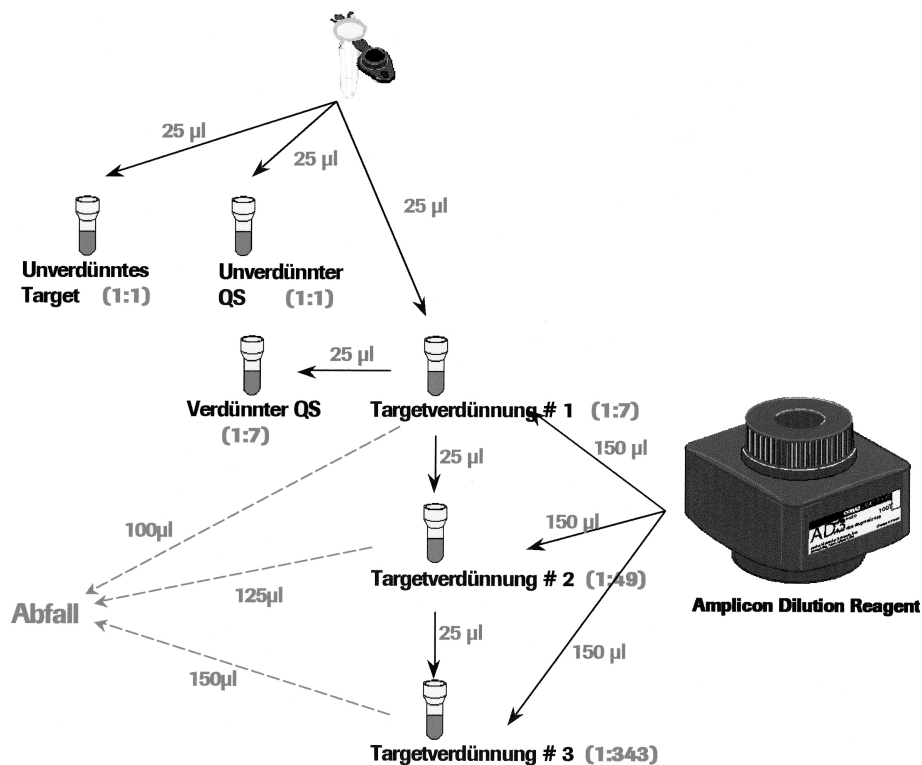
DN4 (Denaturierungslösung)
1,6% Natriumhydroxid
EDTA
Thymolblau

2.6.4.2 Reihenverdünnung

Je 25 µl der Probe wurden aus dem A- Ring- Tube in drei Detektionsröhrchen (D- Cup) überführt. Zwei D- Cups dienten der unverdünnten Detektion von Ziel-

DNA und QS. Der Inhalt des dritten D- Cups wurde mit Hilfe eines Verdünnungsreagens (AD) auf 1:7 verdünnt. Ein Teil der entstandenen Verdünnung diente der QS- Bestimmung, ein weiterer Teil der Ziel- DNA- Bestimmung, ein weiterer Teil wurde wieder 1:7 verdünnt, es entstand eine 1:49 Verdünnung der Erstprobe. Diese diente nur der Detektion von Ziel- DNA. Eine weitere 1:7 bzw. 1:343 Verdünnung schloss sich an. Auch sie diente nur der Bestimmung von Ziel- DNA. Insgesamt entstanden also zwei Konzentrationen zur QS- Bestimmung (1:1 und 1:7) und vier Konzentrationen zur Ziel- DNA- Bestimmung (1:1, 1:7, 1:49, 1:343).

Grafik 15: Ablauf der Verdünnung*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

Tabelle 23: Zusammensetzung AD3

AD3 (Amplifikationsverdünnungsreagens)
EDTA
0,8% Natriumhydroxid

2.6.4.3 Hybridisierung

Im Anschluss an die Verdünnung wurden die D- Cups in den Inkubator (37 °C) transportiert. Die jeweilige Hybridisierungslösung (VM für die Ziel- DNA, VQ für den QS) wurde zugegeben. Sie enthielt magnetische Mikropartikel, die mit spezifischen Oligonukleotid- Fangsonden (LC 359 für die Ziel- DNA, SK 535 für den QS) beschichtet waren. Die Sonden trugen zur Zielsequenz oder zum Standard komplementäre Bindungsstellen. In der Hybridisierungsreaktion wurden die freien Amplicons an die beschichteten Mikropartikel gebunden, die während der folgenden vier Waschschrte in der Waschstation durch einen Magneten im Röhrchen fixiert wurden. Ungebundene Amplicons wurden entfernt. Die Hybridisierung bestimmt die Spezifität des Tests und ist daher der kritische Schritt der Detektion.

Tabelle 24: Zusammensetzung VM PS1

VM PS1 (CMV Probensuspension 1)
MES Puffer
<0,5% Dynabeads®- Lösung
0,09% Sodiumacid

Tabelle 25: Zusammensetzung VM4

VM4 (CMV Probensuspension 2)
Sodium Phosphat Puffer
<0,2% Reinigungsmittel
24,9% Sodium Thiocyanat

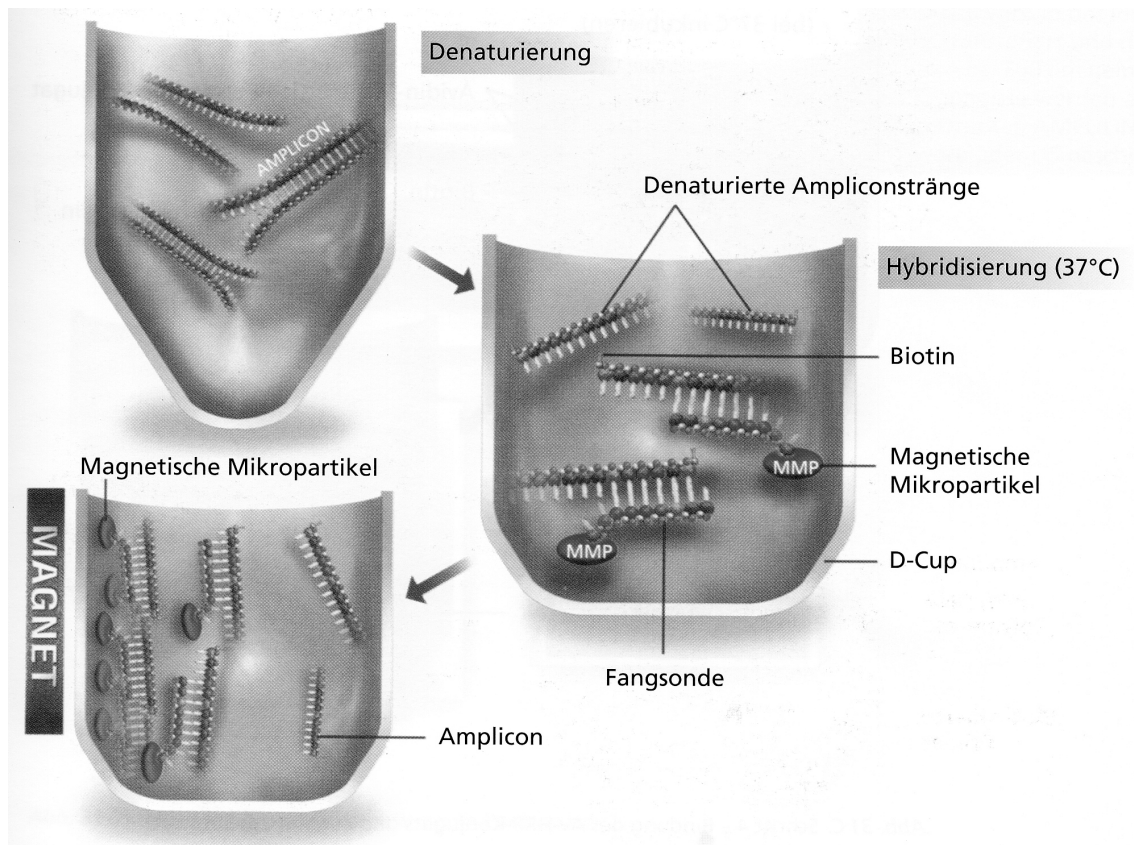
Tabelle 26: Zusammensetzung VQ PS1

VQ PS1 (Quantifizierungsstandardprobe 1)
MES Puffer
<0,1% Dynabeads®- Lösung
0,09% Sodiumacid

Tabelle 27: Zusammensetzung VQ4

VQ4 (Quantifizierungsstandardprobe 2)
Sodium Phosphat Puffer
<0,2% Reinigungsmittel
24,9% Sodium Thiocyanat

Grafik 16: Denaturierung, Hybridisierung und Waschvorgang*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.6.4.4 Konjugation mit Avidin- Meerrettich- Peroxidase (AMP)

Das AMP- Konjugat (CN) wurde automatisch in die D- Cups pipettiert. Dann folgte eine weitere Inkubation im Block bei 37 °C. Avidin besitzt eine große Affinität zu Biotin. Die biotinylierten Primer koppelten das Amplicon samt Sonde und Mikropartikel an die AMP. Es folgte ein weiterer Waschschritt, um nicht gebundene Substanzen zu entfernen.

Tabelle 28: Zusammensetzung CN4

CN4 (Avidin- Meerrettich- Peroxidase- Konjugat)
Tris- HCl Puffer
< 0,001% Avidin- Meerrettich- Peroxidase- Konjugat
Rinderserumalbumin
Emulsit 25
0,1% Phenol
1% ProClin 150

2.6.4.5 Substratzugabe

In einem dritten Inkubationsschritt wurden den D- Cups Tetramethylbenzidin (TMB) und H_2O_2 zugegeben (SB). In Gegenwart von Wasserstoffperoxyd katalysierte die gebundene AMP die Oxidation von TMB. Es entstand ein blauer Farbkomplex.

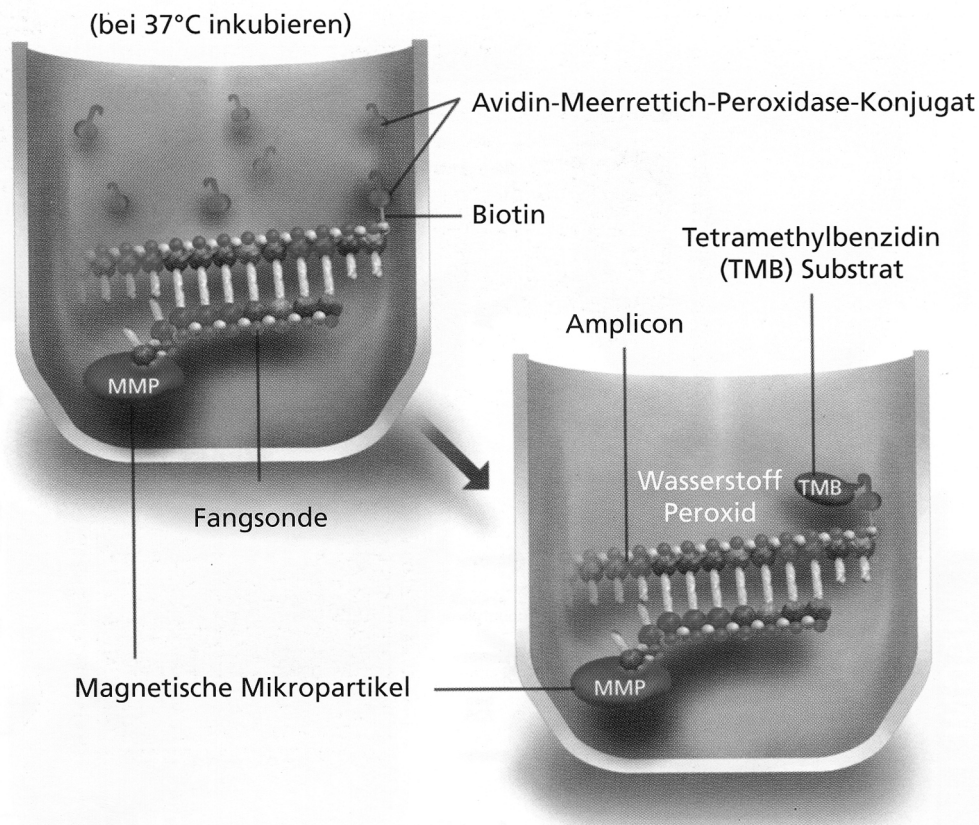
Tabelle 29: Zusammensetzung SB3

SB3 (Substrat A)
Citratlösung
0,01% Wasserstoffperoxyd
0,1% ProClin 150

Tabelle 30: Zusammensetzung SB

SB (Substrat B)
0,1% 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB)
40% Dimethylformamid (DFM)

Grafik 17: Konjugation und Substratzugabe*



* mit freundlicher Genehmigung der Fa. ROCHE, Herr Dr. rer. nat. Klose

2.6.4.6 Absorptionsmessung im Photometer

Dem letzten Inkubationsschritt folgend, wurden die D- Cups ins Photometer überführt. Die Absorption jeder Probe bzw. Konzentration wurde bei 660 nm gemessen. Der Substratleerwert wurde abgezogen.

2.6.5 Auswertung

Aus den Extinktionen berechnete das System die Viruslast in Kopien/ ml Plasma gemäß folgender Formel:

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

Tabelle 31: Legende zur Formel

Dabei entsprechen:	
Titer	Zielsequenz in Kopien/ml Plasma
Kopienzahl (QS)	Konzentration des QS (Kopien/ml) in der Probe
Probenfaktor	Faktor zur Umwandlung Kopien/PCR in Kopien/ml (40)
Extinktion (T)	Extinktion der Probe innerhalb eines linearen Bereichs des Photometers, welche nach der Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die größte Gesamt-Absorption (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

Alle Daten wurden an die Computersoftware Amplilink weitergeschickt. Die einzelnen Extinktionswerte mussten durch den Benutzer auf Plausibilität hin überprüft werden. Sie mussten mit der Verdünnung stetig abnehmende Werte zeigen. Die Kontrollproben (-), (+) und (#) mussten innerhalb der vorgegebenen Grenzwerte liegen. Außerdem durfte keine Fehlermeldung erscheinen. Dann galten die Ergebnisse im Bereich 400 bis 100.000 Kopien/ ml Plasma als valide. Proben mit Werten über 100.000 sollten verdünnt erneut eingesetzt werden. Die Ergebnisse konnten ausgedruckt werden.

2.7 Erstellen von Verdünnungsreihen

2.7.1 Verdünnungsreihe 1

Die Virologie der Universität Tübingen stellte eine Probe mit AD 169 Gesamt-Genom- DNA zur Verfügung. Die Probe wurde durch die Virologen im Biophotometer vermessen. Das Ergebnis zeigte bei zwei Verdünnungen eine Konzentration von 26ng/ µl doppelsträngige DNA in der Probe. Daraus wurde errechnet, dass bei 240.000 Basenpaaren Größe 260 Mio. Kopien/ µl in der Probe vorlagen. Die Probe wurde in acht Stufen 1:10 verdünnt. Eigenes Plasma wurde durch eine PCR im COBAS Amplicor als CMV- negativ getestet. Mit Hilfe des Plasmas wurden 18 Verdünnungsstufen von 400 bis 100.000 Kopien/ ml Plasma erstellt.

2.7.2 Verdünnungsreihe 2

Eine eigene Vermessung der selben unverdünnten Probe im Biophotometer ergab eine DNA- Konzentration von 13,2 ng/ µl. Daraus wurde eine Kopienzahl von 50 Mio. Kopien/ µl in der Probe, bei 240.000 Basenpaaren Größe, errechnet. Wieder wurde in acht Stufen 1:10 verdünnt. Mit Plasma wurden erneut 18 Verdünnungsstufen von 400 bis 100.000 Kopien/ ml Plasma erstellt.

2.7.3 Verdünnungsreihe 3

Patientenplasma mit bekannter HCMV- Quantifizierung und eigenes, mittels PCR im COBAS Amplicor auf HCMV negativ getestetes Plasma wurden gepoolt. Fünf Verdünnungsstufen mit Kopienzahlen von 160 bis 100.000 Kopien/ ml Plasma wurden erstellt.

2.7.4 Verdünnungsreihe 4

Patientenplasma mit bekannter HCMV- Quantifizierung und eigenes, mittels PCR im COBAS Amplicor auf HCMV negativ getestetes Plasma wurden gepoolt. Sechs Verdünnungsstufen im Bereich 200- 700 Kopien/ ml Plasma wurden erstellt.

2.8 Patienten

Prospektiv wurden 33 Patienten im Rahmen der Valganciclovir- Studie in die klinische Erprobungsphase eingeschlossen. Darunter waren 31 Patienten, die eine HSCT am Klinikum erhalten hatten. Ein Patient war zur Behandlung einer GvHD im Klinikum, seine HSCT war in einer anderen Klinik erfolgt. Des weiteren wurde ein Patient mit geplanter HSCT untersucht, der einen positiven IgM- Befund aufgewiesen hatte.

Eine Zusammenfassung der Patientenmerkmale, mit Ausnahme des letzten Falls zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle 32: Patientenmerkmale

		Anzahl Patienten
Geschlecht	Männlich	19
	Weiblich	13
Alter in Jahren	Durchschnitt	44
	Median	42
	Spannweite	24- 64
Grunderkrankung	AML	5
	ALL	6
	CML	5
	Plasmocytom	6
	MDS	2
	NHL	3
	SAA	1
	Aplastisches Syndrom	1
	Plasmazell- Leukämie	1
	PNH	1
	Malignes Melanom	1

Transplantation	Allogen fremd, HLA- ident	17
	Allogen fremd, HLA- mismatch	2
	Allogen familiär, HLA- ident	13
Stammzellen	PBSCT	21
	BMT	11
HCMV- Serostatus	D+/ R+	19
	D+/ R-	6
	D-/ R+	6
	D-/ R-	1
Konditionierung	CY	3
	TBI/ CY	19
	TBI/ CY/ FLU	3
	FLU/ MEL	6
	BU/ CY	1
Beobachtungszeitraum pro Patient in Tagen	Durchschnitt	53
	Median	52
	Spannweite	1- 121

Dabei bedeutet: AML: akute myeloische Leukämie, ALL: akute lymphatische Leukämie, CML: chronisch- myeloische Leukämie, MDS: Myelodysplastisches Syndrom, NHL: Non- Hodkin- Lymphom, SAA: schwere aplastische Anämie, PNH: paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, CY: Cyclosporin, TBI: Ganzkörperbestrahlung, FLU: Fludarabin, MEL: Melphalan, BU: Budenosid

Retrospektiv wurden 59 Plasmaproben analysiert. Die Proben wurden im Rahmen einer anderen Doktorarbeit 2001 mittels COBAS Amplicor analysiert und eingefroren.

3 Ergebnisse

3.1 Protokoll A

36 Plasmaproben wurden retrospektiv untersucht. Davon waren 35 Proben in der im Rahmen einer anderen Doktorarbeit erfolgten quantitativen PCR im COBAS Amplicor positiv, eine Probe hatte ein negatives Ergebnis.

Bei der erneuten Untersuchung mit Protokoll A waren drei Ergebnisse aufgrund einer zu geringen Extinktion des QS invalide. Folglich war bei 33 Proben ein Vergleich mit den alten Werten möglich.

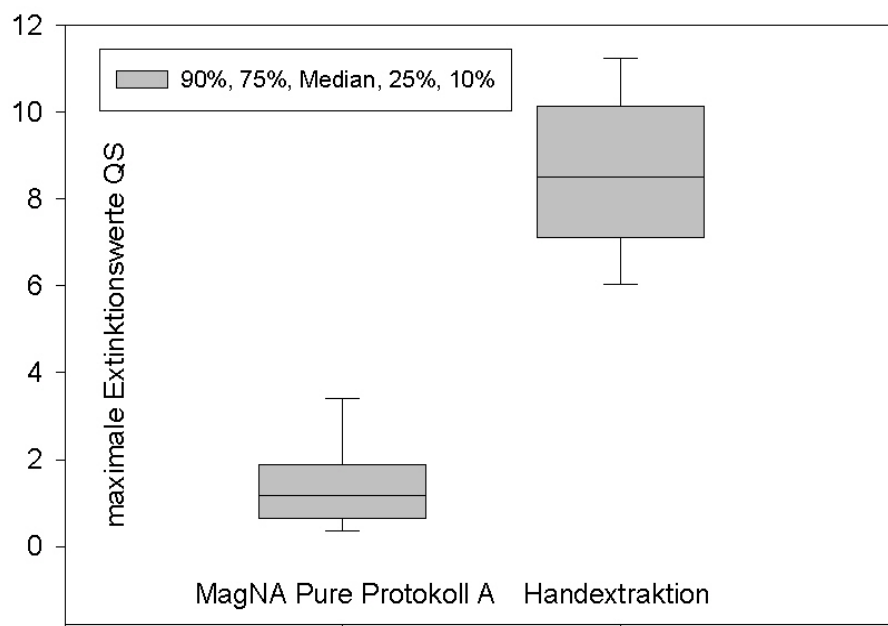
Tabelle 33: Protokoll A versus Handextraktion alt

	negativ MagNA Pure	positiv MagNA Pure	insgesamt
negativ Hand	1	0	1
positiv Hand	18	14	32
insgesamt	19	14	33

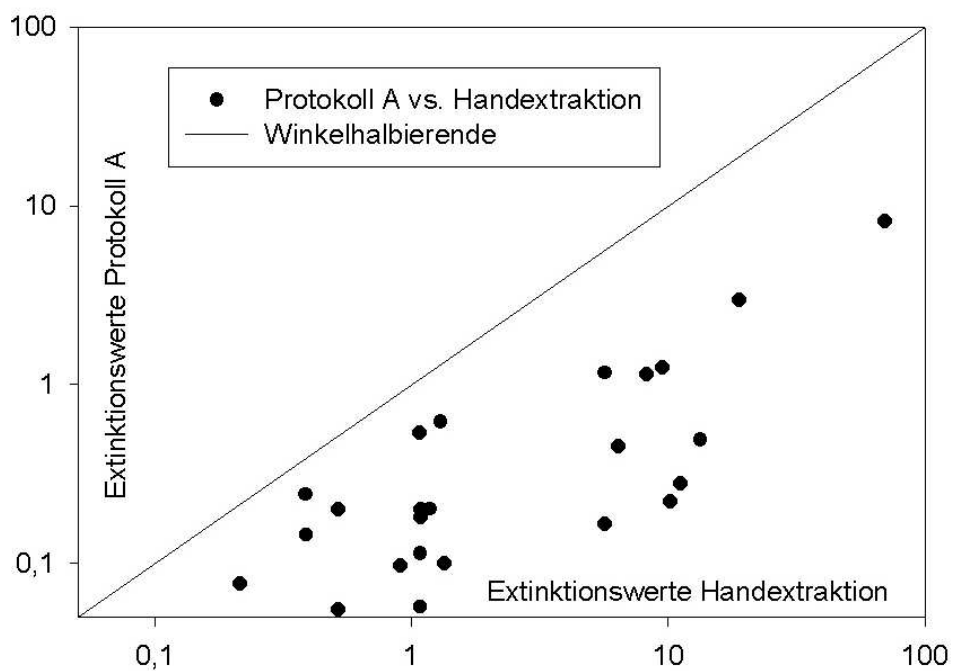
18 von 32 Proben waren im MagNA Pure, verglichen mit den alten Werten der manuellen Extraktion, falsch negativ, in einem Bereich von 528 bis 8710 (Median: 1180, Durchschnitt: 1682) Kopien pro ml Plasma.

Auffallend waren außerdem sehr niedrige maximale Extinktionswerte des QS und deutlich geringere maximale Extinktionswerte bei den Proben. So zeigten 38 bestimmte valide Extinktionen des QS (größer 0.200) im Protokoll A als Median einen Wert von 1,173 (Durchschnitt: 1,487), 225 bestimmte Werte bei der manuellen Extraktion aber als Median 8.524 (Durchschnitt: 8,463). Das entsprach einem Minus von 86%. Die mediale Abweichung der Extinktionswerte der Proben, verglichen mit der manuellen Extraktion, lag bei -88% (Durchschnitt: -82%), wenn die Extinktion in beiden Messungen größer 0 war (27 Proben). Falls eine Viruslast in beiden Verfahren bestimmt wurde (14 Proben), zeigten sich bei einer medialen Abweichung von -15% (Durchschnitt: +3%) kaum Differenzen zur manuellen Extraktion.

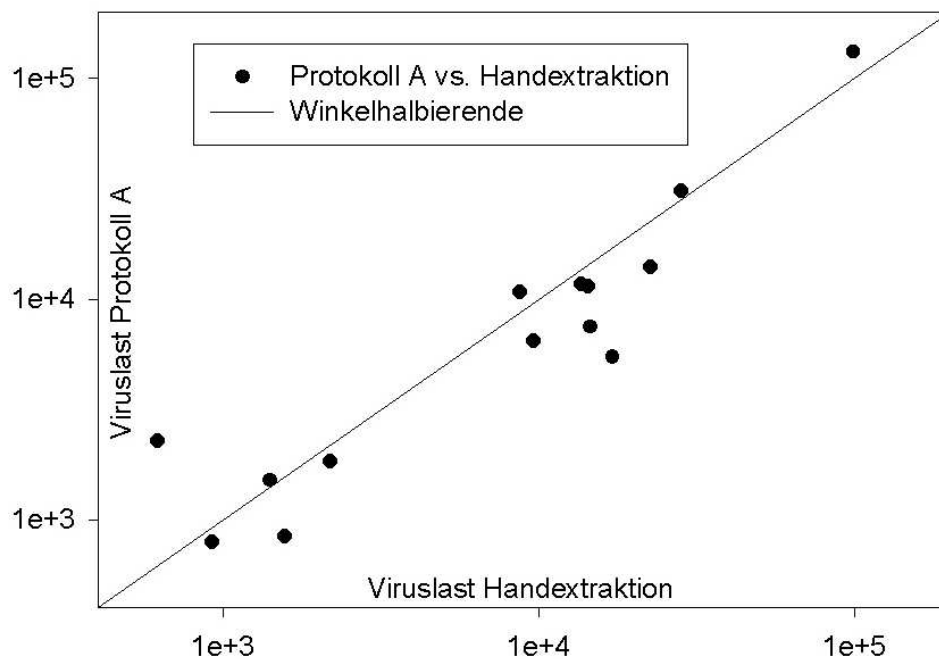
Grafik 18: Maximale Extinktionswerte QS Protokoll A versus Handextraktion



Grafik 19: Maximale Extinktionswerte der Proben Protokoll A versus Handextraktion alt

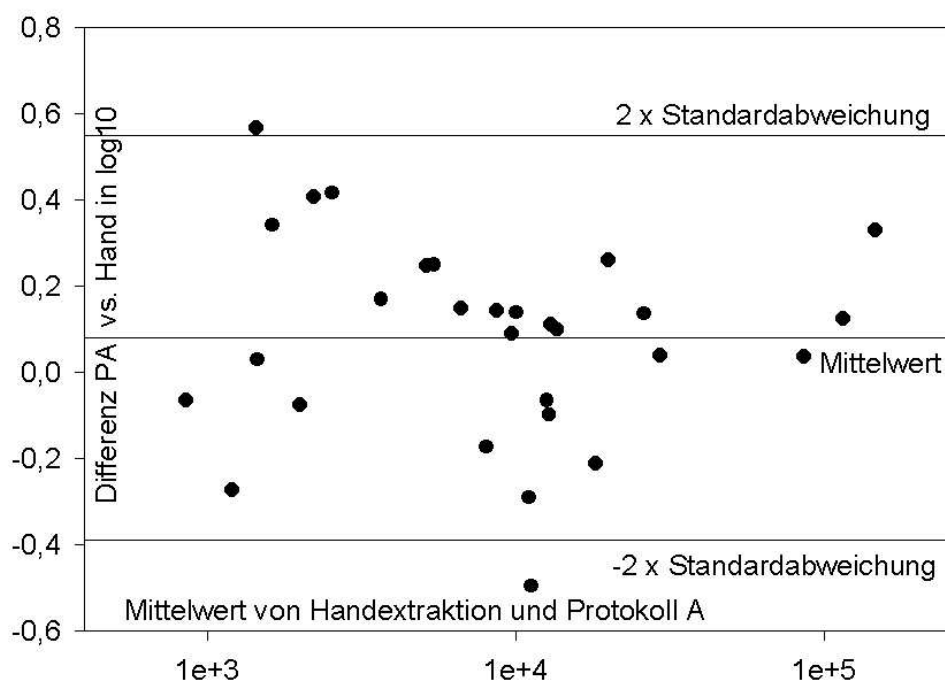


Grafik 20: Viruslasten Protokoll A versus Handextraktion alt



Nach Bland und Altman zeigten die Viruslasten die mit Protokoll A und der manuellen Extraktion bestimmt wurden eine gute Übereinstimmung, falls beide positive Werte lieferten. Im Mittel lag die Differenz bei 0,0806 log₁₀, bei einer Standardabweichung von 0,2354 log₁₀. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) betragen 0,5514 log₁₀ und -0,3902 log₁₀, das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Dreifache.

Grafik 21: Übereinstimmung der Viruslasten von Protokoll A und Handextraktion
alt nach Bland und Altman



3.2 Protokoll B

3.2.1 Direktvergleich mit der manuellen Extraktion

Aufgrund der vielen falsch negativen Werte und der geringen QS- Extinktionen wurde ein neues Protokoll erarbeitet. 99 Proben wurden parallel von Hand und mit Protokoll B extrahiert und anschließend im selben Lauf im COBAS Amplicor amplifiziert. Ein Versuch mit neun Proben konnte aufgrund einer invaliden Kontrolle nicht gewertet werden. Demnach war ein direkter Vergleich bei 90 Proben möglich.

Tabelle 34: Protokoll B versus Handextraktion

	negativ MagNA Pure	positiv MagNA Pure	insgesamt
negativ Hand	35	1	36
positiv Hand	6	48	54
insgesamt	41	49	90

Die im MagNA Pure positive und von Hand negative Probe war richtig positiv, aufgrund des hohen Lipidgehalts wurde die manuelle Extraktion gestört. Sie zeigte im MagNA Pure eine Viruslast von 838 Kopien. Demnach waren mit Protokoll B 6 von 55 Proben falsch negativ im Bereich von 442 bis 1680 Kopien pro ml Plasma (Median: 864, Durchschnitt: 909). Daraus ließen sich die folgenden Sensitivitäten errechnen.

Tabelle 35: Sensitivität Protokoll B

Sensitivität	MagNA Pure	manuelle Extraktion
insgesamt	89%	98%
> 800 Kopien	93%	98%
> 1000 Kopien	96%	100%
> 1200 Kopien	98%	100%
> 1700 Kopien	100%	100%

Unter Berücksichtigung des technischen Problems, dass Viruslasten vom System erst ab einer Probenextinktion von 0.200 berechnet werden und unter Einbeziehen der errechneten Viruslasten der Proben unter dieser Detektionsschwelle, hätte der Direktvergleich von Protokoll B und der manuellen Extraktion ein ausgeglichenes Ergebnis geliefert. Beide im MagNA Pure positiven Ergebnisse wären richtig positiv gewesen, die eine Probe aus bereits erwähntem Grund, die zweite Probe ergab bei der manuellen Extraktion nur knapp weniger als 400 Kopien pro ml Plasma.

Tabelle 36: Protokoll B versus Handextraktion, bereinigt

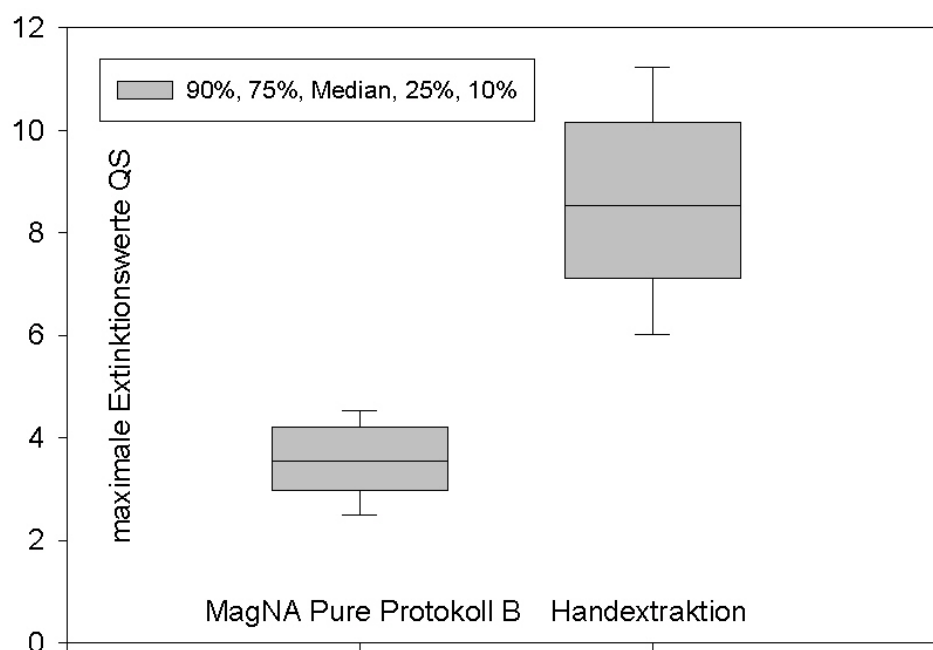
	negativ MagNA Pure	positiv MagNA Pure	insgesamt
negativ Hand	34	2	36
positiv Hand	3	51	54
insgesamt	37	53	90

Tabelle 37: Sensitivität Protokoll B, bereinigt

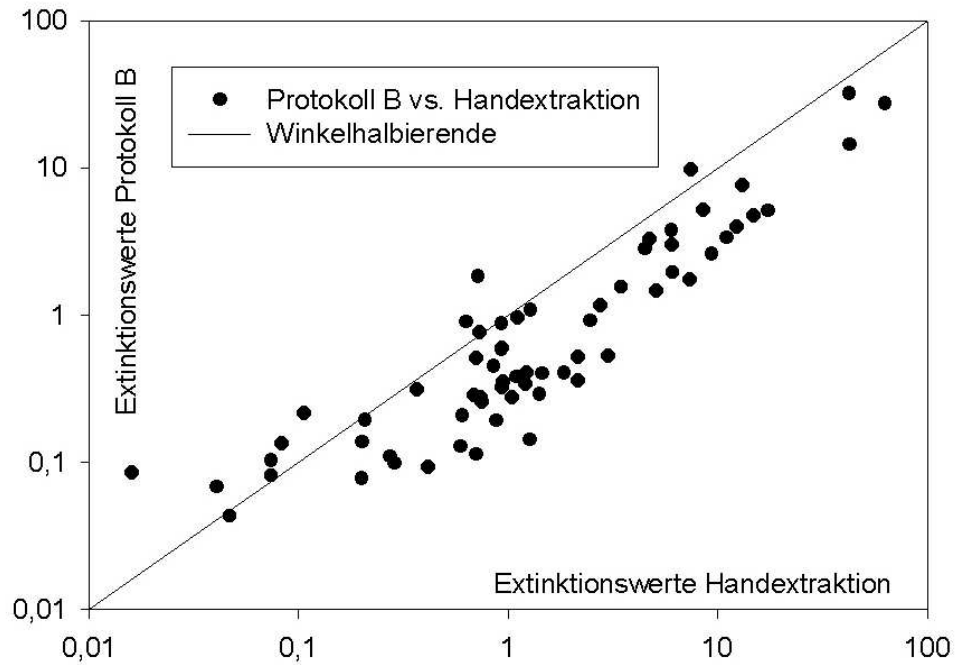
Sensitivität	MagNA Pure	manuelle Extraktion
insgesamt	94%	96%
> 800 Kopien	98%	98%
> 1000 Kopien	100%	100%

Wiederum waren die Extinktionen des Standards (QS) und der Proben deutlich erniedrigt. 134 bestimmte valide Extinktionen des QS (größer 0.200) im Protokoll B zeigten als Median einen Wert von 3,542 (Durchschnitt: 3,513), das entsprach, verglichen mit den oben aufgeführten Ergebnissen der manuellen Extraktion, einem Minus von 58%. Die mediale Abweichung der Extinktionswerte der Proben, verglichen mit der manuellen Extraktion, lag bei -61% (Durchschnitt: -35%), wenn die Extinktion in beiden Messungen größer 0 war (65 Proben). Falls eine Viruslast in beiden Verfahren bestimmt wurde (48 Proben), zeigten sich bei einer medialen Abweichung von -4% (Durchschnitt: +12%) wiederum kaum Differenzen zur manuellen Extraktion.

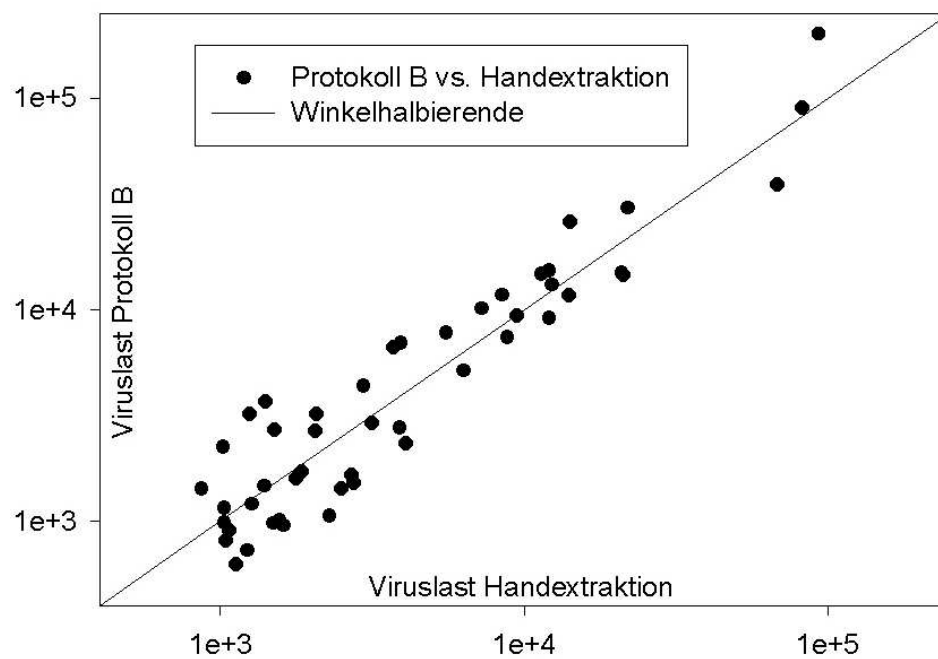
Grafik 22: Maximale Extinktionswerte QS Protokoll B versus Handextraktion



Grafik 23: Maximale Extinktionswerte der Proben Protokoll B versus Handextraktion

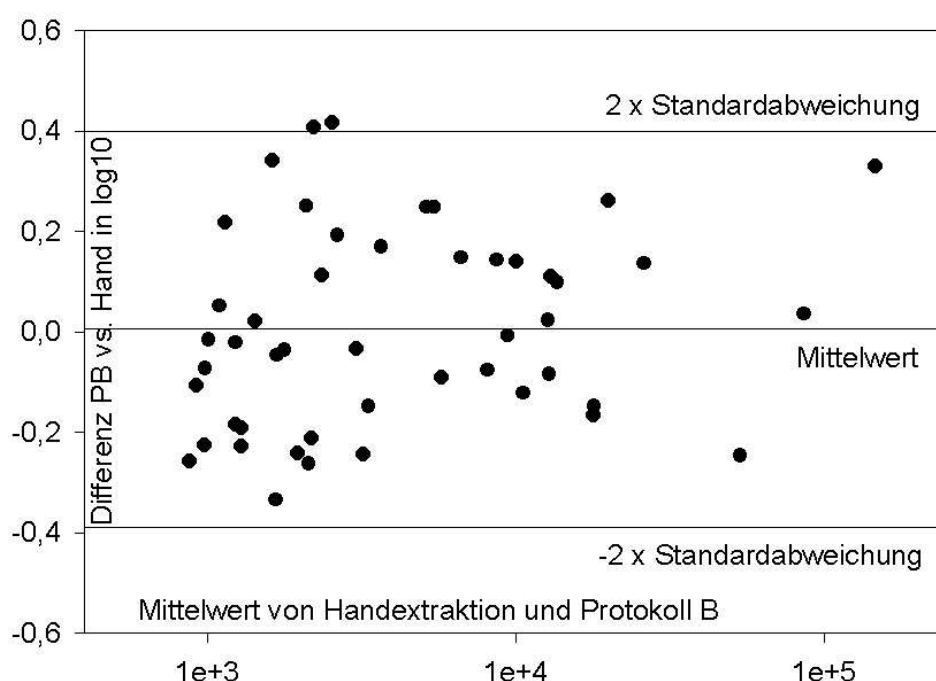


Grafik 24: Viruslasten Protokoll B versus Handextraktion



Nach Bland und Altman zeigten die Viruslasten die mit Protokoll B und parallel mit der manuellen Extraktion bestimmt wurden eine exzellente Übereinstimmung, falls beide positive Werte lieferten. Im Mittel lag die Differenz bei 0,0061 log₁₀, bei einer Standardabweichung von 0,1971 log₁₀. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) lagen bei 0,4003 log₁₀ und -0,3881 log₁₀, das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Zweieinhalbfache.

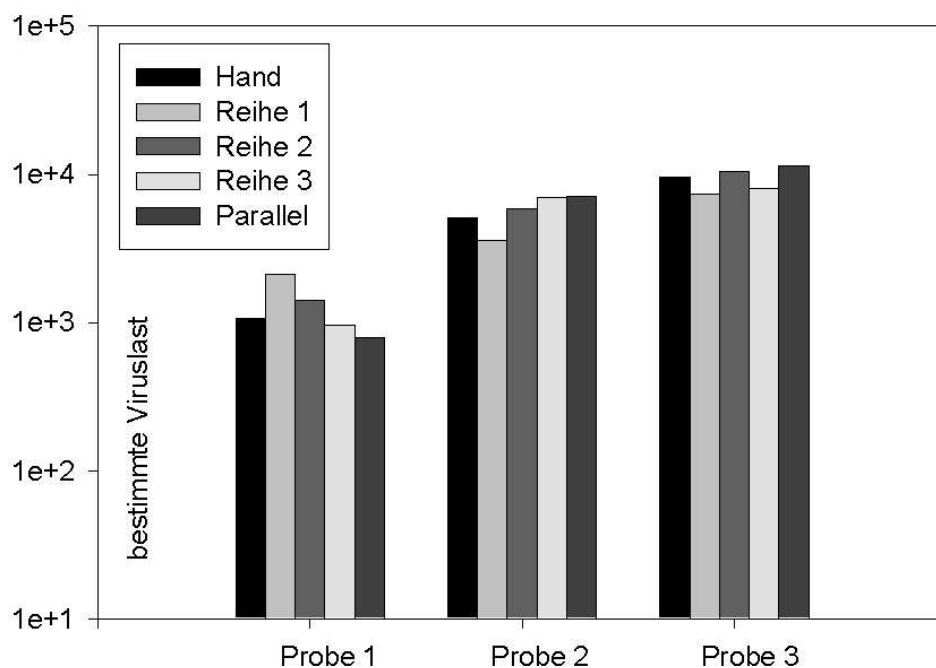
Grafik 25: Übereinstimmung der Viruslasten von Protokoll B und Handextraktion nach Bland und Altman



3.2.2 Reproduzierbarkeit

3 Proben wurden vierfach eingesetzt, dreimal in Reihe, einmal parallel. Die manuelle Extraktion hatte als Werte der Viruslasten 1070 (Probe 1), 5110 (2) und 9510 (3) ergeben. Die maximale Abweichung innerhalb eines Laufs lag dabei bei 0,19 log₁₀, die maximale Abweichung zwischen zwei Läufen bei 0,27 log₁₀.

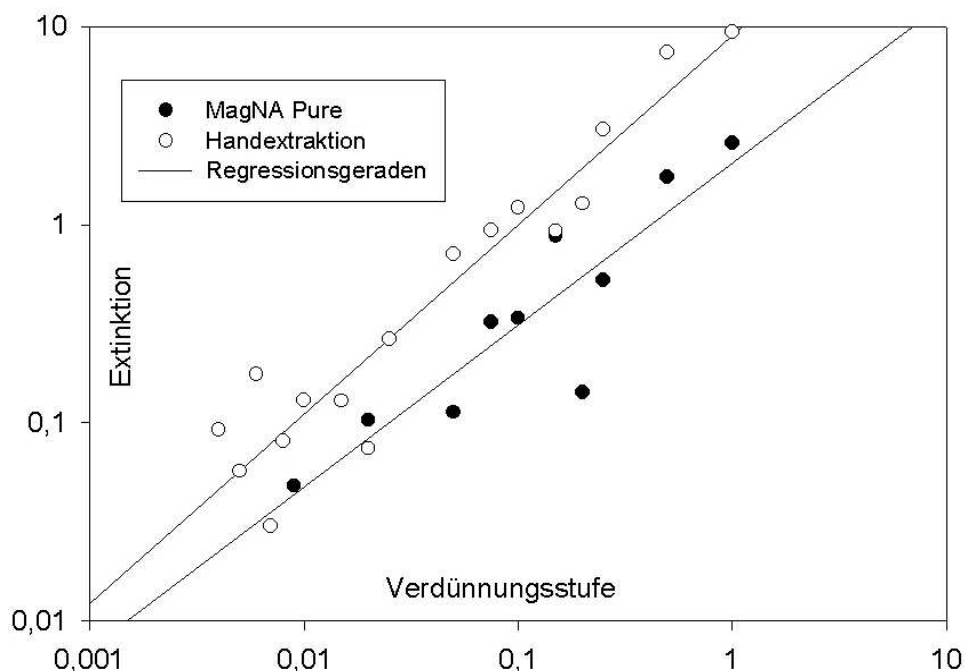
Grafik 26: Reproduzierbarkeit Protokoll B



3.2.3 Verdünnungsreihe

Da die Verdünnung sehr niedrig gewählt wurde, zeigten nur 10 von 18 Verdünnungsstufen mit MagNA Pure, sowie 17 von 18 Verdünnungsstufen per manueller Extraktion, eine Extinktion größer 0 und konnten somit gewertet werden.

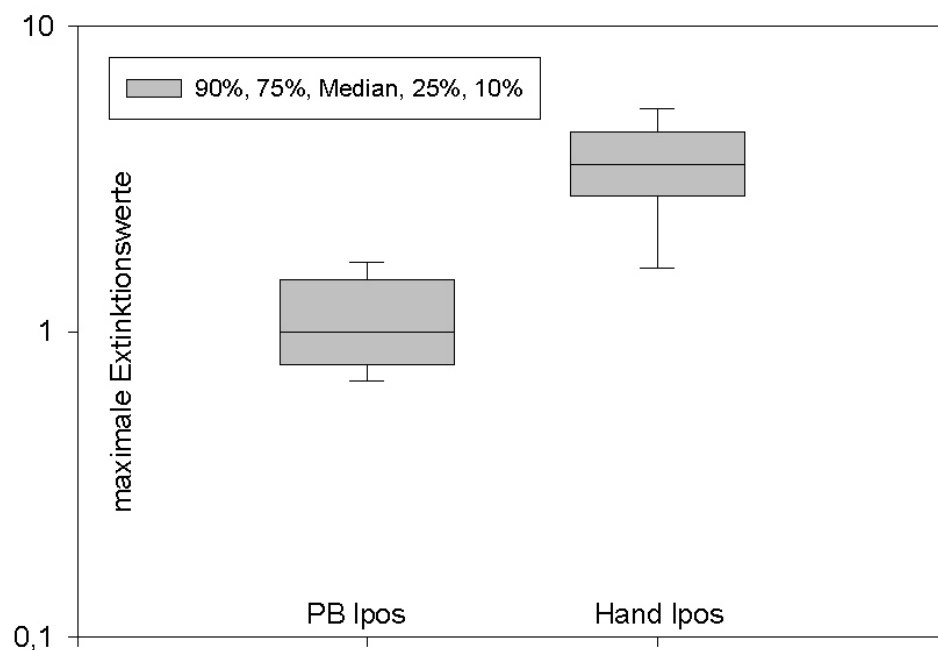
Grafik 27: Linearität der Extinktionen der Verdünnungsreihe, Protokoll B



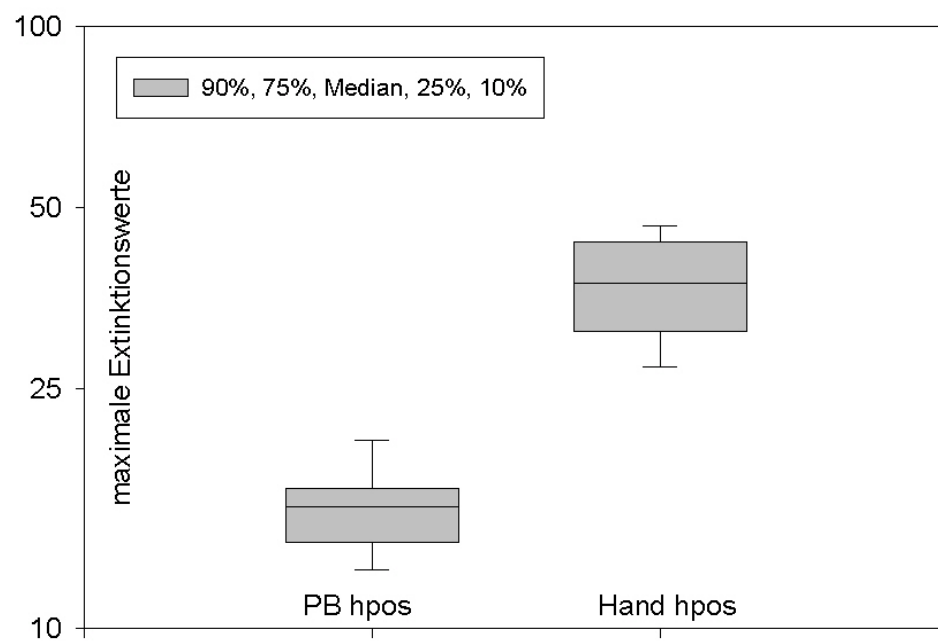
3.2.4 Kontrollen

Im Laufe der Experimente wurden je 10 Kontrollen mit Protokoll B und je 16 Kontrollen nach manueller Extraktion analysiert. Die schwach positive Kontrolle (lpos) zeigte im Protokoll B einen Median von 3435 Kopien (Durchschnitt: 3349), die stark positive Kontrolle (hpos) einen Median von 51550 Kopien (Durchschnitt: 53050). Die maximalen Extinktionen lagen im Median bei 0,997 (Durchschnitt: 1,104) beziehungsweise bei 15,950 (Durchschnitt: 16,110). Die manuelle Extraktion zeigte mediale Viruslasten von 4255 (Durchschnitt: 5020) und 46100 (Durchschnitt: 47569), sowie mediale Extinktionen von 3,447 (Durchschnitt: 3,462) und 38,097 (Durchschnitt: 37,807). Daraus ergab sich für die Viruslasten bei Protokoll B eine Abweichung von -20% (lpos) und +12% (hpos) verglichen mit der manuellen Extraktion, für die Extinktionen Abweichungen von -70% (lpos) und -60% (hpos).

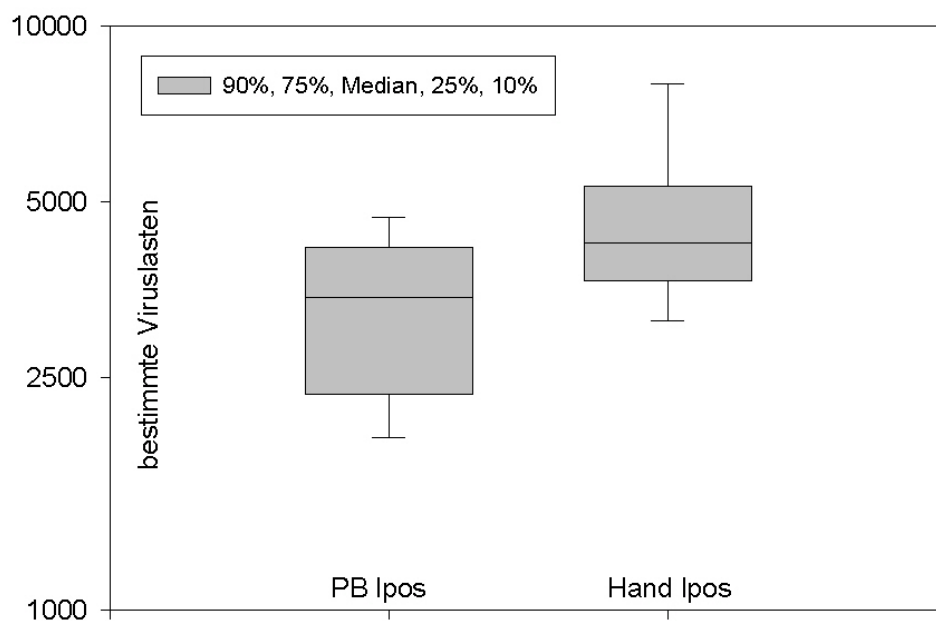
Grafik 28: Extinktionen der schwach positiven Kontrolle Protokoll B versus Handextraktion



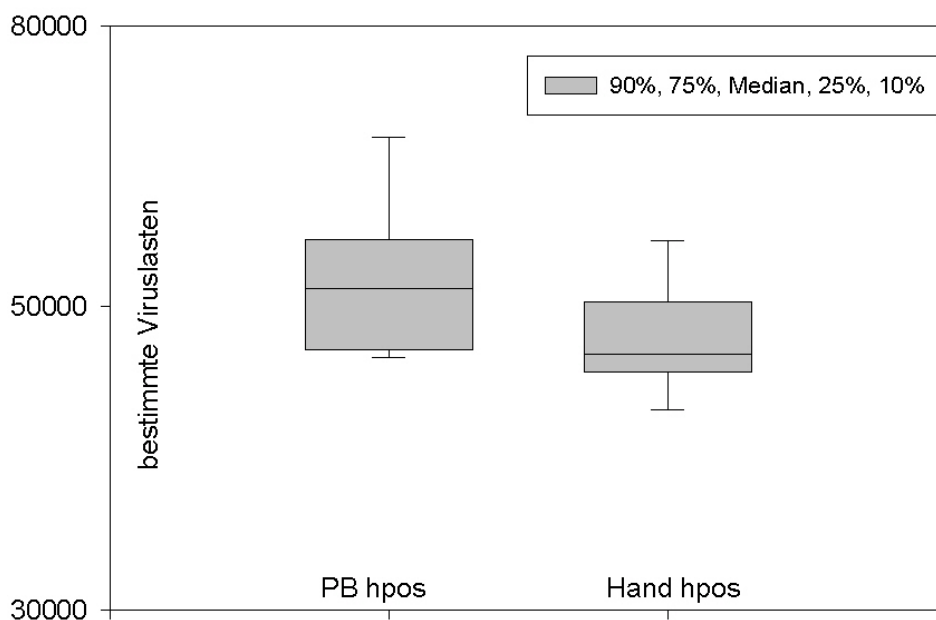
Grafik 29: Extinktionen der stark positiven Kontrolle Protokoll B versus Handextraktion



Grafik 30: Viruslasten der schwach positiven Kontrolle Protokoll B versus Handextraktion



Grafik 31: Viruslasten der stark positiven Kontrolle Protokoll B versus Handextraktion



3.3 Protokoll C

3.3.1 Reproduzierbarkeit

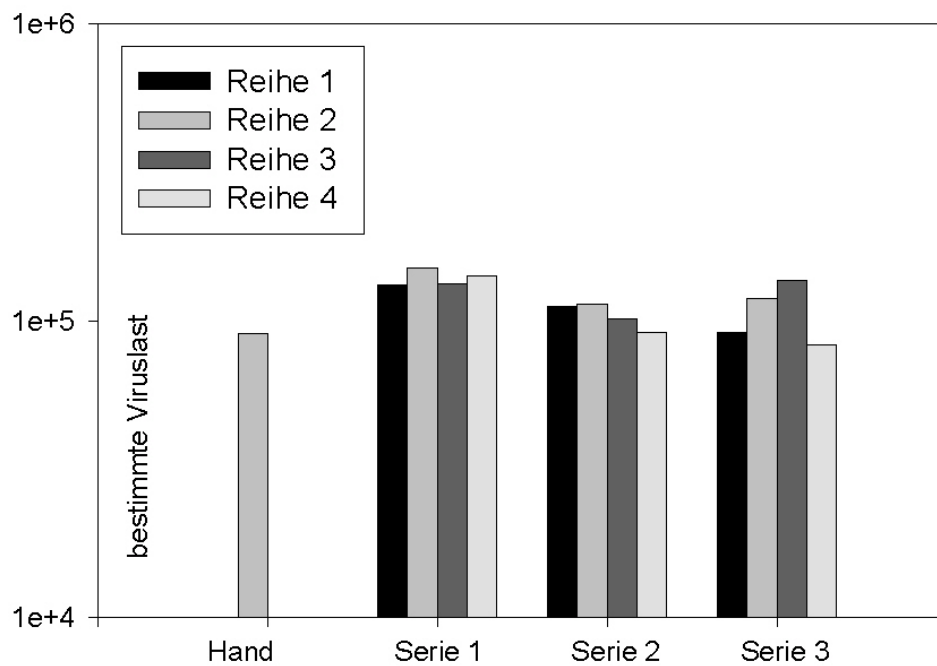
Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit wurden 5 zuvor manuell extrahierte und analysierte halblogarithmische Verdünnungsstufen im Bereich 160 bis 100000 Kopien/ ml Plasma in drei Läufen jeweils vierfach eingesetzt, demnach entstand ein Probenvolumen von 12 Proben je Verdünnungsstufe. Die manuelle Extraktion hatte als Ergebnisse 0, 1930, 11100, 35700 und 90600 Kopien pro ml Plasma ergeben.

Tabelle 38: Variabilitätskoeffizienten

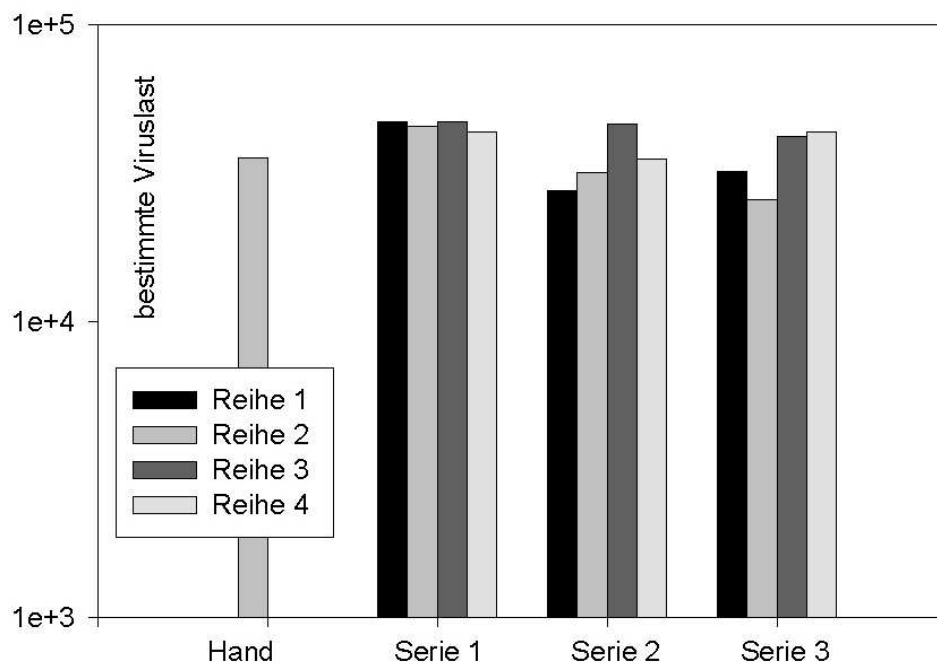
manuelle Extraktion		MagNA Pure Extraktion				
bestimmte Viruslast		Mittelwert Viruslast		Standardabweichung		CV
G/ml	log10	G/ml	log10	G/ml	log10	%
90600	4,957	117392	5,062	22035	0,084	18,8
35700	4,553	35875	4,545	7644	0,097	21,3
11100	4,045	8443	3,914	2071	0,108	24,5
1930	3,286	2255	3,325	798	0,171	35,4

CV Variabilitätskoeffizient, G/ml Genomäquivalente pro ml Plasma

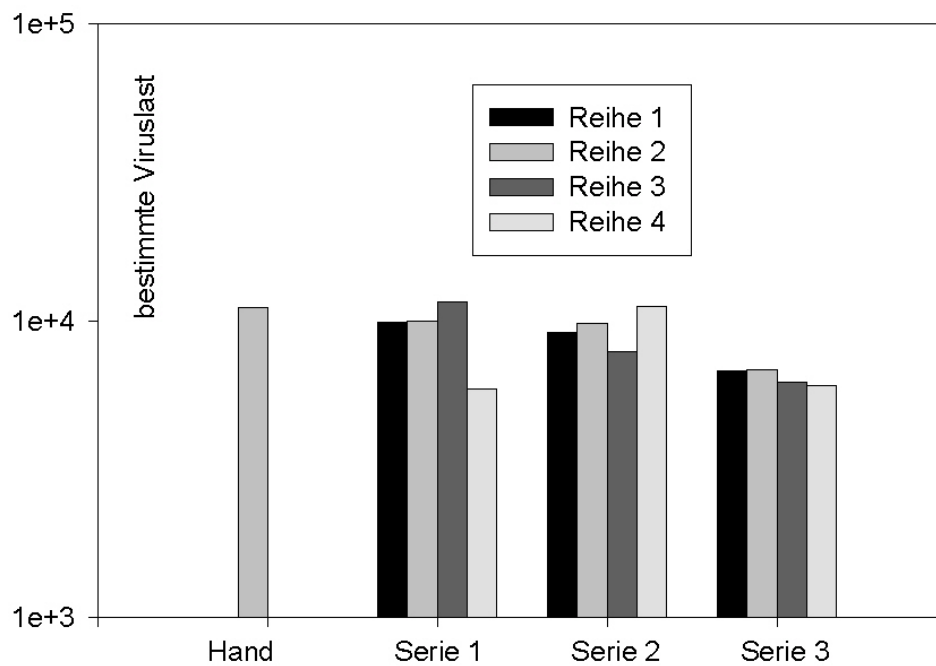
Grafik 32: Reproduzierbarkeit Protokoll C Verdünnungsstufe „100000“



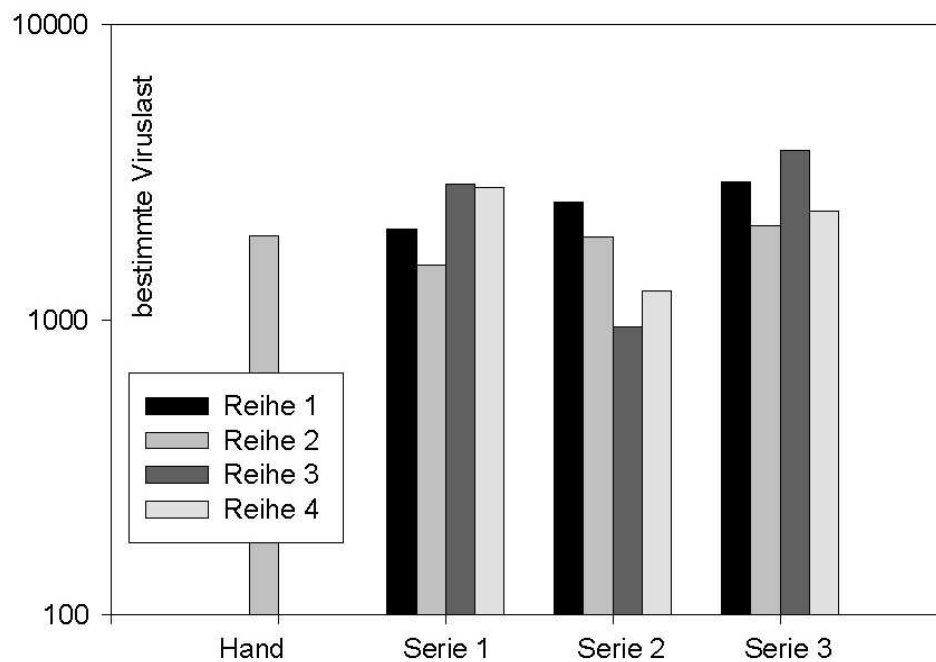
Grafik 33: Reproduzierbarkeit Protokoll C Verdünnungsstufe „20000“



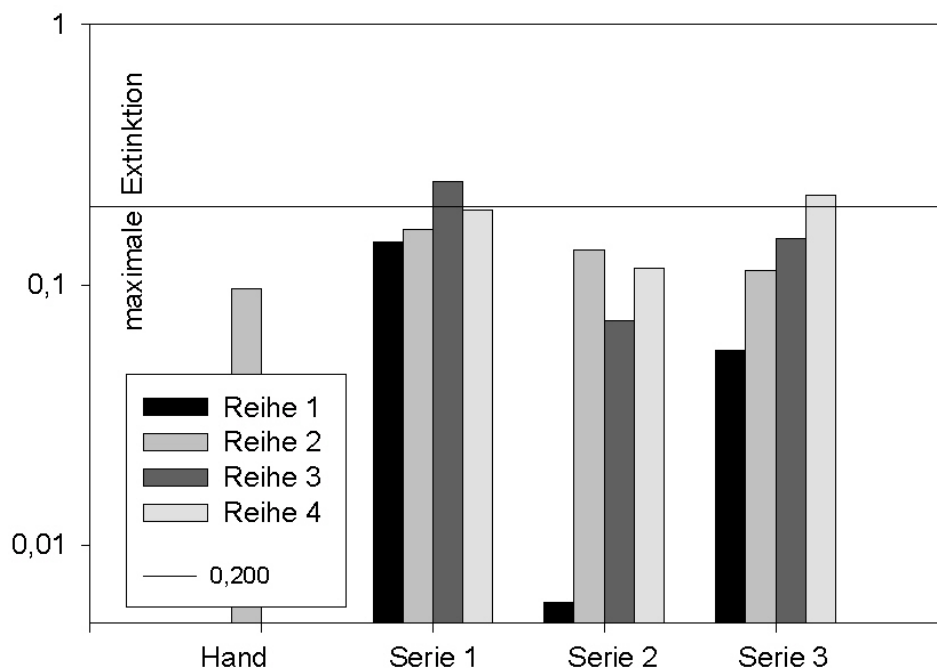
Grafik 34: Reproduzierbarkeit Protokoll C Verdünnungsstufe „4000“



Grafik 35: Reproduzierbarkeit Protokoll C Verdünnungsstufe „800“



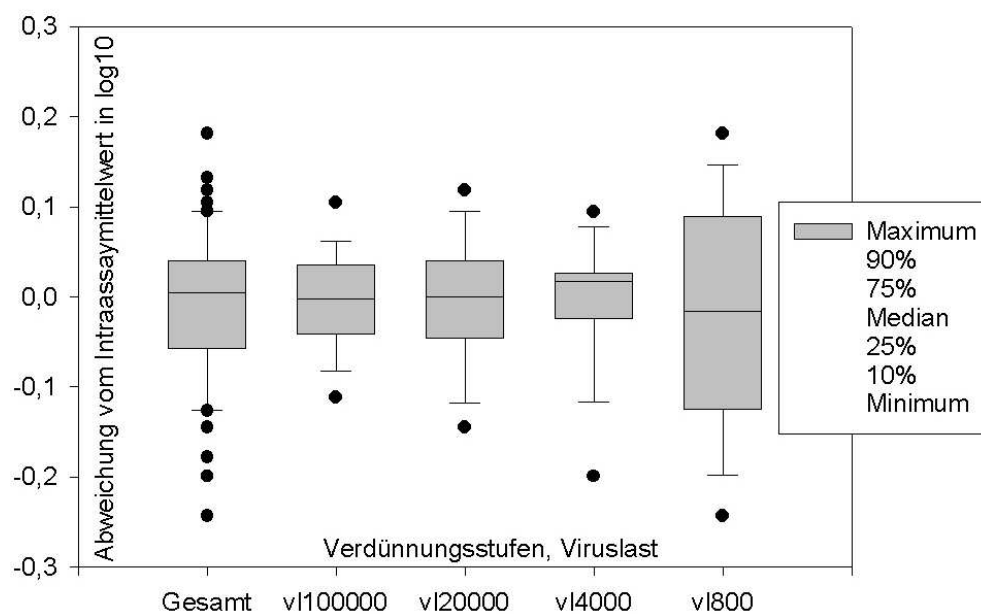
Grafik 36: Reproduzierbarkeit Protokoll C Verdünnungsstufe „160“



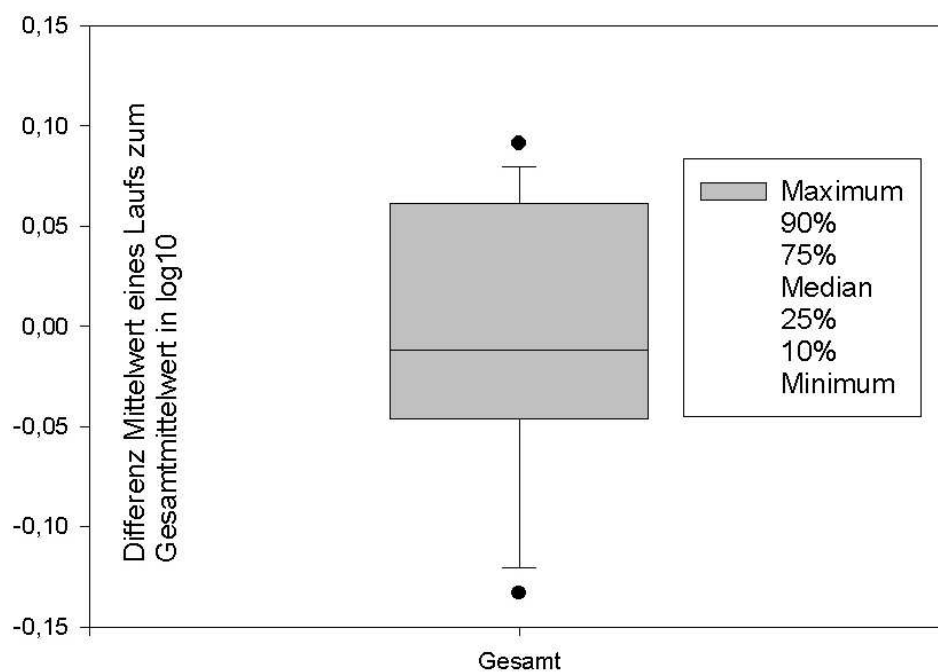
Insgesamt lag die Intraassay- Abweichung der Verdünnungsstufen im bestimmaren Bereich im Mittel bei $0,0672 \log_{10}$, Standardabweichung $0,0568 \log_{10}$. Die maximale Abweichung vom Mittelwert betrug hierbei $0,1815 \log_{10}$ und $-0,2436 \log_{10}$, das heißt, die maximale Abweichung führte zu einem 1,75fachen Ergebnis. Der durchschnittliche CV lag bei 21% (15% bis 32%), mit steigender Tendenz bei kleineren Viruslasten.

Die Interassay- Abweichung im Vergleich zum Mittelwert aller Proben im analysierbaren Bereich lag im Mittel bei $0,0634 \log_{10}$, bei einer Standardabweichung von $0,0352 \log_{10}$. Die maximale Abweichung vom Mittelwert betrug hierbei $0,0913 \log_{10}$ und $-0,1332 \log_{10}$, das heißt die maximale Abweichung betrug das 1,4fache des Mittelwerts. Betrachtet man allerdings die größtmögliche Differenz aller Einzelproben, so lag die maximale Abweichung bei $0,6 \log_{10}$, unter Ausschluss zweier Ausreißer bei $0,28 \log_{10}$. Der durchschnittliche CV lag bei 21% (15% bis 25%), auch hier mit steigender Tendenz in Richtung kleinerer Viruslasten.

Grafik 37: Intraassay- Abweichung Protokoll C

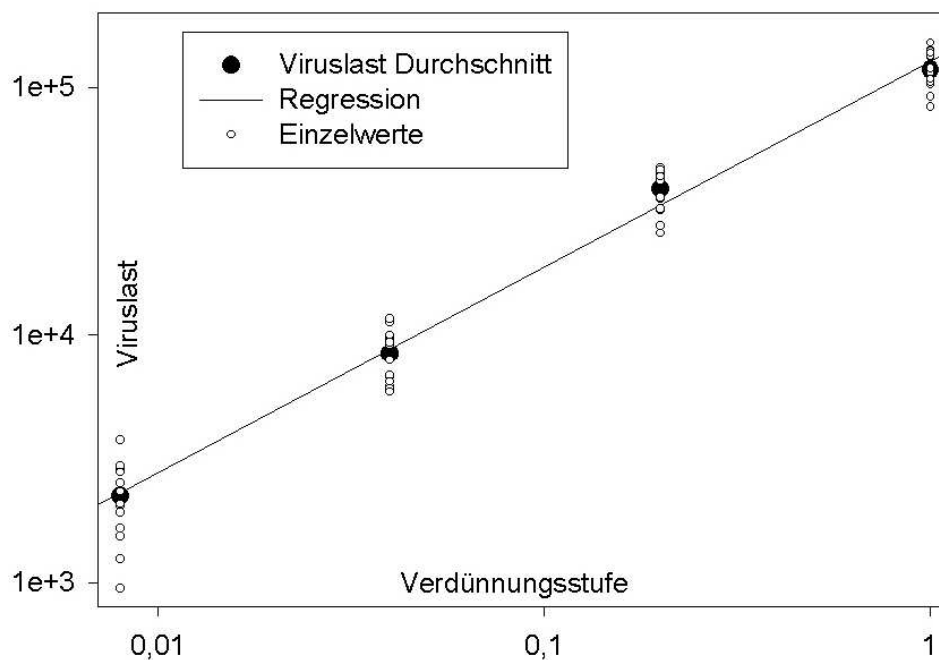


Grafik 38: Interassay- Abweichung Protokoll C



Die halblogarithmischen Verdünnungsstufen zeigten dabei einen linearen Zusammenhang zur ermittelten durchschnittlichen Viruslast über einen Bereich von 2 log₁₀.

Grafik 39: Linearität der Viruslasten der Verdünnungsreihe, Protokoll C



3.3.2 Bestimmung der genauen Sensitivitätsgrenze

Tabelle 39: Sensitivitätsgrenze Protokoll C

Soll	Hand	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	Sensitivität MP
700	729	0	0	902	1240	1070	60%
600	1030	844	0	0	1170	0	40%
500	0	0	817	1180	836	0	60%
400	0	0	0	0	649	0	20%
300	0	0	787	0	0	720	40%
200	0	0	0	0	0	0	0

Rechnerisch ergab sich aus der Berechnungsformel des COBAS AmpliCor, bei Einsatz der medialen maximalen Extinktion des QS (4,044) im Protokoll C, einer eingesetzten Kopienzahl von 300, dem Probenfaktor 40 und einer minimalen Probenextinktion von 0.200 eine maximale Sensitivität von 593 Kopien pro ml Plasma. Setzte man allerdings die kleinste während der Versuche ermittelte maximale Extinktion des QS (1,073) ein, lag die Grenze bei 2237 Kopien, beim größten erreichten Extinktionswert des QS (7,946), ergab sich eine Untergrenze von 302 Kopien. Für 95% aller Proben betrug die maximale Sensitivität 983 Kopien pro ml Plasma, für 90% 863 Kopien. Eine Sensitivitätsgrenze von 400 Kopien pro ml Plasma wäre erst ab einem QS- Extinktionswert von 6,0 möglich gewesen, eine Grenze von 800 Kopien ab einem Extinktionswert von 3,0. Ohne Berücksichtigung der Berechnungsgrenze des Probenextinktionswerts von 0.200 seitens der COBAS Software hätte sich folgendes Ergebnis gezeigt. Demnach wären acht zusätzliche Proben im Bereich von 426 bis 757 Kopien pro ml Plasma positiv gewesen.

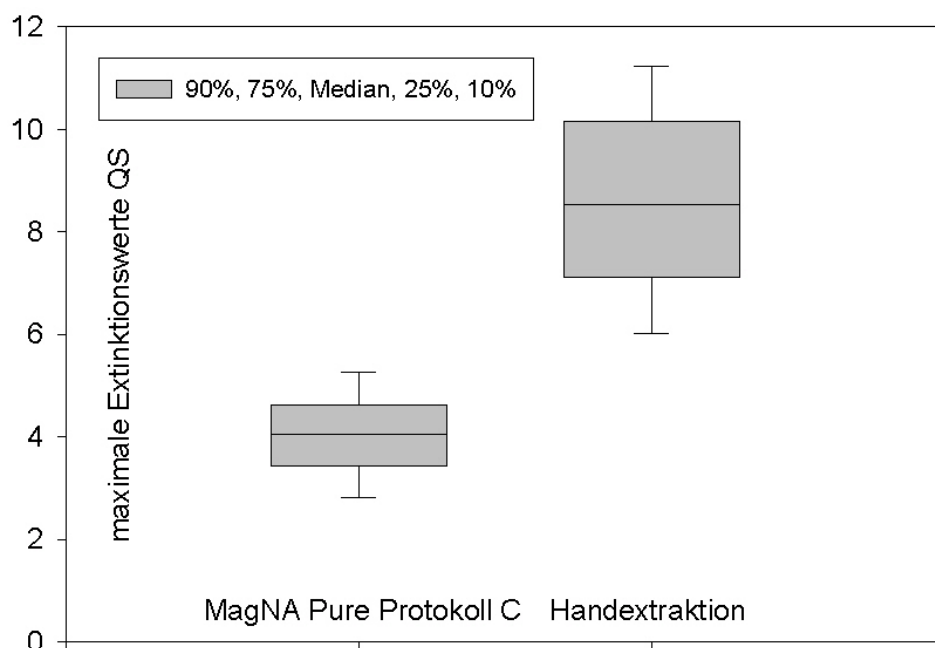
Tabelle 40: Sensitivitätsgrenze Protokoll C, bereinigt

Soll	Hand	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	Sensitivität MP
700	729	0	(467)	902	1240	1070	80%
600	1030	844	0	(661)	1170	(547)	80%
500	0	0	817	1180	836	0	60%
400	0	0	0	(651)	649	(426)	60%
300	0	(757)	787	0	(676)	720	80%
200	0	0	0	0	(568)	0	20%

3.3.4 Standard (QS)

Bei 409 Proben war ein Vergleich der maximalen Extinktionswerte des QS im validen Bereich möglich. Dabei zeigte sich mit Protokoll C ein Median von 4,044 (Durchschnitt 4,038). Verglichen mit der oben aufgeführten manuellen Extraktion entsprach das einem Minus von 53%.

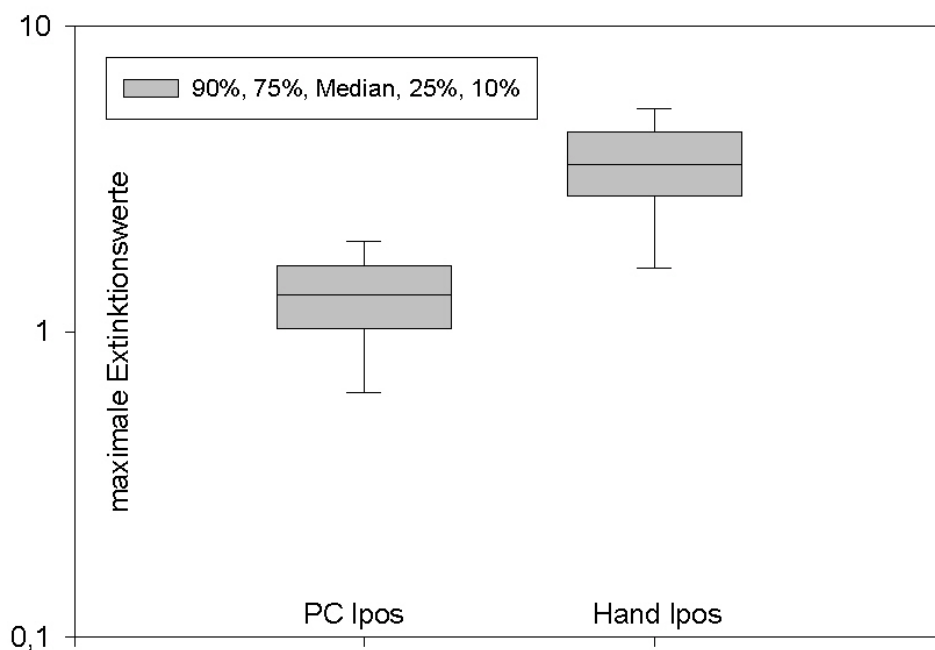
Grafik 40: Maximale Extinktionswerte QS Protokoll C versus Handextraktion



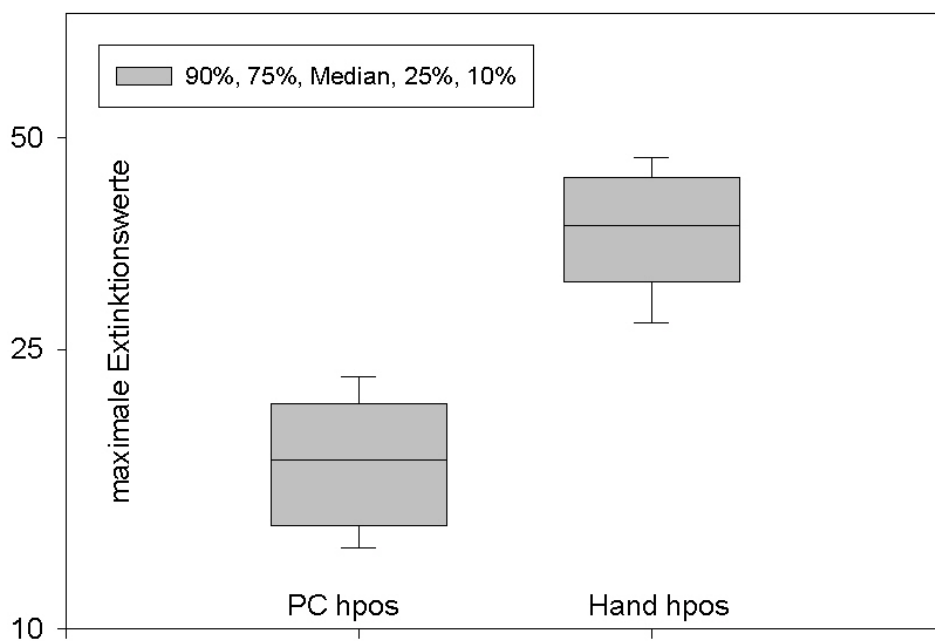
3.3.5 Kontrollen

Mit Protokoll C wurden je 37 Kontrollen extrahiert und analysiert. Die schwach positive Kontrolle (lpos) zeigte einen Median von 3620 Kopien (Durchschnitt: 3726), die stark positive Kontrolle (hpos) einen Median von 49500 Kopien (Durchschnitt: 48754). Die maximalen Extinktionen lagen im Median bei 1,325 (Durchschnitt: 1,343) beziehungsweise bei 17,395 (Durchschnitt: 17,640). Verglichen mit der weiter oben aufgeführten manuellen Extraktion, ergab sich für die Viruslasten bei Protokoll C eine Abweichung von -15% (lpos) und +7% (hpos), für die Extinktionen eine Abweichung von -62% (lpos) und -54% (hpos).

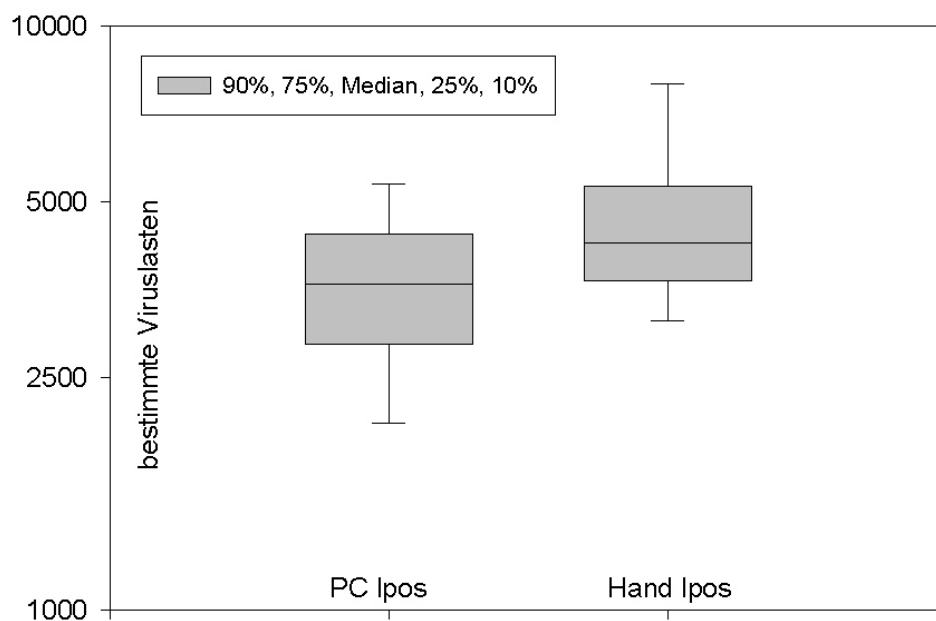
Grafik 41: Extinktionen der schwach positiven Kontrolle Protokoll C versus Handextraktion



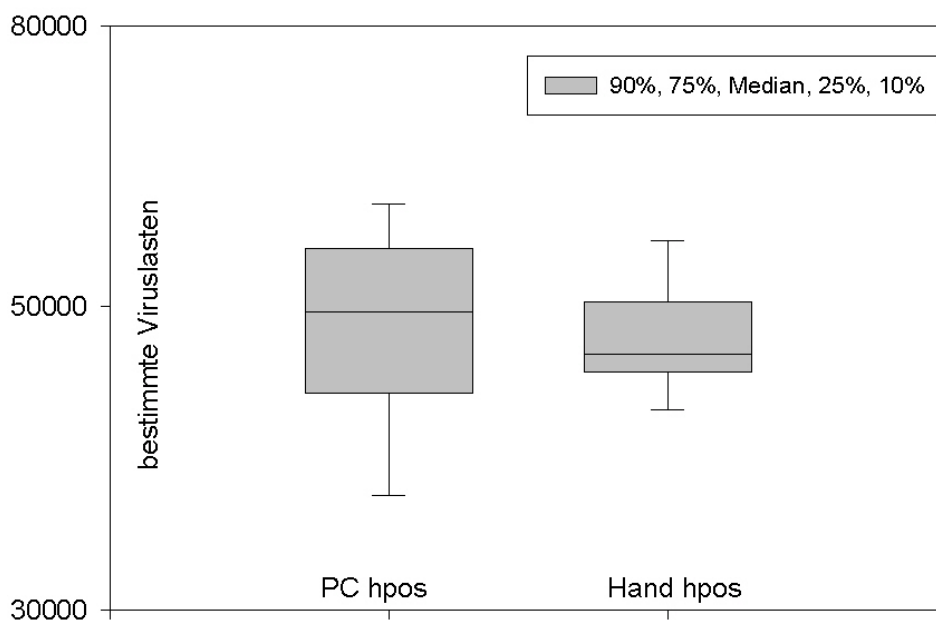
Grafik 42: Extinktionen der stark positiven Kontrolle Protokoll C versus Handextraktion



Grafik 43: Viruslasten der schwach positiven Kontrolle Protokoll C versus Handextraktion



Grafik 44: Viruslasten der stark positiven Kontrolle Protokoll C versus Handextraktion



3.3.6 Klinische Erprobung

Im Zeitraum 03/2002 bis 11/2002 wurden 33 Patienten wöchentlich auf HCMV gescreent. Bei 13 Patienten erfolgte im Beobachtungszeitraum eine Reaktivierung. Davon wurden sieben Patienten in die Valganciclovir- Studie eingeschlossen und weiterhin gemäß Studienprotokoll getestet, die anderen Patienten wurden nicht weiter getestet. Bei einem Patient erfolgte unter Studientherapie der Abbruch der Studie, auch bei ihm wurden keine weiteren Proben getestet. Insgesamt ergab das ein Probenvolumen von 262 Stück. Davon waren 207 Proben negativ, 54 Proben positiv im Bereich 559 bis 216000 Kopien pro ml Plasma (Median: 3875), und eine Probe trotz Wiederholung nicht analysierbar. Sieben der 54 positiven Proben zeigten Ergebnisse kleiner 1000 Kopien pro ml Plasma an.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse unter einer Extinktion von 0,200 wären 5 von 207 negativen Patientenproben im Bereich von 416 bis 470 Kopien pro ml Plasma zusätzlich positiv gewesen. Ein Patient stand dabei unter Therapie und zeigte demnach seinen letzten positiven Wert drei Tage zu früh, zwei der fünf Patientenproben stammten vom wöchentlichen Screening und beide Patienten hatten in der folgenden Woche dann positive Werte, die letzten beiden Proben stammten von einem Patienten, der nach zwei falsch negativen Werten im untersten Viruslastenbereich erst zwei Wochen später ein positives Ergebnis zeigte.

3.3.7 Vergleich zur In- House- PCR und zur pp65- Bestimmung

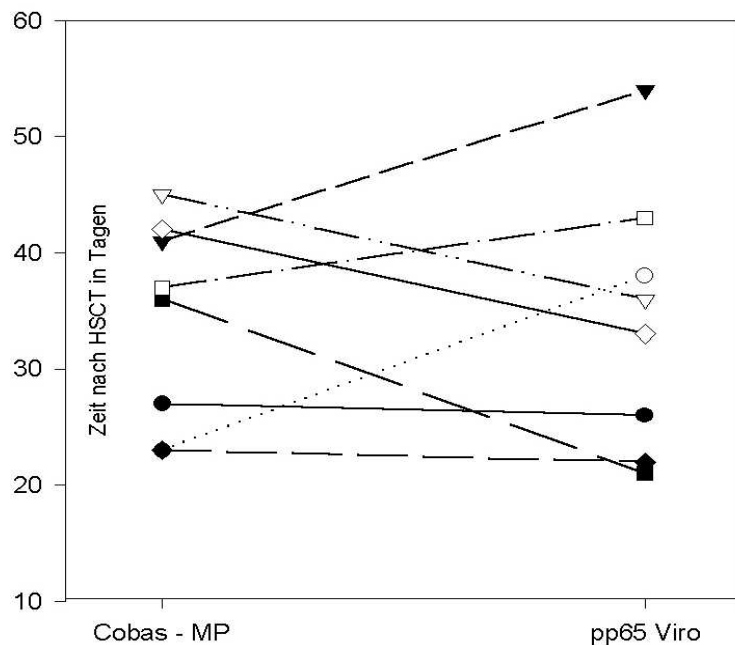
Zu Beginn der Studie wurde parallel zur Messung im COBAS Amplicor eine In-House- PCR im virologischen Institut Tübingen durchgeführt. Später wurde darauf verzichtet. Über den gesamten Zeitraum wurde das pp65- Antigen durch die Virologen bestimmt, allerdings nur während der hospitalisierten Phase.

Vergleichsbedingungen für das erste Positivwerden waren zeitparallele Bestimmungen und ein negativer Wert in der Vorwoche. Aufgrund zahlreicher fehlender Proben war ein Vergleich zwischen In- House- PCR und Protokoll C nur bei 4 Patienten möglich, für den Vergleich mit der pp65- Bestimmung

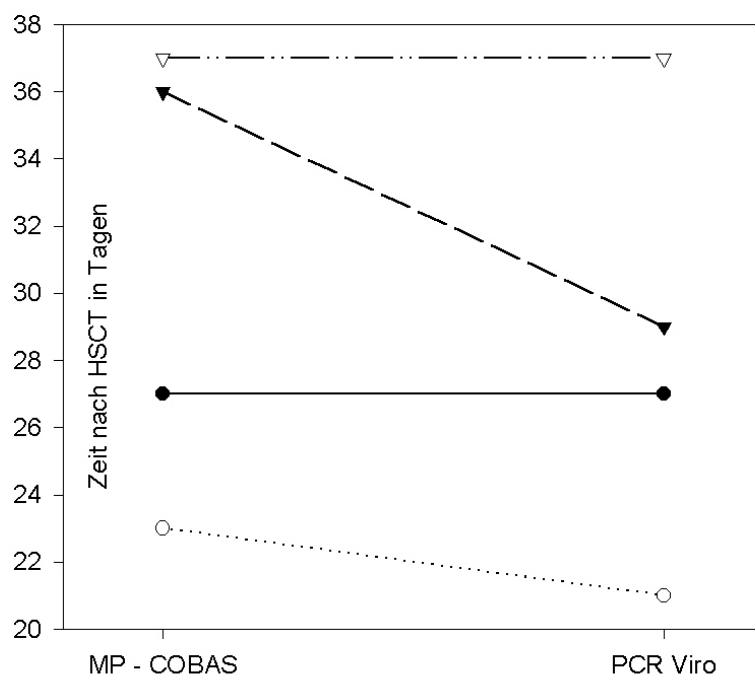
standen nur Daten von 8 Patienten zur Verfügung. Sowohl Protokoll C, als auch die pp65- Bestimmung waren durchschnittlich 34 Tage nach HSCT positiv. Allerdings wurde die pp65- Bestimmung immer einen Tag früher durchgeführt. Ein weiterer Patient mit positiver PCR wurde nie pp65- positiv. Beim Vergleich mit der In- House- PCR waren die Patienten mit Protokoll C nach durchschnittlich 31 Tagen, mit der In- House- PCR nach 29 Tagen positiv, da bei einem Patienten die In- House- PCR eine Woche früher positiv war. Die In- House- PCR hat eine Sensitivitätsgrenze von 300 Kopien pro ml Plasma. Unter Berücksichtigung der Proben mit Extinktionen kleiner 0,200, die rechnerisch Viruslasten größer 400 Kopien pro ml Plasma lieferten, wären zwei Patienten mit dem COBAS Amplicor eine Woche früher positiv geworden, als mit der In- House- PCR.

Zwei Patienten wurden nicht berücksichtigt, da sie in der In- House- PCR nur einmalig positive Werte aufwiesen und in der Folgewoche ohne Therapie wieder negativ waren. Ein Patient hatte im Protokoll C einen positiven Befund, unter Therapie wurde die In- House- PCR nicht mehr positiv.

Grafik 45: Tag nach KMT des ersten positiven Testergebnisses Protokoll C versus pp65



Grafik 46: Tag nach KMT des ersten positiven Testergebnisses Protokoll C versus In- House- PCR



3.4 Einfluss des Einfrierens auf die Proben

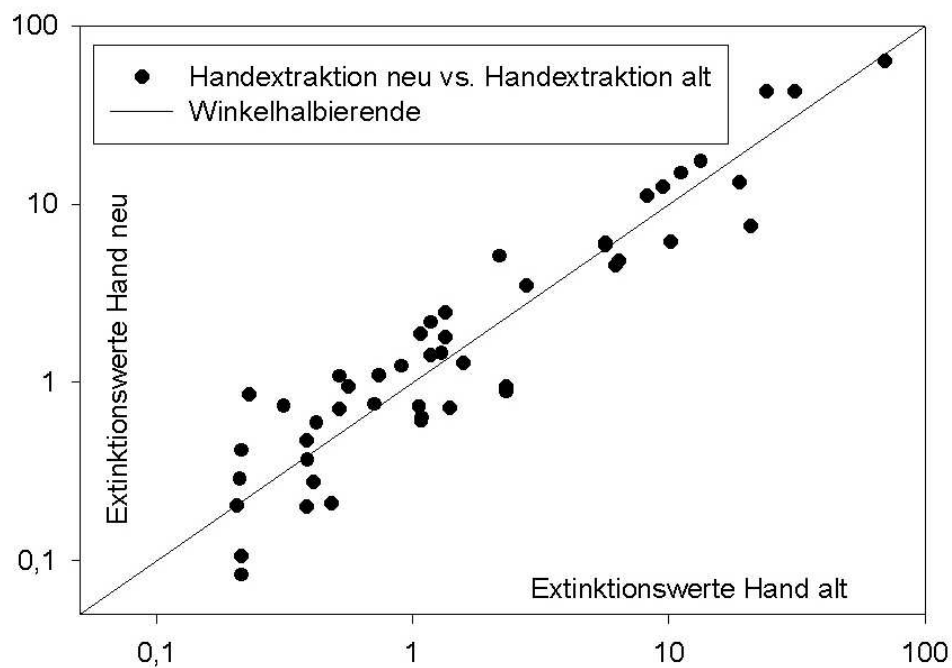
55 ehemals positive Proben, die im Rahmen einer anderen Doktorarbeit im Zeitraum 09/2000 bis 05/2001 analysiert und bei -20°C eingefroren worden waren, wurden von Hand nochmals extrahiert und mit den alten Werten verglichen. Die Einfrierdauer betrug dabei maximal 24 Monate. Die Zahl der Auftau- und Einfriervorgänge war nicht mehr nachvollziehbar, sollte aber in der Regel bei weniger als dreimal gelegen haben.

12 von 55 Proben waren bei neuer Testung negativ, das entsprach etwa 22%. Falls eine Extinktion der Proben messbar war (50 Proben), zeigten sich kaum Differenzen, im Median lag die Abweichung zur erstmaligen Bestimmung bei +16% (Durchschnitt: +16%), Gleiches galt für die bestimmten Viruslasten > 400 Kopien pro ml Plasma (43 Proben) mit einer Abweichung von medial +1% (Durchschnitt: +10%).

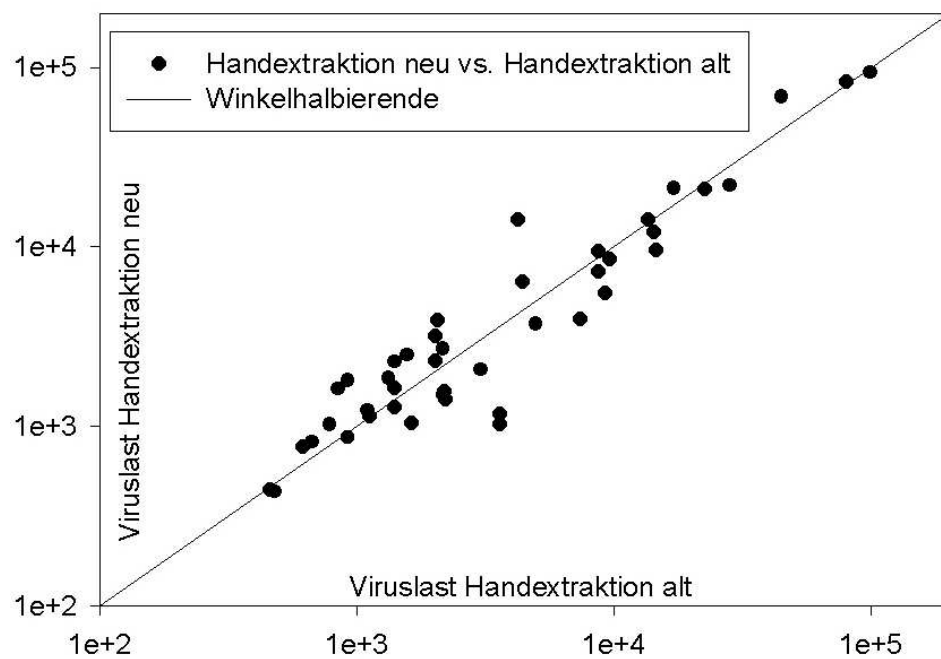
Tabelle 41: Hand alt versus Hand neu

	negativ neu	positiv neu	Insgesamt
positiv alt	12	43	55

Grafik 47: Maximale Extinktionswerte der Proben Handextraktion alt versus Handextraktion neu

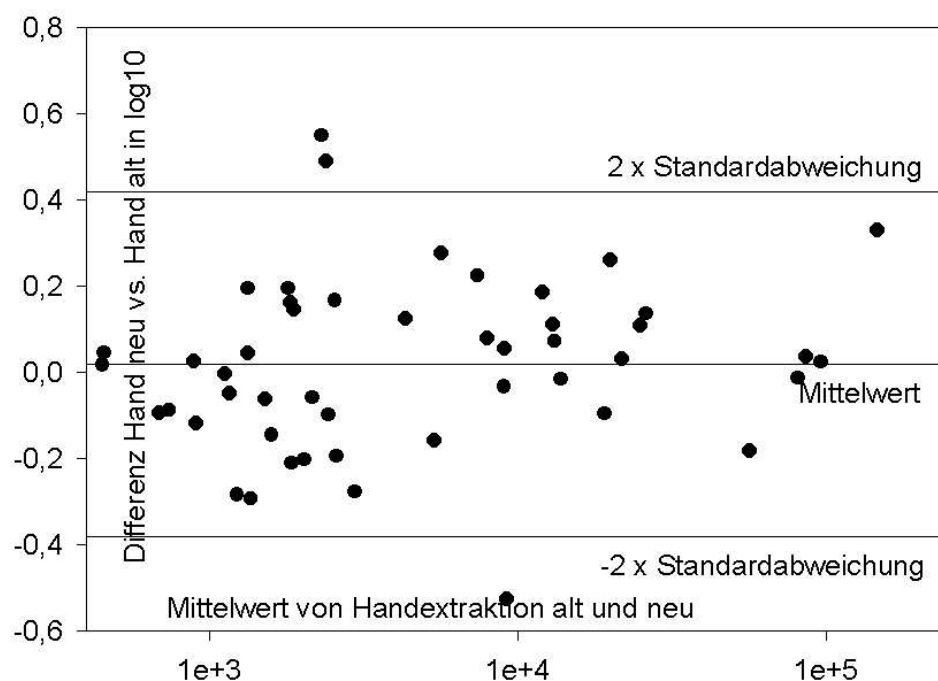


Grafik 48: Viruslasten der Proben Handextraktion alt versus Handextraktion neu



Nach Bland und Altman zeigten die Viruslasten, die per manueller Extraktion und COBAS neu ermittelt wurden und die alten, bereits im Rahmen einer anderen Doktorarbeit ermittelten Viruslasten eine exzellente Übereinstimmung, falls beide positive Werte lieferten. Im Mittel lag die Differenz bei 0,0187 log₁₀, bei einer Standardabweichung von 0,2000 log₁₀. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) lagen bei 0,4187 log₁₀ und -0,3813 log₁₀, das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das 2,5fache.

Grafik 49: Übereinstimmung der Viruslasten von Handextraktion alt und Handextraktion neu nach Bland und Altman



3.5 Zeitaufwand und Kosten

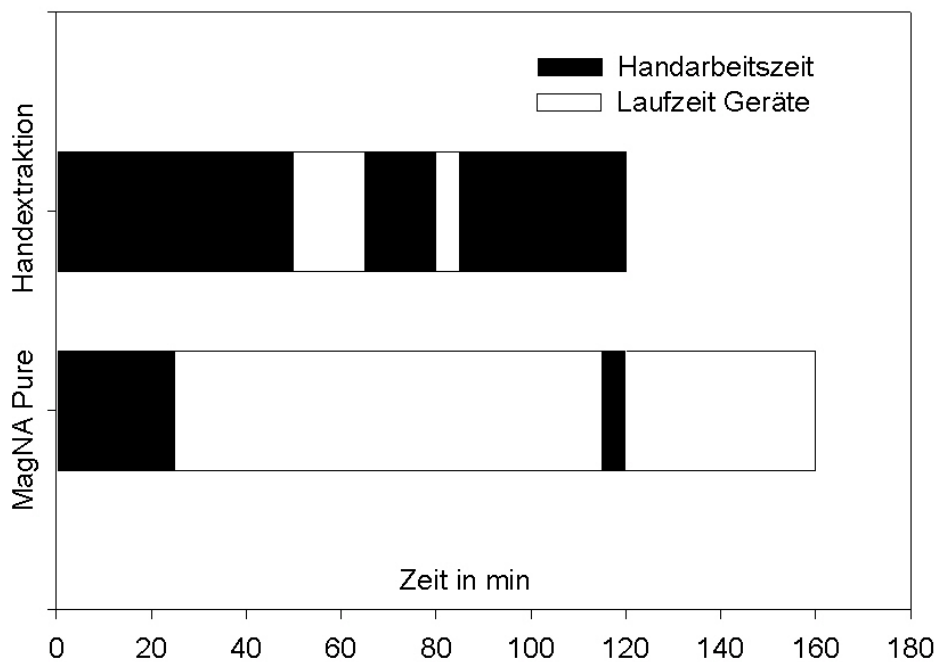
Abgesehen von den Anschaffungskosten des MagNA Pure entstanden durch Verbrauchsgüter zusätzliche Kosten von etwa 4 Euro pro Probe, im Vergleich zur manuellen Extraktion.

Die notwendige Gesamtzeit zur Extraktion und Analyse von 24 Proben mit dem vollautomatisierten Protokoll betrug etwa 160 min, verglichen mit der manuellen

Extraktion, bei einer etwaigen Dauer von 120 min, eine zusätzliche Dauer von 40 min.

Die benötigte Zeit für manuelle Arbeitsschritte lag beim vollautomatisierten Protokoll aber bei nur etwa 30 min, im Vergleich zur manuellen Extraktion mit circa 100 min ein relativer Zeitgewinn von etwa 70 min.

Grafik 50: Zeitaufwand des vollautomatisierten Protokolls versus Handextraktion



4 Diskussion

4.1 Stand der Forschung

4.1.1 Allgemeines

Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik, der Prophylaxe und der Therapie der HCMV- Infektion haben dazu geführt, dass Morbidität und Mortalität der HCMV- Erkrankung nach HSCT gesenkt wurden. Dennoch gehört die HCMV- Erkrankung immer noch zu den Hauptursachen infektbedingter Komplikationen und Todesfälle (Einsele et al., 2000). Bei etwa 75% der seropositiven Patienten kommt es nach HSCT zur HCMV- Reaktivierung, 20- 30% entwickeln ohne antivirale Therapie eine HCMV- Erkrankung (Ljungman, 2002). Die kombinierte Gabe von Ganciclovir und Immunglobulinen konnten zwar die frühe Mortalität auf etwa 50% senken (Ljungman, 2002), die Langzeitüberlebensrate liegt jedoch nur bei etwa 30% (Einsele et al., 2001).

Aufgrund der hohen Letalität sind frühe antivirale Strategien zur Vermeidung einer Erkrankung entscheidend. Zwei Möglichkeiten zur Prävention werden angewandt und diskutiert, einerseits die Chemoprophylaxe zur Vermeidung einer Reaktivierung, andererseits die präemptive Therapie, die darauf abzielt, die Entwicklung einer Erkrankung nach der Reaktivierung von HCMV zu verhindern.

4.1.2 Chemoprophylaxe

In zahlreichen Studien wurde die antivirale Chemoprophylaxe untersucht. In zwei großen Studien zeigte eine Prophylaxe mit Acyclovir eine Reduktion der HCMV- Infektionen und eine höhere Überlebensrate bei intravenöser Hochdosis-therapie (Meyers et al., 1988; Prentice et al., 1994), trotz seiner geringeren in vitro- Wirksamkeit, verglichen mit den anderen zur Verfügung stehenden Mitteln. Prentice et al. zeigten aber auch, dass das Auftreten von HCMV- Erkrankungen mit 8% gegenüber 11% unverändert hoch war. Nach einer Studie von Ljungman et al. (1998b) hatte hochdosiertes, prophylaktisch verabreichtes Acyclovir keinen Einfluss auf die Inzidenz von Erkrankungen und Todesraten.

Eine randomisierte, prospektive Studie untersuchte die prophylaktische Gabe von Valacyclovir im Vergleich zur Hochdosisprophylaxe mit Acyclovir. Die Zahl der Reaktivierungen konnte gesenkt werden. Es zeigte sich jedoch kein Überlebensvorteil. Auch das Risiko für eine HCMV- Erkrankung war unverändert. Bei Kombination mit einer präemptiven Ganciclovir- Therapie konnte deren Notwendigkeit um 50% gesenkt werden (Ljungman et al., 2002c). Eine weitere Studie zeigte diesbezüglich ebenfalls vielversprechende Ergebnisse (Nakamura et al., 2002). So trat bei nur 6% der 174 Patienten innerhalb der ersten 400 Tage eine HCMV- Erkrankung auf, nur ein Patient starb wegen einer HCMV- Pneumonie.

Zwei randomisierte, doppelblinde, Placebo- kontrollierte Studien untersuchten die Prophylaxe mit intravenösem Ganciclovir. In beiden Studien wurde die Inzidenz der HCMV- Infektion gesenkt. So zeigten Goodrich et al. (1993) eine Reduktion von 45% auf etwa 3%. Erkrankungen traten aber nur bei der Studie von Goodrich et al. mit 10% gegenüber 29% weniger häufig auf. Die Mortalitätsraten waren im Vergleich zu den Placebogruppen bei beiden Studien unverändert hoch (Goodrich et al., 1993; Winston et al., 1993). Dafür gibt es zwei mögliche Gründe, zum einen die durch die Medikamentengabe induzierte Neutropenie, die zu einem höheren Risiko für opportunistische Infektionen führt (Salzberger et al., 1997), zum anderen ist die Ganciclovir- Prophylaxe mit einer verzögerten Immunantwort spezifischer T- Zellen auf HCMV assoziiert, wodurch vermehrt späte HCMV- Erkrankungen auftreten (Li et al., 1994, Boeckh et al., 1996).

Orales Ganciclovir wurde in einer kleinen Studie als Prophylaxe getestet. Es zeigten sich jedoch hohe Infektionsraten bei geringer Tolerabilität (Boeckh et al., 1998).

Die prophylaktische Gabe von Valganciclovir ist in der klinischen Erprobungsphase (Ljungman, 2002; Zaia, 2002a).

Foscarnet wurde ebenfalls als Prophylaxe getestet. Ippoliti et al. (1997) zeigten, dass bei 15% der Patienten trotz Prophylaxe eine aktive Infektion auftrat. In einer Studie von Ordemann et al. (2000) trat bei 24% der Patienten eine Reaktivierung auf, außerdem musste bei 38% der Patienten wegen Nebenwirkungen

die Dosis reduziert werden, bei 29% der Patienten musste die Therapie deswegen abgebrochen werden. Ferner existieren bis heute keine Daten zur Überlebensrate (Ljungman, 2002).

4.1.3 Präemptive Therapie

Da nur bei etwa 20- 30% der Patienten eine Infektion auftritt, würde eine generelle Prophylaxe eine Übertherapie bei 70- 80% der Patienten bedeuten, mit allen dadurch entstehenden Risiken und Nebenwirkungen, wie Neutropenie, opportunistische Infektionen, späte HCMV- Erkrankungen, aber auch höhere Kosten. Aus diesem Grund hat sich die präemptive Therapie mehr und mehr durchgesetzt (Avery et al., 2000).

Goodrich et al. (1991) zeigten, dass die präemptive Therapie auf Basis des shell vial- Assay das Risiko für eine HCMV- Erkrankung senkt und die Überlebensrate steigt. Bei 12% der Patienten trat jedoch eine Erkrankung vor oder während der ersten positiven Kultur auf. Mandanas et al. (1996) zeigten eine HCMV- assoziierte Todesrate von 10%. Stocchi et al. (1999) konnten bei T- Zell- freien, nicht verwandten Knochenmarktransplantationen beim Vergleich der präemptiven Therapie nach Kurzzeit- Kultur mit der Ganciclovir- Prophylaxe keinen Unterschied bei der Überlebensrate nach einem Jahr und der HCMV- assoziierten Todesrate feststellen, das Auftreten von HCMV- Infektionen und HCMV- Erkrankungen innerhalb des ersten Jahres war bei der präemptiven Therapie mit 74% und 64% gegenüber 53% und 30% sogar höher als bei der Prophylaxe.

Einsele et al. (1995) zeigten in einer randomisierten Studie, dass die PCR- basierte präemptive Therapie verglichen mit der schnellen Kultur die Inzidenz der HCMV- Erkrankung, die HCMV- assoziierte Mortalität, sowie die Therapiedauer senken konnte. Die Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie bestätigt, bei höherer Überlebensrate insgesamt (Ljungman et al., 1998b). Ein Abbruch der Therapie nach negativer PCR war in einer weiteren Untersuchung sicher, es trat keine HCMV- Erkrankung auf. Bei einer Therapiedauer größer vier Wochen fanden Einsele et al. (2000) jedoch auch bei der präemptiven Therapie ein erhöhtes Risiko, sowohl für spät auftretende HCMV- Erkrankungen, als

auch für opportunistische Infektionen. Auch Machado et al. (2000) zeigten eine Verschiebung des Auftretens der interstitiellen Pneumonie auf einen Median von 92 Tagen nach Transplantation. Ein engmaschigeres Screening, beispielsweise zweimal die Woche, bei akuter GvHD und anderen Hochrisikofaktoren, sowie ein länger andauerndes Screening über Tag 100 nach HSCT hinaus insbesondere bei chronischer GvHD und einer Therapiedauer größer vier Wochen könnten das Risiko der Patienten weiter absenken (Einsele et al., 2000).

Boeckh et al. (1996) untersuchten in einer randomisierten, doppelblinden Studie die präemptive Therapie nach pp65- Antigenämie- Bestimmung. Verglichen mit der Ganciclovir- Prophylaxe, war die Prävention der Erkrankung unverändert. Zwar zeigte die Prophylaxe einen besseren Schutz während der Gabe des Medikaments, jedoch waren späte Erkrankungen, Neutropenie und Pilzinfektionen häufiger und senkten die Langzeitüberlebensrate auf gleiches Niveau. Bei höherer Sensitivität des Antigenämie- Tests konnten sowohl die Inzidenz der HCMV- Erkrankung, als auch die Inzidenz invasiver Pilzinfektionen gesenkt werden (Boeckh et al., 1999).

Moretti et al. (1998) zeigten, dass auch Foscarnet gleichwertig eingesetzt werden kann. In einer größeren Studie waren die Effizienz von Foscarnet und Ganciclovir vergleichbar, außerdem traten bei Foscarnet weniger häufig Neutropenien auf, bei gleicher Nephrotoxizität (Reusser et al., 2002). Auch die Kombination von Ganciclovir und Foscarnet kann ohne höhere Toxizität eingesetzt werden (Bacigalupo et al., 1996).

Cidofovir zeigte bei 66% der Patienten Erfolg, bei denen Ganciclovir oder Foscarnet nicht angeschlagen hatten (Ljungman et al., 2001). Eine kleine prospektive Studie zeigte auch in der präemptiven Therapie bei 90% der Patienten eine Virus- Clearance (Platzbecker et al., 2001). Ljungman et al. (2001) konnten dieses Ergebnis bei nur 62% Ansprechen nicht bestätigen.

Zum heutigen Zeitpunkt wird die präemptive Therapie favorisiert, einige Zentren bevorzugen aber auch die Prophylaxe. So ergab eine Umfrage in den Vereinigten Staaten, dass 53% der Zentren eine präemptive Therapie durchführen, 21% eine generelle Prophylaxe (Avery et al., 2000). Manche

Autoren empfehlen auch eine Wahl der Präventionsstrategie nach Risikoabschätzung bezüglich des Auftretens einer Infektion (Zaia, 2002a; Mori et al., 2000) oder richten die Dosis am Ansprechen auf die Therapie, mit Hilfe einer Antigenämie- Bestimmung aus (Kanda et al., 2002).

4.1.4 Diagnostische Möglichkeiten

Wie bereits gezeigt, erfordert die präemptive Therapie sensitive Tests, die eine Reaktivierung vor Manifestation einer Erkrankung signalisieren. Breite Anwendung finden die PCR, der Hybrid- Capture- Assay, die pp65- Antigenämie und die shell- vial- Culture (Avery et al., 2000). Die interstitielle Pneumonie manifestiert sich ohne Therapie etwa 50- 60 Tage nach Transplantation (Zaia, 2002a).

Boeckh et al. (1997) zeigten, dass die shell- vial- Culture und die pp65- Antigenämie- Bestimmung im Median bei etwa 42 Tagen nach Transplantation positiv werden. Der Assay ist sensitiv, aber zeitaufwendig. Eine Automatisierung ist nicht möglich, die Proben müssen schnell verarbeitet werden. Eine Quantifizierung erfolgt durch die Angabe der pp65- positiven Zellen pro Slide (ca. 100.000 Granulocyten) und korreliert mit der Viruslast im Blut (Thorner, 2002; Flexman et al., 2001). Aufgrund der schwierigen oder unmöglichen Durchführbarkeit und geringerer Sensitivität während der neutropenen Phase, werden beide Möglichkeiten bei HSCT- Patienten vielfach abgelehnt (St. George et al., 2000; Thorner, 2002; Zaia, 2002a; Solano et al., 2001; Halwachs-Baumann et al., 2001). So konnten Flexman et al. (2001), bei pp65 negativen Patienten eine Viruslast von bis zu 43000 Kopien pro ml Plasma nachweisen.

PCR und Hybrid- Capture- Assay werden im Median etwa 35 Tage nach Transplantation positiv (Einsele et al., 1995; Hebart et al., 2001a). Somit ergibt sich ein um eine Woche vergrößertes Sicherheitsfenster. Ein weiterer Vorteil der Plasma- PCR liegt in der zuverlässigen Durchführbarkeit während der neutropenen Phase (Limaye et al., 2001). Sensitivität, Spezifität, positive und negative prädiktive Werte von pp65- Antigenämie und PCR sind vergleichbar (Caliendo et al., 2000; Camargo et al., 2001).

Die hohe Sensitivität der Tests bedingt einen niedrigen positiven prädiktiven Wert. So wird bei einer Vielzahl von Patienten eine HCMV- Infektion nachgewiesen, ohne dass sich jemals eine HCMV- Erkrankung manifestieren würde. Um den positiven prädiktiven Wert zu erhöhen, werden neue Verfahren evaluiert. Geeignet scheinen insbesondere die Bestimmung der mRNA (Blok et al., 1998; Lam et al., 1998; Gerna et al., 1999; Greijer et al., 2001; Oldenburg et al., 2000; Witt et al., 2000; Grangeot- Keros und Cointe, 2001; Amorim et al., 2001) und die Quantifizierung der Viruslast.

Der COBAS Amplicor CMV Monitor ermöglicht eine quantitative, standardisierte und im Bereich der Amplifikation und der Detektion automatisierte PCR. Seine Eignung für die präemptive Therapie und als Bestätigungstest für eine sensitivere In- House- PCR wurde in zahlreichen Untersuchungen bestätigt (Caliendo et al., 2000; Caliendo et al., 2002; Flexman et al., 2001; Masaoka et al., 2001, Piiparinen et al., 2001). Der Test ist derzeit nur für die Forschung, nicht jedoch für die Routinediagnostik zugelassen.

4.1.5 Bedeutung der Viruslast

Die Quantifizierung der Viruslast bekommt im Rahmen der Therapiesteuerung, insbesondere der Resistenzerkennung und der Verbesserung des positiven prädiktiven Werts der PCR immer mehr Bedeutung. Sie erlaubt Rückschlüsse auf die Virusreplikation und damit die Aktivität des Virus. Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Bedeutung der Viruslast für die Entstehung HCMV- assoziierter Erkrankungen.

So besteht eine direkte Verbindung zwischen der Höhe der Viruslast, dem Risiko einer Erkrankung nach HSCT (Boeckh et al., 2003, Limaye et al., 2001) und den mit der Erkrankung assoziierten Todesfällen (Boeckh et al., 2003). Auch für Patienten nach einer soliden Organtransplantation (Sanchez et al., 2001; Michaelides et al., 2001., Nazzari et al., 2000) und für HIV- Patienten (Gourlain et al., 2003; Yoshida et al., 2001) konnte dieser Zusammenhang nachgewiesen werden. Bei Lungentransplantierten zeigte sich zusätzlich eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer HCMV- Pneumonie und der Viruslast in der BAL (Riise et al., 2000).

Auch die Anfangsviruslast zeigt einen direkten Zusammenhang mit dem Risiko des Auftretens einer Erkrankung bei HSCT- Patienten (Emery et al., 2000) und SOT- Patienten (Emery et al., 2000; Rollag et al., 2002; Norris et al., 2002).

Außerdem korreliert der Anstieg der Viruslast signifikant mit dem Auftreten einer Erkrankung nach HSCT (Emery et al., 2000) und SOT (Emery et al., 2000; Norris et al., 2002) und deren Symptomatik (Tong et al., 2000).

Humar et al. (2002) beobachteten die Viruslast von Patienten nach SOT unter Ganciclovir- Therapie. Dabei stellten sie fest, dass sich bei Patienten ohne spätere erneute Reaktivierung die Viruslast innerhalb von 3,17 Tagen halbierte, bei Patienten mit erneuter Reaktivierung erst nach 8,8 Tagen.

Die Symptomatik der Erkrankung hängt ebenfalls von der Viruslast ab, das konnte für SOT- Patienten (Piiparinen et al., 2002; Tong et al., 2000) und für die infantile HCMV- assoziierte Hepatitis gezeigt werden, hier stellte sich eine direkte Korrelation von GPT/GOT und Viruslast heraus (Funato et al., 2001). Für die Viruslasten im Urin (Halwachs- Baumann et al., 2002) und im Fruchtwasser (Nedelec et al., 2002) bei congenitalen Infektionen konnte dieser Zusammenhang aber nicht hergestellt werden.

Para et al. (2001) stellten bei HIV- Patienten eine Korrelation zwischen CD4+- Zellzahl und HCMV- Viruslast fest. Auch eine HCMV- Erkrankung in der Patientengeschichte korrelierte mit der Viruslast. Sie betrug im Median 1780 Kopien pro ml.

Quamruddin et al. (2001) schlagen als Cutoff für SCT- Patienten 1000 G/ml vor. Gor et al. (1998) stellten fest, dass das Risiko für eine HCMV- Erkrankung nach HSCT für Patienten mit einer Viruslast von weniger als 3,5 log₁₀ (3160) G/l kleiner als 10% ist, bei Patienten mit einer Viruslast von 5 log₁₀ (100000) G/l aber bereits 80% beträgt.

Bei Organtransplantierten wird der Cutoff wesentlich höher angesetzt, da HSCT- Patienten wesentlich geringere Viruslasten ausbilden (Aitken et al., 1999; Caliendo et al., 2002; Tong et al., 2000; Flexman et al., 2001). Er reicht von 2000- 5000 G/ml (Caliendo et al., 2002) bis zu 130000 G/ml (Aitken et al., 1999). Für die Bestimmung aus Leukocyten empfehlen Nazzari et al (2000) einen Cutoff von 1000 Kopien pro 200000 Leukocyten, Camargo et al. (2001)

zeigten bei Herztransplantierten, dass ein Cutoff von 50.000 bzw. 100.000 Kopien pro 100.000 Leukocyten positive und negative prädiktive Werte von 53,8 und 100% bzw. 60 und 94,1% für eine HCMV- Erkrankung bedeuten.

Ein Cutoff bei 1000 Kopien pro ml Plasma für HIV- Patienten zeigte einen Anstieg des positiven prädiktiven Werts für eine HCMV- Erkrankung von 33% auf 44% (Wiselka et al., 1999)

Li et al. (2003) staffelten den Cutoff für eine Therapie auf Stufen von 1000, 4000 oder 10000 Kopien pro ml Plasma, je nach Risikogruppe.

Nichtsdestotrotz ist aber auch bekannt, dass bereits geringe Viruslasten mit einer HCMV- Erkrankung assoziiert sein können (Boeckh et al., 1992; Boivin et al., 1998; Gor et al., 1998).

Schaefer et al. (2001) zeigten bei Nierentransplantierten dass die Area under the Viraemia Curve höhere Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte erlaubt, als ein Cutoff.

Für die Zukunft sollte für die jeweilige Patientengruppe ein Cutoff ermittelt werden, ab dem eine Therapie notwendig wird, um eine Erkrankung zu verhindern, sowie ein Wert, ab dem die Therapie ohne das Risiko einer Erkrankung beendet werden kann. Außerdem könnte sich die Therapie in ihrer Art und der Dosis der Medikamente an der Viruslast orientieren. Hierzu liegen bereits erste Versuche vor (Mori et al., 2002).

Fest steht, dass in der Diagnostik anderer Virusinfektionen die quantitative Analyse der Viruslast große Bedeutung hat. Für HIV- Patienten ermöglicht sie Rückschlüsse auf die Krankheitsprognose, eine Indikationsstellung zur Therapie, sowie eine Möglichkeit der Therapie- Kontrolle. Für HBV und HCV kommt der Viruslast ähnliche Bedeutung zu (Berger und Preiser, 2002).

4.1.6 Resistenzen

Mittels eines quantitativen Monitorings der Viruslast können Resistenzen frühzeitig erkannt werden. Sie stellen bei der Behandlung von HCMV- Infektionen und HCMV- Erkrankungen ein zunehmendes Problem dar. Mutationen der UL97- Proteinkinase, aber auch der UL54- DNA- Polymerase können zu einer Ganciclovir- Resistenz führen, UL54- Mutationen spielen auch

eine Rolle bei Resistenzen gegen Cidofovir und Foscarnet (Emery, 2001; Limaye, 2002; Erice, 1999). Erste Resistenzen gegen Ganciclovir wurden bereits 1989 beschrieben (Erice et al., 1989). Risikofaktoren sind eine hohe Viruslast, eine lange Behandlungsdauer, orale Therapie im Vergleich zu intravenöser Therapie, Immunsuppression und der Serostatus D+/R- bei SOT-Patienten (Limaye, 2002, Hebart et al., 1998; Emery und Griffiths, 2000). Besonders gefährdet scheinen Patienten nach Lungen-, Pankreas-, sowie Knochenmarktransplantation (Drew et al., 2001).

Limaye et al. (2002) fanden retrospektiv in einer kleinen Studie bei Lungentransplantierten Patienten in 10% der Fälle Ganciclovir-resistente Viren mit UL97-Mutation, die Inzidenz war unabhängig davon, ob der Patient prophylaktisch oder präemptiv behandelt wurde. Patienten mit dem Serostatus D+/R- hatten ein erhöhtes Risiko. Letzteres deckt sich mit den Ergebnissen von Borade et al. (2002), die Inzidenz lag in dieser Studie bei etwa 6%.

Jabs et al. (2003) untersuchten HIV-Patienten unter HCMV-Therapie mit Ganciclovir. 9% entwickelten eine Ganciclovir-Resistenz mit UL97-Mutation. Boivin et al. (2001) zeigten nach 18 Monaten bei 15% der mit Valganciclovir behandelten HIV-Patienten eine UL97-Mutation mit Ganciclovir-Resistenz.

4.1.7 Automatisierung

Höhere Probenzahlen erfordern in der molekularen Diagnostik die Entwicklung automatisierter Systeme mit hohen Durchlaufzahlen (Holzl et al., 2003). Im Bereich der Amplifizierung und Detektion bestehen bereits automatisierte Systeme, die Isolation der Nukleinsäuren wird aber immer noch überwiegend von Hand durchgeführt. Sie stellt den kritischen Schritt der PCR dar, stellt hohe Anforderungen ans Laborpersonal und ist arbeitsintensiv und zeitaufwendig (Fiebelkorn et al., 2002; Kessler et al., 2001). Mit jedem manuellen Arbeitsschritt steigt das Risiko für falsch positive Ergebnisse (Clewley, 1989; Kwok und Higuchi, 1989). Die volle Automatisierung würde dazu beitragen, menschliche Fehler und Kontaminationen zu minimieren und die Arbeitskosten zu reduzieren (Holzl et al., 2003). Außerdem würden zuverlässigere und standardisierte, vergleichbarere Ergebnisse möglich (Jungkind, 2001).

Allerdings bedeutet die Automatisierung auch höhere Materialkosten und eine zunehmende Technisierung (Holzl et al., 2003).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Leistungsvergleich MagNA Pure versus manuelle Extraktion

4.2.1.1 Übereinstimmung der ermittelten Viruslasten

Das Protokoll A zeigte nach Bland und Altman eine gute Übereinstimmung, falls beide Verfahren positive Werte lieferten. Im Mittel lag die Differenz bei $0,0806 \log_{10}$, bei einer Standardabweichung von $0,2354 \log_{10}$. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) lagen bei $0,5514 \log_{10}$ und $-0,3902 \log_{10}$, das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Dreifache.

Mit Protokoll B konnte die Übereinstimmung weiter verbessert werden. Nach Bland und Altman zeigten die Viruslasten die mit Protokoll B und parallel mit der manuellen Extraktion bestimmt wurden eine sehr gute Übereinstimmung, falls beide positive Werte lieferten. Im Mittel lag die Differenz bei $0,0061 \log_{10}$, bei einer Standardabweichung von $0,1971 \log_{10}$. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) lagen bei $0,4003 \log_{10}$ und $-0,3881 \log_{10}$, das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Zweieinhalbfache.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Fiebelkorn et al. (2002). Bei der Untersuchung von 45 HCMV- positiven Proben ermittelten sie nach Bland und Altman eine durchschnittliche Differenz von $0,009 \log_{10}$, bei einer Standardabweichung von $0,153 \log_{10}$. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) lagen hier bei $0,315 \log_{10}$ und $-0,297 \log_{10}$. Das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Zweifache. Allerdings setzten sie in ihrem Protokoll eine höhere Konzentration an QS ein.

Eine erneute Untersuchung eingefrorener Proben mittels manueller Extraktion zeigte ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung zu den Ergebnissen der bereits erfolgten manuellen Extraktion, falls beide positive Werte lieferten. Im Mittel lag die Differenz bei $0,0187 \log_{10}$, bei einer Standardabweichung von

0,2000 log₁₀. Die Grenzen der Übereinstimmung (Mittelwert +/- zwei Standardabweichungen) lagen bei 0,4187 log₁₀ und -0,3813 log₁₀, das heißt, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Zweieinhalbfache. Das deckt sich mit der Übereinstimmung von Protokoll B und der manuellen Extraktion, was vermuten lässt, dass die Differenzen im COBAS Amplicor entstehen, nicht aber bei der Extraktion im MagNA Pure.

4.2.1.2 Vergleich der ermittelten Extinktionswerte des QS, der Proben und der Kontrollen

Protokoll A zeigte für die validen Extinktionen des QS als Median ein Minus von 86% im Vergleich zur manuellen Extraktion. Als mögliche Ursache für diesen Verlust kommt die direkte Zugabe des Standards zum Plasma in Frage, denkbar wäre eine Zerstörung des QS durch Plasmabestandteile. Die mediale Abweichung der Extinktionswerte der Proben, verglichen mit der manuellen Extraktion, lag bei minus 88%. Problematisch war hierbei, dass neu ermittelte Werte gelagerter Proben mit alten Werten verglichen wurden. Möglicherweise führte das Einfrieren und Wiederauftauen der Proben nach etwa einem Jahr zum Verlust von Virus- DNA. Die dennoch gute Übereinstimmung der ermittelten Viruslasten lässt sich dadurch erklären, dass die Viruslast durch das Verhältnis der beiden Extinktionen bestimmt wird.

Protokoll B lieferte, durch Ausschluss oben aufgeführter Störfaktoren bezüglich der Extinktionen wesentlich bessere Ergebnisse. Wiederum waren jedoch die Extinktionen des Standards (QS) und der Proben erniedrigt. QS und Proben zeigten in etwa einen medialen Verlust von -60% (-58% und -61%) zur manuellen Extraktion. Ähnliche Abweichungen konnten für die Kontrollen ermittelt werden (-70% und -60%). Die bestimmten Viruslasten zeigten bei medialen Abweichungen von -20% für die schwach positive Kontrolle und +12% für die stark positive Kontrolle kaum Differenzen.

Das zu Protokoll B nur durch Automatisierung weiterer Arbeitsschritte veränderte Protokoll C zeigte ähnliche Ergebnisse. Für den Standard konnte als Median ein Extinktionsminus von 53% ermittelt werden, für die Kontrollen Abweichungen von medial -62% (lpos) und -54% (hpos). Die Viruslasten der

Kontrollen zeigten mit medial -15% (lpos) und +7% (hpos) ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit der manuellen Extraktion.

Da das vollautomatisierte Protokoll nur um einen weiteren automatisierten Pipettierschritt ergänzt wurde, sind auch hier vergleichbare Ergebnisse zu erwarten.

Die hochgradige Übereinstimmung der ermittelten Viruslasten der Proben und Kontrollen erklärt sich erneut durch das unveränderte Verhältnis der Extinktionen. Die Ursache des Verlusts muss an dieser Stelle unbeantwortet bleiben, ist aber im Ablauf des MagNA Pure zu suchen. Möglicherweise geht durch die flüssige Extraktion ohne Pelletgewinnung DNA verloren, weil nicht die gesamte DNA an die Magnetic Glass Particles (MGPs) bindet. Denkbar wäre auch, dass während der Elution nicht die gesamte DNA von den MGPs gelöst und damit verworfen wird.

Fiebelkorn et al. (2002) beschreiben ebenfalls einen initialen Verlust von etwa 50% bei ihren Versuchen. Die Ursache hierfür liegt aber in der falsch eingesetzten Menge an QS. Da in ihrer Untersuchung die Ergebnisse erst am Ende um einen entsprechenden Faktor umgerechnet wurden, ist fraglich, ob vergleichbare Extinktionen ermittelt wurden.

Hölzl et al. (2003) führten ähnliche Versuche zum Nachweis von HIV-1- RNA mittels MagNA Pure und COBAS durch. Zum Verlustausgleich wurden hier zehn Prozent mehr Plasma eingesetzt, die Menge an QS, die benötigt wurde, um zur manuellen Extraktion vergleichbare Werte zu liefern, wurde über eine Verdünnungsreihe bestimmt. Beides waren Eingriffe in die Standardisierung des Tests.

4.2.1.3 Sensitivität

Mit Protokoll A waren 18 von 32 Proben, verglichen mit den alten Werten der manuellen Extraktion, falsch negativ, in einem Bereich von 528 bis 8710 (Median: 1180, Durchschnitt: 1682) Kopien pro ml Plasma. Ein unbefriedigendes Ergebnis. Ursächlich kommen oben aufgeführte Störfaktoren in Betracht. Protokoll B führte zu 6 falsch negativen Proben, bei einer positiven Gesamtprobenzahl von 55, im Bereich von 442 bis 1680 Kopien pro ml Plasma

(Median: 864). Im Vergleich zur manuellen Extraktion ein deutlicher Sensitivitätsverlust auf nur noch 89% insgesamt. Berücksichtigen muss man aber den etwa 60%igen Verlust an Probe und Standard mit dementsprechender verminderter Extinktion, sowie die technische Gegebenheit des COBAS Amplicor, dass Viruslasten erst ab einer Probenextinktion von 0,200 berechnet werden. Rein technisch bedingt folgt daraus eine höhere Sensitivitätsgrenze. Unter Einbeziehung der Proben, bei denen Extinktionen kleiner 0,200 bestimmt wurden, die Ergebnisse wurden hier von Hand über bereits aufgeführte Formel errechnet, waren die Sensitivitäten von Protokoll B und der manuellen Extraktion vergleichbar gut. Sie lagen insgesamt bei 94% und 96%, sowie bei 98% mittels beider Verfahren, wenn Viruslasten größer 800 Kopien analysiert wurden und jeweils 100% bei Viruslasten größer 1000 Kopien pro ml Plasma.

Mit Protokoll C sollte die genaue Sensitivitätsgrenze bestimmt werden. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Allerdings zeigte sich bereits bei der höchsten Verdünnungsstufe von 700 Kopien pro ml Plasma nur eine Sensitivität von 60%. Das heißt, die absolute Sensitivitätsgrenze muss höher liegen. Rechnerisch ergab sich aus oben angeführten technischen Gründen eine mediale, maximale Sensitivitätsgrenze von 593 Kopien pro ml Plasma, für 95% der Proben eine maximale Sensitivitätsgrenze von 983 Kopien. Unter Einbeziehung aller Ergebnisse, die Probenextinktionen unter 0,200 ergaben, konnte eine mit der manuellen Extraktion vergleichbare Sensitivitätsgrenze erreicht werden.

Fiebelkorn et al (2002) untersuchten nur Proben mit Viruslasten im Bereich von 1000 bis 100000 Kopien pro ml Plasma. Demnach ergeben sich keine Rückschlüsse auf die untere Sensitivitätsgrenze. Für HCV konnten sie aber eine verbesserte Sensitivität unter Verwendung von MagNA Pure und COBAS Amplicor im Vergleich zur manuellen Extraktion feststellen.

Auch Hölzl et al. (2003) zeigten für HIV eine mit der manuellen Extraktion vergleichbare Sensitivitätsgrenze.

4.2.1.4 Spezifität

Keine der von Hand negativ getesteten Proben war mittels Extraktion im MagNA Pure falsch positiv. Ausgehend von einer Spezifität des COBAS

Amplicor und der manuellen Extraktion von 100% (Caliendo et al., 2000; Pellegrin et al., 1999; Tong et al., 1998), ergibt sich damit auch für die Kombination MagNA Pure und COBAS Amplicor eine Spezifität von 100%.

4.2.1.5 Reproduzierbarkeit

Ein kleiner Test der Reproduzierbarkeit des Protokoll B zeigte eine maximale Abweichung innerhalb eines Laufs von 0,19 log₁₀, die maximale Abweichung zwischen zwei Läufen lag bei 0,27 log₁₀.

Protokoll C zeigte unter Verwendung größerer Probenzahlen vergleichbare Ergebnisse. Insgesamt lag die Intraassay- Abweichung im bestimmbaren Bereich im Mittel bei 0,0672 log₁₀, Standardabweichung 0,0568 log₁₀. Die maximale Abweichung vom Mittelwert betrug hierbei 0,2436 log₁₀, das heißt, die maximale Abweichung führte zu einem 1,75fachen Ergebnis. Es zeigte sich eine größere Streuung im unteren Viruslastenbereich. Dabei lag die Interassay- Abweichung im Mittel bei 0,0634 log₁₀, bei einer Standardabweichung von 0,0352 log₁₀. Die maximale Abweichung vom Mittelwert betrug hierbei 0,1332 log₁₀, das heißt die maximale Abweichung betrug das 1,4fache des Mittelwerts. Betrachtet man allerdings die größtmögliche Differenz aller Einzelproben, so lag die maximale Abweichung bei 0,6 log₁₀, unter Ausschluss zweier Ausreißer bei 0,28 log₁₀. Das deckt sich in etwa mit den Streuungswerten der oben ermittelten Übereinstimmungen.

Der Variabilitätskoeffizient (CV) betrug im Schnitt 25% (19% bis 35%), mit steigenden Werten umgekehrt proportional zur Viruslast, wie auch bei der getrennten Betrachtung der CVs im Intraassay- und Interassay- Bereich, beide lagen im Schnitt bei 21% (15% bis 32%).

Fiebelkorn et al. (2002), ermittelten im selben Bereich der Viruslasten bei 10 Wiederholungen CVs von 12% bis 23%. Interessanterweise führte die parallel durchgeführte manuelle Extraktion zu gleichen Werten (12% bis 24%), was wiederum den Verdacht nahe legt, dass die Streuung durch den COBAS Amplicor bedingt sein könnte.

Hölzl et al. (2003) ermittelten für HIV- Kontrollproben Interassay- CVs von 28,0% und 35,9%, sowie Intraassay- CVs von 28% und 35,9%. Da die

Kontrollen ein Zielintervall besitzen und keine genaue Konzentration angegeben ist, sind die höheren Werte erklärbar.

Unter Verwendung der manuellen Extraktion zeigten Noborg et al. (1999) für HBV, dass der mittlere CV nach PCR im COBAS Amplicor 29,6% betrug, Konnick et al. (2002) stellten im laufinternen Vergleich für HCV Standardabweichungen bis 0,388 log₁₀, im Vergleich verschiedener Läufe Standardabweichungen bis 0,259 log₁₀ fest.

Versuche mit einer PCR im LightCycler nach MagNA Pure Extraktion zeigten eine bessere Reproduzierbarkeit (Epsy et al., 2001; Kessler et al., 2001), Loeffler et al. (2000) zeigten, dass diese unter Verwendung des LightCyclers in erster Linie von der Extraktionsweise abhängt. Insgesamt unterstützt das die Theorie, dass die schlechtere Reproduzierbarkeit unter Verwendung von MagNA Pure und COBAS Amplicor von letzterem geprägt ist.

4.2.1.6 Linearität

Im gesamten vom Hersteller als linear angegebenen Ergebnis- Bereich von 400 bis 100000 Kopien konnte die Linearität des COBAS Amplicor auch für die Ergebnisse der Viruslast in Kombination mit dem MagNA Pure durch zwei Verdünnungsreihen bestätigt werden.

4.2.1.7 Zuverlässigkeit

Im Rahmen der Versuche traten beim MagNA Pure über 12 Monate drei Störungen auf. Zwei davon konnten auf Bedienungsfehler zurückgeführt werden, eine technische Störung wurde seitens des Herstellers behoben. Fehler der Internen Kontrolle traten bei zwei von 412 (0,5%) der mit Protokoll C analysierten Proben auf. Es handelte sich dabei um eine Patientenprobe, die auch im Wiederholungsversuch nicht analysierbar war. Demnach ist davon auszugehen, dass die Probe beispielsweise mit Heparin verunreinigt war.

Nolte et al. (2001) beschreiben bei Versuchen mit manueller Extraktion und COBAS Amplicor zum Nachweis von HCV bei 1,1% der Proben fehlerhafte interne Kontrollen.

4.2.1.8 Zeitaufwand und Kosten

Für 24 Proben wurden für die manuelle Extraktion etwa 120 min, für das vollautomatisierte Protokoll etwa 160 min benötigt. Eine Zunahme um 40 min. Andererseits konnte aber die Handarbeitszeit von 100 min auf 30 min gesenkt werden. Außerdem ist die verbleibende Handarbeitszeit praktischer verteilt. So sind zum Starten des Geräts etwa 25 min Zeit notwendig, nach 90 min Gerätelaufzeit nur noch weitere 5 min zum Starten der Post- Elution. Im Vergleich dazu wurde die Handarbeitszeit bei der konventionellen Extraktion nur durch zwei Abschnitte von 5 min und 15 min unterbrochen.

Für 24 Proben entstehen durch Verbrauchsgüter und Reagenzien des MagNA Pure zusätzliche Kosten von etwa 4 Euro. Bei einem Kostenpunkt der Analyse im COBAS Amplicor von 100 Euro eine geringe Preissteigerung, die durch die gesparte Handarbeitszeit mehr als ausgeglichen wird.

Fiebelkorn et al. (2002) beschreiben für ihre Versuche eine Handarbeitszeit von 15 min bei 90 min Laufzeit des MagNA Pure, auch Williams et al. (2002) kommen zu einem Ergebnis von 20 min Handarbeitszeit, Hölzl et al. (2003) ermittelten 25min Handarbeitszeit.

4.2.1.9 Eignung für den Klinikalltag

Das vollautomatisierte Protokoll zeichnet sich durch leichte Bedienbarkeit aus. Bis auf die Bereitstellung der Reagenzien, der Proben und der Kontrollen, der Verbrauchsgüter, sowie die Erfassung im Computersystem, erfolgt alles weitere vollautomatisiert.

Ebenfalls von Vorteil sind das geringe Probenvolumen von 200 µl und die einfache Probengewinnung. Die Tatsache, dass Plasma als Ausgangsmaterial eingesetzt wird, ermöglicht auch eine Untersuchung in Neutropenie (Masaoka et al., 2001).

Die begrenzte mögliche Kapazität von 24 Proben innerhalb von 160 min, stellt aber eine Begrenzung für Labore mit größeren Probenzahlen dar. Die Automatisierung und die Standardisierung bieten den Vorteil vom Personal unabhängige, verlässlichere Ergebnisse zu liefern, bei größerer Vergleichbar-

keit. Das könnte die Erarbeitung neuer antiviraler Strategien und die Erprobung von Medikamenten im Rahmen von Multicenter- Studien vereinfachen.

4.2.1.10 Zukunft

Die Vernetzung der Computersoftware des COBAS Amplicor und des MagNA Pure könnte eine weitere Vereinfachung erzielen. Demnach müssten Proben nicht doppelt erfasst werden.

Da Viruslasten bei Proben unter einer Extinktion von 0,200 nicht errechnet werden, müsste diesbezüglich die Software des COBAS Amplicor umgestellt werden. Eine andere Möglichkeit wäre das Einsetzen der doppelten Konzentration, die durch eine Verdünnung des Eluats mit nur 100 µl statt 300 µl an Dilution Buffer erreicht werden könnte. Dadurch würde am Verhältnis der Konzentrationen an Standard und Ziel- DNA nichts verändert werden. Hierzu wären aber weitere Versuche notwendig.

Ein Umstellen der Software des MagNA Pure für die Post- Elution könnte weitere Zeitersparnis bringen. Die Geschwindigkeit der Pipettierschritte ist auf den LightCycler und seine kleinen Pipettiermengen im 5µl- Bereich abgestimmt. Eine derartige Genauigkeit ist bei Mengen von zumindest 50 µl für den COBAS Amplicor nicht unbedingt erforderlich.

Durch eine Kombination des LightCyclers mit dem MagNA Pure könnte weiter Zeit gespart werden.

4.3 Klinische Erprobung

Im Rahmen der Valganciclovir- Studie wurden mit Protokoll C 33 Patienten wöchentlich auf HCMV gescreent. Hierbei entstand ein Probenvolumen von 262 Stück. Bei 13 Patienten erfolgte im Beobachtungszeitraum eine Reaktivierung. Das führte zu 54 positiven Proben im Bereich 559 bis 216000 Kopien pro ml Plasma (Median: 3875), davon sieben unter 1000 Kopien pro ml Plasma. Proben unter einer Extinktion von 0,200 wurden nicht berücksichtigt, ansonsten wären 5 von 207 negativen Patientenproben im Bereich von 416 bis 470 Kopien pro ml Plasma zusätzlich positiv gewesen. Bei Patienten mit positivem Ergebnis

wurde die Therapie nach Schema eingeleitet, nach altem Schema wäre die Therapie erst beim zweiten positiven Ergebnis in Folge gestartet worden.

Da die In- House PCR im Laufe der Studie zugunsten der PCR im COBAS nicht mehr durchgeführt wurde, war ein Vergleich zwischen In- House- PCR und Protokoll C nur bei 7 Patienten möglich.

Davon zeigten drei Patienten simultane erste positive Werte, hätte man die Proben unter einer Extinktion von 0,200 gewertet, wäre einer der Patienten eine Woche früher positiv gewesen. Alle drei Patienten wurden demnach eine Woche früher behandelt, als nach konventionellem Schema.

Ein Patient wurde mit Protokoll C und in der pp65- Antigenämie positiv, ohne, nach Einleitung der Therapie, je ein positives Ergebnis in der In- House- PCR zu zeigen, demnach wurde er zumindest zwei Wochen früher therapiert.

Ebenso zeigte ein Patient in der In- House- PCR ein positives Ergebnis eine Woche früher an. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse unter einer Extinktion von 0,200 hätte die Positivierung zeitgleich stattgefunden. Dieser Patient verdient besondere Beachtung, da er nach fulminantem Anstieg der Viruslast eine HCMV- Pneumonie entwickelte, die Therapie wurde aber zum selben Zeitpunkt eingeleitet, wie nach konventionellem Schema.

Zwei Patienten lieferten inhomogene Ergebnisse, sie waren mit der konventionellen PCR früher positiv, zeigten aber in der Folgewoche wieder negative Ergebnisse, ohne dass eine Therapie eingeleitet worden wäre. Gegenätzlich dazu lieferte Protokoll C aber positive Ergebnisse. Demnach wurde auch bei diesen Patienten die Therapie mindestens zwei Wochen früher eingeleitet, als nach altem Behandlungsschema.

Bezüglich der Sensitivität waren die In- House- PCR und die Kombination MagNA Pure COBAS Amplicor vergleichbar bei leichtem Vorteil für die In- House- PCR, unter Berücksichtigung der Proben unter einem Extinktionswert von 0,200 hätten beide nahezu identische Ergebnisse geliefert. Der Vergleich mit der Bestimmung von pp65 lieferte ebenfalls eine gute zeitliche Übereinstimmung, allerdings bei größeren Streubreiten. Im Schnitt waren beide Methoden nach durchschnittlich 34 Tagen positiv.

Zum einem vergleichbaren Ergebnis kommen von Müller et al. (2002), die in einer Multicenter- Studie In- House- PCRs und den COBAS Amplicor verglichen. Dabei zeigte sich, dass sensitivere In- House- Tests aktive HCMV- Infektionen früher und häufiger detektierten, war die Sensitivität der Methoden aber vergleichbar, erfolgte der Nachweis simultan.

Caliendo et al. (2000) berichteten von einer guten zeitlichen Übereinstimmung von pp65- Antigenämie und COBAS Amplicor, auch Flexman et al (2001) ermittelten eine hohe Korrelation zwischen beiden Verfahren.

Therapeutisch gesehen wurde ein Patient zeitgleich, alle anderen mindestens eine Woche früher behandelt, als nach altem Schema. Unter Berücksichtigung der Proben unter einer Extinktion von 0,200 hätte sich die frühere Therapie weiter verstärkt.

Aufgrund der kleinen Patientenzahl ist hier keine abschließende Beurteilung für die Eignung zur Routinediagnostik und Therapiesteuerung möglich, dafür sind weitere Versuche notwendig. Prinzipiell eignet sich der COBAS Amplicor für die präemptive Therapie (Caliendo et al., 2000; Caliendo et al., 2002; Flexman et al., 2001; Masaoka et al., 2001, Piiparinen et al., 2001). Um eine vergleichbare Sensitivität mit dem vollautomatisierten Protokoll zu erreichen müssten dazu aber auch die Ergebnisse unter einer Extinktion von 0,200 berücksichtigt werden. Einer drohenden Übertherapie könnte durch Festlegen eines Cutoffs, für die Therapieeinleitung entgegengewirkt werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung eines vollautomatisierten Verfahrens zum Nachweis von HCMV. Hierzu sollten die bestehenden Systeme MagNA Pure und COBAS Amplicor verknüpft werden. Die Extraktion im MagNA Pure sollte dabei bei allen Testkriterien vergleichbare Ergebnisse zur manuellen Extraktion liefern.

Nach Vorversuchen konnte ein solches vollautomatisiertes Protokoll entwickelt werden, lediglich Proben, Kontrollen, Reagenzien und Verbrauchsgegenstände müssen von Hand bereitgestellt werden.

Im Vergleich zur manuellen Extraktion, die sich durch Pelletgewinnung auszeichnet, konnte durch das vollautomatisierte Protokoll im MagNA Pure, das auf einer flüssigen Gewinnung und Aufreinigung unter Zuhilfenahme von magnetischen Glaspartikeln basiert, letztendlich nur etwa die Hälfte der extrahierten DNA- Menge als Ergebnis über die Extinktionsmessung ermittelt werden. Dieser Verlust betraf die Proben, die Kontrollen und auch die Interne Kontrolle, den Standard, gleichermaßen.

Auf die ermittelten Viruslasten hatte dieses Problem aber keine Auswirkung, da für deren Berechnung das Verhältnis der DNA- Konzentrationen von Standard und Probe entscheidend ist. So zeigte sich eine exzellente Übereinstimmung der Viruslasten im Vergleich zur manuellen Extraktion, 95% der Proben zeigten als maximale Abweichung das Zweieinhalbfache. Die Differenzen konnten weitgehend auf die Entstehung im Ablauf des COBAS Amplicor zurückgeführt werden.

Technisch bedingt zeigte sich zunächst eine schlechtere Sensitivität im unteren Viruslastenbereich. Durch die Software des COBAS Amplicor werden Viruslasten erst ab einer bestimmten Probenextinktion berechnet, die durch den Verlust an DNA nicht erreicht werden konnte. Wurden die Proben manuell berechnet, so zeigte sich eine absolut vergleichbare Sensitivität von 94% und 96% (manuelle Extraktion) bei allen Proben, sowie 98% für beide Verfahren bei Viruslasten größer 800 Kopien pro ml Plasma und 100% bei Viruslasten größer

1000 Kopien pro ml Plasma. Die Spezifität betrug für beide Verfahren unverändert 100%.

Reproduzierbarkeit, Variabilitätskoeffizienten, Intraassay- und Interassay-Abweichungen, sowie die Linearität im analysierbaren Viruslastenbereich von 400 bis 100000 Kopien pro ml Plasma zeigten zur manuellen Extraktion unveränderte Werte. Differenzen konnten wiederum auf die Entstehung im Ablauf des COBAS Amplicor zurückgeführt werden.

Die Kosten für die Gesamtanalyse pro Probe stiegen in geringem Maße um 4% (4 Euro), auch die Gesamtarbeitszeit für 24 Proben verlängerte sich um 40 min. Andererseits konnte aber die Handarbeit im Bereich der Extraktion deutlich von 100min auf 30min reduziert werden.

Das vollautomatisierte Verfahren zeichnete sich durch einfache Durchführbarkeit aus, bei hochgradiger Zuverlässigkeit der Geräte und einer einzigen fehlerhaften Probe, die vermutlich durch Verunreinigung bei der Abnahme zustande kam.

Die klinische Erprobung im Rahmen der Valganciclovir- Studie wurde an einer begrenzten Patientenzahl durchgeführt, erste Daten sprechen aber für die Eignung zur Diagnostik und Steuerung der präemptiven Therapie. Weitere Ergebnisse müssen abgewartet werden, vor allem im Vergleich zu home-made PCR- Techniken und dem pp65- Antigenämie- Assay, um dieses neue Verfahren bezüglich seiner Eignung für ein klinisches Screeningprogramm abschliessend beurteilen zu können.

LITERATURVERZEICHNIS

Adler, S.P., Plotkin, S.A., Gonczol, E., Cadoz, M., Meric, C., Wang, J.B., Dellamonica, P., Best, A.M., Zahradnik, J., Pincus, S., Berencsi, K., Cox, W.I., Gyulai, Z. (1999)

A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne).

J. Infect. Dis. 180, 843-846

Ahlfors, K., Ivarsson, S.A., Harris, S. (1999)

Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature.

Scand. J. Infect. Dis. 31, 443-457

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, 2804-807

Amorim, M.L., Cabeda, J.M., Seca, R., Mendes, A.C., Castro, A.P., Amorim, J.M. (2001)

CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays.

BMC Infect. Dis. 1, 2

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 pre-emptive therapy.

Bone Marrow Transplant. 26, 763-767

Bacigalupo, A., Bregante, S., Tedone, E., Isaza, A., Van Lint, M.T., Moro, F., Trespi, G., Occhini, D., Gualandi, F., Lamparelli, T., Marmont, A.M. (1996)

Combined foscarnet-ganciclovir treatment for cytomegalovirus infections after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation (Hsct).

Bone Marrow Transplant. 18, 110-114

Balslev, U., Monforte, A.D., Stergiou, G., Antunes, F., Mulcahy, F., Pehrson, P.O., Phillips, A., Pedersen, C., Lundgren, J.D. (1997)

Influence of age on rates of new AIDS-defining diseases and survival in 6546 AIDS patients.

Scand. J. Infect. Dis. 29, 337-343

Berencsi, K., Gyulai, Z., Gonczol, E., Pincus, S., Cox, W.I., Michelson, S., Kari, L., Meric, C., Cadoz, M., Zahradnik, J., Starr, S., Plotkin, S. (2001)

A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects.

J. Infect. Dis. 183, 1171-1179

Berger, A., Preiser, W. (2002)

Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV.

J. Antimicrob. Chemother. 49, 713-721

Bhorade, S.M., Lurain, N.S., Jordan, A., Leischner, J., Villanueva, J., Durazo, R., Creech, S., Vigneswaran, W.T., Garrity, E.R. (2002)

Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in lung transplant recipients.

J. Heart Lung Transplant. 21, 1274-1282

Bissinger, A.L., Sinzger, C., Kaiserling, E., Jahn, G. (2002)

Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease.

J. Med. Virol. 67, 200-206

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, 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., 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., Zaia, J.A., Jung, D., Skettino, S., Chauncey, T.R., Bowden, R.A. (1998)

A study of the pharmacokinetics, antiviral activity, and tolerability of oral ganciclovir for CMV prophylaxis in marrow transplantation.
Biol. Blood Marrow Transplant. 4, 13-19

Boeckh, M. (1999)

Current antiviral strategies for controlling cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: prevention and therapy.
Transpl. Infect. Dis. 1, 165-178

Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S.R., Bowden, R.A., Huang, M.L., Myerson, D., Stevens- Ayers, T., Flowers, M.E., Cunningham, T., Corey, L. (2003)

Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity [In Process Citation].
Blood 101, 407-414

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

Comparative evaluation of the cytomegalovirus DNA load in polymorphonuclear leukocytes and plasma of human immunodeficiency virus-infected subjects
J. Infect. Dis. 177, 355-360

Boivin, G., Gilbert, C., Gaudreau, A., Greenfield, I., Sudlow, R., Roberts, N.A. (2001)

Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis.
J. Infect. Dis. 184, 1598-1602

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 Transplant. 26, 23-29

Brown, F., Banken, L., Saywell, K., Arum, I. (1999)

Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers.
Clin. Pharmacokinet. 37, 167-176

Caliendo, A.M., St George, K., Kao, S.Y., Allegra, J., Tan, B.H., La Fontaine, R., Bui, 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., Allegra, J., Bullotta, A.C., Gilbane, L., Rinaldo, C.R. (2002)

Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays.

J. Clin. Microbiol. 40, 1581-1586

Camargo, L.F., Uip, D.E., Simpson, A.A., Caballero, O., Stolf, N.A., Vilas-Boas, L.S., Pannuti, C.S. (2001).

Comparison between antigenemia and a quantitative-competitive polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after heart transplantation.

Transplantation 71, 412-417

Cassoux, N., Lumbroso, L., Bodaghi, B., Zazoun, L., Katlama, C., Le Hoang, P. (1999)

Cystoid macular oedema and cytomegalovirus retinitis in patients with HIV disease treated with highly antiretroviral therapy.

Br. J. Ophthalmol. 83, 47-49

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. (2001)

Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications.

Transpl. Infect. Dis. 3, 20-24

Clewley, J.P. (1989)

The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis.

J. Virol. Methods 25, 179-188

Cobbs, C.S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G.Y., Bharara, S., King, P.H., Nabors, L.B., Cobbs, C.G., Britt, W.J. (2002)

Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma.

Cancer Res. 62, 3347-3350

Cocohoba, J.M., McNicholl, I.R. (2002)

Valganciclovir: an advance in cytomegalovirus therapeutics.
Ann. Pharmacother. 36, 1075-1079

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

Human cytomegalovirus: pathology, diagnosis, treatment.
Adv. Nephrol. Necker Hosp. 19, 333-356

Crippa, F., Corey, L., Chuang, E.L., Sale, G., Boeckh, M. (2001)

Virological, clinical and ophthalmologic features of cytomegalovirus retinitis after hematopoietic stem cell transplantation.
Clin. Infect. Dis. 32, 214-219

Cunha Ade, A., Marin, L.J., Aquino, V.H., Figueiredo, L.T. (2002)

Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo 44, 127-132

Curran, M., Noble, S. (2001)

Valganciclovir.
Drugs 61, 1145-1152

De Maar, E.F., Verschuuren, E.A., Homan vd Heide, J.J., Kas. Deelen, D.M., Jagernath, D., The, T.H., Ploeg, R.J., van Son, W.J. (2002)

Effects of changing immunosuppressive regimen on the incidence, duration, and viral load of cytomegalovirus infection in renal transplantation : a single center report.
Transpl. Infect. Dis. 4, 17-24

Degre, M. (2002)

Has cytomegalovirus infection any role in the development of arteriosclerosis?
Clin. Microbiol. Infect. 8, 191-195

Doniger, J., Muralidhar, S., Rosenthal, L.J. (1999)

Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate.
Clin. Microbiol. Rev. 12, 367-382

Drew, W.L., Paya, C.V., Emery, V. (2001)

Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals.
Am. J. Transplant. 1, 307-312

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., Hebart, H., Wittkowski, K.M., Schuler, U., Jahn, G., Mackes, P., Herter, M., Klingebiel, T., Loffler, J. et al. (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 86, 2815-2820

Einsele, H., Hebart, H., Kauffmann- Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Loffler, 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, 757-763

Einsele, H., Bertz, H., Beyer, J., Kiehl, M.G., Kolb, H.- J., Holler, E., Beck, R., Schwerdfeger, R., Schuhmacher, U., Hebart, H., Martin, H., Kienast, J., Ullmann, A.J., Maschmeyer, G., Krüger, W., Link, H., Schmidt, C.A., Oettle, H., Klingebiel, T. (2001)

Epidemiologie und interventionelle Therapiestrategien infektiöser Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation.

Dtsch. Med. Wochenschr. 126, 1278-1284

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

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

Blood 99, 3916-3922

Emanuel, D. (1990)

Treatment of cytomegalovirus disease

Sem. Hematol. 27, 22-27

Emery, V.C. (1999)

Viral Dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology.

Intervirology 42, 405-411

Emery, V.C., Sabin, C.A., Cope, A.V., Gor, D., Hassan- Walker, A.F., Griffiths, P.D. (2000)

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. (2000)

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, 223-228

Epsy, M.J., Rys, P.N., Wold, A.D., Ull, J.R., Sloan, L.M., Jenkins, G.D., Ilstrup, D.M., Cockeril III, F.R., Patel, R., Rosenblatt, J.E., Smith, T.F. (2001)

Detection of herpes simplex virus DNA in genital and dermal specimens by LightCycler PCR after extraction using the IsoQuick, MagNA Pure, and BioRobot 9604 methods.

J. Clin. Microbiol. 39, 2233-2236

Erice, A., Chou, S., Biron, K.K., Stanat, S.C., Balfour, H.H., Jordan, M.C. (1989)

Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients.

N. Engl. J. Med. 320, 289-293

Erice, A. (1999)

Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs.

Clin. Microbiol. Rev. 12, 286-297

Falagas, M.E., Arbo, M., Ruthazer, R., Griffith, J.L., Werner, B.G., Rohrer, R., Freeman, R., Lewis, W.D., Snyderman, D.R. (1997)

Cytomegalovirus disease is associated with increased cost and hospital length of stay among orthotopic liver transplant patients.

Transplantation 63, 1595-1601

Farber, S., Wolbach, S.B. (1932)

Intranuclear and cytoplasmic inclusions (iprotzoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of infants.

Am. J. Pathol. 8, 123-135

Fiebelkorn, K.R., Lee, B.G., Hill, C.E., Caliendo, A.M., Nolte, F.S. (2002)

Clinical evaluation of an automated nucleic acid isolation system.

Clin. Chem. 48, 1613-1615

Flexman, J., Kay, I., Fonte, R., Herrmann, R., Gabbay, E., Palladino, S. (2001)

Differences between the quantitative antigenemia assay and the cobas amplicor monitor quantitative PCR assay for detecting CMV viraemia in bone marrow and solid organ transplant patients.

J. Med. Virol. 64, 275-282

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

Hämatologie, 1312-1470

in: Innere Medizin, Duale Reihe

Hippokrates Verlag Stuttgart im Georg Thieme Verlag

Funato, T., Satou, N., Abukawa, D., Satou, J., Abe, Y., Ishii, K.K., Inuma, K., Kaku, M., Sasaki, T. (2001)

Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis.
J. Viral. Hepat. 8, 217-222

Gaytant, M.A., Steegers, E.A., Semmekrot, B.A., Merkus, H.M., Galama, J.M. (2002)

Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome.
Obstet. Gynecol. Surv. 57, 245-256

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

Goodpasture, E.W., Talbot, F.B. (1921)

Concerning the nature of protozoan-like cells in certain lesions of infancy.
Am. J. Dis. Child 21, 415-425

Gerna, G., Baldanti, F., Middeldorp, J.M., Furione, M., Zavattoni, M., Lilleri, D., Revello, M.G. (1999)

Clinical significance of expression of human cytomegalovirus pp67 late transcript in heart, lung, and bone marrow transplant recipients as determined by nucleic acid sequence-based amplification.
J Clin Microbiol 37, 902-911

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

Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms [In Process Citation].
Drug Resist. Updat. 5, 88-114

Gonczol, E., Plotkin, S. (2001)

Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials.
Expert. Opin. Biol. Ther. 1, 401-412

Goodpasture, E.W., Talbot, F.B. (1921)

Concerning the nature of protozoan-like cells in certain lesions of infancy.
Am. J. Dis. Child 21, 415-425

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

Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation.
N. Engl. J. Med. 325, 601-607

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 transplant.

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

Gourlain, K., Salmon, D., Gault, E., Leport, C., Katlama, C., Matheron, S., Costagliola, D., Mazon, M.C., Fillet, A.M. (2003)

Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA by real-time PCR for occurrence of CMV disease in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy [In Process Citation].

J. Med. Virol. 69, 401-407

Grangeot- Keros, L., Cointe, D. (2001)

Diagnosis and prognostic markers of HCMV Infection.

J. Clin. Virol. 21, 213-221

Greijer, A.E., Verschuuren, E.A., Harmsen, M.C., Dekkers, C.A., Adriaanse, H.M., The, T.H., Middeldorp, J.M. (2001)

Direct quantification 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 (ISSN: 0095-1137)

Guo, T., Jia, H. (1998)

Epidemiologic study of cytomegalovirus infection in patients with diabetes mellitus.

Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 19, 274-276

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

Halwachs- Baumann, G., Genser, B., Pailer, S., Engele, H., Rosegger, H., Schalk, A., Kessler, H.H., Truschnig- Wilders, M. (2002)

Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns.

J. Clin. Virol. 25, 81-87

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

Zytomegalievirus, 576-581

in: Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulverer
Urban und Fischer, 8.Auflage**Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C.P., Jahn, G. (2001)**

Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding.

Lancet 357, 513-518**Hebart, H., Wuchter, P., Loeffler, J., Gscheidle, B., Hamprecht, K., Sinzger, C., Jahn, G., Dietz, K., Kanz, L., Einsele, H. (2001a)**

Evaluation of the Murex CMV DNA Hybrid Capture assay (version 2.0) for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant.

Bone Marrow Transplant 28, 213-218**Hebart, H., Brugger, W., Grigoleit, U., Gscheidle, B., Loeffler, J., Schäfer, H., Kanz, L., Einsele, H., Sinzger, C. (2001b)**

Risk for cytomegalovirus disease in patients receiving polymerase chain reaction- based preemptive antiviral therapy after allogeneic stem cell transplantation depends on transplantation modality.

Blood 97, 2183-2185**Hemmings, D.G., Kilani, R., Nykiforuk, C., Preiksaitis, J., Guilbert, L.J. (1998)**

Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts.

J. Virol. 72, 4970-4979**Hengel, H. (2000)**

Cytomegalievirus (CMV).

In: Klinische Infektiologie, 833-834

1. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena

Herold, G. (2002)

Innere Medizin.

Gerd Herold, München

Holmberg, L.A., Boeckh, M., Hooper, H., et al. (1999)

Increased incidence of cytomegalovirus disease after autologous CD34-selected peripheral blood stem cell transplantation.

Blood 94, 4029-4035

Holzl, G., Stocher, M., Leb, V., Stekel, H., Berg, J. (2003)

Entirely automated quantification of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA in plasma by using the ultrasensitive COBAS AMPLICOR HIV-1 monitor test and RNA purification on the MagNA pure LC instrument.
J. Clin. Microbiol. 41, 1248-1251

Humar, A., Gregson, D., Caliendo, A.M., McGeer, A., Malkan, G., Krajden, M., Corey, P., Greig, P., Walmsley, S., Levy, G., Mazzulli, T. (1999)

Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients.
Transplantation 68, 1305-1311

Humar, A., Gillingham, K., Payne, W.D., Sutherland, D.E., Matas, A.J. (2000)

Increased incidence of cardiac complications in kidney transplant recipients with cytomegalovirus disease.
Transplantation 70, 310-313

Humar, A., Kumar, D., Boivin, G., Caliendo, A.M. (2002)

Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease.
J. Infect. Dis. 186, 829-833

Hummel, M., Abecassis, M.M. (2002)

A model for reactivation of CMV from latency.
J. Clin. Virol. 25, 123-136

Ippoliti, C., Morgan, A., Warkentin, D., van Besien, K., Mehra, R., Khouri, I., Giralt, S., Gajewski, J., Champlin, R., Andersson, B., Przepiorka, D. (1997)

Foscarnet for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic marrow transplant recipients unable to receive ganciclovir.
Bone Marrow Transplant. 20, 491-495

Iwamoto, G.K., Konicek, S.A. (1997)

Cytomegalovirus immediate early genes upregulate interleukin-6 gene expression.
J Investig Med 45, 175-182

Jabs, D.A., Gilpin, A.M., Min, Y.I., Erice, A., Kempen, J.H., Quinn, T.C. (2002)

HIV and cytomegalovirus viral load and clinical outcomes in AIDS and cytomegalovirus retinitis patients: Monoclonal Antibody Cytomegalovirus Retinitis Trial.
AIDS 16, 877-887

Jabs, D.A., Martin, B.K., Forman, M.S., Hubbard, L. Dunn, J.P., Kempen, J.H., Davis, J.L., Weinberg, D.V. (2003)

Cytomegalovirus resistance to ganciclovir and clinical outcomes of patients with cytomegalovirus retinitis.

Am. J. Ophthalmol. 135, 26-34

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

Jung, D., Dorr, A. (1999)

Single- dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV- seropositive subjects.

J. Clin. Pharmacol. 39, 800-804

Jungkind, D. (2001)

Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction-- our past, our present, our future.

J. Clin. Virol. 20, 1-6

Kanda, Y., Mineishi, S., Saito, T., Saito, A., Ohnishi, M., Niiya, H., Chizuka, A., Nakai, K., Takeuchi, T., Matsubara, H., Makimoto, A., Tanosaki, R., Kunitoh, H., Tobinai, K., Takaue, Y. (2002)

Response-oriented preemptive therapy against cytomegalovirus disease with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation.

Transplantation 73, 568-572

Karavellas, M.P., Lowder, C.Y., Macdonald, J.C., Avila, C.P., Freeman, W. (1998)

Immune recovery vitritis associated with inactive cytomegalovirus retinitis.

Arch. Ophthalmol. 116, 169-175

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

Medizinische Mikrobiologie

8. Auflage, Thieme, Stuttgart, New York

Kearns, A.M., Turner, A.J., Eltringham, G.J., Freeman, R. (2002)

Rapid detection and quantification of CMV DNA in urine using LightCycler-based real-time PCR.

J. Clin. Virol. 24, 131-134

Ketteler, M., Preuschhof, L., Mertz, A., Stoffler- Meilicke, M., Schafer, H., Distler, A., Offermann, G. (2000)

Fatal cytomegalovirus pneumonia after preemptive antiviral therapy in a renal transplant recipient.

Clin. Nephrol. 54, 418-424

Kessler, H.H., Muehlbauer, G., Stelzl, E., Daghofer, E., Santner, B.I., Marth, E. (2001)

Fully automated nucleic acid extraction: MagNA Pure LC.

Clinical Chemistry 47, 1124-1126

Kidd, I.M., Clark, D.A., Sabin, C.A., Andrew, D., Hassan- Walker, A.F., Sweny, P., Griffiths, P.D., Emery, V.C. (2000)

Prospektive study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co- infection with cytomegalovirus disease and increased rejection.

Transplantation 69, 2400-2404

Kim, W.R., Badley, A.D., Wiesner, R.H., Porayko, M.K., Seaberg, E.C., Keating, M.R., Evans, R.W., Dickson, E.R., Krom, R.A., Paya, C.V. (2000)

The economic impact of cytomegalovirus infection after liver transplantation.

Transplantation 69, 357-361

Kline, J.N., Hunninghake, G.M., He, B., Monick, M.M., Hunninghake, G.W. (1998)

Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines.

Exp Lung Res 24, 3-14

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 cytomegalovirus antigenemia-guided preemptive ganciclovir therapy.

J. Pediatr. Hematol. Oncol. 19, 43-47

Kolson, D.L., Gonzalez- Scarano, F. (2001)

HIV- associated neuropathies: role of HIV- 1, CMV, and other viruses.

J. Peripher Nerv Syst. 6, 2-7

Konnick, E.Q., Erali, M., Ashwood, E.R., Hillyard, D.R. (2001)

Performance characteristics of the COBAS Amplicor Hepatitis C Virus (HCV) Monitor, version 2.0, international unit assay and the national genetics institute HCV Superquant assay.

J. Clin. Microbiol. 40, 768-773

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

Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene.

J. Virol. 61, 125-133

Kuo, I.C., Imai, Y., Shum, C., Martin, D.F., Kuppermann, B.D., Margolis, T.P. (2003)

Genotypic analysis of cytomegalovirus retinitis poorly responsive to intravenous ganciclovir but responsive to the ganciclovir implant.

Am. J. Ophthalmol. 135, 20-25

Kwok, S., Higuchi, R. (1989)

Avoiding false positives with PCR.

Nature 339, 237-238

Lalezari, J., Lindley, J., Walmsley, S., Kuppermann, B., Fisher, M., Friedberg, D., Lalonde, R., Matheron, S., Nieto, L., Torriani, F.J., Van Syoc, R., Sutton, M.A., Buhles, W., Stempien, M.J. (2002)

A safety study of oral valganciclovir maintenance treatment of cytomegalovirus retinitis.

J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 30, 392-400

Lam, K.M., Oldenburg, N., Khan, M.A., Gaylore, V., Mikhail, G.W., Strouhal, P.D., Middeldorp, J.M., Banner, N., Yacoub, M. (1998)

Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients.

J. Heart Lung Transplant. 17, 555-565

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

Lautenschlager, I., Soots, A., Krogerus, L., Kauppinen, H., Saarinen, O., Bruggeman, C., Ahonen, J. (1997a)

CMV increases inflammation and accelerates chronic rejection in rat kidney allografts.

Transplant Proc 29, 802-803

Lautenschlager, I., Soots, A., Krogerus, L., Kauppinen, H., Saarinen, O., Bruggeman, C., Ahonen, J. (1997b)

Effect of cytomegalovirus on an experimental model of chronic renal allograft rejection under triple-drug treatment in the rat.

Transplantation 64, 391-398

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

Cidofovir.

Drugs 52, 225-231

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

Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis.

Blood 83, 1971-1979

Li, H., Dummer, J.S., Estes, W.R., Meng, S., Wright, P.F., Tang, Y.W. (2003)

Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients [In Process Citation]

J. Clin. Microbiol. 41, 187-191

Limaye, A.P., Bowden, R.A., Myerson, D., Boeckh, M. (1997)

Cytomegalovirus disease occurring before engraftment in marrow transplant recipients.

Clin Infect Dis 24, 830-835

Limaye, A.P., Huang, M.L., Leisenring, W., Stensland, L., Corey, L., Boeckh, M. (2001)

Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients.

J Infect Dis 183, 377-382

Limaye, A.P. (2002)

Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients.

Clin. Infect. Dis. 35, 866-872

Limaye, A.P., Raghu, G., Koelle, D.M., Ferrenberg, J., Huang, M.L., Boeckh, M. (2002)

High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy.

J. Infect. Dis. 185, 20-27

Lin, T.S., Zahrieh, D., Weller, E., Alyea, E.P., Antin, J.H., Soiffer, R.J. (2002)

Risk factors for cytomegalovirus reactivation after cd6+ T- cell- depleted allogeneic bone marrow transplantation.

Transplantation 74, 49-54

Lin, W.R., Wozniak, M.A., Wilcock, G.K., Itzhaki, R.F. (2002)

Cytomegalovirus is present in a very high proportion of brains from vascular dementia patients.

Neurobiol. Dis. 9, 82-87

Ljungman, P., Griffiths, P. (1993)

Definitions of cytomegalovirus infection and disease.

In: Michelson, S., Plotkin, S. Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease.

Excerpta Medical International Congress Series Amsterdam, 233-237

Ljungman, P., Plotkin, S. (1995)

Proceedings from the 5th international cytomegalovirus conference (Stockholm): CMV definitions and new syndroms.

Scand. J. Infect. Dis. 99, 87-89

Ljungman, P., Cordonnier, C., Einsele, H., Bender- Gotze, C., Bosi, A., Dekker, A., De la Camara, R., Gmur, J., Newland, A.C., Prentice, H.G., Robinson, A.J., Rovira, M., Rosler, W., Veil, D. (1998a)

Use of intravenous immune globulin in addition to antiviral therapy in the treatment of CMV gastrointestinal disease in allogeneic bone marrow transplant patients: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Infectious Diseases Working Party of the EBMT.

Bone Marrow Transplant. 21, 473-476

Ljungman, P., Aschan, J., Lewensohn- Fuchs, I., Carlens, S., Larsson, K., Lonnqvist, B., Mattsson, J., Sparrelid, E., Winiarski, J., Ringden, O. (1998b)

Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients.

Transplantation 66, 1330-1334

Ljungman, P., Deliliers, G.L., Platzbecker, U., Matthes- 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.

The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.

Blood 97, 388-392

Ljungman, P. (2002)

Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients.

British Journal of Haematology 118, 44-57

Ljungman, P., Larsson, K., Kumlien, G., Aschan, J., Barkholt, L., Gustafsson- Jernberg, A., Lewensohn- Fuchs, I., Ringden, O. (2002a)

Leukocyte depleted, unscreened blood products give a low risk for CMV infection and disease in CMV seronegative allogeneic stem cell transplant recipients with seronegative stem cell donors.

Scand. J. Infect. Dis. 34, 347-350

Ljungman, P., Griffiths, P., Paya, C. (2002b)

Definitions of Cytomegalovirus Infection and disease in transplant recipients.
Clin. Infect. Dis. 34, 1094-1097

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

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

Loeffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagemeyer, L., Schumacher, U., Einsele, E. (2000)

Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system.
J. Clin. Microbiol. 38, 586-590

Lopez- Rocafort, L., Brennan, D.C. (2001)

Current review of cytomegalovirus in renal transplantation.
Minerva Urol. Nefrol. 53, 145-158

Lüllmann, H., Mohr, K. (1999)

Pharmakologie und Toxikologie.
14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

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

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

Mandanas, R.A., Saez, R.A., Selby, G.B., Confer, D.L. (1996)

Cytomegalovirus surveillance and prevention in allogeneic bone marrow transplantation: examination of a preemptive plan of ganciclovir therapy.
Am. J. Hematol. 51, 104-111

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.
Recenti. Prog. Med. 87, 545-548

Marre, R., Mertens, T., Trautmann, M., Vanek, E. (2000)

Klinische Infektiologie
1. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena

Martin, D.F., Sierra- Madero, J., Walmsley, S., Wolitz, R.A., Macey, K., Georgiou, P., Robinson, C.A., Stempien, M.J. (2002)

A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis.

N. Engl. J. Med. 346, 1119-1126

Marwick, C. (1998)

First "antisense" drug will treat CMV retinitis.

JAMA 280, 871

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

Maschke, M., Kastrup, O., Diener, H.C. (2002)

CNS manifestations of cytomegalovirus infections: diagnosis and treatment.

CNS Drugs 16, 303-315

Mattila, P.S., Aalto, S.M., Heikkila, L., Mattila, S., Nieminen, M., Auvinen, E., Hedman, K., Tarkkanen, J. (2001)

Malignancies after heart transplantation: presence of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus.

Clin. Transplant. 15, 337-342

Mazzulli, T., Drew, L.W., Yen- Lieberman, B., Jekic- McMullen, D., Kohn, D.J., Isada, C., Moussa, G., Chua, R., Walmsley, S. (1999)

Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia.

J. Clin. Microbiol. 37, 958-963

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

Meijer, E., Dekker, A.W., Rozenberg- Arska, M., Weersink, A.J., Verdonck, L.F. (2002)

Influence of cytomegalovirus seropositivity on outcome after t-cell-depleted bone marrow transplantation: contrasting results between recipients of grafts from related and unrelated donors.

Clin. Infect. Dis. 15, 703-712

Meyers, J.D., Reed, E.C., Shepp, D.H., Thornquist, M., Dandliker, P.S., Vicary, C.A., Flournoy, N., Kirk, L.E., Kersey, J.H., Thomas, E.D. et al. (1988)

Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation.

N. Engl. J. Med. 318, 70-75

Michaelides, A., Liolios, L., Glare, E.M., Spelman, D.W., Bailey, M.J., Walters, E.H., Williams, T.J., Snell, G.I., Kotsimbos, T.C. (2001)

Increased human cytomegalovirus (HCMV) DNA load in peripheral blood leukocytes after lung transplantation correlates with HCMV pneumonitis.

Transplantation 72, 141-147

Minamishima, Y., Minematsu, T. (1998)

Laboratory diagnosis of cytomegalovirus, HHV- 6 and HHV- 7 infectious diseases.

Nippon Rinsho 56, 109-114

Minder W.H. (1953)

Die Aetiologie der Cytomegalia Infantium.

Schweiz. Med. Wochenschr. 83, 1180-1182

Modrow, S., Falke D. (1997)

Molekulare Virologie

1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Moretti, S., Zikos, P., Van Lint, M.T., Tedone, E., Occhini, D., Gualandi, F., Lamparelli, T., Mordini, N., Berisso, G., Bregante, S., Bruno, B., Bacigalupo, A. (1998)

Forscarnet vs ganciclovir for cytomegalovirus (CMV) antigenemia after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation (HSCT): a randomised study.

Bone Marrow Transplant. 22, 175-180

Mori, T., Okamoto, S., Matsuoka, S., Yajima, T., Wakui, M., Watanabe, R., Ishida, A., Iwao, Y., Mukai, M., Hibi, T., Ikeda, Y. (2000)

Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation.

Bone Marrow Transplant. 25, 765-769

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51, 263-273

Nakamura, R., Cortez, K., Solomon, S., Battiwalla, M., Gill, V.J., Hensel, N., Childs, R., Barrett, A.J. (2002)

High- dose acyclovir and pre-emptive ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease in myeloablative and non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation [In Process Citation]

Bone Marrow Transplant. 30, 235-242

Nazzari, C., Gaeta, A., Lazzarini, M., Castelli, T.D., Mancini, C. (2000)

Multiplex polymerase chain reaction for the evaluation of cytomegalovirus DNA load in organ transplant recipients.

J. Med. Virol. 61, 251-258

Nedelec, O., Bellagra, N., Devisme, L., Hober, D., Wattre, P., Dewilde, A. (2002)

[Congenital human cytomegalovirus infection: value of human cytomegalovirus DNA quantification in amniotic fluid]

Ann. Biol. Clin. 60, 201-207

Newkirk, M.M., van Venrooij, W.J., Marshall, G.S. (2001)

Autoimmune response to U1 small nuclear ribonucleoprotein (U1 snRNP) associated with cytomegalovirus infection.

Arthritis Res. 3, 253-258

Nguyen, K. Champlin, R., Giralt, S., Rolsten, K., Raad, I., Jacobson, K., Ippoliti, C., Hecht, D., Tarrand, J., Luna, M., Whimbey, E. (1999)

Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients.

Clin. Infect. Dis. 29, 618-623

Noborg, U., Gusdal, A., Pisa, E.K., Hedrum, A., Lindh, M. (1999)

Automated quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by using the COBAS Amplicor HBV monitor test.

J. Clin. Microbiol. 37, 2793-2797

Norris, S., Kosar, Y., Donaldson, N., Smith, H.M., Zolfino, T., O'Grady, J.G., Muiesan, P., Rela, M., Heaton, N. (2002)

Cytomegalovirus infection after liver transplantation: viral load as a guide to treating clinical infection.

Transplantation 74, 527-531

Nichols, W.G., Boeckh, M. (2000)

Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections.

J. Clin. Virol. 16, 25-40

Nichols, W.G., Corey, L., Gooley, T., Drew, W.L., Miner, R., Huang, M., Davis, C., Boeckh, 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, 867-874

Numazaki, K. (1997)

Human cytomegalovirus infection of breast milk.

FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18, 91-98

Oethinger, M. (2000)

Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie

10. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena

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

Ozdemir, E., St. John, L.S., Gillespie, G., Rowland- Jones, S., Champlin, R.E., Mouldrem, J.J., Komanduri, K.V. (2002)

Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells.

Blood 100, 3690-3697

Para, M.F., Kalish, L.A., Collier, A.C., Murphy, E.L., Drew, W.L. (2001)

Correlates of change in cytomegalovirus viremia in patients with advanced human

immunodeficiency virus infection who require transfusion.

J. Infect. Dis. 183, 1673-1677

Pass, R.F., Burke, R.L. (2002)

Development of cytomegalovirus vaccines: prospects for prevention of congenital CMV infection.

Semin. Pediatr. Infect. Dis. 13, 196-204

Paya, C.V. (2001)

Prevention of Cytomegalovirus Disease in recipients of solid- organ transplants.

Clin. Infect. Dis. 32, 596-603

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

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, 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, 2945-2952

Platzbecker, U., Bandt, D., Thiede, C., Helwig, A., Freiberg- Richter, J., Schuler, U., Plettig, R., Geissler, G., Rethwilm, A., Ehninger, G., Bornhauser, M. (2001)

Successful preemptive cidofovir treatment for CMV antigenemia after dose-reduced conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation* 71, 880-885

Prentice, H.G., Gluckman, E., Powles, R.L., Ljungman, P., Milpied, N., Fernandez Ranada, J.M., Mandelli, F., Kho, P., Kennedy, L., Bell, A.R. (1994)

Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group. *Lancet* 343, 749-753

Quamruddin, A.O., Oppenheim, B.A., Guiver, M., Mutton, K.J., Chopra, R. (2001)

Screening for cytomegalovirus (CMV) infection in allogeneic bone marrow transplantation using a quantitative whole blood polymerase chain reaction (PCR) method: analysis of potential risk factors for CMV infection. *Bone Marrow Transplant.* 27, 301-306

Randolph- Habecker, J., Iwata, M., Torok- Storb, B. (2002)

Cytomegalovirus mediated myelosuppression. *J. Clin. Virol.* 25, 51-56

Razonable, R.R., Rivero, A., Rodriguez, A., Wilson, J., Daniels, J., Jenkins, G., Larson, T., Hellinger, W.C., Spivey, J.R., Paya, C.V. (2001)

Allograft rejection predicts the occurrence of late- onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV- mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J. Infect.* 184, 1461-1464

Razonable, R.R., Burak, K.W., van Crujisen, H., Brown, R.A., Charlton, M.R., Smith, T.F., Espy, M.J., Kremers, W., Wilson, J.A., Groettum, C., Wiesner, R., Paya, C.V. (2002)

The pathogenesis of hepatitis C virus is influenced by cytomegalovirus.
Clin. Infect. Dis. 35, 974-981

Remberger, M., Kumlien, G., Aschan, J., Barkholt, L., Hentschke, P., Ljungman, P., Mattsson, J., Svennilson, J., Ringdén, O. (2002)

Risk factors for moderate to severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
Biology of blood and marrow transplantation 8, 674-682

Reusser, P., Cordonnier, C., Einsele, H., Engelhard, D., Link, D., Locasciulli, A., Ljungman, P. (1996)

European survey of herpesvirus resistance to antiviral drugs in bone marrow transplant recipients. Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).
Bone Marrow Transplant. 17, 813-817

Reusser, P. (2002)

Management of viral infections in immunocompromised cancer patients.
Swiss Med. Wkly. 132, 374-378

Ribbert, H. (1904)

Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern.
Zentralbl. Allg. Pathol. 15, 945-948

Riise, G.C., Andersson, R., Bergstrom, T., Lundmark, A., Nilsson, F.N., Olofsson, S. (2000)

Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: a longitudinal study in lung transplant recipients.
Chest 118, 1653-1660

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

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

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

Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., et al. (1956)

Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 418-424

Ruutu, T., Ljungman, P., Brinch, L., Lenhoff, S., Lonnqvist, B., Ringden, O., Ruutu, P., Volin, L., Albrechtsen, D., Sallerfors, B., Ebeling, F., Myllyla, G. (1997)

No prevention of cytomegalovirus infection by anti-cytomegalovirus hyperimmune globulin in seronegative bone marrow transplant recipients. The Nordic BMT Group.

Bone Marrow Transplant 19, 233-236

Saillour, F., Bernard, N., Ragnaud, J.M., Morlat, P., Blanchard, Y., Monlun, E., Labouyrie, E., Chene, G., Dabis, F.(1997)

Incidence of cytomegalovirus disease in the Aquitaine cohort of HIV-infected patients: a retrospective survey, 1987-1993. Groupe d'Epidemiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GECSA).

J. Infect. 35, 155-161

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985)

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science 230, 1350-1354

Salmon- Ceron, D. (2001)

Cytomegalovirus infection : the point in 2001.

HIV Medicine 2, 255-259

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 90, 2502-2508

Sanchez, J.L., Kruger, R.M., Paranjothi, S., Trulock, E.P., Lynch, J.P., Hicks, C., Shannon, W.D., Storch, G.A. (2001).

Relationship of cytomegalovirus viral load in blood to pneumonitis in lung transplant recipients.

Transplantation 72, 733-735

Schafer, P., Tenschert, W., Cremaschi, L., Schroter, M., Zollner, B., Laufs, R. (2001)

Area under the viraemia curve versus absolute viral load: utility for predicting symptomatic cytomegalovirus infections in kidney transplant patients.

J. Med. Virol. 65, 85-89

- 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 risk for developing human cytomegalovirus disease.
J. Infect. Dis. 175, 302-308
- Sia, I.G., Wilson, J.A., Groettum, C.M., Espy, M.J., Smith, T.F., Paya, C.V. (2000)**
Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation.
J. Infect. Dis. 181, 717-720
- Siennicka, J., Kruk, M., Przyluski, J., Krajewski, P. (2001)**
Relationship between CMV infection and coronary heart disease.
Acta Microbiol. Pol. 50, 175-178
- Slifkin, M., Tempesti, P., Poutsiaka, D.D., Snyderman, D.R. (2001)**
Late and atypical cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients.
Clin. Infect. Dis. 33, 62-68
- Smith, M.G., Vellios, F. (1950)**
Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection.
Arch. Pathol. 50, 424-425
- Smith, M.G. (1956)**
Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 424-430
- Soderberg, C., Giugni, T.D., Zaia, J.A., Larsson, S., Wahlberg, J.M., Moller, E. (1993)**
CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection.
J. Virol. 67, 6576-6585
- Solano, C., Munoz, I., Gutierrez, A., Farga, A., Prosper, F., Garcia-Conde, J., Navarro, D., Gimeno, C. (2001)**
Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation.
J. Clin. Microbiol. 39, 3938-3941
- Sorg, G., Stamminger, T. (1998)**
Strong conservation of the constitutive activity of the IE1/2 transcriptional control region in wild-type strains of human cytomegalovirus.
J Gen Virol (England) 79, 3039-3047

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

Cytomegalovirus (CMV) Dna load is an indepent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS.

J. Virol. 73, 7027-7030

Stagno, S., Cloud, G.A. (1994)

Working parents: the impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring.

Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 2384-2389

St. George, K., Rowe, D.T., Rinaldo Jr., C.R. (2000)

Cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus and Epstein-Barr Virus.

Clinical virology manual. Chapter 32.

3. Auflage, American Society for Microbiology Press, Washington D.C.

Stocchi, R., Szydlo, R., Craddock, C., Kanfer, E., Apperley, J.F., Goldman, J.M., Ward, K.N. (1999)

A comparison of prophylactic vs pre-emptive ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after T-depleted volunteer unrelated donor bone marrow transplantation.

Bone Marrow Transplant. 23, 705-709

Tabbara, I.A., Zimmermann, K., Morgan, C., Nahleh, Z. (2002)

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results.

Arch. Intern. Med. 162, 1558-1566

Temperton, N.J. (2002)

DNA vaccines against cytomegalovirus: current progress.

Int. J. Antimicrob. Agents 19, 169-72

Thorner, A.R. (2002)

Diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients: a review of the aids and solid organ transplant literature.

Harvard Joint ID Conference

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)

Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative and quantitative polymerase chain reaction.

Transplantation 69, 985-991

Trenchel, R., Ross, S., Husing, J., Ottinger, H., Elmaagacli, A., Roggendorf, M., Schafer, U.W., Runde, V. (2000)

Reduced risk of persisting cytomegalovirus pp65 antigenemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant* 25, 665-672

Valantine, H. (2001)

Cytomegalovirus infection and allograft injury. *Curr. Opin. Organ. Trans.* 6, 305-309

Van der Bij, W., Speich, R. (2001)

Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 33, 32-37

Varani, S., Muratori, L., De Ruvo, N., Vivarelli, M., Lazzarotto, T., Gabrielli, L., Bianchi, F.B., Bellusci, R., Landini, M.P. (2002)

Autoantibody appearance in cytomegalovirus-infected liver transplant recipients: correlation with antigenemia. *J. Med. Virol.* 66, 56-62

Vij, R., Di Persio, J.F., Venkatraman, P., Trinkaus, K., Goodnough, L.T., Brown, R.A., Khoury, H.J., Devine, S.M., Oza, A., Shenoy, S., Blum, W., Adkins, D. (2003)

Donor CMV serostatus has no impact on CMV viremia or disease when prophylactic granulocyte transfusions are given following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation [In Process Citation]. *Blood* 101, 2067-2069

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

Weller T.H., Macauley, J.C., Craig, J.M., et al (1957)

Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94, 4-12

Williams, S.M., Meadows, C.A., Lyon, E. (2002)

Automated DNA extraction for real-time PCR. *Clin. Chem.* 48, 1629-1630

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 a placebo-controlled, double-blind trial.

Ann. Intern. Med. 118, 179-184

Wiselka, M.J., Nicholson, K.G., Rowley, S., Bibby, K. (1999)

Cytomegalovirus viraemia has poor predictive value for the development of cytomegalovirus disease in patients with advanced HIV-infection.

J. Infect. 39, 187-192

Wolf, D.G., Lurain, N.S., Zuckerman, T., Hoffman, R., Satinger, J., Honigman, A., Saleh, N., Robert, E.S., Rowe, J.M., Kra- Oz, Z. (2003)

Emergence of late cytomegalovirus central nervous system disease in hematopoietic stem cell transplant recipients [in progress citation].

Blood 101, 463-465

Yoshida, A., Hitomi, S., Fukui, T., Endo, H., Morisawa, Y., Kazuyama, Y., Osumi, K., Oka, S., Kimura, S. (2001)

Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus diseases in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay.

Clin. Infect. Dis. 33, 1756-1561

Zaia, J.A. (2002a)

Prevention and management of CMV- related problems after hematopoietic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplantation 29, 633-638

Zaia, J.A. (2002b)

Prevention of cytomegalovirus disease in hematopoietic stem cell transplantation.

Clin. Infect. Dis. 35, 999-1004

Zini, N., Battista, M.C., Santi, S., Riccio, M., Bergamini, G., Landini, M.P., Maraldi, N.M. (1999)

The novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25, is localized in the viral tegument.

J Virol 73, 6073-6075

LEBENS LAUF

Timo Gentner, geboren am 28.08.1977 in Friedrichshafen

1984 – 1996	Grundschulen Kluftern, Friedrichshafen und Messkirch, Martin Heidegger Gymnasium Messkirch, Abitur
1996 – 1997	Zivildienst beim DRK Sigmaringen e.V.
04/98 – 11/04	Studium der Humanmedizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
03/00	Ärztliche Vorprüfung
03/01	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/01 – 10/02	Durchführen der Experimente dieser Arbeit
08/03	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/03 – 11/04	Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen, Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
11/04	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (10.11.04)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit, sowie seiner Betreuung bei deren Durchführung und Fertigstellung danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Löffler für die engagierte Betreuung im Labor und seiner großen Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Ein Dank an Frau Marija Markulin und Frau Ingrid Kumbier, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Christoph Meisner vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung danke ich für die Ratschläge zur statistischen Auswertung der Daten meiner Arbeit.

An die Firma ROCHE und insbesondere an Frau Dr. rer. nat. Petra Rehberger und Herrn Dr. rer. nat. Michael Klose einen großen Dank für die Beratung und die großzügige Bereitstellung eines Teils der Reagenzien.

Bei meinen Eltern und meinen Großeltern bedanke ich mich für ihre Unterstützung, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.