

**Quantitativer Nachweis des
pp65-Antigens
des Humanen Zytomegalievirus
mittels FACS-Analyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Anke Manuela Litwicky

Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

und

dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Abteilung für Virologie
der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Betreuer: Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

**Quantitativer Nachweis des
pp65-Antigens
des Humanen Zytomegalievirus
mittels FACS-Analyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
Anke Manuela Litwicky
Tierärztin aus Saarbrücken (Saarland)**

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-
Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel

Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch

Tag der Disputation: 19. Mai 2004

Für meine Eltern und meine Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	
<u>1 Einleitung</u>	1-32
1.1 Herpesviren – allgemeine Einführung	1
1.1.1 Morphologie	3
1.1.2 Einteilung	4
1.1.3 Physikalische Erregereigenschaften	5
1.1.4 Übertragungswege	5
1.1.5 Replikation und Infektionsbiologie	5
1.1.5.1 Die lytische Infektion	5
1.1.5.2 Die latente Infektion	6
1.1.6 Abwehrmechanismen	7
1.2 CMV-Infektionen <i>in vivo</i>	7
1.2.1 Die Primärinfektion	7
1.2.2 Die Reaktivierung	8
1.2.3 Die Reinfektion	9
1.3 Epidemiologie	9
1.4 Symptomenkomplexe und Erscheinungsformen	9
1.4.1 Klinik der CMV-Infektion beim Tier	9
1.4.2 Klinik der CMV-Infektion beim Menschen	10
1.4.2.1 Pränatale Infektion	10
1.4.2.2 Postnatale Infektion	11
1.4.2.2.1 Infektion eines gesunden, immunkompetenten Wirtes	11
1.4.2.2.2 Infektion eines immunsupprimierten Wirtes	12
1.5 Therapie	15
1.5.1 Medikamente	15
1.5.2 Strategien der Therapie	16
1.5.2.1 Therapie einer manifesten CMV-Erkrankung	16
1.5.2.2 Prophylaxe	16

1.5.2.3	Präemptive Therapie	17
1.6	CMV-Nachweismethoden	18
1.6.1	Serologische Nachweisverfahren	18
1.6.2	Histopathologische Virusnachweise	19
1.6.3	Elektronenmikroskopische Examination	20
1.6.4	Weitere direkte Virusnachweis-Verfahren	20
1.6.4.1	Virusanzucht in Zellkulturen	20
1.6.4.2	Virus-Antigennachweis	21
1.6.4.2.1	pp65-Nachweis	21
1.6.4.2.2	Kurz-Zeit-Kultur	21
1.6.4.3	Virus-Genomnachweise	22
1.6.4.3.1	Genamplifikation	22
1.6.4.3.2	Signalamplifikation	24
1.7	Der pp65-Nachweis	25
1.7.1	Konventioneller pp65-Nachweis mittels Antigenämietest	25
1.7.2	FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen	28
1.8	Bisherige Resultate zur FACS-Analyse	29
1.9	Fragestellung / Ziel	31
1.9.1	Etablierung	31
1.9.2	Evaluierung	31
2	<u>Materialien</u>	33-36
2.1	Geräte	33
2.2	Plastikwaren und Gebrauchsgegenstände	33
2.3	Konventioneller pp65-Antigenämie-Test	33
2.4	FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen	34
2.5	Patienten	35
3	<u>Methoden</u>	37-46
3.1	Konventioneller pp65-Antigenämietest	37
3.1.1	Isolierung	37
3.1.2	Zellzählung	37
3.1.3	Fixierung	38

3.1.4	Färbung.....	39
3.1.5	Beurteilung.....	39
3.2	FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen.....	41
3.2.1	Isolierung/Probenaufarbeitung.....	41
3.2.2	Färbung.....	41
3.2.3	Messung.....	43
4	<u>Ergebnisse</u>	47-72
4.1	Methodenetablierung.....	47
4.1.1	Auswirkungen unterschiedlicher Antikoagulanzen.....	47
4.1.2	Beeinflussung der Ergebnisse durch Zwischenlagerung der Proben.....	48
4.2	Methodenevaluation.....	50
4.2.1	pp65-Detektion mittels FACS-Messung.....	50
4.2.1.1	Allgemeine Übersicht aller durchgeführten Messungen.....	50
4.2.1.2	Festlegung der Grenzwerte.....	53
4.2.1.3	Berechnung der Testsensitivität und –spezifität.....	53
4.2.2	pp65-Detektion bei zehn Patienten mit aktiver CMV-Infektion.....	55
4.2.2.1	Messungen im FACS.....	55
4.2.3	Die Vergleichsmethoden.....	63
4.2.3.1	Qualitativer und quantitativer Vergleich von konventionellem pp65-Nachweis, Hybrid-Capture-Test und FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen.....	63
4.2.3.2	Analyse der zehn Patienten mit aktiver CMV-Replikation im direkten Testvergleich.....	65
5	<u>Diskussion</u>	73-87
5.1	Fragestellung und Ziel.....	73
5.2	Vorgehensweise.....	73
5.3	Diskussion der Methodenetablierung.....	74
5.3.1	Unterschiedliche Antikoagulanzen.....	74
5.3.2	Unterschiedliche Aufarbeitungszeiten.....	75
5.4	Diskussion der Methodenevaluation.....	76
5.4.1	Diskussion der Grenzwertberechnung.....	76

5.4.2	Diskussion der Übereinstimmung der drei Nachweismethoden – im allgemeinen und direkten Vergleich	80
5.4.3	Diskussion der Übereinstimmung der drei Nachweismethoden – auf die Krankheitsverläufe einzelner Patienten bezogen	82
5.4.4	Diskussion von „Ausreißer“-Ergebnissen	83
5.5	Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse	85
5.6	Fazit	86
<u>6</u>	<u>Ausblick</u>	88-89
<u>7</u>	<u>Zusammenfassung</u>	90-91
<u>8</u>	<u>Summary</u>	92-93
	Datentabellen der einzelnen Patienten	94-97
	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	98-101
	Literaturverzeichnis	102-107
	Danksagung	108

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A. dest-	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Ak	Antikörper
bDNA	branched DNA
BHV-1	Bovines-Herpesvirus-1
BHV-3	Bovines-Herpesvirus-3
BKF	Bösartiges Katarrhalfieber
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalievirus
d.h.	das heißt
diag.	diagnostisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetate
EHV	Equines-Herpesvirus
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated-cell-sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
HCT	Hybrid-Capture-Test
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HIV	Humanes-Immunodefizienz-Virus
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen

i.d.R.	in der Regel
IBR	infektiöse bovine Rhinotracheitis
IFT	Immunfluoreszenz-Test
Ig	Immunglobulin
IPV	infektiöse pustulöse Vulvovaginitis
konz.	Konzentriert
Lsg.	Lösung
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
NASBA	Nucleic-Acid-Sequence-Based-Amplification
nm	nanometer
OHV-2	Ovines-Herpesvirus-2
PBS	Phosphate-buffered-solution
PCR	Polymerase-chain-reaction
pg	pikogramm
pp	Phosphoprotein
RNA	Ribonukleinsäure
SHV-1	Suid-Herpesvirus-1
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Das **Humane-Zytomegalievirus (CMV)** wurde im Jahre 1904 erstmals in der „Münchener Medizinische Wochenschrift“ erwähnt. War man in der Zeit davor weitestgehend der Auffassung, dass es sich bei dieser neuen Struktur lediglich um "Riesenzellen" handelte, setzte sich ab 1930 hingegen die Auffassung durch, dass man es mit einem neuen Virus zu tun hatte. Heute wird es in der neueren Literatur auch als Humanes-Herpesvirus-5 bezeichnet.

1.1 Herpesviren – allgemeine Einführung

Zytomegalieviren gehören zur Familie der Herpesviren. Es gibt über 100 bisher beschriebene Herpesviren. Sie kommen außer beim Menschen auch bei nahezu allen Wirbeltieren vor.

Zu den veterinärmedizinisch bedeutenden Vertretern gehört u.a. das Bovine-Herpesvirus-1. Die durch BHV-1 verursachten Erkrankungen (IBR, IPV) sind weltweit verbreitet. Bei der infektiösen bovinen Rhinotracheitis handelt es sich um eine hochakute systemische Infektion, die vornehmlich mit respiratorischen Symptomen einhergeht. Zusätzlich werden häufig auch Schleimhauterkrankungen der Genitalien beschrieben, die u.a. mit Fruchtbarkeitsstörungen verbunden sind und als infektiöse pustulöse Vulvovaginitis beschrieben werden. Diese Manifestationen werden durch Subtypen des BHV-1 verursacht. Übertragen durch direkten Tierkontakt, breitet sich das Virus ausgehend von einem erkrankten Tier in einer Herde innerhalb weniger Tage aus. Die klinischen Symptome reichen von Fieber, Anorexie, ausgeprägter respiratorischer Dyspnoe über Bläschenausschlag bei der genitalen Form bis hin zu sinkender Milchleistung bei laktierenden Kühen sowie Aborten. Während die Morbidität bis zu 100 % betragen kann, liegt die Letalität zwischen 2 und 12 %. Ein infiziertes Tier bleibt lebenslang Virusträger, durch äußere Einflüsse kann die Latenz jedoch durchbrochen werden, und das Virus wieder in den lytischen Vermehrungszyklus übergehen.

Ähnlich wie bei BHV-1 unterscheidet man auch bei dem, durch das Ovine-Herpesvirus-2 ausgelösten, Bösartigen Katarrhalfieber (BKF) ätiologisch zwei Krankheitsformen, die durch verwandte Herpesviren hervorgerufen werden.

Das BKF der Rinder in Afrika wird durch das im Gnu persistierende, lymphotrophe „alcelaphine“ Herpesvirus-1 hervorgerufen, das in Europa bei Wiederkäuern auftretende Bösartige Katarrhalfieber durch einen bisher nicht weiter definierten Erreger, bei dem das Schaf den inapparent infizierten Hauptwirt darstellt. Seine Bezeichnung läuft unter OHV-2. Es lassen sich eine Reihe mannigfaltiger klinischer Bilder unterscheiden, die auch ineinander übergehen können. Die perakute Allgemeinerkrankung wird von hohem Fieber und Apathie begleitet und führt nach drei bis vier Tagen zum Tod der betroffenen Tiere. Auch die intestinale oder Darmform endet, wie die Kopf-Augen-Form, nach dramatischem Verlauf innerhalb weniger Tage tödlich. Bei beiden werden öfters Komplikationen in Form zentralnervöser Störungen festgestellt.

Auch die weltweit verbreiteten Herpesvirusinfektionen der Pferde sind von großer veterinärmedizinischer Bedeutung. EHV-1 und EHV-4 führen zu Aborten bei trächtigen Stuten und zu respiratorischen Erkrankungen bei Fohlen und jungen Pferden. Über die respiratorischen Sekrete, Nachgeburten bzw. abortierten Fohlen wird das Virus ausgeschieden und verbreitet. Nach diaplazentarer Infektion des Fetus kommt es ab dem 7. bis 10. Trächtigkeitsmonat zum Spätabort. Fohlen mit Anzeichen einer generalisierten EHV-1-Infektion weisen Nekrosen in einer Vielzahl von Organen auf. Bei erwachsenen Pferden kann es im Rahmen der EHV-1-Generalisation in seltenen Fällen auch zu tödlich verlaufenden Enzephalomyelitiden kommen. Infektionen mit EHV-4 führen, nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen, bei Fohlen und jungen Pferden zur Ausbildung einer akuten, fieberhaften Erkrankung des Respirationstraktes. Bei älteren Pferden verläuft die respiratorische Form häufig klinisch inapparent.

Unter natürlichen Bedingungen sind Herpesviren auf ein enges Wirtsspektrum und auch vorwiegend auf eine Spezies beschränkt. Verlassen sie den natürlichen Reservoirwirt, kann es sowohl zu einer Abschwächung als auch zu einer Steigerung der Virulenz

kommen, die mitunter auch in einer tödlichen Infektion resultieren kann, so z.B. das Herpesvirus-B des Affen. Während es bei seinem natürlichen Wirt, dem Rhesusaffen, eine ähnliche Symptomatik wie das Herpes-simplex-Virus beim Menschen hervorruft, kann es nach Übertragung auf den Menschen schwerste, unbehandelt meist tödlich verlaufende, Enzephalitiden auslösen.

Ähnlich stellt auch das Suid-Herpesvirus-1 (SHV-1), der Erreger der Aujeszky'schen Krankheit, eine Ausnahme unter den Herpesviren dar, da es ein sehr breites Wirtsspektrum aufweist. Neben dem Schwein als Hauptwirt sind auch Wiederkäuer, Fleischfresser und Nagetiere empfänglich. Übertragen wird SHV-1 hauptsächlich über respiratorische Sekrete. Abhängig von Alter treten unterschiedliche klinische Verlaufsformen auf. Subklinische Formen mit milden Symptomen sind mitunter bei adulten Schweinen zu beobachten. Jungsauen erkranken in der Regel schwerer mit zentralnervösen Symptomen. Ähnlich schwere Symptome wurden bei Wiederkäuern festgestellt. Bei Fleischfressern, wie Hunde und Katzen, die sich durch den Verzehr von rohem Schweinefleisch infizieren, kommt es fast durchgängig zur Ausbildung eines schweren, meist tödlich verlaufenden Krankheitsbildes, das als sogenannte Pseudowut von der Tollwut klinisch oft nicht sicher zu unterscheiden ist.

Ebenso können auch humanpathogene Herpesviren auf Tiere übertragen werden und zu Infektionen führen. So verursacht das Epstein-Barr-Virus bei Krallenaffen einen dem Burkitt-Lymphom ähnlichen Tumor.

Virulenz und Tropismus der einzelnen Vertreter der Herpesviren, auch unter dem Gesichtspunkt der „Zoonoseerreger“, sind in der Natur unterschiedlich, so dass die dadurch provozierten Erkrankungen klinisch sehr differieren (einschließlich Morbidität und Mortalität).

1.1.1 Morphologie

Herpesviren (*griechisch: Herpein = kriechen*) besitzen eine unsegmentierte, lineare, doppelsträngige DNA und haben eine kubische Symmetrie. Das Kapsid alleine misst 100 - 110 nm im Durchmesser und ist mit 162 ikosaedrisch angeordneten Kapsomeren, 150 Hexameren und 12 Pentameren, besetzt.

Die Kapsomere besitzen einen polygonalen Querschnitt und sind teilweise hohl. Zwischen Kapsid und Virushülle befindet sich die als Tegument bezeichnete Proteinschicht. Die Hülle trägt stachelförmige Oberflächenproteine, die Glykoproteine. Mindestens acht verschiedene Glykoproteine sind in die Lipiddoppelmembran eingelagert. Gegen diese Proteine werden die neutralisierenden Antikörper gebildet. Im Virion kommen mehr als 20 Strukturproteine vor. Das komplette Herpesvirion misst 120 - 200 nm im Durchmesser.

1.1.2 Einteilung

Die Familie der Herpesviridae wird in die folgenden Subfamilien nach ihren biologischen Eigenschaften *in vitro* eingeteilt:

Die Subfamilie der **Alphaherpesvirinae** ist durch einen kurzen Replikationszyklus und durch die Fähigkeit zur Replikation in vielen verschiedenen Zelllinien gekennzeichnet. In Zellkulturen kommt es recht schnell zum Entstehen eines cytopathischen Effektes. Zu dieser Subfamilie gehören das Herpes-simplex-Virus (u.a. Humanes-Herpesvirus-1 und -2, Bovines-Herpesvirus-2), das Varicello-Virus (Bovines-Herpesvirus-1, Equines-Herpesvirus-1, -3 und -4 sowie das Virus der Aujeszkyschen Krankheit) und das Varicella-zoster-Virus.

Als **Betaherpesvirinae** werden Viren bezeichnet, die einen langen Replikationszyklus aufweisen und in Kultur nur langsam zu einem zytopathischen Effekt führen. Sie weisen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine hohe Wirtsspezifität auf. Zu dieser Gruppe gehören die Zytomegalieviren von Mensch und Tier, wie das Humane-Zytomegalievirus, das Suid-Herpesvirus-2, der Erreger der Einschlußkörperchenrhinitis, das Equine- sowie das Feline-Herpesvirus-2. Die infizierten Zellen fallen durch ihre außergewöhnliche Größe (Zytomegalie) und charakteristische Einschlusskörperchen auf. Heute werden die Humanen-Herpesviren-6 und -7, auf Grund ihres engen genetischen Verwandtschaftsverhältnisses zu CMV, zusätzlich dieser Gruppe zugeordnet.

Zu den **Gammaherpesvirinae** gehören Viren, die lymphtrop sind. Sie vermehren sich in der Regel in B- oder T-Lymphozyten. Beispiele hierfür sind das Epstein-Barr-Virus, der Erreger der infektiösen Mononukleose des Menschen, das

Humane-Herpesvirus-8, der Erreger der Marek'schen Krankheit des Geflügels sowie das Bovine-Herpesvirus-3.

1.1.3 Physikalische Erregereigenschaften

Die Tenazität von Herpesviren ist bei niedrigen pH-Werten gering. Sie sind aufgrund der Lipidhülle empfindlich gegen Lipidlösungsmittel und Hitze, z.B. Pasteurisierung. Die Halbwertszeit von CMV beträgt bei 37°C ca. 60 Minuten. Bei -20°C ist das Virus relativ instabil. Um die Infektiosität zu erhalten, sollte es bei mindestens -70°C gelagert werden.

1.1.4 Übertragungswege

Herpesviren werden vorwiegend zellassoziiert übertragen durch Schleimhautkontakt direkt oder parenteral über zellhaltige Blutkomponenten. In diesem Zusammenhang spielen vor allem Stammzell- oder Organtransplantationen eine wichtige Rolle. Ebenso kann eine Übertragung auch prä-, peri- oder postnatal (siehe Abschnitt 1.3.) stattfinden.

1.1.5 Replikation und Infektionsbiologie

Man kann bei Herpesviren zwischen zwei unterschiedlichen Infektionszyklen unterscheiden. Zum einen können sie einen **lytischen** Infektionszyklus durchlaufen und Virionen bilden, zum anderen haben alle Herpesviren aber auch die Fähigkeit zur sogenannten **latenten** Infektion ohne Virionbildung und ohne Zerstörung der Wirtszelle. In diesem Zusammenhang kann noch auf eine weitere Besonderheit der Herpesviren hingewiesen werden: die sogenannte **Episombildung**. In freien Viruspartikeln liegt die Virus-DNA linear vor, in der Wirtszelle ist sie zirkulär zum Ring, dem Episom, geschlossen. Dieser Ring liegt außerhalb des Genoms der Wirtszelle, also extrachromosomal vor. In wenigen Einzelfällen kann es aber auch zur Integration ins Wirtszellgenom kommen.

1.1.5.1 Die lytische Infektion

Mit Hilfe der viralen Glykoproteine kommt es zur Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Die Virushülle fusioniert mit der Zellmembran, das Kapsid wird in die Zelle entlassen, zum Kern transportiert und das Genom dort freigesetzt.

Es beginnt der **lytische Infektionszyklus**: Die Vermehrung der Herpesviren nimmt ihren Anfang im Zellkern. Hier erfolgt die Transkription der **immediate early** Gene mit Hilfe der RNA-Polymerase-II der Wirtszelle, wobei Tegumentproteine des Virus als Transaktivatoren für die immediate early Gene wirken. Die immediate early Proteine sind für die weiteren Schritte der Virusvermehrung verantwortlich. Sie greifen unter anderem auch in die Expression der early Virus-Gene und die Erkennung der HLA-Antigene (MHC Klasse-I-Proteine) ein. Die CMV-kodierte DNA-Polymerase zählt zu den early Proteinen. Sie kann mit Hilfe von antiviralen Substanzen spezifisch gehemmt werden. Zu den early Proteinen zählt vor allem auch das, für die CMV-Diagnostik so bedeutende, **Phosphoprotein pp65**.

Es kann als früher Marker der Virusinfektion eingesetzt werden. Die early Proteine wiederum regulieren die Synthese der **late** Proteine.

Weitere Genprodukte der early Gene wirken ihrerseits selbst wieder regulatorisch auf nachgeschaltete Gene, bis alle zur Virusproduktion nötigen Bestandteile exprimiert werden. Die Virus-DNA wird im Kern vermehrt und in unreife Nukleokapside eingespult. Die Virusfreisetzung erfolgt, nachdem die Viren durch das modifizierte endoplasmatische Retikulum zur Zelloberfläche transportiert worden sind. Ein Lysozym löst die Wirtszellmembran auf, und die Zelle wird zerstört.

1.1.5.2 Die latente Infektion

Die **latente** Infektion ist charakteristisch für alle Herpesviren. Sie bleibt lebenslang bestehen. Das heißt, das Virus verbleibt in einem einmal befallenen Organismus, es persistiert und überdauert in bestimmten Körperzellen, die es als Wirt nutzt. In diesem Zustand werden keine Virionen gebildet, die Wirtszelle wird nicht zerstört. Es werden allerdings eine Vielzahl viraler Proteine gebildet, die unter anderem verhindern, dass die infizierten Zellen durch das Immunsystem erkannt werden. In dieser Phase können verschiedene Proteine auch mit Wirtsproteinen interagieren und in den Zellzyklus eingreifen. Das ist die Grundlage für die Assoziation von Herpesviren mit Tumorerkrankungen, die sowohl in ihren natürlichen Wirten als auch in Versuchstieren beobachtet werden konnte. Eine große Zahl der Mitglieder der Herpesvirusfamilie kann so an der Tumorentstehung beteiligt sein, insbesondere das Epstein-Barr-Virus, das

Humane-Herpesvirus-8 sowie das Herpes-saimiri und das Virus der Marek'schen-Krankheit. Die latente Replikation und die Aktivierung des lytischen Zyklus ist jederzeit durch verschiedene Auslöser aktivierbar, z.B. durch Immunsuppression im Zuge schwerer Krankheiten wie Krebs oder AIDS, Stress, Fieber, Schwangerschaft, Hormone, Immunsuppressiva, Zytostatika, UV-Licht u.a.

1.1.6 Abwehrmechanismen

Unspezifische Abwehrmechanismen, wie natürliche Killerzellen oder Interferone, verhindern zunächst die Ausbreitung des Virus [Pamphilon et al. 1999]. Die Kontrolle der Infektion wird u.a. gewährleistet durch die spezifische Immunantwort (MHC-I-restringierte CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten, MHC-II-restringierte T-Helfer-Lymphozyten). Das vermutlich wichtigste Zielantigen für die zytotoxischen T-Lymphozyten ist das Tegumentphosphoprotein pp65 [Riddell et al. 1997].

1.2 CMV-Infektionen *in vivo*

Hierbei können folgende Unterscheidungen getroffen werden:

- die Primärinfektion,**
- die Reaktivierung,**
- die Reinfektion.**

1.2.1 Die Primärinfektion

Drei unterschiedliche Altersgruppierungen können von einer Primärinfektion betroffen sein: CMV wird intrauterin weitaus häufiger übertragen als andere Erreger pränataler Erkrankungen wie Toxoplasmose oder Röteln und ist damit die Hauptursache von intrauterinen Infektionen während der Schwangerschaft (siehe auch 1.4.2.1.) [Enders 1991, Stagno et al. 1982].

pränatale Infektion: Die kongenitale Infektion des Embryos oder Fetus im Mutterleib ist während der ganzen Schwangerschaft möglich. Sie folgt entweder auf eine primäre oder Reinfektion der Mutter kurz vor oder während der Schwangerschaft, oder in seltenen Fällen auf

eine Reaktivierung einer vor der Schwangerschaft erworbenen mütterlichen Infektion [Epps et al. 1995, Fine et al. 1985].

perinatale Infektion: Infektion des Neugeborenen; bei der Passage durch den infizierten Geburtskanal, durch virushaltige Muttermilch oder durch Austauschtransfusionen.

postnatale Infektion: Infektion im Kindes- und Erwachsenenalter meist durch Kontaktinfektion (Speichel, Urin), auf sexuellem Weg, durch Bluttransfusion oder Transplantation.

1.2.2 Die Reaktivierung

Nach einer primären (lytischen) Infektion verbleibt das Virus im Wirtsorganismus in einem Zustand der Latenz, kann aber in bestimmten Situationen reaktiviert werden und infektiöse Virionen erscheinen im Speichel, im Urin und/oder im Blut. Als zelluläre Zielorte werden zur Zeit hauptsächlich CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen und CD13/CD14-positive Monozyten im peripheren Blut diskutiert [Movassagh et al. 1996, Larsson et al. 1998]. Im gesunden Organismus stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Immunantwort des Wirtes einerseits und der CMV-Replikation andererseits ein.

Die zeitweiligen Reaktivierungen sind in der Regel asymptomatisch, sie erlauben dem Virus aber, sich horizontal und auch vertikal bei einem Ausbruch während einer Schwangerschaft zu verbreiten. Ändert sich die Wirt-Parasit-Beziehung während physiologischer und pathologischer Schwankungen des Immunsystems kann es zu einer **Reaktivierung** kommen. Dies kann z.B. während der Schwangerschaft, durch Interaktionen mit anderen Viren (z.B. Humanes-Herpesvirus-6) oder bakteriellen Infektionen geschehen. Im Rahmen der, vor allem bei Transplantierten, bedeutenden Graft-versus-host-disease, durch die Gabe immunsuppressiver Medikamente oder die Behandlung mit lymphozytären Antikörpern [De Jong et al. 1998, Fishman et al. 1998] kann es ebenfalls zu einer Reaktivierung des Virus kommen.

1.2.3 Die Reinfektion

Sie wird verursacht durch ein Zytomegalievirus unterschiedlicher Antigenstruktur bei einem bereits seropositiven Organismus [Tegtmeier et al. 1989]. Die Unterscheidung zwischen Reaktivierung und Reinfektion ist von epidemiologischer Bedeutung [Toome et al. 1991]. Klinisch sind sie nicht zu unterscheiden. Es konnte aber gezeigt werden, dass bei einer Reinfektion in der Schwangerschaft es zu symptomatischen Infektionen beim Kind kommt, während dies nach einer klassischen Reaktivierung in der Regel nicht der Fall ist.

1.3 Epidemiologie

Grundsätzlich ist es wichtig, zwischen einer CMV-Infektion und einer CMV-Erkrankung mit Symptomen zu unterscheiden. Die Infektion ist weltweit verbreitet und tritt in allen geographischen Lokalisationen und sozioökonomischen Gruppierungen auf. Etwa 70 - 90 % der Menschen weltweit sind mit CMV infiziert [Drago et al. 2000]. In den Industrieländern sind etwa 50 %, in den Entwicklungsländern Afrikas und Asiens fast 100 % der Bevölkerung durchseucht. Mit dem Alter steigt die Prävalenz beständig an. Sechzigjährige sind bis zu 80 % mit dem Virus infiziert [Tegtmeier et al. 1989]. Im Gegensatz zu den infizierten Patienten ist der Prozentsatz der Erkrankten, d. h. derjenigen Patienten mit eindeutigen klinischen Symptomen, wesentlich geringer.

1.4 Symptomenkomplexe und Erscheinungsformen

1.4.1 Klinik der CMV-Infektion beim Tier

Neben denen unter Punkt 1.1.2 aufgelisteten Herpesviren beim Tier soll in diesem Abschnitt besonderes Augenmerk auf die CMV-Infektionen bei Tieren gelegt werden. Hierzu gehört unter anderem die **Einschlußkörperchenrhinitis** des Schweines (Cytomegalic inclusion disease), hervorgerufen durch das Suid-Herpesvirus-2. Diese Erkrankung kommt in den meisten europäischen Staaten sowie Nordamerika und Australien vor.

Zu den hervorstechenden Symptomen gehören Rhinitis mit Nasenausfluss und Niesen und allgemeine Atembeschwerden, häufig vergesellschaftet mit einer atrophischen Rhinitis. Es kommt zu typischen entzündlichen Veränderungen in der Nasenschleimhaut mit Zytomegalie und nukleären Einschlusskörperchen in den Schleimhautdrüsenepithelien. Die Erkrankung tritt vorrangig bei bis zu zwei Wochen alten Ferkeln auf. Diese können auch generalisiert erkranken. Bei älteren Tieren verläuft die Infektion klinisch meist inapparent.

Wie beim Menschen, wird das Virus über latent infizierte Individuen zellassoziiert (virushaltiges Nasensekret) in die Bestände eingeschleppt und weiter übertragen. Diagnostiziert wird die Infektion über den Nachweis der nukleären Einschlusskörperchen und die Zytomegalie der Zellen.

Es gibt zur Zeit keine Impfung und keine spezifische Therapie. Ähnlich der CMV-Infektion des Menschen ist auch das Equine-Herpesvirus-2 in der Pferdepopulation weit verbreitet. Die equine Zytomegalievirusinfektion verläuft im allgemeinen klinisch inapparent. Kommt sie jedoch zum Ausbruch, werden ihr eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen zugeordnet, u. a. die Keratitis superficialis.

Des Weiteren konnten verschiedene Zytomegalieviren bei Affen, Meerschweinchen und Mäusen isoliert werden.

1.4.2 Klinik der CMV Infektion beim Menschen

Die klinischen Bilder werden in drei Hauptvarianten unterteilt:

- i) **pränatal**
- ii) **postnatale** Infektion des gesunden Wirtes
- iii) **postnatale** Infektion des immunsupprimierten Wirtes

1.4.2.1 Pränatale Infektion

Die CMV-Infektion kommt bei 1 - 2 % der Neugeborenen vor. Neunzig Prozent dieser infizierten Neugeborenen sind bei der Geburt, soweit feststellbar, gesund. Bei etwa 10 % können Symptome beobachtet werden. Von diesen liegen bei etwa 50 % leichte Krankheitsanzeichen vor, welche sich später wieder völlig zurückbilden können. Dazu gehören u. a. Hepato- und Splenomegalie mit oder ohne Ikterus und Petechien.

Bei den restlichen 50 % kommen bleibende Veränderungen vor: gastrointestinale Dysfunktionen (ösophageale oder biliäre Atresie, Stenosen des Ileums oder des Kolons, Malformationen des Pylorus), neurologische Störungen (Schwerhörigkeit, Innenohrtaubheit- und damit verbundene Sprachprobleme, Enzephalitis, psychomotorische Retardierung, Paralyse), intrakraniale Kalzifikationen sowie körperliche und geistige Entwicklungsrückstände. In den seltensten Fällen sind die Neugeborenen so schwer geschädigt, dass sie nicht lebensfähig sind [Drago et al. 2000, Griffiths et al. 1993]. Im Verlauf ihrer Kindheit sterben etwa 10 - 20 % dieser Kinder [De Jong et al. 1998]. Andere überleben mit permanenten Abnormalitäten wie sensorischer Taubheit, Retardierung, Wachstums- und Lernstörungen. Bei etwa zwei Jahre alten Kindern kann es zur Ausbildung eines sogenannten Spätsyndroms kommen, welches mit psychomotorischer Retardierung einhergeht.

Wurden die Mütter in einem frühen Stadium der Schwangerschaft mit CMV infiziert, so ist die klinische Manifestation in der Regel massiver [Epps et al. 1995, Fine et al. 1985].

1.4.2.2 Postnatale Infektion

Die postnatale Infektion verläuft bei den meisten immunkompetenten Individuen asymptomatisch. Die Krankheitszeichen sind nur vorübergehend und von uncharakteristischer Natur und geringer gesundheitlicher Relevanz. Die meisten Menschen wissen nichts von ihrer Primärinfektion. Je nach Immunstatus eines Patienten kann es im Zuge einer CMV-Infektion zu sehr unterschiedlichen Krankheitsintensitäten kommen. Sie werden im folgenden beschrieben.

1.4.2.2.1 Infektion eines gesunden, immunkompetenten Wirtes

Sie verläuft zumeist asymptomatisch, da ein intaktes Immunsystem das Virus in der Regel erfolgreich bekämpfen und zurückdrängen kann. In weniger als 1 % der Fälle kann ein fieberhaftes Krankheitsbild mit grippeähnlichen Symptomen, Bilder einer milden Hepatitis, ein Mononukleose-ähnliches Syndrom mit, in seltenen Fällen, unerklärlichen Fieberschüben, Pharyngitis, Tonsillitis, Splenomegalie, leichte Erhöhung der Transaminasen, Lymphadenopathie und / oder Arthralgie beobachtet werden [Cohen et al. 1985, Weigand et al. 1980].

Jedoch sind auch bei immunkompetenten Patienten systemische Manifestationen beschrieben, die eines oder mehrere Organsysteme betreffen und mit eindeutigen klinischen Symptomen einher gehen können. Ikterische Hepatitis sowie in seltensten Fällen auch fulminante massive Lebernekrosen mit fatalem Ausgang konnten beobachtet werden. Das zentrale Nervensystem kann ebenfalls mit einbezogen werden, sowohl mit meningitischen und enzephalitischen Symptomen, wie auch als postinfektiöse Erkrankung im Sinne eines Laundry-Guillain-Barre Syndroms. Der Gastrointestinaltrakt kann gleichfalls durch CMV geschädigt werden. Ulzerationen vom Ösophagus bis zum Kolon sind auch beim immungesunden Patienten möglich [Cohen et al. 1985, Buckner et al. 1993].

1.4.2.2.2 Infektion eines immunsupprimierten Wirtes

Zu den immunsupprimierten Patienten zählen im wesentlichen Transplantierte, HIV-infizierte Patienten sowie Patienten mit angeborenen Immundefekten.

Sie weisen ein wesentlich höheres Gefährdungspotential auf, eine primäre oder eine reaktivierte Erkrankung mit CMV zu entwickeln. Die Mortalität einer CMV-Erkrankung in dieser Population ist mit 80 – 90 % mitunter sehr hoch [Drago et al. 2000]. Bei **HIV-infizierten Individuen** stellt die Reaktivierung bei fortschreitender Immunsuppression die Hauptursache einer CMV-Erkrankung dar. Sie ist eine AIDS definierende Erkrankung und gilt bei Auftreten als Zeichen für das Stadium des AIDS-Vollbildes. Hierbei korreliert das Auftreten der CMV-Erkrankung eindeutig mit dem Schweregrad der Immunschwäche. Patienten mit einem Abfall der CD4-positiven T-Lymphozyten unter 50 - 100/ μ l sind besonders gefährdet. Bei HIV-Patienten bedingt CMV eine weitere Streuung und einen chronischen Verlauf mit einem hohen Anteil an Rückfällen, pluriviszeralen Lokalisationen und schwerwiegenden Veränderungen an unterschiedlichen Organsystemen. Gastrointestinale Störungen beziehen sich auf alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes, vom Ösophagus bis hin zum Rektum. Hierbei können Kolitis, Ulzerationen mit Diarrhoe, abdominalem Schmerz, Gewichtsverlust und Blutungen vorkommen. Die Lungen, Nebennieren sowie das Zentrale Nervensystem (Enzephalitis) können ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen werden. Eine Lungenaffektion ist nach Transplantation recht häufig, wohingegen die Nebennierenerkrankung und die neurologische Symptomatik bei AIDS-Patienten öfters

auftritt [Katlama et al. 1993]. Die klassische Manifestation von CMV bei AIDS ist die Retinitis mit nachfolgendem irreversiblen Sehverlust in der Endphase der Erkrankung. Infolge einer CMV-bedingten Immunsuppression können bakterielle oder Pilzinfektionen, im Sinne von Superinfektionen, weitere mögliche Folgen sein. CMV-bedingtes Organversagen kann schließlich zum Tode führen. Nach Einführung der „Highly Active Antiretroviral Therapie“ mit Protease-Inhibitoren und Hemmstoffen der HIV-Reversen-Transkriptase hat die Häufigkeit aller opportunistischen Effekte u. a. der CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten rapide abgenommen [Jacobson et al. 1997].

Für **Transplantierte** stellt das Zytomegalievirus eine wichtige Komplikation dar, zumal die zusätzlichen Therapien gegen eine akute Abstoßung durch Immunsuppressiva die Aktivierung des Virus begünstigen können. Die Wahrscheinlichkeit, von einer CMV-Infektion unmittelbar durch die Transplantation betroffen zu sein, hängt von zwei Komponenten ab.

Dies können zum einen das nicht weiter beeinflussbare Verhältnis des Infektionsstatus von Spendern und Empfängern und zum anderen der relativ beeinflussbare Faktor der Immunsuppression bzw. der Antiabstoßungstherapie sein; zumal sich Auftreten und Abflauen der Krankheitssymptome nach der Intensität und Dauer der immunsuppressiven Therapie richten. In Tabelle 1 wird das Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit vom serologischen CMV-Status anhand von zwei unterschiedlichen Studien von Villanueva et al. [2000] und Zeevi et al [1998] prozentual angegeben.

Serostatus		Risiko einer CMV Erkrankung in %
Organempfänger	Organspender	
-	+	~ 71 % (höchstes Risiko für Primärinfektion)
+	-	56 – 58 % (leichterer Krankheitsverlauf)
+	+	63 – 68 % (leichterer Krankheitsverlauf)
-	-	~ 2 % (niedrigstes Risiko)

Tabelle 1: Prozentuale Darstellung des CMV-Erkrankungsrisikos in Abhängigkeit vom serologischen Status von Organempfänger und –spender (keine Stammzelltransplantationen), nach Villanueva et al. [2000] und Zeevi et al. [1998].

Bei Stammzellspendern und –empfängern sieht die Verteilung hingegen anders aus. Bei dieser Patientengruppe weist die Konstellation CMV-positiver Empfänger / negativer Spender das höchste Erkrankungsrisiko auf. Hat das übertragene Immunsystem jedoch seine volle Funktionsfähigkeit aufgenommen, scheint die Gefahr einer Erkrankung gebannt. Maßgeblich ist hierbei die Neubildung von Immunzellen, die auf CMV spezialisiert sind.

Die ersten Symptome treten bei Transplantierten in der Regel zwischen dem ersten bis vierten Monat nach der Transplantation auf [Buckner et al. 1993].

Während der ersten Virämie bleibt das Virus noch überwiegend zellgebunden. Nach etwa drei Monaten nimmt das Risiko einer Erkrankung bereits wieder ab. Das liegt daran, dass die direkt nach der Transplantation erforderliche starke Immunsuppression langsam reduziert werden kann und sich dadurch, ab diesem Zeitpunkt in den allermeisten Fällen, wieder ein stabileres Gleichgewicht zwischen dem Immunsystem und dem Virus einstellen kann. Hierbei spielt die zelluläre Immunantwort eine wesentliche Rolle.

Die bei Transplantierten auftretenden Symptome sind oft uncharakteristisch, so dass sich eine CMV Erkrankung klinisch allein nicht sichern lässt. Sie ist auch nicht immer symptomatisch. Als leichteste Form der Erkrankung können Fieber, ein allgemeines Krankheitsgefühl, leichte Gliederschmerzen oder Nachtschweiß auftreten. Es kann zu einer Leukopenie durch Knochenmarksbefall kommen („CMV-Syndrom“). Bei schwerwiegenderen Verläufen sind in der Regel wichtige Organe und Organsysteme erkrankt, wie z. B. Lunge, Niere, Darm, Leber, Nebenniere oder auch Gehirn. Die CMV-Retinitis, wie sie bei AIDS-Erkrankten beobachtet wird, ist bei Transplantierten eher selten.

Ein diagnostisches Problem, das sich bei transplantierten Patienten stellt, ist, die virale Infektion infolge indirekter Effekte von einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion zu unterscheiden. Dies ist besonders wichtig, weil das Zytomegalievirus eine Organabstoßung triggern kann.

In dieser Beziehung kann hinsichtlich der Therapie ein regelrechter Teufelskreis entstehen:

„CMV fördert die Abstoßung, die Antiabstoßungstherapie fördert CMV“

Zusätzlich besitzt CMV, durch die CMV bedingte Immunsuppression, pathogenetische Bedeutung für das Auftreten von Superinfektionen oder persistierender Infektionen sowie Epstein-Barr-Virus assoziierter lymphoproliferativer Erkrankungen, wie die Posttransplantationslymphome [Fishman et al. 1998].

1.5 Therapie

Nach Diagnose einer CMV-Erkrankung ist die Lebenserwartung eines immunsupprimierten Patienten deutlich eingeschränkt. Die Effizienz einer Vielzahl verschiedener CMV-Behandlungsstrategien wurde in diversen Studien belegt [Gane et al. 1997, Goodrich et al. 1991, Hebart et al. 1998].

1.5.1 Medikamente

Die zur Zeit für die antivirale Therapie zur Verfügung stehenden Medikamente sind u.a. Nukleosidanaloga wie Aciclovir, Ganciclovir und Cidofovir sowie das Pyrophosphatanalogon Foscarnet-Natrium und Hyperimmunglobuline.

All diese Substanzen können sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie bereits bestehender Infektionen eingesetzt werden, wobei Aciclovir und vor allem Immunglobuline deutlich unterlegen sind und in aller Regel nicht mehr verwendet werden. Alle Medikamente können z. T. jedoch schwerwiegende organspezifische und auch allgemeine unerwünschte Nebenwirkungen auslösen. Die meisten Substanzen müssen zum Erreichen therapeutischer Plasmakonzentrationen i.d.R. intravenös verabreicht werden.

Ganciclovir (Handelsname „Cymeven“) kann sowohl als Infusion, als auch oral gegeben werden. Insbesondere das Derivat Valganciclovir ist zur oralen Therapie geeignet. Es ist knochenmarks- und nephrotoxisch und kann u. a. zu einer Vielzahl weiterer Nebenwirkungen, wie gastrointestinaler Störungen, Depressionen, Seh- und Hörstörungen, führen. Cidofovir („Vistide“) ist weitestgehend nephrotoxisch, und daher sollte vor jeder Verabreichung die Nierenfunktion des Patienten geprüft werden.

Nierenversagen, aber auch Infektionen wie Lungenentzündungen konnten im Zuge einer Cidofovir-Therapie beobachtet werden. Foscarnet-Natrium („Foscarvir“) ist ebenfalls nephrotoxisch, kann aber auch eine Reihe anderer Nebenwirkungen wie Psychosen, Herzrhythmusstörungen, Fieber, Ödeme und ähnliches auslösen. Eine adoptive Immuntherapie mit CMV-spezifischen CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen wird bisher nur experimentell durchgeführt [De Jong et al. 1998].

1.5.2 Strategien der Therapie

In allen oben erwähnten Studien wurde unterschieden hinsichtlich der Behandlung einer manifesten CMV-Erkrankung, der **Prävention** bzw. **Prophylaxe** einer Infektion und der sogenannten **präemptiven Therapie**. Diese Einteilung kann historisch gesehen veranschaulicht werden.

1.5.2.1 Therapie einer manifesten CMV-Erkrankung

Ursprünglich wurden Patienten erst dann behandelt, wenn die ersten Symptome auftraten. Hierbei stellte sich jedoch oftmals kein Erfolg mehr ein und 50 % der erkrankten Personen verstarben, wie von Ljungman et al. [1998] bereits beschrieben. Obwohl die Virusreplikation und -ausscheidung vermindert werden konnten, zeigte sich keine positive Beeinflussung der Symptome und die Mortalität blieb unbeeinflusst. Analog zu Ergebnissen in der Therapie von anderen Herpesvirus-Infektionen, die nur dann erfolgreich ist, wenn sie sehr frühzeitig eingesetzt wird, ergab sich daher die Notwendigkeit einer prophylaktischen Therapie, die auf das individuelle Risiko des Patienten abgestimmt war.

1.5.2.2 Prophylaxe

Als grundsätzliche Maßnahme der Infektionsvermeidung ist z. B. die Transfusion CMV-seronegativer und/oder leukozytendepletierter Blutprodukte, die Transplantation von Organen seronegativer Spender sowie die Vorabgabe antiviral wirksamer Substanzen zu verstehen [Vogel et al. 1997, Balfour et al. 1999]. Auch der Bereich der Xenotransplantation ist hier anzusiedeln, da gezeigt werden konnte, dass z. B. das porcine Zytomegalievirus nicht auf den Menschen übertragen werden kann [Tucker et al. 1999].

Eine Impfung ist derzeit nicht möglich, jedoch befinden sich zur Zeit unterschiedliche Vakzinierungsstrategien in Erprobung.

Nach der Ära der konventionellen Therapie bei Symptombeginn wurde eine weitere Form der präventiven Therapie, mit der Gabe von antiviralen Substanzen und CMV-spezifischen Immunglobulinen, zum Zeitpunkt der Transplantation für einen Zeitraum bis etwa 100 Tage nach Transplantation entwickelt. Dieses Therapieschema war durchaus erfolgreich und reduzierte die Zahl der CMV-Erkrankungen während der Medikamentengabe erheblich. Oftmals zeigte sich allerdings eine Verschiebung der CMV-Erkrankung auf eine Zeit nach der antiviralen Prophylaxe, die aber erheblich milder verlief, da sich das Immunsystem zu diesem Zeitpunkt meist schon in gewissem Grade rekonstituiert hatte, bedingt durch die Verringerung der transplantationsbedingten Immunsuppression. Allerdings zeigte sich auch, dass aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen der Therapie bei vielen Patienten diese im Vordergrund standen. Die Nebenwirkungen konnten bis hin zum Verlust des Transplantates führen [Egan et al. 1998]. Dies war besonders tragisch, da, wie man heute weiß, nicht alle Patienten eine CMV-Reaktivierung oder Primärinfektion bekommen und selbst von denen nur ein bestimmter Prozentsatz eine klinisch manifeste CMV-Erkrankung erleidet. Die prophylaktische Therapie hatte also den Nachteil einer enormen Übertherapie mit schwerwiegenden Nebenwirkungen. Aus diesem Konsens heraus resultierte die Forderung nach einer weiter optimierten Behandlungsstrategie, der präemptiven Therapie.

1.5.2.3 Präemptive Therapie

Bei der präemptiven Therapie handelt es sich um das derzeit favorisierte Therapiekonzept. Sie wird bei Patienten durchgeführt, bei denen eine Virusreplikation frühzeitig nachgewiesen werden kann, die aber noch nicht klinisch erkrankt sind. Auf diesem Wege können Übertherapien vermieden und Nebenwirkungen reduziert werden.

Grundlage eines solchen Konzeptes ist die frühzeitige und sichere Diagnosestellung [Goodrich et al. 1991, Rubin et al. 1991]. Es galt daher eine schnelle Nachweismethode zu entwickeln, die aufgrund einer hohen Sensitivität Risikopatienten bereits vor Beginn einer Erkrankung detektieren kann [Boeckh et al. 1996].

1.6 CMV-Nachweismethoden

Es stehen zahlreiche indirekte (serologische) und direkte Nachweise zur Verfügung. Sie sind je nach Fragestellung einsetzbar und werden im folgenden erläutert.

Um eine pathogenetische Beziehung sowie eine gesicherte Diagnose zu erhalten, sind häufig unterschiedliche Methoden notwendig. Die prognostische Bewertung des CMV-Nachweises hängt stark von der Art des Untersuchungsmaterials, vom Patientenkollektiv und von der Sensitivität und Spezifität der Nachweisverfahren ab.

Das grundlegende Problem jeglicher CMV-Diagnostik ist in der Natur des Virus selbst verankert. Wie bereits eingangs erwähnt, hat das Virus die Fähigkeit zur latenten Infektion. So können zum Beispiel sehr sensitive DNA-Nachweisverfahren auch dann Viruserbmaterial nachweisen, wenn keine Replikation vorhanden ist. Diese, in der Latenz gewonnenen Virusnachweise entsprechen keiner Reaktivierung und bedürfen damit auch keiner Therapie. Weniger sensitive Methoden umgehen dieses Problem auf relativ einfache Weise. Aufgrund ihrer geringeren Sensitivität können sie latentes Virus nicht erfassen und weisen daher lediglich auf vorhandene Replikation hin. Doch selbst diese Ergebnisse können keine direkte Auskunft über die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Krankheitssymptomen geben. Das Ausmaß der klinischen Manifestation ist nicht unbedingt alleine von der Viruslast abhängig, sondern steht in engem Zusammenhang mit der individuellen Immunantwort.

Zusammenhänge zwischen der Entwicklung der Frequenz von CMV-spezifischen CD4 sowie CD8-T-Zell-Spiegel und der Entwicklung klinisch signifikanter Symptome wurden bereits von Sester et al. [2002] erkannt.

1.6.1 Serologische Nachweisverfahren

Sie dienen der Bestimmung des Infektionsstatus eines Patienten und der Diagnostik von Primärinfektionen bei immungesunden Personen. Zur Analyse der spezifischen Immunantwort werden im Serum IgG-, IgM- und gelegentlich IgA-Antikörper in Serumpaaren oder Einzelnachweisen bestimmt. Zur Detektion von CMV-spezifischen Antikörpern wird in erster Linie ein ELISA-Test durchgeführt. Als Antigen dienen u.a. Extrakte infizierter Zellen, aufgereinigtes Vollvirus oder rekombinante Proteine. CMV-Primärinfektionen können durch einen IgM-Nachweis und einen folgenden IgG-Anstieg nachgewiesen werden.

Ein IgG-Titeranstieg und ein spezifischer IgM-Nachweis, ergänzt durch einen IgA-Titer, können für eine reaktivierte Zytomegalieinfektion sprechen. Die serologischen Nachweisverfahren sind bei immunsupprimierten Patienten nur begrenzt einsetzbar, da die Immunantwort bei diesen Patientengruppen starken Schwankungen unterworfen ist und es aufgrund des Immundefektes zu einer eher inkonstanten Antikörperbildung kommen kann. So wird in der Literatur von nachweislich CMV-positiven/-erkrankten Patienten berichtet, deren Antikörperspiegel sich über Monate hinweg nicht veränderte [Toome et al. 1991]. Eigene Erfahrungen konnten dies bestätigen. Des Weiteren kann es bei immunsupprimierten Patienten sowie auch bei Säuglingen, bei einer Primär- oder rekurrenten Erkrankung zu einem Versagen bzw. einem verzögerten Einsetzen der spezifischen IgM-Antikörper-Bildung kommen. Sowohl die Antikörperproduktion wie auch der Antikörperabfall sind mitunter sehr starken individuellen Schwankungen unterworfen, so dass eine zweite Erkrankungsepisode unter Umständen nicht mehr nachgewiesen werden kann. Passiv übertragene Antikörper, mittels Transfusion, durch Immunglobuline oder diaplazentar übertragen, erschweren die Beurteilung.

Fazit: Der konventionelle serologische Nachweis ist im allgemeinen nur bei intaktem Immunsystem sinnvoll.

In der Transplantationsmedizin sind diesen Diagnosemethoden enge Grenzen gesetzt und aufgrund der oben aufgeführten Punkte sind sie nicht zur Überwachung von Risikopatienten und zum Einsatz in der präemptiven Therapie geeignet. Ihr Einsatzgebiet ist die CMV-Statusbestimmung vor Transplantation.

1.6.2 Histopathologische Virusnachweise

Die Nachweise finden in Geweben, wie z. B. Leber, Lunge, Niere oder Gehirn statt.

Die histologischen Untersuchungen können CMV-spezifische Gewebeveränderungen in Organen bzw. Organsystemen sichtbar machen. In hämatoxylin- und eosin gefärbten Schnitten zeigen sich vergrößerte, irregulär geformte Endothelzellen, die prominente intranukleäre Einschlüsse enthalten können („Cowdry type A“). Sie werden auch als „Eulenaugenzellen“ bezeichnet. Jedoch wurden auch bereits zytopathische Veränderungen ohne die charakteristischen Einschlüsse beobachtet [Browning et al. 1980].

Eine weitere schnelle und sensitive Methode zur Identifikation einer Vielzahl von zellulären Antigenen ist die indirekte Immunohistochemie. Über eine Färbung gelingt es, mittels spezifischer, monoklonaler Antikörper nukleäres CMV-Antigen in Paraffinfixierten-Geweben zu lokalisieren. Zur *in-situ*-Hybridisierung in Geweben kann u. a. auch eine Färbung mit markierten DNA-Sonden eingesetzt werden.

Fazit: Histopathologische Untersuchungen können CMV-Infektionen betroffener Organe beweisen oder bestätigen, sie sind allerdings zur Unterstützung einer präemptiven Therapie, Therapieindikation oder Monitoring aufgrund der notwendigen invasiven Techniken nicht geeignet.

1.6.3 Elektronenmikroskopische Examination

Obwohl man mittels Ultradünnschnitt-Verfahren die charakteristischen viralen Partikel der Herpesfamilie darstellen kann, ist diese sehr aufwendige Methode nicht in der Lage, das Zytomegalievirus von anderen Mitgliedern der Herpesfamilie zu unterscheiden.

1.6.4 Weitere direkte Virusnachweis-Verfahren

Mit Hilfe dieser Methoden können Viren, Antigene oder Virusgenome unabhängig von der Antikörperbildung, unter anderem auch vor der Serokonversion, nachgewiesen werden. Zur Diagnose von kongenitalen oder perinatalen Erkrankungen werden Virus oder Virusbestandteile im allgemeinen aus Urin- oder Speichelproben sowie aus Leukozytenfraktionen isoliert. Bei erwachsenen Patienten sind Urin und heparinisiertes Blut die geläufigsten Proben.

1.6.4.1 Virusanzucht in Zellkulturen

Dieses klassische Nachweisverfahren ist aus nahezu allen Untersuchungsmaterialien möglich. So werden z.B. unter anderem respiratorische Sekrete oder Urin mit Zellkulturen versetzt, die für das jeweilige Virus empfänglich sind. Das Zytomegalievirus wächst nur auf humanen Zellen, und im Gegensatz zu Herpes simplex entwickelt sich erst sehr spät ein zytopathischer Effekt. Mittels aufwendiger Verarbeitungsmethoden wird das Material homogenisiert, so dass freies Virus in die Kulturzellen eindringen und sich vermehren kann.

Die Kulturen sollten wenigstens zwei mal pro Woche kontrolliert werden um den fokalen zytopathischen Effekt frühzeitig zu diagnostizieren, der kann nach etwa fünf Tagen auftreten, jedoch sind auch zwei bis sechs Wochen keine Seltenheit. Die Dauer bis zum Auftreten des zytopathischen Effektes ist wahrscheinlich abhängig von der Viruskonzentration im Ausgangsmaterial. Zwar weist man mit dieser Methode infektiöses Virus nach, die Ausscheidung von Virus in Urin oder Speichel muss aber nicht unbedingt mit einer klinischen Erkrankung korrelieren. Die Sensitivität dieses Verfahrens kann durch eine Vielzahl von Faktoren wie Transport, Kontaminationen u. a., beeinträchtigt werden.

Fazit: Eine direkte Diagnosestellung ist mittels dieses wenig sensitiven Verfahrens, u. a. aufgrund der langen Kulturdauer, nicht sinnvoll [Gerna et al. 1991, Laudry et al. 1993, van der Bij et al. 1988]. Daher ist auch die Methode der Virusanzucht weniger geeignet für die derzeit favorisierte (präemptive) Therapieform, kann aber als Bestätigung für andere Nachweisverfahren eingesetzt werden und hat eine Bedeutung in der Gewinnung von Isolaten zur Resistenztestung.

1.6.4.2 Virus-Antigennachweis

1.6.4.2.1 pp65-Nachweis: Der derzeit bestetablierteste Parameter zur frühzeitigen Diagnose einer CMV-Infektion beruht auf dem quantitativen Nachweis des CMV-Antigens pp65 in den Zellkernen peripherer Blutleukozyten (Monozyten und Granulozyten) [Boeckh et al. 1998]. Dieser Test gilt als „Goldstandard“ in der Transplantationsmedizin und gewährleistet eine frühzeitige und sichere Diagnosestellung. Er wird in Kapitel 1.7. ausführlich beschrieben.

1.6.4.2.2 Kurz-Zeit-Kultur : Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus Virusisolierung und einem CMV-Antigennachweis aus peripheren Blutleukozyten oder Urin.

Zellkulturen, bestehend aus humanen Fibroblasten werden mit dem zu untersuchenden Material (u. a. Blut oder Urin) beimpft, anzenrifugiert und für mindestens 24 Stunden inkubiert.

Die entstandenen Präparate werden mit einem monoklonalen Antikörper i. d. R. gegen das immediate early-Protein pp72 des Zytomegalievirus gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Im Vergleich zur herkömmlichen Virusisolierung hat diese Methode den Vorteil, dass sie eine auf etwa zwei Tage verkürzte Kulturdauer aufweisen kann. Es konnte in unterschiedlichen Studien jedoch gezeigt werden, dass sowohl die Kurz-Zeit-Kultur als auch der Antigenämie-Test nahezu die gleiche Sensitivität aufweisen [van der Bij et al. 1988, Reina et al. 1998].

Fazit: Die verkürzte Kulturdauer ist bezüglich der konventionellen Virusisolierung zwar ein wesentlicher Vorteil, jedoch zur Unterstützung der präemptiven Therapie zeitlich noch zu unflexibel.

1.6.4.3 Virus-Genomnachweise

Hierbei kann zwischen zwei unterschiedlichen Nachweisverfahren unterschieden werden, der Gen- und der Signalamplifikation.

1.6.4.3.1. Genamplifikation : Mittels dieser Technik lassen sich selbst niedrigste Konzentrationen von Virus-DNA bzw. RNA mit hoher Spezifität in Untersuchungsmaterialien nachweisen. Das Grundprinzip ist die Vervielfältigung bestimmter Virus-spezifischer DNA/RNA-Sequenzen. Es werden vielfache Kopien der genetisch relevanten Sequenz erstellt, bis man schließlich genügend Untersuchungsmaterial hat, um das Vorhandensein eines bestimmten Virus belegen zu können. Ein sowohl als kommerzielle als auch als "in-house"-Methode erhältliches Nachweisverfahren dieser Art ist die **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**.

Mit ihr kann virales Genom aus nahezu allen Materialien nachgewiesen werden.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten.

An die im ersten Schritt in zwei Einzelstränge denaturierte DNA werden für die CMV spezifische Zielsequenz entsprechende Primerpaare angelagert. Ein Enzym, die Taq-DNA-Polymerase, beginnt im folgenden mit der Synthese neuer, mit dem Ausgangsprodukt identischer, DNA-Stränge. Die Zyklen werden unterschiedlich oft wiederholt und schließlich quantitativ oder qualitativ ausgewertet. Der Nukleinsäurenachweis gilt weitläufig als sensitivste Nachweisteknik.

Bis zu mehrere Wochen vor dem Auftreten klinischer Symptomatik können PCR-Ergebnisse bereits positiv ausfallen. Jedoch lassen sich keine direkten Rückschlüsse über die pathogenetische Rolle des Virus ziehen. Das virale Genom kann in einer Zelle enthalten sein, muss aber nicht zwangsläufig Auslöser einer Erkrankung sein. Mittels DNA-PCR kann somit nicht unbedingt zwischen latenter oder produktiver, lytischer Infektion unterschieden werden.

Fazit: Auf Grund seiner hohen Sensitivität wird dieses Verfahren den Ansprüchen der präemptiven Therapie sicherlich gerecht, der positive klinisch prädiktive Wert ist allerdings bei seropositiven Patienten gerade wegen dieser hohen Sensitivität eher gering [Gerna et al. 1994, Meyer-König et al. 1995]. Für die Therapiekontrolle oder bei Patienten mit häufigen Reaktivierungen ist der Test wegen der langen Markerpersistenz nur mit Quantifizierung der Genomkopienzahl geeignet, wobei die Zahl der isolierten Zellen in die Berechnung mit eingehen muss. Besonders geeignet ist die PCR zur Ausschlußdiagnostik einer CMV-Erkrankung aus Biopsiematerialien, Liquor oder respiratorischen Sekreten.

Eine weitere Nachweismethode der Art „Genamplifikation“ ist die sogenannte **NASBA-Technik (Nucleic-Acid-Sequence-Based-Amplification)**. Mittels dieses kommerziellen Testverfahrens wird Virus-RNA nachgewiesen. Während sich die PCR an den normalen Vorgängen bei der Replikation der DNA während einer Zellteilung orientiert, ist die Produktion von messenger-RNA das Vorbild für die NASBA Reaktion. In diesem Fall wird die CMV-pp67-RNA untersucht. Es handelt sich bei diesem Nachweisverfahren um eine isotherme Amplifikation von Nukleinsäuren bei 42 °C. Die virale RNA-Matrize wird in cDNA umgeschrieben und an ihr der komplementäre Gegenstrang gebildet.

Hierbei wird auch der T7-Promotor, dessen Einbau über einen ersten Primer geschieht, neu synthetisiert. Eine dritte Enzymkomponenten, die T7-Polymerase, bindet nun an den oben genannten Promotor und synthetisiert pro Strang ca. 100 neue RNA-Moleküle. Der Reaktionszyklus beginnt erneut.

Erste Versuche konnten zeigen, dass die RNA Nachweise der NASBA möglicherweise im Verlauf der CMV Infektion früher positiv werden als die DNA-Teste oder die der Antigenämieteste. Ein Vorteil ist sicherlich, dass der Nachweis mittels NASBA als kommerzielle Methode standardisiert ist und direkt virale transkriptionale Aktivität reflektiert werden kann. Der Nachweis von CMV-RNA-Transkripten ist allerdings sehr aufwendig und bietet laut einigen Literaturangaben [Meyer-König et al. 1995] in der klinischen Praxis keinen wesentlichen Vorteil gegenüber den DNA-Nachweisverfahren oder dem Antigenämietest.

1.6.4.3.2 Signalamplifikation : Bei dieser Methode wird Virusgenom nach Hybridisierung mittels verschiedener Detektionsreaktionen nachgewiesen. Der Amplifikationsschritt findet auf der Ebene der Nachweisreaktion statt. Der **Hybrid-Capture-Test (HCT)** gehört zu den Signalamplifikationsmethoden. Die virale, aus Blutleukozyten gewonnene DNA wird zuerst denaturiert und danach mit einer RNA-Gensonde markiert. Die entstehenden DNA-RNA-Hybride werden an eine feste Phase (Captureröhrchen) gebunden und über lumineszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen.

Die von ihnen ausgehenden Signale werden als relative Lichteinheiten mittels Luminometer gemessen. Die Quantifizierung der Proben erfolgt schließlich mittels vordefinierter Standards an Hand einer Eichkurve.

Der Hybrid-Capture-Test erfasst aufgrund seiner (im Vergleich zur PCR) eher geringeren Sensitivität weniger die latenten, sondern weitestgehend die produktiven Formen der CMV-Infektion. Die Werte korrelieren recht gut mit dem Auftreten klinischer Symptome. Da dieser Test nicht enzymabhängig agiert, fehlen auch die typischen Nachteile der PCR, wie z. B. Inhibition der Polymerase.

Dafür ist die Methode relativ zeitaufwendig [Chou et al. 1988], weist einen schlechten Automatisierungsgrad auf und ist nur mit EDTA-Blut als Untersuchungsmaterial evaluiert.

Fazit: Es handelt sich hierbei um einen Test, der zur Kontrolle und Überwachung von Risikopatienten recht gut geeignet, aufgrund der engen Materialauswahl jedoch nur begrenzt einsetzbar ist.

Eine weitere kommerziell erhältliche Methode dieser Art ist die **bDNA (branched = verzweigt)**. Sie verläuft vom Grundprinzip her analog zum Hybrid-Capture-Test. Mittels Signalamplifikation wird nicht das Virus selbst, sondern ein von den Sonden-Komplexen ausgehendes Signal vermehrt. Anders als beim HCT, bei dem die Signalamplifikation durch zahlreiche lumineszenzmarkierte Antikörper stattfindet, die an die RNA-DNA-Hybride binden, wird bei der bDNA, nach fünf verschiedene Hybridisierungs-Reaktionen, durch verzweigte lumineszenzmarkierte Sonden eine Signalamplifikation erreicht.

Auch hier wird durch externe Standards als Eichkurve eine Quantifizierung möglich. Sie ist derzeit kommerziell für CMV nicht mehr verfügbar.

Fazit: Die bDNA bringt auf Grund ihres sehr komplexen Verlaufs keinen wesentlichen Vorteil und ist nicht mehr kommerziell verfügbar.

1.7 Der pp65-Nachweis

1.7.1 Konventioneller pp65-Nachweis mittels Antigenämietest

Das Phosphoprotein (lower matrix protein) pp65 wurde in seiner Funktion bereits eingangs erwähnt. Es gehört zur Gruppe der early-Proteine, die im Rahmen einer CMV-Infektion früh gebildet werden und die für weitere Schritte der Virusvermehrung verantwortlich sind.

Vermutlich ist das Tegumentphosphoprotein pp65 das wichtigste Zielantigen für die zytotoxischen T-Lymphozyten [Riddell et al. 1997]. Als früher Marker einer Virusinfektion korreliert sein Auftreten recht gut mit der klinischen Manifestation und Intensität einer Erkrankung. Das macht aus ihm einen Parameter von großer diagnostischer Bedeutung [Boeckh et al. 1996].

Die phagozytierten viralen Proteine führen, vor allem auch bei einer CMV-Reaktivierung, zu einer an Leukozyten assoziierten Virämie. Auf dieser Grundlage lässt sich pp65 in einem Blutzellenausstrich verhältnismäßig leicht darstellen.

Die Detektion des Strukturantigens in isolierten, peripheren, polymorphkernigen Blutleukozyten mittels indirekter Immunfluoreszenz gilt als schnelle und durchaus auch als sehr sensitive Methode. Als Antikoagulantien scheinen Heparin- und Citratblut equivalent zu sein [Boeckh et al. 1996].

In den meisten Studien werden jedoch bevorzugt Proben aus Heparinblut behandelt.

Monoklonale Antikörper binden an phagozytiertes CMV-pp65-Antigen, welches sich in fixierten Blutaussstrichen präsentiert [Grefte et al. 1992]. Ungebundene Antikörper werden durch Waschen entfernt. Fluorescein-isothiocyanat-(FITC)-konjugierte Antikörper wiederum binden an die Antigen-Antikörper-Komplexe an. Die ungebundenen Konjugate werden durch eine zweite Waschung entfernt. In diesem Zusammenhang konnte im Vergleich zur Immunoperoxidase beobachtet werden, dass bei der Färbung mit FITC-konjugierten Antikörpern weniger Artefakte auftraten, welche die Beurteilung negativ beeinflussten.

Betrachtet man nun die Ausstriche im Fluoreszenzmikroskop, wird bei einer positiven Probe eine apfelgrüne Fluoreszenz des Zellkernes der infizierten Zelle deutlich. Nichtinfizierte Leukozyten erscheinen, durch die Gegenfärbung mit Evans-Blau, mit rötlich gefärbtem Zytoplasma und dunkelrot abgesetztem Kern. Die Auszählung der pp65-tragenden Zellen erlaubt eine gute Quantifizierung [Gane et al. 1997, Meyer-König et al. 1995]. Die Anzahl und Qualität der isolierten Leukozyten ist ausschlaggebend für eine adäquate Diagnose. Obwohl eine optimale Zellzahl noch nicht etabliert werden konnte, werten die meisten Studien Zellzahlen zwischen 100.000 und 200.000 Zellen aus [Boeckh et al. 1996, The et al. 1995]. Lediglich Zellzahlen unter 50.000 werden als unzureichend erachtet. Bereits eine einzige positive Zelle ist Indikator für ein positives Testergebnis.

Der Antigentest korreliert, wie bereits besprochen, recht gut mit einer CMV-Erkrankung. Aufgrund der guten Quantifizierung ist dieser Test auch zur Therapieverlaufskontrolle geeignet. Jedoch muss bei dieser Testmethode auf eine Reihe von Nachteilen hingewiesen werden.

Obwohl in der Literatur immer wieder versucht wird, den prädiktiven sowie den prognostischen Wert des Nachweises zu ermitteln [Torrus et al. 1999], ist die

konventionelle Analyse von pp65 nicht standardisierbar. Gründe hierfür sind einmal technische Details sowie vor allem die subjektive visuelle Auswertung des Testes [The et al. 1995, Garcia et al. 1996, Perez et al. 1996]. Weitere Nachteile sind eine hohe Personalbindung, da keine Automatisierung des Nachweises möglich ist, der große zeitliche Aufwand von mindestens fünf Stunden und auch die große Blutmenge von 6 - 8 ml, die für den Test benötigt wird. Sie ist vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern kaum zu realisieren.

Des Weiteren hängen die im Test bestimmten Parameter von einem schnellen Probentransport ab, da es nach einer längeren Zwischenlagerung der Blutproben mitunter bei der Auswertung zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann.

In einer Studie von Schäfer et al. [1997] konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der Ag-positiven Zellen über eine zeitliche Lagerung hin, vor allem bei Raumtemperatur, signifikant abnahm, während die DNA-Werte über den entsprechenden Zeitraum hinweg relativ konstant blieben. Zumindest die Isolierung und Fixierung der Zellen sollte bis spätestens sechs Stunden nach Blutentnahme durchgeführt werden, um die Frühdiagnostik einer Virämie, die Quantifizierbarkeit und eine punktuelle Therapieerfolgskontrolle zu gewährleisten [Gerna et al. 1992, Meyer-König et al. 1995].

Fazit: Mit seiner frühzeitigen und sicheren Diagnosestellung unterliegt das Verfahren genau den Anforderungen der präemptiven Therapie. Eine Detektion des CMV-Antigens ist weit vor Auftreten erster Symptome möglich.

Der Antigenämietest wurde bereits in einer Vielzahl unterschiedlichster Testreihen mit diversen anderen Nachweismethoden, z. B. mit der quantitativen PCR, dem Hybrid-capture Test oder der bDNA [Lo Cy et al. 1997, Meyer-König et al. 1995, Wattanamano et al. 2000] verglichen. Die Ergebnisse scheinen vergleichbar zu sein, wobei die Beurteilung durch die fehlende Standardisierung problematisch ist.

Der pp65-Antigenämie-Test stellt, trotz fehlender Standardisierung, den derzeitigen „Goldstandard“ zur Früherkennung einer CMV-Replikation in der Transplantationsmedizin dar. Im Rahmen der Evaluation und der Automatisierung des Antigenämietestes haben bereits einige Modifikationsversuche stattgefunden, welche

auch die pp65-Analyse mittels Durchflußzytometrie miteinschlossen [Imbert et al. 1997, Poirier-Toulemonde et al. 2000].

1.7.2 FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen

Die Durchflußzytometrie bzw. FACS-Analyse („**fluorescence activated cell sorting**“) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen, vorzugsweise Leukozyten, auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Bei den im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen wurden vorrangig Monozyten und Granulozyten gemessen. Zellen können im FACS nach Oberflächenmolekülen bzw. –markern oder über ihre Expressionsdichte sortiert werden. Während des Messvorgangs werden die Zellen in einer FACS-Trägerflüssigkeit durch Überdruck stark beschleunigt (500 - 4000 Zellen pro Sekunde), so dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden. Dieser Vorgang wird hydrodynamische Fokussierung genannt. Durch gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90° Seitwärtsstreulichtes werden die relative Zellgröße und die relative Zellgranularität von Einzelzellen bestimmt, wobei sowohl die Granularität als auch die Größe direkt mit der Lichtintensität korreliert ist.

Die Einheit der FACS-Analyse ist somit die relative Lichtintensität, genauer gesagt, gemessen wird der relative „Lichtverlust“. Werden die zu untersuchenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Primär- oder Sekundärantikörpern markiert, erfolgt durch den Argon-Laser, der Licht mit der Wellenlänge von 488 nm generiert, eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, deren emittiertes Licht über ein optisches System gemessen wird. Der Messbereich gliedert sich in 1024 verfügbare Kanäle, in welche die Zellen nach unterschiedlicher Expression der Oberflächenantigene, die sich durch die Intensität der Fluoreszenz bemerkbar macht, eingeteilt werden. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt i. d. R. über das Histogramm bzw. das Punkt-Wolkendiagramm der einzelnen Fluoreszenzen, auch „dot plot“ genannt. Die Zellen lassen sich durch das Setzen von Analysefenstern, sogenannten „gates“, in unterschiedliche Populationen einteilen und genauer analysieren.

Die Vorteile der FACS-Analyse gegenüber dem konventionellen pp65-Antigenämie-Testes sind:

- eine deutliche Reduktion des Arbeitsaufwandes, der beanspruchten Zeit und des Personalaufwandes. Durch die zeitliche Reduzierung, von vorher mindestens fünf Stunden auf nunmehr etwa drei einhalb Stunden, mit der FACS-Methode, wäre eventuell sogar eine sog „Notfallbestimmung“ möglich, die aufgrund der Dynamik der CMV-Infektion häufig notwendig ist, bisher aber von keiner CMV-Nachweismethode geleistet werden kann.
- eine objektive und vom Untersucher unabhängige Analyse mittels Durchflußzytometrie; dadurch auch die Möglichkeit der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Diagnostikzentren.
- eine geringe Ausgangsblutmenge. Zur FACS-Analyse werden nur 500µl Blut, gegenüber den 8 ml der konventionellen Methode, benötigt. Dadurch könnte auch die Untersuchung bei Neu- und Frühgeborenen möglich werden.
- die Möglichkeit der Differenzierung der Leukozyten-Subklassen, in denen pp65 nachgewiesen werden kann. Hiermit könnten möglicherweise zusätzliche Hinweise gewonnen werden, die prädikativen Wert besitzen.

1.8. Bisherige Resultate zur FACS-Analyse

Der Nachweis von pp65 mittels FACS wurde bisher nur von einigen wenigen Arbeitsgruppen versucht, und erste Ergebnisse haben gezeigt, dass eine solche Methode durchführbar und in ihrer Quantifizierung der Viruslast durchaus objektiv ist. Auf die Ergebnisse dieser Arbeiten wird in der Diskussion ausführlicher eingegangen.

Zwei erste Aufarbeitungsmethoden für die Fixierung und Permeabilisierung pp65-haltiger Leukozyten sind in der Literatur in diesem Zusammenhang bereits bekannt [Imbert Marcille et al. 1997]. Sie beinhalten die Inkubation mit 1 % Paraformaldehyd und einerseits mit kaltem 80 % Methanol sowie andererseits mit 0,2 % Tween 20.

Beide Ansätze zusammen inkubierten über Nacht bei -20 °C bzw. 4 °C. Im folgenden wurden von Imbert Marcille et al. [1997] sieben unterschiedliche kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen CMV-pp65 getestet. Die positiven Patientendaten wurden mittels Kurz-Zeit-Kultur und DNA-Analyse bestätigt.

Um eine akkurate und reproduktive Quantifizierung zu erhalten, wurden von dieser Arbeitsgruppe wenigstens 50.000 Signale im FACS ausgezählt.

Der 1C3-Antikörper und die Paraformaldehyd-Methanol-Methode konnten schließlich als die besten Bearbeitungsmethoden angesehen werden. Die eigentlichen FACS-Ergebnisse wurden als der Prozentsatz der pp65-tragenden Leukozyten angegeben. Der Grenzwert lag im Durchschnitt bei 0,05 % pp65-positiver Leukozyten, bei einigen Antikörpern sogar bei 0,10 %. Die hier ermittelten Zahlen wurden im Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse analysiert und ins Verhältnis gesetzt mit Daten von Patienten ohne akute Infektion.

Die Sensitivität der FACS-Methode wurde niedriger eingestuft als die, die theoretisch mit der Antigenämie-Methode erreicht werden kann. Dennoch konnte im Großen und Ganzen eine gute Übereinstimmung zwischen der Bestimmung der DNA-Viruslast und dem Level der pp65-Detektion mittels FACS gefunden werden. Da in dieser Studie von einem verhältnismäßig kleinen Patientenkollektiv (20 Personen) ausgegangen wurde, konnten die Ergebnisse nicht unmittelbar in einen praktischen, klinisch bedeutsamen Zusammenhang gebracht werden. Eine Rolle bei der Quantifizierung der Viruslast schien den Autoren allerdings wahrscheinlich. Folgestudien von Poirier-Toulemonde et al. [2000] beruhten im wesentlichen auf den hier gewonnenen Erkenntnissen. Sie untersuchten die klinische Relevanz der direkten Quantifizierung der pp65-Antigenämie mittels FACS-Analyse. Eine Vielzahl von Transplantatempfängern wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Kurz-Zeit-Kultur und quantitativer PCR untersucht.

Die FACS-Ergebnisse korrelierten weitestgehend mit den Ergebnissen der quantitativen PCR und denen der herkömmlichen pp65-Analyse. Im Durchschnitt waren sie früher und länger positiv als die des Antigenämie-Testes. Eine weitere Studie von Essa et al. [2000] sollte den diagnostischen Nutzen der pp65-FACS-Analyse bewerten. Hier wurde erstmals ein positiver (97,5 %) und ein negativer (82,4 %) prädiktiver Wert zur FACS-Analyse ermittelt. Im Rahmen dieser Studie wurden allerdings nur diejenigen Patientenproben im FACS gemessen, welche die höchsten Werte im konventionellen Antigenämietest aufzeigten. Alle Untersuchungen weisen hinsichtlich der Probenaufarbeitung allerdings durchaus Schwächen auf. Aufgrund des von nahezu allen Arbeitsgruppen verwendeten Protokolls werden wegen der langen Inkubationszeiten etwa 18 Stunden oder länger für einen Testdurchlauf veranschlagt.

1.9 Fragestellung / Ziel

Wie bereits dargestellt, ist die Detektion des CMV Proteins pp65 von signifikanter Bedeutung für die Diagnostik und die Therapiekontrolle einer CMV-Erkrankung bzw. -infektion. In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, die CMV-pp65-Diagnostik zu optimieren. Dazu sollte eine schnellere und in der Auswertung objektivere Methode mittels FACS-Analyse entwickelt werden. Diese Methode sollte soweit etabliert und evaluiert werden, dass sie in der Routinediagnostik einsetzbar sein würde. Neben den klassischen Charakteristika einer Methodenevaluierung sollte in einer Vergleichstestung mit der konventionellen pp65-Antigenbestimmung und der Hybrid-Capture-Methode die Qualität des neuen Nachweisverfahrens evaluiert werden.

Das Arbeitsprogramm sollte die folgenden Punkte umfassen:

1.9.1 Etablierung

Die Optimierung der Methode bzw. der präanalytischen Phase sollte als wesentliche Punkte die Probengewinnung, -transport, oder -lagerung sowie die Stabilität des entnommenen Materials, sprich den Zeitrahmen, in dem der Test nach Probenentnahme stattfinden musste, umfassen. Anhand von zehn pp65-positiven Proben sollte die Einwirkung von verschiedenen Einflussfaktoren untersucht werden:

- i. verschiedene Antikoagulantien bei der Probengewinnung (EDTA, Heparin)
- ii. verschiedene Zeitpunkte der Probenaufarbeitung nach Probenentnahme (sofort und nach 24 Stunden)

1.9.2 Evaluierung

Erarbeitet werden sollten folgende Aspekte:

- i. Die Sensitivität der FACS-Analyse anhand von zehn Risikopatienten nach Lungen-, Herz-, Nieren- oder Stammzelltransplantationen. Die Patienten befinden sich in einem Monitoringprogramm, das klinikintern bereits erfolgreich zur Früherkennung von CMV-Erkrankungen eingesetzt wird. Es sollten zu jeder Messung mittels FACS immer auch eine entsprechende Patientenprobe mittels konventionellem pp65, und eine entsprechende

CMV-DNA-Messung mittels Hybrid-Capture-Test als Vergleichsteste mitgeführt werden.

- ii. Die Spezifität der Methode sollte an einem Kollektiv von 100 klinisch gesunden Probanden nach Lungen-, Herz-, Nieren oder Stammzelltransplantationen ohne aktive CMV-Replikation (d. h. gesunde CMV-IgG positive Patienten) untersucht werden.

2 MATERIALIEN**2.1 Geräte**

- sterile Sicherheitswerkbank Fa. HERAEUS (Wiesbaden)
- Zentrifuge, Labofuge GL Fa. HERAEUS CHRIST (Bensheim)
- Vortexer MS2 Minishaker Fa. IKA Labortechnik (Staufen)
- Celloshaker Variospeed RENNER GmbH (Dannstadt)
- FACScan Fa. BECTON DICKINSON (Heidelberg)
- Immunfluoreszenzmikroskop C. Zeiss (Jena)

2.2 Plastikwaren und Gebrauchsgegenstände

- 10 ml Rekordspritze Fa. BRAUN (Melsungen)
- Kanülen Microlane 3 Fa. BECTON DICKINSON (Heidelberg)
- 50 ml und 10 ml Kunststoffröhrchen Fa. SARSTEDT (Nümbrecht)
- Objektträger „Cytoträger“ Fa. SHANDON (Frankfurt)
- 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube Fa. BECTON DICKINSON (Heidelberg)
- sterile Einmalpipetten (10 ml) Fa. RATIOLAB (Dreiech)
- sterile 3,5 ml Transferpipetten Fa. SARSTEDT (Nümbrecht)

Die einzelnen Chemikalien werden mit dem Namen der Hersteller bei den jeweiligen Lösungen und Reagenzien angegeben. Die Auflistung erfolgt in der Reihenfolge des Gebrauches.

2.3 Konventioneller pp65-Antigenämie-Test

- **Gradient zur Leukozytenseparation** „Plasmasteril“; HES 450/07 in isoton. NaCl-Lsg. (6 % Hydroxyethylstärke) Beutel zu 500 ml (Fa. FRESENIUS; Bad Homburg), je 2 ml in 10er Rekordspritzen aufgezogen (bei 4 °C lagern)
- **Erythrozyten-Lyse-Lösung**
 - 8,3 g NH₄CL (Fa. ICN; Eschwege)
 - 1,0 g KHCO₃ (Fa. MERCK; Darmstadt)
 - 0,03 g EDTA (Fa. MERCK) ad 1000 ml A. dest.

- **PBS** von Dulbecco $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei = gepufferte Kochsalz-Lösung nach Dulbecco pH 7,2
- **Fetales Kälberserum (FKS)** GIBCO BRL; Fa. LIFE technologies; Karlsruhe
das fetale Kälberserum wurde nach dem Inaktivieren leukozytenfrei filtriert und zu je 25 ml portioniert bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.
- **Fixierlösungen** Lösung 1: 25 ml 37 % Formaldehyd (Fa. MERCK)
10 g Sucrose (D+) Saccharose (Fa. ROTH; Karlsruhe)
ad 500 ml PBS
- **Waschlösung** Lösung 2: 10 ml FKS
ad 1000 ml PBS
- **Permeabilisierungslösung** Lösung 3: 50 g Sucrose
2,5 ml Igepal CA-630 (Fa. ICN; Eschwege)
5 ml FKS
ad 500 ml PBS
- **Antikörper-Testkit** CMV pp65 Antigenemia-IFT Kit/ Katalog-Nummer C3247/C3244 (Fa. VIRION/CHEMICON; München)
 1. anti-CMV IgG von Maus (monoklonaler Antikörper), Tween 20
 2. anti-Maus IgG von Ziege, FITC-konjugiert, Evans-Blue
 3. Eindeckmedium

2.4 FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen

- **BSA** Bovines Serumalbumin pH 7,0 (Fa. SERVA; Heidelberg)
- **FACS™ Lyse-Lösung** (Fa. BECTON DICKINSON; Heidelberg) # 349202
100 ml (10x konz.) 1: 10 in A. dest. verdünnen
- **FACS-Puffer** 500 ml PBS
25 ml fetales Kälberserum

- 2,5 g BSA
- 3,5 ml 10 % NaN₃ (Fa. MERCK)
- **Saponin** (Fa. ICN; Eschwege) Saponin practical grade
- **Saponin-Puffer** 200 ml FACS-Puffer
4 ml 5 % Saponin-Lösung : in 30 ml sterilem PBS,
bei 4 °C gelagert

Die Saponin-Puffer-Lösung wurde einmal wöchentlich neu angesetzt, da sie recht schnell verpilzte.

- **1 % Paraformaldehyd-
lösung** Stammlösung von 4 % herstellen, in PBS
(Fa. MERCK; Darmstadt)
- **1. Antikörper** CINApool Anti-HCMV-pp65, 1 mg/ml 1C3 (IgG)
(Fa. VIVA; Köln) # Ref. 11-002
- **2. Antikörper** Goad-Anti-Mouse-Ig G+Ig M, FITC-conjugated,
„Human absorbed“, 1 mg/ml (Fa. VIVA; Köln), #
Ref. 50 – 011
- **FACS-Reinigungslösung** (Fa. DAKO; Hamburg)

Hier eventuell nicht aufgeführte Materialien sowie bei der Auswertung der Daten verwendete Analysenprogramme werden bei den zugehörigen Methoden bzw. in der Diskussion erwähnt.

2.5 Patienten

Während der Methodenevaluation wurde in der FACS-Analyse ausschließlich Heparinblut aus 10 ml Monovetten als Probenmaterial verwendet. Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde zusätzlich EDTA-Blut in der Durchflußzytometrie eingesetzt. Für diese Studie wurden 110 Patienten der Universitätskliniken des Saarlandes in insgesamt 234 vergleichenden Messungen über einen Zeitrahmen von sieben Monaten untersucht. Es handelte sich bei den Patienten um 16 Nierentransplantierte, vier Herz- , drei Leber- , 20 allogene Stammzell- und 46 Lungentransplantierte.

Sie wurden im Rahmen des klinikinternen Monitoringprogramms mittels konventionellem pp65- und Hybrid-Capture Test in regelmäßigen Abständen auf ihren CMV-Status hin kontrolliert.

Bei Nachweis von CMV-DNA oder von pp65 wurde zumeist eine Therapie im Sinne einer präemptiven Therapie eingeleitet, so dass über eventuelle klinisch signifikante Symptome einer CMV Erkrankung keine verlässlichen Aussagen gemacht werden konnten. Bei 21 der in der Studie eingesetzten Patienten handelte es sich nicht um Transplantierte, sondern um immungeschwächte Patienten (z. B. HIV-Patienten) mit Verdacht auf CMV-Reaktivierung bzw. Primärinfektion. Die Blutproben stammten aus den Routineuntersuchungen der Abteilung für Virologie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg.

3 METHODEN**3.1 Konventioneller pp65-Antigenämietest**

Die Leukozytenisolierung erfolgte am Tag der Entnahme sofort nach Eintreffen der Proben im Labor.

3.1.1 Isolierung

Das Blut wurde in der Monovette gut gemischt, ca. 6 - 8 ml wurden in einer Spritze mit 2 ml einer 6 %igen Dextranlösung aufgezogen, die Spritze auf einem Ständer in 45° Neigung mit Kanülenansatz nach oben gelagert und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Kanüle wurde gegen eine andere Kanüle, die um 90° abgelenkt war, ausgetauscht und der Überstand aus Plasma, Zuckerlösung und Leukozyten in ein 50 ml Kunststoffröhrchen übertragen. Dann wurden 20 ml kalte Erythrozyten-Lyse-Lösung zugegeben, um eventuell vorhandene Reste von Erythrozyten zu entfernen und der Ansatz für weitere zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Das Röhrchen wurde auf 50 ml mit Waschlösung aufgefüllt, der Inhalt durchmischt und bei 400 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mittels Vortex durchmischt. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt.

Es verblieb in der Regel 1 ml der Leukozyten-Lösung im Röhrchen.

3.1.2 Zellzählung

Um optimale FITC-Markierungen zu erzielen und quantitative Ergebnisse angeben zu können musste eine Zellzahl von ungefähr 2×10^6 Leukozyten pro Milliliter erreicht werden. Dazu galt es, das Pellet entsprechend einer Leukozytenzählung mit PBS zu verdünnen. In der Regel blieb, wie bereits oben erwähnt, etwa 1 ml Zellsuspension zurück, es empfahl sich daher eine Vorverdünnung von 1:5 zu besserer Auszählung des Mittelquadrates einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

Das Mittelquadrat der Zählkammer besteht aus 16 Kleinstquadraten. Ein Kleinstquadrat hat eine Fläche von $0,0625 \text{ mm}^2$ und eine Kammertiefe von 0,2 mm. Das Volumen eines Kleinstquadrates beträgt $0,0125 \text{ mm}^3$.

Das aus 16 Kleinstquadraten bestehende Großquadrat hat somit ein Volumen von 0,2 mm³ (bzw. µl). Die gezählte Zellzahl in der Kammer entspricht der Größe N. Unter Miteinbeziehung der Ausgangsverdünnung errechnet sich die Zellzahl in 1 ml PBS mit folgender Formel:

$$\text{isolierteZellzahl} = \frac{N \times 1000 \times 5}{0,2}$$

Wobei N die gezählte Zellzahl in der Zählkammer ist.

Aus der auf diese Weise hergestellten Zellsuspension wurden je 50 µl auf jedes Feld des Objektträgers aufgetragen. Es befanden sich somit ca. 100.000 Zellen pro Feld, die am Ende mit dem Mikroskop ausgezählt und beurteilt werden mussten. Färbung und Fixierung werden in den folgenden Abschnitten ausführlich behandelt.

Pro Patient wurde ein Objektträger mit je zwei Auftragsfeldern (siehe Abbildung 2) hergestellt. Ein Feld wurde, während des im folgenden beschriebenen Färbeprozesses, komplett mit einem pp65 spezifischen Antikörper und einem FITC-markierten Zweitantikörper gefärbt, wohingegen das zweite Feld nur mit dem zweiten Antikörper gefärbt wurde, um unspezifische Fluoreszenzen erkennen zu können. Die Objektträger wurden schließlich unter der Sterilbank luftgetrocknet.

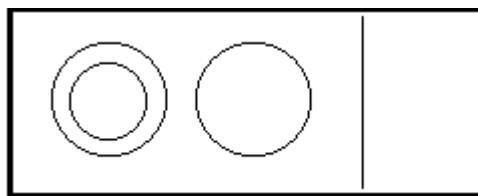


Abbildung 1: Ansicht eines Objektträgers mit dem zusätzlichen Kontrollfeld rechts, welches nur mit dem zweiten Antikörper gegengefärbt wurde, im Gegensatz zu dem eigentlichen Probenfeld links, welches mit beiden Antikörpern gefärbt wurde.

3.1.3 Fixierung

Die trockenen Objektträger wurden, in der im folgenden beschriebenen Reihenfolge, in die in Kapitel 2 bereits beschriebenen Lösungen eingetaucht und jeweils mittels Celloshaker schwenkend bewegt.

Zuerst wurden sie für zehn Minuten in Lösung 1, die eigentliche Fixierungslösung, eingetaucht.

Zum Waschen wurden die Objektträger im folgenden für fünf Minuten in Lösung 2 eingebracht und auch hier mittels Celloshaker bewegt. Schließlich wurden sie für weitere fünf Minuten in die Permeabilisierungslösung, Lösung 3, gestellt und ein letztes Mal in der Waschlösung, Lösung 2, für zehn Minuten gewaschen.

Die Objektträger wurden sofort gefärbt, oder bei -70 °C eingefroren.

3.1.4 Färbung

Vor dem Färben, direkt nach der Fixierung oder nach dem Auftauen, wurden die Objektträger für circa zehn Minuten in PBS schwenkend gespült und um die Proben markierenden Ringe gründlich abgetrocknet. Die Zellen durften während des gesamten Färbevorganges nicht eintrocknen.

Auf das mit den zwei Kreisen markierte Feld wurden, gemäß den Herstellerangaben im Testkit, 40 μl des monoklonalen Antikörpers gegen pp65 (= anti-pp65-IgG von der Maus) aufgebracht, auf das andere Feld wurden 40 μl PBS gegeben.

Die Objektträger wurden für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden für fünf Minuten in PBS, in einer Schale mittels Celloshaker schwenkend, abgewaschen. Beide Felder wurden nun mit jeweils 40 μl des zweiten Antikörpers (= anti-Maus IgG von Ziege, FITC-konjugiert) gefärbt und erneut für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. In der Antikörperlösung des zweiten Antikörpers war auch das zur Gegenfärbung notwendige Evans-Blau enthalten. Nach diesem Schritt wurden nicht gebundene Antikörper wiederum mittels PBS-Waschung entfernt.

Die Objektträger wurden mit dem Eindeckmedium des Testkits unter Öl im Immunfluoreszenzmikroskop (Fa. ZEISS; Planapo 63/ 1,4 Oel) ausgewertet.

3.1.5 Beurteilung

Patientenproben, bei denen im Rahmen der Zellzählung weniger als 2×10^6 Zellzahlen pro ml vorlagen, wurden von der Beurteilung ausgeschlossen.

Bei den anderen Proben zeigten sich die Leukozyten bei der Betrachtung der Objektträger im Mikroskop als kreisrunde Strukturen mit feuerrotem Zytoplasma und dunkel abgesetzten Kernen.

Die rote Farbe der Zellen wurde durch die Evans-Blau-Gegenfärbung gewährleistet. CMV-pp65-Partikel sind durch die Färbung als apfelgrün leuchtende Strukturen im Zellkern vor rotem Hintergrund erkennbar, die z.T. grieselig oder schollig erscheinen. Apfelgrün leuchtende Partikel oder Strukturen, die nicht in der gleichen Schärfenebene wie die Zellen lagen, wurden als Artefakte gewertet (Staub, Verunreinigungen u.ä.), ebenso solche, die im Zellplasma oder ganz außerhalb der Zellen lagen. Bei manchen Proben erschien der Hintergrund „sternenhimmelartig“ übersät mit winzig fluoreszierenden Punkten. Auch diese wurde als unspezifische Fluoreszenzen gewertet. Gelegentlich erschienen Zellen wie mit Watte umhüllt oder überlagert von diffuser zartgrüner fluoreszierender Materie umgeben.

Es handelte sich hierbei jedoch in der Regel um Hintergrundfluoreszenzen mit unspezifischer Morphologie, die in der Beurteilung als negativ bewertet wurden. Lagen diese Strukturen jedoch in extremem Ausmaß vor, ließen sie keine adäquate Beurteilung zu. Solche Proben wurden als unspezifisch beurteilt.

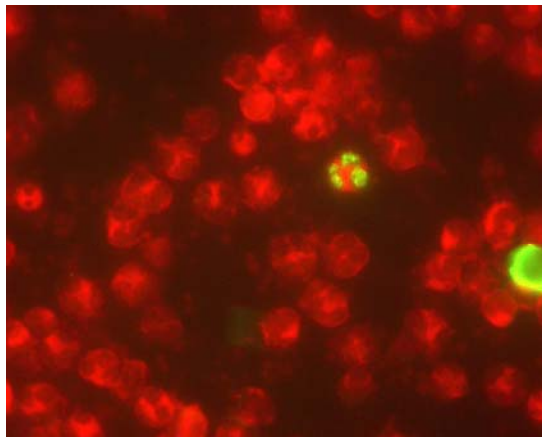


Abbildung 2: Eine mit dem Antigenämietestkit gefärbte positive Zelle, mit den typischen grün-fluoreszierenden Kernsegmenten in der Mitte der Abbildung sowie eine diffus grün gefärbte Struktur unspezifischer Fluoreszenz am rechten Bildrand.

Eine einzige positive Zelle steht bereits für ein positives Testergebnis. In wie fern dieses Ergebnis von klinischer Relevanz, ist wird in der Diskussion weitergehend erörtert werden. Deutlich sind in der obigen Abbildung auch die nicht infizierten Zellen mit ihren dunkel abgesetzten Kernen zu erkennen. Bei der Struktur am rechten Bildrand handelt es sich um eine unspezifische Fluoreszenz, die in einer anderen Schärfenebene liegt.

3.2 FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen

Es wurden die gleichen Patientenmaterialien verwendet, wie zur Durchführung der konventionellen pp65-Testung.

3.2.1 Isolierung / Probenaufarbeitung

Aus jeder für die Antigenämietestung vorgesehenen Patientenprobe wurden, nachdem das Blut gut gemischt wurde, für die pp65-FACS-Analyse 500 µl Blut in ein 15 ml Kunststoffröhrchen überführt. Die 4,5 ml hinzugegebene Lyse-Lösung diente der Erythrozytenlyse. Die Röhrchen inkubierten für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Für weitere zehn Minuten wurde bei 350 g zentrifugiert. Mittels steriler Einmalpipette wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und auf dem Vortex gemischt. Es wurde erneut für zehn Minuten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der verbliebene Überstand wurde wiederholt mit einer sterilen Einmalpipette abgesaugt und verworfen, das verbliebene Pellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und mittels Vortex resuspendiert. Die isolierten Zellen wurden nun direkt gefärbt, oder sie konnten bis zu fünf Tagen bei 4 °C aufbewahrt werden. Aus der zuvor hergestellten Suspension wurden nun jeweils 200 µl in zwei FACS-Röhrchen übertragen.

Pro Patient wurde ein Doppelansatz, analog zu den beiden Feldern des pp65-Objekträgers, durchgeführt. Ein Röhrchen wurde als eigentliche Testprobe mit beiden Antikörpern versehen, das zweite Röhrchen wurde, als interne Kontrolle, nur mit dem zweiten FITC-markierten Antikörper gefärbt.

3.2.2 Färbung

Die Färbung erfolgte direkt in den FACS-Röhrchen. Für zehn Minuten wurden diese bei 350 g zentrifugiert. Ohne Zeitverzögerung wurden die Röhrchen mit dem Zentrifugenblock sachte entnommen. Mittels Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Zu dem verbliebenen Pellet wurden 2 ml Saponin-Puffer zugegeben und mittels Vortex gemischt.

Für weitere zehn Minuten wurde bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss ebenfalls für zehn Minuten erneut bei 350 g zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und das Pellet in etwas über dem Pellet stehenden Puffer resuspendiert.

Die Antikörperlösungen wurden jeweils frisch angesetzt.

Die **Antikörper-I-Lösung** setzte sich zusammen aus:

- 2 μ l Antikörper I
 - 1 μ l 5 % Saponin
 - 47 μ l FACS-Puffer
- d.h. insgesamt 50 μ l Ansatzvolumen pro Patient

Wie bereits erwähnt wurden die 50 μ l Antikörper-I-Lösung nur in das erste Röhrchen pipettiert, in das zweite Röhrchen hingegen 50 μ l Saponin-Puffer. Alle Röhrchen wurden aufgeschüttelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die FACS-Röhrchen mit jeweils 3 ml Saponinpuffer gewaschen, für zehn Minuten bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert und mittels Wasserstrahlpumpe ein zweites Mal vorsichtig abgesaugt.

Die **Antikörper-II-Lösung** setzte sich zusammen aus:

- 1 μ l Antikörper II
 - 2 μ l 5 % Saponin
 - 97 μ l FACS-Puffer
- d.h. insgesamt 100 μ l Ansatzvolumen pro Patient

Von der Antikörper-II-Lösung wurden 50 μ l in jedes der Patientenröhrchen, Probe sowie auch Kontrolle, pipettiert. Die Röhrchen wurden aufgeschüttelt und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es wurde ein zweites mal mit 3 ml Saponin-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dabei wurde zuerst der, im Zuge des Waschens mit Saponin, entstandene Schaum entfernt. Die Zellen wurden in 200 μ l Fixierlösung (1 % Paraformaldehyd-Lösung) aufgenommen. Eine geringe Menge Restschaum störte bei der darauffolgenden Messung am FACS Gerät nicht. Die Messung wurde, im Rahmen der Evaluation der Methode, innerhalb einer Stunde nach Beendigung der Färbung durchgeführt.

3.2.3 Messung

Die Zellen wurden kurz vor der Messung auf dem Vortexmischer bei niedriger Geschwindigkeit gründlich gemischt, um bei der FACS-Messung die Zellaggregation zu reduzieren. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des CellQuest™ Programms Version Mac App^R 3.0.1. Die Instrumenten-Settings wurden auf das vorhandene FACS-Gerät (FACScan) individuell abgestimmt. Die Geräteeinstellungen für die hier durchgeführten Versuche befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Die Analysefenster (Gates) wurden über die gemessenen Zellpopulationen gelegt.

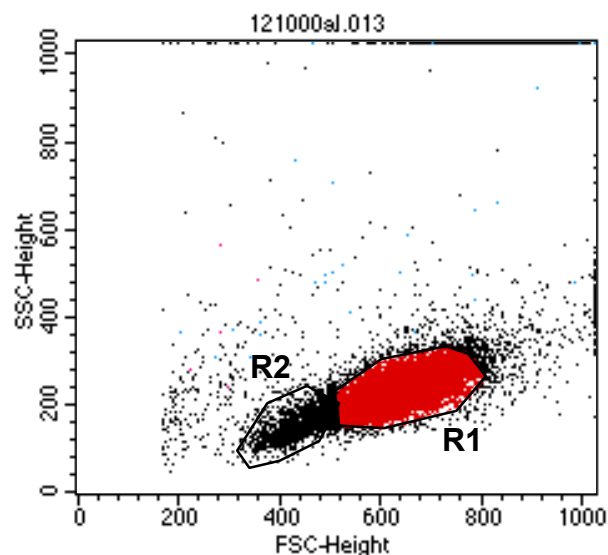


Abbildung 3: Auftragung der Intensität des Seitwärtsstreulichtes (y-Achse), korreliert mit der Granularität der Zelle, gegen die Intensität des Vorwärtsstreulichtes (x-Achse), korreliert mit der Größe der Zellen, zur Aufschlüsselung der einzelnen Leukozytenfraktionen, wobei „R1“ Granulozyten und Monozyten umfasst und „R2“ die Lymphozyten umschließt.

Die Region „R2“ wurde zur Orientierung angelegt. Sie begrenzt die Lymphozytenpopulation, die in die weitere Betrachtung nicht mit einbezogen wurden. Die Region „R1“ wurde über die Monozyten und über die sich, bedingt durch die Saponin-Waschung, auch in dieser Region befindlichen Granulozyten gelegt. Aus dieser Region wurden im weiteren die pp65-positiven Zellen ermittelt. Zu diesem Zweck wurden mit dem Analysefenster „R1“ insgesamt 100.000 Zellsignale markiert und diese zur weiterführenden Auswertung in einem weiteren Punktwolkendiagramm gesondert dargestellt.

Im folgenden werden die Beispieldiagramme einer pp65-negativen Probe abgebildet.

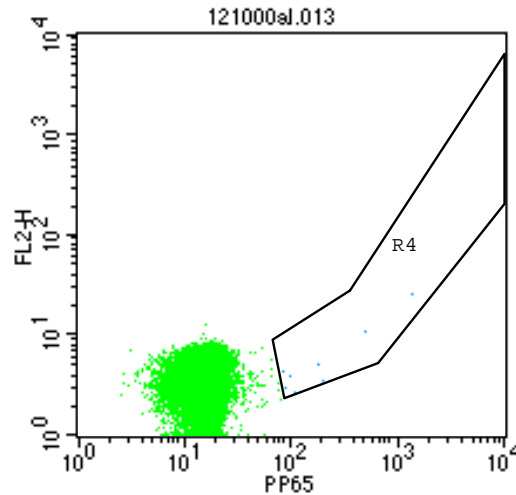
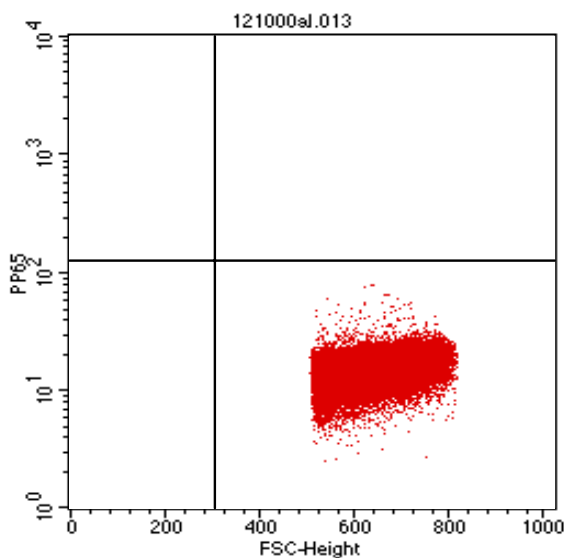


Abbildung 4: Darstellung der in „R1“ abgegrenzten Monozyten und Granulozytenpopulation in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität bei einer pp65-negativen Probe unter Ausschluss eventueller unspezifischer Fluoreszenzen („R4“).

Mit Hilfe der Region „R4“ wurden eventuelle unspezifische Fluoreszenzen, bedingt durch Verunreinigungen oder Zelltrümmer, von der weiteren Auswertung ausgegrenzt, bzw. gesondert dokumentiert. Die verbleibenden Zellen der Region „R1“ wurden in das eigentliche Analysendiagramm überführt und die relative Anzahl der FITC-(pp65)-positiven Zellen berechnet.



Probennummer : 121000al.013		
Patientenname :		
Gesamtanzahl gezählter Zellen: 100.000		
Quadrant	Zellzahlen	%
oben links	0	0
oben rechts	0	0
unten links	0	0

Abbildung 5: Auswertende Darstellung des Analysenergebnisses der negativen Patientenprobe in graphischer und tabellarischer Form

Im Vergleich dazu ein pp65-positives Testergebnis.

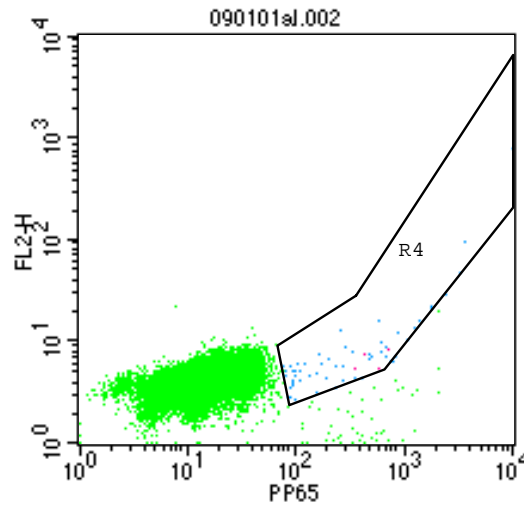
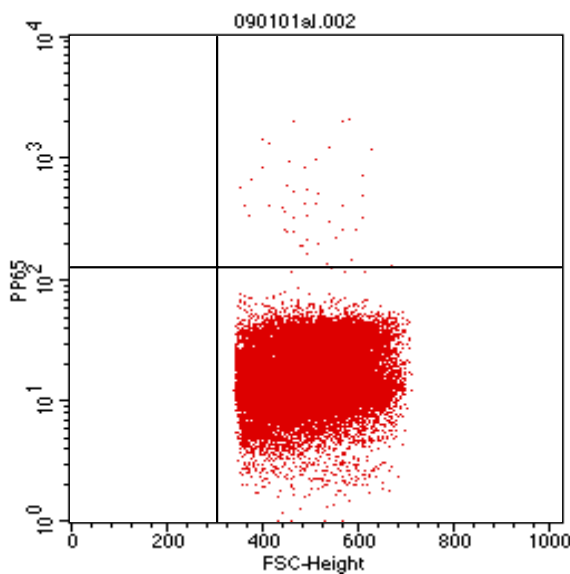


Abbildung 6: Darstellung der in „R1“, einer anderen Probe, abgegrenzten Monozyten- und Granulozytenpopulation in bezug auf ihre Fluoreszenzintensität bei einer pp65-positiven Probe unter Ausschluss eventueller unspezifischer Fluoreszenzen („R4“).



Probennummer :	090101al.002	
Patientenname :	Patient 5	
Gesamtanzahl gezählter Zellen :	100.000	
Quadrant	Zellzahlen	%
oben links	0	0
oben rechts	47	0,05
unten links	0	0

Abbildung 7: Auswertende Darstellung des Analyseergebnisses der positiven Patientenprobe in graphischer und tabellarischer Form

Das Analysefenster ist in vier Quadranten unterteilt. Von Bedeutung sind vor allem der untere und der obere rechte Quadrant. Im unteren Quadranten befinden sich Zellen ohne oder mit nur geringer Fluoreszenz. Im oberen Quadranten kommen, bedingt durch ihre höhere Fluoreszenzaktivität, die pp65-positiven Zellen zu liegen.

Von Patientenproben, bei denen ungewöhnlich hohe Zellzahlen bzw. stark abweichende Ergebnisse in der Durchflußzytometrie beobachtet werden konnten, wurden zur Sicherung der Daten zusätzlich Objektträgerpräparate angefertigt. Ähnlich den Vorgängen beim konventionellen pp65 wurden 50 µl der vorbereiteten FACS-Lösungen von Probe und Kontrolle auf einen Objektträger aufgebracht, mit dem Eindeckmedium des CMV-pp65-Testkits versiegelt und nach Lufttrocknung unter Öl im Immunfluoreszenzmikroskop gesondert ausgewertet.

4 ERGEBNISSE**4.1 Methodenetablierung**

Im Rahmen der Methodenetablierung wurde zuerst einige präanalytische Parameter und deren Einfluss auf das Analyseergebnis untersucht. Anhand von zehn Proben mit dem Nachweis einer replikativen CMV-Infektion, bestätigt durch ein positives Testergebnis im konventionellen pp65 und/oder im Hybrid-Capture Test, wurde der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Analysemethode untersucht. Zum einen wurde geprüft, inwieweit das Ausgangsmaterial als solches das Testergebnis beeinflussen kann und zum anderen wie umfangreich die Beeinträchtigung durch eine unterschiedliche lange Zwischenlagerung der Proben ist.

4.1.1 Auswirkungen unterschiedlicher Antikoagulanzen

Im Rahmen des klinikinternen Monitoringprogramms standen von jedem Patienten sowohl Heparin- als auch EDTA-Blutproben zur Verfügung. Waren Patientenproben nun entweder im konventionellen pp65 und/oder im Hybrid-Capture Test in der CMV-DNA-Bestimmung positiv, wurden die beiden Antikoagulanzen in einleitenden Messungen einander gegenüber gestellt und in bezug auf ihre Zellausbeute im FACS miteinander verglichen.

	pp65 Test	Hybrid capture Test	FACS-Messungen		Reduktion der Zellausbeute je Probe in %
			Heparin	EDTA	
Probe 1	Negativ	21 pg/ml	38 Zellen	1 Zelle	97,4
Probe 2	Negativ	11 pg/ml	15 Zellen	0 Zellen	100
Probe 3	Negativ	0,7 pg/ml	51 Zellen	28 Zellen	45,1
Probe 4	144 Zellen	200 pg/ml	130 Zellen	51 Zellen	60,7
Probe 5	11 Zellen	6 pg/ml	13 Zellen	4 Zellen	69,2
Probe 6	11 Zellen	3 pg/ml	6 Zellen	0 Zellen	100
Probe 7	104 Zellen	4 pg/ml	50 Zellen	40 Zellen	20
Probe 8	79 Zellen	negativ	92 Zellen	72 Zellen	21,7
Probe 9	Negativ	1 pg/ml	11 Zellen	0 Zellen	100
Probe 10	Negativ	5,7 pg/ml	15 Zellen	0 Zellen	100
Gesamtmedian der Reduktion in %					83,3

Tabelle 2: Vergleich der Antikoagulanzen Heparin und EDTA: Gegenüberstellung der Zahlenwerte und Berechnung der Reduktion in % bei zehn Proben mit Nachweis einer replikativen CMV-Infektion (konventioneller pp65 oder Hybrid-Capture Test positiv)

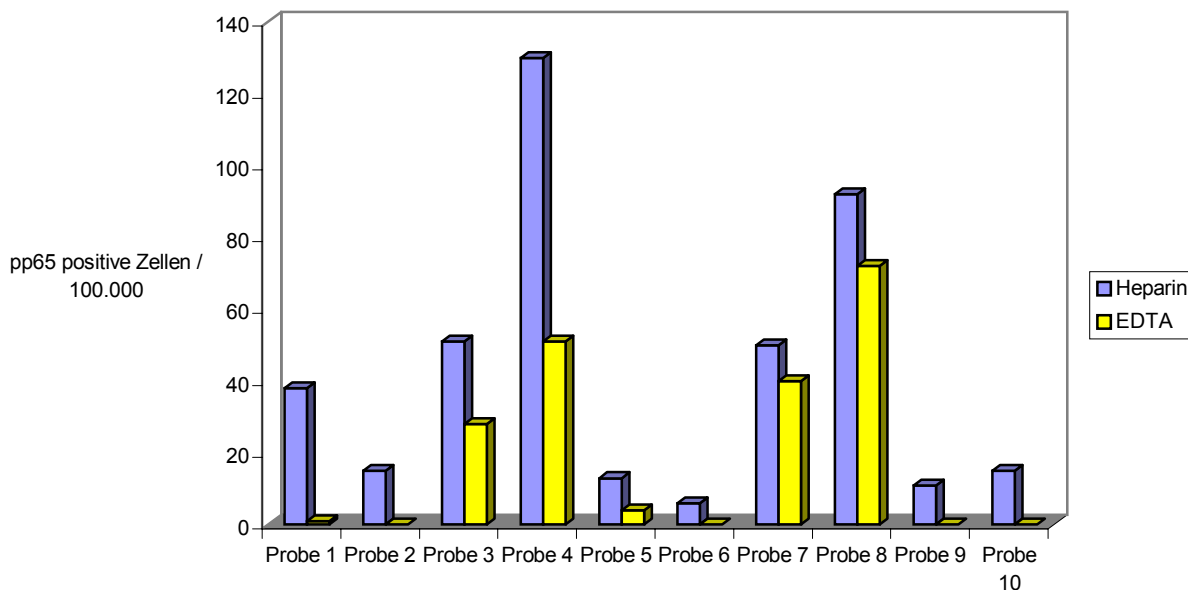


Abbildung 8: Vergleich zweier Antikoagulanzen (Heparin [blau] und EDTA [gelb]) bei zehn Proben mit Nachweis einer replikativen CMV-Infektion (konventioneller pp65-Test oder Hybrid-Capture Test positiv)

In der obigen Tabelle und Abbildung sind deutliche Diskrepanzen zwischen den beiden unterschiedlichen Antikoagulanzen zu erkennen. Die FACS-Werte, welche aus EDTA-Blutproben erzielt wurden, liegen in allen Fällen unter denen, die aus Heparinblutproben gewonnen werden konnten. Als Median konnte ein Wert von etwa 83 % ermittelt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im folgenden ausschließlich Proben aus Heparinblut verwendet.

4.1.2 Beeinflussung der Ergebnisse durch Zwischenlagerung der Proben

In einer zweiten präanalytischen Untersuchungsphase wurden unterschiedliche Zeitpunkte der Probenaufarbeitung untersucht. Das heißt, die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten einmal sofort und zum anderen 24 Stunden nach Probeneingang im Labor isoliert und weiterverarbeitet. Die Heparinblutröhrchen wurden bei 4 °C zwischengelagert.

In diesem Zusammenhang sollte der Zeitrahmen, in dem mit dem Test nach Probeneingang begonnen werden muss, festgelegt werden.

	pp65 Test	Hybrid capture Test	FACS-Messungen (Heparin)		Reduktion in %
			sofort	nach 24 h	
Probe 1	104 Zellen	4 pg/ml	50 Zellen	36 Zellen	28
Probe 2	36 Zellen	negativ	47 Zellen	34 Zellen	27,6
Probe 3	144 Zellen	200 pg/ml	130 Zellen	51 Zellen	60,7
Probe 4	2 Zellen	negativ	4 Zellen	3 Zellen	25
Probe 5	68 Zellen	1,5 pg/ml	76 Zellen	23 Zellen	69,7
Probe 6	negativ	20 pg/ml	30 Zellen	1 Zelle	96,7
Probe 7	101 Zellen	negativ	45 Zellen	14 Zellen	68,8
Probe 8	1 Zelle	1,1 pg/ml	6 Zellen	0 Zellen	100
Probe 9	11 Zellen	3 pg/ml	13 Zellen	6 Zellen	53,8
Probe 10	12 Zellen	2,6 pg/ml	14 Zellen	5 Zellen	64,3
Median der Reduktion in %					62,5

Tabelle 3: Analyse des Einflusses von Lagerungszeiten (sofort und nach 24 Stunden) bei zehn Proben mit Nachweis einer replikativen CMV-Infektion (konventioneller pp65 oder Hybrid-Capture Test positiv)

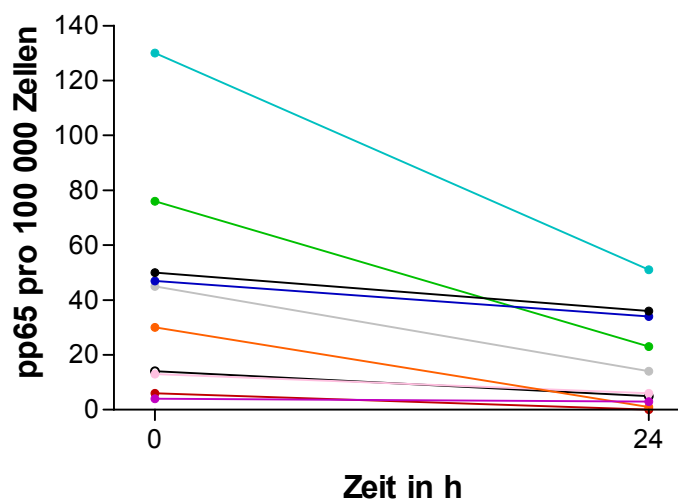


Abbildung 9: Darstellung der Reduktion der pp65-positiven Zellzahlen in Anbetracht der unterschiedlichen Lagerungszeiten (sofort und nach 24 Stunden)

Auch hier war eine deutliche Reduktion der Zellausbeute zu sehen. Nach 24-stündiger Lagerung und erst dann erfolgter Isolierung konnten deutlich weniger pp65-positive Zellen nachgewiesen werden. Als Median der Reduktion konnte hier ein Wert von etwa 62,5 % ermittelt werden. Als Konsequenz aus dieser Untersuchung wurden im folgenden alle Proben sofort nach Eintreffen im Labor bearbeitet.

4.2 Methodenevaluation

Mittels eines Kollektives von 100 klinisch gesunden Patienten nach Lungen-, Herz-, Nieren- oder Stammzelltransplantationen ohne aktive CMV-Replikation wurde im folgenden die Spezifität und anhand von zehn pp65-positiven Probanden mit aktiver Virus-Replikation die Sensitivität der FACS-Analyse für das CMV-Matrix-Antigen pp65 ermittelt.

Es wurden insgesamt 214 vergleichende Messungen protokolliert. Sie wurden gemäß den im Zuge der Beurteilung der präanalytischen Phase gewonnenen Erkenntnissen durchgeführt. Das heißt, es wurden ausschließlich Proben aus Heparinblut verwendet, die sofort nach Probeneingang im Labor bearbeitet wurden.

4.2.1 pp65-Detektion mittels FACS-Messung

4.2.1.1 allgemeine Übersicht aller durchgeführten Messungen

Tabelle 4 gibt einen statistischen Überblick über die mit der Durchflußzytometrie gewonnenen Werte. Bei der Bewertung der Analysen mittels FACScan traten jedoch gewisse Schwierigkeiten auf.

Keine der hier als Vergleichstest eingesetzte Methode kann als definierter Goldstandard gelten, jede hat ihre Vor- und Nachteile und misst vor allem etwas anderes. Da der DNA-Anstieg in der Regel vor dem Anstieg der Antigenmenge erfolgt, ist nicht in allen Fällen von einem kongruenten Nachweis beider Zielbereiche auszugehen. Betrachtet man den Gegenstand, den die beiden Vergleichsteste nachzuweisen versuchen, müssten die Ergebnisse der FACS-Analyse eher den Vorgaben des konventionellen pp65-Antigenämietestes gleichzusetzen sein. Beide Teste detektieren das Phosphoprotein pp65. Bedingt durch die im Rahmen dieser Arbeit formulierte Fragestellung lag im Gegensatz hierzu allerdings auch die Vermutung nahe, dass eine Analyse mittels Durchflußzytometrie möglicherweise sensitiver sein könnte als die konventionelle Antigenämie-Methode.

Es könnte von daher auch sinnvoll sein, die FACS-Methode mit den Ergebnissen des Hybrid-Capture Testes zu vergleichen, um gegebenenfalls die Anzahl möglicher falsch negativer Proben zu reduzieren.

Folgerichtig reichte es sicherlich nicht aus, die Ergebnisse der FACS-Messungen nur nach den Daten der Vergleichsteste, sondern vielmehr auch anhand der Vorgaben einer sogenannten „CMV-Episode“ einzuordnen. Der Beginn einer Episode wurde definiert als der Zeitpunkt, ab dem in jeweils zwei Testen bzw. in einem Test zwei aufeinander folgende, positive CMV-Nachweise vorlagen. Das Ende einer Episode war gekennzeichnet durch negative Messdaten bei allen drei Nachweisverfahren. Daten, die innerhalb einer solchen Episode ermittelt werden konnten, galten als richtig positiv, solche die außerhalb der Episode lagen, wurden als richtig negativ interpretiert.

Die hier durchgeführten Messungen richteten sich, da keine Angaben über die klinische Symptomatik der Patienten vorlagen, nach den jeweiligen etablierten Grenzwerten der beiden Vergleichsmethoden. Dies war eine positive Zelle beim konventionellen pp65 und der vom Testhersteller vorgegebene Grenzwert des Hybrid-Capture Testes.

Hier zeigte sich eine weitere Schwierigkeit, nämlich die Notwendigkeit der Definition eines methodischen bzw. klinischen Grenzwertes. Auf diesen Punkt wird im Rahmen der Diskussion allerdings noch ausführlicher eingegangen werden.

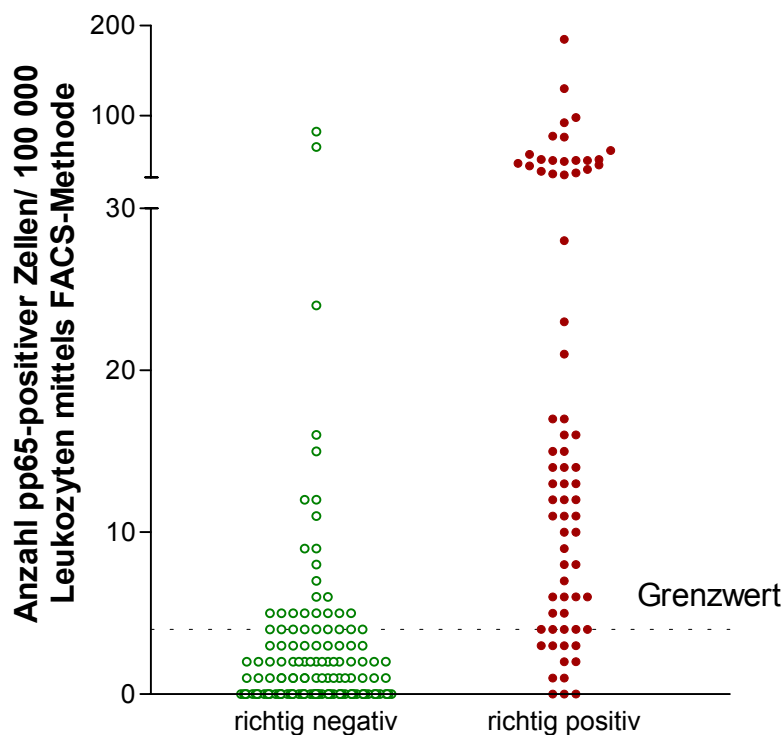


Abbildung 10: Graphische Darstellung der einzelnen FACS-Messungen gemäß ihrer Einteilung nach den Ergebnissen der beiden Vergleichsteste (pp65-Antigenämietest und Hybrid-Capture Test)

Anzahl der pp65 positiven Zellen/100 000 mittels FACS	Anzahl der richtig negativen Proben	Anzahl der richtig positiven Proben
0	64	3
1	19	2
2	17	2
3	9	4
4	12	5
5	8	2
6	2	4
7	1	1
8	1	2
9	2	1
10	0	2
11	1	3
12	2	3
13	0	3
14	0	3
15	1	2
16	1	2
17	0	2
21	0	1
23	0	1
24	1	0
28	0	1
34	0	1
35	0	1
36	0	1
38	0	1
40	0	1
44	0	1
45	0	1
47	0	1
49	0	1
50	0	3
51	0	2
57	0	1
61	0	1
65	1	0
76	0	1
77	0	1
82	1	0
92	0	1
98	0	1
130	0	1
185	0	1

Tabelle 4: Übersicht über alle während der Evaluation durchgeführten Messungen in Bezug auf detektierte Zellzahlen und Einteilung als „negative“ (konventioneller pp65 und Hybrid-Capture Test negativ) bzw. „positive“ (konventioneller pp65 und/oder Hybrid-Capture Test positiv) Proben.

4.2.1.2 Festlegung der Grenzwerte

Aus den erhobenen Daten wurde der methodische Grenzwert für die Bestimmung mittels FACS ermittelt. Ab welcher Zellzahl kann eine Patientenprobe im FACS als positiv angesehen werden?

Setzt man, ähnlich dem konventionellen pp65, den Grenzwert bei Null an, d.h. ab einem einzigen positiven Signal, ergeben sich für die FACS-Detektion in Bezug auf die Referenzmethoden und auf die Gesamtzahl der Messungen folgende Zahlenkonstellationen:

richtig negative Ergebnisse	:	64
richtig positive Ergebnisse	:	68
falsch negative Ergebnisse	:	3
falsch positive Ergebnisse	:	79

Nimmt man eine höhere Zellzahl als Grenzwert, ergeben sich die in Tabelle 5 angegebenen Zahlenwerte.

4.2.1.3 Berechnung der Testsensitivität und -spezifität

Da selbst ein analytisch zuverlässiger Laborbefund keinesfalls eine Garantie für dessen Wertigkeit bei der Diagnosestellung, Verlaufs- oder Therapiebeurteilung besitzt, wurde im Folgenden mittels der diagnostischen Sensitivität und Spezifität die Validität der FACS-Detektion beurteilt. Die Sensitivität eines Testes gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der durch ein positives Testergebnis die richtige Diagnose gestellt wird.

$$\text{Diag. Sensitivität (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Ergebnisse}}{\text{Anzahl richtig positiver} + \text{falsch negativer Ergebnisse}} \cdot 100$$

Die Spezifität gilt als die Wahrscheinlichkeit, mit der durch ein negatives Testergebnis (im Referenzbereich liegend) Nichtkranke erkannt werden.

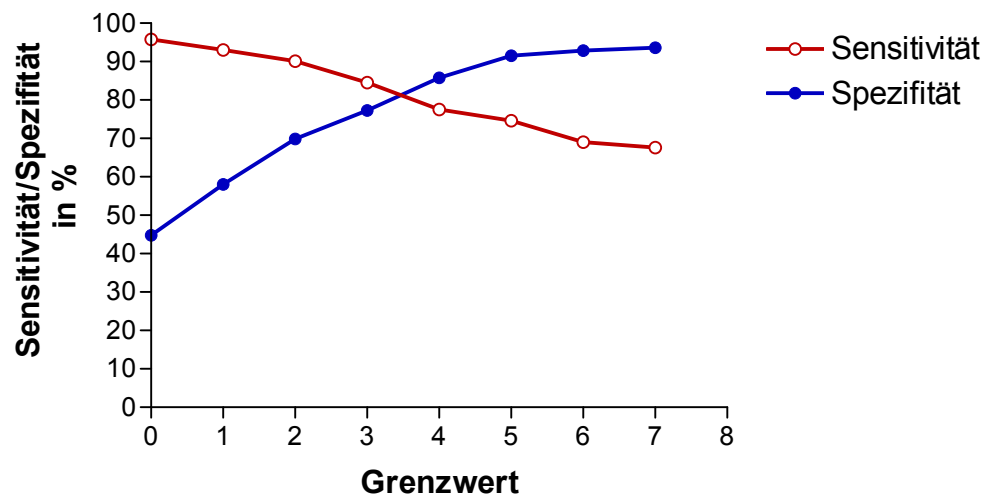
$$\text{Diag. Spezifität (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer Ergebnisse}}{\text{Anzahl richtig negativer} + \text{falsch positiver Ergebnisse}} \cdot 100$$

Hieraus ergeben sich für die möglichen einzelnen Grenzwerte die in der Tabelle angegebenen Ergebnisse:

Grenzwert	richtig negativ	richtig positiv	falsch negativ	falsch positiv	Sensitivität %	Spezifität %
0	64	68	3	79	95,8	44,8
1	83	66	5	60	93,0	58,0
2	100	64	7	43	90,1	69,9
3	109	60	11	34	84,5	76,2
4	121	55	16	22	77,5	84,6
5	129	53	18	14	74,6	90,2
6	131	49	22	12	69,0	91,6
7	132	48	23	11	67,6	92,3

Tabelle 5: Darstellung der einzelnen „Grenzwerte“ mit ihrer gemäß den obigen Formeln errechneten Testsensitivität und -spezifität. Der graumarkierte Bereich kennzeichnet den Umschlagpunkt der Wertigkeiten.

Trägt man nun die Werte der Sensitivität und Spezifität gegen ihre entsprechenden Grenzwerte auf, ergibt sich folgendes Bild:



Anzahl der pp65-positiven Zellen mittels FACS-Methode

Abbildung 11: Auftragung der Prozentwerte der errechneten Testsensitivität und -spezifität für einzelne Grenzwerte zur Ermittlung eines methodischen Grenzwertes.

Der Schnittpunkt der beiden Linien weist auf einen optimierten Grenzwert zwischen den Zellzahlen 3 und 4 pro 100.000 Leukozyten hin. Der Bereich zwischen diesen beiden Werten wurde im folgenden als Grenzwert definiert. Ab einer Zellzahl von mindestens vier positiven Zellen galt eine Patientenprobe bei der FACS-Analyse in der weiteren Betrachtung als positiv.

4.2.2 pp65-Detektion bei zehn Patienten mit aktiver CMV-Infektion

4.2.2.1 Messungen im FACS

Im Folgenden werden die Verlaufskurven von zehn Probanden mit nachweislich replikativer Virus-Infektion vorgestellt.

Als positiv wurden, wie bereits eingangs erwähnt, solche Verläufe angesehen, die bei mindestens zwei Testen positive Daten lieferten oder mindestens zweimal hintereinander in wenigstens einem Test ein positives Testergebnis aufwiesen. Ab diesen ersten positiven Testergebnissen wurde engmaschig, mittels Blutproben im Abstand von wenigen Tagen, der weitere Verlauf bis zum ersten, wieder negativen Testergebnis aller drei Vergleichsteste kontrolliert.

Die im Folgenden aufgeführten Diagramme veranschaulichen die Ergebnisse der FACS-Analysen. Die aus dem eigentlichen Probenröhrchen ermittelten Zellzahlen stehen hier den Zellzahlen des, nur mit dem zweiten FITC-markierten Antikörper versehenen, Kontrollröhrchens gegenüber. Die Werte wurden schließlich subtrahiert und auf diesem Wege das eigentliche Testergebnis einer jeden Patientenprobe ermittelt. Aufschluss über die genauen Daten geben die sich im Anhang befindlichen Wertetabellen der einzelnen Patienten. Die Berechnung der Differenz erwies sich als notwendig, da in vielen Fällen die Kontrollröhrchen eine Hintergrundfluoreszenz aufwiesen und dadurch eine Beurteilung erschwert wurde.

Bei dem **ersten Patienten** handelte es sich um einen etwa 65 Jahre alten, CMV seropositiven Mann. Er wurde im Juli 2000 nierentransplantiert. Zeitnah zu dem hier zu beobachtenden Anstieg konnte auch ein positiver HCMV-IgM-Titer detektiert werden, welches als ein weiterer Hinweis für eine stattfindende CMV-Reaktivierung galt.

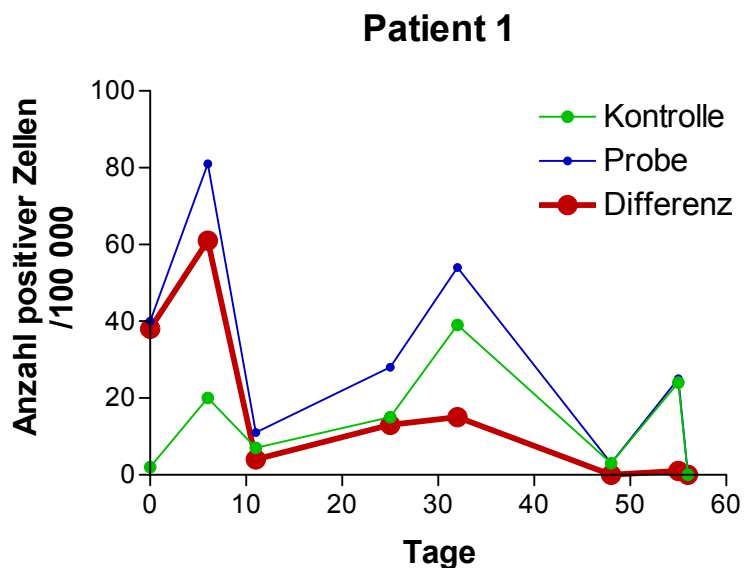


Abbildung 12: Patient 1 (Darstellung der FACS-Messungen)

Gut erkennbar ist in diesem Verlauf der Anstieg der Zellzahlen innerhalb der ersten Tage. Erste Reaktivierungsanzeichen konnten im Rahmen des klinikinternen Monitoringprogrammes bereits im Vorfeld dieses Verlaufes, mittels niedrig positiver CMV-DNA-Werte, beobachtet werden. Nach ungefähr 11 Tagen kam es zu einem zweiten Anstieg, der dann, wahrscheinlich therapeutisch bedingt, wieder abfiel. Es wird ebenfalls ersichtlich, dass auch die Kontrollröhrchen ab dem Zeitpunkt des zweiten erkennbaren Anstieges eine deutliche Eigenfluoreszenz aufwiesen, in den letzten drei Proben konnten sogar nahezu identische Werte erzielt werden. In diesem Abschnitt des Verlaufes ist es nun durchaus auch wahrscheinlich, dass durch die erhöhte Eigenfluoreszenz der Kontrollröhrchen eine gewisse Störung auftrat, und das Ergebnis nicht mehr als einfache Differenz der beiden Röhrchen darzustellen ist. Die hohe Störfluoreszenz könnte eventuell durch eine unspezifische Bindung der Antikörper an Medikamente bedingt sein, über deren detaillierten Einsatz von Seiten der behandelnden Kliniken für diese Studie allerdings keine Angaben vorlagen.

Bei der **zweiten Patientin** handelte es sich um eine etwa 40 Jahre alte Frau. Sie wurde 2000 stammzelltransplantiert und befindet sich seit mittlerweile etwa vier Jahren im Monitoringprogramm.

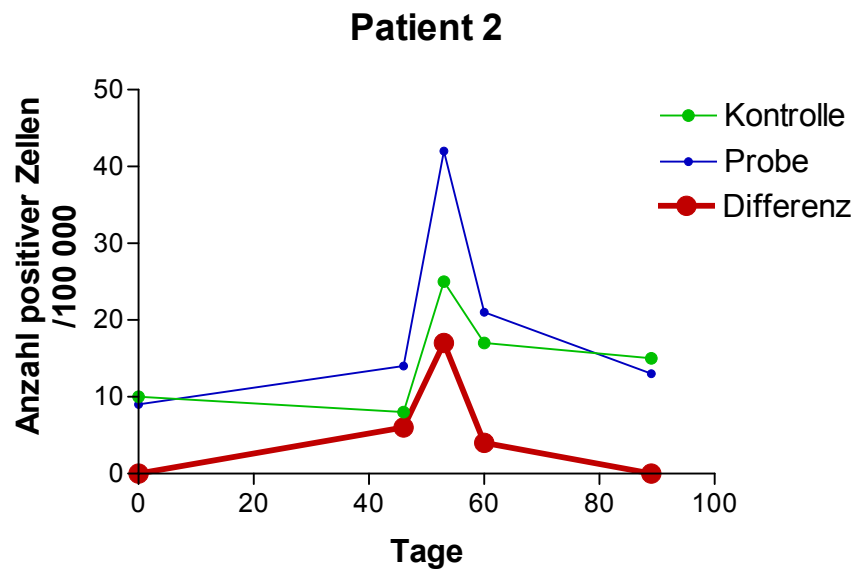


Abbildung 13: Patient 2 (Darstellung der FACS-Messungen)

Während dieser Zeit konnte eine Reaktivierung etwa fünf Monate vor Beginn dieser Studie beobachtet werden, mit CMV-DNA-Nachweis und einem einmaligen pp65-Nachweis. Positive CMV-IgM-Titer lagen zwar auch vor, waren aber über einen längeren Zeitraum erhöht und erlaubten somit keine deutliche Aussage zum Erkrankungsverlauf. Auch während des hier dokumentierten Verlaufs konnten positive CMV-IgM Titer ermittelt werden. Es kamen auch Überschneidungen der Kurvenverläufe der eigentlichen Probe und der dazu gehörigen Kontrolle vor. Bei dieser Patientin lag die Fluoreszenz des Probenröhrchens zu Beginn und am Ende der Messungen unter der des Kontrollröhrchens. Solche Proben wurden als negativ gewertet. In der nur mit dem zweiten Antikörper versehenen Kontrolle schienen Strukturen enthalten zu sein, die mit dem fluoreszierenden Antikörper interagierten.

Bei **Patient 3** handelte es sich um einen etwa 43 Jahre alten Mann, der lebertransplantiert worden ist. Auch bei diesem Patienten konnten positive CMV-IgM Titer bestimmt werden. Über klinisch bedeutende Symptome lagen keine Angaben vor. In diesem Fall zeigten Kontroll- und Proberöhrchen ein ausgewogenes Verhältnis der Fluoreszenzen, so dass bei diesem Patienten keinerlei Störungen der Auswertung auftraten.

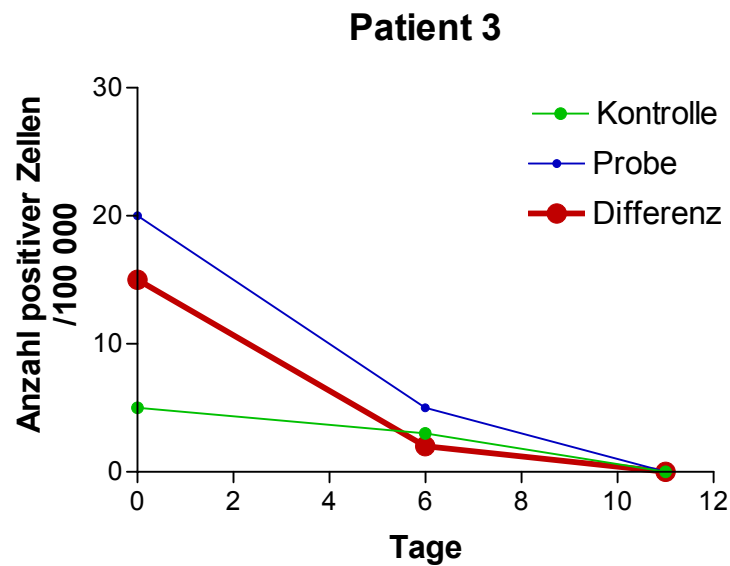


Abbildung 14: Patient 3 (Darstellung der FACS-Messungen)

Der Verlauf dieser, im Dezember 2000 lungentransplantierten, etwa 39 Jahre alten, **vierten Patientin** war sehr starken Schwankungen unterlegen. Bei nahezu allen Messungen lagen auch in den Kontrollröhrchen deutlich hohe Grundfluoreszenzen vor, welche eine Auswertung erschwerten und die bezüglich ihrer Relevanz eingehend zu diskutieren sind.

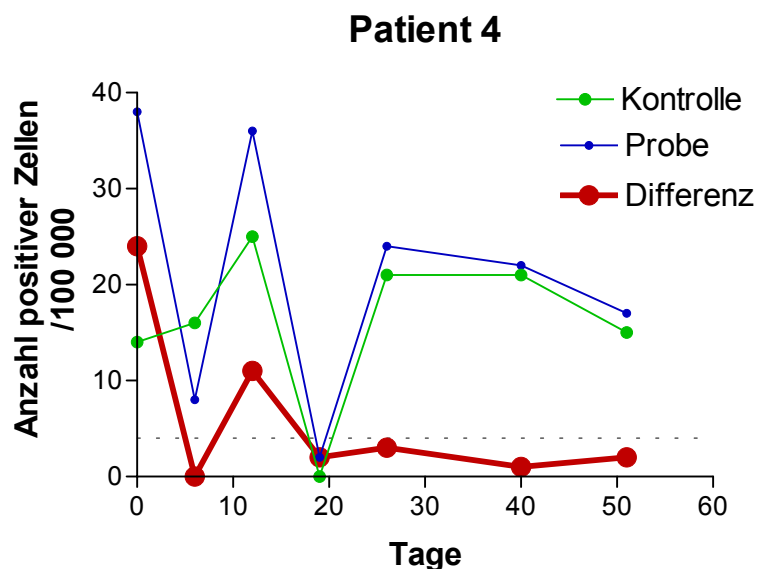


Abbildung 15: Patient 4 (Darstellung der FACS-Messungen)

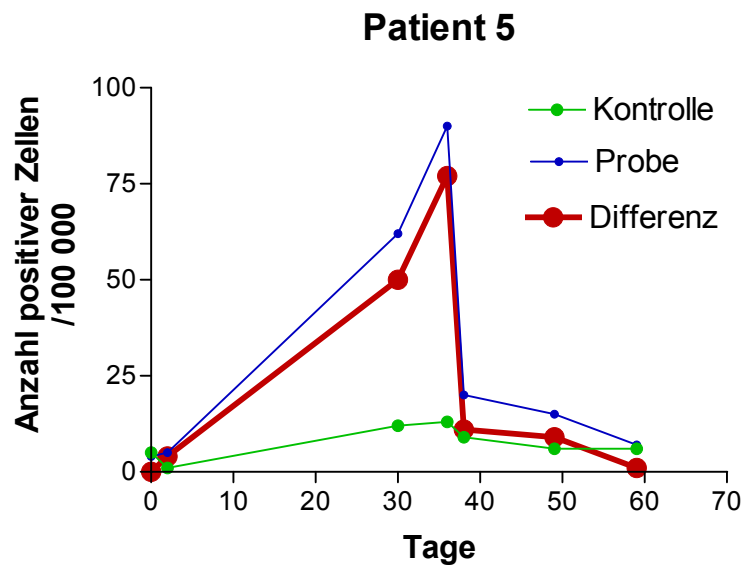


Abbildung 16: Patient 5 (Darstellung der FACS-Messungen)

Der oben dargestellte Verlauf einer ca. 33 Jahre alten Patientin nach Stammzelltransplantation zeigte eine sehr eindrucksvolle Abfolge. Die Kontrollröhrchen wiesen kaum Eigenfluoreszenz auf und die Werte konnten ohne Einschränkungen übernommen werden. Bei der Patientin konnte, bis auf die hier dokumentierte Reaktivierung, seit nunmehr 1 ½ Jahren keine Virusreplikation mehr nachgewiesen werden.

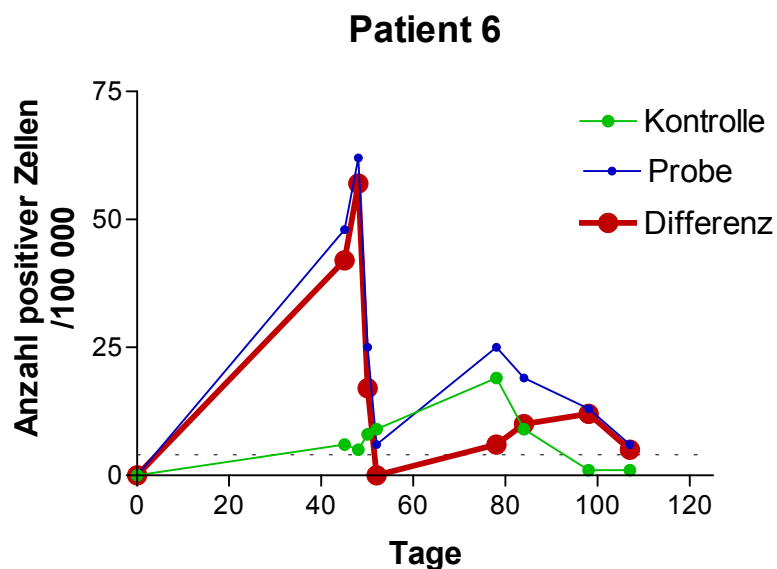


Abbildung 17: Patient 6 (Darstellung der FACS-Messungen)

Bei **Patient 6** handelte es sich um einen ca. 40 Jahre alten Mann, der im August 2000

stammzelltransplantiert wurde. Es lag ein fast vier Monate umfassender Verlauf vor, der zwei Reaktivierungen umfasste. Im ersten Abschnitt, bis etwa zum 50sten Tag, zeigen die Verläufe des Kontroll- und des eigentlichen Probenröhrchens eine gute Übereinstimmung. In den folgenden Proben stieg die Eigenfluoreszenz der Kontrollröhrchen allerdings wieder deutlich an. Bei beiden hier dokumentierten Reaktivierungen lagen von diesem Patienten auch CMV-positive PCR-Ergebnisse aus Rachenspülwasser sowie Urin vor. Über eventuelle begleitende Symptome war nichts bekannt.

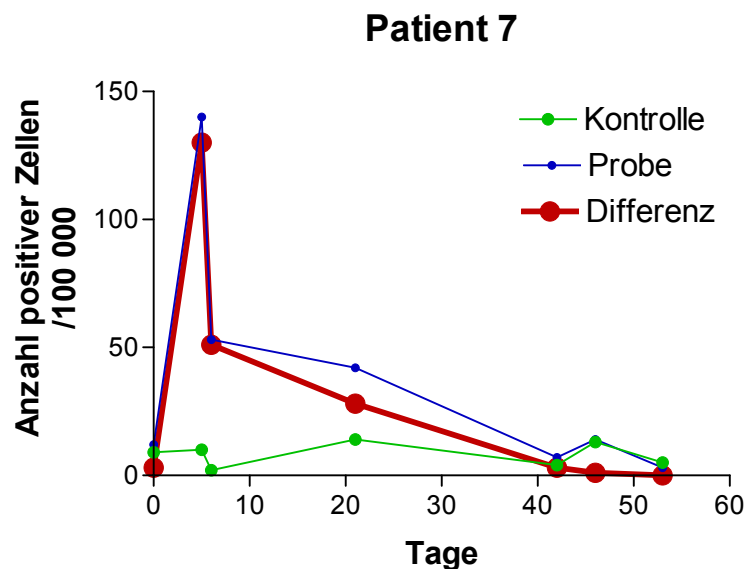


Abbildung 18: Patient 7 (Darstellung der FACS-Messungen)

Bei dem **siebten Patienten** handelte es sich um einen etwa 71 jährigen Mann. Er wurde im Juli 2000 nierentransplantiert und verstarb bereits im Mai 2001. Auch in diesem Beispiel ist im ersten Abschnitt eine deutliche Differenz zwischen Kontroll- und Proberöhrchen zu erkennen.

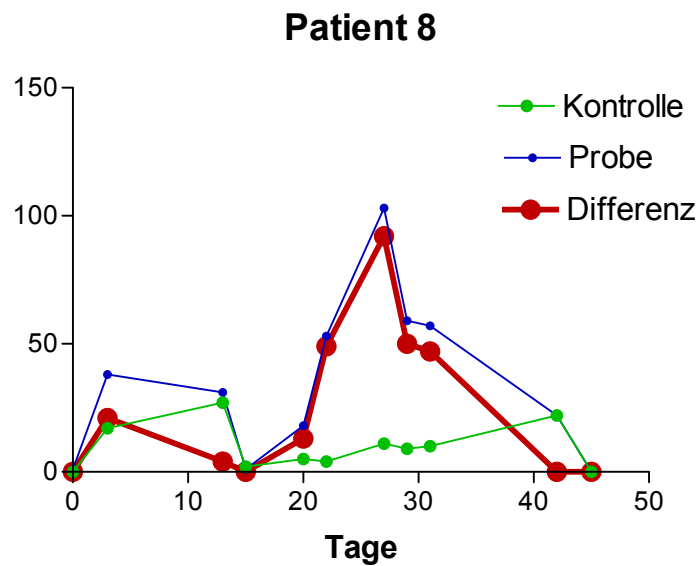


Abbildung 19: Patient 8 (Darstellung der FACS-Messungen)

Bei **Patient 8** handelte es sich um eine etwa 39 Jahre alte Frau. Sie wurde im November 2000 lungentransplantiert und war vor Transplantation seronegativ. Innerhalb der ersten 14 Tage dieser Studie kam es zu einer Serokonversion mit nachweislich positiven CMV-IgG-Titern. Ab dem 20. Tag konnte ein weiterer Anstieg der pp65-positiven Zellen in den FACS-Proben beobachtet werden.

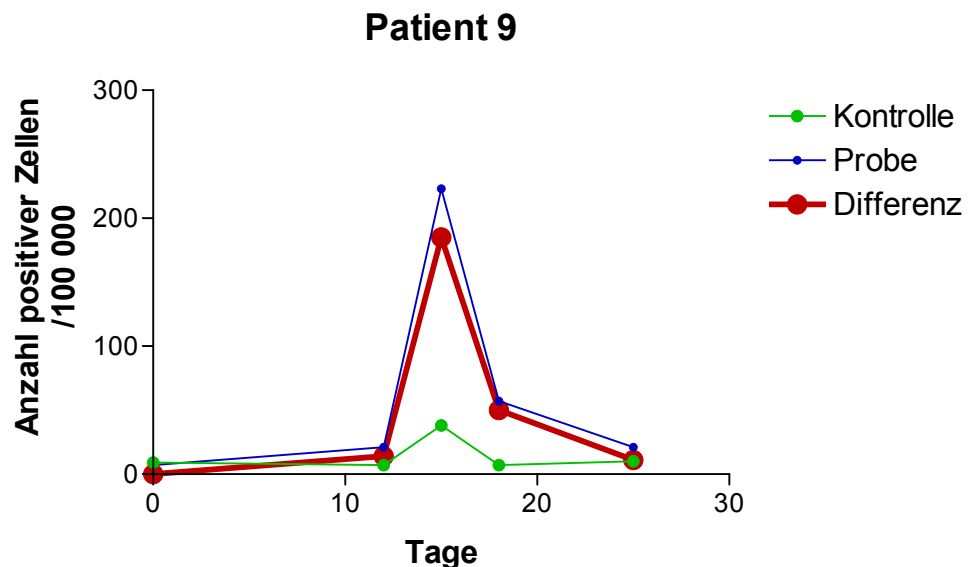


Abbildung 20: Patient 9 (Darstellung der FACS-Messungen)

Bei dem **neunten Patienten** handelte es sich um einen zum damaligen Zeitpunkt 26 jährigen, stammzelltransplantierten Mann. Auch in diesem Verlauf ist wieder eine

deutliche Differenz zwischen dem Probenröhrchen und den Kontrollen erkennbar. Der Patient verstarb im Mai 2002.

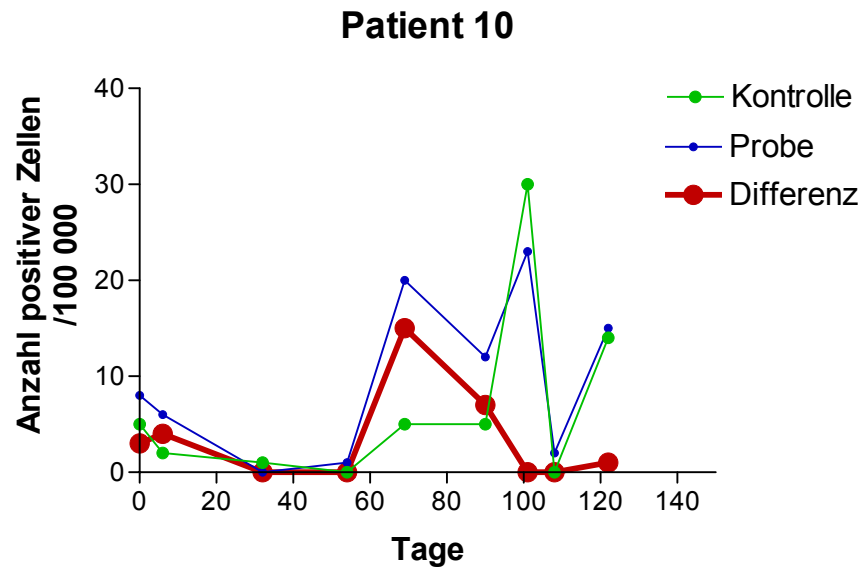


Abbildung 21: Patient 10 (Darstellung der FACS-Messungen)

Bei der **zehnten Patientin** konnte erneut gezeigt werden, dass sich die Subtraktion des Zahlenwertes des Kontrollröhrchens vom Zahlenwert des eigentlichen Teströhrchens als notwendig erwies, da auch hier wieder eine gewisse Eigenfluoreszenz in einigen Kontrollröhrchen beobachtet werden konnte. Bei der Patientin handelte es sich um eine etwa 61 jährige Frau, die im Mai 2000 lungentransplantiert wurde. Sie verstarb im April 2002. Eindeutig zu beurteilen wird sicherlich nur der Spitzenwert zwischen dem Tag 60 und 80 sein.

4.2.3 Die Vergleichsmethoden

Im folgenden Kapitel wird die FACS-Methode im direkten Vergleich mit den Ergebnissen der beiden bereits etablierten Methoden, dem konventionellen pp65-Antigenämietest und dem Hybrid Capture Test, betrachtet. Dabei wurden die Teste in einer ersten Analyse nur qualitativ verglichen (positiv/negativ Aussage). In einem zweiten Vergleich wurde dagegen die quantitative Korrelation überprüft.

4.2.3.1 Qualitativer und quantitativer Vergleich von konventionellem pp65-Nachweis, Hybrid-Capture-Test und FACS-Analyse zum Nachweis von pp65-Antigen

Zuerst wird ein allgemeiner Überblick über alle durchgeführten, richtig und falsch positiven Messungen gegeben. Ein FACS-Ergebnis galt in den folgenden Betrachtungen als positiv, wenn gemäß den im vorangehenden Kapitel gewonnen Erkenntnissen, eine Zellzahl ≥ 4 beobachtet werden konnte.

Das unten aufgeführte Diagramm gibt Aufschluss über die einzelnen positiven Ergebnisse der unterschiedlichen Testmethoden im Vergleich zueinander.

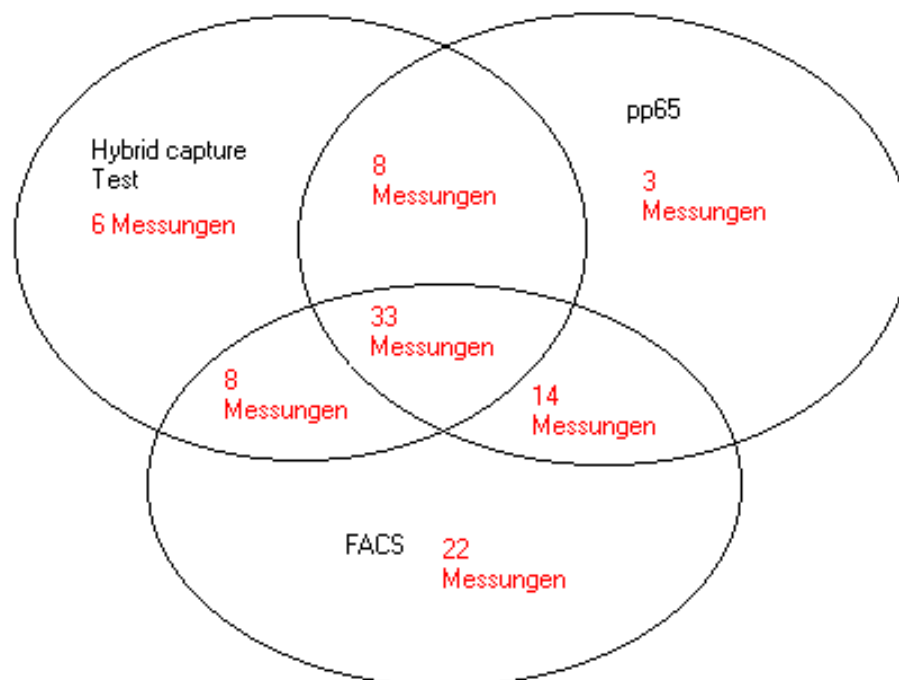


Abbildung 22: Verteilung der 94, als positiv gewerteten Messergebnisse auf ein Schnittmengendiagramm, bezogen auf die jeweiligen Vergleichsteste mit positivem Ergebnis.

Aus Abbildung 23 wird ersichtlich, dass lediglich bei 33 Messungen, das entspricht 35,5 % aller Analysen, in allen drei Vergleichsmethoden ein positives Ergebnis erzielt werden konnte. Bei 50,5 % aller Messungen wurde eine Übereinstimmung der Ergebnisse des konventionellen pp65 mit der FACS-Methode beobachtet. Etwa 44,1 % der hier untersuchten Proben waren sowohl in FACS als auch im Hybrid-Capture Test positiv, und wiederum 44,1 % sowohl im Hybrid-Capture Test und im konventionellen pp65-Nachweis. Bei 23,7 % aller Messungen war nur das Ergebnis der FACS-Analyse positiv, in 3,2 % der Fälle lieferte nur der konventionelle Antigenämietest positive Ergebnisse und in 5,4 % nur der Hybrid-Capture Test.

In einer quantitativen Analyse ergaben sich folgende Korrelationen, wobei aus theoretischen Erwägungen eine lineare Regression zu Grunde gelegt wurde. Nach Auswertung der Daten mittels Prism 3.0 Software ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,13$ für die Gegenüberstellung von FACS-Analyse und Hybrid-Capture Test (Abb. 24), sowie $r = 0,38$ für den Vergleich der FACS-Analyse mit dem konventionellen pp65-Antigenämietest (Abb.25).

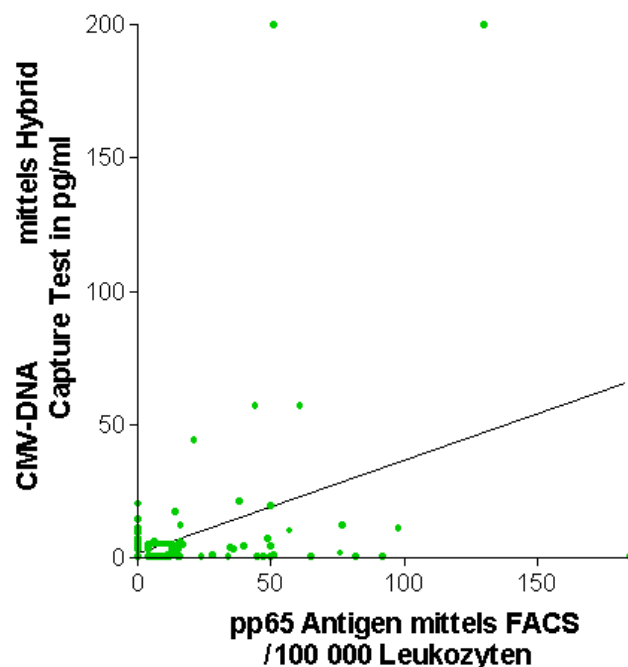


Abbildung 23: Vergleich des pp65 Nachweises mittels FACS Analyse (x-Achse) und im Hybrid-Capture Test (y-Achse); Korrelationskoeffizient $r = 0,18$.

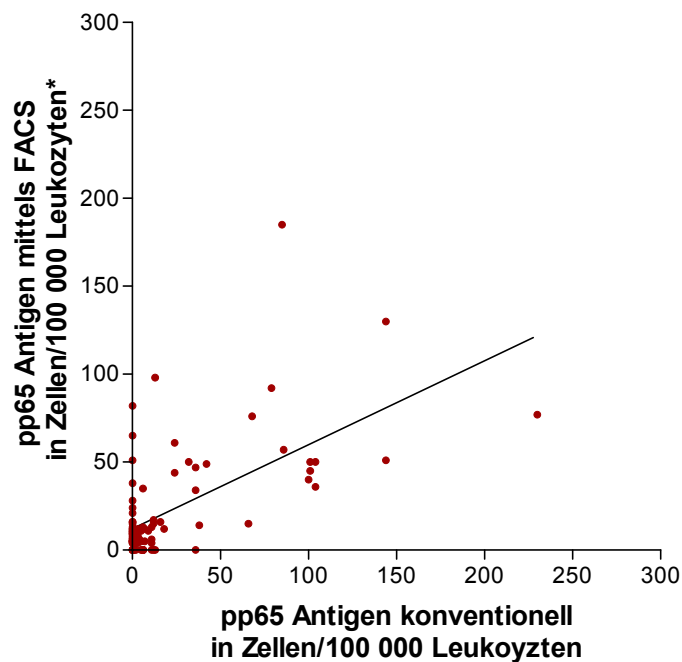


Abbildung 24: Vergleich des pp65 Nachweises mittels FACS Analyse (y-Achse) und im konventionellen Nachweis (x-Achse); Korrelationskoeffizient $r = 0,38$.

4.2.3.2 Analyse der zehn Patienten mit aktiver CMV-Replikation im direkten Testvergleich

Im folgenden Kapitel werden die zehn pp65-positiven Patienten, im direkten Vergleich mit den beiden anderen Testmethoden, gesondert betrachtet. In den Diagrammen wurden für die FACS-Ergebnisse die Differenzen (Kapitel 4.2.2.1.) aus den vorhergegangenen Messungen verwendet. Die Wertetabellen der einzelnen Patienten befinden sich im Anhang. Die Werte der CMV-DNA-Analyse mittels Hybrid-Capture-Test orientieren sich an der rechten Achse und sind in pg/ml angegeben.

Eine Übereinstimmung der Analysewerte der drei Vergleichsteste des **ersten Patienten** ist vor allem im ersten Abschnitt eindrucksvoll zu beobachten. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, konnten bereits im Vorfeld des hier abgebildeten Verlaufes niedrig positive CMV-DNA-Werte nachgewiesen werden.

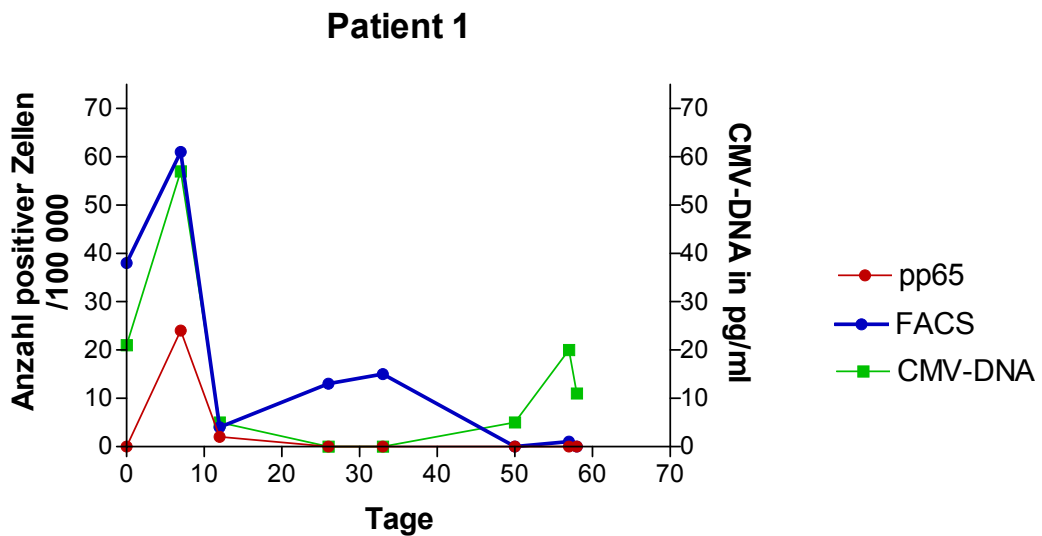


Abbildung 25: Patient 1 im Methodenvergleich

Vermutlich zeitgleich zum positiven Hybrid-Capture Test erfolgte ein Anstieg der mittels FACS detektierten pp65-positiven Zellen. Mittels des konventionellen pp65-Nachweises konnten erst ab dem ca. 7 Tag positiven Daten ermittelt werden. Da der Hybrid-Capture Test die, im Laufe einer Infektion, bedingt durch den Replikationsmodus, zuerst vorhandene DNA misst, kann mit dieser Nachweismethode in der Regel früher ein CMV-positives Ergebnis erzielt werden, als mit den beiden das Matrixprotein nachweisenden Methoden. Da die Ergebnisse der FACS-Analyse bei diesem Patientenverlauf ebenfalls etwas früher positiv waren, scheint es, dass diese Nachweismethode sensitiver als der konventionelle pp65-Nachweis ist. Die Detektion mittels Laser scheint genauere Ergebnisse zu erzielen als die subjektive Untersuchung mittels Mikroskop. Ab den 11. Tag blieben die FACS-Werte auf einem relativ konstanten Niveau, bis sie nach weiteren 15 Tagen wieder auf Null absanken. Zu diesem Zeitpunkt konnte mittels Hybrid-Capture Test bereits ein erneuter Anstieg der Werte beobachtet werden. In der FACS-Analyse konnte dieser Anstieg nur an Hand einer einzigen positiven Zelle verfolgt werden. Allerdings ist an dieser Stelle auch darauf hin zu weisen, dass bei diesen Messungen die Kontrollröhrchen ebenfalls eine hohe Eigenfluoreszenz aufzeigten. Die CMV-DNA-Werte blieben, wie auch im Monitoringprogramm dokumentiert, noch etwa zwei Wochen leicht erhöht und wurden dann ebenfalls negativ.

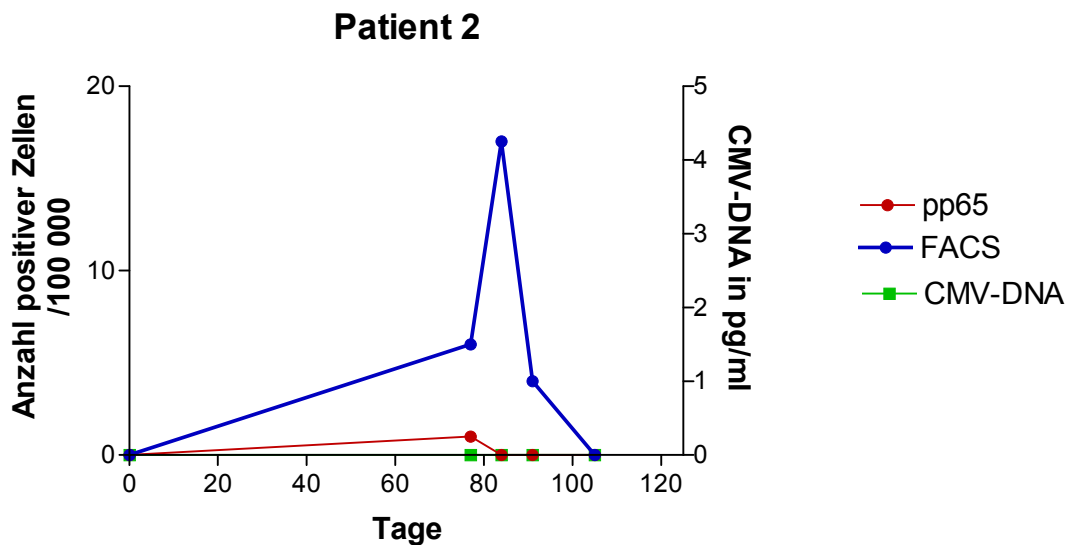


Abbildung 26: Patient 2 im Methodenvergleich

Bei diesem **zweiten Patienten** erscheint die FACS-Methode wesentlich sensitiver als die beiden Vergleichsteste. Zwar konnte zeitgleich mit dem Anstieg im FACS ein Anstieg beim konventionellen pp65-Nachweis dokumentiert werden, jedoch nur anhand einer einzigen positiven Zelle. In dieser pp65-Probe des konventionellen Antigenämietestes wurde zusätzlich allerdings auch eine hohe Eigenfluoreszenz dokumentiert. Diese kann vom FACS in vielen Fällen vielleicht nicht als solche erkannt werden, und wird daher als positives Zellsignal in die Berechnung übertragen. Der mögliche Vorteil der höheren Sensitivität, durch die rein objektive Beurteilung der zu analysierenden Zellen, könnte sich daher als Nachteil erweisen, da mittels FACS-Analyse nicht zwischen pp65-positiven Zellen und einer unspezifischen Fluoreszenz durch Artefakte unterschieden werden kann. Jedes eingehende Signal wird im Endeffekt als positive Zelle gewertet. Bei der Betrachtung der Zellen im Mikroskop hingegen ist eine Differenzierung durchaus möglich.

Es sind im Rahmen dieser Arbeit leider keine früheren Daten des hier im folgenden dargestellten Diagramms des **dritten Patienten** vorhanden, mit denen der Anstieg der pp65-Kurve hätte dokumentiert werden können.

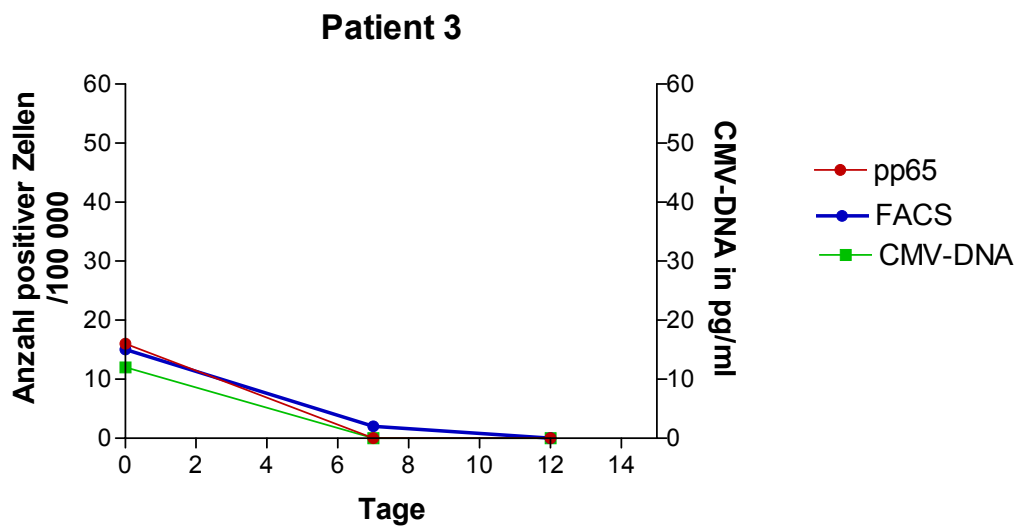


Abbildung 27: Patient 3 im Methodenvergleich

Jedoch ist im Monitoringprogramm festgehalten, dass zuvor keine weiteren Anzeichen für eine Reaktivierung zu finden waren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hier dokumentierten Werte die eigentliche Reaktivierung belegen. Alle drei Vergleichsteste harmonieren im Verlauf und weisen ähnliche Ergebnisse auf.

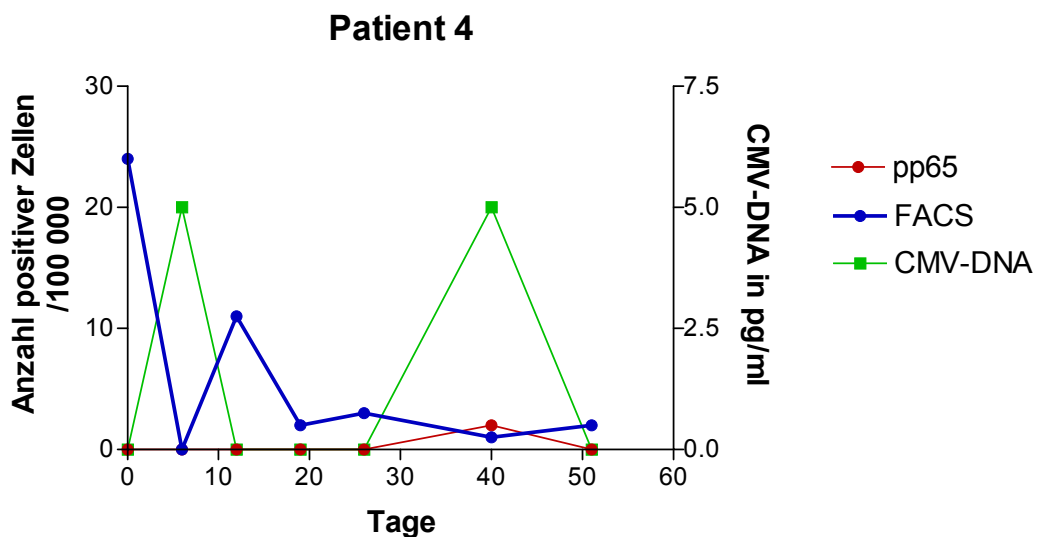


Abbildung 28: Patient 4 im Methodenvergleich

Bei dem **vierten Patienten** konnten während des ersten positiven CMV-DNA Befundes im ersten Abschnitt des Verlaufes bessere Übereinstimmungen mit dem Nachweis mittels FACS gefunden werden.

Im Folgenden scheinen der Hybrid-Capture Test und der konventionelle pp65-Nachweis besser zu harmonisieren.

Betrachtet man die Monitoringwerte dieser Patientin, fällt auf, dass sie immer wieder niedrig positive Werte im CMV-DNA-Nachweis und ebenso im konventionellen pp65-Nachweis immer wieder eine oder zwei pp65-positive Zellen aufweist. Sie entwickelte jedoch zu keinem der angegebenen Zeitpunkte positive CMV-IgM-Titer. Über eventuelle Symptome war nichts Näheres bekannt.

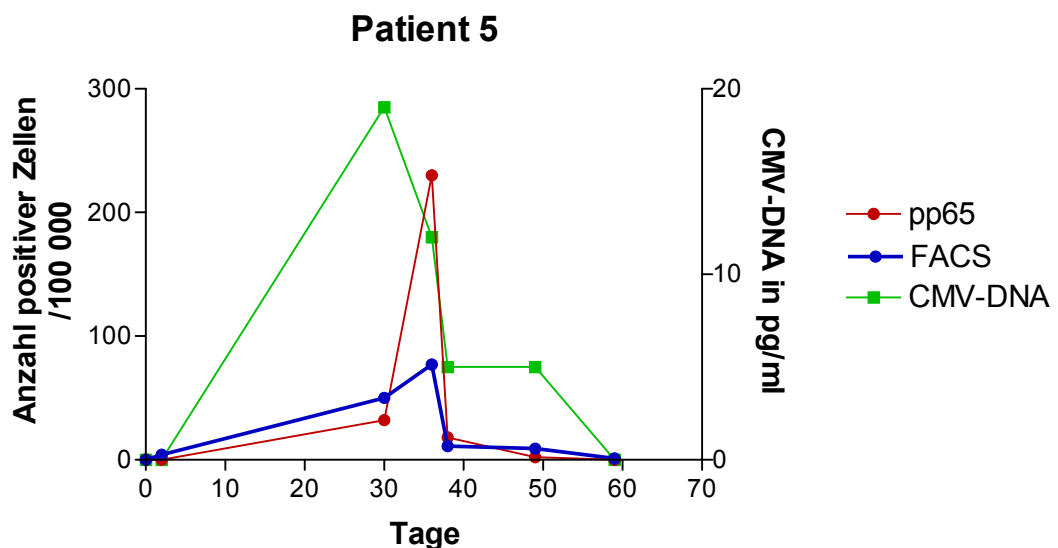


Abbildung 29: Patient 5 im Methodenvergleich

Die drei Vergleichsmethoden stimmen in ihrem Verlauf bei dieser **fünften Patientin** recht anschaulich überein. Der Hybrid-Capture Test reagiert im Verhältnis scheinbar früher als die beiden Verfahren zum Antigen-Nachweis. Die Verschiebung in der Höhe der einzelnen Kurven ist durch die beiden Skalen mit unterschiedlichen Einheiten bedingt. Trotz der Verschiebung der Kurven sind die Ergebnisse der Messungen in Wirklichkeit allerdings gut vergleichbar.

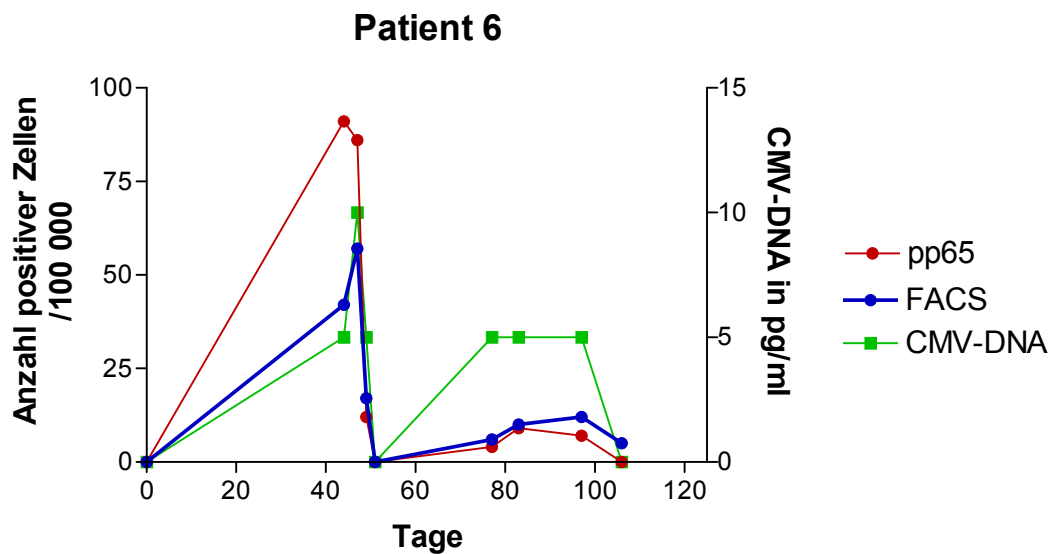


Abbildung 30: Patient 6 im Methodenvergleich

Bei diesem Patienten sprechen während des ersten Anstieges alle Vergleichsmethoden gleich gut an. Trotz der im vorangehenden Kapitel festgestellten erhöhten Eigenfluoreszenz der Kontrollröhrchen korrelierten die FACS-Ergebnisse auch in diesem Abschnitt recht gut mit denen des konventionellen pp65 und denen des Hybrid-Capture Testes.

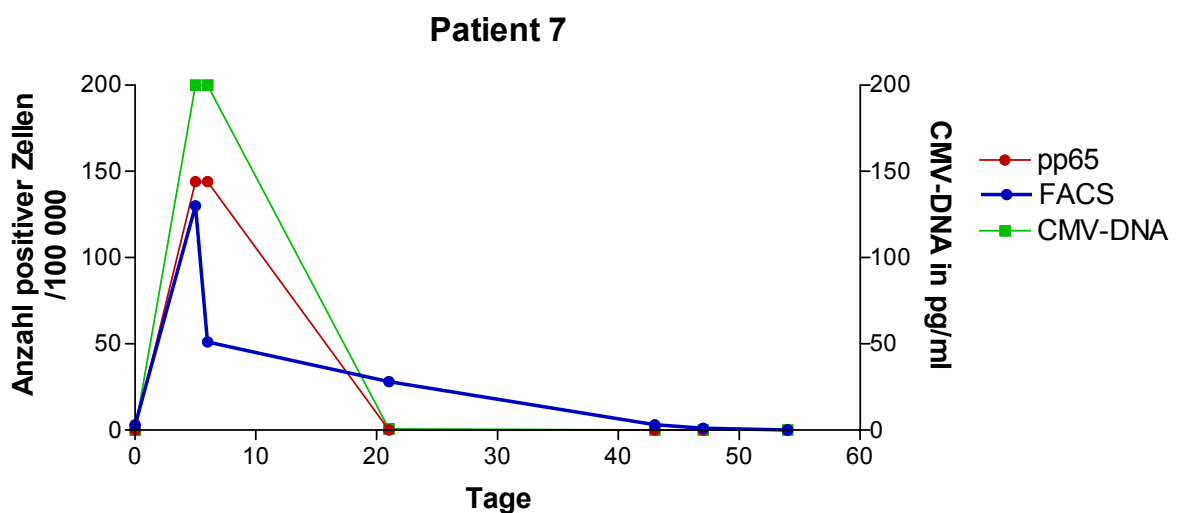


Abbildung 31: Patient 7 im Methodenvergleich

Bei diesem Patienten konnten mit der FACS-Analyse noch positive Signale nachgewiesen werden, als die beiden etablierten Methoden bereits negativ waren. Hier schien die FACS-Methode erneut sensitiver zu sein.

Zum anderen kann die Bildung von Virus-DNA im Zuge einer erfolgreichen Therapie eventuell bereits gehemmt bzw. gestoppt worden sein. Restliches, bereits gebildetes Phosphoprotein zirkuliert möglicherweise noch einige Zeit im Blut und kann hierüber mit den entsprechenden Methoden noch detektiert werden.

Dagegen blieben die Ergebnisse der FACS-Methode auch länger positiv als diejenigen des konventionellen pp65-Nachweises, da die Durchflußzytometrie als technisierte Methode sensibler reagiert und jede Zelle einzeln analysieren kann. Nach einer kurzen, hier dokumentierten, negativen Phase stiegen die Werte in der CMV-DNA mittels Hybrid-Capture Test wieder an und blieben längere Zeit grenzwertig positiv.

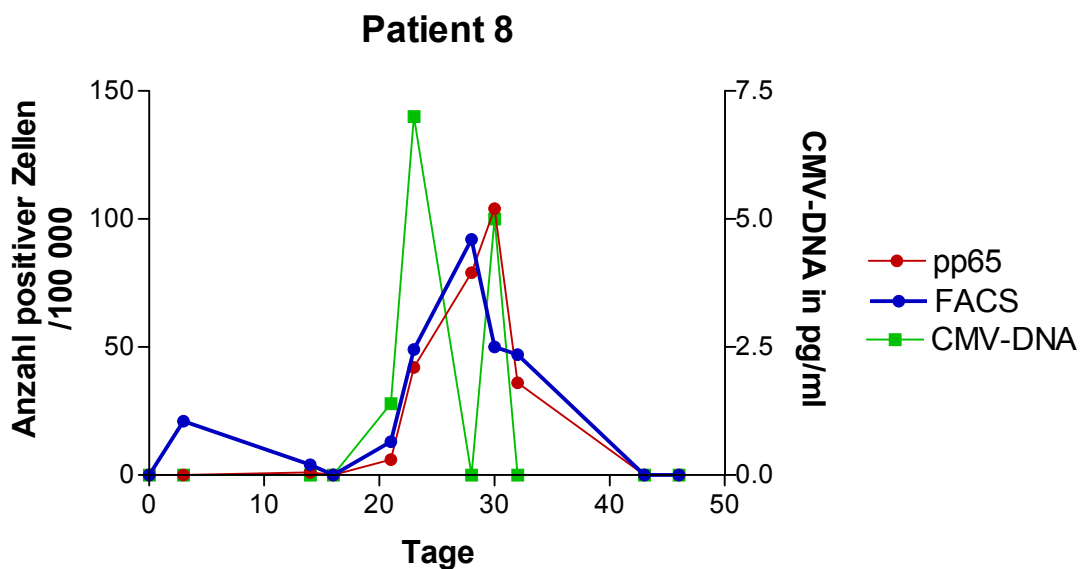


Abbildung 32: Patient 8 im Methodenvergleich

Bei diesem Patientenverlauf ist zu sehen, dass die beiden das Phosphoprotein nachweisenden Methoden etwas länger positiv bleiben und somit auch dann noch pp65 nachweisen können, wenn mittels des Hybrid-Capture Testes bereits keine CMV-DNA mehr detektiert werden kann. Der erste Anstieg der FACS-Verlaufskurve könnte eventuell auf die während dieser Zeit bei der Patientin stattgefundene Serokonversion hindeuten.

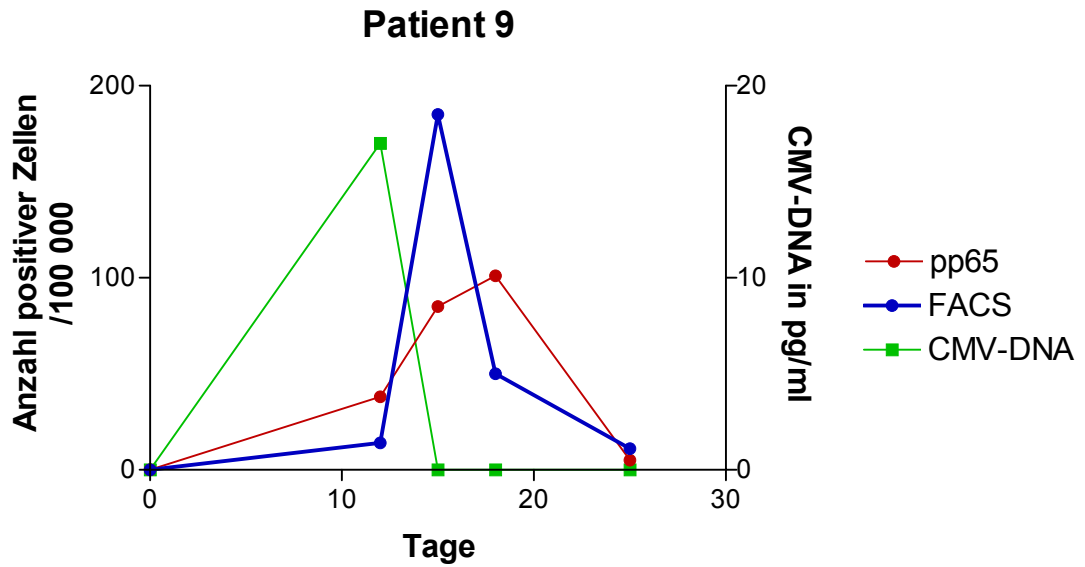


Abbildung 33: Patient 9 im Methodenvergleich

Deutlich zu erkennen ist in diesem Verlauf der frühere Abfall der CMV-DNA bzw. die längere Positivität und der etwas spätere Anstieg der Kurven von FACS- und konventionellem pp65-Methode.

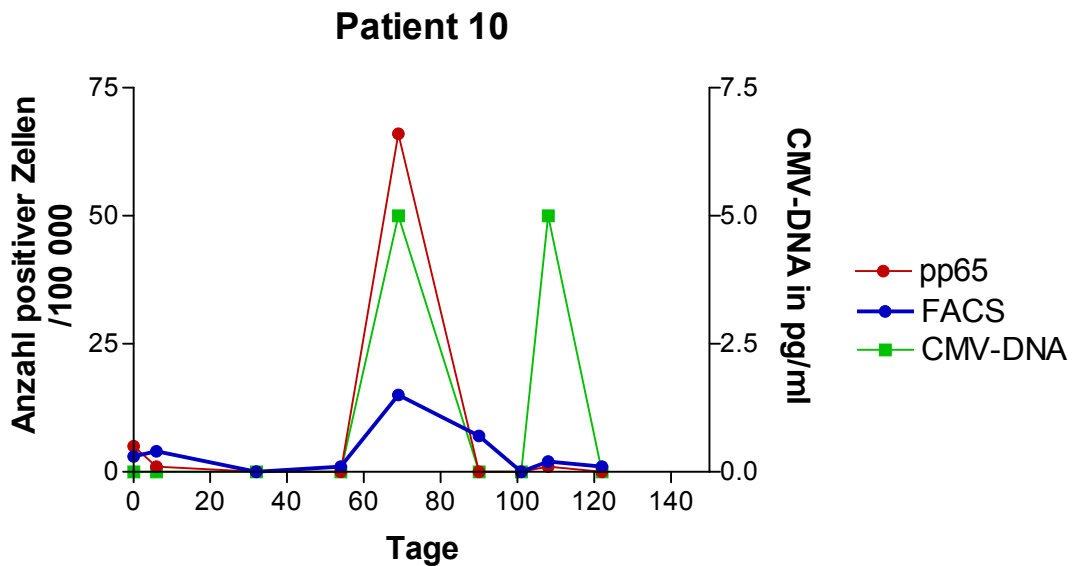


Abbildung 34: Patient 10 im Methodenvergleich

Der erste, im FACS eindeutig zu beurteilende Anstieg ab dem etwa 55. Tag stimmt mit den beiden anderen Vergleichsmethoden überein. Der zweite evidente Anstieg im Hybrid-Capture Test wird von den Vergleichsmethoden nur auf niedrigem Niveau erkannt.

5 DISKUSSION**5.1 Fragestellung und Ziel**

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Evaluation und Etablierung des pp65-Nachweises mittels FACS-Analyse einen Versuch zu starten, die CMV-Diagnostik zu optimieren und zu standardisieren. Es galt den bereits von einigen Arbeitsgruppen begonnenen Ansatz so weit zu etablieren, dass er in der Routinediagnostik von CMV-Erkrankungen einsetzbar würde. Dies wurde erreicht, indem das Testprotokoll im Vorfeld dieser Arbeit soweit überarbeitet wurde, dass z. B. die Übernachtinkubation, wie sie von Imbert Marcille et al. durchgeführt wurde, weggelassen werden konnte, und die Methodik somit viel variabler und flexibler einsetzbar wurde.

Die Vorteile der FACS-Analyse gegenüber dem konventionellen pp65-Antigenämie Test wären z. B. eine deutliche Reduktion des Arbeitsaufwandes von derzeit mindestens 5 Stunden auf etwa 3,5 Stunden. Die Methodik wäre durch eine Verringerung der beanspruchten Zeit und des Personals eventuell sogar als „Notfallbestimmung“ einsetzbar. Mit der FACS-Analyse würde eine objektive und untersucherunabhängige Analyse in der CMV-Diagnostik zur Verfügung stehen. Des Weiteren wäre die Untersuchung mittels FACS in ihrer Durchführung einfacher zu handhaben, so würde z. B. eine geringe Ausgangsblutmenge von nur 500 µl statt 8 ml ausreichen und damit eine Bestimmung von Säuglingsproben möglich sein. Zudem würde auch die aufwändige und fehleranfällige Herstellung einer optimalen Leukozytenverdünnung weggelassen.

5.2 Vorgehensweise

Alle gewonnenen Ergebnisse wurden zwei etablierten und bereits routinemäßig eingesetzten Labormethoden gegenübergestellt: dem konventionellen pp65-Antigenämietest auf Objektträgern und dem Hybrid-Capture-Test zur quantitativen CMV-DNA Bestimmung. Die beiden Vergleichsmethoden werden klinikintern, in einem Monitoringprogramm, bereits seit Jahren erfolgreich zur Früherkennung von CMV-Infektionen eingesetzt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Methodenetablierung durchgeführt. Anhand von zehn Patientenproben mit nachweislich replikativer CMV-Infektion wurden die Einwirkungen zweier unterschiedlicher Parameter auf das Testergebnis untersucht.

In der präanalytischen Phase wurden bei der Probengewinnung zum einen unterschiedliche Antikoagulanzen (EDTA- und Heparinblut) untersucht und zum anderen verschiedene Zeitpunkte der Probenaufarbeitung im Labor gewählt (sofort nach Eingang im Labor und nach 24 Stunden Lagerung bei 4 °C).

Im zweiten Teil dieser Arbeit galt es die Sensitivität sowie die Spezifität der FACS-Analyse zu ermitteln. Die Sensitivität wurde anhand der Ergebnisse von zehn Risikopatienten nach Lungen-, Leber-, Nieren- oder Stammzelltransplantationen, mit in Vergleichstesten nachweislich replikativer CMV-Infektion, untersucht. Die Spezifität der Testmethode wurde an einem Kollektiv von 100 CMV-positiven Probanden ohne Replikation ermittelt.

5.3 Diskussion der Methodenetablierung

5.3.1 Unterschiedliche Antikoagulanzen

Eine Methodik einschließlich des Messverfahrens kann durch Antikoagulanzen oder Bestandteile des Plasmas gestört werden, sie können als Komplexbildner oder Enzyminhibitoren wirken. Die beiden hier im Vergleich betrachteten Materialien unterbrechen die Blutgerinnung an verschiedenen Stellen und können daher für unterschiedliche Untersuchungsmethoden eingesetzt werden.

Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin wird dadurch gewährleistet, dass die Komplexbildung von Antithrombin 3, Thrombin und der Faktoren IXa, Xia und XIIa gefördert wird. Allerdings kann das als Kation verwendete Lithium oder Ammonium des Heparins ebenfalls mit der jeweiligen Testmethode interferieren. Das als Antikoagulanzen eingesetzte EDTA ist kalziumbindend, inhibiert die Faktoren V und VIII und bildet stabile Metallkomplexe. Wegen möglicher Chelatbildung mit Ca^{2+} und einem möglichen Einfluss auf die Komplementaktivierung kann EDTA-Blut für manche Testmethoden weniger gut geeignet sein.

Bei den hier durchgeführten Messungen konnte festgestellt werden, dass bei den Ergebnissen der FACS-Analyse aus EDTA-Blutproben der Median der Reduktion bei 83,3 % lag. Die Werte, die aus EDTA-Blut erzielt werden konnten, lagen in allen Fällen unter denen, die mittels Heparinblut gewonnen wurden. Bei den FACS-Messungen mit Heparinblut konnten alle zehn Proben als positiv erkannt werden, bei denen mit EDTA lediglich sechs. Die aus diesen Ergebnissen ersichtliche geringere Sensitivität der Bestimmungen aus EDTA-Proben bei nachweislich pp65 positiven Patienten führte im Folgenden dazu, nur Heparin-Blut bei den Messungen einzusetzen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Storch et. al. 1994. In deren Arbeit wurden ebenfalls die eventuell inhibierenden Effekte der Antikoagulanzen Heparin und EDTA allerdings auf den konventionellen pp65-Antigenämietest, die Kurz-Zeit-Kultur und die PCR-Methode untersucht. Sie konnten jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Heparin und EDTA-Blutproben feststellen.

5.3.2. Unterschiedliche Aufarbeitungszeiten

Hierzu wurden zehn Blutproben von bekannt pp65-positiven Patienten, bestätigt durch einen positiven konventionellen pp65 und/oder positiven Hybrid-Capture Test, nach zwei unterschiedlichen Lagerungszeiten mittels FACS analysiert. Zur Ermittlung eines Basiswertes wurden jeweils 500 µl Heparinblut direkt nach Eintreffen im Labor aufgearbeitet. Etwa 1 ml des unbearbeiteten Blutes wurde bei 4 °C im Heparinröhrchen für 24 Stunden gelagert und danach erst für die FACS-Methode isoliert und gefärbt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die beide FACS-Proben parallel unter den gleichen Bedingungen gemessen.

Es konnte festgestellt werden, dass bei einer Lagerung der Blutproben von 24 Stunden bei 4 °C eine deutliche Reduktion in der Anzahl der pp65-positiven Leukozyten auftrat. So konnte eine Reduktion im Median von etwa 62,5 % ermittelt werden.

Ein ähnliches Phänomen wurde bereits von Schäfer et al. [1997] beim konventionellen pp65-Nachweis beobachtet. Sie analysierten anhand der Proben von 25 Patienten mit replikativer CMV-Infektion den möglichen Einfluss einer Probenlagerung auf die Ergebnisse des konventionellen pp65-Antigenämietestes und der quantitativen PCR.

Nach der Ermittlung von Basiswerten direkt nach Probengewinnung wurden die Proben aliquotiert, bei Raumtemperatur sowie bei 4 °C gelagert und nach jeweils 6, 24, 48 und 72 Stunden mit beiden Nachweismethoden die Reduktionskinetik bestimmt. Bei der PCR konnten keine signifikanten Änderungen beobachtet werden. Bei der konventionellen pp65-Analyse kam es jedoch zu deutlich feststellbaren Verringerungen der Zellzahlen, wobei der Zerfall bei 4 °C etwas geringer war als bei einer zeitgleichen Lagerung bei Raumtemperatur. Ein signifikanter Zerfall konnte ab einer Lagerung von 24 Stunden beobachtet werden, während die Werte nach sechs Stunden noch keine deutliche Reduktion ergaben. So konnten z. B. eine Reduktion von eingangs gemessenen ~ 550 Zellen auf 350 pp65-positive Zellen nach 24 Stunden bis hin zu 200 Zellen nach 48 Stunden bei 4 °C detektiert werden. Ab einer Lagerung von 48 Stunden wurden bei etwa zehn Patientenproben sogar falsch-negative Testergebnisse detektiert. Die Beobachtungen von Schäfer et al. konnten daher im Rahmen der Methodenetablierung der in dieser Arbeit vorgestellten Testmethode bestätigt werden.

Auf Grund der in der präanalytischen Phase gewonnenen Daten schien es sinnvoll, für eine pp65-Analyse mittels FACS Heparinblut wegen der höheren Sensitivität und eine sofortige Aufarbeitung des Materials zu fordern. Die Studie im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch unter diesen Bedingungen zur Präanalytik durchgeführt.

5.4 Diskussion der Methodenevaluation

Zur klinischen Evaluation wurden zehn Risikopatienten nach Lungen-, Leber-, Nieren- oder Stammzelltransplantationen mit nachweislich replikativer CMV-Infektion und 100 CMV-positive Probanden ohne Virusreplikation untersucht.

5.4.1 Diskussion der Grenzwertberechnung

Als Schwierigkeit erwies sich die Einordnung gewonnener Ergebnisse der FACS-Analyse in die Kategorien „falsch-negativ“ oder „falsch-positiv“, weil es keine Goldstandardmethode gibt. Von daher wurde zuerst die „CMV-Episode“ definiert. Alle während dieser Episode gewonnenen Messdaten galten im folgenden als richtig-positiv.

Der Beginn dieser Episode war gekennzeichnet durch je ein positives Testergebnis in zwei Vergleichstesten bzw. zwei aufeinander folgende positive Daten in einem Verfahren. Das Ende einer Episode war charakterisiert durch negative Ergebnisse aller drei Nachweismethoden. Die Daten des konventionellen pp65-Antigenämie- und des Hybrid-Capture Testes richteten sich hierbei nach dem methodischen Grenzwert des jeweiligen Analyseverfahrens. Dies war eine positive Zelle pro 100.000 beim konventionellen pp65-Nachweis und der nach den Herstellerangaben zu berechnende Grenzwert der CMV-DNA Bestimmung.

Die Definition eines Grenzwertes wird bei der CMV-Diagnostik, und hier vorrangig beim konventionellen pp65-Test, allerdings bereits seit Jahren kontrovers diskutiert.

Zum einen muss methodisch ein Grenzwert definiert werden, der ein Signal von einem Hintergrundrauschen differenziert. Dagegen gebraucht man, von der klinischen Seite aus gesehen, aber oft einen anderen "klinischen" Grenzwert, ab dem klinische Konsequenzen (z. B. die Einleitung einer Therapie) folgen. Letzterer Wert ist klinisch etabliert und hat Bezug zur Interpretation der Befunde, nicht zur eigentlichen Testmethode. Er gibt an, ab wann eine Patientenprobe als auffällig gilt.

Der Grund, warum im Zusammenhang mit CMV häufig zwei verschiedene Grenzwerte verwendet werden, ist die Tatsache, dass nicht alle Patienten mit Nachweis von CMV-Antigen oder DNA Replikation auch klinisch erkranken. Die Wahrscheinlichkeit steigt zwar mit der Anzahl der positiven Zellen oder der Menge an DNA an, jedoch können in Einzelfällen Patienten mit niedrigen Werten symptomatisch erkranken, oder solche mit hohen Werten asymptomatisch bleiben.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wurden im Gegensatz zu den sonst in der Literatur in Prozent angegebenen Resultaten als absolute Zellzahl pro 100.000 registrierter Signale angegeben, um die bessere Vergleichbarkeit mit dem konventionellen pp65-Antigennachweis zu ermöglichen. In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wird davon ausgegangen, dass die optimale Zellzahl, die es im konventionellen pp65-Nachweis auszuwerten gilt, zwischen 100.000 und 200.000 Zellen liegt [Boeckh et al. 1998, The et al. 1995]. Um nun eine bessere Vergleichbarkeit zwischen dem durchgeführten konventionellen pp65-Antigenämietest und der FACS-Analyse gewährleisten zu können, wurden auch in der Durchflußzytometrie 100.000 Signale ausgewertet.

Imbert Marcille et al. [1997] zählen in ihrer Studie lediglich 50.000 Zellen mittels FACS aus. Jedoch wurde auch bei dieser eher geringen Gesamtzellzahl eine recht hohe Anzahl von pp65-positiven Leukozyten in den jeweiligen Patientenproben detektiert.

Bei Patienten ohne replikative Infektion konnten Werte von $< 0,03$ % gemessen werden. Die entsprechenden Proben wurden daher als „negativ“ betrachtet. Der in dieser Studie getestete 1C3-Antikörper-Grenzwert lag bei negativen Patienten bei $< 0,05$ %. Bei positiven Patienten wurden Ergebnisse von 0,14 - 0,15 % erreicht.

Imbert Marcille et al. [1997] führten in ihrer Studie eine isotype Kontrolle mit, um die Höhe der Hintergrundfluoreszenz zu messen. So konnte schließlich von dieser Arbeitsgruppe ein Grenzwert im FACS bei 0,05 % etabliert werden. Da Poirier-Toulemonde et al. [2000] nach derselben Methode arbeiteten, gingen auch sie von einem Grenzwert von 0,05 % in der Durchflusszytometrie aus. Zusätzlich wurde in dieser Studie ein Schwellenwert für die FACS-Analyse von 0,20 % positiver Leukozyten (Monozyten und Granulozyten) angegeben, ab dem bei Organtransplantierten aus Sicht dieser Autoren eine klinisch relevante Erkrankung wahrscheinlich war. Die positiv getesteten Proben wiesen Zahlenwerte von $> 0,05$ bis 4,91 % pp65-positiven Zellen auf. Die im Vergleich dazu angegebenen Ergebnisse des konventionellen pp65-Antigenämie Testes lagen zwischen einer und 900 positiver Zellen pro 200.000 insgesamt ausgezählten Leukozyten.

Ungewöhnlich erschienen die doch recht hohen Zellzahlausbeuten, die sowohl Imbert Marcille et al. [1997] als auch Poirier-Toulemonde et al. [2000] erreichen konnten. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie konnten nur bei wenigen Patienten ähnlich hohe Daten ermittelt werden. Lediglich bei vier Messungen konnten Resultate > 90 pp65-positiver Leukozyten detektiert werden.

Ein ähnliches Phänomen wurde allerdings bereits bei von Müller et al. [2002] eindrucksvoll belegt. Dort wurden u.a. die Ergebnisse des konventionellen pp65-Antigenämietestes von fünf Laboratorien miteinander verglichen. Es konnten teils beachtliche Differenzen zwischen den einzelnen Laboren festgestellt werden. Erklären lassen sich solche Unterschiede in der Bestimmung mittels Antigenämie-Test damit, dass der pp65-Nachweis nicht standardisiert ist.

Es werden eine Vielzahl unterschiedlichster Antikörper verwendet, die Präparation der Leukozyten sowie auch die Anzahl der examinieren Zellen variiert mitunter von Labor zu Labor. Daraus folgerten von Müller et al. [2002], dass die Detektionsrate der einzelnen Laboratorien mittels lokal etablierter Methoden für klinische Zwecke ohne weiteres verwendet werden kann, jedoch Ergebnisse von unterschiedlichen Laboratorien nur schwer miteinander zu vergleichen sind.

Bei Essa et al. [2000] wurden die Untersuchungen und Ergebnisse eher im Bezug zu möglichen CMV-definierenden Symptomen betrachtet. Die Patienten dieser Studie mussten mindestens eines der CMV-assoziierten, vorher definierten Symptome und einen positiven pp65-Antigenämie-Test aufweisen, um als labordiagnostisch „positiv“ zu gelten. Aus der Gesamtschau dieser Studie lässt sich daher aber keine direkte Eignung für die CMV-Diagnostik im Rahmen einer präemptiven Therapie ableiten. Bedingt durch die unspezifische Symptomatik und die zahlreichen Differentialdiagnosen einer CMV-Erkrankung bereitet es demzufolge ohnehin große Schwierigkeiten, eine entsprechende Studie an klinischen Parametern festzumachen. Wie bereits eingangs erwähnt, stellt die Bewertung der Zellzahl bezogen auf ihren methodischen bzw. ihren klinischen Grenzwert eine Schwierigkeit in der Beurteilung dieser Studie dar. Die Einteilung der FACS-Ergebnisse in Tabelle 4 geht auf die methodischen Grenzwerte der Vergleichsteste zurück, d.h. eine positive Zelle im konventionellen pp65 und/oder ein positives Ergebnis, gemäß den Herstellerangaben, im Hybrid-Capture-Test.

So konnte zum Beispiel bei 64 Messungen das „negative“ Ergebnis der beiden Vergleichsteste mit null Zellen in der FACS-Analyse bestätigt werden. Jedoch konnten auch bei eigentlich „positiven“ Resultaten in drei Fällen im FACS keine Signale detektiert werden. Andererseits gab es wiederum „negative“ pp65- und Hybrid-Capture Test-Proben, bei denen mittels FACS sehr hohe Zellzahlen, von z. B. 82 oder 65, ermittelt werden konnten.

Auf diese Weise konnte ein Grenzwertbereich zwischen drei und vier positiven Zellsignalen etabliert werden. Wird, wie sonst in der Literatur üblich, versucht einen Grenzwert in Prozent anzugeben, so würde dieser für den in dieser Studie zu

ermittelnden methodischen Grenzwert bei ca. 0,02 % liegen. Dieser Wert liegt, ähnlich wie die im Rahmen dieser Studie detektierten absoluten Zellzahlen, weit unter dem Betrag von 0,05 %, der in anderen Veröffentlichungen ermittelt werden konnte. Würde der Grenzwert auf 0,05 % angehoben, würde sich damit auch der Grenzwert der absoluten Zellzahlen von > 4 auf Zellzahlen von > 15 erhöhen. Damit hätten einige der hier ermittelten Ergebnisse von Patienten mit Virus-Replikation bei den Monitoringverläufen allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt als positiv eingestuft werden können. Das Ziel einer Diagnostik im Rahmen einer präemptiven Therapie ist jedoch die frühzeitige Detektion von Patienten mit einer Reaktivierung, so dass an den gewonnenen Analyseergebnissen festgehalten werden konnte, auch hier wieder in Verbindung mit der Veröffentlichung von von Müller et al. [2002].

5.4.2 Diskussion der Übereinstimmung der drei Nachweismethoden – im allgemeinen und direkten Vergleich

Der konventionelle pp65- und der Nachweis mittels FACS haben das gleiche Ziel. Sie weisen beide die gleiche Komponente nach: Das sich in den Leukozyten befindliche Phosphoprotein pp65. Der Hybrid-Capture-Test, bei dem Virus-Genom detektiert wird, reagiert im Verhältnis früher als die beiden erst später im Infektionszyklus auftretenden Antigen-nachweisenden Methoden. Da die Virus-DNA während eines Infektionszyklus zuerst gebildet wird, scheint es nur physiologisch, dass eine solche Detektionsmethode auch zuerst positiv wird. Es handelt sich hierbei allerdings nicht um einen Zeitraum, der mehrere Tage umfasst.

Sicherlich ist es nur ein kurzer zeitlicher Abstand zwischen den beiden Vorgängen im Infektionszyklus, der bedingt durch die Intervalle der Blutentnahme nur in einigen Fällen als getrenntes Phänomen erfasst werden konnte.

Bei 35,5 % aller richtig positiven Messungen konnte daher auch eine Übereinstimmung der Ergebnisse aller drei Methoden nachgewiesen werden.

Erwartungsgemäß waren mit ca. 51 % mehr Proben im konventionellen pp65-Nachweis und in der FACS-Analyse gleichzeitig positiv. Nur etwa 44 % Übereinstimmung bestand hingegen zwischen der CMV-DNA-Bestimmung und der Durchflußzytometrie. Zwischen dem konventionellen Antigenämietest und der FACS-Methode konnte eine höhere Übereinstimmung somit bestätigt werden.

Dies scheint wiederum die oben dargestellte Vermutung zu bestätigen. Sie lässt sich aufgrund der gemeinsamen Untersuchungsmatrix der beiden Methoden erklären.

Poirier-Toulemonde et al. [2000], die in ihrer über zwei Jahre laufenden Studie etwa 1300 Blutproben untersuchten, konnten eine bessere Übereinstimmung von etwa 59 % zwischen der FACS-Analyse und der qualitativen PCR beobachten. Die von ihnen ermittelte Übereinstimmung zwischen Durchflußzytometrie und konventionellem pp65-Nachweis lag bei etwa 47 %. Die in dieser Studie angegebenen Korrelationskoeffizienten für die quantitativen Werte lagen bei $r = 0,38$ für den Vergleich von Daten aus der FACS-Analyse mit Ergebnissen der PCR und bei $r = 0,76$ für den Vergleich mit der konventionellen pp65-Testung.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach Auswertung der im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit detektierten Werte. Die Gegenüberstellung von Hybrid-Capture-Test und Durchflußzytometrie ergab einen niedrigeren Koeffizienten von $r^2 = 0,13$ als dies beim konventionellen pp65-Nachweis der Fall war ($r = 0,38$). Insgesamt konnte aber in dieser Studie nur eine deutlich schlechtere Korrelation zwischen den Testen ermittelt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass man die absoluten Zellzahlen der Durchflußzytometrie und des pp65 nicht unbedingt direkt miteinander vergleichen kann. So entsprechen 0,05 % im FACS nicht zwangsläufig ca. 50 positiven Zellen aus einer Gesamtzahl von 100.000 im konventionellen pp65-Nachweis. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in beiden Methoden unterschiedliche Zellpopulationen analysiert wurden. Im konventionellen pp65-Antigenämie-Test wird die gesamte Leukozytenpopulation, bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, unter dem Mikroskop betrachtet. Im Rahmen des für diese Studie verwendeten Protokolls für die FACS-Analyse wurden lediglich Monozyten und Granulozyten gemessen.

Auf der anderen Seite können diese Zellen bei der Durchflußzytometrie individueller betrachtet und als Einzelobjekt am Laser vorbeigeführt werden. Die Methode ist dadurch möglicherweise ein sensitiverer Detektor von niedrigen Antigenmengen als die mikroskopische Betrachtung. Trotz sorgfältigster Präparation der Zellen im pp65-Antigenämie-Test ist nicht immer gewährleistet, dass die Zellen auf dem Objektträger nicht doch übereinander liegen und sich im folgenden nicht so gut anfärben lassen. Überlagerungen von Einzelzellen können schließlich dazu führen, dass die

Betrachtungsebene im Mikroskop nicht korrekt eingestellt werden kann und damit die Beurteilung der Farbtintensität und Fluoreszenz erschwert wird.

In den Untersuchungen von Essa et al. [2000] zeigte sich, dass alle im konventionellen pp65-Nachweis negativen Proben auch im FACS negativ waren. Bei den positiven Ergebnissen zeigte sich erst bei Zellzahlen > 200 eine gute Korrelation zwischen den beiden Testen. Patientenproben mit 5-20 positiven Zellen bei einer Gesamtzellzahl von 50.000 im konventionellen pp65-Nachweis waren auch im FACS positiv mit einer mittleren Fluoreszenz von 0,16 %.

5.4.3 Diskussion der Übereinstimmung der drei Nachweismethoden – auf die Krankheitsverläufe einzelner Patienten bezogen

Die oben beschriebene recht gute Übereinstimmung der drei verschiedenen Nachweisverfahren ist bei den Verläufen der Patienten 3, 5, 6 und 10 sehr anschaulich zu erkennen. Jedoch konnte z. B. bei den Patienten 1 und 4 beobachtet werden, dass die Ergebnisse der FACS-Analyse mitunter eher positiv wurden als diejenigen, die mit dem konventionellen pp65-Nachweis gemessen wurden. Dies könnte die bereits auch von Poirier-Toulemond et al. [2000] erwähnte Theorie der höheren Sensitivität der FACS-Methode gegenüber dem, subjektiv auszuwertenden konventionellen pp65-Antigenämie-Test zusätzlich bestätigen. Betrachtet man die Patientenverläufe, so fällt auf, dass gelegentlich, z. B. bei Patient 7 und 8, sowohl das Ergebnis des konventionellen pp65-Nachweises (Patient 7) als auch die Ergebnisse der FACS-Methode (Patient 7 und 8) länger positiv bleiben als der DNA Nachweis mittels Hybrid-Capture Test. Ähnliches konnte auch von Poirier-Toulemonde et al. [2000] beobachtet werden.

Wahrscheinlich wird bereits synthetisiertes pp65, welches auch noch einige Zeit nach Beginn einer präemptiven Therapie weiterhin synthetisiert und von den Leukozyten phagozytiert wird, von den beiden Nachweismethoden, und hier vor allem von der scheinbar sensitiveren FACS-Methode, nachgewiesen, während die DNA-Replikation durch die Medikamente bereits geblockt ist.

5.4.4 Diskussion von „Ausreißer“-Ergebnissen

Bereits zu Anfang der Diskussion wurde erneut auf die Schwierigkeit der Beurteilung der Ergebnisse der FACS-Analyse vor dem Hintergrund der Goldstandard-Definition, hingewiesen. Die Zuordnung von positiven FACS-Ergebnissen, deren Gegenstücke in den beiden Vergleichstesten ebenfalls positiv waren, bzw. Analysen, die in allen drei Testen negative Ergebnisse aufwiesen, war unproblematisch.

Eine Reihe von Abweichungen zwischen den einzelnen Untersuchungsmethoden, bei denen nur zwei bzw. mitunter auch nur einer der Teste ein positives Ergebnis ergaben, konnten anhand des Monitoringverlaufes der einzelnen Patienten erklärt werden. Zum einen ließen sich solche Aberrationen durch den unterschiedlichen Gegenstand des Nachweises – einerseits die sehr früh auftretende Virus-DNA, andererseits das erst später gebildete Antigen – und dessen zeitliches Auftreten während eines Infektionszyklus erklären. Zum anderen spielten sicherlich auch die unterschiedlichen Sensitivitäten der einzelnen Methoden eine wesentliche Rolle.

Vereinzelt traten allerdings auch Patientenproben auf, die in den beiden Vergleichstesten negativ, im FACS hingegen mit z. B. 82 bzw. 65 Zellen deutlich positiv waren. Im weiteren Krankheitsverlauf konnten bei diesen Patienten jedoch keinerlei weitere Hinweise auf eine mögliche CMV-Infektion oder Erkrankung beobachtet werden. Zwei der auf diese Art und Weise detektierten Patientenproben waren bis weit nach dem Ende der Betrachtungsperiode zudem CMV-seronegativ, so dass es sich am ehesten um einen falsch positiven Nachweis handelte. Bei Poirier-Poulemonde et al. werden solche isoliert FACS-positiven Ergebnisse derart erklärt, dass es im Zuge möglicher unspezifischer Bindungen der monoklonalen Antikörper oder durch die Detektion sehr niedriger CMV-Level, die unter den Nachweisgrenzen anderer Techniken liegen, zu einer entsprechenden Beeinflussung der Durchflußzytometrie kommt.

Möglicherweise kann mittels FACS-Analyse in Ausnahmefällen nicht zwischen einer wirklichen Kernfluoreszenz und z.B. Zytoplasmafluoreszenzen unterschieden werden. Dies stellt zweifelsohne eine Schwachstelle des FACS-Nachweises dar. Im konventionellen pp65-Nachweis kann durch den Beobachter eine subjektive Bewertung der unterschiedlichen Fluoreszenzgrade stattfinden.

Unspezifische Bindungen können besser als solche erkannt und die entsprechende Patientenprobe in Folge als negativ oder eventuell nicht auswertbar interpretiert werden. Als mögliche Ursachen für diese störenden Fluoreszenzen könnten beide Antikörper verantwortlich sein. Vorrangig käme hier sicherlich der erste Antikörper in Betracht. Dieser ist in den Kontrollen nicht enthalten und könnte durch Bindung an den FITC-konjugierten zweiten Antikörper zu unspezifischer Fluoreszenzen in einer Probe führen bei gleichzeitig negativer Kontrolle. Jedoch traten auch eine Reihe von Messungen auf, bei denen nicht nur in den eigentlichen Proben, sondern gerade auch in den Kontrollen scheinbar positive Zellen detektiert werden konnten. Diese waren sicherlich eher auf Bindungen zurückzuführen, die primär durch den zweiten Antikörper verursacht wurden. Vereinzelt war die Eigenfluoreszenz der Kontrollen sogar höher als die der eigentlichen Probe (so z. B. auch bei Patient 2). Hieran lässt sich erneut der große Nachteil der FACS-Methode verdeutlichen.

Während unspezifische Bindungen, unter dem Mikroskop betrachtet, als Artefakte oder „Sternenhimmel“- oder Zytoplasma-Fluoreszenzen beurteilt werden können, kann mittels Durchflußzytometrie nicht zwischen solchen Strukturen oder Artefakten und den spezifisch positiven, fluoreszierenden Zellkernsignalen unterschieden werden. Obwohl Zelltrümmer u.ä. mittels der konventionellen Scatter-gating-Methode ausgeschlossen wurden, konnten die unspezifische Fluoreszenzen in Ausnahmefällen nicht vollständig von der Beurteilung ausgeschlossen werden. Im Ausblick werden im folgenden Möglichkeiten diskutiert, mit denen solche Störungen reduziert bzw. möglicherweise auch vermieden werden könnten.

Woran binden die Antikörper nun? Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um unspezifische Bindungen der Antikörper an zelluläre Strukturen handeln könnte. Auch könnten Verunreinigungen des FACS-Gerätes Ursachen solcher Störungen sein. Es wäre des weiteren möglich, dass die Zellen im Zuge der Präparation einem zusätzlichen mechanischen Stress ausgesetzt werden, der dazu führt, dass sie durch Quetschungen o.ä. vermehrt beschädigt werden. Diese Schäden könnten zusammen mit dem bei der Zellpräparation fürs FACS eingesetzten Saponin dazu führen, dass im zunehmenden Maße fluoreszierende Antikörper in die Zellen eindringen.

Zweifelsohne sind die Zellen auch beim konventionellen pp65-Nachweis einer ähnlichen mechanischen Beanspruchung ausgesetzt, allerdings hat man bei diesem Nachweis die Möglichkeit unspezifischen Fluoreszenzen im Mikroskop subjektiv zu differenzieren.

Deswegen wurde bei einigen Patientenproben mit dem Verdacht auf unspezifische Fluoreszenz je 50 µl der vorbereiteten FACS-Lösung auf einen Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop betrachtet, um eventuell auf diese Art und Weise störenden Fluoreszenzen ausfindig zu machen. Die meisten Proben konnten so einfach als unspezifisch beurteilt werden.

5.5 Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse

Zur Beurteilung der Qualität eines neuen Testes ist es von großer Wichtigkeit, dass er an bereits etablierten Standardmethoden gemessen wird und im folgenden die Werte der jeweiligen Testsensitivität sowie der Testspezifität ermittelt werden.

Sie beschreiben die Aussagekraft eines Testes und müssen vor jeder praktischen Anwendung eines neuen Testes in der Routinediagnostik ermittelt werden. Beide Werte vermitteln eine Information zur Wahrscheinlichkeit, mit der eine Person tatsächlich an einer bestimmten Erkrankung leidet oder nicht.

Die **Sensitivität** gibt hierbei die Wahrscheinlichkeit an, mit der durch ein positives Testergebnis die richtige Diagnose gestellt werden kann. Die **Spezifität** hingegen gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der durch ein negatives Testergebnis Nichtkranke erkannt werden können. Durch Senkung bzw. Erhöhung des Grenzwertes können die Sensitivität sowie die Spezifität gegenläufig beeinflusst werden. Allgemein lässt sich sagen, dass ein Test mit einer hohen Sensitivität nahezu alle Erkrankten erfasst. Ein negatives Testresultat kann eine eventuelle Erkrankung dann mit recht hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, weil die Anzahl der Probanden, die trotz negativem Test die gesuchte Erkrankung haben, verhältnismäßig klein ist.

Da bei den untersuchten Patienten keine verlässlichen Angaben über eventuelle klinische Manifestationen aufgrund der präemptiven Therapiestrategie zu gewinnen waren, bezogen sich die ermittelten Werte rein auf den methodischen Grenzwert, der im Vergleich mit den zwei Vergleichsmethoden ermittelt werden konnte.

Für drei pp65-positive Zellen im FACS lag die Spezifität bei 76,2 %, die Sensitivität bei 84,5 %. Bei vier positiven Zellen als Grenzwert konnte in der FACS-Analyse eine Spezifität von 84,6 % und eine Sensitivität von 77,5 % ermittelt werden. Bei fünf positiven Zellen lagen die Werte für die Spezifität bei 90,2 % und die Sensitivität bei 74,6 %. Bei dem in folgenden definierten Grenzwert von ≥ 4 Zellen konnten somit 55 Proben als richtig positiv bewertet werden, 121 Messungen als richtig negativ, bei 22 Patientenproben wurden hingegen falsch positive Ergebnisse erzielt, und bei 16 Proben war das Ergebnis falsch negativ.

5.6 Fazit

Die errechneten Werte zeigten, dass die FACS-Methode zum Einsatz in der CMV-Routinediagnostik zur Zeit nur mit Einschränkungen von Nutzen sein kann. Dies wurde u.a. auch durch den recht hohen Anteil von falsch negativen bzw. falsch positiven Patientenproben verdeutlicht. Eindeutig negative FACS-Proben, die sowohl in der Kontrolle als auch in der eigentlichen Probe keine Zellen detektieren lassen, können ohne weiteres als negativ interpretiert werden. Sie stimmen in etwa zu 95 % mit den eindeutig negativen Proben der beiden Vergleichsteste überein. Sobald im FACS jedoch positive fluoreszierende Signale detektiert werden, sei es in der Probe oder vor allem auch in der Kontrolle, ist Vorsicht geboten. Auch bei eindeutig negativer zugehöriger Kontrolle ist nicht gesagt, dass die Messung klar beurteilt werden kann, wie die oben aufgeführten Beispiele zeigen.

Es kann unter Umständen notwendig sein, die Lösung auf einen Objektträger aufzutragen und gesondert noch einmal kurz unter dem Mikroskop anzuschauen. Durch diese einfache Maßnahme ist eine deutliche Verbesserung zu erhalten, weil unspezifische Fluoreszenzen leicht zu erkennen sind. Auch bei Proben die auffällig sind, und deren Kontrollröhrchen ebenso eine hohe Eigenfluoreszenz aufweist, kann es besser und somit auch sicherer sein, die FACS-Lösung selbst noch einmal unter dem Mikroskop explizit zu betrachten.

Zum allgemeinen Screening könnte die Methode daher durchaus eingesetzt werden.

Hierbei würden dann sicherlich auch die anfangs erwähnten Vorteile eine bedeutende Rolle spielen, wie z. B. der geringere Arbeitsaufwand und auch die geringere für den Test einzusetzende Blutmenge. Werden in einer Probe und auch in einer entsprechenden Kontrolle allerdings Signale detektiert, müssten die entsprechenden Proben zusätzlich noch unter dem Fluoreszenzmikroskop nachuntersucht werden. Dadurch könnten unspezifische Fluoreszenzen und somit auch falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen bzw. zugehörige Proben als unspezifisch interpretieren werden.

Des weiteren müssten die Ergebnisse der FACS-Methode, sollte sie zum allgemeinen Screening eingesetzt werden, unbedingt mit einem zusätzlichen Testverfahren überwacht oder abgeglichen werden.

6 AUSBLICK

Wie gezeigt werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die pp65-Analyse mittels FACS-Methode für den Einsatz in der CMV-Routinediagnostik zu etablieren und zu evaluieren. Es konnten allerdings nicht alle zu Beginn der Studie vermuteten Vorteile der Durchflußzytometrie für die CMV-Diagnostik bestätigt werden. Trotzdem handelt es sich bei dieser Methode um ein schnelles und sensitives Nachweisverfahren, dessen Etablierung auf dem Gebiet der Früherkennung von CMV-Erkrankungen, insbesondere auch bei Neu- und Frühgeborenen bedingt durch die geringere Blutmenge von nur 500 µl, auch weiterhin von Nutzen sein könnte. Hierzu wäre es jedoch sicherlich sinnvoll, das Nachweisverfahren durch weitere Variationen und Korrekturen zu optimieren. Zusätzlich könnte versucht werden, die Wertigkeit des Nachweises und die Übereinstimmung mit den klinischen Daten und durch zusätzliche Vergleichsmethoden, wie z. B. die CMV-RNA Messung mittels NASBA, aufzuwerten. Um das System der FACS-Analyse für das Gebiet der Routinediagnostik weiter auszubauen, müsste primär versucht werden, den doch verhältnismäßig hohen Anteil an unspezifischen Fluoreszenzen in manchen Proben sowie auch in einer Vielzahl von Kontrollproben zu reduzieren.

Hierzu könnte versucht werden, mit anderen Antikörpern zu arbeiten. So könnten in weiterführenden Studien z. B. Antikörper mit einer anderen Epitoperkennung zum Einsatz kommen.

Um die unspezifischen Bindungen von Seiten der Antikörper reduzieren bzw. unterbinden zu können, wäre es möglicherweise angebracht, einen direkt markierten Erstantikörper einzusetzen. Auf diesem Wege könnten Störungen durch einen zweiten Antikörper vermieden werden. Der Vorteil hiervon könnte eine reduzierte Hintergrundfluoreszenz sein, wobei man sicherlich den Nachteil der geringeren Sensitivität eines solches Nachweises in Betracht ziehen müsste.

Bereits im Rahmen der Methodenetablierung wurden Blutproben mit EDTA als Antikoagulanzen zur Probenentnahme in Erwägung gezogen. Bedingt durch die während der Etablierung gewonnenen Resultate wurde jedoch erwogen, nur Proben aus Heparinblut aufgrund der höheren Sensitivität und der besseren Vergleichbarkeit mit

dem konventionellen pp65-Test in den Analysen einzusetzen. Retrospektiv betrachtet wäre es eventuell auch denkbar gewesen, dass Messungen mit EDTA-Blut zwar weniger sensitiv, dafür aber spezifischer sein könnten. Insofern könnte anhand einer größeren Anzahl Messungen aus EDTA-Blutproben versucht werden, die unter Umständen durch Heparin bedingten Störungen auszuschließen.

Die zehn Proben, die diesbezüglich während der präanalytischen Phase gemessen wurden, reichten sicherlich nicht aus, um über die Auswahlkriterien eines geeigneten Antikoagulanzes explizite Aussagen zu treffen. Zumal auf diesem Wege mittels der Proben mit nachweislicher Virusreplikation nur die Sensitivität des Testes ermittelt werden konnte. Zur Bestimmung der Spezifität müssten zusätzlich Blutspender bzw. eindeutig CMV-negative Proben getestet werden. Erst in den zahlreichen später durchgeführten Messungen konnte das Ausmaß an unspezifisch positiven Testen diagnostiziert werden.

Auch die Testung einer vergleichbar großen Kontrollgruppe definitiv negativer Probanden, z. B. CMV-seronegative Blutspender, könnte die Auswertung und die Grenzwertermittlung vereinfachen. Anhand dieser Kontrollgruppe wäre es eventuell auch möglich, einen neuen Grenzwert mit klinischer Relevanz zu ermitteln, da es bei den CMV-positiven Patienten augenscheinlich zu viele ungeklärte Schwankungen gab.

7 Zusammenfassung

Die Zytomegalievirusinfektion stellt noch immer eine der wichtigsten Ursachen von Mortalität und Morbidität bei Immunsupprimierten wie z. B. Transplantatempfängern dar. Das derzeit favorisierte Therapiekonzept sieht eine präemptive Therapie vor, die nur bei Patienten eingeleitet wird, bei denen eine Virusreplikation frühzeitig nachgewiesen werden kann, die aber noch nicht klinisch erkrankt sind. Der derzeit bestetablierteste diagnostische Parameter hierzu ist der Nachweis des CMV-Antigens pp65 in Leukozyten. Der konventionelle Nachweis von pp65 ist allerdings aufgrund der subjektiven Auswertung nicht standardisierbar.

Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, den pp65-Nachweis mittels Durchflußzytometrie zu vereinfachen und die CMV-Routinediagnostik durch die Etablierung dieser Methode zu optimieren und zu standardisieren. Im Rahmen der Methodenetablierung wurde anhand von je zehn Patientenproben mit dem Nachweis einer replikativen CMV-Infektion der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Testmethode untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bei einer Analyse aus EDTA-Blut der Median der Reduktion bei 83 % lag gegenüber den Messungen aus Heparinblut. Bei einer Lagerung der Proben bei 4 °C für 24 Stunden lag der Median der Reduktion bei etwa 63 % gegenüber der sofortigen Probenaufarbeitung. Als Konsequenz aus diesen Voruntersuchungen wurden im folgenden nur Proben mit Heparin als Antikoagulant nach sofortiger Aufarbeitung eingesetzt.

Zur Methodenevaluierung wurden insgesamt 214 Messungen von 110 immunsupprimierten Patienten durchgeführt. Es galt die Testsensitivität sowie die –spezifität der FACS-Analyse im Vergleich mit dem konventionellen pp65-Antigenämie-Test und der quantitativen CMV-DNA-Analyse zu ermitteln. Es konnte ein optimierter Grenzwert ab vier pp65-positiven Zellen aus insgesamt 100.000 detektierten Leukozyten im FACS ermittelt werden. Für diesen Wert errechnete sich eine Testsensitivität von 77,5 % und eine –spezifität von 84,6 %. In der Gegenüberstellung der drei Vergleichsteste ergab sich, bezogen auf die qualitativen Ergebnisse, für Proben, bei denen mindestens in einer der Methoden CMV Replikation nachgewiesen werden

konnte, zwischen der Durchflußzytometrie und dem pp65-Antigenämie Test eine höhere Übereinstimmung (50,5 %) als mit der CMV-DNA Bestimmung (44,1 %). Bezüglich der Auswertung der quantitativen Daten konnte ein Spearman`s Korrelationskoeffizient von $r = 0,38$ (Durchflußzytometrie verglichen mit dem konventionellen pp65-Nachweis) bzw. $r = 0,13$ (CMV-DNA) ermittelt werden.

Letztendlich lässt sich sagen, dass die neue Methode, die deutlich weniger Ausgangsmaterial braucht, schneller und objektiver ist als der konventionelle pp65-Nachweis. Jedoch müsste das Verfahren aufgrund des im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Mangels an Sensitivität und Spezifität durch weitere Variationen im Bearbeitungsprotokoll oder der Auswertung, z. B. durch die Miteinbeziehung einer vergleichbar großen Kontrollgruppe CMV-seronegativer Patienten oder Blutspender weiter optimiert werden.

8 Summary

Cytomegalovirus is a major cause of morbidity and mortality in immunosuppressed patients such as transplant recipients. At present, pre-emptive administration of antiviral drugs is the dominant principle of therapy, defined by early initiation of therapy at the moment when virus replication is detected, but importantly before symptoms develop. To date, the detection of the CMV antigen pp65 in leucocytes is the best established diagnostic tool for this purpose. However, detection of pp65 with the established slide technique lacks standardization as reading of the slides is subjective.

The aim of this study was to simplify pp65 detection by using flow cytometry for reading and thus to establish an optimized and more standardized method. To evaluate the influence of different anticoagulants and of different storage conditions, ten samples with a highly replicative CMV infection were tested. EDTA as anticoagulant in comparison to heparin reduced the number of positive cells detected by flow cytometry by a median of 83 %. Similarly, storage of the samples by 4 °C for 24 hours resulted in a median reduction of 63 % compared to an immediate sample preparation. As a result heparin as anticoagulant and an immediate sample preparation were used for all further testing. Sensitivity and specificity of the newly established flow cytometry detection was compared with the pp65 detection in the conventional slide technique and with a quantitative CMV-DNA detection by the hybrid capture test in 214 samples from 100 immunosuppressed patients. A methodological cut-off value of 4 positive cells in 100.000 cells was established for flow cytometry. Using this cut-off sensitivity and specificity were 77,5 % and 84,6 %, respectively.

In a comparison all three assays with samples, in which at least one assay detected CMV replication the correlation of qualitative results between the two pp65 methods was 50,5 %. However, correlation between the flow cytometry and the CMV-DNA detection was lower with 44,1 %. When analysing the quantitative results a Spearman's coefficient of correlation of $r = 0,38$ resulted when comparing the two pp65 methods and of only $r = 0,13$ when flow cytometry was compared with the hybrid capture assay. In conclusion the newly established method is a more rapid and objective technique and requires significantly less input volume compared to the conventional slide technique.

However, at present a substantial lack of sensitivity and specificity implies that this protocol should be modified to overcome these problems. Moreover, further studies including other patients such as blood donors or CMV-negative individuals might improve the evaluation.

DATENTABELLEN

Im folgenden sind die Datentabellen der zehn nachweislich CMV-positiven Patienten einzusehen. Die aus ihnen hervorgehenden Diagramme befinden sich in Kapitel 4.

Patient 1

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
24.08.00	2	40	38	0	21
30.08.00	20	81	61	24	57
04.09.00	7	11	4	2	5
18.09.00	15	28	13	0	0
25.09.00	39	54	15	0	0
11.10.00	3	3	0	0	5
18.10.00	24	25	1	0	20
19.10.00	0	0	0	0	11

Patient 2

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
16.11.00	10	9	-	0	0
01.02.01	8	14	6	1	0
08.02.01	25	42	17	0	0
15.02.01	17	21	4	0	0
01.03.01	15	13	-	0	0

Patient 3

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
10.08.00	5	20	15	16	12
16.08.00	3	5	2	0	0
21.08.00	0	0	0	0	0

Patient 4

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
03.01.01	14	38	24	0	0
09.01.01	16	8	-	0	5
15.01.01	25	36	11	0	0
22.01.01	0	2	2	0	0
29.01.01	21	24	3	0	0
12.02.01	21	22	1	2	5
23.02.01	15	17	2	0	0

Patient 5

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
04.12.00	5	4	-	0	0
06.12.00	1	5	4	0	0
03.01.01	12	62	50	32	19
09.01.01	13	90	77	230	12
11.01.01	9	20	11	18	5
22.01.01	6	15	9	2	5
01.02.01	6	7	1	0	0

Patient 6

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
18.10.00	0	0	0	0	0
01.12.00	6	48	42	91	5
04.12.00	5	62	57	86	10
06.12.00	8	25	17	12	5
08.12.00	9	6	-	0	0
03.01.01	19	25	6	4	5
09.01.01	9	19	10	9	5
23.01.01	1	13	12	7	5
01.02.01	1	6	5	0	0

Patient 7

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
20.09.00	9	12	3	0	0
25.09.00	10	140	130	144	200
26.09.00	2	53	51	144	200
11.10.00	14	42	28	0	0,7
02.11.00	4	7	3	0	0
06.11.00	13	14	1	0	0
13.11.00	5	3	-	0	0

Patient 8

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
20.11.00	0	1	1	0	0
23.11.00	17	38	21	0	0
04.12.00	27	31	4	1	0
06.12.00	2	1	-	0	0
11.12.00	5	18	13	6	1,4
13.12.00	4	53	49	42	7
18.12.00	11	103	92	79	0
20.12.00	9	59	50	104	5
22.12.00	10	57	47	36	0
02.01.01	22	22	0	0	0
05.01.01	0	0	0	0	0

Patient 9

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
01.02.01	9	7	-	0	0
13.02.01	7	21	14	38	17
16.02.01	38	223	185	85	0
19.02.01	7	57	50	101	0
26.02.01	10	21	11	5	0

Patient 10

Datum der Messung	FACS-Kontrolle	FACS-Probe	FACS-Ergebnis	pp65	HCT
06.10.00	5	8	3	5	0
12.10.00	2	6	4	1	0
07.11.00	1	0	-	0	0
29.11.00	0	1	1	0	0
14.12.00	5	20	15	66	5
04.01.01	5	12	7	0	0
15.01.01	30	23	-	0	0
22.01.01	0	2	2	1	5
05.02.01	14	15	1	0	0

FACS-Einstellungen:

<u>Parameter</u>	<u>Detektor</u>	<u>Voltage</u>	<u>AmpGain</u>	<u>Modus</u>
P1	FSC	E00	1.80	Lin
P2	SSC	400	2.73	Lin
P3	FL1	428	1.00	Log
P4	FL2	435	1.00	Log
P5	FL3	443	1.00	Log

Grenzwert:	Parameter	:	FSC
	Wert	:	170
Kompensation:	FL1	-	0.3 % FL2
	FL2	-	52.8 % FL1
	FL2	-	0.0 % FL3
	FL3	-	23.3 % FL2

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

- Abb. 1
(Seite 38) Ansicht eines Patientenobjektträgers mit dem zusätzlichen Kontrollfeld rechts, welches nur mit dem zweiten Antikörper gegengefärbt wurde, im Gegensatz zu dem eigentlichen Probenfeld links, welches mit beiden Antikörpern gefärbt wurde.
- Abb. 2:
(Seite 40) Eine mit den Antigenämietestkit gefärbte positive Zelle, mit den typischen grünfluoreszierenden Kernsegmenten, in der Mitte der Abbildung, sowie eine Struktur unspezifischer Fluoreszenz am rechten Bildrand.
- Abb. 3:
(Seite 43) Auftragung der Intensität des Seitwärtsstreulichtes (y-Achse), korreliert mit der Granularität der Zelle, gegen die Intensität des Vorwärtsstreu-lichtes (x-Achse), korreliert mit der Größe der Zellen, zur Aufschlüsselung der einzelnen Leukozytenfraktionen, wobei „R1“ Granulozyten und Monozyten umfasst und „R2“ die Lymphozyten umschließt.
- Abb. 4:
(Seite 44) Darstellung der in „R1“ abgegrenzten Monozyten und Granulozyten-population in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität bei einer pp65-negativen Probe unter Ausschluss eventueller unspezifischer Fluoreszenzen („R4“).
- Abb. 5:
(Seite 44) Auswertende Darstellung des Analysenergebnisses der negativen Patientenprobe in graphischer und tabellarischer Form
- Abb. 6:
(Seite 45) Darstellung der in „R1“, einer anderen Probe, abgegrenzten Monozyten- und Granulozytenpopulation in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität bei einer pp65-positiven Probe unter Ausschluss eventueller unspezifischer Fluoreszenzen („R4“).
- Abb. 7:
(Seite 45) Auswertende Darstellung des Analysenergebnisses der positiven Patientenprobe in graphischer und tabellarischer Form
- Abb. 8:
(Seite 48) Vergleich verschiedener Antikoagulanzen (Heparin [blau] und EDTA [gelb]) bei 10 Proben mit Nachweis einer replikativen CMV-Infektion (konventioneller pp65-Test oder Hybrid-Capture Test positiv)
- Abb. 9:
(Seite 49) Darstellung der Reduktion der positiven Zellzahlen in Anbetracht der unterschiedlichen Aufarbeitungszeiten (sofort und nach 24 Stunden)
- Abb. 10:
(Seite 51) Graphische Darstellung der einzelnen FACS-Proben gemäß ihrer Einteilung nach den Ergebnissen der beiden Vergleichsteste (pp65-Antigenämietest und Hybrid-Capture Test)

- Abb. 11: Auftragung der Prozentwerte der errechneten Testsensitivität und spezifität für einzelne Grenzwerte zur Ermittlung eines methodischen Grenzwertes.
(Seite 54)
- Abb. 12: Patient 1 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 56)
- Abb. 13: Patient 2 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 57)
- Abb. 14: Patient 3 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 58)
- Abb. 15: Patient 4 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 58)
- Abb. 16: Patient 5 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 59)
- Abb. 17: Patient 6 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 59)
- Abb. 18: Patient 7 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 60)
- Abb. 19: Patient 8 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 61)
- Abb. 20: Patient 9 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 61)
- Abb. 21: Patient 10 (Darstellung der FACS-Messungen)
(Seite 62)
- Abb. 22: Verteilung der 93, als positiv gewerteten Messergebnisse auf ein Schnittmengendiagramm, bezogen auf die jeweiligen Vergleichsteste mit positivem Ergebnis.
(Seite 63)
- Abb. 23: Vergleich des pp65 Nachweises mittels FACS Analyse (x-Achse) und im Hybrid-Capture Test (x-Achse); Korrelationskoeffizient $r = 0,18$.
(Seite 64)
- Abb. 24: Vergleich des pp65 Nachweises mittels FACS Analyse (y-Achse) und im konventionellen Nachweis (x-Achse); Korrelationskoeffizient $r = 0,38$.
(Seite 65)
- Abb. 25: Patient 1 im Methodenvergleich
(Seite 66)

- Abb. 26: Patient 2 im Methodenvergleich
(Seite 67)
- Abb. 27: Patient 3 im Methodenvergleich
(Seite 68)
- Abb. 28: Patient 4 im Methodenvergleich
(Seite 68)
- Abb. 29: Patient 5 im Methodenvergleich
(Seite 69)
- Abb. 30: Patient 6 im Methodenvergleich
(Seite 70)
- Abb. 31: Patient 7 im Methodenvergleich
(Seite 70)
- Abb. 32: Patient 8 im Methodenvergleich
(Seite 71)
- Abb. 33: Patient 9 im Methodenvergleich
(Seite 72)
- Abb. 34: Patient 10 im Methodenvergleich
(Seite 72)

- Tabelle 1 (Seite 13) Prozentuale Darstellung des CMV-Erkrankungsrisikos in Abhängigkeit vom serologischen Status von Organempfänger und –spender (keine Stammzelltransplantationen), nach Villanueva et. al. und Zeevi et. al..
- Tabelle 2: (Seite 47) Vergleich der Antikoagulationen Heparin und EDTA: Gegenüberstellung der Zahlenwerte und Berechnung der Reduktion in % bei zehn Proben mit Nachweis einer replikativen CMV-Infektion (konventioneller pp65 oder Hybrid-Capture Test positiv)
- Tabelle 3: (Seite 49) Analyse des Einflusses von Lagerungszeiten(sofort und nach 24 Stunden) bei zehn Proben mit Nachweis einer replikativen CMV-Infektion (konventioneller pp65 oder Hybrid-Capture Test positiv)
- Tabelle 4: (Seite 52) Übersicht über alle während der Evaluation durchgeführten Messungen in Bezug auf detektierten Zellzahlen und Einteilung als „negative“ (konventioneller pp65 und Hybrid-Capture Test negativ) bzw. „positive“ (konventioneller pp65 und/oder Hybrid-Capture Test positiv) Proben.
- Tabelle 5: (Seite 54) Darstellung der einzelnen „Grenzwerte“ mit ihrer gemäß den obigen Formeln errechneten Testsensitivität und -spezifität. Der graumarkierte Bereich kennzeichnet den Umschlagpunkt der Wertigkeiten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Balfour HH (1999) *Antiviral drugs*; **N Engl J Med** **340**: 1255
- Boeckh M, Boivin G (1998) *Quantification of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical application*; **Clin Microbiol Rev** **11**: 533-554
- Boeckh M, Gooley TA, Meyerson D, Cunningham T, Schock G, Bowden RA (1996) *Cytomegalovirus pp65 antigenemia guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomised double-blind study*; **Blood** **88**: 4063-4071
- Boeckh M, Woogerd PM, Stevens-Ayers T, Ray CG, Bowden RA (1994) *Factor influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia*; **J Clin Microbiol** **32**: 832-834
- Boivin G, Handfield J, Murray G, Toma E, Lalonde R, Lazar JG, Bergeron TG (1997) *Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subject with and without CMV disease by using PCR and the sharp signal detection system*; **J Clin Microbiol** **35**: 525-526
- Browning JD, More I, Boyd JF (1980) *Adult pulmonary cytomegalic inclusion disease: report of a case*; **J Clin Pathol** **33**: 11-18
- Buckner FS, Pomeroy C (1993) *Cytomegalovirus disease of the gastrointestinal tract in patients without AIDS*; **Clin Infect Dis** **17**: 644-656
- Chou SW, Scott KM (1988) *Rapid quantitation of cytomegalovirus and assay of neutralizing antibodies by using monoclonal antibody to the major immediate-early viral protein*; **J Clin Microbiol** **26**: 504-507
- Cohen JI, Corey GR (1985) *Cytomegalovirus infection in the normal host*; **Medicine** **64**: 100-114
- De Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA (1998) *Summary of the II international symposium on cytomegalovirus*; **Antiviral Res** **39**: 141
- Drago F, Aragone MG, Lugani C, Reborja A (2000) *Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans, a review*; **Dermatology** **2000**: 189-195
- Egan JJ, Lomax J, Barber L, Lok SS, Martyszuk R, Yonan N, Fox A, Deiraniya AK, Turner AJ, Woodcock AA (1998) *Preemptive treatment of the prevention of cytomegalovirus disease in lung and heart transplant recipients*; **Transplantation** **65**: 747-752

- Enders G (1991) *Infektionen und Impfungen in der Schwangerschaft*; **Urban & Schwarzenberg, 2. Auflage**
- Epps RE, Pittelkow MR, SU DWP (1995) *Torch syndrom*; **Semin Dermatol 14**: 179-186
- Erice A, Holm MA, Gill PC, Henry S, Dirksen CL, Dunn DL, Hillam RP, Balfour HP (1992) *Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell-vial culture for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes*; **Journal of Clinical Microbiology 30**: 2822-2825
- Essa S, Pacsa AS, Al-Attiyah R, El-Shazly A, Raghupathy R, Said T (2000) *The use of flow cytometry for the detection of CMV-specific antigen (pp65) in leukocytes of kidney recipients*; **Clinical Transplantation 14**: 147-151
- Fine JD, Arndt KA (1985) *The Torch syndrom: a review*; **J Am Acad Dermatol 12**: 697-709
- Fishman JA, Rubin RH (1998) *Infection in organ-transplant recipients*; **N Engl J Med 338**: 1741
- Gane E, Saliba F, Valsecasas GJ, O'grady J, Pescovitz MD, Lyman S, R Robinson CA (1997) *Randomised trail of efficacy and safety of oral ganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease in liver-transplant recipients*; **Lancet 350**: 1729-1733
- Garcia A, Ninbo J, Benitez MA, Viueira M, Perez JL (1996) *Comparison of two leukocyte extraction methodes for cytomegalovirus antigenemia assay*; **J Clin Microbiol 34**: 182-184
- Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A (1994) *Comparative quantitation of transplant and AIDS patients*; **J Clin Microbiol 32**: 2709-2717
- Gerna G, Zipeto D, Parea M et al. (1991) *Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia*; **J Infect Dis 164**: 488-798
- Gerna G, Zipeto D, Percivalle E, Parea M, Revello MG, Maccario R, Peri G, Milanesi G (1992) *Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence of initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients*; **J Infect Diss 166**: 1236-1244
- Goodrich, J. M., Mori M, Gleaves CA, du Mond C, Cays M, Ebeling DF, Buhles WC, Dearmond B, Meyers JD (1991) *Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation*; **N Engl J Med 325**: 1601-1607

- Grefte JM, van der Gnu BT, Schmolke S et al. (1992) *Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65*; **J Infect Dis** **166**: 683-684
- Grefte JM, van der Gun BT, Schmolke S, van der Giessen M, van Son WJ, Plachter B, Jahn G, The TH (1992) *The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in periphery blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection*; **J Gen Virol** **73**: 2923-2932
- Griffiths PD (1993) *Current management of cytomegalovirus disease*; **J Med Virolog** **S1**: 106-111
- Hebart H, Kanz L, Jahn G, Einsele H (1998) *Management of cytomegalovirus infection after solid-organ or stem-cell transplantation. Current guidelines and future prospects*; **Drugs** **55**: 59-72
- Imbert Marcille BM, Robillard N, Poirier AS, Costeburel M, Canterovich D, Milpied N, Billandel S (1997) *Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry*; **J Clin Microbiol** **35**:2665-2669
- Jacobson MA, Zegans M, Pavan PR, O'Donnell JJ, Sattler F, Rao N, Owens S, Pollard R (1997) *Cytomegalovirus retinitis after initiation of highly active antiretroviral therapy*; **Lancet** **349**: 1443
- Katlama C (1993) *Cytomegalovirus infection in acquired immune-deficiency syndrome*; **J Med Virol** **S1**: 128-133
- Larsson S, Soderberg-Naucler C, Moller E (1998) *Productive cytomegalovirus infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals*; **Transplantation** **65**: 411
- Laudry ML, Ferguson D (1993) *Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease*; **J Clin Microbiol** **31**: 2851-2856
- Lee FK, Nahmias AJ, Stagnos S (1978) *Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in infants by electron microscopy*; **N Eng J Med** **299**: 1266-1270
- Ljungman P, Aschau J, Lewensohn-Fuchs I, Carlens S, Larsson K, Lonnqvist 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
- Lo Cy, Ho KN, Yuen KY, Lui SL, Li FK, Chan TM, Lo WK, Cheng IK (1997) *Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay*; **Clin Transplant** **11**: 286-293

- Mandell GI et al. (1995) *Principles and practice of infectious diseases. Fourth edition*; **Churchill Livingstone**
- McSharry JJ (1994) *Uses of flow cytometry in virology*; **Clin Mikrobiol Rev** **7 (4)**: 576-604
- Meyer-König U, Serr A, Hufert FT et al. (1995) *Laboratory diagnosis of HCMV-related disease in renal transplant patients – pp65 antigen detection versus nested PCR*; **Clin Diag Virol** **3**: 49-59
- Meyer-König U, Serr A, van Laer D et al. (1995) *Human cytomegalovirus immediate early and late transcript in peripheral blood leukocytes: diagnosis value in renal transplant recipients*; **J Infect Dis** **171**: 705-709
- Movassagh M, Gozlan J, Senechal B, Baillou C, Lemoine FM (1996) *Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus : Evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication*; **Blood** **88 (4)**: 1277
- Pamphilon DH, Rider JR, Barbara JA, Williamson LM (1999) *Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection*; **Transfusion Med** **9**: 115
- Pellegrin I, Garrigue I, Ekonevi D, Couzi L, Merville P, Merel P, Chene G, Schrive MH, Trimoulet P, Lafon ME, Fleury H (2000) *New molecular assay to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients*; **J Infect Dis** **182 (1)**: 36-42
- Perez JL, De Ona M, Ninbo J, Villar H, Melon S, Garcia A, Martin R (1996) *Comparison of several fixation methods for cytomegalovirus antigenemia assay*; **J Clin Microbiol** **33**: 1646-1649
- Poirier-Toulemonde AS, Milpied N, Cantarovich D, Morcet JF, Billaudel S, Imbert-Marcille BM (2000) *Clinical relevance of direct quantification of pp65 Antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients*; **J Clin Microbiology**: 3143-3149
- Reina J, Fernandez-Baca V, Saurina J, Blanco I, Munar M (1998) *Shell-vial culture and pp65 antigenemia assay in the detection of cytomegalovirus in the first blood sample of renal transplant recipients*; **Journal of Medical Virology** **55**: 240-242
- Riddell SR, Greenberg PD (1997) *T-cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts*; **Rev Medical Virology** **7**: 181
- Rubin RH (1991) *Preemptive therapy in immunocompromised hosts*; **N Engl J Med** **324**: 1057-1059

- Schäfer P, Tenschert W, Gutensohn K, Laufs R (1997) *Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay*; **J Clin Microbiol** **35**: 741-744
- Sester M, Sester U, Gärtner BC, Grindt M, Meyerhans A, Kohler H (2002) *Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection*; **J Am Soc Nephrol** **13** (11): 2577-2584
- Stagno S, Pass RF, Dworsky ME et al. (1982) *Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection*; **N Engl J Med** **306**: 945-949
- Storch GA, Gandreault-Keener M, Welby PC (1994) *Comparison of heparin and EDTA transport tubes for detection of cytomegalovirus in leukocytes by shell-vial assay, pp65 Antigenemia assay and PCR*; **Journal of Clinical Microbiology** **32** (10): 2581-2583
- Tegtmeier GE (1989) *Posttransfusion cytomegalovirus infection*; **Arch Pathol Lab Med** **113**: 236-245
- The TH, van den Berg AP, Harmsen MC, van der Bij W, van Son WJ (1995) *The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization*; **Scand J Infect Dis Suppl** **99**: 25-29
- Toome BK, Bowers KE, Scott GA (1991) *Diagnosis of cutaneous cytomegalovirus infection: a review and report of a case*; **J Am Acad Dermatol** **24**: 857-863
- Torrus D, Portilla J, Hernández-Aguado I, Boix V, Plazas J, Gimeno A, Torrome M, Llopis C, Valls V, Sanchez-Paya J (1999) *Usefulness of pp65 Antigenemia for the early diagnosis of cytomegalovirus disease in patients with AIDS*; **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **18**:630-635
- Tucker AW, Galbraith D, McEwan P, Onions D (1999) *Evaluation of porcine cytomegalovirus as a potential zoonotic agent in xenotransplantation*; **Transplantation Proceedings** **31**: 915
- Van der Bij, Torensma R, van Son WJ et al. (1988) *Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes*; **J Med Virol** **25**: 179-188
- Villanueva J, MD., Garrity E.R. (2000) *Recurrent cytomegalovirus infection in a lung transplant recipient*; **J Heart Lung transplant.** **19** (11): 1122-1124
- Vivarelli M, de Ruvo N, Lazzarollo T, Bellusci R, Landini MP, Varani S, Cavallari A (2000) *Abstention from treatment of low-level pp65 cytomegalovirus antigenemia after liver transplantation: a prospective study*; **Transplantation** **70**: 1183-1187

- Vogel JU, Scholz M, Cinatl J Jr (1997) *Treatment of cytomegalovirus disease; Intervirology* **40**: 357
- Von Müller L, Hampl W, Hinz J, Meisel H, Reip A (2002) *High variability between results of different in-house tests for cytomegalovirus (CMV) monitoring and a standardized quantitative plasma CMV PCR assay; J Clin Mikrobiol* **40**: 2285-2287
- Wattanamano P, Clayton JC, Kopicko JJ, Kissinger P, Elliot S, Jarrott C, Rangan S, Beilke AB (2000) *Comparison of three assays for cytomegalovirus detection in AIDS patients at risk for retinitis; Journal of Clinical Microbiology* **38 (2)**: 727-732
- Weigand DA, Burgdorf WHC, Tarpay MM (1980) *Vasculitis in cytomegalovirus infection; Arch Dermatol* **116**: 1174-1176
- Zaia JA, Forman SJ (1995) *Cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipient; Infect Dis Clin North Am* **9**: 789-900
- Zeevi A, Morel P, Spichy K, Dauber J, Yousem S, Williams K, Grgurich W, Pham S, Iacono A, Keenan R (1998) *Clinical significance of CMV-specific T-helper responses in lung transplant recipients; Hum Immunol* **59 (12)**: 768-775

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch für die Überlassung des Themas und für die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen zu vertreten und für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. B. Gärtner für die engagierte, persönliche Betreuung der praktischen und vor allem der theoretischen Arbeit.

Frau Dr. M. Sester sowie Herrn Dr. U. Sester danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der FACS-Analyse und für die jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bei allen meinen Fragen.

Ein Dankeschön ist auch an Frau R. Nord für die Einarbeitung in die Methodik des konventionellen pp65-Nachweises sowie an alle Mitarbeiter des Institutes für Virologie der Universitätskliniken des Saarlandes gerichtet, die mich jederzeit unterstützt haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern und Großeltern, für ihr Verständnis und Entgegenkommen. Ihre Hilfe hat mir die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt erst ermöglicht.

Erklärung gemäß § 10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (April 2002):

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Anke Manuela Litwicki