

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

**Evaluation einer vollautomatischen HCMV-  
Nachweismethode mittels MagNA Pure und COBAS  
Amplacor CMV Monitor in der klinischen Anwendung  
bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation  
im Rahmen einer Phase I/II- Studie**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Denise Staier  
aus  
Bietigheim-Bissingen  
2006

---

Dekan: Professor Dr. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Einsele  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Binder

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>		<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das humane Cytomegalievirus</b>	<b>1</b>
1.1.1	Geschichte	1
1.1.2	Morphologie, Genom und Anzucht	1
1.1.3	Epidemiologie, Übertragung und Pathogenese	2
1.1.4	Immunantwort und Klinik der CMV-Infektion	3
<b>1.2</b>	<b>Risikogruppen</b>	<b>4</b>
1.2.1	Neugeborene	4
1.2.2	AIDS-Patienten	5
1.2.3	Organtransplantierte Patienten	6
1.2.4	Stammzelltransplantierte Patienten	7
1.2.4.1	Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (SCT)	7
1.2.4.2	Komplikationen nach Stammzelltransplantation	8
1.2.4.3	Infektion mit CMV nach Stammzelltransplantation	9
<b>1.3</b>	<b>Diagnostik</b>	<b>10</b>
1.3.1	Diagnosekriterien einer CMV-Erkrankung	12
<b>1.4</b>	<b>Prävention und Therapie</b>	<b>13</b>
1.4.1	Prävention	13
1.4.2	Therapie	13
<b>1.5</b>	<b>Thematik und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Valganciclovir</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Studienprotokoll</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Patienten</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Geräte und Materialien</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Patientenproben</b>	<b>28</b>

---

<b>2.6</b>	<b>MagNA Pure</b>	<b>28</b>
2.6.1	Überblick	28
2.6.2	Vorbereitung und Befüllung des Geräts	29
2.6.3	Der Isolationsprozess	31
2.6.3.1	Prolog- Befüllung der Processing Cartridges	31
2.6.3.2	Protokoll- Extraktion von Nukleinsäuren	31
2.6.4	Post- Elution	32
<b>2.7</b>	<b>COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM)</b>	<b>34</b>
2.7.1	Überblick	34
2.7.2	Vorbereitung und Befüllung des Geräts	34
2.7.3	Amplifikation	37
2.7.4	Besonderheiten: Quantifizierungsstandart und AmpErase	38
2.7.4.1	Quantifizierungsstandart	38
2.7.4.2	AmpErase	38
2.7.5	Hybridisierung	39
2.7.6	Detektion	39
2.7.7	Quantifizierung	40
<b>2.8</b>	<b>Klinische Daten und statistische Analyse</b>	<b>41</b>
<b>2.9</b>	<b>Methodik des pp65 Antigenämietests</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Viruslast</b>	<b>43</b>
3.1.1	Patienten- und Transplantationscharakteristika	43
3.1.2	Vergleich der Viruslasten	46
3.1.3	Studienmedikation	48
<b>3.2</b>	<b>Vergleich zweier Nachweismethoden: Quantitative PCR mittels COBAS Amplicor CMV- Monitor Test (CMM) versus pp65 Antigenämietest</b>	<b>49</b>
3.2.1	Konkordanz	49
3.2.2	Sensitivität	50

---

<b>3.3</b>	<b>Klinischer Vergleich</b>	<b>51</b>
3.3.1	Inzidenz der HCMV-Infektion	51
3.3.2	Risikofaktorenanalyse für eine HCMV- Infektion	51
3.3.3	Verteilung der Risikofaktoren	53
3.3.4	Symptomatische Patienten	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Diagnostik</b>	<b>56</b>
4.2.1	Nachweismethoden in der Routinediagnostik zur Einleitung einer präemptiven Therapie	56
4.2.2	Vergleich COBAS Amplicor CMV Monitor versus pp65-Antigenämietest	60
4.2.3	Eignung des COBAS Amplicor zur Routinediagnostik und Zukunftsperspektiven	63
4.2.4	Bedeutung der Viruslast Erfassung	64
<b>4.3</b>	<b>Therapiestrategien und Medikamente</b>	<b>68</b>
4.3.1	Prophylaxe	68
4.3.2	Präemptive Therapie	70
<b>4.4</b>	<b>Klinik</b>	<b>72</b>
4.4.1	Risikofaktoren für eine HCMV- Infektion	72
4.4.2	Risikofaktoren für die Entwicklung einer HCMV- Erkrankung	75
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>77</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>91</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>93</b>

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACV	Aciclovir
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANC	Absolute neutrophil count
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
BUS	Busulfan
CD	Cluster of differentiation
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMM	COBAS Amplicor CMV Monitor
CMV	Cytomegalievirus
CMV (-)C	CMV- negative control
CMV H(+)C	CMV- high positive control
CMV L(+)C	CMV- low positive control
CYC	Cyclophosphamid
D	Donor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein- Barr- Virus
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbant assay
END	Endoxan
FLU	Fludarabin
G	Genomäquivalente
GCV	Ganciclovir
GvHD	Graft versus host disease

---

HAART	Highly active antiretroviral therapie
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Human immundeficiency virus
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSV	Herpes simplex Virus
Ig	Immunglobulin
KG	Körpergewicht
KMT	Knochenmarkstransplantation
LC	LightCycler
M	Männlich
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEL	Melphalan
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MGPs	Magnetic glass particles
MMF	Mycophenolatmofetil
MMX	Mastermix
MTX	Methotrexat
NA	Nucleic acid
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification
NHL	Non- Hodgkin- Lymphom
NHP	Negatives Humanplasma
NPV	Negativer prädiktiver Wert
NS	Nukleinsäure
OD	Gesamtabsorption
PBSCT	Peripheral blood stem cell transplantation
PCR	Polymerase chain reaction
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
pp	Phosphoprotein
PPV	Positiver prädiktiver Wert
PRE	Prednisolon
R	Recipient
QS	Quantifizierungsstandart

---

RIA	Radio- Immunoassay
RIT	Radio- Immunotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SAA	Schwere aplastische Anämie
SCT	Stammzelltransplantation
SIR	Sirolimus
TAC	Tacrolimus
TBI	Ganzkörperbestrahlung
TRE	Treosulfan
U	Umdrehungen
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
VGCV	Valganciclovir
W	Weiblich
dl	Deziliter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
min	Minute
nm	Nanometer
s	Sekunde

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das humane Cytomegalievirus

### 1.1.1 Geschichte

1881 entdeckte Ribbert in der Niere eines totgeborenen Kindes Zellen, die sehr groß waren und Einschlüsse aufwiesen (Ribbert, 1904). Der Begriff Cytomegalie wurde aber erst 1921 von Goodpasture und Talbot geprägt. 1925 publizierten dann Von Glahn und Pappenheimer einen Fall der Einschlusskörperchenkrankheit, und äußerten erstmals die Vermutung, dass ein Virus die Ursache sein könnte (St. George et al. 2000).

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist der Erreger der Cytomegalie. Zellen, die mit dem Virus infiziert sind, vergrößern sich und zeigen intranukleäre Einschlüsse, auch Eulenaugen genannt (Modrow & Falke, 1998). Die humanen Cytomegalieviren werden zusammen mit den humanen Herpesviren 6 und 7 der Beta-Subfamilie der Herpesviridae zugeordnet. Diese Familie setzt sich aus folgenden 8 Viren zusammen: Herpes- simplex- Virus Typ 1 und 2, Varizella-Zoster-Virus, Epstein-Barr-Virus, humanes Cytomegalievirus (humanes Herpesvirus 5), Humanes Herpesvirus 6 ,7 , und 8 (Hahn et al., 2001).

### 1.1.2 Morphologie, Genom und Anzucht

Das HCMV gehört zu den humanpathogenen Viren mit der höchsten Codierungskapazität. Das Genom umfaßt circa 245.000 Basenpaare, besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA, und enthält Information für mehr als 200 Genprodukte (St. George et al., 2000). Die Größe des Virus beträgt etwa 180 nm. Es setzt sich aus einem zentralen DNA-Innenkörper zusammen, welcher von einem isokaederförmiges Kapsid mit 162 Kapsomeren umgeben ist. Eine

---

lipidhaltigen Hülle umgibt das Kapsid, zwischen Hülle und Kapsid befindet sich das Tegument (Hahn et al, 2001).

Die Replikation des HCMV findet ausschließlich in menschlichen Zellen statt. In vivo findet man infizierte Zellen in der Niere, Leber, Gallengängen, Speicheldrüsen, Darmepithel, Lunge und Pankreas, genauso wie in Endothelien, Leukozyten, Monozyten, T- und B- Lymphozyten. In vitro gelingt die Anzucht in Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Epithelzellen, Trophoblasten und glatten Muskelzellen (St. George et al., 2000).

Der Replikationszyklus des HCMV ist typisch für Herpesviren. Er dauert in vivo etwa 24 Stunden (Mach et al., 1989). Als erstes erscheinen die immediate-early- Genprodukte in der infizierten Zelle, gefolgt von den early-Glykoproteinen. Später findet die Translation des late- Gens statt. Die immediate- early- Gene kodieren für Transaktivatoren, welche die Expression ihrer eigenen, aber auch die anderer viraler und zellulärer Gene regulieren können. Der major immediate- early- Promoter des Cytomegalievirus regelt die Produktion des immediate-early- Genprodukts. Er wird benötigt, um einen neuen Replikationszyklus zu starten und das Virus aus der Latenz zu reaktivieren. Die early-Gene kodieren für Nichtstruktur- Glykoproteine wie DNA- Polymerasen, Strukturproteine werden durch die late- Gene kodiert (St. George et al., 2000).

### **1.1.3 Epidemiologie, Übertragung und Pathogenese**

Die Seroprävalenz des humanen Cytomegalievirus variiert in Abhängigkeit von Alter, geographischen, ethnischen und sozioökonomischen Faktoren zwischen 30 und 100%. In Entwicklungsländern findet eine Infektion mit HCMV bereits im frühen Kindessalter statt, hier liegt die Rate der seropositiven Träger nahe bei 100%, ähnliche Daten findet man in unteren sozioökonomischen Schichten der Industrienationen. In Mitteleuropa sind im Mittel zwischen 40 und 70% der Erwachsenen infiziert (St. George et al, 2000).

Neuinfektionen treten vor allem im frühen Kindesalter und in der Adoleszenz mit der Aufnahme sexueller Kontakte auf (Oethinger, 2000). HCMV wird über

---

Sekrete wie Speichel, Muttermilch, Zervixsekret, Sperma, Blut, Urin und Fäzes als Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen, außerdem diaplazentar und iatrogen über Bluttransfusionen und transplantierte Organe. Nach der Primärinfektion werden die Viren intermittierend, oftmals monate- oder jahrelang, mit den Körperflüssigkeiten ausgeschieden (St. George et al., 2000). Die primäre Virusreplikation findet in den Epithelzellen des Oropharynx statt. Das intrazelluläre Virus breitet sich auf dem Blutweg im Organismus aus und gelangt so in die verschiedenen Organe (Hahn et al., 2001). Hierbei befindet sich das HCMV in Monozyten, zirkulierenden Epithelzellen, Granulozyten, T- und B-Lymphozyten (St. George et al., 2000).

Alle Infektionen münden in ein Latenzstadium mit lebenslangem Virusträgertum, von dem aus es in Phasen von Immunsuppression zu Reaktivierungen kommen kann. Hauptorte der HCMV-Persistenz sind Speicheldrüsen, Lunge, Brustdrüsen und Nieren, außerdem Monozyten, Gefäßendothelien sowie das Knochenmark (Hahn et al., 2001), wobei die Lunge mit einer hohen Dichte an latentem Genom eine Vorzugsstellung einnimmt. Dies erklärt die Häufigkeit der Manifestation der HCMV- Erkrankung in der Lunge ebenso wie die Übertragung des Virus bei Organ- und Knochenmarkstransplantationen (Reddehase, 1995).

#### **1.1.4 Immunantwort und Klinik der CMV-Infektion**

Die HCMV-Infektion wird durch zellvermittelte und humorale Immunreaktionen unter Kontrolle gehalten. Nach einer Primärinfektion entstehen IgM-, IgA- und IgG- Antikörper. Als erstes bilden sich Antikörper gegen Sofort- und Frühproteine, neutralisierende Antikörper treten erst sehr viel später auf. Bei Reaktivierung des HCMV werden sie allerdings sofort gebildet (Hahn et al., 2001). Die neutralisierenden Antikörper sind hauptsächlich gegen das Glykoprotein B, ein CMV-Hüllprotein, gerichtet. Die meisten Immunglobuline erkennen das Phosphoprotein pp68, die Hauptkomponente des Teguments. Die Antikörper kontrollieren die virämische Ausbreitung und schützen vor Neuinfektion (Modrow & Falke, 1998).

---

Für die Induktion der zellvermittelten Immunität sind zunächst die Sofortproteine verantwortlich. Eine zytotoxische Antwort der CD8-T-Lymphozyten und eine Proliferation der CD4-T-Helferzellen findet beispielsweise gegen das Glykoprotein B statt. Hauptsächlich richtet sich die zytotoxischen T-Lymphozyten jedoch gegen das Tegumentprotein pp65 (St. George et al., 2000). Die zelluläre Immunantwort ist für die Viruseliminierung und Beendigung der Symptome zuständig (Modrow & Falke, 1998).

Bei immunkompetenten Personen verlaufen nur 1% der primären HCMV-Infektionen apparent. Die Symptomatik lässt sich als Mononukleose-ähnliches Syndrom mit Fieber, allgemeinem Krankheitsgefühl, und Lymphozytose charakterisieren. Zusätzlich kann die Infektion mit einer interstitiellen Pneumonie einhergehen, selten kommt es zu einer Polyradikulitis Guillain-Barré, hämolytischer Anämie, Chorioretinitis, Vaskulitis und Purpura (Hahn et al., 2001).

Schwerwiegende Auswirkungen einer HCMV-Infektion finden sich bei Neugeborenen nach intrauteriner Infektion, ebenso ist die Cytomegalie bei Erkrankungen, die mit Immunsuppression einhergehen, gefürchtet.

## **1.2 Risikogruppen**

### **1.2.1 Neugeborene**

Das Cytomegalievirus ist weltweit die häufigste Ursache für prä- und perinatale Virusinfektionen. Die Übertragung von der Mutter auf das Kind kann im Laufe der Schwangerschaft, der Geburt oder über die Muttermilch erfolgen (St. George et al., 2000).

Etwa 2- 4% aller seronegativen Schwangeren machen eine primäre Infektion durch, bei 10- 20% der seropositiven Schwangeren wird die latente Infektion durch die hormonelle Umstellung reaktiviert, vor allem im 2. und 3. Trimenon. Bei Primärinfektionen beträgt die Übertragungsrate auf das Kind 35- 50%, bei

---

Reaktivierungen nur 0.2- 2% (Hahn et al., 2001). Allerdings scheint die Schwere der CMV- Erkrankung nach Primärinfektion der Mutter nicht größer zu sein als bei Reaktivierung des Virus aus der Latenz (Gaytant et al., 2002).

Schäden am Embryo treten vor allem im 1. und 2. Trimenon auf. Etwa 1% aller Neugeborenen haben konnatale CMV- Infektionen. Von diesen sind 7% symptomatisch, von ihnen sterben 12%, die restlichen Kinder haben bleibende Schäden. Zusätzlich treten Spätfolgen bei 15% der Kinder auf, die anfangs symptomlos waren (Hahn et al., 2001).

Die klinischen Befunde einer intrauterin erworbenen Cytomegalieinfektion reichen von Ikterus, petechialen Blutungen, Hepatosplenomegalie, thrombozytopenischer Purpura, Wachstumsretardierung, Myokarditis, Mikrozephalie, geistiger Retardierung, spastischer Diplegie, Pneumonie, Chorioretinitis, Optikusatrophie bis hin zur Taubheit, psychomotorischer Retardierung, neurologische Defiziten und Zahndefekten. Eine peri- oder neonatale CMV- Übertragung durch zervikovaginales Sekret und Muttermilch bleibt für das Kind meist folgenlos, mit Ausnahme von gelegentlich auftretenden Pneumonien (St. George et al., 2000).

### **1.2.2 AIDS-Patienten**

Die HCMV-Erkrankung zählt zu den am meisten gesehenen opportunistischen Infektionen bei AIDS-Patienten (Salomon- Ceron, 2001). Das HCMV-Syndrom beginnt meist mit Fieber, Anorexie, Nachtschweiß, Anthralgie und Myalgie (Braunwald et al., 2001). Die häufigste Erkrankung im Rahmen der HCMV- Reaktivierung aufgrund des T- Zell- Defektes ist die nekrotisierende HCMV- Retinitis. Seltener Manifestationsorte sind Lunge, Gastrointestinaltrakt und das zentrale Nervensystem (Hahn et al., 2001). Hochrisikopatienten sind solche mit einer CD4-T-Zellzahl unter 100/ $\mu$ l (Braunwald et al., 2001). Im Spätstadium von AIDS, bei Unterschreitung der CD4-T-Lymphozytenzahl unter 50/ $\mu$ l, kommt es bei vielen Patienten zu einem Multiorganbefall mit HCMV (Hahn et al., 2001).

Seit Beginn der Behandlung mit highly active antiretroviral therapie (HAART) ist die Prävalenz des Organbefalls durch das humane Cytomegalievirus um mehr

---

als das Fünffache gefallen, sie betrug zuvor bei HIV-Patienten mit CD4-Zellzahl kleiner  $50/\mu\text{l}$  20-40%, (Salomon-Ceron, 2001). Bei Patienten, die auf HAART nicht ansprechen, stellt die HCMV-Erkrankung allerdings nach wie vor ein großes Problem dar (Reusser, 2001).

### **1.2.3 Organtransplantierte Patienten**

Das HCMV steht noch immer an der Spitze der Infektionen bei Patienten nach Organtransplantation (Rubin, 2001). Seit der Einführung hochpotenter immunsuppressiver Therapien wird sogar eine noch höhere Inzidenz und Schwere der HCMV-Erkrankung beobachtet (Paya, 2001).

Bei Organtransplantation spielt die Übertragung des Virus mit dem Transplantat eine der Reaktivierung übergeordnete Rolle (Reddehase, 1995). So stellt die Abwesenheit eines CMV-spezifischen Immunsystems bei einem CMV-seronegativen Transplantatempfänger, der ein Organ eines HCMV-seropositiven Spenders erhält, ein Hauptrisiko für die Entwicklung einer Erkrankung durch das Cytomegalievirus dar (Paya, 2001). Das Risiko steigt mit dem Grad der Immunsuppression, wobei hier vor allem Medikamente, die die T-Zellantwort unterdrücken, wie Kortikosteroide und Ciclosporin, zu nennen sind (Marre et al., 2000). Außerdem spielt die Höhe der Viruslast im Organ für die Entstehung einer HCMV-Erkrankung eine Rolle (Paya, 2001).

Das HCMV-Syndrom nach Organtransplantation ist definiert durch Fieber über  $38^\circ\text{C}$  mindestens zwei Tage lang, Neutropenie oder Thrombozytopenie und Detektion des Virus im Blut (Ljungman et al., 2002). Nach Herz-, Lunge-, Leber- und Nierentransplantationen kann es zur Manifestation einer CMV-Pneumonie kommen. Lebertransplantationen können einen Befall des Gastrointestinalsystems mit HCMV bedingen, HCMV-Hepatitis entstehen vor allem nach Lungen- und Herztransplantationen (Marre et al, 2000).

Die gravierendsten Krankheitsverläufe treten nach Primärinfektion des Transplantatempfängers auf, da hier keine spezifischen Antikörper vorliegen, in Folge dessen eine ungehemmte Infektionsausbreitung mit Multiorganbefall stattfinden kann (Reddehase, 1995).

---

Auch indirekte Effekte werden durch HCMV beobachtet. So besitzt das Virus selbst eine immunsuppressive Wirkung, welche weitere Posttransplantationskomplikationen einschließlich Superinfektion mit Pilzen oder anderen Viren nach sich ziehen kann (Paya, 2001). Entzündungsreaktionen die durch HCMV hervorgerufen werden, können zur Abstoßung des Transplantates führen, beziehungsweise diese verstärken (Marre et al., 2000).

## **1.2.4 Stammzelltransplantierte Patienten**

### **1.2.4.1 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (SCT)**

Hämatopoetische Stammzellen können aus Knochenmark (KMT), peripherem Blut (PBSCT) oder Nabelschnurblut entnommen (Tabbara et al., 2002) und dem Empfänger via zentralem Venenkatheter infundiert werden. Die SCT kommt zum Einsatz, um ein abnormes hämatopoetisches System durch dasjenige eines gesunden Spenders zu ersetzen, oder um maligne Grunderkrankungen mit der nötigen aggressiven immunsuppressiven Therapie behandeln zu können. Dem Transplantatempfänger wird über die Spenderstammzellen ein intaktes Immunsystem zurückgeben (Braunwald et al., 2001).

Es wird zwischen autologer und allogener Stammzelltransplantation unterschieden. Bei autologer Transplantation werden körpereigene, bei allogener Transplantation körperfremde Stammzellen transfundiert.

Bei circa 1% der allogenen Transplantationen steht ein identischer Zwilling als Donor zur Verfügung. Dieses syngene Transplantat birgt weder die Gefahr einer GvH- Reaktion, noch existiert das Risiko tumorzellkontaminierte Stammzellen zu übertragen. Ersteres ist eine typische Komplikation nach allogener, letzteres nach autologer Stammzelltransplantation (Braunwald et al., 2001) In allen anderen Fällen wird versucht, unter den nahen Verwandten, vor allem den Geschwistern des Empfängers, einen passenden Spender zu finden. Dies gelingt aber nur in weniger als 30% der Fälle (Tabbara et al., 2002).

---

Entscheidend ist bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation eine möglichst hohe genetische Übereinstimmung. Um diese zu ermitteln, wird eine HLA- Gewebetypisierung durchgeführt. Die HLA-Moleküle sitzen als Gewebeantigene auf den Zellen nahezu aller menschlicher Gewebe. Sie binden antigene Proteine und präsentieren diese den T-Zellen. Dadurch, dass sie körpereigenes von körperfremden unterscheiden können, spielen sie eine wichtige Rolle bei der immunologischen Abwehr, aber auch bei der Entstehung von Abstossungsreaktionen gegen das Transplantat. Aus diesem Grund werden große Anstrengungen unternommen um ein weitgehend kompatibles Transplantat für den Empfänger zu finden.

#### **1.2.4.2 Komplikationen nach Stammzelltransplantation**

Komplikationen wie die venöse Verschlusskrankheit der Leber, die akute und chronische Graft versus Host Disease (GvHD) und Infektionen treten häufig nach allogener Stammzelltransplantation auf (Tabbara et al., 2002).

Die Graft versus Host Disease lässt sich in zwei Formen unterteilen: Die akute Form erscheint in den ersten 3 Monaten nach SCT, die chronische manifestiert sich erst später in der Posttransplantationsphase (Braunwald et al., 2001). 20-50% der SCT-Empfänger eines HLA-identischen Geschwisters und 50-80% der Empfänger eines HLA-identischen Transplantats von einem nicht verwandten Donor entwickeln eine klinisch relevante akute GvHD Grad 2-4. Diese manifestiert sich als Dermatitis, Hepatitis und Enteritis. Risikofaktoren für die Entwicklung einer akuten GvHD sind nicht verwandter HLA-identischer Spender, HLA- mismatch, weiblicher Spender bei männlichem Empfänger, hohes Lebensalter und vorangegangene Infektionen des Empfängers mit Herpesviren (Tabbara et al., 2002).

Eine chronische GvHD entwickelt sich bei 20-50% der länger als 6 Monate überlebenden Patienten. Man beobachtet bei diesen Patienten ein Sicca-Syndrom, Arthritis, obliterative Bronchiolitis, Gallengangsdegeneration und Cholestase. Ein erhöhtes Risiko eine chronische GvHD zu entwickeln besitzen ältere Patienten, Empfänger eines Transplantats welches von unverwandten

---

Spendern stammt und nicht identisch in den HLA- Merkmalen ist, und Patienten, die bereits eine akute GvH- Reaktion durchgemacht haben (Braunwald et al., 2001).

Neben der GvHD existiert noch ein Graft versus Tumor Effekt, hierbei richtet sich das neue, kompetente Immunsystem therapieunterstützend gegen noch vorhandene maligne Zellen, die als fremd erkannt werden (Braunwald et al., 2001).

Die Infektionsgefahr in den ersten 10-28 Tagen nach SCT wird v.a. durch eine ausgeprägte Neutropenie geprägt (Marre et al., 2000; Einsele et al., 2001), welche vor allem die Entstehung bakterieller Infekte begünstigt.

Auch in der späten Posttransplantationsphase, nach Tag 100 nach SCT, werden bei Patienten mit chronischer GvHD hauptsächlich bakterielle Infekte beobachtet, die auf mangelhafte IgA-Sekretionsleistung, Granulozytendefekte sowie quantitative wie auch qualitative B- und T- Zell- Defekte zurückzuführen sind (Einsele et al., 2001).

Dagegen dominieren in der mittleren Posttransplantationsphase (von der hämatopoetischen Rekonstitution bis Tag 100 nach SCT) virale Infektionen. Die bedrohlichste Infektion in dieser Phase ist die CMV-Infektion (Einsele et al., 2002).

#### **1.2.4.3 Infektion mit CMV nach Stammzelltransplantation**

Das Cytomegalievirus ist hauptverantwortlich für die durch Infektionen hervorgerufene Mortalität nach SCT. Die CMV-Infektion tritt meist zwischen dem Tag 30 und 100 nach Stammzelltransplantation auf (Einsele et al., 2001).

Bei Patienten nach SCT manifestiert sich eine HCMV-Erkrankung hauptsächlich als interstitielle Pneumonie, aber auch Gastroenteritiden, Hepatitiden und Störungen der hämatopoetischen Rekonstitution mit Leukozytopenie und Thrombozytopenie kommen vor (Reddehase, 1995). Seltener werden HCMV-Polyradikulitiden, Enzephalitiden oder eine HCMV-Retinitis beobachtet (Marre et al., 2000). Durch Verbesserungen im Rahmen der Infektionsprävention ist die

---

Inzidenz der frühen CMV-Erkrankung nach SCT von 20-30% auf 3-6% gesunken (Zaia, 2000; Einsele et al., 2001). Die Mortalitätsrate ist aber trotz Behandlung mittels Ganciclovir und CMV- Immunglobulin mit 30-50% nach wie vor sehr hoch (Tabbara et al., 2002; Einsele et al., 2001).

Die Inzidenz der späten HCMV-Infektion, die ab Tag 100 nach SCT auftritt, nimmt seit dem Rückgang der frühen HCMV-Infektion zu (Einsele et al., 2001). Sie ist häufig mit einer chronischen GvHD assoziiert (Marre et al., 2000), außerdem prädisponiert eine prolongierte antivirale Therapie bis Tag 100 zur Entwicklung einer late-onset HCMV-Erkrankung (Herbart et al., 2000b).

### **1.3 Diagnostik**

In Abhängigkeit von Patient und Fragestellung stehen in der HCMV-Diagnostik unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Den indirekten serologischen Nachweismethoden stehen folgende direkte Verfahren gegenüber:

Die kulturelle Anzucht von HCMV gelingt mittels zahlreicher Patientenmaterialien wie Urin, Rachenspülwasser, Trachealsekret und Blut (Marre et al., 2000). Für die Virusisolierung werden humane Fibroblasten verwendet, im Falle einer Infektion zeigen sich nach ein bis vier Wochen HCMV-charakteristische zytopathische Effekte (St. George et al., 2000; Braunwald et al., 2001). Durch Anwendung der shell- vial- culture lässt sich der kulturelle Nachweis wesentlich beschleunigen. Hierbei wird das early-Antigen in der Fibroblastenkultur nach 24 und 48 Stunden Inokulation nachgewiesen (Marre et al., 2000; St. George et al., 2000).

Ebenso zu den direkten HCMV-Nachweisverfahren zählt der pp65-Antigenämie Assay. Es werden Granulozyten aus Blut oder Liquor isoliert und mit Antikörpern gegen das Tegumentprotein pp65 inkubiert. Mittels Immunfluoreszenz werden die Antigen-Antikörperkomplexe anschließend sichtbar gemacht (St. George et al., 2000).

Durch die Entdeckung der Polymerasekettenreaktion (PCR) 1983 durch Kary B. Mullis steht heute ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren zur

---

Verfügung (Mullis, 1990). Erregerspezifische Abschnitte von Nukleinsäuren werden durch DNA-Polymerasen vervielfältigt und schließlich mit hoher Sensitivität detektiert. Je nach Fragestellung können sie aus Vollblut, Leukozyten, Serum, Trachealsekret, Liquor, Biopsiematerial, Fruchtwasser oder Nabelschnurblut gewonnen werden (Marre et al, 2000). Aus der qualitativen PCR wurden quantitative Verfahren zur Nucleinsäure-Amplifikation, wie beispielsweise der COBAS Amplicor CMV Monitor Test (CMM), entwickelt. Neben dem Erregernachweis wird hier auch die Höhe der Viruslast bestimmt, welche unter anderem für die Überwachung des Therapieverlaufs wichtig ist. Gegenüber der qualitativen PCR verfügt die quantitative zusätzlich über einen verbesserten positiven prädiktiven Wert (Reddehase, 1995). Durch Real-Time-PCR-Verfahren, beispielsweise mittels LightCycler von Roche, könnte das quantitative Verfahren in Zukunft wesentlich beschleunigt werden.

Mit der NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) und der RT (Reverse Transkriptase) PCR stehen seit einiger Zeit Verfahren zur Amplifizierung von mRNA zur Verfügung (St. George et al., 2000). Für die frühzeitige Diagnose einer HCMV-Infektion und Therapieverlaufskontrolle ist vor allem der CMV Nuclisens Assay, der auf der Amplifizierung der RNA des pp67 basiert, von Bedeutung (Hebart et al., 2000).

Ebenfalls für die Detektion von HCMV geeignet ist der Hybrid Capture-Assay (Zaia, 2002). Bei diesem Verfahren wird Leukozyten-DNA denaturiert und mit einer RNA- Probe hybridisiert. Die DNA- RNA- Hybride werden gebunden und mit multiplen Antikörpern konjugiert (Thorner, 2002)

Der indirekte Nachweis von HCMV gelingt mittels serologischer Verfahren. Die Detektion von IgG- Antikörpern spricht für die Anwesenheit des latenten Virus nach vorangegangener Infektion. Die Serologie ist also von Nutzen um den HCMV- Serostatus von Donor und Recipient vor der Transplantation zu ermitteln (Thorner, 2002). Positive IgM-Titer und ein Anstieg des IgG deuten auf eine Primärinfektion, beziehungsweise Reaktivierung des Virus aus der Latenz hin (St. George et al., 2000; Thorner, 2002). Die gebräuchlichsten Testverfahren zur Antikörperdiagnostik sind ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) oder RIA (Radio- Immunoassay). Bei Immundefekten besitzen

---

serologische Tests mangels adäquater Immunantwort durch den Patienten keine ausreichende Aussagekraft (Marre et al., 2000; Thorner, 2002).

### **1.3.1 Diagnosekriterien einer CMV-Erkrankung**

Eine HCMV- Erkrankung wird nach den Richtlinien der 5. internationalen Cytomegaliekonferenz in Stockholm wie folgt definiert:

Um eine HCMV- Pneumonie diagnostizieren zu können, müssen Symptome einer Lungenentzündung in Kombination mit einer HCMV-positiven bronchoalveolärer Lavage vorliegen.

Die HCMV- Gastroenteritis wird über eine Kombination aus klinischen Symptomen, endoskopisch sichtbaren Mucosaläsionen und HCMV- Nachweis in Biopsiematerial aus dem Gastrointestinaltrakt definiert.

Von einer HCMV- Hepatitis spricht man, sobald erhöhte Bilirubinspiegel und/oder erhöhte Leberenzyme in Abwesenheit einer anderen dokumentierten Ursache für eine Leberentzündung vorliegen, und HCMV im Lebergewebe nachgewiesen wurde.

Zentralnervöse Symptome und ein HCMV-positiver Liquornachweis rechtfertigen die Diagnose einer durch HCMV verursachten ZNS-Erkrankung.

Für die Diagnose einer HCMV-Retinitis wird eine Befunderhebung durch einen Ophthalmologen gefordert (Ljungman et al., 2002).

---

## 1.4 Prävention und Therapie

### 1.4.1 Prävention

Abgesehen von der Vermeidung einer HCMV-Infektion durch Verwendung HCMV-negativer Transplantate und Blutprodukte für seronegative Empfänger, stehen zwei medikamentöse Strategien für die Verabreichung antiviraler Substanzen zur Prävention einer HCMV-Infektion, beziehungsweise einer HCMV-Erkrankung zur Verfügung (Zaia, 2002; Paya, 2001). Die erste Strategie verfolgt die prophylaktische Gabe von antiviralen Substanzen oder Immunglobulinen vom Zeitpunkt der Transplantation ab etwa über 100 Tage (Einsele et al., 2001; Zaia et al., 2002). Zur Chemoprophylaxe wird meist Ganciclovir i.v. verwendet (Eisele et al, 2001).

Die zweite Strategie der präemptiven oder frühinterventionellen Therapie besteht darin, erst therapeutisch zu intervenieren, sobald tatsächlich eine HCMV-Infektion durch diagnostische Maßnahmen nachgewiesen wurde (Paya, 2001), der Patient in der Regel aber noch keine klinischen Symptome zeigt. Dies setzt die Verwendung eines sensitiven Screeningverfahrens für HCMV voraus (Einsele et al., 2001). Bevorzugt werden Ganciclovir oder Foscarnet, alternativ Cidofovir, verabreicht (Einsele et al., 2001).

Eine aktive Immunprophylaxe steht bislang nicht zur Verfügung.

### 1.4.2 Therapie

Für die Therapie der HCMV-Erkrankung stehen zahlreiche Virostatika zur Verfügung.

Aciclovir (ACV) wird hauptsächlich in der HSV-Therapie eingesetzt, zeigt aber auch in der Therapie der HCMV- Erkrankung Wirkung, wenn seine Potenz auch geringer ist als die der spezifischen anti- HCMV Substanzen. Aciclovir ist ein Nucleosid-Analogon, dessen Wirkung auf eine Monophosphorylierung durch die UL97-Kinase des HCMV-Virus zurückzuführen ist. Im Anschluss daran findet

---

ein Umbau in die trizyklische Form durch zelluläre Enzyme statt. Trizyklisches ACV ist in der Lage virale Polymerasen selektiv zu inhibieren (St. George et al., 2000). Mit Valaciclovir steht eine orale Variante des ACV zur Verfügung. Nach Ljungman et al. (2002) kann durch dessen Einsatz die Notwendigkeit einer präemptiven Therapie mit Ganciclovir bzw. Foscarnet um 50% reduziert, und damit das Risiko von schwerwiegenden Nebenwirkungen gesenkt werden.

Ganciclovir (GCV) ist das Standardpräparat in der Behandlung HCMV-assoziiierter Erkrankungen. Es ist als Derivat des Aciclovirs ebenfalls ein Nucleosid- Analogon, welches durch die UL97- Kinase des Cytomegalievirus phosphoryliert wird. Seine hohe Potenz, die Virusreplikation zu hemmen, beruht darauf, dass eine große Menge an aktiver, dreifach phosphorylierter Wirkform in den HCMV-infizierten Zellen generiert wird (St. George et al., 2000). In dieser Form ist das Ganciclovir in der Lage, die virale DNA- Polymerase UL54 des HCMV-Virus zu hemmen. Allerdings verursacht GCV schwerwiegende toxische Probleme. An erster Stelle ist die Knochenmarkstoxizität des GCV zu nennen, welche zu einer reversiblen Panzytopenie führt, wobei v.a. die Neutropenie therapielimitierend sein kann. Durch sie können Sekundärinfektionen mit Bakterien oder Pilzen getriggert werden (Marre et al., 2000). Außerdem werden nach länger als drei Monate dauernder Therapie zunehmend Resistenzen gegen Ganciclovir, meist verursacht durch eine Mutation im UL97-Gen, welches für eine Phosphotransferase kodiert, beobachtet (Braunwald et al., 2001; Limaye et al., 2002; Drew et al., 2001).

Neben dem intravenös zu verabreichenden Ganciclovir ist auch ein orales Ganciclovirpräparat im Handel, dessen Bioverfügbarkeit aber sehr gering ist.

Mit Valganciclovir (VGCV) ist nun ein Monovalylester des Ganciclovirs erhältlich. Nach oraler Einnahme wird VGCV im Gastrointestinaltrakt gut resorbiert und rasch durch intestinale und hepatische Esterasen zu Ganciclovir hydrolysiert bevor es in den Blutkreislauf gelangt (Reusser, 2001). Die Bioverfügbarkeit von VGCV ist nach oraler Einnahme mit 60% um das 10-fache höher als die des orales Ganciclovirs (Reusser, 2001; Salomon-Ceron, 2001). Der Ganciclovir- Blutspiegel, der durch die Einnahme von 900mg Valganciclovir erreicht wird, ist mit demjenigen vergleichbar, der durch die

---

intravenöse Gabe von 5mg/kg KG GCV entsteht (Reusser, 2002; Salomon-Ceron, 2001). Auch hinsichtlich der Nebenwirkungen von Ganciclovir und Valganciclovir konnten weder im Spektrum noch in der Schwere signifikante Unterschiede festgestellt werden. Am häufigsten wurde das Auftreten von Diarrhoen und Neutropenien dokumentiert (Salomon-Ceron, 2001). Bisher ist VGCV lediglich zur Prophylaxe der HCMV-Infektion bei HIV-positiven Patienten, und zur Behandlung der HCMV-Retinitis, zugelassen (Reusser, 2001).

Foscarnet agiert ebenfalls durch eine Hemmung der DNA-Polymerase des HCM- Virus. Da Foscarnet jedoch keine Phosphorylierung benötigt, um in aktiver Form vorzuliegen, wirkt es auch gegen die meisten Ganciclovir-resistenten Stämme (Braunwald et al., 2001). Foscarnet muß aufgrund niedriger Bioverfügbarkeit und Toxizität im Gastrointestinaltrakt intravenös appliziert werden (St. George et al., 2000). Hauptnebenwirkung dieser Substanz ist die Nephrotoxizität, des weiteren treten gehäuft Elektrolytentgleisungen wie Hypocalzämie, Hypomagnesämie, und Hypophosphatämie auf (Zaia, 2002). Da es jedoch eine signifikant geringere Hämatotoxizität als GCV bei vergleichbarer Wirksamkeit aufweist, ist Foscarnet trotz zahlreichen Nebenwirkungen das Mittel der zweiten Wahl in der Prävention und Behandlung der HCMV-Erkrankung (Reusser, 2002; St. George et al., 2000).

Eine Kombinationstherapie, bestehend aus Ganciclovir und Foscarnet, führt im Vergleich zur Monotherapie zu einer Reduktion der Mortalität ohne eine signifikante Steigerung der Toxizität (Ljungman, 2002).

Das Nukleotid-Analogon Cidofovir kommt gegen Ganciclovir- und Foscarnet-resistente HCMV-Stämme als second- line Therapeutikum zum Einsatz (Drew et al., 2001; Ljungman et al, 2002). Dem Vorteil der langen intrazellulären Halbwertszeit, welche Injektionen im Abstand von einer Woche ermöglicht, steht die erhebliche Nephrotoxizität gegenüber, die mittels Probenecid und konsequenter Hydratation bekämpft werden muß (Braunwald et al., 2001; St. George et al., 2000).

Der Nutzen einer Therapie mit HCMV-Immunglobulinen ist umstritten und konnte bisher in keiner Studie zweifelsfrei belegt werden. Trotzdem gilt die

---

Ganciclovir- Immunglobulin- Kombinationstherapie nach wie vor als Goldstandart in der Behandlung der manifesten HCMV-Erkrankung (Ljungman, 2002).

Eine zukünftige Strategie zur Bekämpfung der HCMV-Infektion wird gegenwärtig mit der adoptive Immuntherapie mittels HCMV- spezifischer, CD8- positiver, zytotoxischer T-Zellen erprobt (Einsele et al., 2002; Stocchi et al., 1999). Hierzu werden Klone von HCMV- spezifischen T-Lymphozyten des Spenders entnommen, ex vivo vermehrt und anschließend dem Empfänger intravenös zugeführt (Einsele et al., 2002). Dieses Verfahren ist allerdings sehr aufwendig und wird aus diesem Grund noch nicht in der Routine eingesetzt (Marre et al, 2000), obwohl Daten dafür sprechen, dass durch adoptive Immuntherapie das Risiko für eine Infektion und Erkrankung durch HCMV niedrig gehalten werden kann, ohne dies durch schwerwiegende Nebenwirkungen erkaufen zu müssen (Ljungman, 2002).

## **1.5 Thematik und Zielsetzung der Arbeit**

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf einer Verbesserung von Diagnostik und Therapie der HCMV- Infektion nach allogener Stammzelltransplantation.

Hierzu soll die Eignung der Kombination des MagNA Pure- Geräts zur DNA- Extraktion mit dem COBAS Amplicor CMV Monitor Gerät für die Detektion der Virus- DNA mittels quantitativer PCR in der klinischen Verwendung erprobt werden. Dazu werden die Ergebnisse dieser Methode mit den Resultaten des weitverbreiteten pp65- Antigenämie- Assays verglichen.

Für eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten wird im Rahmen einer Phase I/II- Studie der Einsatz des per os einnehmbaren Valganciclovir im Vergleich zu intravenösem Ganciclovir bei SCT- Patienten getestet, mit dem Ziel, die Lebensqualität sowie die Compliance dieser Patienten zu steigern. Patienten, die mittels dieser Studienmedikamente behandelt werden, sollen anschließend bezüglich des Verlaufs ihrer Viruslast unter Therapie untersucht werden. Um zu vermeiden, dass sich Cross- over- Effekte der beiden

---

Substanzen in der Auswertung niederschlagen, soll sich die Untersuchung der Viruslast auf die erste Therapiewoche beschränken, dies macht auch im Hinblick auf die Ermittlung frühzeitiger prognostischer Faktoren hinsichtlich der Entwicklung einer HCMV- Erkrankung Sinn.

Der dritte Teil der Arbeit wird sich mit einer Risikofaktorenanalyse der untersuchten Patienten befassen, um Hochrisikokonstellationen für eine HCMV- Infektion und Erkrankung zu ermitteln. Anhand des jeweiligen Risikoprofils des einzelnen Patienten könnten in Zukunft im Rahmen sogenannter Risiko- adaptierter Therapiestrategien optimale Ergebnisse in der Bekämpfung der HCMV- Erkrankung erzielt werden.

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Valganciclovir

Durch Bemühungen, eine orale Form des Ganciclovirs mit besserer Bioverfügbarkeit zu konzipieren, wurde Valganciclovir, eine Valyl- Vorstufe des Ganciclovirs entwickelt. Da das Valganciclovir im Organismus innerhalb kürzester Zeit ohne Bildung weiterer Metaboliten in Ganciclovir umgewandelt wird, entspricht der Wirkmechanismus des Valganciclovirs dem des Ganciclovirs. Die klinische Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit des VGCV wurde in zahlreichen Studien untersucht. Nach Einnahme rasch vom Gastrointestinaltrakt absorbiert und durch intestinale und hepatische Esterasen in GCV umgewandelt, erreicht die Plasmakonzentration des GCV bereits nach 2-3 Stunden ihr Maximum. 60% der verabreichten VGCV- Dosis erreichen als GCV die systemische Zirkulation, um diese Rate noch weiter zu erhöhen sollte das Medikament zum Essen eingenommen werden. Das systemische Konzentrationsmaximum von Valganciclovir selbst ist sehr niedrig und beträgt lediglich um die 3%. Das Verteilungsmuster von VGCV im Organismus scheint laut Untersuchungen im Tiermodell vergleichbar mit dem des GCV zu sein. Das Medikament verteilt sich auf alle gut durchblutete Organe und Gewebe und wird schnell in Form von GCV über die Nieren durch glomeruläre Filtration und aktive tubuläre Sekretion ausgeschieden. Daten hinsichtlich der Penetrationsfähigkeit des VGCV in den Liquor bzw. in intraokuläres Gewebe liegen bisher nicht vor, für das GCV beträgt sie 24-67% bzw. 40-88%. Die Proteinbindung des VGCV wurde ebenfalls noch nicht untersucht, für GCV beträgt sie weniger als 2%. Beide Substanzen kumulieren nicht im Organismus. Auch die klinische Wirksamkeit des VGCV wird derzeit in einigen Studien überprüft und scheint den Erwartungen zu entsprechen. Für die Prophylaxe der HCMV- Infektion bei HIV- infizierten Patienten sowie zur Behandlung der HCMV- Retinitis ist das VGCV bereits etabliert.

Bezüglich der Sicherheit der Substanz wurden ebenfalls zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Im allgemeinen wurde das Valganciclovir gut

---

toleriert ohne das unerwartete Nebenwirkungen in Erscheinung traten, das Spektrum der Nebenwirkungen entsprach weitgehend demjenigen des GCV. Bei HIV- Patienten wurden unter Therapie mit VGCV etwas häufiger Diarrhoe und orale Candidiasis beobachtet, während Patienten unter i.v. GCV- Therapie häufiger unter Erbrechen litten und vermehrt zu Katheter-assoziierten Infekten neigten. Wie das Ganciclovir hat auch das VGCV nach Untersuchung im Tiermodell möglicherweise carzinogene Wirkung.

Das Präparat ist in Form von Tabletten oder als Sirup erhältlich.

## **2.2 Studienprotokoll**

Im Rahmen einer Phase I/II-Studie wurden Blutplasmaproben von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation deren CMV- Serostatus für Empfänger (R) und/oder Spender (D) positiv waren, hinsichtlich CMV-DNAämie mittels quantitativer PCR durch den COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM) untersucht. Die von der Hoffman- La Roche AG, Grenzach-Whylen, gesponsorte Studie über die „PCR-basierte präemptive Therapie mit oralem Valganciclovir und intravenösem Ganciclovir bei Patienten mit aktiver CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation“ soll der Bewertung des oralen Valganciclovirs im Vergleich zum intravenösen Ganciclovir hinsichtlich der Pharmakokinetik, der Sicherheit und der Wirksamkeit dienen.

Die offene, randomisierte, cross-over Studie wurde multizentrisch parallel an 5 Universitätskliniken (Basel, Dresden, Genf, Hannover, Tübingen) durchgeführt. Zielgruppen sind Empfänger eines allogenen Stammzelltransplantats, die vor SCT HCMV- seropositiv waren und/oder ein Transplantat eines HCMV-seropositiven Donors erhielten. Diese wurden über 100 Tage ab SCT untersucht.

In den 5 Zentren sollten insgesamt 50 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, davon 30 mit kompletter Datenerhebung zur Pharmakokinetik. 10 von den 50 Patienten sollten vor Aufnahme in die Studie eine intestinale GvHD dokumentiert haben.

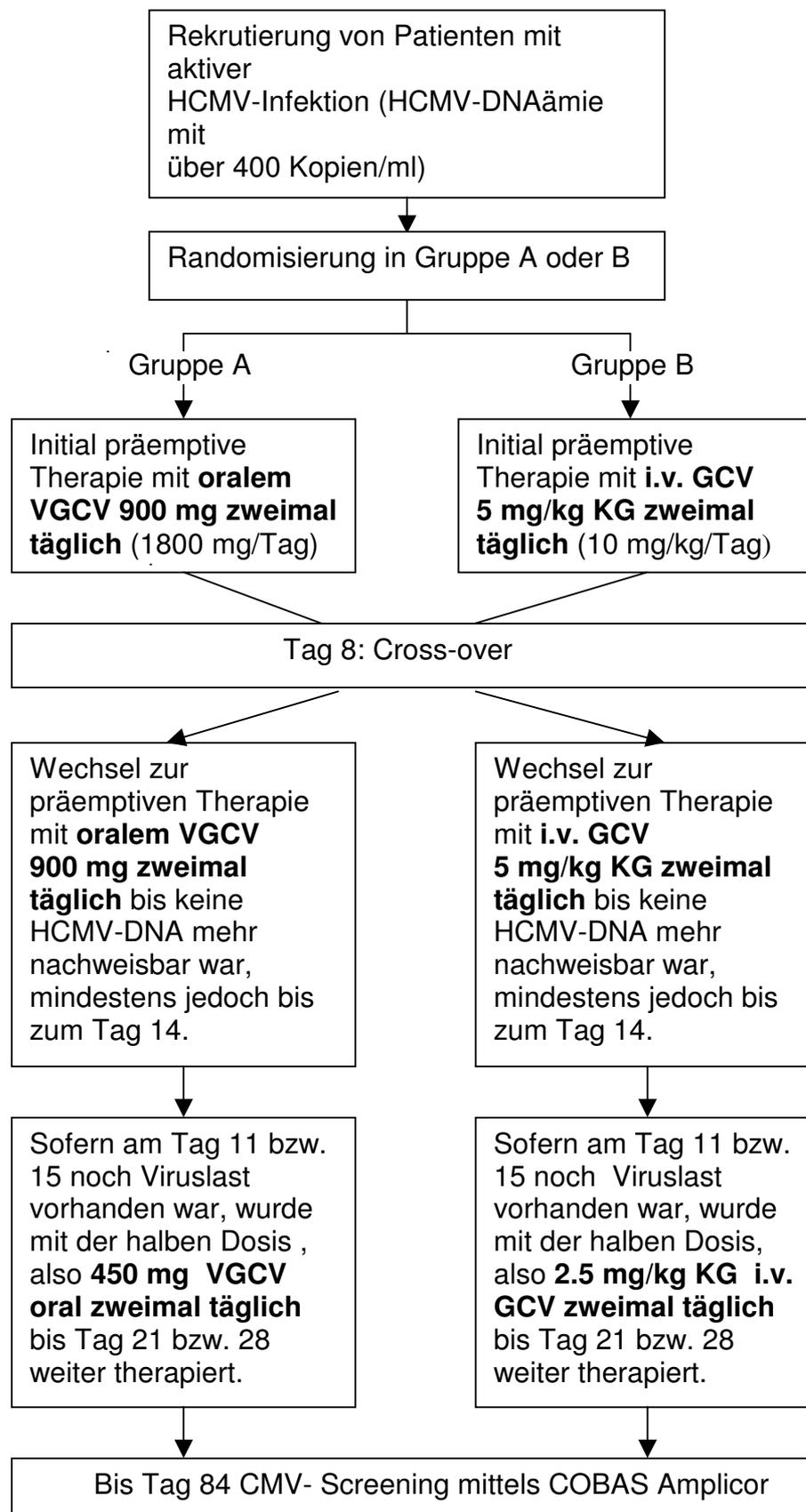
---

Folgende Einschlusskriterien mussten erfüllt werden: Mindestalter war 18 Jahre. Die Patienten mussten in der Lage sein, orale Medikation einzunehmen. Außerdem mussten die Patienten im Zeitraum von 100 Tagen nach allogener Stammzelltransplantation, in einer Blutprobe positiv durch den CMV-Monitor getestet worden sein (>400 Kopien/ ml). Der ANC (absolute neutrophil count) musste zum Zeitpunkt der Rekrutierung an zwei aufeinanderfolgenden Visiten >750/ $\mu$ l betragen, außerdem musste der Patient einen normalen Kaliumwert aufweisen.

Folgende Kriterien führten zum Ausschluss aus der Studie: Schwangere oder stillende Frauen und Patienten die während der Studie und 90 Tage darüber hinaus keine zuverlässigen Verhütungsmaßnahmen ergreifen wollten, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Das Gewicht sollte 30% des Durchschnittsgewichts nicht unterschreiten und nicht um mehr als das doppelte überschreiten. Patienten, die bereits zu Studienbeginn an einer invasiven HCMV- Erkrankung litten oder andere antivirale Medikamente einnahmen, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Medikamente, welche die Nierenfunktion einschränkten, waren kontraindiziert, ebenso eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion mit einer Kreatininclearance unter 25 ml/min. Weitere Ausschlussgründe waren Leberfunktionsstörungen mit einer Bilirubinerhöhung auf über 10mg/dl, schwere Diarrhoen und QT- Zeit- Abweichungen im EKG. Außerdem konnten solche Patienten nicht teilnehmen, die in den zurückliegenden 12 Wochen an einer anderen Studie beteiligt waren oder eine bekannte Unverträglichkeit gegenüber Ganciclovir, Valganciclovir oder Aciclovir aufwiesen.

Erfüllte der Patient alle Kriterien, so wurde er vom Zeitpunkt der SCT an über 100 Tage einmal wöchentlich durch den CMV MONITOR auf CMV- DNAämie untersucht. Nachdem der CMV-PCR Test eine aktive Infektion anzeigte, wurde der Patient einer der Behandlungsgruppen A oder B zugeteilt und nach dem auf der folgenden Seite dargestellten Therapieschema behandelt.

Abbildung 1: Therapieschema der Studie



---

Unter Therapie sollten am Tag 1, 4, 8, 11, 15, 22, ab diesem Zeitpunkt einmal wöchentlich bis zum Tag 84 Blutproben abgenommen werden. Diese wurden einmal die Woche mittels COBAS Amplicor CMV Monitor untersucht.

Zur Überwachung der Sicherheit der Medikamente wurden unter Therapie die Vitalzeichen erfasst, Nebenwirkungen dokumentiert und Labortests durchgeführt. Für die Erfassung der Pharmakokinetik wurden an 2 Tagen innerhalb der ersten 14 Tage der Therapie Blutproben vor der Medikamentengabe sowie 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 12 Stunden danach abgenommen und untersucht. Die Wirksamkeit der Therapie wurde anhand der HCMV- Viruslast mittels quantitativer PCR durch den COBAS Amplicor CMV MONITOR bestimmt. Die Patientencompliance wurde entweder über Dokumentation der Medikamenteneinnahme durch den Patienten selbst, oder durch Beaufsichtigung der Verabreichung durch das medizinische Personal überprüft. Eine 90%ige Compliance während der ersten 14 Tage und 80% im Zeitraum der Erhaltungsdosis wurden gefordert.

Die Studiendauer betrug 84 Tage ab Therapiebeginn.

## **2.3 Patienten**

Insgesamt wurden im Rahmen der Valganciclovirstudie in Tübingen 604 Blutplasmaproben von 59 Patienten im Zeitraum Februar 2002 bis September 2003 prospektiv untersucht. Die ersten 243 Proben wurden im Rahmen einer Vorgängerdoktorarbeit im Zeitraum Februar 2002 bis Oktober 2002 analysiert. Die Proben stammten von Patienten des UKT nach allogener Stammzelltransplantation, deren CMV- Serostatus für Empfänger (R) und/oder Spender (D) positiv waren. 58 Patienten wurden am UKT stammzelltransplantiert, 1 Patient befand sich zur Behandlung seiner GvHD im UKT, er wurde bereits in der Universitätsklinik Dresden transplantiert. Folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Merkmale der 59 untersuchten Patienten.

**Tabelle 1: Patienten- und Transplantationscharakteristika**

	Anzahl	%
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	38	64
Weiblich	21	36
<b>Alter bei SCT</b>		
Durchschnitt	44	
Median	45	
Spannweite	19-65	
<b>Grunderkrankung</b>		
ALL	8	12.9
AML	17	27.4
CML	10	16.1
NHL	10	16.1
MDS	3	4.8
PNH	2	3.2
Plasmozytom	8	12.9
SAA	1	1.6
Plasmazellleukämie	1	1.6
Adenokarzinom	1	1.6
Malignes Melanom	1	1.6
<b>Transplantation</b>		
Allogen familiär, HLA-identisch	30	50.8
Allogen familiär, HLA-mismatch	1	1.7
Allogen fremd, HLA-identisch	26	44.1
Allogen fremd, HLA-mismatch	2	3.4

<b>Stammzellen</b>		
KMT	9	15.3
PBSCT	50	84.7
<b>Konditionierung</b>		
TBI/FLU/CYC	5	8.5
TBI/CYC	33	55.9
TBI/END	5	8.5
TBI/FLU	3	5.1
BUS/CYC	1	1.7
FLU/MEL	7	11.9
FLU/TRE	2	3.4
RIT/BUS/END	1	1.7
CYC	2	3.4
<b>Akute GVHD*</b>		
Grad 0-1	24	42.1
Grad 2-4	33	57.9
<b>GVHD- Prophylaxe</b>		
CSA	8	13.6
MMF	1	1.7
CSA/ATG	26	44.1
CSA/MTX	1	1.7
CSA/MMF	2	3.4
CSA/PRE	1	1.7
CSA/Mab CAM	3	5.1
MMF/TAC	1	1.7
CSA/MMF/ATG	11	18.6
CSA/MMF/PRE/ATG	2	3.4
CSA/ATG/MMF/PRE/SIR	1	1.7
CSA/DEC/MTX/MMF	1	1.7
CSA/ATG/CD34Selektion	1	1.7

---

<b>HCMV- Serostatus</b>		
R+/D+	31	52.6
R-/D+	13	22.0
R+/D-	15	25.4
<b>Beobachtungszeitraum pro Patient in Tagen</b>		
Durchschnitt	69.5	
Median	71	
Spannweite	13-155	

Dabei bedeutet: ALL: akute lymphatische Leukämie, AML: akute myeloische Leukämie, CML: chronisch myeloische Leukämie, NHL: Non- Hodgkin-Lymphom, MDS: Myelodysplastisches Syndrom, PNH: paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, SAA: Schwere aplastische Anämie, TBI: Ganzkörperbestrahlung, FLU: Fludarabin, CYC: Cyclophosphamid, END: Endoxan, TRE: Treosulfan, BUS: Busulfan, MEL: Melphalan, RIT: Radio-Immunotherapie, MMF: Mycophenolatmofetil, PRE: Prednisolon, MTX: Methotrexat, SIR: Sirolimus, TAC: Tacrolimus

\*Zwei fehlende Werte

Einer der Patienten litt sowohl an einer AML als auch an einem NHL, ein anderer an einem Adenokarzinom und einer AML, ein weiterer Patient litt an einem Plasmozytom und an einem myelodysplastischen Syndrom.

---

## 2.4 Geräte und Materialien

**Tabelle 2 :Geräte und Programme**

<b>Gerät/Programm</b>	<b>Hersteller</b>
COBAS Amplicor 35- 2485	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Programm: Amplilink Version 1, for Microsoft Office	Roche Diagnostics Instrument Center Tegimenta AG, Schweiz
MagNA Pure LC JE 379	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Programm: MagNA Pure LC Ver. 2.1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
Pipettus- akku	Hirschmann, Laborgeräte
Varipetten, Reference (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer VM- 300	Neolab Migge, Heidelberg

**Tabelle 3 :Verbrauchsgegenstände und Verbrauchsmaterialien**

<b>Reagenz/Material</b>	<b>Hersteller</b>
COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM) Probenvorbereitungskit, Nr.0764787	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM) Kontrollkit, Nr.1110241	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM) Amplifikationskit, Nr.1110268	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM) Detektionskit, Nr.0764795	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor DK Detektionskit, Nr.0757470	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor CN Konjugatkit, Nr.0764213	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

COBAS Amplicor WB Waschpuffer, Nr.0759899	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor A-Ringe, Nr.2057026	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
COBAS Amplicor D-Cups, Nr.2057034	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Reagent Tub (small) Nr.3004066	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Medium Reagent Tub 30, Nr.3045501	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Reagent Tub (large) Nr.3004040	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Tub Lid (small, medium), Nr.3004082	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Tub Lid (large) Nr.3004074	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Reaction Tip (large) Nr.3004171	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Reaktion Tip (small) Nr.3004180	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Sample Cartridge Nr.3004112	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Cartridge Seal No.3118827	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Processing Cartridge Nr.3004147	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Tip Stand Nr.3004155	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Waste Bag Nr.3004201	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit, Nr.3038505	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

---

Eppendorf-Röhrchen 1,5/2ml safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Tubes 15 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen Safeseal 10/100/1000 µl	Biozym Diagnostik GmbH, Hess
Schraubdeckel- Probenröhrchen 2 ml	Biozym Diagnostik GmbH, Hess
Stripette 5/10/25 ml	Costar Corporation, Cambridge, USA

## 2.5 Patientenproben

Für die DNA-Extraktion mittels Magna Pure LC von Roche wurde Blutplasma verwendet. Dazu wurde den Patienten 10ml EDTA- Blut abgenommen, welches anschließend 20 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert wurde. Vom dadurch gewonnenen Plasmaüberstand wurden 2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt, wovon je Probe 200 µl zur DNA-Extraktion in den Magna Pure eingesetzt, die restliche Menge als Reserve bei –80 °C eingefroren wurde.

## 2.6 MagNA Pure

### 2.6.1 Überblick

Das MagNA Pure LC System von Roche arbeitet mit einem Roboterarm, Präzisionspipetten die auf 2% genau pipetieren, und magnetischen Glaspartikeln (MGPs) um DNA oder RNA aus verschiedenen Probematerialien wie Vollblut, Plasma, Serum oder Gewebeproben zu extrahieren. Das Gerät ist imstande maximal 32 Proben parallel in einem Zeitraum von 1.5 Stunden ohne manuelle Zwischenschritte kontaminationssicher zu bearbeiten. Die Proben werden im MagNA Pure über Proteindenaturierung lysiert, die freigesetzte Nukleinsäure wird stabilisiert und an die Oberfläche der zugesetzten MGPs

---

gebunden. Ungebundene Substanzen werden durch verschiedene Waschschrirte entfernt, die NS werden wieder von den MGPs abgelöst und in den Kühlblock überführt. Im Anschluss daran können die Proben mittels Post-Elution- Protokoll mit den für eine nachfolgende Amplifizierung benötigten Reagenzien versetzt, und in die für den COBAS Amplicor konzipierten A-Ringe pipettiert werden.

## **2.6.2 Vorbereitung und Befüllung des Geräts**

Nach dem Starten des MagNA Pure LC Ver. 2.1 Programms wurde das Total NA Serum\_Plasma\_Blood Protokoll aufgerufen und die gewünschten Volumina der Proben (200 µl), Elution (100 µl) und Dilution (300 µl) angegeben. Anhand der Eingabe der Probenzahl einschließlich der Kontrollen wurde durch die Software die benötigte Menge der Reagentien ermittelt. Daraufhin fand die Bestückung des Geräts mit den Verbrauchsmaterialien gemäß der Vorgaben durch den MagNA Pure statt. Die Reagent Tubs wurden entsprechend mit Wash Buffer I, II, III, Proteinase K, Elution Buffer, und CMM Dilution Buffer befüllt. Die Proteinase K musste zuvor mit 5 ml Elution Buffer in Lösung gebracht werden. Anschließend wurden die Positionen A1, B1, C1 der Sample Cartridge je mit 150 µl zuvor gevortextem negativen Humanplasma (NHP) befüllt, in die nachfolgenden Positionen wurden die Plasmaproben der Patienten, je 200 µl, pipettiert. Pro Milliliter des Lysis/Binding- Buffers mussten 22 µl des Quantifizierungsstandarts (QS) zugegeben werden, beide wurden zusammen in ein steriles Falconröhrchen pipettiert und 10 s lang gründlich gevortext bevor sie in das Reagent Tub überführt wurden. Die MGPs mussten vor dem umpipettieren in das Behältnis ebenso sorgfältig durchmischt werden. Schließlich wurden dem NHP die, ebenfalls zuvor gevortexten, Kontrollen zugesetzt. Durchmischt wurde das ganze durch mehrmaliges auf- und abziehen in der Pipette. Auf die Position A1 kamen 50 µl der CMV (-)C, auf die Position C1 folgten 50 µl der CMV H(+)C, zuletzt wurden 50 µl der CMV L(+)C zum NHP der Position B1 zugegeben. Sämtliche Reagent Tubs und der Sample Cartridge wurden in das Gerät eingesetzt, am Display abgehakt, dann wurde das

---

Programm gestartet.

In folgender Tabelle sind die Bestandteile der verwendeten Reagentien aufgeführt.

**Tabelle 4 : MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit**

<b>Reagenz</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
Lysis/Binding- Buffer	Guanidiumthiocyanat Triton X 100
Proteinase K	Proteinase K Keine zusätzlichen Angaben
MGPs	Magnetic Glass Particles Isopropanol
Wash Buffer I	Guanidiumhydrochlorid Ethanol
Wash Buffer II	Ethanol Keine zusätzlichen Angaben
Wash Buffer III	Keine Angaben
Elution Buffer	Keine Angaben

**Tabelle 5 : AMPLICOR CMV MONITOR Controls Kit (CMM CTL)**

<b>Reagenz</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
NHP	Humanplasma (getestet auf HCV, HIV und HBs- Ag) 0.1% ProClin 300
CMV (-) C	<0.005% Poly rA RNA EDTA 0.05% Sodiumacid
CMV L(+) C	<0.001% nicht infektiöse Plasmid DNA <0.005% Poly rA RNA EDTA 0.05% Sodiumacid

---

CMV H(+) C	<0.001% nicht infektiöse Plasmid DNA <0.005% Poly rA RNA EDTA 0.05% Sodiumacid
------------	---

Dabei bedeutet: NHP: Negatives Humanplasma, CMV (-) C: CMV-Kontrolle negativ, CMV L(+) C: CMV-Kontrolle low positive, CMV H(+) C: CMV-Kontrolle high positive.

## 2.6.3 Der Isolationsprozess

### 2.6.3.1 Prolog- Befüllung der Processing Cartridges

Folgende Reagenzien wurden während des Prologs in die Processing Cartridge pipettiert: Pro Probe wurden jeweils 450 µl Wash Buffer III in Reihe 4 und 5, 450 µl Wash Buffer II in Reihe 4, 850 µl Wash Buffer I in Reihe 3, 100 µl Proteinase K in Reihe 1 und 150µl MGPs in Reihe 2 pipettiert. Jeder Probenreihe, bestehend aus 8 Proben, wurde eine eigene Processing Cartridge zugewiesen, dadurch stand jeder Probe genug Platz für die einzelnen Arbeitsschritte zur Verfügung.

### 2.6.3.2 Protokoll- Extraktion von Nukleinsäuren

Für jede Probe wurden 100 µl Elution Buffer in die jeweilige Position der Elution Cartridge im Heat Block vorgelegt. Die Storage Cartridge im Cool Block wurde mit CMM Dilution Buffer, 300 µl je Probe, befüllt.

Anschließend wurden die Proben im Sample Cartridge mit jeweils 300 µl des Lysis/Binding- Buffer- QS- Gemisches versetzt, und durch mehrmaliges auf- und abziehen vermischt. Der Lysis/Binding- Buffer denaturiert Proteine, setzt DNA und RNA frei und stabilisiert gleichzeitig die Nukleinsäuren. Die nun lysierten Proben wurden in die Processing Cartridge zur Proteinase K pipettiert und mit dieser 120 s lang gemischt. Die Proteinase K ist für die Verdauung der

---

Proteine zuständig.

Nachfolgend wurden die vorbehandelten Proben zu den MGPs pipettiert, 30 s gemischt und für 6 min inkubiert. Während dieser Zeit hefteten sich die Nukleinsäuren aufgrund der chaotropischen Salzverhältnisse und der hohen ionischen Stärke des Lysis/Binding- Buffers an die Silica- Oberfläche der MGPs an.

Durch einen Magnet wurden die MGPs zusammen mit denen an sie gebundenen Nukleinsäuren in die Pipettenspitzen separiert und in den Wash Buffer I der Processing Cartridge transferiert. Der Wash Buffer I wird für die Entfernung von ungebundenen Substanzen, wie denaturierte Proteine, Zellmembranen und PCR-Inhibitoren wie Hämoglobin oder Heparin, benötigt.

Anschließend wiederholte sich der Waschvorgang noch zweimal im Wash Buffer II der Processing Cartridges. Der Wash Buffer II ist für die weitere Entfernung von Verunreinigungen zuständig, daneben reduziert er die Salzkonzentration in der Lösung.

Zum letzten Waschvorgang wurden die Proben in den Wash Buffer III transferiert. Der Wash Buffer reinigt weiter auf und sorgt ebenfalls für eine Verringerung der Salzkonzentration.

Nach der Separation erfolgte der Transfer des MGP/Total NA- Komplex in den sich im Heat Block befindenden Elution Buffer. Dort fand eine 6 min dauernde Inkubation bei höherer Temperatur statt. Nachfolgend wurden die Nukleinsäuren im Elution Buffer von den MGPs abgelöst. Nach 2 min fand der Transfer der gelösten Nukleinsäuren in die Elution Cartridges des Cool Blocks statt. Die MGP- Überreste wurden durch den Einsatz eines Magneten entfernt. Fehlerhaft extrahierte Proben wurden durch das Gerät angezeigt.

#### **2.6.4 Post- Elution**

Anschließend wurden die Proben durch das Post-Elution Programm mit Mastermix (CMM MMX) und Magnesium (CMM Mg<sup>2+</sup>) versetzt und in die für den COBAS Amplicor konzipierten A- Ringe pipettiert. Dazu wurde das Programm mit der gewünschten Probenzahl angewählt und gestartet. Die A-

Ringe, der Mastermix und das Magnesium, die zuvor in 2 ml Schraubdeckel-Gefäße umpipettiert worden waren, wurden im Cool Block plaziert. Zudem wurden ausreichend 100 µl Spitzen zugefügt. Nachdem Eluat und Dilution Buffer miteinander vermischt worden waren, pipettierte das Gerät 50 µl Mg in den MMX, das Programm stoppte, damit das Gemisch manuell durch mehrmaliges Kippen durchmischt werden konnte. Danach wurde das Programm fortgesetzt. Pro Probe wurden 50 µl MMX-Mg Gemisch in die A-Ringe überführt, je 50 µl Probe dazupipettiert und mit der Mastermixlösung durchmischt. Nach Programmende wurden die Deckel des A-Rings verschlossen und dieser in den COBAS Amplicor eingesetzt. Mittels Dekontaminationsprogramm wurde der MagNA Pure anschließend gereinigt. Folgende Tabelle beschreibt die im Post- Elution Programm eingesetzten Reagenzien.

**Tabelle 6: AMPLICOR CMV MONITOR Amplification Kit (CMM AMP)**

<b>Reagenz</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
CMV MONITOR Master Mix (CMM MMX)	Tris- HCL Puffer Glycerol <0.1% AmpliTaq (Taq-Polymerase) <0.001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP <0.005% LC342 und LC383 (biotinylierte Primer) <0.01% AmpErase 0.09% Sodiumacid
CMV MONITOR Magnesium Reagent (CMM Mg <sup>2+</sup> )	<2% Magnesiumchlorid Amaranth dye 0.09% Sodiumacid

---

## **2.7 COBAS Amplicor CMV Monitor (CMM)**

### **2.7.1 Überblick**

Der COBAS AMPLICOR Analyzer ist ein vollautomatisiertes Gerät für qualitative und quantitative diagnostische in- vitro Testverfahren. Insgesamt sind vier Geräte (Thermocycler, Inkubator, Waschstation und Photometer) im COBAS AMPLICOR Analyzer System, welches mit Pipettierroboter arbeitet, integriert. Mit dem verwendeten COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test (CMM) steht ein in-vitro Nukleinsäuren- Amplifikationstest zur Quantifizierung viraler HCMV- DNA aus Humanplasma zur Verfügung.

Nach der Probenvorbereitung mittels spezieller standartisierter Testkits die außerhalb des Geräts stattfindet, werden die Proben und die benötigten Reagentien im Gerät platziert. Im dazugehörenden Software Programm Amplilink werden die Daten erfasst und das vollautomatische Programm gestartet. Zuerst findet die Amplifikation der Nukleinsäuren im Thermocycler statt, danach werden die Amplifikate denaturiert und reihenverdünnt. Anschließend erfolgt eine Hybridisierung der Amplifikate an spezifische Sonden, die an Mikromagnetpartikel gebunden sind. Diese gebundenen Amplifikate werden nun durch eine kolorimetrische Reaktion nachgewiesen. Parallel wird ein Quantifizierungsstandart (QS), dessen Viruskopienzahl bekannt ist, amplifiziert. Anhand des Vergleichs der Probenextinktion zur Extinktion des QS berechnet das Gerät nun die Viruslast der Probe. Die untere Detektionsgrenze beträgt 400 Kopien/ml Plasma, im Bereich bis 100.000 Kopien/ml verläuft der Test linear. Pro Lauf können maximal 24 Proben, das entspricht 2 A- Ringen, parallel quantifiziert werden.

### **2.7.2 Vorbereitung und Befüllung des Geräts**

Zunächst wurde nach dem Start des Amplilink Programms und des COBAS AMPLICOR Geräts das Waschprogramm gestartet, wodurch alle Leitungen und

die Transfernadel hochdruckgereinigt wurden. Anschließend wurden die anstehenden Wartungen durchgeführt. Sowohl die Reinigung als auch das regelmäßige Austauschen von Teilen des Geräts im Rahmen der Wartung diente neben der Erhaltung der Funktionstüchtigkeit des Geräts auch dem Schutz vor Kontaminationen der zu untersuchenden Proben. Der Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:9 mit destilliertem Wasser verdünnt und in den dafür vorgesehenen Kanister gefüllt. Für 24 Proben wurden davon etwa 3.5 l benötigt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers**

Reagenz	Inhaltsstoffe
Waschpuffer	<2% Phosphatpuffer <9% Natriumchlorid EDTA <2% Reinigungsmittel 0.5% ProClin

Danach wurden alle benötigten Reagenzien im COBAS Amplicor platziert und durch Eingabe des jeweiligen Strichcodes erfasst. Die VQ4 und VM4 Reagenzien mussten zuvor mit 2.5 ml VQ PS1 bzw. VM PS1 vervollständigt, das SB3 Reagenz entsprechend mit 5 ml SB versehen werden.

Tabelle 8 zeigt die einzusetzenden Reagenzien mit Tests/Menge pro Probe bzw. Kontrolle und deren Zusammensetzungen.

**Tabelle 8: Menge und Zusammensetzung der Reagenzien**

Reagenz	Anzahl der Tests	Zusammensetzung
VQ4+VQ PS1	2	MES Puffer <0.1% Dynabeads- Lösung 0.09% Natriumacid Natrium Phosphat Puffer <0.2% Reinigungsmittel 24.9% Natrium Thiocyanat
VM4+VM PS1	4	MES Puffer

		<0.5% Dynabeats-Lösung 0.09% Sodiumpuffer Sodium Phosphat Puffer <0.2% Reinigungsmittel 24.9% Sodium Thiocyanat
AD3	3	EDTA 0.8% Sodiumhydroxid
DN4	1	1.6% Sodiumhydroxid EDTA Thymolblau
CN4	6	Tris- HCL Puffer <0.001% Avidin- Meerrettich- Peroxidase- Konjugat Rinderserumalbumin Emulsit 25 0.1% Phenol 1% ProClin 150
SB3+SB	6	Citratlösung 0.01% Wasserstoffperoxid 0.1% ProClin 150 0.1% 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin 40% Dimethylformamid

Dabei bedeutet: VQ4+VQ PS1: Gemisch aus Quantifizierungsstandartprobe 1 und 2, VM4+VM PS1: Gemisch aus Probensuspension 1 und 2, AD3: Amplifikationsverdünnungsreagenz, DN4: Denaturierungslösung, CN4: Avidin-Meerrettich- Peroxidase- Konjugat, SB3+SB: Gemisch aus Substrat A und B.

Anschließend wurden entsprechend der Anzahl der A- Ringe genügend D- Cups in das Gerät eingesetzt, die Kontrollen und Proben unter der zugehörigen A-Ringnummer in das Programm eingegeben, die A-Ringe in die Thermocycler des Geräts platziert und über den Strichcode erfasst. Nun konnte das vollautomatisch ablaufende Programm gestartet werden. Nachdem das Gerät

---

überprüft hatte, ob die Befüllung mit Reagenzien und Verbrauchsmaterial den Angaben entsprechend war, wurde der Lauf begonnen. Die Zeitdauer betrug für 12 Proben 4, für 24 Proben 6 Stunden.

### **2.7.3 Amplifikation**

Die aus den drei Prozessen Denaturierung, Annealing und Extension bestehende Amplifikation erfolgte im Thermocycler des COBAS Amplicor Analyser. Bei Temperaturen über 90°C wurde die doppelsträngige DNA denaturiert, wobei Wasserstoffbrücken gelöst, und die DNA in 2 Einzelstränge aufgetrennt wurde. In einem zweiten Schritt (Annealing) wurde der Reaktionsansatz auf etwa 60°C abgekühlt. Die Zielsequenz wurde durch die Anlagerung von zwei biotinylierten Primern, LC342 und LC383, markiert. Als Zielsequenz diente ein 362 Basen umfassender Abschnitt des hochkonservierten N- Terminus des CMV- DNA- Polymerase- Gens. Nachdem die Primer gebunden hatten, wurde die Temperatur im dritten Schritt, der Extension, auf 72°C erhöht. In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und den Desoxynukleotidtriphosphaten dATP, dGTP, dCTP und dUTP (statt dTTP) im Überschuss, konnten nun die DNA- Stränge durch die Taq- DNA- Polymerase durch die in 5'- 3'-Richtung ablaufende Anlagerung von zum Matrizenstrang komplementären Desoxynukleotiden (dNTPs) an die Primer vervollständigt werden. Hierbei entstanden im ersten Zyklus zwei neue DNA-Stränge, welche identisch mit der DNA- Zielsequenz waren. Die Anzahl der so entstandenen Kopien, auch Amplicons genannt, konnten nun mit jedem neuen Zyklus verdoppelt werden.

---

## **2.7.4 Besonderheiten: Quantifizierungsstandart und AmpErase**

### **2.7.4.1 Quantifizierungsstandart**

Der Quantifizierungsstandart (QS), ein ebenfalls 365 Basen umfassendes, nichtinfektiöses DNA- Molekül mit gleichen Primerbindungsstellen aber einer anderen Sondenbindungsstelle (SK535) als die Zielsequenz des HCMV-Genoms, wurde in bekannter Kopienzahl zu jeder Probe zugegeben und durchlief ebenfalls die Schritte Amplifikation, Hybridisierung und Detektion. Aufgrund der differierenden Sondenbindungsstelle fand die Detektion des QS getrennt von der Detektion der Proben statt, wodurch die Viruslast quantifiziert werden konnte und gleichzeitig eine interne Inhibitionskontrolle mitgeführt wurde.

### **2.7.4.2 AmpErase**

Das im Mastermix zugeführte Enzym AmpErase gewährleistete den Schutz vor Kontaminierung mit Amplicons aus vorangegangenen Läufen, sogenannten carry- over Produkten, indem es DNA- Stränge welche dUTP enthalten erkennt und zerstört. Da sich dUTP nicht in natürlich vorliegender DNA aber immer anstelle von dTTP in den Amplicons befindet, werden diese selektiv zerstört. Dies geschieht zu Beginn des ersten Zyklus der PCR indem die betroffenen Amplicons in Position des dUTPs gespalten werden und somit nicht mehr amplifizierbar sind. Da die AmpErase bei Temperaturen über 55°C inaktiv ist, werden die neu entstehenden Amplicons geschont, da diese nur bis 60°C abgekühlt werden. Nachdem die Amplifikation abgeschlossen ist, wird das Enzym durch Zugabe einer Denaturierungslösung zerstört.

---

### 2.7.5 Hybridisierung

Die in den vorangegangenen Amplifikationszyklen gebildeten Amplicons wurden anschließend durch Zugabe einer Denaturierungslösung (DN4) wieder in Einzelstränge gespalten.

Für jede Probe wurden dann je 25 µl in drei D- Cups (Detektorröhrchen) pipettiert, wovon je ein D- Cup zur Detektion unverdünnter DNA der Zielsequenz und des QS diente, das dritte Detektorröhrchen wurde mit einer Verdünnungslösung (AD) im Verhältnis 1:7 verdünnt. Hiervon wurden je ein Aliquot 1:7 verdünnte Probe für die Bestimmung des QS und der Ziel- DNA zurückbehalten, ein weiteres Aliquot wurde zur Bestimmung der Ziel- DNA auf ein Verhältnis von 1:49 verdünnt und anschließend auf ein Verhältnis von 1:343 gebracht. Letztendlich lagen also zwei Konzentrationen, 1:1 und 1:7, für die Bestimmung des QS, und vier Konzentrationen, 1:1, 1:7, 1:49 und 1:343, für die Bestimmung der Ziel- DNA vor. Diese wurden in den Inkubator transportiert und auf 37 °C gebracht.

Im Anschluß daran wurden die Hybridisierungslösungen VM und VQ zugegeben, VM in die Verdünnungsreihe zur Ziel- DNA Bestimmung und VQ in die Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Quantifizierungsstandarts. Diese Hybridisierungslösungen beinhalteten magnetische Partikel welche mit Oligonukleotidsonden beschichtet waren, im Falle des VM mit Bindungsstelle komplementär zur Zielsequenz, im Falle des VQ mit Bindungsstelle komplementär zur DNA des QS. Die Amplicons wurden so in einer Hybridisierungsreaktion an die jeweiligen Sonden gebunden, welche wiederum an die magnetischen Partikel gekoppelt waren.

### 2.7.6 Detektion

Nach der Hybridisierungsreaktion folgten vier Waschschrte mit dem Ziel, alle nicht gebundenen Amplicons zu entfernen, alle gebundenen Amplicons wurden dagegen mit Hilfe eines Magneten in den Röhrchen zurückgehalten.

Anschließend wurde ein Avidin- Meerrettich- Peroxidase- Konjugat (CN) in die D- Cups pipettiert, gefolgt von einem zweiten Inkubationsschritt bei 37°C. Da das im CN- Reagenz enthaltene Avidin eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, erfolgte eine Koppelung der Amplicons samt Sonde und magnetischen Partikeln durch die biotinylierten Primer an das Avidin- Meerrettich- Peroxidase- Konjugat. Es schloß sich ein weiterer Waschschrift zur Entfernung ungebundener Substanzen an. Dann wurde in einem dritten Inkubationsschritt Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid (SB) in jedes D- Cup pipettiert. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysierte die gebundene Meerrettichperoxidase die Oxidation von Tetramethylbenzidin, wodurch ein blauer Farbkomplex entstand. Schließlich wurden die D- Cups in ein Photometer überführt und die Absorption jeder Probe bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Der Substratleerwert wurde hiervon abgezogen.

### 2.7.7 Quantifizierung

Aus diesen Extinktionswerten berechnete das System die Höhe der Viruslast (Genomäquivalente/ml Plasma) anhand folgender Gleichung:

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

**Tabelle 9: Erläuterungen zur Gleichung**

<b>Extinktion(T)</b>	Extinktion der Probe (innerhalb eines linearen Bereichs des Photometers) welche nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die größte Gesamtabsorption (OD) ergibt
<b>VF(T)</b>	Die zur Bestimmung der Gesamtabsorption (OD) benutzte Verdünnung der Probe

---

<b>Extinktion(QS)</b>	Extinktion des QS (innerhalb eines linearen Bereichs des Photometers) welche nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die größte Gesamtabsorption (OD) ergibt
<b>VF(QS)</b>	Die zur Bestimmung der Gesamtabsorption (OD) benutzte Verdünnung des QS
<b>Kopienzahl(QS)</b>	Konzentration des QS (Genomäquivalente/ml) in der Probe
<b>Probenfaktor</b>	Faktor für die Umwandlung Genomäquivalente/PCR in Genomäquivalente/ml

Die ermittelten Daten wurden nun an die Amplilink- Software geschickt und konnten anschließend ausgedruckt werden. Die Extinktionswerte wurden überprüft, sie mussten in der Verdünnungsreihe stets abnehmende Werte zeigen. Alle drei externen Kontrollproben (CMV (-) C, CMV L(+) C und CMV H(+) C) mussten in einem definierten Bereich liegen. Sofern auch vom System keine Fehlermeldungen angegeben waren, galten die Ergebnisse im Bereich 400 bis 100 000 Genomäquivalente/ml Plasma als valide.

## 2.8 Klinische Daten und statistische Analyse

Nach abgeschlossener Erhebung der Labordaten erfolgte die Auswertung der klinischen Patientenparameter, welche aus den Arztbriefen und Akten der Patienten zusammengetragen wurden.

Für die Auswertung der Risikofaktoren für die Entwicklung einer HCMV-Infektion wurde in der Univarianzanalyse der Chi- Quadrat- Test durchgeführt, die multivariate Auswertung erfolgte mittels logistischer Regressionsanalyse. Anschließend wurde eine backward selection mit allen Variablen durchgeführt, welche einen p- Wert kleiner 0.1 aufwiesen.

---

## **2.9 Methodik des pp65 Antigenämietests**

Mittels Immunperoxidasetechnik erfolgte der immunzytochemische Nachweis des viralen pp65- Tegumentproteins in peripheren Blutleukozyten. Hierzu wurde der gegen obengenanntes pp65- Strukturprotein gerichtete monoklonale Antikörper 28-77 als Primärantikörper eingesetzt. 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) wurde als Chromogen verwendet. Der Test wurde in der Abteilung für Virologie der Universität Tübingen durchgeführt.

---

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Viruslast**

Im folgenden Abschnitt wurde ein Vergleich der Kinetik der Viruslasten, der initialen Viruslasten und des Viruslastpeaks durchgeführt. Um zu vermeiden, dass sich Cross-over-Effekte der beiden Studienmedikamente in der Auswertung niederschlagen, beschränkte sich die Untersuchung der Viruslast auf die erste Therapiewoche, außerdem sollten so mögliche frühzeitige Prognoseparameter ermittelt werden.

#### **3.1.1 Patienten- und Transplantationscharakteristika**

Von den 59 untersuchten Patienten wurden 26 im Sinne einer HCMV-DNAämie positiv. Von diesen erfüllten 17 die Einschlusskriterien der Studie. Für die folgende Fragestellung konnten jedoch lediglich die Daten von 12 Patienten herangezogen werden, 5 wurden aus verschiedenen Gründen aus der Studie ausgeschlossen: Einer der Patienten zeigte bereits zum Zeitpunkt seiner Stammzelltransplantation eine HCMV-DNAämie, zwei weitere Patienten waren zum Zeitpunkt des Enrollments in die Studie bereits wieder HCMV-negativ, daher wurden diese Patienten nachträglich wieder aus der Studie ausgeschlossen. Zwei andere Patienten konnten wegen lückenhafter Datenlage nicht ausgewertet werden. Es wurde also eine per Protokoll-Auswertung vorgenommen. Von den 12 Patienten wurden 7 in den Studienarm B: Behandlungsbeginn mit intravenös zu verabreichendem Ganciclovir, und 5 in den Studienarm A: Behandlungsbeginn mit oralem Valganciclovir, randomisiert. Bei jeweils einem Patient in Arm A und B musste die Dosis der Studienmedikamente wegen eingeschränkter Kreatinin-Clearance reduziert werden.

In den folgenden Tabellen werden Patienten- und Transplantationscharakteristika der beiden Gruppen gegenübergestellt.

**Tabelle 10: Patientencharakteristika**

	Therapiebeginn mit Valganciclovir	Therapiebeginn mit Ganciclovir
<b>Patientenanzahl</b>	5	7
<b>Alter: Median, (SW)</b>	55, (36- 58)	52, (40- 65)
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	5	5
weiblich	-	2
<b>Erkrankung</b>		
ALL	1	1
AML	2	4
CML	-	1
Plasmozytom	1	1
NHL	1	1
Adenokarzinom	1	-
<b>CMV- Serologie vor Transplantation</b>		
R+/D-	2	4
R+/D+	3	3

Dabei bedeutet: ALL= Akute lymphatische Leukämie, AML= Akute myeloische Leukämie, CML= chronisch myeloische Leukämie, NHL= Non- Hodgkin- Lymphom, R= Recipient, D= Donor

Ein Patient litt zugleich an einem NHL und einer AML, ein anderen hatte eine AML und ein Adenokarzinom unklarer Primärlokalisierung.

**Tabelle 11: Transplantationscharakteristika**

	Therapiebeginn mit Valganciclovir	Therapiebeginn mit Ganciclovir
<b>Patientenanzahl</b>	5	7
<b>Konditionierung</b>		
CYC/TBI	4	3
FLU/MEL	1	-
CYC/BUS	-	1
FLU/TBI (2g)	-	1
END/TBI	-	1
FLU/CYC/TBI (2g)	-	1
<b>GVHD- Prophylaxe</b>		
CSA	2	-
CSA/ATG	2	4
CSA/MMF	1	2
CSA/MMF/ATG	-	-
CSA/ATG/CD34- Selektion	-	1
<b>Art der STC</b>		
PBSCT	3	5
KMT	2	2
<b>Spendertyp</b>		
Fremd	3	4
Familiär	2	3
HLA- identisch	5	6
HLA- mismatch	-	1

Dabei bedeutet: CYC= Cyclophosphamid, TBI= Ganzkörperbestrahlung, FLU= Fludarabin, MEL= Melphalan, BUS= Busulfan, END= Endoxan, ATG= Antithymozytenglobulin, MMF= Mycophenolatmofetil, PBSCT= Stammzelltransplantation aus dem peripheren Blut, KMT= Knochenmarkstransplantation, HLA= Humanes Leukozyten Antigen

---

### 3.1.2 Vergleich der Viruslasten

Definition: Tag 1 bezieht sich hier auf den Tag des Therapiebeginns. Die Patienten wurden fortlaufend nummeriert, wobei die Patienten 1-26 eine HCMV DNAämie hatten, die Patienten 27-59 in der HCMV- PCR negativ blieben.

Anhand der Kinetik der Viruslast der Patienten wurden die in den Tabellen 12-15 aufgelisteten 4 Gruppen gebildet.

**Tabelle 12: Gruppe 1: Patienten mit vollständiger Clearance von HCMV- DNA im Laufe der ersten Therapiewoche**

Patienten-nummer	Initiale Viruslast (Tag -1 ) [G/ml]	Viruslastpeak bis zum Ende der 1. Therapiewoche [G/ml]	Viruslast am Tag 8 [G/ml]	Therapiearm
4	1160	1160	0	A (VGCV initial)
9	3630	3630	0	B (GCV initial)
Mittelwert	2395	2395	0	

G= Genomäquivalente

**Tabelle 13: Gruppe 2: Patienten, deren Viruslast innerhalb der ersten Therapiewoche eine sinkende Tendenz zeigte**

Patienten-nummer	Initiale Viruslast (Tag -1 ) [G/ml]	Viruslastpeak bis zum Ende der 1. Therapiewoche [G/ml]	Viruslast am Tag 8 [G/ml]	Therapiearm
8	2460	2460	1100	A (VGCV initial)
10	3670	3670	596	B (GCV initial)
Mittelwert	3065	3065	848	

G= Genomäquivalente

**Tabelle 14: Gruppe 3: Patienten, deren Viruslast zu Beginn der DNAämie und am Ende der ersten Therapiewoche ähnlich hoch war**

Patienten-nummer	Initiale Viruslast (Tag -1 ) [G/ml]	Viruslastpeak bis zum Ende der 1. Therapiewoche [G/ml]	Viruslast am Tag 8 [G/ml]	Therapiearm
1	2660	4370	2360	A (VGCV initial)
3	1470	4390	1170	A (VGCV initial)
14	2550	3600	2970	B (GCV initial)
Mittelwert	2227	4120	2166	

G= Genomäquivalente

**Tabelle 15: Gruppe 4: Patienten, deren Viruslast innerhalb der ersten Therapiewoche eine steigende Tendenz zeigte**

Patienten-nummer	Initiale Viruslast (Tag -1 ) [G/ml]	Viruslastpeak bis zum Ende der 1. Therapiewoche [G/ml]	Viruslast am Tag 8 [G/ml]	Therapiearm
2	9720	59400	59400	B (GCV initial)
11	1170	3810	3430	B (GCV initial)
12	8100	30000	16700	B (GCV initial)
13	3500	28000	28000	B (GCV initial)
15	3410	10400	10400	A (VGCV initial)
Mittelwert	5180	26322	23586	

G= Genomäquivalente

Bei allen Patienten aus den ersten beiden Gruppen entspricht der initiale Viruslastanstieg dem Viruslastpeak, was bedeutet, dass die Viruslast ausgehend vom Tag -1 bis Tag 8 kontinuierlich absinkt. Am Tag des Therapiebeginns (Tag 1), sprich vor Wirkeintritt der Medikamente, war also schon ein geringeres Level an Viruslast vorhanden, als zum Zeitpunkt der initialen DNAämie.

---

Bei allen Patienten aus den Gruppen 3 und 4 entspricht die initiale Viruslast nie dem Viruslastpeak. In Gruppe 3 findet sich bei allen Patienten der Viruslastpeak im Laufe der ersten Therapiewoche am Tag 1 der Therapie, wonach die Viruslast wieder auf das Niveau der initialen DNAämie abfällt. In Gruppe 4 dagegen ist der Viruslastpeak während der ersten Woche bei 2 der 5 Patienten am Tag 4, bei den anderen dreien am 8. Tag der Therapie zu finden.

Vergleicht man nun die Mittelwerte der initialen Viruslasten zwischen den Gruppen, so befinden sich dieser in den Gruppen 1-3 bei 2514 Kopien/ml Blutplasma. In der Gruppe 4 liegt der Mittelwert mit 5180 Kopien/ml um das Doppelte höher. Noch deutlicher werden die Unterschiede zwischen den Gruppen 1-3 und Gruppe 4, wenn man die Mittelwerte der Maximalviruslasten vergleicht: Dieser liegt in den ersten drei Gruppen bei 3325 Kopien/ml, während er im Mittel in Gruppe 4 mit 26322 Kopien/ml um ein Vielfaches höher liegt.

### **3.1.3 Studienmedikation**

7 Patienten wurden während der ersten Therapiewoche mit intravenösem Ganciclovir, 5 mit Valganciclovir oral behandelt. Jeweils ein Patient der beiden Therapiegruppen clearte vollständig im Laufe der ersten Woche. Dies sind entsprechend 20% der mit VGCV und 14.3% der mit GCV behandelten Patienten. 20% der mit VGCV behandelten Patienten und 14.3% der mit GCV behandelten Patienten zeigten einen Viruslastabfall während der ersten 8 Tage ihrer Therapie. 2 von 5 Patienten der Valganciclovirgruppe, dies entspricht 40%, blieben bezüglich ihrer Viruslast auf konstantem Niveau, in der Ganciclovirgruppe waren es 14.3%, also 1 von 7. In der Gruppe 4 (steigende Viruslast) befinden sich 4 von 7 Patienten der Ganciclovirgruppe, dies sind 57.1%, während lediglich einer der 5 (20%) der mit Valganciclovir therapierten Patienten eine steigende Tendenz in der Viruslast zeigte.

Zu erwähnen bleibt noch, dass die einzigen beiden Patienten (Patient 2 und 11), die tatsächlich eine manifeste Erkrankung im Sinne einer HCMV-Pneumonie erlitten, sich beide in der Gruppe mit steigender Viruslast befanden,

---

und beide im Therapiearm B (Therapiebeginn mit Ganciclovir) behandelt wurden.

## **3.2 Vergleich zweier Nachweismethoden: Quantitative PCR mittels COBAS Amplicor CMV- Monitor Test (CMM) versus pp65 Antigenämietest**

### **3.2.1 Konkordanz**

Im folgenden Abschnitt wurde ein Vergleich der Konkordanz zwischen quantitativer PCR mittels COBAS Amplicor CMV- Monitor Test (CMM) und pp65 Antigenämietest anhand parallel bestimmter Proben der 59 untersuchten Patienten durchgeführt. Die Datierung der miteinander verglichenen Proben durfte nicht länger als ein Tag auseinander liegen.

Es liegen die Ergebnisse von 153 parallel ausgewerteten Stichproben vor. Die beiden Testverfahren stimmten im Ergebnis von 130 Proben überein, wovon 105 Proben in beiden Methoden einen negativen Befund zeigten, 25 Proben in beiden Tests positiv waren. 23 Proben differierten im Ergebnis, davon zeigten 6 Proben ein positives Ergebnis im COBAS CMM, waren aber im pp65-Antigenämietest negativ. 17 Proben waren im pp65-Antigenämietest positiv, im COBAS CMM dagegen negativ. Von den letztgenannten 17 Proben waren 6 komplett negativ im COBAS (Viruslast gleich 0), in den anderen 11 Proben wurde geringfügig Viruslast detektiert, jedoch unter dem Cut off von 400 Kopien/ml Blutplasma. Alle Werte die unter dieser Schwelle liegen, sind definitionsgemäß negativ.

---

**Tabelle 16: Konkordanz der beiden Testverfahren auf Probenebene, Darstellung anhand einer Vierfeldertafel**

	<b>CMM positiv</b>	<b>CMM negativ</b>	<b>insgesamt</b>
<b>pp65 positiv</b>	25 (80.6%)	17 (13.9%)	42
<b>pp65 negativ</b>	6 (19.4%)	105 (86.1%)	111
<b>insgesamt</b>	31	122	153

Zusammenfassend beträgt die Konkordanz der beiden Testverfahren bei beidseits positivem Ergebnis 80.6%, bei beidseits negativem Ergebnis 86.1%. Insgesamt stimmten 130 von 153 Befunden überein, die Gesamtkonkordanz zwischen quantitativer PCR mittels COBAS Amplicor CMV- Monitor Test (CMM) und pp65 Antigenämietest beträgt also 85%.

### **3.2.2 Sensitivität**

Die Sensitivität des CMM und des pp65-Antigenämietests bezogen auf die Detektion einer HCMV-Infektion (mindestens einer der beiden Testverfahren lieferte ein positives Ergebnis) betrug für den CMM 64,6% (31 Proben waren im CMM positiv, 48 Proben in mindestens einem der beiden Testverfahren), für den Antigenämietest 87.5% (42/48 Proben).

Wären auch die Proben mit einer Viruslast > 400 Kopien/ml und einer Extinktion < 0.200 im CMM als positiv gewertet worden, so hätte der CMM eine wesentlich höhere Sensitivität erreicht, da in diesem Falle 10 weitere Proben durch den CMM als positiv erkannt worden wären.

### 3.3 Klinischer Vergleich

#### 3.3.1 Inzidenz der HCMV-Infektion

Von insgesamt 59 untersuchten Patienten wurde bei 26 HCMV-DNA detektiert. Dies entspricht 44%.

#### 3.3.2 Risikofaktorenanalyse für eine HCMV- Infektion

Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Risikofaktorenanalyse bezüglich der Entwicklung einer frühen HCMV- Infektion (bis 100 Tage nach SCT).

**Tabelle 17: Risikofaktoren für eine CMV- Infektion**

Risikofaktor	CMV-DNAämie		Univariate Analyse		Multivariate Analyse		
	nein	ja	P*-Wert	RR	OR	95% CI	p-Wert
<b>Kohorte</b>	33	26					
<b>Alter</b>			<b>0.015</b>	2.29	8.62	1.54- 48.13	<b>0.014</b>
<=40	18	6					
>40	15	20					
<b>Geschlecht</b>			0.890	1.04	1.89	0.40- 8.87	0.419
M	21	17					
W	12	9					
<b>Donortyp</b>			0.486	0.81	1.25	0.22- 7.08	0.804
Fremd	17	11					
Familiär	16	15					
<b>Transplantat-kompatibilität</b>			<b>0.047</b>	2.43	-°	-°	-°
HLA-identisch	33	23					
HLA-Mismatch	-	3					

<b>CMV- Serologie</b>							
R-/D+	12	1					
R+/D-	9	6					
R+/D+	12	19					
Referenz=R+/D+			<b>0.005</b>	0.41	0.29	0.05– 1.81	0.186
Referenz=R+/D-			<b>0.003</b>	7.07	9.34	0.64– 135.44	0.102
<b>Art der SCT</b>							
PBSCT	30	20					
KMT	3	6					
<b>Akute GVHD Grad II-IV</b>							
Ja	17	16					
Nein	15	9					
missing value	1	1					
<b>In vivo T-Zell-Depletion</b>							
JA	26	18					
Nein	7	8					
<b>Konditionierung</b>							
Myeloablativ	21	20					
Nonmyeloablativ	11	6					
missing value	1	-					

RR= Relatives Risiko, OR= Odds Ratio, CI= Konfidenzintervall

\* Chi- Quadrat- Test

°Anzahl der Patienten der Risikogruppe zu klein

Die univariate Analyse der Risikofaktoren wurde mittels Chi- Quadrat- Test durchgeführt. Die multivariate Auswertung erfolgte mittels logistischer Regressionsanalyse. Anschließend wurde eine backward selection mit allen Variablen durchgeführt, welche einen p- Wert kleiner 0.1 aufwiesen. Diese Form der Analyse hat den Vorteil, dass nur Faktoren, die einen relevanten

---

Effekt auf die Entstehung einer HCMV- Infektion ausüben, in der Auswertung berücksichtigt werden und liefert somit die aussagekräftigsten Ergebnisse.

Patienten ab 40 Jahren haben laut univariater Analyse ein signifikant erhöhtes Risiko, eine HCMV- Reaktivierung bzw. - Infektion durchzumachen ( $p=0.015$ ). Dies bestätigte sich in der multivariaten Analyse ( $p=0.014$ ), sowie in der backward selection ( $p= 0.0302$ ). HLA- mismatch ist ebenso ein Risikofaktor, welcher eine HCMV- Infektion begünstigt, der p-Wert betrug in der univariaten Analyse 0.047. Für diesen Faktor konnte keine Multivarianzanalyse durchgeführt werden, da die Anzahl der Risikogruppe mit drei Patienten zu klein war. Als dritter Risikofaktor wurde in der Univarianzanalyse die HCMV- Serologie ermittelt, der p- Wert betrug für die Referenzgruppe R+/D+ 0.005, für die Referenzgruppe R+/D- 0.003. In der multivariaten Analyse erreichten diese Faktoren kein signifikantes Niveau, jedoch wiederum in der backward selection: das höchste Risiko eine HCMV- Reaktivierung durchzumachen haben demnach HCMV- positive Empfänger eines HCMV- positiven Transplantats (Häufigkeit: 61.29%), gefolgt von HCMV- positive Empfänger eines HCMV- negativen Transplantats (Häufigkeit: 40%). Das kleinste Risiko bestand für HCMV- negative Empfänger eines HCMV- positiven Transplantats mit einer Häufigkeit von 7.69%.

### **3.3.3 Verteilung der Risikofaktoren**

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der Risikofaktoren unter den verschiedenen Patientengruppen.

**Tabelle 18: Verteilung der Risikofaktoren**

	CMV- DNAämie nach SCT		
	nein	CMV- Infektion asymptomatisch	CMV- Erkrankung
<b>Alter</b>			
</=40	17	5	1
>40	16	19	1
<b>Transplantat- kompatibilität</b>			
HLA-identisch	33	21	2
HLA-Mismatch	-	3	-
<b>CMV – Serologie</b>			
R-/D+	12	1	-
R+/D-	9	5	1
R+/D+	12	18	1

### 3.3.4 Symptomatische Patienten

Von den insgesamt 59 untersuchten Patienten wurde bei 26 Patienten CMV-DNA detektiert, davon wurden 2 innerhalb der ersten 100 Tage nach SCT im Sinne einer early-onset CMV-Pneumonie symptomatisch. Die Inzidenz einer early-onset CMV-Erkrankung betrug also 3.4%.

Bezogen auf das Kollektiv aller 26 infizierten Personen beträgt die Progressionsrate der Erkrankung 7.7%.

Die Diagnosekriterien der CMV-Pneumonie waren: typische Infiltrate im CT und eine CMV-positive Broncho-alveoläre Lavage.

Tabelle 19 zeigt die Patienten- und Transplantationscharakteristika der beiden erkrankten Patienten.

**Tabelle 19: Patienten mit CMV- Erkrankung**

	<b>Patient 2</b>	<b>Patient 11</b>
<b>Alter</b>	40	58
<b>Geschlecht</b>	M	M
<b>Diagnose</b>	AML	CML
<b>Art der SCT</b>	KMT	PBSCT
<b>Spender</b>	Fremdspender	Fremdspender
<b>HLA- Kompatibilität</b>	HLA- identisch	HLA- identisch
<b>CMV- Serologie</b>	R+/D+	R+/D-
<b>Akute GVHD</b>	Grad II	Grad II
<b>In vivo T-Zell-Depletion</b>	Ja (ATG)	Ja (ATG)
<b>Konditionierung</b>	CYC/TBI	CYC/TBI
<b>CMV- Therapie</b>	Studienarm B (GCV i.v. initial)	Studienarm B (GCV i.v. initial)
<b>Zeitspanne zwischen SCT und initialer DNAämie [Tage]</b>	37	35
<b>Viruslast [Genomäquivalente/ml]</b>		
<b>initial</b>	9720	1170
<b>Peak</b>	96700	*
<b>Zeitspanne zwischen SCT und Diagnose der CMV- Erkrankung [Tage]</b>	38	78
<b>Zeitspanne zwischen initialer DNAämie und Diagnose der CMV- Erkrankung [Tage]</b>	1	43
<b>Zeitspanne zwischen initialer DNAämie und Einleitung der antiviralen Therapie</b>	1	4
<b>Art der CMV- Erkrankung</b>	CMV- Pneumonie	CMV- Pneumonie

\* Wert fehlt, da Patient 11 zum Zeitpunkt der CMV- Erkrankung im Robert-Bosch Krankenhaus in Stuttgart lag.

---

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Allgemeines**

Neue Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie von HCMV- Infektionen führten zu einer Abnahme der HCMV- assoziierten Morbidität und Mortalität nach Stammzelltransplantation (Hebart et al., 2000a). Noch immer aber stellt die Infektion mit dem Cytomegalievirus eine der Hauptursachen für infektionsbedingte Todesfälle bei allogenen stammzelltransplantierten Patienten dar (Einsele et al., 2001). Auch mittels Kombinationstherapie bestehend aus Ganciclovir und CMV-Immunglobulin ließ sich bisher die Mortalitätsrate bei interstitieller HCMV-Pneumonie nicht unter 30-50% senken (Osarogiagbon et al., 2000). Aufgrund der hohen Letalität der HCMV-Erkrankung muss der Ausbruch der Erkrankung zu verhindern versucht werden. Dazu stehen derzeit mit der Prophylaxe auf der einen Seite, und der frühinterventionellen Behandlung auf der anderen Seite zwei Therapiestrategien zur Verfügung (Einsele et al., 2001). Die frühinterventionelle, auch präemptiv genannte Therapie, wird erst nach Detektion des Erregers eingeleitet. Um das Auftreten einer HCMV-Erkrankung zu verhindern sind demnach schnelle, spezifische und sensitive Nachweismethoden nötig (Hebart et al., 1996).

### **4.2 Diagnostik**

#### **4.2.1 Nachweismethoden in der Routinediagnostik zur Einleitung einer präemptiven Therapie**

Folgenden Anforderungen sollte ein optimaler Assay zum Nachweis von HCMV genügen: Zu den wichtigsten Eigenschaften einer Nachweismethode gehören eine hohe Spezifität und Sensitivität, die eine frühzeitige Detektion des Virus bei

---

Risikopatienten erlaubt. Quantitative Nachweismethoden geben zusätzlich die Möglichkeit, den positiven prädiktiven Wert zu verbessern und anhand des Verlaufs der Viruslast den Erfolg der Therapie zu überwachen. Eine schnelle Durchführbarkeit des Tests ist notwendig, um eine frühzeitige Therapieeinleitung und gegebenenfalls Änderungen in der Medikation zu gewährleisten (Boeckh & Boivin, 1998a).

Im Folgenden sollen die gebräuchlichsten Methoden miteinander verglichen werden. Breite Anwendung auf dem Gebiet des HCMV-Monitoring finden derzeit der shell- vial- Culture- Assay, der Hybrid- Capture- Assay, der pp65-Antigenämietest und verschiedene PCR-Verfahren (Avery et al., 2000).

Die konventionelle Viruskultur und auch die wesentlich schnellere shell- vial- Culture sind beides Verfahren, die eine relativ geringe Sensitivität aufweisen (Boeckh & Boivin, 1998a). Laut einer prospektiven Studie von Einsele et al. (1995) entwickelten 12-13% der untersuchten Patienten eine HCMV-Erkrankung bevor das Virus mittels Kultur nachgewiesen werden konnte. Mazzulli et al. (1999) verglichen die konventionelle Viruskultur und die shell-vial-Culture mit dem Hybride Capture Assay (Version 2.0) (HCA) und dem pp65-Antigenämie-Assay. Bezüglich der Sensitivität lieferte die Untersuchung folgende Ergebnisse: 43% und 46% für die beiden Kulturverfahren, 95% für den HCA, 94% für den pp65-Antigenämietest. Aufgrund dessen wurde die Viruskultur weitgehend durch neuere Methoden ersetzt (Boeckh & Boivin, 1998a).

Mit dem Hybrid-Capture-Assay steht ein quantitativer Test zur Verfügung, der die Vorteile einer einfachen, standartisierten und schnellen Durchführung bietet (Boeckh & Boivin, 1998a). Zusätzlich zu einer hohen Sensitivität verfügt der HCA mit 95%, im Vergleich zu 94% für den pp65-Antigenämietest, über eine gute Spezifität (Mazzulli et al., 1999; Thorner et al., 2002). Hebart et al. (2001) untersuchten die Tauglichkeit der zweiten Generation des Hybrid Capture Assays hinsichtlich seines Einsatzes in der frühen Diagnostik der HCMV-Infektion bei stammzelltransplantierten Patienten und in der

---

Verlaufsbeobachtung der Therapie bei diesem Patientenkollektiv. Der HCA wurde in dieser Studie einem in-house PCR Assay (Vollblut) gegenübergestellt. Die Konkordanz dieser beiden Methoden betrug 90.1%, auch der Detektionszeitpunkt der HCMV-Infektion war mit einem Median von 34 Tagen (HCA) gegenüber 35 Tagen (PCR) nach SCT vergleichbar. Der Hybrid-Capture-Assay war zu 98.9% spezifisch, für die in-house PCR betrug der Wert 100%. Die Sensitivität beider Verfahren war vergleichbar. Folglich ist der HCA ein geeignetes Verfahren, auf das sich die präemptive Therapie stützen kann, dies gilt sowohl für Patienten nach allogener SCT (Hebart et al., 2001), als auch für Empfänger eines soliden Transplantats (Aitken et al., 1999) und HIV-Patienten (Mazzulli et al., 1999).

Zahlreiche Studien belegen die Tatsache, dass der pp65-Antigenämietest gegenüber der Viruskultur wesentlich sensitiver ist (Boeckh & Boivin, 1998a; Mazzulli et al., 1999). Verglichen mit dem HCA liefert er vergleichbare Zahlen (Mazzulli et al., 1999; Thorner et al., 2002), ebenso verhält es sich im Vergleich zu PCR-Verfahren (Boeckh & Boivin, 1998a; Hebart et al., 1996). Seine Vorteile liegen darin, dass er in weniger als 6 Stunden Ergebnisse liefert und keine hochspezifischen Geräte für seine Durchführung nötig sind (Boeckh & Boivin, 1998a; Zaia, 2002). Nachteilig ist, dass die Proben zügig verarbeitet werden müssen, da sonst kein zuverlässiges Ergebnis resultiert. Außerdem ist die Durchführung nicht automatisierbar und birgt daher einen grossen Zeitaufwand (Boeckh & Boivin, 1998a). Die Interpretation des Tests ist betrachterabhängig und nicht standardisiert. Des weiteren muss eine ausreichende Zahl an Granulozyten vorhanden sein, damit der Test erfolgreich durchgeführt werden kann, dies limitiert seinen Einsatz direkt nach SCT und bei Patienten mit schwerer Neutropenie (Boeckh & Boivin, 1998a; Thorner, 2002). Von diesem Problem abgesehen, stellt der pp65-Antigenämietest jedoch ein zuverlässiges Verfahren da Risikopatienten auf HCMV zu screenen und den Therapieverlauf zu kontrollieren (Hebart et al., 1996).

Mittels PCR-Verfahren ist man heute in der Lage, selbst kleine Mengen an

---

viraler DNA in Patientenproben zu detektieren. In-house HCMV PCR- Assays wurden in vielen Zentren entwickelt. Da diese in den Protokollen und Ergebnissen sehr variabel sind (von Müller et al., 2002), ist es nur unter Vorbehalt möglich, Studienergebnisse basierend auf in-House PCR-Verfahren miteinander zu vergleichen (Boeckh & Boivin, 1998a). Ein Problem der qualitativen in-House PCR ist der niedrige positive prädiktive Wert dieser Assays. Flexman et al. veröffentlichten 2001 eine Studie, aus der hervorgeht, dass mehr als die Hälfte der durch ein qualitatives in-House PCR Verfahren ermittelten CMV-positiven Resultate im quantitativen COBAS Amplicor CMV Monitor Test unter der Schwelle von 400 Viruskopien/ml lagen. Dies zeigt, dass hoch sensitive Assays mit niedriger Spezifität die Gefahr einer Übertherapie für die Patienten bergen.

Der quantitative COBAS Amplicor CMV Monitor Assay (CMM) ist durch seine Detektionsgrenze, die bei 400 Kopien/ml Plasma liegt, etwas in seiner Sensitivität reduziert, dafür aber spezifischer bei der Prädiktion einer Erkrankung durch das Virus (Caliendo et al., 2000). Mehrere Veröffentlichungen bestätigen, dass das Auftreten einer HCMV-Erkrankung bei Viruslasten <400/ml sehr unwahrscheinlich ist (Caliendo et al., 2000; Humar et al., 1999; Cope et al., 1997; Roberts et al., 1998). Vorteile des Assays sind kleine Probenvolumina (200µl Plasma), geringer Zeitaufwand (4 beziehungsweise 6 Stunden für 12 bzw. 24 Proben) und eine automatisierte PCR mit einfacher Handhabung. Da Plasma als Probenmaterial verwendet wird, ist auch eine Untersuchung neutropener Patienten möglich (Caliendo et al., 2000). Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren wie beispielsweise Heparin, kann mittels Koamplifizierung einer internen Kontrolle nachgewiesen werden (Boeckh & Boivin, 1998a). Durch das standardisierte Protokoll des CMM können nun Studienergebnisse verschiedener Labore miteinander verglichen und der optimale Cut off für die unterschiedliche Patientenkollektive ermittelt werden (Caliendo et al., 2000). Zusammenfassend steht mit der quantitativen PCR mittels COBAS Amplicor CMV Monitor Test ein geeignetes, sensitives und spezifisches diagnostisches Verfahren zur präemptiven Therapieeinleitung und Therapiemonitoring zur Verfügung, deren Viruslasthöhe im Plasma ein guter Prädiktor der HCMV-

---

Erkrankung ist (Rollag et al., 2002). Der Test ist derzeit lediglich für die Forschung zugelassen.

Eine quantitative Real-Time PCR lässt sich mittels LightCycler- Instrument durchführen. Pang et al. (2003) sowie Razonable et al. (2001) beschrieben eine gute Korrelation der Resultate von CMM und LightCycler (LC). Vor allem in Bereichen niedriger Viruslasten zeigte der LC eine höhere Sensitivität als der CMM (Pang et al., 2003), außerdem ist er in der Lage, auch sehr hohe Viruslasten zuverlässig zu erfassen. Der LightCycler- Assay zeichnet sich zusätzlich durch eine höhere Probenanzahl pro Lauf aus (36 statt 24 im CMM), er ist zeit- und kosteneffektiv (Schaade et al., 2000).

Im Median liegt der erste durch den Hybrid Capture-Assay sowie durch PCR ermittelte HCMV-positive Befund bei 35 Tagen (Hebart et al., 2001; Einsele et al., 1995), wohingegen der Median beim pp65-Antigenämietest und der shell-vial-culture bei 42 Tagen liegt (Boeckh et al., 1997). Da die HCMV-Pneumonie im Median 50-60 Tagen nach SCT auftritt, bieten die beiden erstgenannten Verfahren eine längere Zeitspanne zwischen dem ersten positiven Befund und dem Ausbruch der HCMV-Pneumonie (Zaia, 2002).

#### **4.2.2 Vergleich COBAS Amplicor CMV Monitor versus pp65-Antigenämietest**

Anhand 153 parallel im COBAS Amplicor CMV Monitor und pp65-Antigenämietest untersuchten Patientenproben wurde die Konkordanz der beiden Verfahren ermittelt. Dabei durfte die Datierung der jeweils miteinander verglichenen Proben nicht mehr als einen Tag differieren. Die beiden Testverfahren lieferten in 130 von 153 Proben ein übereinstimmendes Ergebnis, dies entspricht einer Gesamtkonkordanz von 85%. Untergliedert in eine Übereinstimmung für positive Resultate ergibt sich eine Konkordanz von 80.6%, 86.1% betrug die Konkordanz für negative Resultate in beiden Nachweismethoden.

23 von 153 Proben waren diskordant im Resultat. 6 der untersuchten Proben

---

zeigten ein positives Ergebnis im CMM und blieben im Antigenämietest negativ. Die Viruslasten dieser 6 Proben lagen zwischen 797 und 7870 Kopien/ml, im Mittel waren es 2433 Viruskopien/ml Plasma. Die anderen 17 Proben lieferten im Antigenämietest ein positives Resultat, bei 6 der Proben wurde im CMM keine Viruslast detektiert, in den restlichen 11 wurden geringe Viruslasten nachgewiesen, welche allerdings unter der Schwelle von 400 Kopien/ml Plasma lagen.

Pellegrin et al. (1999) ermittelten mit einer Konkordanz von 88% zwischen dem COBAS Amplicor CMV Monitor Test und pp65- Antigenämieassay bei HIV-infizierten Patienten ein vergleichbares Ergebnis. Außerdem zeigten sie, dass die überwiegende Anzahl an diskordanten Resultaten mit einer niedrigen Viruslast des positiven Tests einherging. Auch verschiedene andere Autoren berichten über eine gute Korrelation der beiden Verfahren (Rollag et al., 2002; Caliendo et al., 2000 und 2002; Piiparinen et al., 2002). Flexman et al. (2001) zeigten in einer Studie, dass diskordante Resultate in den beiden Testmethoden jedoch nicht immer im Bereich niedriger Viruslasten angesiedelt sind, und nicht immer eine Neutropenie vorliegen muss, um ein negatives Testergebnis im Antigenämietest bei hoher Viruslast im CMM zu erhalten. So entwickelte in Ihrer Studie ein nicht-neutropener Patient Viruslasten von 43.000 Kopien/ml, zeigte aber negative Befunde im Antigenämietest. Hieraus folgt, dass Veränderungen der Viruslast nicht zwangsläufig parallel in den beiden Assays verlaufen, es zeigt aber auch, dass sich die beiden Nachweismethoden gut ergänzen (Flexman et al., 2001).

Die Sensitivität des CMM und des pp65-Antigenämietests bezogen auf die Detektion einer HCMV-Infektion (mindestens einer der beiden Testverfahren lieferte ein positives Ergebnis) betrug für den CMM 64,6% (31 Proben waren im CMM positiv, 48 Proben in mindestens einem der beiden Testverfahren), für den Antigenämietest 87,5% (42/48 Proben). Bei beiden Patienten, die eine symptomatische HCMV-Erkrankung im Sinne einer HCMV-Pneumonie entwickelten, wurde vor, beziehungsweise zeitgleich mit dem Ausbruch der Erkrankung mit beiden Methoden eine HCMV-Infektion diagnostiziert. Wären im CMM auch die Proben mit einer Extinktion unter 0.200 als positiv berücksichtigt

---

worden, die die Schwelle von 400 Kopien/ml überschritten, so wären 10 weitere Patientenproben im CMM positiv geworden. Zu erwähnen ist hier besonders einer der beiden symptomatischen Patienten, der im CMM erst einen Tag vor Diagnose der HCMV-Pneumonie ein HCMV-positives Ergebnis zeigte. Dieser wäre bereits eine Woche früher therapiert worden, sofern lediglich der Cutt-off von 400 Kopien/ml entscheidend für das Testergebnis wäre. Die Sensitivität des CMM ließe sich also entscheidend verbessern, würden auch Proben ab 400 Viruskopien/ml Plasma mit einer Extinktion  $<0.200$  als positiv gewertet. Der Verlauf des obengenannten Patienten zeigt, dass diese Überlegung nicht rein theoretischer Natur ist, sondern entscheidend für Patienten mit hohem Risiko eine HCMV-Erkrankung zu entwickeln sein könnte.

Von Müller et al. (2002) zeigten entsprechend in einer multizentrischen Studie, dass der Antigenämie-Assay mit einem höheren Prozentsatz an positiven Ergebnissen einhergeht. Begründet wird dies damit, dass der COBAS Amplicor CMV Monitor Test anhand von Plasmaproben, der pp65-Antigenämietest dagegen direkt in Blutzellen durchgeführt wird. Auch Boivin et al. (2000) postulieren eine höhere Sensitivität von Leukozyten-basierten Testverfahren, ob es sich nun um den pp65-Antigenämietest oder um einen Leukozyten-basierten quantitativen PCR Test mittels COBAS Amplicor CMV Monitor handelt, verglichen mit dem CMM-Test in Plasma. Ähnliche Untersuchungsergebnisse beschreiben Pellegrin et al. (1999).

Der COBAS Amplicor CMV Monitor zeigte jedoch im Vergleich mit dem Antigenämietest eine höhere Spezifität (Pellegrin et al., 1999; Tong et al., 1998). Mit der festgelegten Detektionsgrenze von 400 Viruskopien/ml ist das Design des CMM-Assays von vornherein auf eine reduzierte Sensibilität zugunsten einer erhöhten Spezifität ausgelegt. Dadurch ist der CMM in mehreren Studien als geeigneter als der Antigenämietest befunden worden, die Entstehung einer HCMV-Erkrankung vorherzusagen (Caliendo et al., 2000 ; Pellegrin et al., 1999). Dem Antigenämietest wird andererseits in verschiedenen Veröffentlichungen aufgrund seiner höheren Sensitivität bei Patientenkollektiven mit eher niedrigen Viruslasten, wie Patienten unter antiviraler Therapie und SCT- Patienten im Allgemeinen, der Vorzug gegeben (Pellegrin et al., 1999;

---

Boeckh & Boivin, 1998a). Andere weisen jedoch auf die Tatsache hin, dass der Antigenämietest bei neutropenen Patienten nicht durchführbar und daher für stammzelltransplantierte Patienten vor dem Engraftment untauglich ist (Masaoka et al., 2001; St. George et al., 2000; Zaia , 2002; Thorner, 2002).

GRAFIKEN! (siehe Flexman et al., 2001)

#### **4.2.3 Eignung des COBAS Amplicor zur Routinediagnostik und Zukunftsperspektiven**

Zusammenfassend lassen die obengenannten Ergebnisse darauf schließen, dass mit dem Cobas Amplicor CMV Monitor ein Gerät zur Verfügung steht, welches für präemptive Diagnostik und Therapiesteuerung bei Risikopatienten geeignet ist. Dies bestätigen zahlreiche Untersuchungen (Pellegrin et al., 1999; Rollag et al., 2002; Caliendo et al., 2000; Piiparinen et al., 2002; Masaoka et al., 2001). Es könnte allerdings von Vorteil sein, die Sensitivität des Geräts zu verbessern, indem die Software des COBAS Amplicor dahin gehend umprogrammiert würde, dass auch Proben mit einer Extinktion kleiner 0.200 aber Viruslasten größer 400, als positiv gewertet würden. Dies hätte möglicherweise einen der zwei später erkrankten Patienten vor dem Ausbruch der Pneumonie bewahrt, da er so eine Woche früher therapiert worden wäre, statt erst am Tag vor Diagnosestellung. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema sind nötig, um das Risiko, eine Erkrankung ohne vorausgehende DNAämie zu entwickeln, gegen das Risiko einer Übertherapie abwägen zu können.

In Zukunft könnte durch eine Kombination des MagNA Pure Extraktionsgerätes mit dem LightCycler anstelle des COBAS Amplicor weiter Zeit sowie Kosten eingespart werden.

---

#### 4.2.4 Bedeutung der Viruslastfassung

HCMV-Disseminierung im Blut, sprich Virämie, ist laut zahlreicher Veröffentlichungen der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung (Meyers et al., 1990; Boeckh & Boivin, 1998a).

Die Mehrzahl aller Patienten mit symptomatischer HCMV-Erkrankung zeigen signifikant höhere Viruslasten im Vergleich zur asymptomatischen Kontrollgruppe. Dies gilt sowohl für Organtransplantierte Patienten (Fox et al., 1995; Cope et al., 1997; Roberts et al., 1998; Aitken et al., 1999), HIV-infizierte Patienten (Shinkai et al., 1997; Bowen et al., 1997; Rasmussen et al., 1997), als auch für Patienten nach Stammzelltransplantation (Gor et al., 1998; Boeckh & Boivin, 1998a; Limaye et al., 2001). Gor et al. (1998) zeigten an SCT-Patienten, dass das Risiko einer HCMV-Erkrankung bei Viruslasten unter  $10^{3.5}$  (3162) Kopien/ml weniger als 10% beträgt, dieses mit einem Anstieg der Viruslast auf  $10^5$  (100000) Kopien/ml aber auf etwa 80% ansteigt. Folglich spielt die Quantifizierung der Viruslast eine bedeutende Rolle, um das Risiko der Entstehung einer HCMV-Erkrankung bereits im Vorfeld abschätzen zu können (Meyers et al., 1990; Boeckh & Boivin, 1998a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die initiale Viruslast, der Viruslastpeak, und die Kinetik der Viruslasten im Laufe der ersten Therapiewoche von 12 Patienten untersucht, die laut Studienprotokoll der Valganciclovirstudie behandelt wurden. Ziel dieser Untersuchung war, bereits zu einem frühen Zeitpunkt, sprich innerhalb der ersten Woche nach Auftreten einer HCMV-Infektion, Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer manifesten Erkrankung anhand der obengenannten Parameter herauszufiltern. Anhand des Viruslastverlaufs wurden die Patienten in vier Gruppen aufgeteilt, bei 2 der 12 Patienten (16.66%) konnte eine vollständige HCMV-Clearance innerhalb der ersten Therapiewoche beobachtet werden, ebenfalls 2 Patienten (16.66%) zeigten eine sinkende Viruslast in diesem Zeitraum. 3 weitere Patienten (25%) blieben mit ihrer Viruslast auf konstantem Niveau, 5 Patienten (41.66%) stiegen während der ersten Therapiewoche mit der Viruslast an. Beide Patienten, die eine manifeste HCMV-Erkrankung entwickelten, befanden sich in der Gruppe

---

mit steigender Viruslast.

Sämtliche Patienten aus den beiden erstgenannten Gruppen zeigten eine initiale Viruslast die gleichzeitig dem Viruslastpeak entsprach. Vergleicht man nun die Höhe der initialen DNAämie der 4 Gruppen, so war diese bei Patienten mit steigender Viruslast mit im Mittel 5180 Kopien/ml um das Doppelte höher als diejenige der drei ersten Gruppen mit 2514 Genomäquivalenten/ml.

Betrachtet man die Werte der Maximalviruslasten, so lagen diese in den drei ersten Gruppen, in denen sich ausschließlich asymptomatische Patienten befanden, bei 3325 Kopien/ml. Dagegen bildeten die Patienten der letzten Gruppe im Laufe der ersten Therapiewoche Maximalviruslasten aus, die im Mittel mit 26322 Kopien/ml um ein 8 faches höher waren. 2 von diesen 5 Patienten, also 40% der Patienten mit steigender Viruslast, erkrankten an einer HCMV-Pneumonie.

Da aufgrund der kleinen Patientenzahlen hier ohnehin nur Tendenzen beschrieben werden konnten, wurde auf eine Berechnung der Signifikanz der Resultate verzichtet.

Verschiedene Studien kamen jedoch zu vergleichbaren Ergebnissen: Rollag et al. (2002) beschrieben eine signifikante Assoziation der initialen Viruslast mit einer HCMV-Erkrankung bei SOT-Patienten. In dieser Studie lagen 83% der manifest erkrankten Patienten mit der Anfangsviruslast über 3000 Kopien/ml, aber nur 14% der asymptomatischen Kontrollpersonen. Auch Emery et al. (2000) zeigten für SCT- und SOT-Patienten eine Korrelation der Anfangsviruslast mit der HCMV-Erkrankung, des weiteren konnten sie zeigen, dass ein Anstieg der Viruslast signifikant mit dem Auftreten einer manifesten Erkrankung assoziiert war. Verschiedene Autoren beschrieben außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe des Viruslastpeaks und dem Ausbruch einer Erkrankung durch das Cytomegalievirus (Emery et al., 2000; Limaye et al., 2000; Humar et al., 1999; Gor et al., 1998). Die Ergebnisse von Gor et al. (1998) bezüglich der Maximalviruslasten von SCT-Patienten zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Daten, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden: Der Viruslastpeak der Patienten mit symptomatischer HCMV-Erkrankung betrug hier ebenfalls das 8- fache dessen der asymptomatischen

---

Kontrollgruppe. Laut dieser Studie steigt das Risiko eine HCMV-Erkrankung zu entwickeln bei einem Viruslastpeak von  $10^4$  Kopien/ml um nahezu das 6.5 fache an, liegt der Peak bei  $10^5$ , so erhöht sich das Risiko bereits um das 10 fache.

Der Beobachtung von Emery et al. (2000), dass zwar eine Korrelation zwischen Maximalviruslast und einer HCMV-Erkrankung besteht, dieser Peak aber häufig zu spät auftritt um noch von prognostischem Nutzen zu sein, kann man durch diese Untersuchung entgegenstellen, dass neben der Anfangsviruslast und dem Verlauf der DNAämie bereits der Viruslastpeak innerhalb der ersten Woche der Therapie eine Risikoabschätzung bezüglich des weiteren Verlaufs möglich zu machen scheint.

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Frage, welcher Cut-off für welches Patientenkollektiv im Hinblick auf die Sensitivität, Spezifität, den positiven und negativen prädiktiven Wert des jeweiligen Testverfahrens ein optimales Niveau beinhaltet, um Übertherapie zu vermeiden und dennoch alle Hochrisikopatienten durch Einleitung einer präemptiven Therapie vor dem Ausbruch einer HCMV-Erkrankung zu schützen.

Für HIV-Patienten postulierten Pellegrin et al. (1999) eine der Detektionsgrenze von 400 Viruskopien/ml entsprechenden Cut-off. Die Spezifität, Sensitivität, PPV und NPV des CMM betragen für diesen Cut-off 92.3%, 86.7%, 66.7%, 97.5%.

Für lebertransplantierte Patienten erreichte das selbe Gerät bei einem Cut-off von 400 Kopien/ml eine Sensitivität von 100%, Spezifität von 47.4%, PPV von 34.4% und NPV von 100%. Der optimale Cut-off für dieses Patientenkollektiv wurde von Humar et al. (1999) im Bereich von 2000-5000 Kopien/ml ermittelt (Sensitivität 85.7%, Spezifität 86.8%, PPV 64.3%, NPV 95.7% für >5000 Kopien/ml). Caliendo et al. (2002) bestätigten den von Humar et al. postulierten Cut-off an einem gemischten Transplantations-Patientenkollektiv.

Bei SCT-Patienten werden wesentlich niedrigere Cut-off Werte diskutiert, da diese Patienten geringere Viruslasten aufweisen als SOT-Patienten (Caliendo et al., 2002, Flexman et al., 2001). Limaye et al. (2001) schlagen hier einen

---

Schwellenwert von 1000 Viruskopien/ml vor, gemessen mittels Plasma-PCR. Da jedoch bekannt ist, dass eine signifikante Anzahl an stammzelltransplantierten Patienten trotz einer niedrigen systemischen Viruslast eine HCMV-Erkrankung entwickelt (Boeckh & Boivin, 1998a; Gor et al., 1998; Boivin et al., 2000; Rollag et al., 2002), und vor allem HCMV-Pneumonien trotz Therapie mittels Ganciclovir und Immunglobulin noch immer mit einer hohen Mortalität assoziiert sind, fordern Boivin et al. (2000) bei diesem Patientenkollektiv einen Cut-off Wert auf möglichst niedrigem Niveau.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit initial niedriger DNAämie, die später eine HCMV-Erkrankung entwickelten, häufig vor Ausbruch der Erkrankung rapide ansteigende Viruslasten zeigten. Insbesondere trifft dies auf stark immunsupprimierte Patienten, beispielsweise mit schwerer GvHD, zu. Aus diesem Grund schlagen Einsele et al. (2000) und Boeckh & Boivin (1998a) zusätzlich zur Festlegung eines Cut-off Wertes vor, diese Hochrisikopatienten in kürzeren Zeitintervallen, beispielsweise zweimal wöchentlich, zu überwachen. Auch andere Autoren fordern neben der Festlegung eines Cut-offs die Entwicklung sogenannter risikoadaptierter Therapiestrategien, welche das spezifische Risikoprofil des einzelnen Patienten wie Grad der Immunsuppression und GvHD, miteinbeziehen (Mori et al., 2000; Flexman et al., 2001; Berger & Preiser, 2002; Rollag et al., 2002).

Neben der Identifizierung von Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung, gibt die Quantifizierung der Viruslast ebenfalls Auskunft über ein Ansprechen auf die antivirale Therapie, und dient als früher Indikator hinsichtlich antiviraler Resistenzentwicklung (Razonable et al., 2001). Da jedoch in einigen Studien ein Anstieg der Antigenämie bei 30% der SCT- und SOT-Patienten in den ersten drei Wochen nach Therapiebeginn mit Ganciclovir festgestellt wurde, ohne dass eine Resistenz gegen das Medikament bestand, ist ein Wechsel zu einer alternativen Therapie bei steigender Viruslast erst nach einem dreiwöchigen Therapieintervall indiziert (Boeckh & Boivin, 1998a; Gerna et al., 1998; Boeckh et al., 1996). Vergleichbar wurde auch ein initialer Anstieg der DNAämie unter Therapie beobachtet, wobei die Mechanismen dieser

---

Phänomene noch nicht klar sind.

Die aktive Replikation des HCMV ist mit einer Verdoppelungszeit von etwa einem Tag sehr schnell. Die Replikationsrate des Virus ist abhängig von etlichen Faktoren, wichtig ist hierbei die Qualität und Quantität der spezifischen Immunantwort des Patienten gegen das Virus. Ist diese ungenügend (beispielsweise bei SOT-Patienten mit einem R-/D+-Serostatus, oder bei einem SCT-Patienten mit R+/D-Serostatus), so kann die Replikation unkontrolliert und rapide von statten gehen (Emery et al., 2000). Diese dann entstehende hohe Viruslast vereinfacht die Selektion von resistenten, mutierten Viren (Limaye et al., 2002). Zu einem weiteren Selektionsvorteil für resistente Mutanten können folgende Faktoren beitragen: Unterbrechung der antiviralen Therapie, Bekämpfung des Virus mit suboptimaler Dosierung der antiviralen Substanzen entweder durch i.v.-Applikation zu niedriger Dosen oder aber Gabe von oralem Ganciclovir mit niedriger Bioverfügbarkeit, und langdauernde Therapie im Rahmen prophylaktischer Behandlungsstrategien (Limaye et al., 2002; Drew et al., 2001; Emery et al., 2001; Hebart et al., 1998). Die beiden letzten Punkte können zum einen durch präemptive statt prophylaktische Therapie, zum anderen durch die Einführung von oralem Valganciclovir mit einer hohen Bioverfügbarkeit, umgangen werden.

## **4.3 Therapiestrategien und Medikamente**

### **4.3.1 Prophylaxe**

Unter dem Terminus der prophylaktischen Therapie zur Prävention einer HCMV-Infektion versteht man die Verabreichung einer antiviralen Substanz vom Zeitpunkt des Engraftments bis zu Tag 100 nach SCT, beziehungsweise bis zum Zeitpunkt reduzierter Immunsuppression des Patienten (Zaia, 2002).

Trotz der Tatsache, dass Aciclovir und Valaciclovir in vitro nur geringe Effekte auf die Replikation des HCMV aufweisen, konnte in mehreren grossen Studien

---

nachgewiesen werden, dass diese Substanzen dennoch in der Lage sind, die Inzidenz der HCMV-Infektion zu senken und einen Überlebensvorteil zu erbringen (Prentice et al., 1994; Ljungman, 2002). Weiter zeigte Ljungman (2002), dass die prophylaktische Gabe von Valaciclovir in der Lage ist die Notwendigkeit einer präemptiven Anschlussbehandlung mit Ganciclovir oder Foscarnet um 50% zu verringern, was zu einem reduzierten Risiko bezüglich der Nebenwirkungen dieser weit toxischeren Medikamente führt.

Prophylaktisch verabreichtes, intravenöses Ganciclovir ist laut zweier randomisierter, doppelblinder, Placebo-kontrollierter Studien effektiv in der Prävention der HCMV-Erkrankung. Es reduzierte zwar die Inzidenz der HCMV-Infektion in beiden Studien, zusätzlich konnte die Inzidenz der HCMV-Erkrankung in einer der beiden Studien signifikant gesenkt werden, die Mortalitätsraten waren jedoch im Vergleich zu den Placebo-behandelten Kontrollgruppen in beiden Studien unverändert hoch (Goodrich et al., 1993; Winston et al., 1993). Zwei mögliche Gründe hierfür sind das vermehte Auftreten später HCMV-Erkrankungen, die durch die Ganciclovir-induzierte verzögerte Immunrestitution begünstigt werden, sowie das Entstehen von medikamenteninduzierten Neutropenien, welche gehäuft zur Entwicklung opportunistischer Infektionen führen (Ljungman, 2002).

Boeckh et al. (1998b) testeten den Einsatz von oralem Ganciclovir bezüglich seiner Eignung als prophylaktische Präventionmaßnahme, die resultierende Infektionsrate war jedoch hoch.

Valganciclovir, welches bei oraler Gabe eine hohe Bioverfügbarkeit besitzt, ist bislang lediglich zur Prophylaxe und Behandlung der HCMV- Retinitis bei HIV-Patienten zugelassen (Cocohoba & McNicholl, 2002; Lalezari et al., 2002; Curran & Noble, 2001; Brown et al., 1999). Es zeigte sich aber auch bei SOT-Patienten in einer Phase III- Studie gleichwertig mit oralem Ganciclovir in der Prävention der HCMV-Erkrankung (Akalin et al., 2003). Paya et al. (2004) beobachteten in einer prospektiven Studie an SOT- Patienten eine dem oralen Ganciclovir gleichwertige Effektivität und Tolerabilität, die Inzidenz von medikamentös induzierter Neutropenie war unter Therapie mit VGCV mit 8.2% höher als unter GCV oral (3.2%), jedoch fanden unter oralem GCV mehr akute

---

Transplantatabstossungen statt. Bei vergleichbarem Sicherheitsprofil und Kosten von VGCV und GCV oral bietet Ersteres die Vorteile, dass eine einmalig Gabe pro Tag genügt, und bisher unter VGCV im Gegensatz zu GCV oral keine Resistenzentwicklung beobachtet werden konnte (Pescovitz, 2003). Boivin et al. (2004) postulieren daher, dass durch die einfache Handhabung des VGCV die Compliance der Patienten verbessert werden wird, was wiederum das Risiko der Entwicklung von Resistenzen senkt. Eine abschließende Bewertung des Medikaments an SCT- Patienten steht noch aus.

Obwohl Foscarnet bereits in einigen Studien auf seine prophylaktische Eignung getestet wurde und effektiv in der Inhibition der HCMV-Replikation ist, stehen keine Daten aus diesen Untersuchungen zu Überlebensraten zur Verfügung (Ljungman et al., 2002).

Die Erkrankungsrate durch HCMV liegt bei Hochrisikopatienten um 30%. Durch eine Anwendung der prophylaktischen Therapiestrategie bei allen Risikopatienten würden demnach etwa 70% unnötig einer Therapie ausgesetzt, die unter Umständen lebensbedrohliche Nebenwirkungen verursacht, und das Risiko der Entwicklung von Resistenzen birgt. Infolge dessen wurden grosse Anstrengungen unternommen um frühinterventionelle Therapiestrategien zu evaluieren, die sich nun immer mehr durchsetzen (Boeckh & Boivin, 1998a; Avery et al., 2000).

#### **4.3.2 Präemptive Therapie**

Unter frühinterventioneller oder präemptiver Therapie versteht man die Einleitung einer antiviralen Therapie auf der Grundlage eines positiven HCMV-Laborbefunds. Seit Goodrich et al. (1991) mittels präemptiver Therapie basierend auf den shell- vial-Test zeigen konnten, dass diese Strategie die Inzidenz der HCMV-Erkrankung reduziert und einen Überlebensvorteil bietet, hat sich diese Therapieform bei SCT-Patienten mehr und mehr etabliert (Avery et al., 2000; Ljungman et al., 2002). Vorteil dieser Strategie ist, dass nur Höchststrisikopatienten eine antivirale Therapie bekommen, ihr Nachteil liegt darin, dass manche Patienten eine HCMV-Erkrankung entwickeln, bevor dies

---

durch einen positiven Laborbefund erkennbar wird. Dieses Risiko lässt sich durch sensitivere Nachweismethoden verringern. Einsele et al. (1995) konnten mittels PCR-basierter präemptiver Therapie mit Ganciclovir im Vergleich zur Schnellkultur die Inzidenz der HCMV- Erkrankung sowie die HCMV-assoziierte Mortalität bei verkürzter Therapiedauer weiter senken. Boeckh et al. (1996) wiesen für eine Antigenämie- basierte präemptive Ganciclovir- Therapie eine vergleichbare Effektivität in der Prävention der HCMV- Erkrankung nach, wie für eine generelle Prophylaxe mit Ganciclovir: letztere war zwar effektiver in der Prävention während der ersten 100 Tage nach SCT, führte nach diesem Zeitraum aber gehäuft zum Auftreten von späten HCMV-Erkrankungen, Ganciclovir-assoziierten Neutropenien und invasiven Pilzinfektionen. Sowohl Einsele et al. (1995) als auch Boeckh (1999) zeigten, dass mit der Einführung sensitiverer Nachweismethoden die Resultate der präemptiven Therapie auch im Bezug auf die Inzidenz der Ganciclovir- assoziierten Nebenwirkungen verbessert werden konnten. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass der Therapiebeginn zu einem frühen Zeitpunkt der HCMV-Infektion die Therapiedauer zu limitieren vermag (Reusser et al., 2002).

Foscarnet besitzt im Vergleich zu Ganciclovir eine äquivalente Wirksamkeit in der präemptiven Therapie. Unter Foscarnet traten weniger Neutropenien auf, die Nephrotoxizität der beiden Medikamente war vergleichbar, sofern die Patienten im Foscarnet- Studienarm intravenös hydriert wurden und eine regelmäßige Serumelektrolytkontrolle durchgeführt wurde (Moretti et al., 1998; Reusser et al., 2002).

Des Weiteren steht mit Cidofovir eine effektive Alternative im Sinne einer second- line Therapie zur Verfügung, dessen Ansprechrate 66% beträgt, wenn mit Ganciclovir oder Foscarnet kein Erfolg erzielt werden konnte ( Ljungman, 2002).

Valganciclovir ist momentan in der Erprobungsphase für den Einsatz in der präemptiven Therapie bei SOT- und SCT- Patienten. Wird die Wirksamkeit und Sicherheit des Medikaments auch für diese Patienten bestätigt, könnte die Substanz in Zukunft den Platz des oralen und intravenösen Ganciclovirs in der Prophylaxe und Frühintervention einnehmen. Laufende Studien, in denen der

---

Einsatz des VGCV getestet wird, liefern vielversprechende Ergebnisse. Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie zum Einsatz des VGCV in der präemptiven Therapie nach Stammzelltransplantation erhoben, deren Gesamtergebnisse noch nicht veröffentlicht wurden. Anhand des in Tübingen untersuchten verhältnismäßig kleinen Patientenkollektivs kann keine abschließende Beurteilung des Valganciclovirs hinsichtlich Effektivität und Sicherheit erfolgen. Um die Gleichwertigkeit von VGCV und GCV zu bestätigen, die auch aufgrund der hier erhobenen Daten angenommen werden kann, bleibt die Veröffentlichung des Gesamtergebnisses aus den 5 Zentren abzuwarten.

Über die optimale Dauer der präemptiven Therapie besteht noch kein Konsens. Die beiden meist verfolgten Strategien sind zum einen die Fortsetzung der Therapie bis zum Tag 100 nach SCT, was meist eine 6- 8 Wochen dauernde Therapie bedeutet, zum anderen die Beendigung der Therapie sobald ein negativer Laborbefund ermittelt wurde (Ljungman, 2002). Einsele et al. (1995) beschrieben den auf einer negativen PCR basierenden Therapieabbruch als sicher, da daraufhin kein Rückfall beobachtet werden konnte. Betrug die Dauer der präemptiven Therapie jedoch länger als vier Wochen, so stieg laut einer Studie von Einsele et al. (2000) das Risiko für das Auftreten von late-onset Erkrankungen, als auch für opportunistische Infektionen, an.

## **4.4 Klinik**

### **4.4.1 Risikofaktoren für eine HCMV- Infektion**

Das Risiko für eine HCMV- Infektion nach Stammzelltransplantation ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Ein wesentlicher Risikofaktor ist der HCMV- Serostatus des Donors (D), sowie des Recipienten (R) vor Transplantation. Das niedrigste Risiko besteht für seronegative Empfänger

---

eines seronegativen Transplantats (R-/D-). Sofern diese nur HCMV- negative oder leukozytenfreie Blutprodukte erhalten ist eine Infektion unwahrscheinlich (Zaia, 2002; Einsele et al, 2001). Steht jedoch nur ein seropositiver Spender zur Verfügung (R-/D+), so steigt das Risiko für die Entwicklung einer HCMV- Infektion bereits auf 20-40% an. Ist der Patient nun HCMV- positiv vor Transplantation (R+/D- oder R+/D+), so wird das Risiko mit 75% angegeben (Ljungman, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von 59 Patienten nach allogener SCT deren HCMV- Serostatus entweder R+/D-, R-/D+ oder R+/D+ war, eine Risikofaktorenanalyse hinsichtlich einer frühen HCMV- Infektion (bis Tag 100 nach SCT) durchgeführt. Dabei konnte die HCMV- Serologie als Risikofaktor bestätigt werden. Das höchste Risiko eine HCMV- Reaktivierung durchzumachen hatten HCMV- positive Empfänger eines HCMV- positiven Transplantats (Häufigkeit: 61.29%), gefolgt von HCMV- positiven Empfängern eines HCMV- negativen Transplantats (Häufigkeit: 40%). Das kleinste Risiko bestand für HCMV- negative Empfänger eines HCMV- positiven Transplantats mit einer Häufigkeit von 7.69%. Dies ergab die Analyse mittels backward selection.

Noch immer ist umstritten, ob die Transplantation eines seropositiven Empfängers mit einem seropositiven Transplantat wegen der Übertragung der aktiven Spenderimmunität einen Benefit für den Patienten darstellt. Studien zum Thema Spenderserologie lieferten bislang kontroverse Resultate, daher weisen Boeckh & Nichols (2004) auf die Notwendigkeit hin, dieser Frage in einer grossangelegten Studie auf den Grund zu gehen.

Laut univariater Analyse, multivariater Analyse und backward selection hatten diejenigen der 59 Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation älter als 40 Jahre waren, ein signifikant erhöhtes Risiko eine HCMV- Reaktivierung, beziehungsweise - Infektion durchzumachen. Bacigalupo et al. (1995) kommen zu einem vergleichbaren Ergebnis, während Osarogiagbon et al. bei Kategorien von kleiner 18 und grösser 18 Jahren, kein signifikantes Niveau erreichten.

Als drittes wurde die HLA- Inkompatibilität als Risikofaktor ermittelt, wobei aufgrund einer zu geringer Patientenzahl in der Risikogruppe keine multivariate

---

Analyse möglich war. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen aber, dass Unterschiede in den HLA- Merkmalen von Spender und Empfänger auch in Bezug auf eine HCMV- Infektion eine Risikokonstellation darstellt (Einsele et al., 2001; Moretti et al., 1998; Okada et al., 1998).

Weder Geschlecht, Spendertyp (Fremdspender versus familiärer Spender), Art der SCT (KMT versus PBSCT), akute GvHD, medikamentöse in vivo T- Zell- Depletion, noch Art der Konditionierung (non- myeloablative versus myeloablative) erreichten in der Risikofaktorenanalyse ein signifikantes Niveau.

Je nach Patientenkollektiv variiert die Konstellation der ermittelten Risikofaktoren in den verschiedenen Studien erheblich. Zusätzlich zu den obengenannten Patienten- oder Transplantationscharakteristika werden häufig folgende Risikofaktoren für die Entstehung einer HCMV- Infektion diskutiert: Transplantate eines unverwandten Spenders (Einsele et al., 2001; Osarogiagbon et al., 2000; Okada et al., 1998), akute GvHD Grad II-IV (Matthes-Martin et al., 2003; Osarogiagbon et al., 2000; Moretti et al., 1998; Okada et al., 1998; Bacigalupo et al., 1995; Meyers et al., 1986), medikamentöse in vivo T- Zell- Depletion (Zaia, 2002; Einsele et al., 2001; Okada et al., 1998; Bacigalupo et al., 1995), und Selektion von CD34<sup>+</sup>- Stammzellen (Nachbaur et al., 2003; Zaia et al., 2002; Hebart et al., 2001a). Hinsichtlich der Art der Konditionierung (myeloablative versus non-myeloablative Konditionierung) sind die Resultate verschiedener Studien noch sehr kontrovers. Die Hypothese, dass Transplantationen nach non-myeloablative Protokollen durch eine frühere Immunrestitution vor Infektionskomplikationen schützen, konnte nicht bestätigt werden. Laut Nachbaur et al. (2003) steigt das Risiko für eine HCMV- Infektion mit reduzierter Intensität der Konditionierung sogar an, Schetelig et al. (2003) Daly et al. (2003), und Zaia (2002) fanden keinen Unterschied bezüglich der HCMV- Infektion zwischen den beiden Gruppen non- myeloablative versus myeloablative.

---

#### 4.4.2 Risikofaktoren für die Entwicklung einer HCMV- Erkrankung

Die Inzidenz einer HCMV- Erkrankung für Risikopatienten nach allogener SCT, die im Falle einer DNA- beziehungsweise Antigenämie mittels präemptiver Therapie behandelt wurden, wird je nach Veröffentlichung mit 3.9-19% angegeben (Machado et al., 2000; Mori et al., 2000; Ljungman et al., 1998; Moretti et al., 1998; Gor et al., 1998). In der vorliegenden Untersuchung liegt die Inzidenz der Erkrankung bei 3.4% (2 von 59 untersuchten Patienten), die Progressionsrate (2 von 26 Patienten mit DNAämie entwickelten eine HCMV- Erkrankung) betrug 7.7%. Einsele et al. (2000) veröffentlichten mit einer Inzidenz von 3.0% vergleichbare Ergebnisse. Diese Zahlen sprechen für das hier verwendete präemptive Therapieschema.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich mit der Frage, welches die Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer manifesten early-onset HCMV- Erkrankung sind. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die Viruslast des Patienten. Diese korreliert mit dem Risiko, eine Erkrankung durch das Virus zu entwickeln, dies gilt sowohl für HIV- infizierte Patienten als auch für Patienten nach SCT und SOT (Berger & Preiser, 2002; Boeckh & Boivin, 1998; Gor et al., 1998). Emery et al. (2000) identifizierten den Viruslastpeak, die Höhe der initialen Viruslast und die Wachstumsrate des Virus als Hauptrisikofaktoren. Einigen Autoren zufolge, spielt der Serostatus des Transplantatspenders ebenfalls eine wichtige Rolle als Risikofaktor (Matthes-Martin et al., 2003): Gor et al. (1998) und Gratama et al. (2001) fanden bei seropositiven Patienten mit einem seronegativen Spender eine signifikant höhere Inzidenz der Antigenämie und der HCMV- Erkrankung, sowie eine höhere Viruslast. Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen akuter GvHD und der HCMV- Erkrankung postuliert (Matthes-Martin et al., 2003, Thorner, 2002; Mori et al., 2000). Auch T- Zell- Depletion scheint eine Rolle zu spielen (Zaia, 2002; Mori et al., 2000). Hebart et al. (2001) sowie Ljungman et al. (1998) weisen auf ein erhöhtes Risiko für Transplantatempfänger eines unverwandten Spenders im Hinblick auf die Entwicklung einer HCMV- Erkrankung hin. Schließlich wird auch noch ein Einfluss des Alters des Patienten diskutiert (Zaia, 2002; Ljungman et al., 1998).

---

Von den 59 Patienten dieser Untersuchung erkrankten 2 Patienten an einer HCMV- Pneumonie. Diagnosekriterien waren typische Infiltrate im CT und eine HCMV- positive BAL. Einer der Patienten hatte einen R+/D- Serostatus, der andere war R+/D+ für HCMV. Beide Patienten litten an einer akuten GvHD Grad II, waren mittels ATG in vivo T- Zell- depletiert und hatten eine myeloablative Therapie mittels CYC/TBI hinter sich. Beide wurden im Studienarm B (siehe S. 21) behandelt. Bei beiden wurde vor Diagnosestellung der Pneumonie Viruslast detektiert, bei einem jedoch erst einen Tag zuvor (aufgrund der Nichtberücksichtigung von Proben mit einer Viruslast größer 400 aber einer Extinktion kleiner 0.200 durch den COBAS Amplicor). Dieser Patient hatte eine hohe Anfangsviruslast mit 9720 Kopien/ml und einen hohen Viruslastpeak im Laufe der ersten Woche bei 59400 Kopien/ml, während der andere nur 1170 Kopien/ml initial aufwies, mit einem Peak in der ersten Therapiewoche von 3810 Kopien/ml. Beide Patienten zeigten jedoch im Verlauf einen kontinuierlichen Anstieg der Viruslast.

Die kleine Anzahl an symptomatischen Patienten erlaubt keine abschließende Bewertung der Risikofaktoren für eine HCMV- Erkrankung an diesem Patientenkollektiv, sie erlaubt jedoch die Aussage, dass die präemptive Therapie basierend auf einer sensitiven Nachweismethode mit nachfolgender adäquater Therapie in der Lage ist, den Patienten den erforderlichen Schutz vor einer Infektion mit dem Cytomegalievirus zu bieten. Nun bleibt für die Zukunft die Aufgabe, das optimale präemptive Therapieschema für Patienten nach Stammzelltransplantation zu evaluieren. Neben Foscarnet und Ganciclovir könnte in naher Zukunft auch das oral zu verabreichende Valganciclovir hierfür zur Verfügung stehen.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Eignung der Kombination des MagNA Pure-DNA- Extraktionsgeräts mit dem COBAS Amplicor CMV Monitor Gerät zur Detektion von HCMV- DNA mittels quantitativer PCR in der klinischen Anwendung unter Beweis zu stellen. Dazu wurden insgesamt 604 Plasmaproben von 59 Patienten mit dieser Methode untersucht. Die Resultate wurden anschließend mit denen des pp65- Antigenämie- Assays verglichen. Die beiden Testverfahren lieferten in 130 von 153 parallel bestimmten Proben ein übereinstimmendes Ergebnis, dies entspricht einer Konkordanz von 85%.

48 Proben lieferten in mindestens einem der beiden Testverfahren ein positives Resultat. Davon waren 31 Proben im CMM positiv, 42 im Antigenämietest. Die Sensitivität bezogen auf die Detektion einer HCMV-Infektion betrug für den CMM 64,6% (31/48), für den Antigenämietest 87,5% (42/48). Wären im CMM auch die Proben mit einer Extinktion unter 0,200 als positiv berücksichtigt worden, die die Schwelle von 400 Kopien/ml überschritten, so wären 10 weitere Patientenproben im CMM positiv geworden. Die Sensitivität des CMM ließe sich also entscheidend verbessern, würden auch diese Proben als positiv gewertet. Dazu müsste die Software des Geräts umgestellt werden.

Abgesehen davon, konnte bestätigt werden, dass die Kombination des MagNA Pure- DNA- Extraktionsgeräts mit dem COBAS Amplicor CMV Monitor Gerät zur Detektion von HCMV- DNA mittels quantitativer PCR für die präemptive Diagnostik und Therapiesteuerung bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation geeignet ist.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die initialen Viruslasten, Maximalviruslasten, und die Kinetik der Viruslasten im Laufe der ersten Therapiewoche von 12 Patienten untersucht, die laut Studienprotokoll der Valganciclovirstudie behandelt wurden. Ziel dieser Untersuchung war, bereits zu einem frühen Zeitpunkt, sprich innerhalb der ersten Woche nach Auftreten einer HCMV-Infektion, anhand der Viruslast Hochrisikopatienten für die Entwicklung einer manifesten Erkrankung herauszufiltern.

---

Anhand des Viruslastverlaufs wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt. Die Patienten, deren Viruslast im Verlauf der ersten Therapiewoche anstieg, zeigten im Mittel eine doppelt so hohe Initialviruslast und eine achtfach höhere Maximalviruslast als die Patienten aus den anderen drei Gruppen, die HCMV entweder vollständig eliminiert hatten, oder eine sinkende oder konstante Viruslast innerhalb der ersten Therapiewoche zeigten. Beide Patienten, die an einer HCMV- Pneumonie erkrankten, befanden sich in der Risikogruppe mit steigender Viruslast.

Um Risikofaktoren für die Entstehung einer frühen HCMV- Infektion zu ermitteln, wurden im dritten Teil dieser Arbeit klinische Parameter der 59 Patienten einer univariaten, und anschließend einer multivariaten Risikofaktoranalyse unterzogen. Dabei erreichte die HCMV- Serologie von Empfänger und Spender ein signifikantes Niveau. Das höchste Risiko eine HCMV- Reaktivierung durchzumachen hatten HCMV- positive Empfänger eines HCMV- positiven Transplantats (Häufigkeit: 61.29%), gefolgt von HCMV- positiven Empfängern eines HCMV- negativen Transplantats (Häufigkeit: 40%). Das kleinste Risiko bestand für HCMV- negative Empfänger eines HCMV- positiven Transplantats mit einer Häufigkeit von 7.69%.

Als weitere Risikofaktoren konnten die HLA- Inkompatibilität und ein Patientenalter über 40 Jahren ermittelt werden.

Die Anzahl der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zu den Studienmedikamenten Ganciclovir und Valganciclovir ist für eine abschließende Bewertung der Effektivität und Sicherheit von oralem Valganciclovir zu klein. Da diese Daten im Rahmen der multizentrischen Studie über die „PCR-basierte präemptive Therapie mit oralem Valganciclovir und intravenösem Ganciclovir bei Patienten mit aktiver CMV-Infektion nach allogener Stammzeltransplantation“ erhoben wurden, bleibt die Veröffentlichung des Gesamtergebnisses aus den 5 Zentren abzuwarten.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

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

Use of molecular assays in diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease following renal transplantation  
J. Clin. Microbiol. 37, 2804-2807

**Akalin, E., Sehgal, V., Ames, S., Hossain, S., Daly, L., Barbara, M., Bromberg, J.S. (2003)**

Cytomegalovirus disease in high-risk transplant recipients despite Ganciclovir or valganciclovir prophylaxis  
American Journal of Transplantation 3, 731-735

**Avery, R.K., Adal, K.A., Longworth, D.L., Bolwell, B.J. (2000)**

A survey of allogeneic bone marrow transplant programs in the United States regarding cytomegalovirus prophylaxis and preemptive therapy  
Bone Marrow Transplant. 26, 763-767

**Bacigalupo, A., Tedone, E., Isaza, A., Sorraco, M., Van Lint, M.T., Sanna, A., Frassoni, F., Occhini, D., Gualandi, F., Lamparelli, T., Figari, O., Benvenuto, F., Raffo, M.R., Marmont, A.M. (1995)**

CMV-antigenemia after allogeneic bone marrow transplantation: correlation of CMV-antigen positive cell numbers with transplant related mortality  
Bone Marrow Transplant. 16, 155-161

**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

**Boeckh, M., Nichols, W.G. (2004)**

The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy  
Blood 103, 2003-2008

**Boeckh, M. (1999)**

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

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

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

---

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

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., Bowden, R.A., Zaia, J.A. (1997)**

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

**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

**Boivin, G., Goyette, N., Gilbert, C., Roberts, N., Macey, K., Paya, C., Pescovitz, M.D., Humar, A., Dominguez, E., Washburn, K., Blumberg, E., Alexander, B., Freeman, R., Heaton, N., Covington, E. (2004)**

Absence of cytomegalovirus-resistance mutations after valganciclovir prophylaxis, in a prospective multicenter study of solid-organ transplant recipients  
J. Infect. Dis. 189, 1615-1618

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

Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the COBAS Amplicor CMV Monitor PCR test after blood and marrow allogeneic transplantation  
J. Clin. Microbiol. 38, 4356-4360

**Bowen, E.F., Sabin, C.A., Wilson, P., Griffith, P.D., Davey, C.C., Johnson, M.A., Emery, V.C. (1997)**

Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease  
Aids. 11, 889-893

**Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. (2001)**

Harrisons Principles of Internal Medicine  
McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 15. Auflage

---

**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., Allegra, J., Bullotta, A.C., Gilbane, L., Rinaldo, C.R. (2002)**

Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays  
J. Clin. Microbiol. 40, 1581-1586

**Caliendo, A.M., St. George, K., Kao, S.-Y., Allegra, J., Tan, B.-H., Lafontaine, 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

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

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

**Cope, A.V., Sabin, C., Burroughs, A., Rolles, K., Griffith, P.D., Emery, V.C. (1997)**

Interrelationship among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation  
J. Infect. Dis. 176, 1484-1490

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

Valganciclovir  
Drugs 61, 1145-1152

**Daly, A., McAfee, S., Colby, C., Schulte, L., Yeap, B., Sackstein, R., Tarbell, N.J., Sachs, D., Sykes, M., Spitzer, T.R. (2003)**

Nonmyeloablative bone marrow transplantation: infectious complications in 65 recipients of HLA-identical and mismatched transplants  
Biol. Blood Marrow Transplant. 9, 373-382

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

Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals  
American Journal of Transplantation 1, 307-312

---

**Einsele, H., Bertz, H., Beyer, J., Kiehl, M.G., Kolb, H.-J., Beck, R., Schwertfeger, R., Schuhmacher, U., Hebart, H., Martin, H., Kienast, J., Ullman, 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., Hebart, H., Kauffmann-Schneider, C., Sinzger, C., Jahn, G., Bader, P., Klingebiel, T., Dietz, K., Löffler, J., Bokemeyer, C., Müller, 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., Ehninger, G., Hebart, H. (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

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

Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance  
J. Clin. Virol. 21, 223-228

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

Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation  
Lancet 355, 2032-2036

**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

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

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

**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

---

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

Rising levels of human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ transplant recipients with primary HCMV infection

J. Clin. Microbiol. 36, 1113-1116

**Goodrich, J.M., Bowden, R.A., Fisher, L., Keller, C., Schoch, G., Meyers, J.D. (1993)**

Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplantation

Ann. Intern. Med. 118, 173-178

**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

**Gore, D., Sabin, C., Prentice, H.G., Vyas, N., Man, S., Griffith, 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

**Gratama, J.W., Van Esser, J.W., Lamers, C.H. (2001)**

Tetramer based quantification of cytomegalovirus (CMV)- specific CD8+ -T-lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection

Blood 98, 1358-1364

**Hahn, H., Falke, D., Kaufmann, S., Ullmann, U. (2001)**

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie

Springer Verlag, 4.Auflage

**Hebart, H., Brugger, W., Grigoleit, U., Gscheidle, B., Loeffler, J., Schäfer, H., Kanz, L., Einsele, H., Sinzger, C (2001a)**

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

Blood 97, 2183-2185

---

**Hebart, H., Wuchter, P., Löffler, J., Gscheidle, B., Hamprecht, K., Sinzger, C., Dietz, K., Kanz, L., Einsele, H. (2001b)**

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., Jahn, G., Sinzger, C., Kanz, L., Einsele, H. (2000a)**

CMV infection in bone marrow and solid organ transplant patients in the era of antiviral prophylaxis

Herpes 7, 13-17

**Hebart, H., Loeffler, J., Kanz, L., Einsele, H. (2000b)**

Molecular methods in the diagnosis of infections in the immunocompromised host

Current Opinion in Infectious Disease 13, 355-359

**Hebart, H., Müller, C., Löffler, J., Jahn, G., Einsele, H. (1996)**

Monitoring of CMV-infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation

Bone Marrow Transplant. 17, 861-868

**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

**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

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

**Limaye, A.P. (2002)**

Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients

Clin. Infect. Dis. 35, 866-872

**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 hemopoietic stem-cell transplant recipients

J. Infect. Dis. 183, 377-382

---

**Ljungman, P.(2002)**

Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients  
British Journal of Haematology 118, 44-57

**Ljungman, P., Griffith, P., Paya, C. (2002)**

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

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

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

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

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

**Masaoka, T., Hiraoka, A., Ohta, K., Tatsumi, N., Watanabe, S., Hotta, T., Yabe, H., Kato, S., Aikawa, A., Ohara, T., Hasegawa, A., Tanabe, K., Toma, H., Yasuoka, A., Oka, S. (2001)**

Evaluation of the Amplicor CMV, COBAS Amplicor CMV Monitor and antigenemia assay for cytomegalovirus disease  
Jpn. J. Infect. Dis. 54, 12-16

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

Klinische Infektiologie  
Urban & Fischer, 1.Auflage

**Matthes-Martin, S., Lion, T., Aberle, S.W., Fritsch, G., Lawitschka, A., Bittner, B., Frommlet, F., Gadner, H., Peters, C. (2003)**

Pre-emptive treatment of CMV DNAemia in pediatric stem cell transplantation: the impact of recipient and donor CMV serostatus on the incidence of CMV disease and CMV-related mortality  
Bone Marrow Transplant. 31, 803-808

**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

**Meyers, J.D., Flournoy, N., Thomas, E.D. (1986)**

Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation  
J. Infect. Dis. 153, 478-488

---

**Meyers, J.D., Ljungman, P., Fisher, L.D. (1990)**

Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: Importance of cytomegalovirus viremia  
J. Infect. Dis. 162, 373-380

**Modrow, S., Falke, D., (1998)**

Molekulare Virologie  
Spektrum Akademischer Verlag, 1.Auflage

**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)**

Foscarnet vs ganciclovir for cytomegalovirus (CMV) antigenemia after allogeneic 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.B. (1990)**

Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion  
Spektrum der Wissenschaft 6, 60-67

**Nachbaur, D., Larcher, C., Kircher, B., Eibl, G., Nussbaumer, G., Gunsilius, E., Haun, M., Grünewald, K., Gastl, G. (2003)**

Risk for cytomegalovirus infection following reduced intensity allogeneic stem cell transplantation  
Ann. Haematol. 82, 621-627

**Oethinger, M. (2000)**

Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie  
10. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena

**Okada, M., Takemoto, Y. (1998)**

Monitoring of CMV infection after bone marrow transplantation  
Nippon Rinsho. 56, 189-192

**Osarogiagbon, R.H., Defor, T.E., Weisdorf, M.A., Erice, A., Weisdorf, D.J. (2000)**

CMV antigenemia following bone marrow transplantation: risk factors and outcome  
American Society for Blood and Marrow Transplantation, 280-288

---

**Pang, X.L., Chui, L., Fenton, J., LeBlanc, B., Preiksaitis, J.K. (2003)**  
Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS Amplicor CMV Monitor, and pp65 antigenemia assay for quantitative Measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation

J. Clin. Microbiol. 41, 3176-3174

**Paya, C., Humar, A., Dominguez, E., Washburn, K., Blumberg, E., Alexander, B., Freeman, R., Heaton, N., Petzkovitz, M.D. (2004)**

Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients

Am. J. Transplant 4, 611

**Paya, C. (2001)**

Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of solid-organ transplants

Clin. Infect. Dis. 32, 596-603

**Pellegrin, I., Garrigue, I., Biquet, 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

**Pescovitz, M.D. (2003)**

Formulary considerations for drugs used to prevent cytomegalovirus disease

Am. J. Health. Syst. Pharm. 60, 17-21

**Piiparinen, H., Höckerstedt, 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

**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

**Rasmussen, L., Zipeto, D., Wolitz, R.A., Dowlind, A., Efron, B., Merigan, T.C. (1997)**

Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood

J. Infect. Dis. 176, 1146-1155

---

**Razonable, R.R., Brown, R.A., Espy, M.J., Rivero, A., Kremers, W., Wilson, J., Groettum, C., Smith, T.F., Paya, C.V. (2001)**

Comparative Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems

J. Clin. Microbiol. 39, 4472-4476

**Reedehase, M., J. (1995)**

Cytomegalievirus- Infektion

Die gelben Hefte 3, 95-103

**Reusser, P. (2001)**

Oral valganciclovir: a new option for treatment of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised hosts

Expert Opin. Investig. Drugs 10, 1745-1753

**Reusser, P. (2002)**

Management of viral infections in immunocompromised cancer patients

Swiss. Med. Wkly 132, 374-378

**Reusser, P., Einsele, H., Lee, J., Volin, L., Rovira, M., Engelhard, D., Finke, J., Cordonnier, C., Link, H., Ljungman, P. (2002)**

Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection allogeneic stem cell transplantation

Blood 99, 1159-1164

**Ribbert, H. (1904)**

Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern

Zentralbl. Allg. Pathol. 15, 945-948

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

Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir Therapie in renal transplant recipients

J. Infect. Dis. 178, 626-635

**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

J. Clin Microbiol. 8, 431-434

---

**Rubin, R.H. (2001)**

Cytomegalovirus in solid organ transplantation  
Transpl. Infect. Dis. 3, 1-5

**Salomon-Ceron, D. (2001)**

Cytomegalievirus infection: the point in 2001  
HIV Medicine 2, 255-259

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

Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR  
J. Clin. Microbiol. 38, 4006-4009

**Schetelig, J., Oswald, O., Steuer, N., Radonic, A., Thulke, S., Held, T.K., Oertel, J., Nitsche, A., Siegert, W. (2003)**

Cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia  
Bone Marrow Transplant. 32, 695-701

**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

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

Cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus and Epstein-Barr Virus  
Clinical virology manual. Chapter 32.  
American Society for Microbiology Press, 3.Auflage

**Stocchi, R., Ward, K.N., Baccarani, M., Apperley, J.F. (1999)**

Management of cytomegalovirus infection and disease after bone marrow transplantation  
Haematologica 84, 71-79

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

Allogenic hematopoietic stem cell transplantation, complications and results  
Arch. Intern. Med. 162, 1558-1566

**Thorner, A.R. (2002)**

Diagnosis of cytomegalievirus disease in immunocompromised patients: a review of the aids and solid organ transplant literatur  
Harvard Joint ID Conference

**Tong, C.Y., Cuevas, L., Williams, H., Bakran, A. (1998)**

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

---

**Von Müller, L., Hampl, W., Hinz, J., Meisel, H., 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 a standardized quantitative plasma PCR assay  
J. Clin. Microbiol. 40, 2285-2287

**Winsten, 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

**Zaia, J.A. (2002)**

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

Bone Marrow Transplant. 29, 633-638

---

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Hermann Einsele möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie seiner Betreuung während dieser Zeit danken.

Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Löffler danke ich ganz herzlich für seine engagierte Betreuung im Labor, seine Hilfsbereitschaft und sein offenes Ohr bei Fragen und Problemen.

Vielen Dank an Timo Gentner für seine geduldige Einarbeitung in die Geräte und die Methodik.

Grossen Dank an Marija Markulin und Ingrid Kumbier für die freundliche Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Götz Ulrich Grigoleit für seine freundliche Bereitschaft Fragen zu beantworten und Ratschläge zu erteilen bedanken.

Herrn Christoph Meisner vom Institut der Medizinischen Informationsverarbeitung danke ich für seine Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Cornelia Kuppinger, die mir ebenfalls bei statistischen Fragen und der Auswertung der Daten zur Seite stand.

Der Firma Roche danke ich für die Bereitstellung des COBAS Amplicor CMV Monitor und die großzügigen Lieferungen der Reagentien.

Ganz herzlichen Dank an Dr. Thomas Bächle für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und seine Ermutigungen.

---

Ich danke meiner Schwester Anke die für Ablenkung gesorgt hat.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Mutter für ihre großartige Unterstützung in allen Lebenslagen.

---

## LEBENS LAUF

Denise Staier, geboren am 27.03.1978 in Bietigheim-Bissingen

1984-1988	Grundschule Besigheim
1988-1997	Christoph Schrempf Gymnasium Besigheim
10/1998-03/2001	Studium der Humanmedizin an der Johannes- Gutenberg Universität Mainz
03/2001	Ärztliche Vorprüfung
seit 04/2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
04/2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002-09/2003	Durchführung der Experimente dieser Arbeit
03/2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.05.2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung