

Aus der Medizinischen Klinik II mit
Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zytomegalievirus und Humanes Herpesvirus 6 nach allogener Stammzelltransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Olivia Oswald
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Siegert
2. Prof. Dr. med. H. Riess
3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Schetelig

Datum der Promotion: 30.10.2008

Für meine Omi, Frau Dr. Hildegard Völker

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stammzelltransplantation.....	1
1.1.1	Geschichtlicher Überblick	1
1.1.2	Prinzip und biologische Grundlagen der Stammzelltransplantation.....	2
1.1.2.1	Die pluripotente hämatopoetischen Stammzelle	2
1.1.2.2	Arten der SZT und Spendersuche.....	2
1.1.2.3	Transplantatquelle.....	4
1.1.2.4	Konditionierung	4
1.1.3	Indikationen für die SZT.....	6
1.1.4	Komplikationen nach SZT.....	6
1.1.4.1	Graft-versus-Host-Erkrankung	7
1.1.4.2	Infektionen.....	8
1.2	Herpesviren.....	10
1.2.1	Familie der Herpesviren.....	10
1.2.2	Morphologie der β -Herpesviren	11
1.2.3	Genom, Replikation und Pathogenese von CMV und HHV-6.....	12
1.2.4	Epidemiologie und Transmission.....	13
1.2.5	Klinische Manifestation	14
1.2.6	CMV und HHV-6 in stammzelltransplantierten Patienten	15
1.2.7	Therapie von CMV und HHV-6 in stammzelltransplantierten Patienten.....	17
1.3	Diagnostische Methoden.....	18
1.3.1	Serologie	19
1.3.2	Zellkultur und Shell-vial-assay	19
1.3.3	Antigennachweis (APAAP = Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase)	20
1.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
1.3.4.1	Qualitative PCR.....	21
1.3.4.2	Quantitative PCR	22
1.3.4.2.1	Quantitative real-time-PCR im TaqMan Format.....	22
1.4	Fragestellung	26

2	Patienten, Methoden und Material	27
2.1	Patientenkollektiv	27
2.1.1	Patientencharakteristika	27
2.1.2	Supportive Therapie	29
2.1.3	Überwachung und Therapie von CMV Infektionen	29
2.1.4	HHV-6 Infektionen	30
2.2	Arbeitsmethoden	30
2.2.1	Proben	30
2.2.2	DNA-Präparation aus Patientenplasma	30
2.2.3	Herstellung einer quantifizierbaren Positivkontrolle	30
2.2.3.1	Qualitative PCR.....	31
2.2.3.2	Gelelektrophorese	32
2.2.3.3	Plasmidklonierung	32
2.2.3.4	Kopienzahlberechnung und Erstellen einer Standardgeraden	33
2.2.4	Quantitative real-time PCR	33
2.2.5	Standardgeraden	36
2.2.5.1	CMV	37
2.2.5.2	HHV-6A und -6B	37
2.2.6	Antigennachweis (APAAP = Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)	38
2.2.7	Statistische Auswertung	38
2.3	Reagenzien und Materialien	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Nachweis von CMV und HHV-6A und -6B mittels quantitativer real-time PCR ...	41
3.1.1	Häufigkeit von CMV und HHV-6A und -6B	41
3.1.1.1	Nachweis von CMV DNA	41
3.1.1.2	Nachweis von HHV-6 DNA.....	41
3.1.1.3	Vergleich der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von CMV, HHV-6A und -6B.....	41
3.1.2	Kinetik der Virus-DNA Nachweise	42
3.1.2.1	Vergleich der gemessenen maximalen DNA Lasten von CMV, HHV-6A und -6B.....	42
3.1.2.2	Häufigkeit und DNA Last der Virusnachweise.....	43

3.1.2.3	Dauer des Virusnachweises	44
3.1.2.4	Zeitpunkt der erstmaligen Virusnachweise	44
3.1.2.5	Interaktion verschiedener Herpesvirus-Infektionen	45
3.1.2.6	Klinik bei HHV-6 Virämien	46
3.1.3	Risikofaktoren für das Auftreten eines positiven Virus DNA Nachweises	47
3.1.3.1	Risikofaktoren für das Auftreten eines CMV DNA Nachweises	47
3.1.3.2	Risikofaktoren für das Auftreten eines HHV-6 DNA Nachweises	49
3.2	CMV Infektionen nach dosisreduzierter und myeloablativer Konditionierung	50
3.2.1	Inzidenz der CMV Infektionen	50
3.2.2	Kinetik des CMV Nachweises	51
3.2.3	Überlebensanalyse	51
3.3	Einfluss von HHV-6 auf das hämatologische Engraftment und die GvHD	52
3.3.1	Frühe HHV-6 Infektionen und ihr Einfluss auf das hämatologische Engraftment	52
3.3.1.1	Klinischer Verlauf von Patienten mit früher HHV-6B Infektion	54
3.3.2	GvHD als Risikofaktor für das Auftreten einer HHV-6 Infektion	56
3.4	Vergleich der quantitativen real-time PCR mit dem Antigennachweis	57
3.4.1	Häufigkeit und Kinetik der CMV Infektionen durch Nachweis mittels qPCR und Antigenämie	57
3.4.1.1	Nachweis von CMV	57
3.4.1.2	Zeitpunkt des erstmaligen Virusnachweises	58
3.4.2	Korrelation der Ergebnisse des CMV DNA Nachweises durch die qPCR und den Antigennachweis mittels APAAP	59
3.4.2.1	Korrelation der Maximalwerte beider Methoden	59
3.4.2.2	Korrelation der beiden Methoden durch Gruppierung der Ergebnisse des Antigennachweises	59
3.4.2.2.1	Nachweis von CMV bei Patienten mit CMV Erkrankung	60
3.4.2.2.2	Virus DNA Last und antigenpositive Zellen bei CMV Organerkrankung	62
3.4.3	Sensitivität und Spezifität von quantitativer PCR und Antigennachweis	63
3.4.3.1	Grenzwert für die Ergebnisse der qPCR	65
4	Diskussion	66
4.1	Nachweis und Risikofaktoren für CMV und HHV-6A und -6B nach SZT	66
4.1.1	CMV	66

4.1.2	HHV-6.....	68
4.1.3	Vergleich von CMV, HHV-6A und HHV-6B.....	69
4.2	Einfluss des Konditionierungsregimes auf das Auftreten von CMV Infektionen..	70
4.3	Einfluss von HHV-6 Infektionen auf hämatologisches Engraftment und GvHD...	74
4.4	Vergleich der real-time PCR im TaqMan Format mit dem Antigennachweis.....	76
5	Zusammenfassung.....	80
6	Literaturverzeichnis	82
7	Anhang.....	I
7.1	Verzeichnis verwendeter Abkürzungen.....	I
7.2	Verzeichnis der Tabellen.....	III
7.3	Verzeichnis der Abbildungen	IV
7.4	Danksagung.....	V
7.5	Lebenslauf	VI
7.6	Veröffentlichungen/ Kongressbeiträge	VII
7.7	Eidesstattliche Erklärung.....	VIII

1 Einleitung

Die allogene Stammzelltransplantation wird insbesondere zur Therapie verschiedener Erkrankungen des Blutes eingesetzt. Aufgrund der damit einhergehenden Immunsuppression sind die Patienten stark durch Infektionen gefährdet, dabei stellen unter anderem Viren eine große Gefahr dar. Die Diagnostik und die adäquate Therapie derartiger Infektionen erfordern sensitive und reproduzierbare Methoden zum Erregernachweis.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Auftreten von β - Herpesviren nach allogener Stammzelltransplantation, ihren Risikofaktoren, dem Einfluss der Konditionierung und dem Vergleich verschiedener Nachweismethoden.

1.1 Stammzelltransplantation

Eine allogene Stammzelltransplantation (SZT) ist die Infusion von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) nach Applikation eines Konditionierungsregimes mit der Intention, das hämatopoetische System des Empfängers durch die transfundierten Zellen zu ersetzen [1].

Sie ist eine seit den 1970er Jahren etablierte und inzwischen verbreitete Therapie zur Behandlung verschiedener hämatologischer Neoplasien und angeborener Störungen der Hämatopoese. In über 550 Zentren in 39 europäischen Ländern werden heutzutage mehr als 20.000 Stammzelltransplantationen pro Jahr durchgeführt [2]. Durch zahlreiche Komplikationen sind die Morbidität und Mortalität nach der Transplantation hoch. Aufgrund der Immunsuppression sind die Patienten dabei besonders durch Infektionen gefährdet.

1.1.1 *Geschichtlicher Überblick*

Der Grundstein für die heutige Stammzelltransplantation wurde im Jahr 1909 von Alexander Maximov durch die Entdeckung der Population der pluripotenten Stammzellen gelegt [3].

Ihren eigentlichen Ursprung nahm die Knochenmarktransplantation etwa ein halbes Jahrhundert später. Angeregt durch die Katastrophen von Hiroshima und Nagasaki und die anhaltende Bedrohung durch Atomwaffen am Ende des zweiten Weltkrieges wuchs das wissenschaftliche Interesse an den Auswirkungen von radioaktiver Strahlung auf

den menschlichen Körper [4]. Erste Studien zeigten, dass Mäuse eine normalerweise tödliche Bestrahlung durch Abschirmung der Milz überlebten. Die Wiederherstellung des durch die Bestrahlung zerstörten Knochenmarks fand durch Zellen aus der nicht bestrahlten Milz statt [5]. Durch Infusion von Milz- oder Knochenmarkzellen konnte dasselbe Ergebnis erzielt werden [6]. Aus den Beobachtungen erschloss sich die Möglichkeit, dieses Schema auf leukämiekranken Menschen anzuwenden. Die frühen klinischen Versuche waren jedoch erfolglos, vor allem aufgrund von fehlendem Wissen in den Bereichen des Haupthistokompatibilitätskomplexes und der supportiven Therapie. Durch intensive Studien in den folgenden Jahren wurden die Probleme des allogenen Knochenmarktransfers erkannt [4], und so gelangten 1968 Bach et al. in Madison und Gatti et al. in Minneapolis die ersten erfolgreichen allogenen Transplantationen [7, 8].

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen hat sich seitdem deutlich weiterentwickelt und ist heute eine weit verbreitete Therapie zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen. 1990 wurde E. D. Thomas für seine herausragende Arbeit auf diesem Gebiet mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet.

1.1.2 Prinzip und biologische Grundlagen der Stammzelltransplantation

1.1.2.1 Die pluripotente hämatopoetischen Stammzelle

Der Sitz der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) ist das Knochenmark. Sie sind die Urzellen der Hämatopoese und haben die Fähigkeit zur Selbstreplikation, Proliferation und Differenzierung in alle Zellen des lymphohämatopoetischen Systems. Mittels Immunphänotypisierung können die HSZ anhand ihres Oberflächenrezeptors CD34 (CD, cluster of differentiation) erkannt werden. Das CD34-Antigen ist ein Membranphosphoglykoprotein, welches auf allen hämatopoetischen Vorläuferzellen einschließlich der pluripotenten und der lymphopoetischen Stammzelle exprimiert ist [9]. Die pluripotente Stammzelle zeichnet sich außerdem durch die fehlende Expression linienspezifischer Antigene aus. Nur etwa 1-4 % der Knochenmarkzellen sind hämatopoetische Progenitorzellen, die pluripotenten HSZ sind noch seltener.

1.1.2.2 Arten der SZT und Spendersuche

Stammen die bei der SZT übertragenen Stamm- bzw. Progenitorzellen vom Patienten selbst, spricht man von einer autologen Transplantation. Dabei werden die HSZ vor der

Hochdosischemotherapie gesammelt und kryokonserviert. Vorteilhaft ist, dass nach der Transplantation keine Immunsuppression notwendig ist, keine Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) auftritt und kein Spender nötig ist. Nachteilig ist ein ausbleibender Graft-versus-Leukemia-Effekt, sowie das Risiko der Tumorzellkontamination des Transplantats. Durch Reinigen des Transplantats (purging) mittels physikalischen, pharmakologischen oder immunologischen Methoden wird versucht, letzterem entgegen zu wirken. Der Wirkmechanismus der autologen SZT beruht auf den zytotoxischen Effekten der Hochdosistherapie. Bei der allogenen SZT, hier stammen die übertragenen Zellen von einem Spender, ist ein entscheidender zusätzlicher Mechanismus der Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL), bei dem die mit dem Transplantat übertragenen T-Zellen residuale leukämische Zellen des Empfängers zerstören [10].

Für die Spendersuche bei allogener SZT ist das wichtigste Kriterium die immunologische Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Durch serologische und molekulare Testung wird eine Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) angestrebt. Die HLA-Antigene sind genetische Merkmale auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen, welche für die Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremd wichtig sind. Die genetische Information für die HLA-Antigene liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6, im Bereich des major histocompatibility complex (MHC). Die HLA-Antigene werden in Klasse I (HLA-A, -B, -C) auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten und Klasse II (HLA-DR, -DP, -DQ) auf antigenpräsentierenden Zellen unterteilt. Ihre Aufgabe ist die Präsentation von Peptiden an T-Lymphozyten, wobei sie eine Schlüsselrolle in der T-Zell-vermittelten Immunität spielen. Stimmen die HLA-Antigene A, B, DRB1 und DQB1 bei Typisierung mittels genügender Auflösung überein, spricht man von vollständiger HLA-Kompatibilität (HLA-match) [11].

Die besten Erfolgsraten der SZT werden mit einem HLA-identischen verwandten Spender erreicht. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Patient ein HLA-kompatibles Geschwister hat, liegt bei 20-25% [12]. Gelegentlich ist es möglich, einen Spender in der näheren Verwandtschaft (Kinder, Eltern) zu finden [13]. Um die Transplantationen einer größeren Anzahl von Patienten zugänglich zu machen, wurden internationale Spenderdateien aufgebaut. Weltweit sind bereits über 9,5 Millionen HLA-typisierte Spender und Nabelschnurbluteinheiten registriert [14]. SZT mit unverwandten Spendern sind mit einer höheren Rate an Komplikationen assoziiert [15, 16]. Je nach Anzahl und

Lokalisation des Mismatches kommt es häufiger zu einer Transplantatabstoßung und zu einer GvHD [17, 18, 19].

1.1.2.3 Transplantatquelle

Als Stammzellquelle können HSZ des Knochenmarks, des peripheren Bluts oder des Nabelschnurbluts verwendet werden. Obwohl seit den 1960er Jahren bekannt ist, dass HSZ im peripheren Blut zirkulieren [20], war man bis in die 1980er Jahre auf Knochenmark (KM) als Stammzellquelle angewiesen. Dann erst konnten periphere Blutstammzellen (PBSZ) durch Leukapherese in ausreichender Zahl gewonnen werden, um ein Engraftment zu gewährleisten [21, 22].

Das periphere Blut enthält normalerweise nur eine geringe Anzahl an zirkulierenden HSZ. Durch die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF, Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor) oder in der Phase der Regeneration nach Chemotherapie kommt es zu einem starken Anstieg der HSZ im peripheren Blut, so dass es möglich ist, sie für therapeutische Zwecke zu sammeln [23, 24]. Vor allem aufgrund der schnelleren hämatologischen und immunologischen Erholung nach peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) im Vergleich zur Knochenmarktransplantation (KMT), haben in der autologen Situation inzwischen PBSZ das Knochenmark als Stammzellquelle nahezu ersetzt [25, 26, 27]. Auch bei der allogenen Transplantation werden zunehmend PBSZ eingesetzt. Zu einem Anstieg der akuten GvHD Erkrankungen aufgrund einer etwa zehnfach höheren Menge an T-Zellen in dem PBSZ-Transplantat scheint es nicht zu kommen [25, 26], möglicherweise erhöht sich aber die Inzidenz der chronischen GvHD [1, 25, 28]. 2002 wurden 97 % der autologen Ersttransplantationen mit PBSZ durchgeführt, bei den allogenen Ersttransplantationen waren 62 % der Transplantate PBSZ [2].

Nabelschnurblut als Stammzellquelle wird fast ausschließlich bei Kindern eingesetzt, da die gewonnenen Zellzahlen häufig zu gering sind, um ein stabiles Anwachsen der Zellen in Erwachsenen zu gewährleisten. Diese Transplantationen sind mit einem leicht verzögerten Engraftment und einem geringeren Risiko an GvHD assoziiert [29]. 2 % aller allogenen SZT waren 2002 Nabelschnurbluttransplantate [2].

1.1.2.4 Konditionierung

Durch die Konditionierung wird der Körper des Patienten auf die bevorstehende Transplantation vorbereitet. In der Regel werden zwei Ziele miteinander verknüpft. Die

Konditionierung soll immunsuppressiv wirken, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern und sie soll – mit unterschiedlicher Intensität – verbleibende Tumorzellen abtöten. Die Wahl des Konditionierungsregimes ist von der zugrundeliegenden Erkrankung sowie ihrem Stadium abhängig. Es können sogenannte Hochdosistherapien – oft eine Hochdosis- Chemotherapie evt. in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) – von dosisreduzierten Konditionierungsverfahren unterschieden werden. Hochdosis-Konditionierungsregime sind mit höheren Akut-Toxizitäten und einer etwas höheren therapieassoziierten Mortalität vergesellschaftet, sind jedoch stärker anti-neoplastisch wirksam. Aufgrund der größeren Belastungen werden Hochdosistherapien nur bei Patienten unter 55 Jahren ohne wesentliche Begleiterkrankungen eingesetzt. Eine Alternative zu dieser konventionellen Konditionierung ist die nicht-myeloablative (dosisreduzierte) Konditionierung [30]. Der Begriff Dosisreduktion bezieht sich auf die Dosis anti-neoplastisch wirksamer Zytostatika, die im Rahmen der Konditionierung verabreicht werden. Hierbei erfolgt die Tumoreradikation und die Zerstörung der Hämatopoese des Empfängers nicht durch die zytotoxische Therapie, sondern durch immunitätsvermittelte Effekte. Durch die Dosisreduktion wird die Toxizität verringert und das Knochenmark des Empfängers nicht vollständig zerstört. Diese Regime wirken jedoch hochgradig immunsuppressiv und gewährleisten deshalb das Engraftment der Spenderzellen. Vorrangig T-Lymphozyten des Spenders induzieren den Graft-versus-Leukaemia (GvL) Effekt, welcher maßgeblich an der Eradikation der malignen Erkrankung beteiligt ist [31]. Durch den gleichen Effekt kann bei einem Rezidiv nach SZT mit der Gabe von Lymphozyten des gleichen Spenders (donor lymphocyte infusions, DLI) eine Remission erzielt werden (adoptive Immuntherapie) [32].

Nach verschiedenen dosisreduzierten Konditionierungsregimen konnte mittlerweile ein stabiles Engraftment gezeigt werden [10, 30, 33, 34]. Sie erweisen sich als besser verträglich, die typischen Akut-Toxizitäten treten in weniger starkem Ausmaß auf. Die Zytopenie in der frühen Phase nach der Transplantation ist weniger schwerwiegend und langandauernd, wodurch das Risiko für schwere bakterielle und Pilz-Infektionen in den ersten vier Wochen nach allogener Transplantation vermindert zu sein scheint [10, 30, 35]. Durch die geringere therapieassoziierte Mortalität und die bessere Verträglichkeit kann die Indikation einer SZT mit dieser Konditionierung auf Patienten ausgeweitet werden, welche nicht für eine konventionelle myeloablative Behandlung geeignet wären [10, 30, 33, 35].

In den letzten Jahren hat die Anwendung der dosisreduzierten Konditionierung rasant zugenommen, von weniger als 1 % an allen allogenen Transplantationen vor dem Jahr 2000 auf 28 % im Jahr 2002 [2, 36].

1.1.3 Indikationen für die SZT

Durch große Fortschritte in der HLA-Typisierung, der Prophylaxe und Therapie der Graft-versus-Host-Erkrankung und der antimikrobiellen Therapie konnte die Anwendung der SZT auf viele Krankheiten ausgeweitet werden. Die Bedeutung der SZT bei der Therapie von verschiedenen Krankheiten ist vielschichtig und unter anderem abhängig von dem Schweregrad der Erkrankung, dem Subtyp, dem Remissionsstatus, dem Alter des Patienten, sowie der Verfügbarkeit eines geeigneten Spenders. Die Indikationen für eine allogene SZT im Jahr 2002 sind Tabelle 1-1 zu entnehmen.

Tabelle 1-1: Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation 2002

Erkrankung	Anteil an den SZT
Akute myeloische Leukämie (AML)	27 %
Akute lymphatische Leukämie (ALL)	19 %
Chronische myeloische Leukämie (CML)	14 %
Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	3 %
Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	9 %
Multiple Myelom (MM)	4 %
Morbus Hodgkin (MH)	1 %
Non-Hodgkin Lymphome (NHL)	7%
Schwere Aplastische Anämie (SAA) und Fanconi-Anämie	5 %
Nicht-maligne Erkrankungen (z. B. Thalassämie, Immundefektsyndrome)	7 %
Solide Tumore	2 %
andere	2%

(modifiziert nach [37])

1.1.4 Komplikationen nach SZT

Die Komplikationsrate nach allogener Stammzelltransplantation ist hoch. Dazu zählen toxische Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie, die Auswirkungen der Immunsuppression und der gestörten immunologischen Rekonstitution, immunologische Reaktionen zwischen Empfänger und Spender, Transplantatversagen und Rezidiv der Grunderkrankung. Die transplantationsassoziierte Mortalität (TRM) nach allogener SZT bei malignen hämatologischen Erkrankungen liegt - abhängig von Alter, Grunderkrankung und Histokompatibilität - in den ersten Jahren nach

Transplantation zwischen 10-40 % [27, 38].

Im Folgenden werden die Graft-versus-Host-Erkrankung und das Auftreten von Infektionen nach Stammzelltransplantation näher dargestellt.

1.1.4.1 Graft-versus-Host-Erkrankung

Die Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (Graft-versus-Host-Disease, GvHD), ist die häufigste Komplikation nach allogener SZT und eine der Hauptursachen für die transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität [39]. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens, vor bzw. nach Tag 100 nach der Transplantation, unterscheidet man die akute (aGvHD) und die chronische GvHD (cGvHD).

Die GvHD ist Ausdruck einer zytotoxischen Aktivität immunkompetenter T-Lymphozyten, die mit dem Transplantat (Graft) auf den Empfänger (Host) übertragen wurden und sich vor allem gegen die drei Zielorgane Haut, Leber und Darm richtet. Diese Alloimmunreaktion ist gegen die fremden Histokompatibilitätsantigene des Empfängers gerichtet und betrifft bei HLA-Identität von Spender und Empfänger die Minor Histokompatibilitätsantigene.

1966 wurden von Billingham drei Bedingungen für das Auftreten einer aGvHD formuliert [40]: die Übertragung von immunkompetenten Zellen, eine Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger und das Unvermögen des Empfängers, die transplantierten Zellen zu inaktivieren.

Pathophysiologisch steht am Anfang der aGvHD eine toxische Gewebeschädigung durch das Konditionierungsregime und die damit verbundene Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (Il-1) und TNF α . Eine Interaktion der antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers mit den T-Lymphozyten des Spenders führt zu einer T-Zell-Aktivierung mit nachfolgender Proliferation und Differenzierung sowie weiterer Zytokinsekretion (Il-2, IFN γ). Es folgt die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen die Empfängerzellen und eine Gewebeerstörung in den Zielorganen durch Apoptoseinduktion.

Die Inzidenz einer behandlungsbedürftigen akuten GvHD (Grad II-IV) liegt nach konventioneller Konditionierung bei HLA-identischen Geschwistern bei 40-45 % und nach Fremdspendertransplantation bei 55-75 %. Eine chronische GvHD tritt bei 60-80 % der Patienten nach allogener Transplantation auf [41]. Einflussfaktoren für das Auftreten einer GvHD sind das Alter des Empfängers, die HLA-Inkompatibilität, ein Geschlechts-Mismatch, die GvHD Prophylaxe [42, 43, 44]. Das Risiko einer

chronischen GvHD steigt außerdem durch eine vorausgegangene akute GvHD [45] und die Verwendung von PBSZ als Stammzellquelle [1, 25, 28].

Klinisch ist die akute GvHD durch eine Manifestation an der Haut (makulopapulöses Exanthem, Erythrodermie, Desquamation), der Leber (Hepatitis bis Leberversagen) und/oder dem Darm (Ulzerationen, Diarrhoe) gekennzeichnet. Allgemeinsymptome wie Fieber und Gewichtsverlust können auftreten. Die Immunrekonstitution ist verzögert und damit das Infektionsrisiko erhöht. Die chronische GvHD gleicht in ihrem klinischen Bild einer Autoimmunerkrankung mit Sklerodermie-ähnlichen Hautveränderungen, Sicca-Syndrom, lupoider Hepatitis, Veränderungen an den Gelenken und dem Gastrointestinaltrakt, sowie einem zu opportunistischen Infektionen prädisponierenden persistierenden Immundefekt.

Therapeutisch und prophylaktisch wird die GvHD mit immunsuppressiven und antiinflammatorischen Medikamenten behandelt. In der Regel wird in den ersten Monaten nach der Transplantation eine medikamentöse Prophylaxe durchgeführt. Eingesetzt werden für Prophylaxe und Therapie unter anderem Ciclosporin A (CSA), Methotrexat (MTX), Mycophenolat Mofetil (MMF), Steroide, Antithymozytenglobulin (ATG), Tacrolimus (FK605).

1.1.4.2 Infektionen

Infektionen sind trotz beachtlicher Fortschritte in ihrer Behandlung weiterhin eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation. Verschiedene Faktoren beeinflussen das Risiko einer Infektion, wie die zugrunde liegende Erkrankung, die Intensität der verabreichten Therapie, bereits aufgetretene Komplikationen und vor allem die Transplantationsmodalitäten (z. B. Histokompatibilität und T-Zell-Depletion) [46, 47]. Das Ausmaß der infektiösen Komplikationen hängt entscheidend von der Geschwindigkeit der Rekonstitution des Immunsystems nach erreichter hämatologischer Regeneration ab [46].

Die Infektionen nach myeloablativer SZT werden in drei Phasen unterteilt (siehe Abbildung 1-1):

1. Frühe Phase: nach der Konditionierung bis zum Engraftment.

Diese Phase ist von einer schweren Neutropenie und toxischen Mukosaschäden durch die Konditionierung gekennzeichnet. Bis zur Neutrophilenregeneration dominieren Infektionen durch Bakterien, Pilze (*Aspergillus*, *Candida*) und Viren

(insbesondere Herpes simplex Virus, HSV). Bakterien sind für 90 % der Infektionen in dieser Zeit verantwortlich [46]. Hauptursachen der infektionsassoziierten Mortalität sind die schwere bakterielle Sepsis, Pneumonie und systemische Pilzinfektion.

2. Intermediäre Phase: von der Granulozytenregeneration bis Tag 100.

Nach der hämatologischen Regeneration bestehen weiterhin schwere qualitative und quantitative Störungen in der zellulären und humoralen Immunabwehr. Durch das Auftreten und die Therapie einer akuten GvHD werden die Immunrekonstitution verzögert und Infektionen begünstigt. Die Patienten sind in dieser Zeit stark durch virale Infektionen, insbesondere durch das Zytomegalievirus (CMV), gefährdet.

3. Späte Phase: nach Tag 100

Trotz einer fortschreitenden Immunrekonstitution sind die Patienten noch immer abwehrgeschwächt. Der Verlauf ist stark von dem Auftreten einer chronischen GvHD abhängig, welche durch eine T-Zell-Dysfunktion und erniedrigte Serumimmunglobulinkonzentrationen gekennzeichnet ist. Die Patienten sind gegenüber bekapselten Erregern (wie Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae) besonders anfällig.

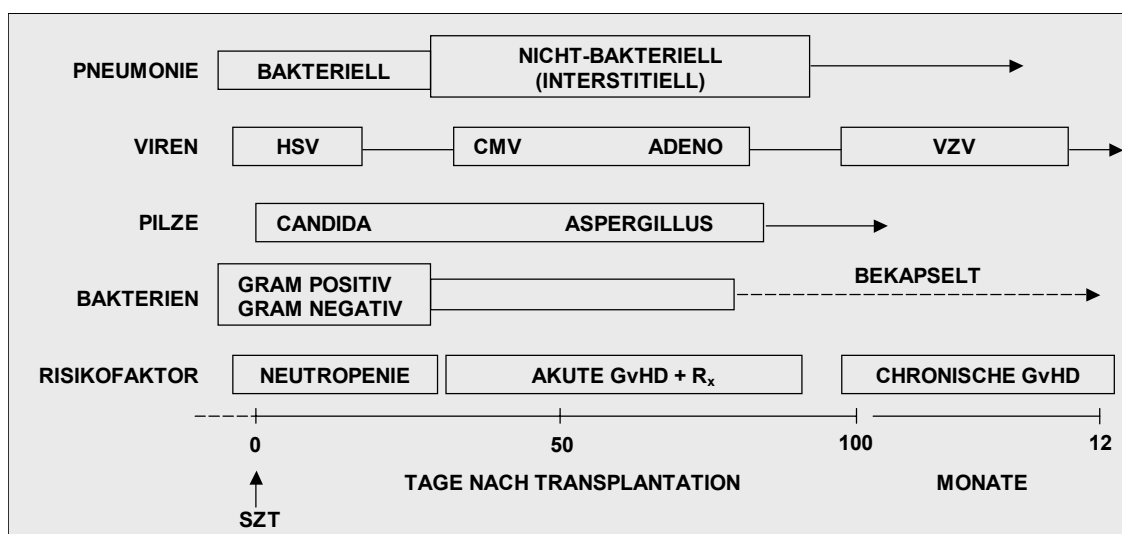


Abbildung 1-1: Infektionen an verschiedenen Zeitpunkten nach SZT

Modifiziert nach Myers JD [48].

Mit der dosisreduzierten Konditionierung haben sich die Art und die Zeit des Auftretens von Infektionen verändert. Durch die verkürzte oder fehlende Neutropenie sinkt das Risiko für bakterielle und Pilzinfektionen in den ersten vier Wochen nach Transplantation [49]. Da das Risiko einer GvHD etwa gleich bleibt, sind die Patienten später jedoch durch Virus- und Pilzinfektionen gefährdet.

1.2 Herpesviren

1.2.1 Familie der Herpesviren

Herpesviren sind in der Natur weit verbreitet, sie kommen beim Menschen und bei zahlreichen Wirbeltierarten vor. In fast allen untersuchten Spezies konnte mindestens ein spezifisches Herpesvirus isoliert werden. Die Familie der Herpesviren umfasst insgesamt etwa 130 Arten, wovon 8 als humanpathogen identifiziert wurden. Die Vertreter dieser Virusfamilie verursachen verschiedene klinische Symptome, gleichen sich aber in Partikelmorphologie und biologischen Eigenschaften [50]. Ein weiteres wichtiges Merkmal aller Herpesviren ist die Fähigkeit nach der Primärinfektion latent im Wirtsorganismus zu bleiben, wobei sich keine Virusproduktion nachweisen lässt. Dieser Zustand der Latenz kann jederzeit unterbrochen werden und in einen lytischen Infektionszyklus übergehen, bei dem erneut infektiöse Partikel freigesetzt werden. Klinisch äußert sich dies in einer der Primärinfektion identischen oder ähnlichen Symptomatik.

Der Name der Virusfamilie weist auf die kriechende Ausbreitung des vom Herpes-simplex-Virus verursachten Hautausschlags hin (griechisch: herpein, kriechen).

Nach ihrem Wirtsspektrum, ihrer Pathogenität und ihrem Replikationsverhalten werden die Herpesviren in drei Unterfamilien eingeteilt: in α -, β - und γ - Herpesviren. Die acht humanpathogenen Vertreter sind in Tabelle 1-2 beschrieben.

Tabelle 1-2: Klassifikation der humanen Herpesviren

Unterfamilie	Genus	Humanpathogene Vertreter	Prävalenz	Assoziierte Erkrankungen	Latenzort
α	Simplexvirus	Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV1, HHV-1)	>90 %	orofazialer Herpes, Keratokonjunktivitis, Ekzema herpeticum	Trigeminus-Ganglion
		Herpes-Simplex-Virus 2 (HSV2, HHV-2)	10-20 %	Herpes genitalis, Herpes neonatorum	Ganglion sacrale
	Varicellavirus	Varicella-Zoster-Virus (VZV, HHV-3)	>90 %	Varicellen (primär), Zoster (Rekurrenz), Meningoenzephalitis, Pneumonie	Paravertebrale Ganglien
β	Zytomegalievirus	Humanes Zytomegalievirus (CMV, HHV-5)	60-70 %	kongenitale Missbildungen, Mononukleose-ähnliche Symptome, Pneumonie, Retinitis, Hepatitis, Enterokolitis	Zellen der Hämatopoese?
	Roseolavirus	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)	>90 %	<i>Exanthema subitum</i> Mononukleose	Lymphozyten Monozyten, ?

		Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	>90 %	Exanthema subitum ? Mononukleose?	T-Lymphozyten ?
Y	Lympho-crypto-virus	Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4)	>90 %	infektiöse Mononukleose, Burkitt-Lymphom, Nasopharynxcarcinom,	B-Lymphozyten
	Rhadino-virus	Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8)	?	Karposi-Sarkom Effusionslymphom, multizentrische Castleman- Krankheit	?

1.2.2 Morphologie der β -Herpesviren

Die Herpesviren gleichen sich in ihrer Morphologie und können elektronenmikroskopisch nicht voneinander unterschieden werden. Ihre Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 250 nm und bestehen aus mehr als 30 Strukturproteinen. Im Dünnschnitt sind vier Schichten erkennbar: im Inneren der Kern (engl. Core), umgeben von Kapsid, Tegument und, als äußerste Schicht, der Virushülle (engl. envelope). Das Virus-Core im Zentrum der Viruspartikel ist eine fibrilläre Proteinmatrix, welche mit der linearen, doppelsträngigen DNA des Virus assoziiert ist. Es ist von einer ikosaedrischen Proteinhülle, dem Kapsid umgeben, das aus 162 einzelnen Kapsomeren zusammengesetzt ist und einen Durchmesser von etwa 100 nm aufweist. Die äußerste Schicht bildet die lipidhaltige Virushülle, welche sich von der inneren Kernmembran ableitet. Eingelagert in die Virushülle sind Proteine, die wichtige Funktionen bei der Absorption und Penetration der Viruspartikel in die Zelle und der Induktion einer Immunantwort übernehmen [51, 52]. Zwischen Kapsid und Hülle befindet sich eine amorphe Proteinmatrix, die als Tegument bezeichnet wird. Proteine des Teguments übernehmen wichtige regulatorische Funktionen bei der Replikation.

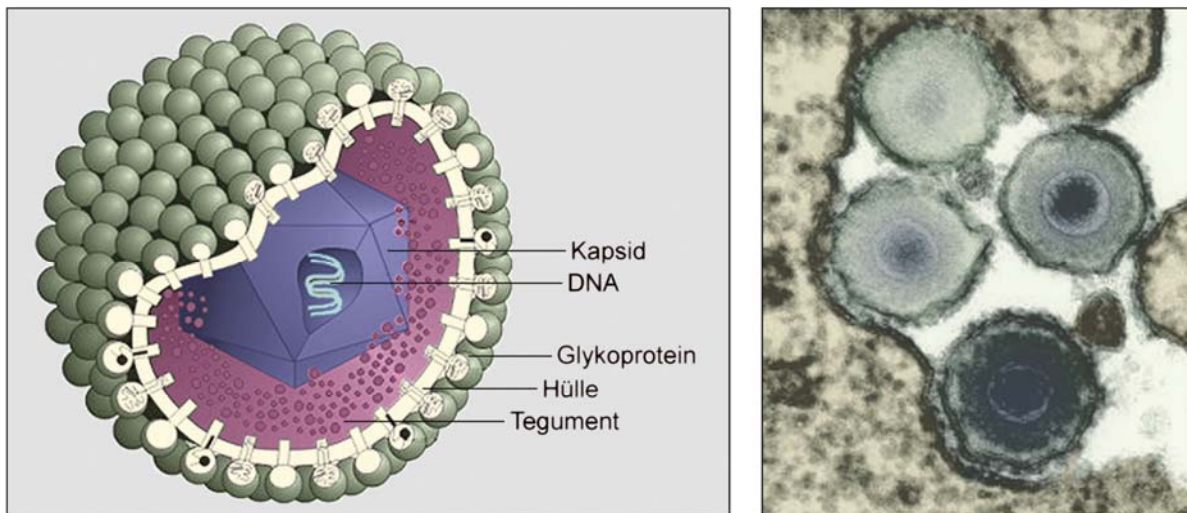


Abbildung 1-2: Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung eines β -Herpesvirus.

Schematische Abbildung modifiziert nach M. Reschke [53], EM-Aufnahme von Dr. S. Biel, Robert-Koch-Institut, Berlin.

1.2.3 Genom, Replikation und Pathogenese von CMV und HHV-6

Die Genome von CMV und HHV-6 liegen als doppelsträngige lineare DNA vor. CMV hat das größte und komplexeste Genom aller Herpesviren. Das CMV Genom besteht aus einem kurzen und einem langen Segment (U_S und U_L), welche von Wiederholungseinheiten eingerahmt sind. Es umfasst ~230 kbp und kodiert für etwa 200 Genprodukte. Das Genom von HHV-6 besteht aus einer einheitlichen Region, die von Wiederholungssequenzen variierender Länge flankiert ist. Es ist mit 161 bis 168 kbp kürzer als CMV und hat mit etwa 80 Genprodukten eine geringere Kodierungskapazität. HHV-6 wird aufgrund von eindeutigen genetischen, biologischen und immunologischen Eigenschaften in zwei Varianten, HHV-6A und -6B, unterteilt [54, 55]. Die Varianten HHV-6A und -6B sind zu 90 % genetisch identisch [56, 57], die Sequenz von CMV wird zu 40-57% als homolog angegeben [58].

Die Infektion der Zelle beginnt durch Adsorption der Virionen an die Zelle und der Membranfusion von Virushülle und Zellmembran. Kapsid und Tegument gelangen in das Zytoplasma, wo sich das Kapsid an die Mikrotubuli anlagert. Das lineare Genom wird durch die Kernporen in den Zellkern transportiert, dort zirkularisiert es und liegt danach als Episom vor. Eine Integration von CMV in das Wirtsgenom findet nicht statt, für HHV-6 wurde der Einbau der viralen DNA in Chromosom 17 und 22 beschrieben [59, 60].

Die Expression des Virusgenoms erfolgt in drei Phasen. Zuerst werden die sehr frühen

(engl. immediate-early, IE) Proteine synthetisiert, sie haben regulatorische Aufgaben und aktivieren die Expression der frühen (engl. early, E) Gene. Diese sind für die Vorbereitung und Durchführung der viralen Replikation erforderlich. Die späten Proteine (engl. late, L) werden während der DNA-Synthese exprimiert und sind für den Aufbau der Virusstruktur verantwortlich.

Der Replikationszyklus der β -Herpesviren ist mit 48 - 72 Stunden vergleichsweise langsam. Sie haben ein enges Wirtsspektrum und zeichnen sich durch ein Anschwellen infizierter Zellen (zytopathischer Effekt) aus. Nach der Primärinfektion persistieren alle Herpesviren lebenslang im Organismus des Wirts. Während der Latenz liegt die Virus-DNA als extrachromosomales Episom im Zytoplasma vor und wird parallel mit dem Zellgenom repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Während dieser Phase ist die Produktion infektiöser Partikel unterdrückt. Der Ort der Latenz ist für CMV und HHV-6 nicht abschließend geklärt, die Zellen der Hämatopoese, sowie einige Organsysteme scheinen eine zentrale Rolle zu spielen.

1.2.4 Epidemiologie und Transmission

Das streng artspezifische Zytomegalievirus infiziert ausschließlich den Menschen. Abhängig vom sozio-ökonomischen Status und geographischer Region beträgt die Prävalenz 40-100 % [61]. Im allgemeinen ist die Prävalenz in Entwicklungsländern und bei niedrigem sozio-ökonomischen Status höher. Die Übertragung erfolgt zum einen von der Mutter auf das Kind (transplazentar (1 %), unter der Geburt und über die Muttermilch (5-20 %) [62]), zum anderen über Tröpfcheninfektion durch virushaltigen Speichel, über Schmierinfektion mit kontaminiertem Urin oder Blut und durch sexuelle Übertragung. Außerdem besteht die Möglichkeit einer iatrogenen Infektion durch die Transfusion infektiöser Blutprodukte oder die Transplantation infizierter Organe.

HHV-6 ist weltweit verbreitet und die Durchseuchung in der Bevölkerung hoch. Die Primärinfektion ereignet sich meist in den ersten zwei Lebensjahren mit einem Maximum im 6. bis 9. Lebensmonat. In der Erwachsenen Bevölkerung beträgt die Seroprävalenz 90 % [63]. Nur wenige Studien unterscheiden zwischen den beiden Varianten HHV-6A und -6B, es wird jedoch vermutet, dass die Mehrheit der Infektionen in immunkompetenten Patienten durch HHV-6B hervorgerufen wird und HHV-6A bei immunsupprimierten Patienten und einigen neurologischen Krankheitsbildern eine Rolle spielt [64]. Der vermutete Weg der Übertragung erfolgt über virushaltigen Speichel [65],

selten wurde eine kongenitale oder perinatale Transmission beobachtet [66]. HHV-6 kann ebenfalls durch Blutprodukte und transplantierte Organe übertragen werden.

1.2.5 Klinische Manifestation

Eine Primärinfektion mit CMV in immunkompetenten Personen verläuft meist klinisch unauffällig [67]. Gelegentlich führt sie zu einem Mononukleose-ähnlichen Bild, mit persistierendem Fieber, zervikalen Lymphknotenschwellungen und Myalgien. Im Gegensatz zu der EBV-assoziierten Infektiösen Mononukleose verursacht die CMV Infektion selten eine Tonsillitis oder Splenomegalie [68]. Eine der wichtigsten Manifestationen der CMV Infektion ist die kongenitale Infektion. Ihre klinischen Folgen sind abhängig von der Art der Infektion der Mutter. Eine Erstinfektion in der Schwangerschaft führt in 35 bis 50 % der Fälle zur Übertragung von CMV auf das ungeborene Kind, eine nicht-primäre Infektion nur in 0,2 bis 2 % der Fälle [69, 70]. Kinder von Müttern mit bestehender Immunität zeigen ausgesprochen selten klinische Symptome, wohingegen 8 bis 10 % der infizierten Neugeborenen von Müttern mit Primärinfektion nach der Geburt manifest erkranken. An Symptomen treten dabei unter anderem Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Mikrozephalie, mentale Retardierung und Taubheit auf. Generalisierte Infektionen mit schweren Schädigungen und Letalitätsraten von 11 bis 20 % sind möglich [71].

Die Erstinfektion mit HHV-6 erfolgt meist im Kindesalter und kann asymptomatisch verlaufen. Das Dreitagefieber (Exanthema subitum) wurde als Primärinfektion mit der Variante HHV-6B assoziiert [72]. Der typische kleinfleckige Ausschlag dieser Erkrankung tritt nur bei etwa 20% der Kinder mit Erstinfektion auf [73]. Die Mehrheit entwickelt eine akute fieberhafte Erkrankung, welche in der Regel einen leichten und selbstlimitierenden Verlauf nimmt. Selten treten Komplikationen wie Fieberkrämpfe, Hepatitis, Arthritis oder Enzephalopathie auf [74]. Aufgrund der hohen Durchseuchung mit HHV-6 im Kindesalter sind Primärinfektionen in älteren Personen rar. Bei Erstinfektion im Erwachsenenalter kann es zu unspezifischem Fieber oder einer Mononukleose-ähnlichen Symptomatik kommen. Eine Reaktivierung des Virus in immunkompetenten Personen verläuft meist mild oder asymptomatisch. HHV-6 Infektionen wurden unter anderem mit Multipler Sklerose [75, 76], lymphoproliferativen Erkrankungen [77], dem chronischen Müdigkeitssyndrom [78] und Pityriasis rosea [79] assoziiert, diese Zusammenhänge sind jedoch nicht gesichert.

1.2.6 CMV und HHV-6 in stammzelltransplantierten Patienten

Die Ausbreitung von Viren im menschlichen Organismus hängt stark vom Reife- und Funktionszustand des Immunsystems ab, weshalb Virusinfektionen für immunsupprimierte Patienten eine besondere Bedrohung darstellen. Insbesondere Herpesvirusinfektionen verursachen nach Stammzelltransplantation häufig schwere Komplikationen und tragen somit erheblich zu Morbidität und Mortalität bei. Dabei kann es zu einer Primärinfektion, einer Reaktivierung des latenten Virus oder einer Reinfektion mit einem zweiten Virusstamm kommen [62]. Eine Erstinfektion nach der Transplantation ist mit einer höheren Virusausscheidung und einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert [80].

Bei Stammzelltransplantatempfängern war das Zytomegalievirus früher die häufigste infektiöse Todesursache [81]. Durch Fortschritte in Prävention, Diagnose und Therapie konnte das Auftreten von CMV Erkrankungen von 20 - 30% in den frühen 1990ern auf 5 - 10 % heutzutage gesenkt werden [82].

Eine CMV Infektion verursacht bei stammzelltransplantierten Patienten verschiedene klinische Symptome. Durch die direkte Wirkung des Virus kann das sog. CMV-Syndrom auftreten, ein Mononukleose-ähnliches Bild mit Fieber, Thrombo- und Neutropenie, oder aber eine eindeutig definierte CMV Organerkrankung. Nach dem *Workshop of CMV disease* müssen für die Diagnose einer CMV Organerkrankung ein passendes klinisches Syndrom, zusammen mit dem Nachweis von CMV aus dem betroffenen Organ vorliegen und andere auslösende Faktoren ausgeschlossen sein [83]. Die einzige Ausnahme bildet die Retinitis, bei der das klinische Erscheinungsbild genügt. Häufige Organmanifestationen bei stammzelltransplantierten Patienten sind die interstitielle Pneumonie und die Kolitis. Außerdem können nach SZT das Knochenmark, die Leber, die Retina und selten das ZNS betroffen sein. CMV wirkt durch Inhibition des Wachstums und der Differenzierung myeloischer Progenitorzellen myelosuppressiv [84] und kann zu einem verzögerten Anwachsen oder völligen Versagen des transplantierten Knochenmarks führen [85].

Als indirekte Wirkung der CMV Infektion werden eine Transplantatabstoßung von soliden Organen, das Auftreten einer GvHD und die Prädisposition zu opportunistischen Infektionen, bedingt durch immunsuppressive Effekte des Virus, beschrieben [62, 86, 87].

Zeitlich tritt eine CMV Erkrankung in seropositiven Patienten nur selten vor dem Engraftment auf und ist dann mit einer hohen Mortalität assoziiert [88]. Wegen der nach

dem Engraftment bestehenden Immundefizienz lässt sich während dieser Zeit bei etwa 60 - 70 % der CMV seropositiven Patienten eine CMV Infektion nachweisen. Werden keine präventiven Maßnahmen ergriffen, so besteht für diese Patienten ein Risiko von 20 - 30 %, eine manifeste CMV Erkrankung zu entwickeln [89]. Das Risiko einer CMV Infektion bleibt auch nach Tag 100 nach Transplantation bestehen. Abhängig von den durchgeführten prophylaktischen Maßnahmen wurde ein Anstieg der späten CMV Infektionen und Erkrankungen beschrieben [86, 89].

Als Risikofaktoren einer CMV Erkrankung werden der CMV Serostatus von Spender und Empfänger, Fremdspendertransplantation und HLA Mismatch [90], Manipulationen des Transplantats, wie T-Zell Depletion oder CD34 Selektion und das Auftreten einer GvHD beschrieben [68, 86, 89].

Infektionen mit HHV-6 nach Stammzelltransplantation treten häufig auf und sind aufgrund der hohen Seroprävalenz in der Bevölkerung meistens auf eine Reaktivierung zurückzuführen [91]. Die mediane Inzidenz von HHV-6 Infektionen bei stammzelltransplantierten Patienten wird mit 48 % (Spanne 28 bis 75 %) angegeben [63]. Die Mehrheit dieser Infektionen ist auf eine Reaktivierung der Variante B zurückzuführen und tritt typischerweise 2 - 4 Wochen nach der Transplantation auf [62, 92]. Im Gegensatz zu CMV ist über die klinischen Auswirkungen einer HHV-6 Infektion nach SZT weniger bekannt. Verschiedene Erkrankungen konnten mit HHV-6 Infektionen assoziiert werden. Dazu zählen Enzephalitis, interstitielle Pneumonie, Hautausschlag und Knochenmarksuppression [93, 94, 95]. In vitro Versuche zeigten die Fähigkeit von HHV-6, die Proliferation und Differenzierung von Knochenmarkszellen zu unterdrücken, wobei alle drei Zelllinien betroffen sein können [96, 97]. Es wird angenommen, dass zwei verschiedene Mechanismen für die HHV-6 vermittelte Myelosuppression verantwortlich sind. Zum einen durch direkte Schädigung der Progenitorzellen durch die Infektion und zum anderen über indirekte Zytokin-vermittelte Effekte [98]. Die klinische Ausprägung reicht von verzögertem Engraftment bis zur chronischen Dysfunktion [76, 99, 100, 101]. Im Allgemeinen scheinen jedoch asymptomatische HHV-6 Infektionen nach SZT zu dominieren [62, 102].

Als Risikofaktoren für das Auftreten einer HHV-6 Infektion wurden unter anderem Fremdspendertransplantation [99], Verwendung von Knochenmark als Transplantatquelle [100], allogene Transplantation im Gegensatz zur autologen und eine Leukämie oder ein Lymphom als zugrunde liegende Erkrankung [103] beschrieben.

Eine Interaktion von HHV-6 und CMV wird in verschiedenen Studien vermutet, jedoch ist eine kausale Beziehung nicht bewiesen [63]. So gibt es Anzeichen, dass HHV-6 die CMV spezifische Immunantwort hemmt und damit zur Entstehung von CMV Erkrankungen prädisponiert [104]. Auch bei Organtransplantationen wurde HHV-6 als Risikofaktor für das Auftreten einer CMV Erkrankung beschrieben [105, 106].

1.2.7 Therapie von CMV und HHV-6 in stammzelltransplantierten Patienten

Zur Therapie der manifesten CMV Erkrankung stehen im wesentlichen drei Medikamente zur Wahl. Ganciclovir ist ein Nukleosidanalogen, welches durch Einbau in das Virusgenom zum Abbruch der DNA-Synthese führt. Foscarnet ist ein Pyrophosphatanalogen, das nicht-kompetitiv die virale DNA Polymerase hemmt, und Cidofovir führt zu einer direkten Hemmung viraler Polymerasen. Diese Medikamente können nur replizierende Viren hemmen und erfassen somit nicht die latenten Viren. Das bedeutet, dass das Virus nicht vollständig aus dem Organismus entfernt werden kann und erneute Reaktivierungen auch nach erfolgreicher Behandlung möglich sind. Eine länger erforderliche Behandlungsdauer bei stark immunsupprimierten Patienten birgt die Gefahr der Resistenzentwicklung. Diese treten bei stammzelltransplantierten Patienten aber insgesamt selten auf [86].

Medikament der ersten Wahl zur Behandlung der CMV Erkrankung ist Ganciclovir. Zu beachten sind auch die Nebenwirkungen der Medikamente, so wirkt Ganciclovir vor allem myelotoxisch und führt zu Neutro- und Thrombopenien, Foscarnet und Cidofovir haben nephrotoxische Eigenschaften [107, 108].

Die Prognose der CMV Erkrankung ist trotz Fortschritten in der Therapie weiterhin schlecht, es überleben etwa nur 50 % der Patienten mit behandelter CMV Pneumonie [107]. Aus diesem Grund sind präventive Maßnahmen besonders wichtig. Die Durchführung dieser Maßnahmen kann zum einen als Prophylaxe, der Verhinderung der Entstehung einer CMV Infektion durch Gabe von antiviralen Medikamenten, erfolgen. Oder zum anderen als präemptive Therapie, bei der Patienten mit nachgewiesener CMV Infektion vor Auftreten von klinischen Symptomen behandelt werden. Wichtig für die Entscheidung, welche therapeutischen Maßnahmen angewendet werden, ist das Risikoprofil des einzelnen Patienten [82]. Die präemptive Therapie ist Standard. Bei Höchst-Risiko-Patienten (haploidente Transplantationen oder T-Zell depletierte PBSCT) wird sie mit der prophylaktischen Strategie kombiniert.

Ein Wirkstoff, welcher prophylaktisch eingesetzt wird, ist Aciclovir. Dieser wirkt über

eine Hemmung der Thymidinkinase, welche von CMV nicht exprimiert wird, weshalb Aciclovir in vitro nur eine schwache Wirksamkeit zeigt. Die prophylaktische Gabe von Aciclovir in SZT Empfängern reduziert jedoch das Auftreten von CMV Infektionen und verbessert das Überleben [109, 110]. Auch eine Prophylaxe mit Ganciclovir verringert die Inzidenz von CMV, ist aber mit Neutropenien und einem erhöhten Risiko für bakterielle und fungale Infektionen verbunden [111]. Eine generelle vorbeugende Therapie ist derzeit nicht indiziert.

Die präemptive Therapie ist weit verbreitet und basiert auf der Tatsache, dass eine Virämie der CMV Erkrankung vorausgeht und die Viruslast ein entscheidender Faktor in der Pathogenese ist [112, 113]. Dieser Ansatz erfordert sensitive verlässliche Methoden zum Virusnachweis. Als Medikament wird vor allem Ganciclovir verwendet, durch dessen Gabe die Inzidenz der CMV Erkrankung reduziert werden konnte [86]. Mit der gleichen Effizienz kann alternativ auch Foscarnet eingesetzt werden [114] oder eine Kombination aus beiden Medikamenten [115]. Nach Versagen von Ganciclovir und Foscarnet kann Cidofovir als zweite Therapieoption eingesetzt werden [116].

Zur antiviralen Therapie von HHV-6 wurden bislang keine großen kontrollierten Studien durchgeführt. In vitro Versuche zeigen eine Aktivität von Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir gegen HHV-6 [117]. Über eine klinische Wirksamkeit von Ganciclovir und Foscarnet bei immunsupprimierten Patienten mit organ-spezifischen Symptomen wurde in Fallberichten und kleineren Studien berichtet [63]. Trotz geringer Ansprechraten von Aciclovir in vitro, wurde eine Reduktion der HHV-6 Infektionen durch Prophylaxe mit hoch dosiertem Aciclovir in SZT Patienten beschrieben [101]. Auch die prophylaktische Gabe von Ganciclovir scheint sich positiv auf das Auftreten von HHV-6 Infektionen auszuwirken, ist jedoch mit stärkeren Nebenwirkungen als Aciclovir verbunden [118, 119]. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob eine Prophylaxe oder eine präemptive Therapie generell angeraten ist.

1.3 Diagnostische Methoden

Die durch β -Herpesviren, insbesondere CMV, verursachte Morbidität und Mortalität in immunsupprimierten Patienten erfordern sensitive und verlässliche diagnostische Methoden, die möglichst früh und genau Auskunft über eine Infektion geben. Ziel der Diagnostik ist, Patienten mit Risiko frühzeitig zu erkennen und eine antivirale Therapie (präemptive Therapie) einleiten zu können. Klinisch relevant ist dabei die Unterscheidung von aktiver und latenter Infektion. Erfordernisse an eine optimale

Nachweismethode sind unter anderem schnelle Durchführbarkeit, einfache Handhabung, hohe Sensitivität, Quantifizierung der Viruslast und hohe Reproduzierbarkeit [112].

Einige Nachweismethoden für CMV und HHV-6 werden im Folgenden vorgestellt. Dabei wird besonders auf die für diese Arbeit relevanten Methoden, den Antigennachweis und die quantitative real-time PCR im TaqMan-Format eingegangen.

1.3.1 Serologie

Eine Infektion kann durch den Nachweis von Antikörpern gegen das Virus diagnostiziert werden. Dieses setzt die Serokonversion der infizierten Person von Antikörper negativ zu positiv voraus [120]. Da diese Serokonversion nicht immer auftritt, ist die Sensitivität der Serologie eingeschränkt. Der Nachweis von IgM, als Marker der frühen Immunität, beweist nicht die frische Infektion, weil dieser Antikörper während der aktiven Infektion negativ bleiben oder sehr lange persistieren kann [121]. Die Messung der Antikörper erfolgt meist mit einem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Jedoch verhindern Kreuzreaktivitäten zwischen den β -Herpesviren möglicherweise eine zuverlässige Unterscheidung zwischen den einzelnen Viren, und die meisten erhältlichen Tests differenzieren nicht zwischen HHV-6A und -6B [63, 108]. Es ist nicht zur Überwachung von Virusinfektionen nach einer Transplantation geeignet, wohl aber zur Bestimmung des Infektionsstatus vor der Transplantation.

1.3.2 Zellkultur und Shell-vial-assay

Eine sensitive und spezifische Methode zum Virusnachweis ist die Anzucht in der Zellkultur. Durch Auftreten eines zytopathischen Effekts und anschließender Bestätigung durch eine Immunzytologie wird eine aktive Virusreplikation nachgewiesen. Vorteilhaft ist die Möglichkeit der weiteren Charakterisierung des Virus, z. B. Typ- oder Resistenzbestimmung. Die Kultivierung ist jedoch ein sehr zeitaufwendiges und arbeitsintensives Verfahren und damit nicht für die Anwendung in der Routinediagnostik geeignet. Eine Unterscheidung zwischen Primärinfektion, Reaktivierung und chronisch persistierender Infektion ist mit dieser Methode nicht möglich [108].

Eine schnellere Methode für den Nachweis für CMV ist der *shell-vial-assay*. Dabei wird das Patientenmaterial mit humanen Fibroblasten in sog. shell-vials inkubiert. Unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die α - und β -Proteine von CMV (*immediate-early* Proteine) kann das Virus sofort oder nach 12 bis 48 Stunden durch

Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Gegenüber der Zellkultur ist der *shell-vial-assay* zeitsparend, jedoch in der Sensitivität unterlegen. Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Anzahl von Patienten mit CMV Virämie nicht als positiv erkannt wird [122].

Über ähnliche Verfahren zum Nachweis von HHV-6 wurde berichtet [63, 92].

1.3.3 Antigennachweis (APAAP = Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase)

Der Antigennachweis ist eine sensitive und spezifische Methode zur CMV Diagnostik. Er wurde erstmals 1988 beschrieben und basiert auf dem Nachweis des viralen Strukturproteins pp65 (ppUL83) in infizierten peripheren Blutleukozyten (PBL) [123]. Der Antigennachweis korreliert mit der Virämie und dem Auftreten einer CMV Erkrankung und wird inzwischen vielerorts erfolgreich in der CMV Diagnostik eingesetzt [124].

Für die Durchführung werden die PBLs der Patienten mittels Zytozentrifugation angereichert, auf Objektträger gebracht und in Aceton fixiert. Es folgt die Inkubation der Präparate mit dem monoklonalen pp65-spezifischen CMV mAb (Primärantikörper), dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex (Enzym-Immunkomplex). Nach Färbung mit der APAAP-Färbelösung erscheinen antigenpositive und damit CMV-infizierte Zellen, unter dem Lichtmikroskop rot.

Vorteile dieser Methode sind die schnelle Durchführung und die Möglichkeit der Quantifizierung. So können Aussagen über den Schweregrad der Infektion, das Ansprechen einer antiviralen Therapie und den Verlauf getroffen werden. Dazu wird die Anzahl der antigenpositiven PBL zu der Gesamtanzahl der PBL ins Verhältnis gesetzt.

Allgemein ist der Antigennachweis jedoch relativ arbeitsintensiv und die Interpretation subjektiv. Ein limitierender Faktor nach Stammzelltransplantation ist die Phase der Aplasie, in der nicht genug Leukozyten zur Durchführung dieses Tests vorhanden sind. Problematisch ist außerdem die Aufarbeitung der Proben. Eine rasche Bearbeitung ist notwendig, da mit der Zeit die Anzahl der positiven Zellen abnimmt und das Ergebnis verfälscht wird [125]. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode sind standardisierte Protokolle, die eine Vergleichbarkeit gewährleisten.

Für die HHV-6 Diagnostik wurden ebenfalls Methoden zum Antigennachweis entwickelt [126].

1.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion kann eine Virusinfektion durch die Amplifikation von Virus DNA nachgewiesen werden. Sie wurde 1983 von Kary B. Mullis konzipiert [127] und ist ein sehr sensibles, schnelles und gut reproduzierbares Verfahren. Die PCR ermöglicht den Nachweis minimaler Mengen viraler Nucleinsäuren und ist somit aus der Routinediagnostik nicht mehr wegzudenken. Eine Unterscheidung zwischen latenter und aktiver, klinisch relevanter Infektion ist durch die hohe Sensitivität der PCR schwierig, weshalb in der Routinediagnostik die Sensitivität häufig bewusst niedrig eingestellt wird [121].

1.3.4.1 Qualitative PCR

Die PCR vervielfältigt gezielt DNA-Abschnitte. Auch der Nachweis von RNA mit der PCR ist möglich, wenn sie vorher durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt wird.

Die PCR wird in Thermocyclern durchgeführt und besteht typischerweise aus drei Schritten mit drei Temperaturstufen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, erfolgt bei etwa 94°C die Auftrennung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge. Danach lagern sich die Primer, kurze einzelsträngige Oligonukleotide, an die ihnen komplementären DNA-Abschnitte an und rahmen damit die zu amplifizierende Zielsequenz von beiden Seiten ein. Die exakte Bindung der Primer ist maßgeblich für eine korrekte Amplifizierung der Zielsequenz. Dieser zweite Schritt wird Annealing genannt und erfolgt bei etwa 55°C. Im dritten Schritt, der Extension, wird die Temperatur auf 72°C erhöht. Die Taq-Polymerase verlängert nun mit Nucleotiden aus dem Reaktionsgemisch die Primer, bis wieder eine Doppelstrang-DNA vorliegt, welche der zu amplifizierenden DNA exakt gleicht. Die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte führt zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten Sequenz.

Die PCR-Produkte können anschließend ihrer Größe nach in einer Elektrophorese aufgetrennt und durch einen interkalierenden Farbstoff sichtbar gemacht werden.

Eine Möglichkeit, eine aktive Infektion sicher von einer latenten Infektion zu unterscheiden, ist die Durchführung einer *Reverse-Transkriptase-PCR* (RT-PCR). Sie weist virale messenger RNA (mRNA) nach, welche nur während der Replikationsphase vorhanden ist.

1.3.4.2 Quantitative PCR

Eine etwas neuere Entwicklung ist die quantitative PCR. Bei dieser wird durch den Vergleich des Amplifikats mit einem co-amplifizierten Standard die Menge der Ziel-DNA bestimmt. So kann die Anzahl der Virus-Kopien in der Patientenprobe errechnet werden.

Das bietet entscheidende Vorteile bei der Verlaufbeobachtung und der Einschätzung des Therapieerfolges von Virusinfektionen [128, 129]. Weiterhin kann durch Überwachung der Viruslast das Risiko für das Auftreten einer Erkrankung beurteilt werden, beispielsweise sind hohe CMV DNA Lasten mit einem höheren Risiko einer CMV Erkrankung assoziiert und bedürfen somit einer größeren Kontrolle [113].

Verschiedene Verfahren der quantitativen PCR sind bekannt. Im Folgenden wird nur die in dieser Arbeit angewendete real-time-PCR im TaqMan Format beschrieben.

1.3.4.2.1 Quantitative real-time-PCR im TaqMan Format

Das Entscheidende an der real-time-PCR (Echtzeit-PCR) ist die kontinuierliche Messung des Amplifikationsprodukts während seiner Entstehung, also in Echtzeit. Die Messung erfolgt dabei über laserinduzierte Fluoreszenzsignale. Vorteil ist, dass die Quantifizierung des Produkts in der exponentiellen Vermehrungsphase der PCR erfolgen kann. Die Amplifikation des PCR Produkts erfolgt zunächst exponentiell und geht dann in eine Plateauphase über. In der exponentiellen Phase besteht eine direkte Korrelation zwischen der DNA-Menge in der Probe und dem gebildeten PCR Produkt. In der konventionellen quantitativen PCR erfolgt die Messung des Produkts jedoch nur einmalig nach einer definierten Anzahl von Zyklen (Endpunktbestimmung). Es ist dabei nicht erkennbar, ob sich die Amplifikation schon in der Plateauphase befindet, in der die Korrelation der DNA-Menge von Probe und PCR Produkt abnimmt und damit die quantitative Messung ungenau ist.

Vorteilhaft an der real-time-PCR ist außerdem die einfache Handhabung, die schnelle Durchführbarkeit mit hoher Probenzahl, der relativ objektive Auswertungsmodus und die sofortige Verfügbarkeit der Ergebnisse. Durch Integration der Bestätigungsreaktion im PCR-Lauf entfällt die Gelelektrophorese nach der PCR und verringert damit den Zeitaufwand und die Kontaminationsgefahr.

Insgesamt sind die fluoreszenz-basierten real-time PCRs eine verlässliche Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren. Die real-time-PCR im TaqMan Format wurde Mitte der 1990er entwickelt und beruht auf dem 5' Nuklease Konzept [130, 131].

Für die Durchführung wird in den Reaktionsansatz zusätzlich eine sog. Sonde gegeben, die aus 20 bis 30 Basen besteht und komplementär zur Zielsequenz ist. Die Sonde bindet zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern an die DNA. Im Unterschied zu den Primern ist sie an ihrem 3'Ende phosphoryliert und damit nicht verlängerbar. Die Enden der Sonde sind mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert, am 3'Ende sitzt der Quencher und am 5'Ende der Reporter. Die beiden Farbstoffe unterliegen einem Fluoreszenz- (oder Förster) Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [132]. Das bedeutet, dass bei Anregung durch den Laser des Detektionsgerätes die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes wegen der räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff unterdrückt ist, weil die Energie durch Elektronentransfer vom Quencher aufgenommen wird [133]. Die in dieser PCR eingesetzte Taq DNA-Polymerase besitzt neben der Fähigkeit zur DNA Synthese auch eine 5'Nuklease-Aktivität, kann also DNA abbauen. In der Extensionsphase wird, bei Verlängerung der Primer durch die Polymerase, die auf dem gleichen Strang liegende Sonde verdrängt („strand displacement“). Durch die 5'Nuklease-Aktivität der Polymerase wird die Sonde hydrolysiert, der Reporter-Farbstoff damit von der Sonde abgeschnitten. Die beiden Farbstoffe verlieren dadurch ihre Nähe und unterliegen nicht mehr dem FRET, so dass der Reporter nun nach Anregung fluoresziert (vergleiche Abbildung 1-3).

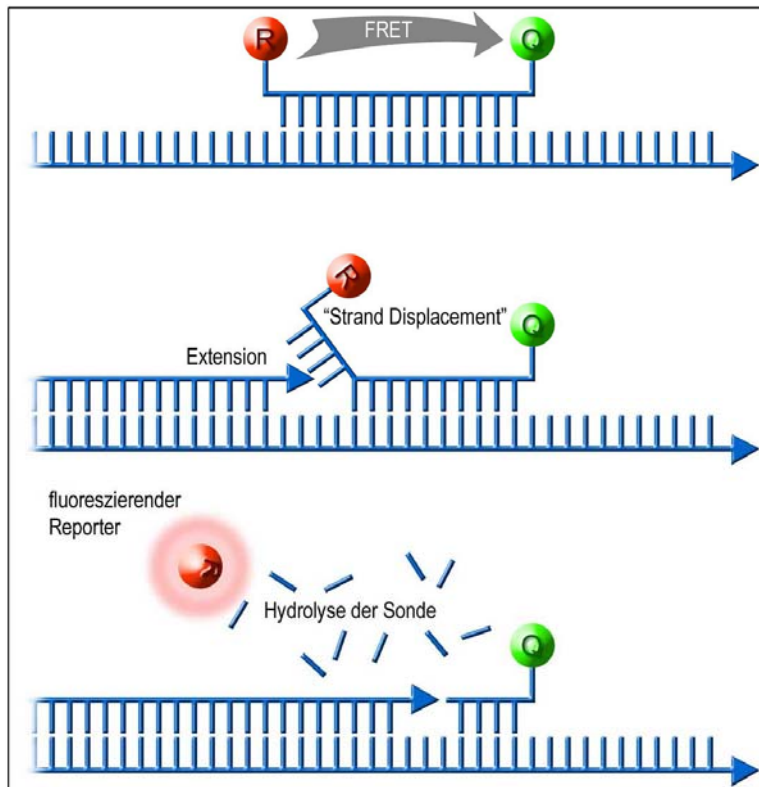


Abbildung 1-3: Funktionsprinzip des Sondenabbaus und der Fluoreszenzemission der real-time PCR im TaqMan Format.

Die gemessene Fluoreszenz ist sequenzspezifisch, da die Sonde nur bei vollständiger Bindung an die Zielsequenz abgebaut werden kann und fluoresziert. Mit der Amplifikation der Zielsequenz steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme direkt proportional zu dem Zuwachs an PCR-Amplifikat.

Als fluoreszierende Farbstoffe werden häufig 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporter und 5-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) als Quencher verwendet. Jede PCR Reaktion, die auf dem 5' Nuklease Konzept beruht, enthält einen weiteren Fluoreszenz-Farbstoff, z. B. Carboxy-X-Rhodamine (ROX). Das ist ein Kontrollfarbstoff, der nicht an der Reaktion beteiligt ist und dessen Fluoreszenz sich nicht verändert. Er dient somit als passive Referenz, um Schwankungen der Intensität des Signals zu berücksichtigen. Die Emission der Sonde wird mit der des Kontrollfarbstoffs automatisch verrechnet.

Für die Quantifizierung wird für jede Probe der Zyklus bestimmt, bei dem es zu einem definierten Anstieg der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase kommt. Dieser Zyklus wird C_T (engl. *threshold cycle*, Schwellenzyklus) genannt. Im ABI Prism 7700 Sequence Detection System wird dieser Wert automatisch berechnet und ist als das Überschreiten der Fluoreszenz der Probe über das Zehnfache der Standardabweichung der Zyklen 3

bis 15 definiert.

Die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenz ist abhängig von der Anfangskopienzahl der Zielsequenz. Je mehr Kopien in der Probe vorhanden sind, desto früher ist ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten und der C_T Wert damit niedriger.

Zur Berechnung der Kopienanzahl in einer Probe werden die C_T Werte von DNA Proben mit bekannter Konzentration bestimmt. Aus diesen wird eine Standardgerade erstellt, aus der dann die Konzentration unbekannter Proben errechnet werden kann.

1.4 Fragestellung

Herpesviren persistieren nach der Erstinfektion lebenslang im Organismus und werden vor allem während Phasen der Immunsuppression reaktiviert. Unter den Herpesviren trägt insbesondere das Zytomegalievirus erheblich zu Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation bei. Zur Epidemiologie, Diagnostik und Therapie von Infektionen mit dem Zytomegalievirus nach SZT ist unser Kenntnisstand bereits relativ gut. Über die klinischen Auswirkungen einer Infektion/ Reaktivierung mit dem Humanen Herpesvirus 6 nach SZT ist weniger bekannt. Die Prävention von manifesten Infektionen mit CMV und HHV-6, sowie die Einleitung einer präemptiven Therapie erfordern sensitive und reproduzierbare Methoden zum Virusnachweis.

Die vorliegende Arbeit soll sich einigen wichtigen, noch unbeantworteten Fragen in diesem Zusammenhang widmen, im wesentlichen wird sie die folgenden vier Punkte behandeln:

- Nachweis und Risikofaktoren für CMV, HHV-6A und –6B nach SZT
- Einfluss des Konditionierungsregimes auf das Auftreten von CMV Infektionen
- Einfluss von HHV-6 Infektionen auf das hämatologische Engraftment und die GvHD
- Methoden zum Nachweis von CMV: Vergleich der quantitativen real-time-PCR im TaqMan Format mit dem Antigennachweis

2 Patienten, Methoden und Material

In der vorliegenden Arbeit wurden klinische Daten von 82 knochenmark- bzw. stammzelltransplantierten Patienten mittels eines Fragebogens erfasst. 1241 Plasmaproben dieser Patienten, welche während des stationären Verlaufs und der ambulanten Nachsorge gewonnen wurden, wurden retrospektiv mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) im TaqMan-Format auf das Vorhandensein von CMV, HHV-6A und -6B DNA untersucht. Dazu wurde vorher DNA aus den Plasmaproben extrahiert und eine quantifizierbare Positivkontrolle für die qPCR aus Plasmiden erstellt.

2.1 Patientenkollektiv

In diese Arbeit wurden alle konsekutiv zwischen Januar 1998 und März 2001 in der Charité - Campus Virchow Klinikum knochenmark- bzw. stammzelltransplantierten Patienten eingeschlossen.

2.1.1 Patientencharakteristika

Die klinischen Daten der eingeschlossenen Patienten wurden retrospektiv aus den Patientenakten entnommen. Hierfür wurden die stationären und ambulanten Akten der Patienten herangezogen. Wichtige Patientencharakteristika sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Insgesamt wurden 82 Patienten, davon 34 Frauen und 48 Männer, mit einem medianen Alter von 39 Jahren untersucht. 77 Patienten litten an einer malignen hämatologischen Systemerkrankung, 5 Patienten hatten ein fortgeschrittenes Hodenkarzinom. In 43 Fällen war der Spender ein Familienangehöriger, die anderen 39 Patienten hatten nichtverwandte Spender. 45 Patienten erhielten eine dosisreduzierte Konditionierung wegen relativer Kontraindikationen gegen eine myeloablative Behandlung (Alter oder Komorbidität) im Rahmen einer prospektiven Studie [134]. Diese bestand aus Fludarabin (gesamt 180 mg/m^2), Busulfan (gesamt 8 mg/m^2), ATG (gesamt 40 mg/kg) [30]. Die myeloablative Konditionierung wurde anhand von Standardprotokollen [135] durchgeführt, Patienten mit Fremdspendern oder fortgeschrittenem Krankheitsstadium erhielten eine intensiviertere Konditionierung mit Cyclophosphamid, Busulfan, Thiotepa und ATG [136]. Falls verfügbar wurden G-CSF mobilisierte periphere Blutstammzellen transplantiert. 19 Patienten mit Fremdspendern erhielten als Transplantat Knochenmark. Zur Prophylaxe einer Graft-versus-Host-Erkrankung erhielten alle

Patienten Ciclosporin A, 41 Patienten in Kombination mit Methotrexat und 19 Patienten mit Mycophenolatmofetil.

Tabelle 2-1: Patientencharakteristika (n= 82)

	Anzahl	(%)
Geschlecht		
weiblich	34	(41,5 %)
männlich	48	(58,5 %)
Alter		
in Jahren [Median (Spanne)]	39	(17 - 64)
Erkrankung		
AML / MDS / ALL	23	(28 %)
CML	33	(40 %)
MH / NHL	20	(25 %)
Hodentumor	5	(6 %)
Aplastische Anämie	1	(1 %)
Rezidivrisiko*		
standard	24	(29 %)
hoch	58	(71 %)
HLA-Matchstatus		
Geschwister, identisch	35	(43 %)
Familie, identisch	4	(5 %)
Familie, nicht identisch	4	(5 %)
Fremdspender, identisch	31	(37 %)
Fremdspender, nicht identisch	8	(10 %)
CMV-Serostatus		
E und S negativ	33	(40 %)
E negativ, S positiv	10	(12 %)
E positiv, S negativ	20	(25 %)
E und S positiv	19	(23 %)
Konditionierung		
FLU / BUS / ATG	45	(55 %)
BUS / CY / Thiotepa / ATG	19	(23 %)
BUS / CY	9	(11 %)
CY / TBI +/- VP16	6	(7 %)
andere	3	(4 %)
Transplantatquelle		
Knochenmark	19	(23 %)
MNC-Zahl [Median x 10 ⁸ /kg (Spanne)]	3,4	(0,9 - 20,1)
periphere Blutstammzellen	63	(77 %)
CD34 ⁺ -Zellzahl [Median x 10 ⁶ /kg (Spanne)]	6,0	(2,2 - 18,9)
GvHD-Prophylaxe		
CSA alleine	22	(27 %)
CSA + Methotrexat	41	(50 %)
CSA + Mycophenolatmofetil	19	(23 %)

* Rezidivrisiko: Standard bei CML 1. chronische Phase und AML in kompletter Remission; hohes Rezidivrisiko bei allen anderen Diagnosen bzw. fortgeschritteneren Stadien.

AML = akute myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, ALL = akute lymphatische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie, MH = Morbus Hodgkin, NHL = Non-Hodgkin Lymphom, E = Empfänger, S = Spender, CY = Cyclophosphamid, BUS = Busulfan, VP16 = Etoposid, FLU = Fludarabin, ATG = Antithymozytenglobulin, TBI = Ganzkörperbestrahlung, MNC = mononukleäre Zellen, GvHD = Graft-versus-Host-Erkrankung, CSA = Ciclosporin A.

2.1.2 Supportive Therapie

Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Patienten orale Chinolone und Amphotericin B. Neutropenisches Fieber wurde mit Breitspektrumantibiotika therapiert. Bei antibiotika-refraktärem Fieber wurde, wegen des Verdachts auf eine Pilzinfektion zusätzlich Amphotericin B verabreicht. Die Gabe von niedrig dosiertem Aciclovir bis zum Ausschleichen der Immunsuppression diente zur Vorbeugung von viralen Infektionen. Zur Prophylaxe von Pneumocystis carinii- und Toxoplasma gondii-Infektionen wurde Cotrimoxazol bis zum Tag 100 nach der Transplantation gegeben.

Die übertragenen Blutprodukte waren bestrahlt. CMV-seronegative Patienten mit seronegativen Spendern erhielten ausschließlich Blutprodukte von CMV-negativen Spendern. Leukozyten-depletierte Erythrozytenkonzentrate wurden zur Aufrechterhaltung eines Hämoglobinwertes von 8 g/dl transfundiert. Zur Aufrechterhaltung einer Thrombozytenzahl von 10/nl bzw. 20/nl bei Patienten mit Fieber wurden Leukozyten-depletierte Thrombozytenkonzentrate übertragen. Es wurde kein G-CSF zur Beschleunigung des hämatopoetischen Engraftments gegeben.

2.1.3 Überwachung und Therapie von CMV Infektionen

Alle Patienten wurden prospektiv für ein Jahr nach der Transplantation auf CMV Antigenämie untersucht. Während der ersten drei Monate erfolgte der CMV-Nachweis wöchentlich, danach je nach Ausprägung einer GvHD und dem Grad der Immunsuppression in wöchentlichen bis zu vierwöchentlichen Abständen.

Eine CMV bedingte Hepatitis oder Gastroenteritis wurde durch eine Gewebebiopsie mit Virusnachweis durch PCR oder immunhistologischem Verfahren bestätigt. Die Diagnose einer CMV-Pneumonie wurde anhand von Röntgenaufnahmen und dem Nachweis des Virus in der bronchoalveolären Lavage oder einer Biopsie gestellt.

Mit einer präemptiven CMV Therapie wurde bei zweimaligem Antigennachweis in Folge bei 18 Patienten begonnen. Davon erhielten 15 Patienten Ganciclovir 5 mg/kg Körpergewicht (KG) zweimal täglich, 2 Patienten bekamen einmal wöchentlich 5 mg/kg KG Cidofovir und ein Patient erhielt Foscarnet 90 mg/kg KG zweimal täglich. Die mediane Dauer der CMV Therapie betrug 17 Tage (Spanne 9 - 36).

2.1.4 HHV-6 Infektionen

Die Patienten wurden nicht routinemäßig auf eine HHV-6 Infektion untersucht. Die Blutproben, welche ursprünglich zur Überwachung von CMV Infektionen gewonnen wurden, wurden retrospektiv auf HHV-6A und -6B untersucht.

2.2 Arbeitsmethoden

2.2.1 Proben

Die in dieser Arbeit analysierten 1241 Proben wurden prospektiv zur Überwachung von CMV Infektionen durch Antigenämienachweis abgenommen. Aus den mit Heparin oder EDTA antikoagulierten Blutproben wurde Plasma durch Schwerkraftsedimentation gewonnen. Dabei werden die Blutröhrchen für 30 Minuten senkrecht aufgestellt, so dass aufgrund der Gravitation eine Auftrennung der Blutkomponenten erfolgt und das Plasma abgenommen werden kann. Die Plasmaproben wurden anschließend bei -80°C gelagert. Aus dem zellhaltigen Überstand wurden periphere Blutleukozyten (PBLs) gewonnen, anhand welcher der Antigenämienachweis erfolgte. Retrospektiv erfolgte dann die DNA Extraktion aus den Plasmaproben sowie der Nachweis von Herpesviren mittels quantitativer real-time PCR (qPCR).

2.2.2 DNA-Präparation aus Patientenplasma

Zur Isolierung der DNA aus den Plasmaproben wurde der QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Vorschriften des Herstellers. Dabei wird durch Proteinase K Verdau und anschließender Bindung an Silikamembranen die DNA mit einem Elutionspuffer extrahiert. Es werden je 200 µl Plasma eingesetzt und mit 200 µl Elutionspuffer eluiert, so dass 1 µl Plasma 1 µl Eluat entspricht. Die Eluate wurden bei -20° C gelagert.

2.2.3 Herstellung einer quantifizierbaren Positivkontrolle

Zur Herstellung einer quantifizierbaren Positivkontrolle und einer Standardgeraden für die qPCR wurden Plasmide kloniert, welche Gensequenzen der Viren CMV, HHV-6A und -6B enthielten. Für CMV war das die major-immediate-early-region (MIE) Genregion und für HHV-6 Abschnitte der putative-immediate-early-region.

2.2.3.1 Qualitative PCR

Die entsprechenden Gensequenzen wurden vor der Klonierung mittels qualitativer PCR amplifiziert. Als Ausgangs-DNA diente der Überstand einer Zellkultur, welcher mit dem jeweiligen Virus infiziert war.

Für CMV wurden die Primer MIE4 und MIE5 und für HHV-6 die Primer IE01 und IE02 in der PCR (Trio-Thermoblock von Biometra, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer, ihre *genebank accession number* (Nummer, unter welcher die Gene in der Genbank eingetragen sind), sowie die Genomlokalisierung der entsprechenden Sequenz sind in Tabelle 2-2 dargestellt (Informationen zur Genbank über das *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [137]). Aus den Tabellen 2-3 und 2-4 sind die Reaktionsansätze und Temperaturprofile der PCRs zu entnehmen.

Tabelle 2-2: Primer für die qualitative PCR

Virus	Accession-Number	Primer	Sequenz	Nukleotid-position
CMV	#M21295	MIE4	5'-CCA AgC ggC CTC TgA TAA CCA AgC C-3'	2736 - 2760
		MIE5	5'-CAg CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTg g-3'	3170 - 3147
HHV-6A	#M73681	IE01	5'-ATg ATg ATA CTg gTT TgA TTA-3'	893 - 913
		IE02	5'-ATC AgT TTC ATC ATT gTT ATC-3'	1435 - 1455
HHV-6B	#L21760	IE01	5'-ATg ATg ATA CTg gTT TgA TTA-3'	893 - 913
		IE02	5'-ATC AgT TTC ATC ATT gTT ATC-3'	1340 - 1359

Angegeben sind jeweils die Bezeichnung, die Sequenzen und die Genomlokalisierungen und die *genebank accession numbers* der verwendeten Primer für CMV und HHV-6.

Tabelle 2-3: CMV: Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die qualitative PCR

Reaktionsansatz CMV		Temperaturprofil		
Probe	2,5 µl	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Primer je	1,0 µl (20 µM)	94° C	180 s	1
dNTPs je	100,0 µM	94° C	30 s	35
10x PCR Puffer	2,5 µl	68° C	30 s	35
Taq Polymerase	1,0 U	72° C	20 s	35
Aqua bidest ad	25,0 µl			

Tabelle 2-4: HHV-6: Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die qualitative PCR

Reaktionsansatz HHV-6		Temperaturprofil		
Probe	2,0 µl	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Primer je	1,0 µl (333 nM)	94° C	180 s	1
dNTPs je	33,0 µM	94° C	30 s	30
10x PCR Puffer	3,0 µl	47° C	30 s	30
Taq Polymerase	0,3 U	72° C	60 s	30
Aqua bidest ad	30,0 µl	72° C	300 s	1

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese werden PCR-Produkte anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Identifikation der einzelnen Produkte erfolgt durch den Vergleich mit einem definierten Marker.

Zur Lösung der Agarose wird sie in TAE-Puffer aufgekocht. Der etwas abgekühlten flüssigen Agarose wird Ethidiumbromid zugesetzt, anschließend wird sie in eine Gelkammer mit einem Kamm gegossen. Nach Erstarrung des Gels wird dieses in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt und der Kamm vorsichtig entnommen. Dadurch entstehen Geltaschen für die Aufnahme der Proben. Das PCR-Produkt wird mit Gellade-Puffer 1:10 gemischt, wovon dann 10 µl in die Geltaschen pipettiert werden. Bei einer Spannung von 80 - 100 V erfolgt anschließend für 30 - 60 Minuten die elektrophoretische Auftrennung. Durch Interkalation des Ethidiumbromids und Anregung unter UV-Licht ($\lambda=256$ nm) wird die DNA im Gel sichtbar.

2.2.3.3 Plasmidklonierung

Die in der PCR amplifizierten Gensequenzen der Viren werden mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) in die mitgelieferten Plasmidvektoren (pCR[®]2.1-TOPO, 3,9 kb) eingebaut. Die Klonierung wurde anhand des Protokolls des Herstellers durchgeführt, das Prinzip ist im Folgenden erklärt: Während der Amplifikation der PCR wird durch die matritzenunabhängige Taq-Polymerase ein zusätzliches Nukleotid, häufig ein Adenin, an das 3'Ende des PCR-Produktes angefügt. Das verwendete Plasmid trägt an beiden 3'Enden ein ungepaartes Thymidin. An die Enden des Plasmidvektors ist außerdem das Enzym Topoisomerase I gebunden, dieses Enzym bewirkt eine spezifische Adenin-Thymidin-Bindung und damit die Verknüpfung von PCR-Produkt und Vektor.

Anschließend werden die Plasmide in kompetente *E. coli* (TOP 10) Bakterien transformiert. Zu einer Einheit *One Shot* Bakterien wurden 2 µl des Reaktionsansatzes gegeben und diese dann für 30 Minuten auf Eis gestellt. Es folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42° C, bevor die Zellen wieder auf Eis gestellt wurden. Danach wurden sie mit Flüssignährmedium (SOC-Medium) für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Die transformierten Bakterienzellen werden auf LB-Agar-Platten (\varnothing 10 cm, 50 µg Ampicillin/ml), welche mit 40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (DMF) ausgestrichen werden, gegeben und für ca. 12 Stunden bei 37° C inkubiert.

Eine Selektion der Zellen findet zum einen über die Ampicillin-Resistenz statt. Das verwendete Plasmid enthält ein Ampicillinresistenzgen. Bakterien, die das Plasmid

aufgenommen haben, sind gegenüber dem Antibiotikum unempfindlich und können auf der ampicillinhaltigen Agarplatte wachsen.

Zum anderen erfolgt die Selektion über die X-Gal Umwandlung. Durch die kurze DNA Sequenz Lac Z' im Vektor und das lacZ-Gen der Bakterien kommt es zur Ausbildung einer β -Galactosidase. Diese setzt das auf die Agarplatte ausgestrichene X-Gal in das blaue 5-Brom-4-Chloridigo um. Kolonien aber, welche ein Insert in der lacZ-Region tragen, können keine funktionsfähige β -Galactosidase bilden und bleiben weiß (Blau-Weiß-Test).

Ein Teil einer weißen Kolonie wurde mit einer sterilen Öse von der Agarplatte entnommen und auf 3 ml LB-Medium überimpft. Die Bakterien werden im Schüttler bei 37° C über Nacht inkubiert. Die Ernte der Zellen am nächsten Morgen erfolgte durch zentrifugieren für 10 min bei 3000 U/min. Die Plasmide wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) anhand des Protokolls des Herstellers gereinigt.

2.2.3.4 Kopienzahlberechnung und Erstellen einer Standardgeraden

Die Konzentration der Plasmidkopien wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) in einem Photometer und unter Berücksichtigung der Länge und Masse des Plasmids (Produkt + Vektor) errechnet. Die Berechnung ergibt sich wie folgt:

$$1. \text{ Molekülmasse (mol/l)} = \frac{\text{Konzentration gemäß OD (g/l)}}{\text{Plasmidlänge (bp)} \times 660 \text{ (g/mol)}^*}$$

$$2. \text{ Konzentration (Moleküle/l)} = \frac{\text{Molekülmasse (mol/l)}}{\text{Avogadro - Konstante}^{**}}$$

* durchschnittliche Molmasse eines Basenpaares ~ 660 (g/mol)

** Avogadro-Konstante = $6,02213670 \times 10^{23}$ /mol

Die Plasmidstammlösung mit bekannter Konzentration wurde anschließend in Zehnerschritten von 10^6 bis 10^1 in 5 μ l Aqua bidest verdünnt und eine Standardgerade erstellt (siehe 2.2.5).

2.2.4 Quantitative real-time PCR

Die in dieser Arbeit angewandte quantitative real-time PCR basiert technisch auf dem TaqMan-Format.

Die aus den Plasmaproben präparierten DNA Eluate wurden in der qPCR gemessen, wobei das Probenvolumen 5 μ l betrug. Eine Probe galt als positiv, wenn die

reproduzierbare Nachweisgrenze der verwendeten Assays von 10 Genomäquivalenten (ge) pro 5 µl erreicht wurde (entspricht 2.000 ge/ml Plasma). Die Virus-DNA kann über einen Bereich von 10^1 bis 10^6 ge/5 µl nachgewiesen werden.

Die Proben wurden in Doppelansätzen gemessen. Bei einem positiven Virus-Nachweis in einem oder in beiden Ansätzen wurde die Probe erneut in einem Doppelansatz gemessen.

Als Positivkontrolle wurden serielle Verdünnungen von 10^1 bis 10^5 der hergestellten Plasmide (siehe 2.2.3) in Doppelansätzen eingesetzt. Ein Doppelansatz ohne Probe diente als Negativkontrolle.

Die hier angewandten PCR-Assays wurden von Nitsche et al. etabliert [138, 139]. Es besteht keine Kreuzreaktivität der verwendeten Primer mit der DNA anderer Viren und humaner DNA, so dass nur die jeweils gewünschte Virus-DNA amplifiziert wird. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 2-5 aufgelistet.

Tabelle 2-5: Primer und Sonden für die qPCR der untersuchten Viren

Cytomegalievirus (CMV)		#M21295
Primer CM 3	5'-gCA CCA TCC TCC TCT TCC T-3'	3168-3151
Primer CM 5	5'-ggC CTC TgA TAA CCA AgC C-3'	2760-2742
Sonde TM CMV 2	5'-6-FAM-CCT CCT gAg CAC CC T(TAMRA) CCT CCT CTT CC-3'ph	3086-3061
Humanes Herpesvirus 6A (HHV-6A)		#L217559
Primer H6A-F	5'-CAT gAA gAT gAT gAC AAT AAA Atg-3'	1081-1104
Primer H6B-R	5'-Tgg AAC CAT CTT gTT CTg TCC-5'	1357-1337
Sonde H6-TM-A	5'-6-FAM-CCg CCC AgA T(TAMRA) CTg TCA CTg Agg CTg-3'ph	1241-1217
Humanes Herpesvirus 6B (HHV-6B)		#L21760
Primer H6B-F	5'-gAg ACC ggg TCT ggA CAA CA-3'	1459-1478
Primer H6B-R	5'-gAg TTg CTg AgT Tgg TAA Agg-3'	1600-1580
Sonde H6-TM-B	5'-6-FAM-CTC CAA gTg TAC CgA AAC gC T(TAMRA) TCC Tgg-3'ph	1548-1574

Angegeben sind die jeweilige Bezeichnung, die Sequenz, die zugehörige *genebank accession number* und die Genomlokalisierung.

Fam = Reporter-Farbstoff, TAMRA = Quencher-Farbstoff, ph = Phosphatgruppe.

Pro Reaktion werden 50 µl Mastermix und 5 µl Probe bzw. Plasmid eingesetzt, was einem Gesamtvolumen von 55 µl pro Reaktionsansatz entspricht. Der Reaktionsansatz wird in die Vertiefungen einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Um sicherzustellen, dass sich die Probe vollständig im Mastermix befindet, werden die verschlossenen 96-well-Mikrotiterplatten bei 3.000 U/min für 30 s zentrifugiert, bevor sie durch das ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, USA) gemessen werden.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die untersuchten Viren sind in Tabelle 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-6: Reaktionsansätze der qPCR-Assays für die untersuchten Viren

	CMV	HHV-6A	HHV-6B
Probe	5 µl	5 µl	5 µl
10x PCR Puffer	5 µl	5,5 µl	5,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl	4 µl	4 µl
MgCl ₂ (50 mM)	4 µl	3 µl	3 µl
TE (Tris EDTA)	0,3 µl	0,8 µl	0,8 µl
ROX (100 µM)	0,5 µl	0,47 µl	0,47 µl
Primer 1 (10 µM)	4 µl	4 µl	4 µl
Primer 2 (10 µM)	4 µl	2 µl	4 µl
Sonde (10 µM)	0,5 µl	1 µl	1 µl
Platinum Taq DNA Polymerase	0,25 µl	0,2 µl	0,2 µl
Aqua bidest ad	55 µl	55 µl	55 µl

Ein PCR Lauf im ABI Prism 7700 Sequence Detection System dauert etwa 90 Minuten. Er gliedert sich in einen initialen Schritt von 3 min bei 94° C zur Aktivierung der Platinum Taq Polymerase und zur Denaturierung der DNA. Danach folgen 45 Zyklen mit jeweils Denaturierung der DNA, Binden der Primer an die DNA (Annealing) und Verlängerung der Primer mit Nukleotiden (Extension).

Die Temperaturprofile für die verwendeten Assays sind in Tabelle 2-7 dargestellt.

Tabelle 2-7: Temperaturprofile für die qPCR Assays für die untersuchten Viren

CMV	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94° C	3 min	1
Denaturierung	94° C	10 s	45
Annealing / Extension	64° C	10 s	45
Extension	72° C	30 s	45
HHV-6A und -6B	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94° C	3 min	1
Denaturierung	94° C	20 s	45
Annealing / Extension	65° C	50 s	45

2.2.5 Standardgeraden

Vor dem Messen der Patientenproben wird die Quantifizierung der qPCR geeicht. Durch Erstellen einer Standardgeraden mit seriell verdünnten Plasmiden bekannter Konzentration kann anschließend die Konzentration unbekannter Proben errechnet werden.

Dazu wurden die klonierten Plasmide in Zehnerschritten von 10^6 bis 10^1 Genomäquivalenten in 5 μ l Aqua bidest verdünnt und jeweils dreifach in der qPCR gemessen. In der Amplifikationskurve ist der von der PCR gemessene Fluoreszenzverlauf über der Anzahl der Zyklen aufgetragen (siehe Abb. 2-1). Die aus den Amplifikationskurven automatisch ermittelten Schwellenzyklen (CT, engl. threshold cycle) werden über dem Logarithmus der enthaltenen Plasmidmenge aufgetragen (siehe Abb. 2-2) und durch eine Ausgleichsgerade, die Standardgerade, verbunden. Die Gleichung dieser Standardgeraden erhält man durch Berechnung einer linearen Regression. Durch Umformen der Gleichung ergibt sich eine direkte Beziehung zwischen dem gemessenen Schwellenzyklus in der qPCR und der Menge an vorhandener Virus-DNA (in Genomäquivalenten) in der Probe.

Exemplarisch sind in Abbildung 2-1 und 2-2 die Amplifikationskurven und die Standardgerade für HHV-6A dargestellt.

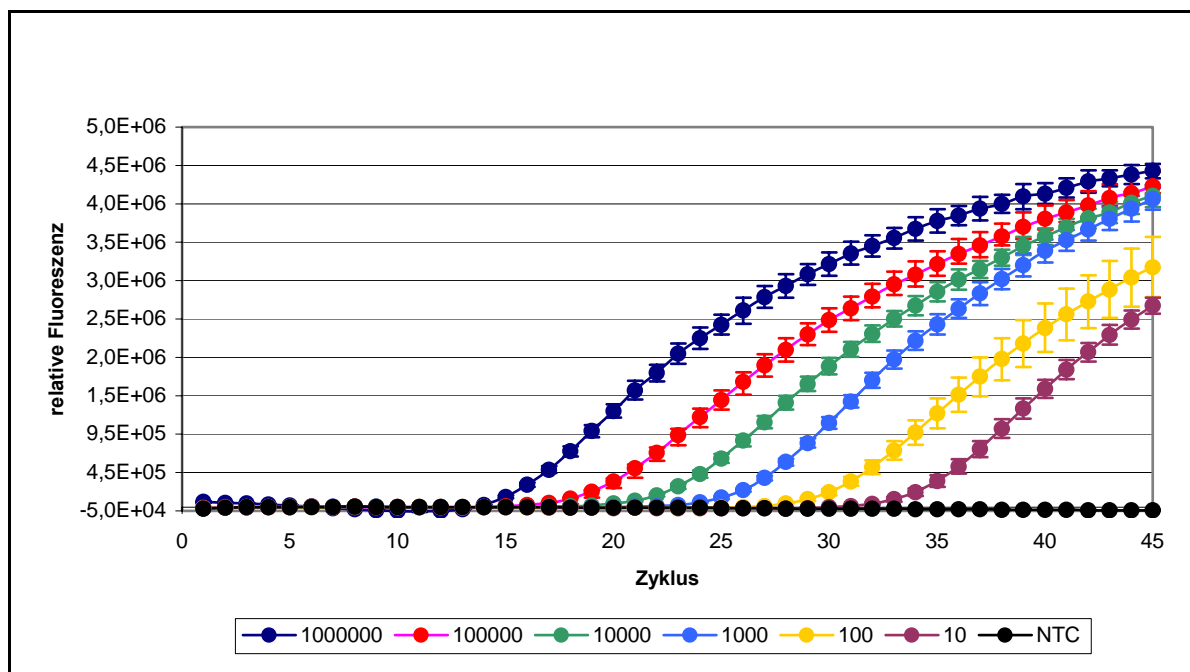


Abbildung 2-1: Amplifikationskurven der HHV-6A qPCR

Fluoreszenzverlauf der seriell verdünnte Plasmide.

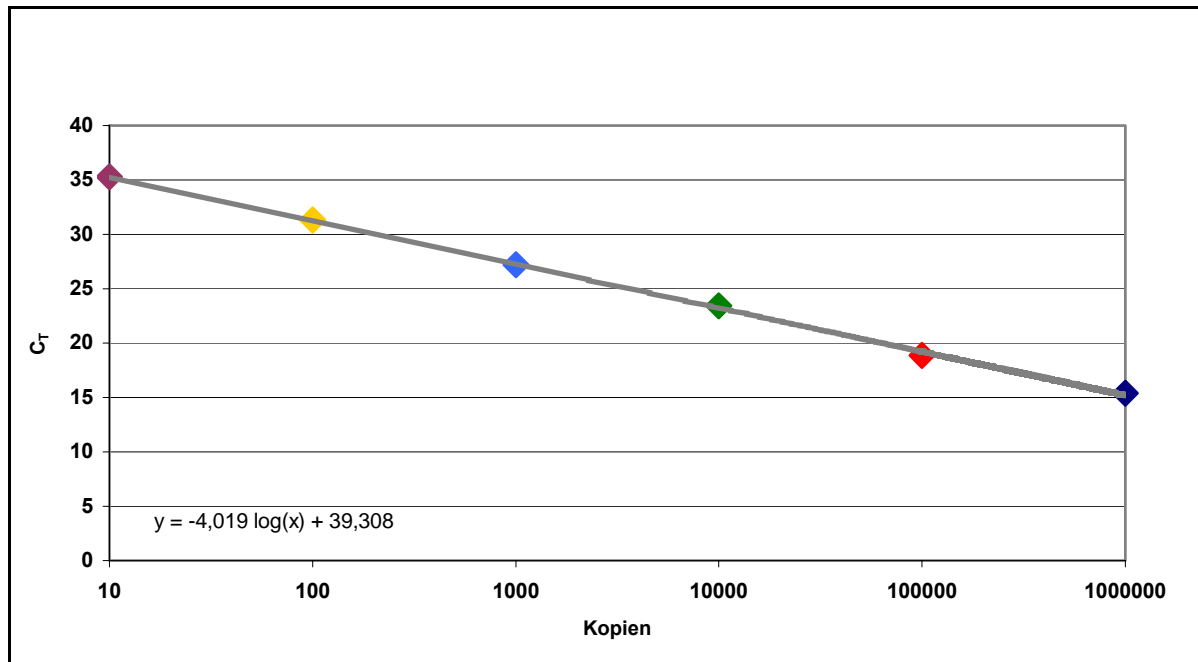


Abbildung 2-2: Standardgerade der HHV-6A qPCR

2.2.5.1 CMV

Die Korrelation zwischen dem Schwellenzyklus CT und der Anzahl der Genomäquivalente in der Probe weist einen Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,99$ auf. Die folgende Formel beschreibt die Berechnung der Genomäquivalente (ge) über eine Umformung der Geradengleichung:

$$ge = 10^{\left(\frac{C_T - 42,11}{-3,41}\right)}$$

2.2.5.2 HHV-6A und -6B

Der Korrelationskoeffizient für den HHV-6A Nachweis beträgt $r^2=0,99$, die Korrelation wird über folgende Gleichung beschrieben:

$$ge = 10^{\left(\frac{C_T - 39,31}{-4,02}\right)}$$

Für den HHV-6B Nachweis wird die Korrelation über folgende Gleichung mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,99$ beschrieben:

$$ge = 10^{\left(\frac{C_T - 38,24}{-3,61}\right)}$$

2.2.6 Antigenachweis (APAAP = Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)

Die Patienten des untersuchten Kollektivs wurden für ein Jahr nach der Transplantation prospektiv auf CMV Antigenämie untersucht. Der Antigenachweis wurde vom Routinelabor des Rudolph Virchow Klinikums durchgeführt. Es wurden $1-2 \times 10^5$ periphere Blutleukozyten (PBL) der zu untersuchenden Probe eingesetzt. Als Antikörper wurde HCMV mAb (Clonab, Biotest), ein monoklonaler Antikörper gegen das pp65 Antigen, verwendet [140]. Die Anzahl der antigenpositiven Zellen wurde auf 10000 PBL bezogen.

Tabelle 2-8 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Puffer für den Antigenachweis

Puffer A	FKS 10 ml, Bovine Serum Albumin 10 g, 1x PBS ad 100 ml
Blockierungspuffer	Magermilchpulver 5 g, NaN_3 0,1 g, TBS pH 7,6 ad 100 ml
Waschpuffer (20x)	Tris-Base 18 g, Tris-Cl 137 g, NaCl 175 g, 1M HCl ad pH 7,6, Aqua bidest ad 1000 ml
Färbelösung	Naphtol-AS-MX-Phosphat in 1 ml DMF 10 mg, Tris-Cl pH 8,2 49 ml, 1M Levamisol 100 μl , Fast Red 50 mg

2.2.7 Statistische Auswertung

Die klinischen Daten wurden in einen Fragebogen eingetragen und nachfolgend in eine Microsoft ACCESS 2000 Datenbank eingegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Deskriptive Daten wurden als Häufigkeiten, Prozentwerte, Median, Minimum und Maximum angegeben. Der Gruppenvergleich für kategoriale Variablen wurde anhand des Chi²-Tests und des Fisher-Exakt-Tests für kleine Fallzahlen durchgeführt. Unterschiede zwischen Patientengruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests für numerische Variablen errechnet.

Die Abschätzung der Wahrscheinlichkeiten für zeitabhängige Ereignisse wurde mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. Grundsätzlich wurden die Intervalle zwischen dem Tag der Transplantation und dem Datum des jeweiligen Ereignisses gemessen (Aufreten einer GvHD, Tag des neutrophilen oder thrombozytären Engraftments, erstmaliger Nachweis von CMV-Antigen oder Virus-DNA oder Tod). Als statistischer Test zum Gruppenvergleich wurde der Log Rank Test herangezogen. Patienten, bei denen das betreffende Ereignis nicht eintrat, wurden am Tag der letzten vorhandenen

Plasmaprobe, jedoch nicht später als Tag +365, zensiert.

Zur Errechnung des Einflusses verschiedener Variablen auf das Auftreten einer Virusreaktivierung oder des Engraftments der neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten wurde die uni- und multivariate Cox-Regression benutzt. Es wurden nur Risikofaktoren, welche bei mindestens 20 % der Patienten vorhanden waren, in die Analyse eingeschlossen. Faktoren mit einem p-Wert $< 0,05$ in der univariaten Analyse wurden in die multivariate Analyse einbezogen. Hierbei wurde der Einfluss einer aGvHD als zeitabhängige Variable getestet. Zur Untersuchung des hämatopoetischen Engraftments wurden Patienten, die vor dem Engraftment starben oder ein Rezidiv erlitten, an dem entsprechenden Tag zensiert.

2.3 Reagenzien und Materialien

Sofern keine andere Herkunft angegeben ist, stammen alle Chemikalien von Sigma, Deisenhofen, Deutschland. Die zur normalen Laboreinrichtung gehörenden Glas- und Plastikutensilien werden nicht gesondert aufgeführt.

Tabelle 2-9: Reagenzien und Materialien

Reagenzien	
Agarose	
Ampicillin	
Ethidiumbromid (10 mg/ml in Aqua bidest)	
Ethanol	Serva, Heidelberg
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)	
Puffer	
TAE-Puffer	Tris-Base 400 mM, Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 20 mM, Natriumacetat 200 mM, Essigsäure 296 mM (Serva, Heidelberg)
Gellade-Puffer	Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 2 mM, Glycerin 15 % (v/v), Bromphenolblau 0,1 % (w/v) (Serva, Heidelberg)
10x PCR Puffer, minus MgCl ₂	GIBCO, Rockville, USA
Nukleinsäuretechniken	
Carboxy-X-Rhodamin, ROX	Molecular Probes, Leiden, NL
dNTPs	Perkin Elmer, Weiterstadt, D
MgCl ₂ Lösung (50 mM)	GIBCO, Rockville, USA
Mineralöl	
alle Oligonukleotide für die PCR	TIB MOLBIOL, Berlin, D
Platinum Taq DNA Polymerase	GIBCO, Rockville, USA
Taq DNA Polymerase	GIBCO, Rockville, USA
Kits	
QiaAmp DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden, D
QIA prep miniprep system	Quiagen, Hilden, D
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, NL
Sonstiges	
LB-Agar	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 15 g/l Bacto-Agar und 10 g/l NaCl
SOC-Medium	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 1 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ /MgSO ₄ , 2 mM Glukose
Materialien	
MicroAmp-96-Well Reaction Plates	AB gene House, Surrey, UK
Optical Caps	AB gene House, Surrey, UK
Optical Tubes	AB gene House, Surrey, UK
PCR-Reaktionsgefäße	AB gene House, Surrey, UK

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von CMV und HHV-6A und -6B mittels quantitativer real-time PCR

3.1.1 Häufigkeit von CMV und HHV-6A und -6B

Von 82 Patienten, die zwischen Januar 1998 und März 2001 eine Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation erhielten, standen Plasmaproben zur Verfügung. Mittels einer quantitativen real-time PCR (qPCR) im TaqMan-Format wurden die Proben auf das Vorhandensein von CMV DNA und HHV-6 DNA untersucht. Pro Patient wurden im Median 15 Proben in der qPCR untersucht (Spanne 3 - 41).

3.1.1.1 Nachweis von CMV DNA

Es wurden 1222 Plasmaproben auf CMV DNA untersucht. In 163/1222 Plasmaproben (13 %) von 41 Patienten (50 %) konnte mit der quantitativen real-time PCR CMV DNA nachgewiesen werden.

3.1.1.2 Nachweis von HHV-6 DNA

1231 Plasmaproben wurden mittels der qPCR auf HHV-6A und -6B DNA untersucht. In 51/1231 Proben (4 %) von 24 Patienten (29,3 %) wurde HHV-6A DNA nachgewiesen. HHV-6B wurde in 62/1231 Plasmaproben (5 %) von 35 Patienten (42,7 %) gefunden.

3.1.1.3 Vergleich der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von CMV, HHV-6A und -6B

Die Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer der drei untersuchten Viren im ersten Jahr nach Knochenmarktransplantation im Plasma der untersuchten Patienten ist anhand einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (siehe Abb. 3-1). Es ist erkennbar, dass die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises von CMV DNA während des ersten Jahres nach Transplantation im Vergleich zu der Wahrscheinlichkeit eines HHV-6A DNA oder HHV-6B DNA Nachweises am höchsten ist. So beträgt die Wahrscheinlichkeit für einen CMV Nachweis bis zum Tag 200 nach Transplantation 52 % (95 % KI 40 % bis 64 %), für HHV-6A 32 % (95 % KI 21 % bis 43 %) und für HHV-6B 45 % (95 % KI 33 % bis 56 %).

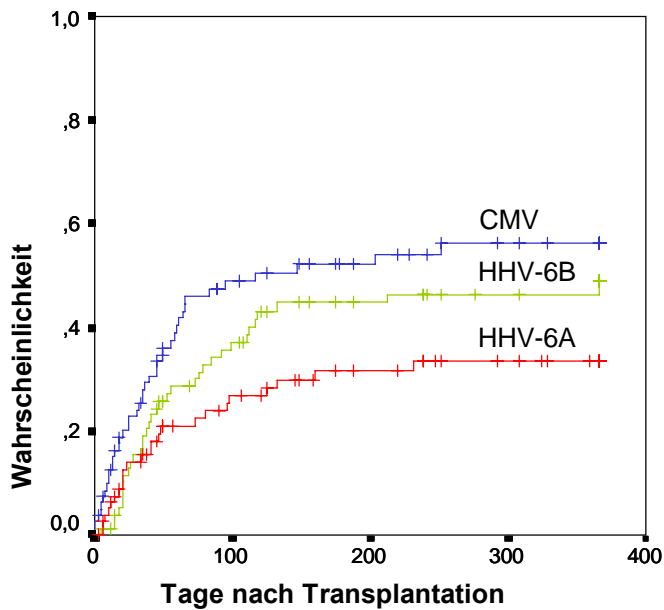


Abbildung 3-1: Wahrscheinlichkeit für einen Virusnachweis

Darstellung der Wahrscheinlichkeiten für einen Nachweis von CMV, HHV-6A oder HHV-6B DNA in den Proben der untersuchten Patienten im ersten Jahr nach Transplantation anhand einer Kaplan-Meier-Kurve.

3.1.2 Kinetik der Virus-DNA Nachweise

3.1.2.1 Vergleich der gemessenen maximalen DNA Lasten von CMV, HHV-6A und -6B
Mittels der qPCR wurde die Virus DNA Last der Plasmaproben bestimmt. Zum Vergleich der Virus DNA Last der drei gemessenen Viren wurde die maximale gemessene DNA Last pro Patient herangezogen.

Für die CMV positiven Patienten betrug der Median der maximalen DNA Lasten $7,5 \times 10^3$ ge/ml (Spanne 2×10^3 bis 5×10^5). Der Median der maximalen DNA Lasten der HHV-6A positiven Patienten lag bei $9,9 \times 10^4$ ge/ml (Spanne 2×10^3 bis $2,8 \times 10^7$) und für die HHV-6B positiven Patienten bei $9,8 \times 10^3$ ge/ml (Spanne $2,1 \times 10^3$ bis $1,5 \times 10^8$). Der Median der maximalen DNA Last der Patienten mit HHV-6A Reaktivierung ist signifikant höher als der von Patienten mit CMV Reaktivierung ($p=0,002$). Der Vergleich zwischen HHV-6A und HHV-6B zeigt eine höhere, statistisch jedoch nicht signifikante maximale DNA Last von HHV-6A ($p=0,077$). Der Unterschied zwischen CMV und HHV-6A ist nicht signifikant ($p=0,435$) (siehe Abb. 3-2).

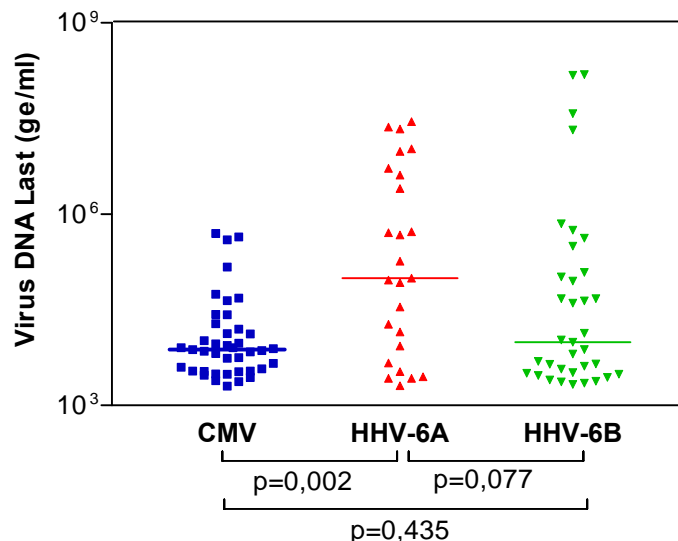


Abbildung 3-2: Vergleich der maximalen Virus DNA Last der untersuchten Viren

Vergleich der maximalen DNA Last von CMV, HHV-6A und HHV-6B der Patienten, welche einen positiven Virus DNA Nachweis durch die qPCR erfuhren. Darstellung der Mediane der maximalen DNA Last durch die horizontalen Balken: CMV $7,5 \times 10^3$ ge/ml; HHV-6A 10×10^4 ge/ml; HHV-6B $9,8 \times 10^3$ ge/ml.

3.1.2.2 Häufigkeit und DNA Last der Virusnachweise

Von 41 Patienten mit CMV DNA Nachweis waren 15 Patienten in nur einer Probe CMV positiv. 26/41 Patienten hatten zwei oder mehr CMV DNA positive Proben, diese Patienten hatten mit 9×10^3 ge/ml (Spanne 3×10^3 bis 5×10^5) eine signifikant höhere mediane CMV Maximallast als die Patienten mit nur einer positiven Probe ($3,4 \times 10^3$ ge/ml (Spanne 2×10^3 bis $2,7 \times 10^4$) ($p=0,002$).

In 18 von 24 HHV-6A positiven Patienten wurde nur in einer Probe das Virus nachgewiesen. 6/24 Patienten hatten zwei oder mehr HHV-6A DNA positive Proben. Die HHV-6A Last dieser Patienten war mit $1,5 \times 10^6$ ge/ml im Median (Spanne $1,8 \times 10^5$ bis $2,8 \times 10^7$) signifikant höher als die der Patienten mit nur einer HHV-6A positiven Probe (Median $5,9 \times 10^4$ ge/ml, Spanne 2×10^3 bis $2,1 \times 10^7$) ($p=0,033$). 27/35 Patienten waren nur in einer Probe HHV-6B positiv. 8 von 35 Patienten hatten zwei oder mehr HHV-6B DNA positive Proben, deren Last mit im Median $7,5 \times 10^4$ ge/ml (Spanne $4,4 \times 10^3$ bis $1,5 \times 10^8$) signifikant höher war als die Last der Patienten mit nur einer HHV-6A positiven Probe (Median $4,9 \times 10^3$ ge/ml, Spanne $2,1 \times 10^3$ bis $3,8 \times 10^7$) ($p=0,027$).

3.1.2.3 Dauer des Virusnachweises

Die Dauer des Virusnachweises wurde für solche Patienten berechnet, die an wenigstens zwei hintereinanderfolgenden Terminen, welche nicht länger als eine Woche auseinander lagen, einen positiven Virusnachweis hatten.

Für den CMV DNA Nachweis traf dies auf 20 Patienten zu, 3 davon durchliefen 2 Serien und ein Patient 3 Serien positiver CMV DNA Nachweise. Die mediane Dauer des Virusnachweises für CMV betrug 13 Tage (Spanne 5 bis 64 Tage).

HHV-6A DNA konnte bei 2 Patienten in Folge nachgewiesen werden, bei einem Patienten dauerte die Virämie 15 Tage. Der andere Patient durchlief 2 Serien des Virusnachweises, sie dauerten 8 und 6 Tage. 4 Patienten waren in Folge für HHV-6B DNA positiv, ein Patient 5 Tage, zwei Patienten 8 Tage und der vierte Patient 13 Tage (siehe Abb. 3-3).

Tabelle 3-1: Häufigkeit einer Virämiedauer >5 Tage für die untersuchten Viren

	Virämien mit einer Dauer >5 Tage (95 % Konfidenzintervall)
CMV	20/82 = 24 % (15 % bis 33 %)
HHV-6A	2/82 = 4 % (0 % bis 5 %)
HHV-6B	4/82 = 5 % (0 % bis 10 %)

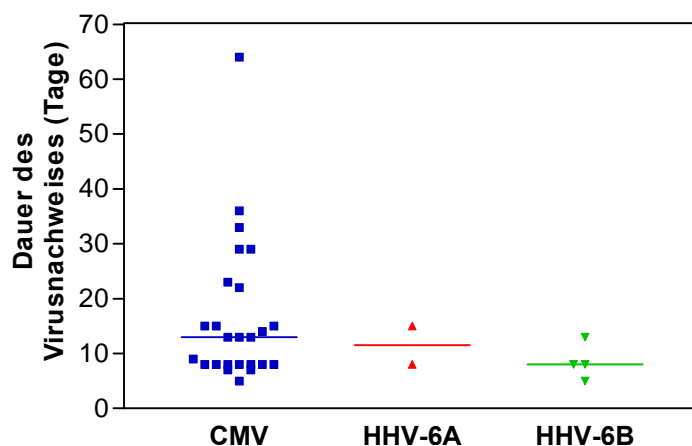


Abbildung 3-3: Dauer des Virusnachweises

Darstellung der Dauer des Virusnachweises für Patienten, welche an zwei hintereinanderfolgenden Terminen einen positiven Virus DNA Nachweis hatten. Die horizontalen Balken stellen die mediane Dauer des Virusnachweises für die einzelnen Viren dar, diese beträgt für CMV 13 Tage (Spanne 5 bis 64), für HHV-6A 8 Tage (Spanne 6 bis 15) und für HHV-6B 8 Tage (Spanne 5 bis 13).

3.1.2.4 Zeitpunkt der erstmaligen Virusnachweise

Bei Patienten mit CMV DNA Nachweis im Verlauf konnte das Virus im Median erstmalig an Tag 35 (Spanne 0 bis 252) nach der Transplantation nachgewiesen werden. Der

erste HHV-6A Nachweis konnte im Median an Tag 38 (Spanne 6 bis 232) beobachtet werden, für HHV-6B lag dieser am Tag 41 (Spanne 5 bis 426) nach der Übertragung des Knochenmarks bzw. der peripheren Blutstammzellen (siehe Abb. 3-4). Der Unterschied zwischen den Nachweiszeitpunkten der untersuchten Viren ist statistisch nicht signifikant.

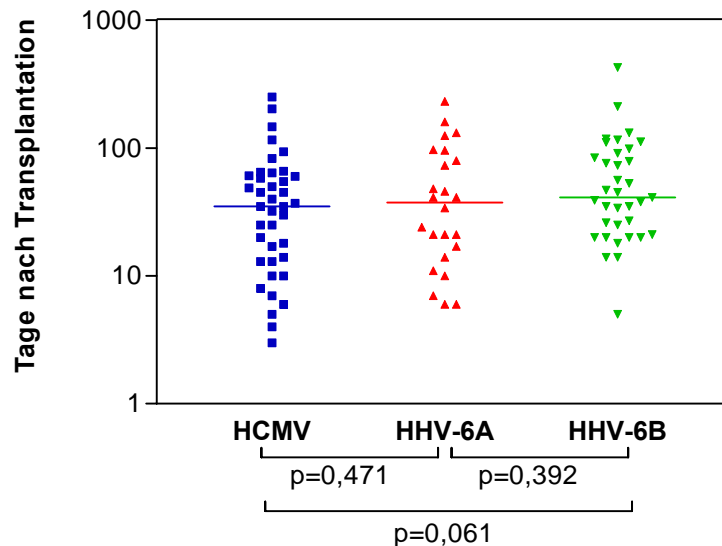


Abbildung 3-4: Erstmaliger Nachweis von Virus-DNA

Darstellung der Zeitpunkte des erstmaligen Nachweises von Virus-DNA in Plasmaproben der Patienten im Verlauf nach der Transplantation durch die qPCR. Die horizontalen Balken stellen den medianen Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises dar: CMV Tag 35, HHV-6A Tag 38 und HHV-6B Tag 41.

3.1.2.5 Interaktion verschiedener Herpesvirus-Infektionen

Von den 82 untersuchten Patienten reaktivierten insgesamt 41 Patienten CMV (50 %), 24 Patienten HHV-6A (29 %) und 35 HHV-6B (43 %). Als Reaktivierung wird in diesem Zusammenhang der einmalige Nachweis von Virus DNA definiert.

22 Patienten (27 %) reaktivierten keines der untersuchten Viren. Eine alleinige Reaktivierung von CMV während des untersuchten Zeitraumes fand sich in 14 Patienten (17 %), eine ausschließliche Reaktivierung von HHV-6A in 6 Patienten (7 %) und von HHV-6B in 9 Patienten (11 %). Eine Reaktivierung von CMV und HHV-6A konnte in dem Probenmaterial von 5 Patienten (6 %) nachgewiesen werden, CMV und HHV-6B wurde in 13 Patienten (16 %) gemessen. 4 der 82 Patienten (5 %) reaktivierten sowohl HHV-6A und HHV-6B und in den Plasmaproben von 9 Patienten (11 %) wurden im Verlauf alle drei Viren detektiert (siehe Abb. 3-5).

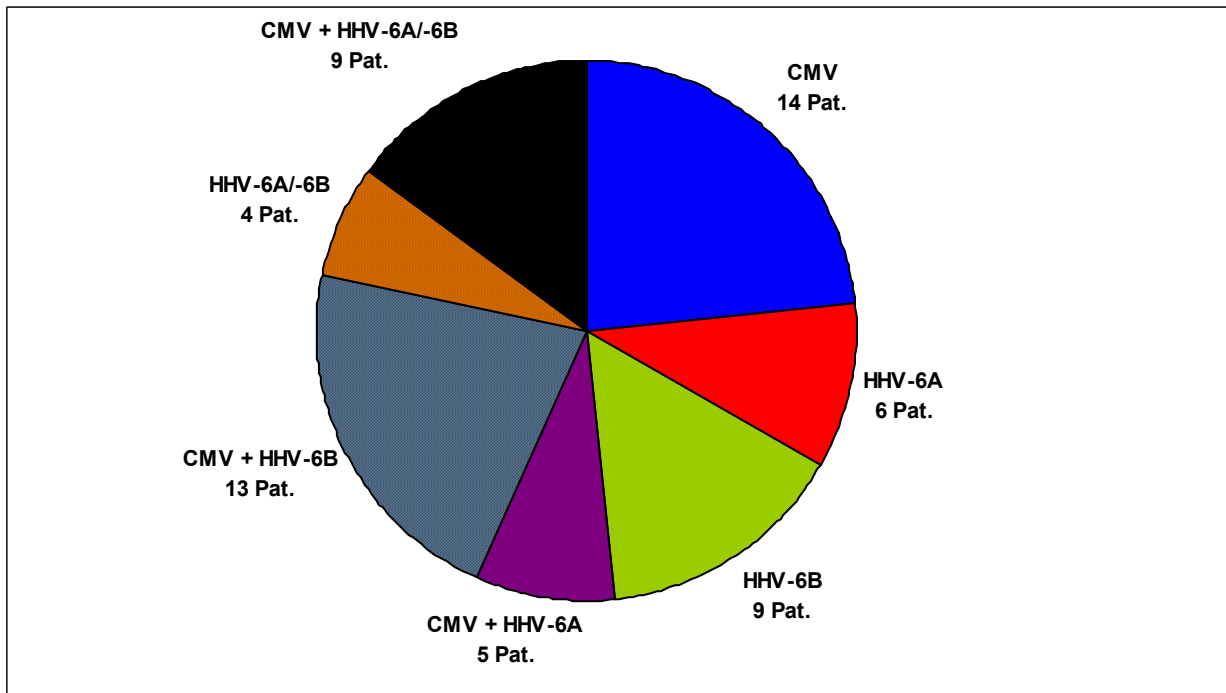


Abbildung 3-5: Anzahl der Patienten mit Virusnachweis

Darstellung der Anzahl von Patienten (Pat.), in deren Probenmaterial zu mindestens einem Zeitpunkt Virus DNA nachgewiesen werden konnte. 14 von 82 Patienten waren im Verlauf nur für CMV positiv, 6 Patienten nur für HHV-6A positiv und 9 Patienten nur für HHV-6B positiv. 5 Patienten waren für CMV und HHV-6A positiv, 13 für CMV und HHV-6B, 4 für HHV-6A und HHV-6B, und im Probenmaterial von 9 Patienten konnte während des beobachteten Zeitraumes DNA aller drei Viren nachgewiesen werden.

Es gibt die Beobachtung, dass Infektionen mit HHV-6 einer CMV-Infektion vorweglaufen können [63, 141]. Für Patienten mit CMV und HHV-6 Nachweis wurde deshalb die zeitliche Abfolge zwischen den ersten Nachweisen dieser Viren untersucht (siehe Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Zeitliche Abfolge des Virusnachweises

	Anzahl gesamt	erst CMV, dann HHV-6A (zeitl. Abstand in Tagen)	gleichzeitig	erst HHV-6A, dann CMV (zeitl. Abstand in Tagen)
CMV + HHV-6A	14 Patienten	7 Patienten (35 Tage (Spanne 16 - 77))	0 Patienten	7 Patienten (35 Tage (Spanne 7 - 167))
	Anzahl gesamt	erst CMV, dann HHV-6B (zeitl. Abstand in Tagen)	gleichzeitig	erst HHV-6B dann CMV (zeitl. Abstand in Tagen)
CMV + HHV-6B	22 Patienten	14 Patienten (41,5 Tage (Spanne 2 - 154))	1 Patient	7 Patienten (31 Tage (Spanne 2 - 77))

Vergleich der zeitlichen Abfolge des Auftretens eines erstmaligen Virusnachweises bei Patienten mit CMV und HHV-6 Nachweis

3.1.2.6 Klinik bei HHV-6 Virämien

Über die klinischen Auswirkungen von HHV-6 Virämien ist im Vergleich zu CMV Infektionen wenig bekannt, deshalb werden im folgenden die klinischen Korrelate der

Patienten mit zwei oder mehr HHV-6 DNA positiven Proben an hintereinanderfolgenden Terminen beschrieben. Für HHV-6A traf dies auf zwei Patienten zu, sie hatten Maximallasten von $4,7 \times 10^5$ ge/ml und $5,3 \times 10^5$ ge/ml. In beiden Patienten trat eine akute GvHD nach erstmaligem Nachweis von HHV-6A DNA auf. Einer der Patienten reaktivierte im Anschluss an die HHV-6A Serie mit CMV, der andere Patient erlitt einen Progress seiner Erkrankung.

Eine Serie von zwei oder mehr HHV-6B positiven Proben an hintereinanderfolgenden Terminen hatten vier Patienten. Bei einem dieser Patienten war dies mit Fieber unbekanntes Ursprungs assoziiert, und zwei Patienten erkrankten danach an einer schweren akuten GvHD. Der vierte Patient erlitt im Anschluss an die HHV-6B Serie eine Thrombozytopenie nach bereits erreichtem Engraftment der Thrombozyten.

3.1.3 Risikofaktoren für das Auftreten eines positiven Virus DNA Nachweises

Zur Feststellung der Risikofaktoren für das Auftreten eines positiven Nachweises von CMV, HHV-6A oder HHV-6B DNA wurde eine univariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt. In die Analyse wurden Faktoren einbezogen, welche für mindestens 20 % der Patienten zutreffen. So wurden die Art der Konditionierung (myeloablativ oder nonmyeloablativ), das Alter der Patienten, der Matchstatus (verwandter oder unverwandter Spender), die Art des Transplantats (Knochenmark oder periphere Blutstammzellen), die GvHD Prophylaxe (CSA allein oder CSA + MMF / MTX), der CMV Serostatus des Empfängers und das Auftreten einer akuten GvHD als zeitabhängige Variable eingeschlossen.

3.1.3.1 Risikofaktoren für das Auftreten eines CMV DNA Nachweises

Patienten, die entweder selbst oder deren Spender einen positiven CMV Serostatus haben, reaktivieren CMV häufig nach allogener Transplantation. Das trifft auf 49 Patienten zu, von denen 29 (59 %) CMV reaktiviert haben. Unter den 33 seronegativen Patienten mit seronegativem Spender ließ sich bei 12 Patienten (36 %) CMV nachweisen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,035$). In die weitere Analyse wurden deshalb nur die 49 Patienten mit einer serologischen Risikokonstellation für eine CMV Infektion einbezogen. Zusätzlich zu den oben genannten Faktoren wurde der Nachweis von HHV-6A oder -6B DNA einbezogen.

Tabelle 3-3: Univariate Analyse der Risikofaktoren für einen CMV DNA Nachweis

Risikofaktor	CMV DNA	
	Univariates RR (95 % KI)	Signifikanz p
Konditionierung, nonmyeloablativ vs. myeloablativ	1,24 (0,59 - 2,62)	0,571
Alter (10jahres Veränderung)	1,01 (0,98 - 1,05)	0,473
verwandter Spender vs. Fremdspender	1,79 (0,83 - 3,83)	0,136
KM vs. PBSZ	1,51 (0,68 - 3,36)	0,308
CSA mono vs. CSA + MMF / MTX	1,04 (0,44 - 2,45)	0,930
aGvHD II-IV° vs. 0-I°	1,93 (0,82 - 4,55)	0,132
Empfänger CMV IgG positiv vs. negativ	1,84 (0,64 - 5,32)	0,259
Nachweis von HHV-6A DNA	1,599 (0,759 - 3,366)	0,217
Nachweis von HHV-6B DNA	1,614 (0,754 - 3,458)	0,218

Univariate Analyse der Risikofaktoren für den Nachweis von CMV DNA für Patienten mit serologischer Risikokonstellation (Empfänger oder Spender CMV seropositiv) für eine CMV Infektion (49 Patienten). ATG = Antithymozytenglobulin, KM = Knochenmark, PBSZ = periphere Blutstammzellen, CSA = Ciclosporin A, MMF = Mycophenolatmofetil, MTX = Methotrexat, aGvHD = akute Graft versus Host Disease, RR = relatives Risiko, KI = Konfidenzintervall.

Mittels univariater Cox-Regression konnte keine der eingeschlossenen Variablen mit dem Auftreten von CMV DNA assoziiert werden.

Das Auftreten einer akuten GvHD konnte in der univariaten Cox-Regression nicht als Risikofaktor für einen CMV DNA Nachweis erkannt werden. Allerdings fällt auf, dass Patienten mit einer aGvHD eine signifikant höhere maximale CMV DNA Last aufwiesen (Median $8,1 \times 10^3$ ge/ml, Spanne 0 bis 5×10^5 ge/ml) als jene ohne aGvHD (Median 0 ge/ml, Spanne 0 bis $4,4 \times 10^4$) ($p=0,0018$), vergleiche Abbildung 3-6.

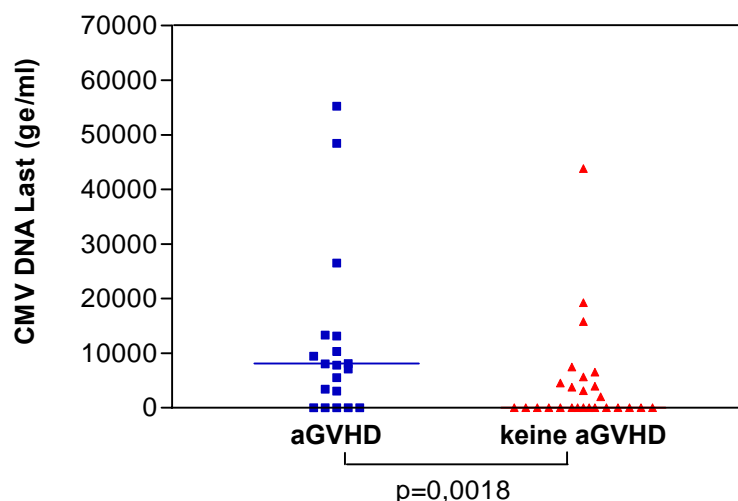


Abbildung 3-6: Vergleich der maximalen CMV DNA Last bei Patienten mit und ohne akuter GvHD

Vergleich der maximalen CMV DNA Last. Darstellung der Mediane der maximalen Last durch horizontale Balken: aGvHD $8,1 \times 10^3$ ge/ml; keine GvHD 0 ge/ml. Zur besseren Anschauung sind 4 Patienten mit aGvHD und einer maximalen CMV DNA Last $> 7 \times 10^4$ ge/ml nicht dargestellt.

Von den 82 untersuchten Patienten waren 41 im CMV DNA Nachweis positiv. Davon waren wiederum 20 Patienten an mindestens zwei hintereinanderfolgenden, in wöchentlichem Abstand gemessenen Terminen, CMV DNA positiv. Für den Nachweis von CMV DNA in Folge wurden dieselben Risikofaktoren wie für den einfachen CMV Nachweis untersucht (siehe Tabelle 3-4). In diese Analyse wurden ebenfalls nur die 49 Patienten mit der serologischen Risikokonstellation für eine CMV Infektion einbezogen. Unter diesen 49 Patienten konnte bei 19 (39 %) CMV in Folge nachgewiesen werden, bei den 33 seronegativen Patienten mit seronegativem Empfänger erfolgte ein CMV Nachweis in Folge bei einem Patienten (3 %) ($p=0,000$).

Tabelle 3-4: Univariate Analyse der Risikofaktoren für einen CMV DNA Nachweis in Folge

Risikofaktor	CMV DNA in Folge	
	Univariates RR (95 % KI)	Signifikanz p
Konditionierung, nonmyeloablativ vs. myeloablativ	0,76 (0,3 - 1,92)	0,557
Alter (10jahres Veränderung)	1,02 (0,98 - 1,06)	0,352
verwandter Spender vs. Fremdspender	1,73 (0,67 - 4,47)	0,260
KM vs. PBSZ	1,56 (0,58 - 4,17)	0,379
CSA mono vs. CSA + MMF / MTX	1,18 (0,42 - 3,32)	0,752
aGvHD II-IV° vs. 0-I°	4,78 (1,47 - 15,54)	0,009
Empfänger CMV IgG positiv vs. negativ	2,43 (0,56 - 10,58)	0,238
Nachweis von HHV-6A DNA	1,85 (0,73 - 4,68)	0,193
Nachweis von HHV-6B DNA	2,72 (0,97 - 7,66)	0,058

Univariate Analyse der Risikofaktoren für den Nachweis von CMV DNA an mindestens 2 hintereinanderfolgenden Terminen in wöchentlichem Abstand für Patienten mit serologischer Risikokonstellation (Empfänger oder Spender CMV seropositiv) für eine CMV Infektion (49 Patienten). ATG = Antithymozytenglobulin, KM = Knochenmark, PBSZ = periphere Blutstammzellen, CSA = Ciclosporin A, MMF = Mycophenolatmofetil, MTX = Methotrexat, aGvHD = akute Graft versus Host Disease, RR = relatives Risiko, KI = Konfidenzintervall.

Die univariate Cox-Regression assoziierte das Auftreten einer akuten GvHD mit dem Nachweis von CMV DNA in Folge ($p=0,009$). Der Nachweis von HHV-6B war mit $p=0,058$ nicht signifikant assoziiert. GvHD und der Nachweis von HHV-6B DNA wurden in eine multivariate Analyse eingeschlossen, dabei konnte das Auftreten einer GvHD als Risikofaktor bestätigt werden (RR 4,08; 95 % KI 1,27 bis 13,06; $p=0,018$)

3.1.3.2 Risikofaktoren für das Auftreten eines HHV-6 DNA Nachweises

In diese Analyse wurden alle 82 Patienten einbezogen. Zusätzlich zu den oben genannten Faktoren wurde außerdem der Nachweis von CMV DNA und der Nachweis einer Antigenämie eingeschlossen.

Tabelle 3-5: Univariate Analyse der Risikofaktoren für einen HHV-6A und -6B Nachweis (82 Patienten)

Risikofaktor	HHV-6A		HHV-6B	
	Univariates RR (95 % KI)	Signifikanz p	Univariates RR (95 % KI)	Signifikanz p
Konditionierung, nonmyeloablative vs. myeloablative	0,63 (0,28 - 1,41)	0,258	0,63 (0,32 - 1,22)	0,171
Alter (10-jährige Veränderung)	1,01 (0,97 - 1,04)	0,658	1,0 (0,97 - 1,03)	0,780
verwandter Spender vs. Fremdspender	1,28 (0,57 - 2,89)	0,550	0,90 (0,46 - 1,76)	0,765
KM vs. PBSZ	1,21 (0,50 - 2,92)	0,671	2,12 (1,05 - 4,28)	0,035
CSA mono vs. andere	0,85 (0,34 - 2,15)	0,738	1,15 (0,56 - 2,37)	0,706
aGvHD II-IV° vs. 0-I°	1,76 (0,67 - 4,63)	0,250	2,29 (1,08 - 4,86)	0,031
Empfänger CMV IgG positiv vs. negativ	1,30 (0,58 - 2,91)	0,522	2,03 (1,03 - 4,01)	0,041
Nachweis von CMV DNA	1,33 (0,59 - 2,99)	0,497	1,645 (0,825 - 3,280)	0,157
Antigenämie positiv	2,16 (0,95 - 4,9)	0,066	1,848 (0,916 - 3,729)	0,086

ATG = Antithyozytenglobulin, KM = Knochenmark, PBSZ = periphere Blutstammzellen, CSA = Ciclosporin A, MMF = Mycophenolatmofetil, MTX = Methotrexat, aGvHD = akute Graft versus Host Disease, RR = relatives Risiko, KI = Konfidenzintervall.

Die univariate Cox-Regression zur Ermittlung der Risikofaktoren für HHV-6A erkannte keinen der getesteten Variablen als HHV-6A assoziiert.

Die folgenden Faktoren konnten aufgrund der univariaten Cox-Regression mit dem Auftreten einer HHV-6B Infektion in Zusammenhang gebracht werden: die Art des Transplantats (KM bzw. PBSZ), das Auftreten einer akuten GvHD und ein positiver CMV Serostatus des Empfängers. Diese Faktoren wurden in die multivariate Analyse einbezogen. In dieser konnten ein positiver CMV Serostatus des Empfängers (RR 2,03; 95 % KI 1,02 bis 4,04; $p=0,045$) und eine akute GvHD (RR 2,36; 95 % KI 1,11 bis 4,99; $p=0,025$) als Risikofaktoren bestätigt werden.

3.2 CMV Infektionen nach dosisreduzierter und myeloablativer Konditionierung

3.2.1 Inzidenz der CMV Infektionen

Bei 26 von 45 Patienten (58%) mit dosisreduzierter Konditionierung und bei 15 von 37 Patienten (41%) mit myeloablativer Konditionierung konnte CMV DNA nachgewiesen werden ($p=0,120$). Mittels des Antigennachweises wurden 14/ 45 Patienten (31%) mit dosisreduzierter Konditionierung und 7/ 37 Patienten (19%) mit myeloablativer Konditionierung als CMV positiv erkannt ($p= 0,208$). Die Wahrscheinlichkeit eines CMV DNA Nachweises im ersten Jahr nach der Transplantation beträgt 65 % (95 % KI 49 %

bis 81 %) nach dosisreduzierter Konditionierung und 45 % (95 % KI 27 % bis 73 %) nach myeloablativer Konditionierung. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p=0,300$).

An einer CMV Organerkrankung erkrankten 3 von 45 Patienten mit dosisreduzierter Konditionierung an den Tagen 41, 65 und 80 nach Transplantation. In der myeloablativen Gruppe hatten 2 von 37 Patienten eine Organerkrankung, welche an den Tagen 60 und 156 nach Transplantation diagnostiziert wurde ($p=0,978$).

3.2.2 Kinetik des CMV Nachweises

CMV DNA konnte nach dosisreduzierter Konditionierung im Median erstmalig nach 36 Tagen (Spanne 0 bis 252 Tage) nachgewiesen werden und nach myeloablativer Konditionierung im Median nach 25 Tagen (Spanne 0 bis 65 Tage) ($p=0,261$).

Die mediane maximale DNA Last in der Gruppe mit dosisreduzierter Konditionierung betrug $7,2 \times 10^3$ ge/ml (Spanne $2,4 \times 10^3$ bis 5×10^5) und in der Gruppe mit myeloablativer Konditionierung $8,1 \times 10^3$ ge/ml (Spanne 2×10^3 bis $1,5 \times 10^5$) ($p=0,499$).

3.2.3 Überlebensanalyse

Ein Jahr nach der SZT lebten 38 Patienten. 44 Patienten waren gestorben. 17 Patienten starben an einem Fortschreiten ihrer Erkrankung und 27 Patienten an Therapie-assoziierten Komplikationen. Die Wahrscheinlichkeit der Therapie-assoziierten Mortalität am Tag 100 und 1 Jahr nach Transplantation betrug 5 % und 31 % nach dosisreduzierter Konditionierung im Vergleich zu 30 % und 44 % nach myeloablativer Konditionierung ($p=0,002$ und $p=0,134$), vergleiche Abbildung 3-7. Je ein Patient in den beiden Konditionierungsgruppen erlag einer CMV Organerkrankung, die anderen Patienten starben an septischen Komplikationen, häufig im Zusammenhang mit einer GvHD. Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko für eine CMV Infektion (Spender, Empfänger oder beide CMV seropositiv) wiesen keine erhöhte Therapie-assoziierte Mortalität am Tag 100 auf. Der Nachweis einer CMV Antigenämie war jedoch ein signifikanter Vorhersagewert der Therapie-assoziierten Mortalität am Tag 100 nach myeloablativer Konditionierung (RR 8,4; 95 % KI 2 bis 34; $p=0,003$), jedoch nicht nach dosisreduzierter Konditionierung.

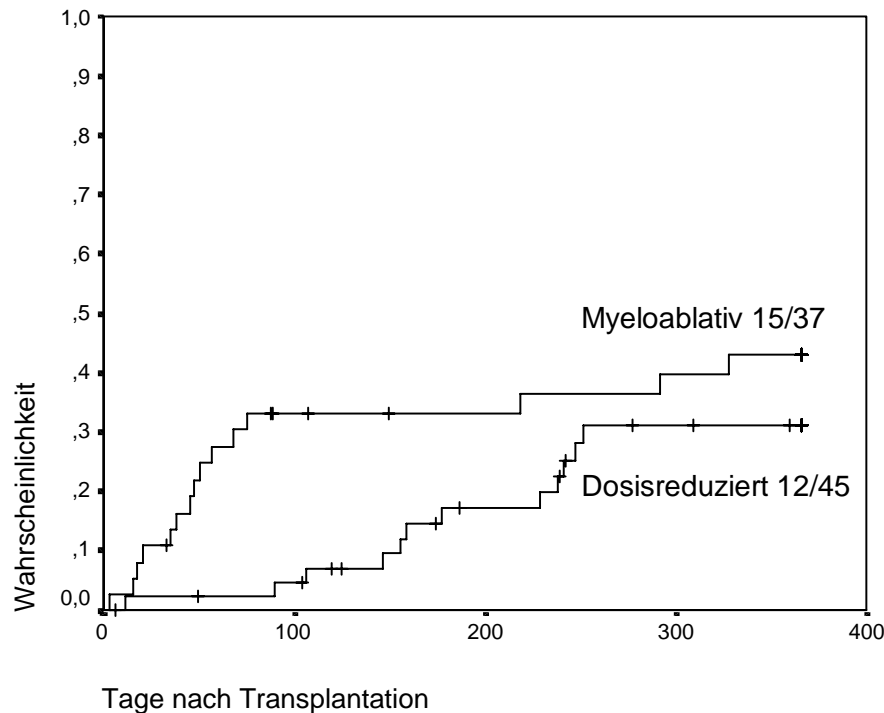


Abbildung 3-7: Konditionierung und Therapie-assoziierte Mortalität

Darstellung der Therapie-assoziierten Mortalität nach dosisreduzierter Konditionierung im Vergleich zu myeloablativer Konditionierung. Am Tag 100 nach Transplantation betrug diese 5 % vs. 31 % ($p=0,002$) und nach einem Jahr 30 % vs. 44% ($p=0,134$).

3.3 Einfluss von HHV-6 auf das hämatologische Engraftment und die GvHD

3.3.1 Frühe HHV-6 Infektionen und ihr Einfluss auf das hämatologische Engraftment

Um den potentiellen Einfluss einer HHV-6 Infektion auf das hämatologische Engraftment zu untersuchen, wurden die Zeiten bis zum Engraftment der neutrophilen Granulozyten und der Thrombozyten für Patienten mit einem HHV-6 Nachweis vor Tag +28 nach Transplantation (frühe Infektion) mit den entsprechenden Zeiten der Patienten mit später (nach Tag +28) oder ohne HHV-6 Infektion verglichen. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da nach Knochenmarktransplantation ein ausbleibendes Engraftment bis Tag 28 als primäres Transplantatversagen gilt.

Als neutrophiles und thrombozytäres Engraftment wurde der erste von drei hintereinanderfolgenden Tagen nach Transplantation mit unsubstituierten Thrombozytenzahlen $>20 \times 10^9/l$ oder einer Anzahl von neutrophilen Granulozyten $>0,5 \times 10^9/l$ definiert.

Eine frühe HHV-6A Infektion trat bei 11 Patienten und eine frühe HHV-6B Infektion bei 12 Patienten auf.

Die Regeneration der neutrophilen Granulozyten wurde im Median an Tag 15 (Spanne 0 bis 33 Tage) erreicht. Sechs Patienten starben vor dem Engraftment der Neutrophilen. In der univariaten Cox-Regression konnte weder eine HHV-6A ($p=0,451$) noch eine HHV-6B ($p=0,351$) Infektion mit der Zeit bis zur Regeneration der neutrophilen Granulozyten in Zusammenhang gebracht werden.

Die Regeneration der Thrombozyten dauerte im Median 16 Tage (Spanne 0 bis 91 Tage). Zehn Patienten starben vor dem thrombozytären Engraftment. Eine frühe HHV-6A Infektion konnte in der univariaten Cox-Regression nicht mit einem verzögerten Engraftment assoziiert werden ($p=0,999$). Eine frühe HHV-6B Infektion hingegen erhöhte das Risiko eines verzögerten thrombozytären Engraftments ($p=0,006$). Patienten mit einer HHV-6B Infektion vor Tag +28 regenerierten mit den Thrombozyten im Median an Tag 29, wohingegen Patienten ohne frühe HHV-6B Infektion ein Engraftment der Thrombozyten nach 15 Tagen zeigten (siehe Abb. 3-8).

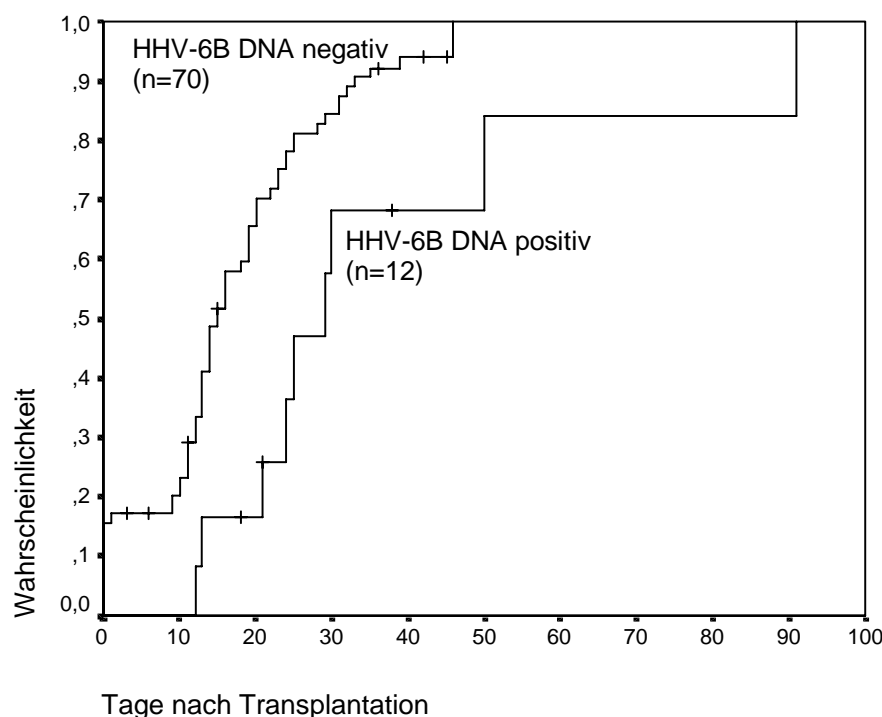


Abbildung 3-8: Einfluss von frühen HHV-6B Infektionen auf das Engraftment der Thrombozyten

Darstellung des Einflusses von frühen HHV-6B Infektionen auf des thrombozytäre Engraftment. Patienten mit einer frühen HHV-6B Infektion regenerieren mit den Thrombozyten im Median 14 Tage nach Patienten ohne frühe HHV-6B Infektion.

Um einen Einfluss nicht balancierter Risikofaktoren für ein verzögertes Engraftment der Thrombozyten auszuschließen, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt. Eingeschlossen wurden die in der univariaten Analyse signifikanten Faktoren, eine

frühe HHV-6B Infektion, die Art des Transplantats und die Konditionierung (siehe Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Risikofaktoren für ein verzögertes Engraftment der Thrombozyten

Risikofaktor	univariate Analyse		multivariate Analyse	
	RR (95 % KI)	Signifikanz p	RR (95 % KI)	Signifikanz p
frühe HHV-6A Infektion	1,0 (0,5 - 1,9)	0,999		
frühe HHV-6B Infektion	2,8 (1,3 - 6,3)	0,010	2,6 (1,2 - 5,9)	0,019
KM vs. PBSZ	0,5 (0,3 - 0,8)	0,008	0,5 (0,3 - 1,0)	0,046
Konditionierung, nonmyeloablativ vs. myeloablativ	0,6 (0,3 - 0,9)	0,015	0,7 (0,4 - 1,1)	0,094
aGvHD II-IV° vs. 0-I°	0,7 (0,3 - 1,3)	0,246		

3.3.1.1 Klinischer Verlauf von Patienten mit früher HHV-6B Infektion

Im Probenmaterial der 12 Patienten mit einer frühen HHV-6B Infektion ließ sich HHV-6B DNA im Median erstmalig an Tag 20 nach Transplantation (Spanne 5 bis 27 Tage) nachweisen. Die Basisdaten und der klinische Verlauf dieser Patienten sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tabelle 3-7: Basisdaten und klinischer Verlauf der Patienten mit einer frühen HHV-6B Infektion

UPN	Spender	Konditionierung / GvHD Prophylaxe	Transplantat	Erster HHV-6B Nachweis [Tage nach Tx]	max. HHV-6B DNA Last [ge/ml]	Beginn aGvHD [Tage nach Tx]	neutrophile Granulozyten $>0.5 \times 10^9/l$ [Tage nach Tx]	Thrombozyten $>20 \times 10^9/l$ [Tage nach Tx]	Klinischer Verlauf
551	FS MM	DR + ATG / CSA	KM	20	2586	18	25	91	anhaltende Thrombopenie $< 50/nl$, gleichzeitig wiederholte CMV Infektionen ab Tag +57, lebt
728	SIB	DR + ATG / CSA	PBSZ	20	2136	19	25	50	chronische GvHD der Leber und Haut, anhaltende Thrombopenie $< 50/nl$, invasive Aspergillose der Lunge, tödliche Lungenblutung, Tag 229†
738	FS	HD + ATG / CSA + MTX	KM	26	40400	NA	20	30	früher Beginn einer Leber-/ Lungentoxizität, schwere VOD, Tod durch Multiorganversagen, Tag 35†
755	FS	HD + ATG / CSA + MTX	KM	18	6363	NA	23	24	keine Besonderheiten, Tod durch Rückfall, Tag 510†
761	SIB	HD / CSA + MTX	PBSZ	25	3214	12	20	38+	kein thrombozytäres Engraftment, septisches Multiorganversagen mit unbekannter infektiöser Ursache, Tag 38†
765	SIB	HD / CSA + MTX	PBSZ	27	4,44E+06	9	11	25	anhaltende Thrombopenie $< 50/nl$ ab Tag 32, HHV-6B DNA pos. Tage 27 + 34; Tod durch Rückfall, Tag 89†
771	SIB	HD / CSA + MTX	PBSZ	14	3729	NA	18	18+	kein thrombozytäres Engraftment, vermutete toxische Enzephalopathie; intrakranielle Blutung und septisches Multiorganversagen, Tag 18†
779	FAM	HD / CSA + MTX	PBSZ	20	3,16E+05	18	19	13	keine Besonderheiten
780	SIB	HD / CSA + MTX	PBSZ	21	4916	16	21+	21+	kein primäres Engraftment bis Tag 21, septisches Multiorganversagen mit unbekannter infektiöser Ursache, Tag 21†
810	FS	HD + ATG / CSA + MTX	KM	20	3,77E+07	26	23	29	sek. Transplantatversagen mit persistierender Panzytopenie unbekannter Ätiologie, septisches Multiorganversagen Tag 219†
845	SIB	HD / CSA + MTX	PBSZ	5	4422	63	15	12	neutropenes Antibiotika-refraktäres Fieber unklarer Ursache während HHV-6B Virämie, lebt
848	FS	DR + ATG / CSA + MMF	KM	14	2670	NA	30	21	sek. Transplantatversagen nach CMV Infektion an Tag 56, septisches Multiorganversagen, Tag 105†

FS = Fremdspender; MM = Mismatch; SIB = HLA-identisches Geschwister; FAM = verwandter Spender; DR = Dosis reduzierte Konditionierung; HD = Hochdosis-Konditionierung; ATG = Antithymozytenglobulin; PBSZ = periphere Blutstammzellen; KM = Knochenmark; NA = nicht anwendbar, keine GvHD im Follow-up; + bedeutet, dass diese Patienten bis zu ihrem Tod transfusionsbedürftig waren.

Drei Patienten starben an septischem Multiorganversagen, wobei die infektiöse Ursache unbekannt blieb. Zwei Patienten starben an Blutungskomplikationen während einer andauernden Thrombozytopenie und zwei Patienten erlitten ein sekundäres Transplantatversagen. Die behandlungsassoziierte Mortalität für Patienten mit einer frühen HHV-6B Infektion ist erhöht. Die Wahrscheinlichkeit einer behandlungsassoziierten Mortalität im ersten Jahr nach Transplantation beträgt für Patienten mit früher HHV-6B Infektion 62 % (95 % KI 32 % bis 92 %) und 32 % (95 % KI 20 % bis 44 %) für Patienten ohne HHV-6B Nachweis vor Tag +28 ($p=0,0184$) (siehe Abb. 3-9).

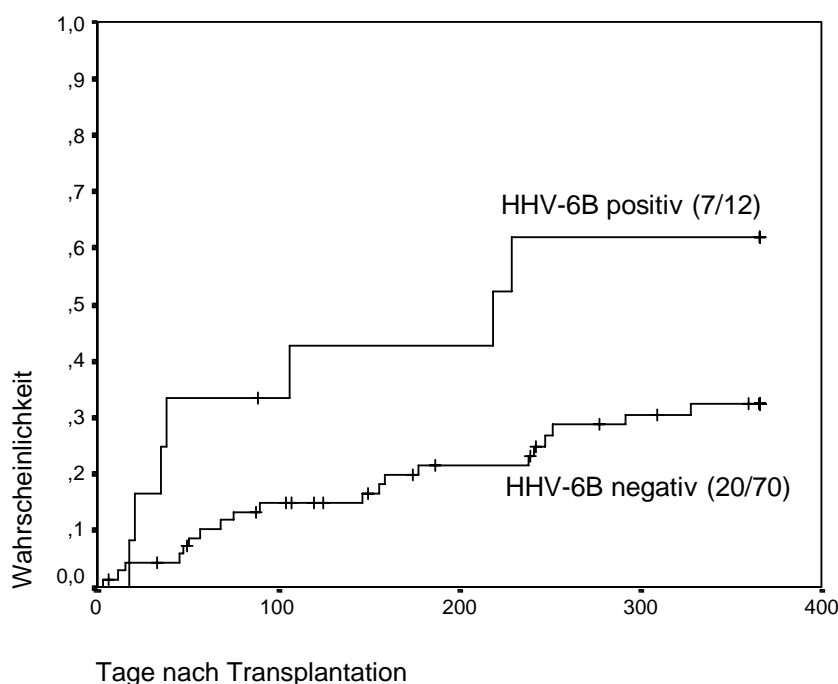


Abbildung 3-9: Frühe HHV-6B Infektionen und behandlungsassoziierte Mortalität

Darstellung der Wahrscheinlichkeit einer behandlungsassoziierten Mortalität bei Patienten mit und ohne früher HHV-6B Infektion.

3.3.2 GvHD als Risikofaktor für das Auftreten einer HHV-6 Infektion

Eine akute GvHD II-IV° trat in 46 von 82 Patienten (56 %) im Median nach 20,5 Tagen (Spanne 9 bis 88 Tage) auf. In der Risikofaktorenanalyse für HHV-6A und -6B unter 3.1.3.2 konnte die aGvHD als Risikofaktor für eine HHV-6B Infektion identifiziert werden ($p=0,031$). Bestätigt wurde dies durch die multivariate Cox-Regression ($p=0,025$; RR 2,36; 95 % KI 1,11 bis 4,99).

Da nicht bekannt ist, ob eine HHV-6B Infektion eine akute GvHD auslöst oder umgekehrt, wurde die Reihenfolge des Auftretens für alle Patienten mit GvHD Grad II-IV

und HHV-6B Nachweis untersucht. Bei 27 Patienten trat sowohl eine akute GvHD als auch eine HHV-6B Infektion auf. Von diesen hatten 23 Patienten vor dem ersten HHV-6B Nachweis eine GvHD und vier zuerst eine HHV-6B Infektion (Vorzeichentest $p=0,001$).

3.4 Vergleich der quantitativen real-time PCR mit dem Antigennachweis

In diesem Teil werden zwei Methoden für den Nachweis von CMV verglichen: die quantitative real-time PCR (qPCR) mit dem im klinischen Bereich als Standardmethode verwendeten Antigennachweis.

In diesen Vergleich wurden 1122 Proben eingeschlossen. Nicht eingeschlossen werden konnten solche Proben, die nur für den Nachweis einer der beiden Methoden zur Verfügung standen. Dies traf aufgrund einer zu geringen Anzahl von Leukozyten in den Blutproben auf 100 Proben für den Antigennachweis zu.

3.4.1 Häufigkeit und Kinetik der CMV Infektionen durch Nachweis mittels qPCR und Antigenämie

3.4.1.1 Nachweis von CMV

Die Ergebnisse beider Methoden, der qPCR und des Antigennachweises, ergaben einen positiven CMV Nachweis für 19/82 Patienten (23 %).

22/82 Patienten (27 %) waren CMV DNA positiv, hatten jedoch keine Antigenämie. Umgekehrt waren 2/82 Patienten (2 %) Antigenämie positiv, aber CMV DNA negativ. CMV DNA konnte in insgesamt 41/82 Patienten (50 %), eine Antigenämie in 21/82 Patienten (26 %) nachgewiesen werden. Die qPCR erkannte also zusätzliche 22 Patienten als CMV positiv, dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,000$).

Tabelle 3-8: Nachweis von CMV im Probenmaterial der untersuchten Patienten

Nachweis von CMV DNA in der qPCR bzw. Antigennachweis in der APAAP

	Nachweis von CMV DNA			
		ja	nein	
Antigenämie-nachweis	ja	19 (23 %)	2 (2 %)	21 (26 %)
	nein	22 (27 %)	39 (48 %)	61 (74 %)
		41 (50 %)	41 (50 %)	

Von den 41 Patienten (50 %) mit CMV DNA Nachweis wurde bei 20 Patienten (24 %) CMV DNA an mindestens zwei hintereinanderfolgenden Terminen in wöchentlichem

Abstand gemessen (siehe Tabelle 3-9). Vier der 20 in Folge CMV DNA positiven Patienten waren nicht im Antigennachweis positiv.

Tabelle 3-9: Nachweis von CMV im Probenmaterial der untersuchten Patienten

Nachweis von CMV DNA und antigenpositiven Zellen an mindestens zwei hintereinanderfolgenden Terminen.

	Nachweis von CMV DNA in Folge			
		ja	nein	
Antigenämie-nachweis	ja	16 (20 %)	5 (6 %)	21 (26 %)
	nein	4 (5 %)	57 (70 %)	61 (74 %)
		20 (24 %)	62 (76 %)	

3.4.1.2 Zeitpunkt des erstmaligen Virusnachweises

Bei Patienten mit CMV Nachweis im Verlauf konnte CMV DNA erstmalig mittels der qPCR im Median an Tag 35 (Spanne 0 bis 252), die Antigenämie erstmalig im Median an Tag 49 (Spanne 6 bis 75) nach Transplantation nachgewiesen werden (siehe Abb.3-10). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,000$). Auch in der Gruppe der Antigen-positiven Patienten lässt sich CMV DNA im Median vor der Antigenämie nachweisen (nach 35 Tagen (Spanne 0 bis 94)).

Der Vergleich, welche der beiden Methoden in dem Probenmaterial des einzelnen Patienten als erstes eine Reaktivierung nachweist, zeigt, dass die qPCR in 32/82 Patienten (39 %) zuerst CMV nachweist, wohingegen der Antigennachweis in 9/82 Patienten (11 %) den früheren Nachweis erbringt ($p=0,000$).

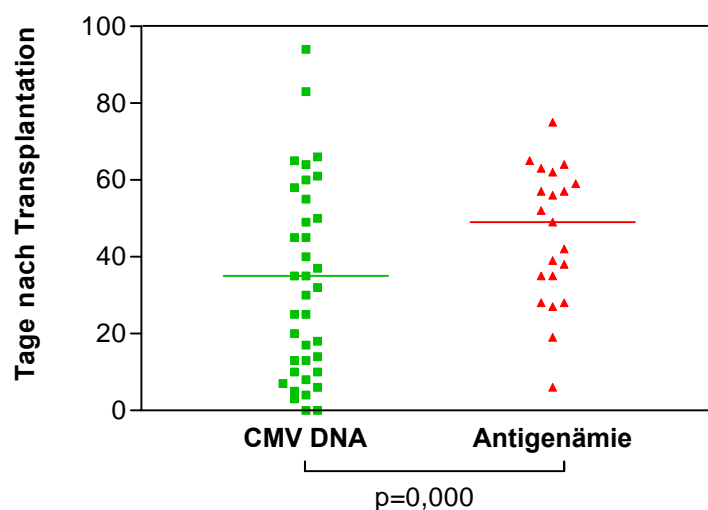


Abbildung 3-10: Erstmaliger Virusnachweis

Darstellung der Zeitpunkte des erstmaligen Virusnachweises in CMV DNA Nachweis und Antigennachweis in Tagen nach Transplantation. Die horizontalen Balken stellen den medianen Zeitpunkt

des erstmaligen Nachweises dar: CMV DNA Tag 35 und Antigenämie Tag 49.

3.4.2 Korrelation der Ergebnisse des CMV DNA Nachweises durch die qPCR und den Antigennachweis mittels APAAP

3.4.2.1 Korrelation der Maximalwerte beider Methoden

Die maximale Last und die maximale Anzahl der antigenpositiven Zellen der Patienten, die in wenigstens einer der beiden Methoden CMV positiv waren (n=43), wurden verglichen (siehe Abb. 3-11). Die Korrelation dieser beiden Werte ist gering, der Spearman Rangkorrelationskoeffizient beträgt 0,387.

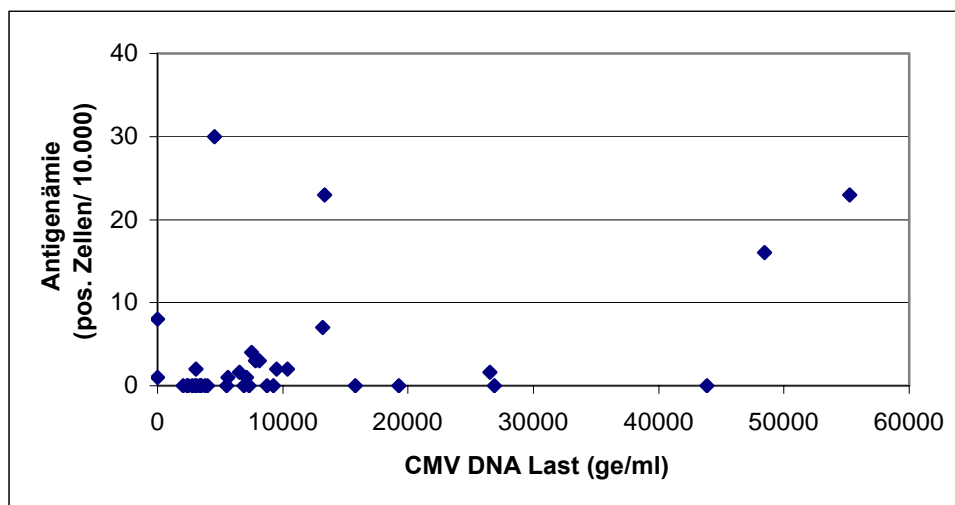


Abbildung 3-11: Korrelation der CMV DNA Last mit der Anzahl antigenpositiver Zellen

Streudiagramm mit Darstellung der Maximallast der qPCR und der maximalen Anzahl positiver Zellen im Antigennachweis für Patienten, die in wenigstens einem der Nachweise CMV positiv waren (n=43). Zur besseren Anschauung wurde die Skalierung der Achsen so gewählt, dass 4 Patienten mit hoher maximaler Last bzw. großer Anzahl antigenpositiver Zellen nicht in der Abbildung dargestellt sind.

3.4.2.2 Korrelation der beiden Methoden durch Gruppierung der Ergebnisse des Antigennachweises

Klinisch wird bei einem Nachweis von mindestens 1/10.000 CMV-Antigen positiver Zellen und der Reproduzierbarkeit am folgenden Tag von einer CMV Infektion ausgegangen und eine antivirale Therapie begonnen. Antigenämiewerte bis 10 positive Zellen/10.000 stellen eine mittlere virale Belastung dar, Werte bis 200 positive Zellen/10.000 eine hohe.

Daher erschien die Aufteilung der Ergebnisse des Antigennachweises in folgende drei Gruppen sinnvoll: 0 positive Zellen/10.000, 1 bis 10 positive Zellen/10.000 und 11 bis 200 positive Zellen/10.000.

Es zeigt sich dabei, dass steigende Werte im Antigennachweis mit steigenden Viruslasten einhergehen. So haben Proben ohne CMV-Antigen Nachweis, aber mit

CMV DNA Nachweis, im Median eine DNA Last von $4,1 \times 10^3$ ge/ml (Spanne 2×10^3 bis $4,4 \times 10^5$), solche mit 1 bis 10 positiven Zellen haben eine mediane DNA Last von $6,9 \times 10^3$ ge/ml (Spanne $2,6 \times 10^3$ bis 4×10^5). Und Proben mit 11 bis 200 Antigen-positiven Zellen weisen eine DNA Last von $1,8 \times 10^4$ ge/ml (Spanne 3×10^3 bis 5×10^5) auf (siehe Abb. 3-12).

Die Viruslast der entsprechenden Antigenämie-Gruppen sind statistisch signifikant voneinander verschieden.

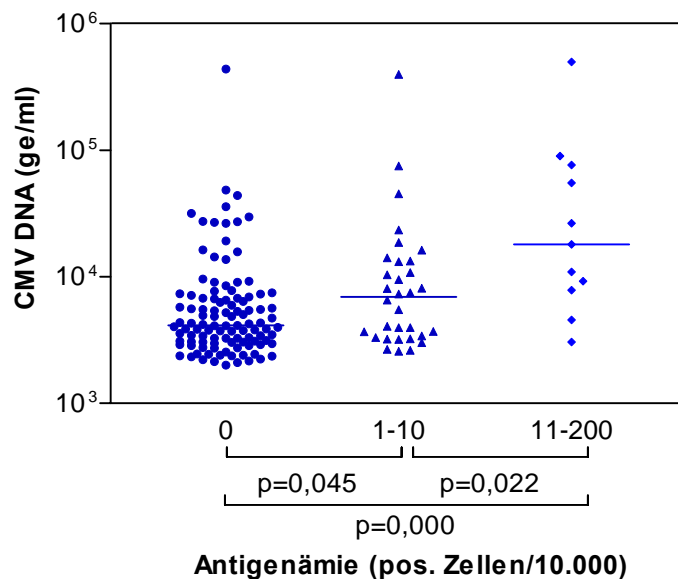


Abbildung 3-12: CMV DNA Last bei Gruppierung der Ergebnisse des Antigennachweises

Gruppierung der Ergebnisse des Antigennachweises und Darstellung der entsprechenden Last des CMV DNA Nachweises. Darstellung der Mediane durch horizontale Balken: 0 positive Zellen/10.000: $4,1 \times 10^3$ ge/ml; 1 - 10 positive Zellen/10.000: $6,9 \times 10^3$ ge/ml; 11 - 200 positive Zellen/10.000: $1,8 \times 10^4$ ge/ml.

3.4.2.2.1 Nachweis von CMV bei Patienten mit CMV Erkrankung

Wenn man den gleichzeitigen Nachweis von CMV und Fieber ohne erkennbare andere Ursache und/ oder einer Zytopenie als CMV-Syndrom definiert, so hatten vermutlich 9 der 82 Patienten ein CMV-Syndrom. Da dieses Syndrom retrospektiv unsicher erfasst werden kann, wird es nicht weiter in die Auswertung eingehen.

Eine histologisch gesicherte CMV Organmanifestation trat bei 5 von 82 untersuchten Patienten auf. Im Median wurde diese an Tag 65 (Spanne 41 bis 156) nach Transplantation diagnostiziert. In zwei Fällen war es eine Manifestation des Virus am Darm, in einem Fall an der Leber. Eine Patientin erlitt eine CMV-Retinitis und der fünfte Patient eine Organmanifestation an Leber und Lunge. Alle betroffenen Patienten wurden während des Beobachtungszeitraumes sowohl Antigenämie-, als auch CMV DNA positiv.

Tabelle 3-10: Patienten mit CMV Organerkrankung

UPN	Alter	Diagnose	Spender- typ	Sero- konstellation	Beginn	CMV Organ-	beteiligte Organe
	Jahre				aGVHD	erkrankung	
					Tage nach TX	Tage nach TX	
726	41	CML	FS	S- E+	+11	+156	Retina
743	41	CML	SIB	S+ E+	+51	+60	Darm
806	60	MH	SIB	S+ E+	+44	+65	Leber
876	56	CML	FS	S+ E+	+15	+41	Leber + Lunge
926	59	CML	FS MM	S- E+	+49	+80	Darm

CML = chronische myeloische Leukämie; MH = Morbus Hodgkin; FS = Fremdspender, MM = Mismatch, SIB = HLA-identische Geschwister; S = Spender; E = Empfänger.

Die Patientin (UPN 726) mit CMV-Retinitis erkrankte erst spät, am Tag 156 nach Transplantation. Über diesen Zeitraum lag kein Untersuchungsmaterial vor. Zu einem früheren Zeitpunkt war sie in beiden Methoden mehrfach positiv.

Zwei Patienten (UPN 806 und 926) waren vor der Diagnose einer Leber- bzw. Darmmanifestation im Antigennachweis und der quantitativen PCR positiv. Patient UPN 806 lieferte die erste Episode von positiven Antigennachweisen an Tag +6 und +8 noch während der Aplasie. Die zweite Episode einer Antigenämie begann an Tag +55, zehn Tage vor dem histologischen Nachweis einer Lebermanifestation.

Im Probenmaterial des vierten und fünften erkrankten Patienten (UPN 876 und 743) zeigte sich vor der histologischen Diagnose einer CMV Organerkrankung kein positiver Antigennachweis, dieser wurde erst 1 bzw. 3 Tage danach positiv. Die qPCR aber war bereits vor der Diagnose mehrfach und auch in Folge positiv.

Beispielhaft soll der Verlauf von Patient UPN 876 näher dargestellt werden (siehe Abbildung 3-13). Dieser Patient hatte eine Organmanifestation an Leber und Lunge. Er wurde nach Diagnosestellung 20 Tage mit Ganciclovir behandelt, lieferte jedoch weiterhin positive CMV Nachweise und starb etwa 3 Monate nach Diagnose der CMV Organerkrankung an einer Sepsis mit Multiorganversagen.

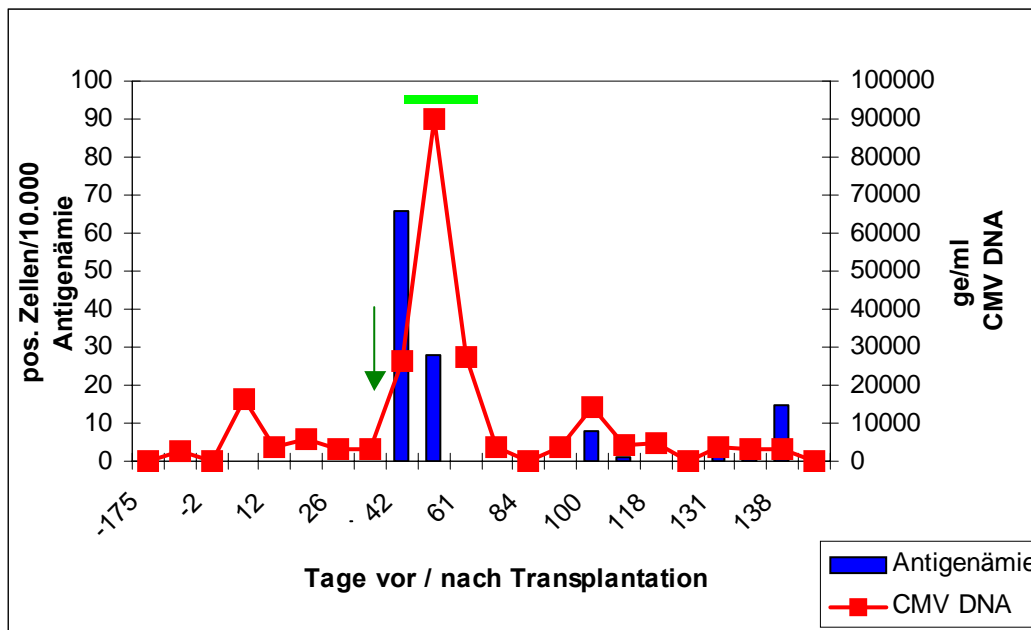


Abbildung 3-13: Verlauf der CMV Infektion des Patienten UPN 876

Darstellung des Verlaufs der CMV Infektion durch den Antigennachweis und die qPCR eines Patienten (UPN 876). Histologischer Nachweis einer CMV Organmanifestation an Leber und Lunge am Tag 41 nach Transplantation (grüner Pfeil). Die Dauer der antiviralen Therapie mit Ganciclovir ist durch den horizontalen grünen Balken dargestellt. Zur besseren Anschauung der Abbildung wurde die Maximallast von 5×10^5 an Tag +49 nicht dargestellt.

3.4.2.2.2 Virus DNA Last und antigenpositive Zellen bei CMV Organerkrankung

Die maximalen Virus DNA Lasten der fünf Patienten mit CMV Organerkrankung waren mit $4,8 \times 10^4$ ge/ml im Median (Spanne 8×10^3 bis 5×10^5 ge/ml) signifikant höher als die maximalen Virus DNA Lasten der Patienten ohne Organerkrankung (Median 7×10^3 ge/ml (Spanne 2×10^3 bis 4×10^5 ge/ml)) ($p=0,012$). Ebenso war die maximale Anzahl der antigenpositiven Zellen im Antigennachweis signifikant höher für Patienten mit Organerkrankung (Median 66 positive Zellen/10.000 (Spanne 2 bis 200)) im Vergleich zu Patienten ohne Organerkrankung (Median 3 (Spanne 1 bis 30)) ($p=0,025$) (siehe Abbildung 3-14).

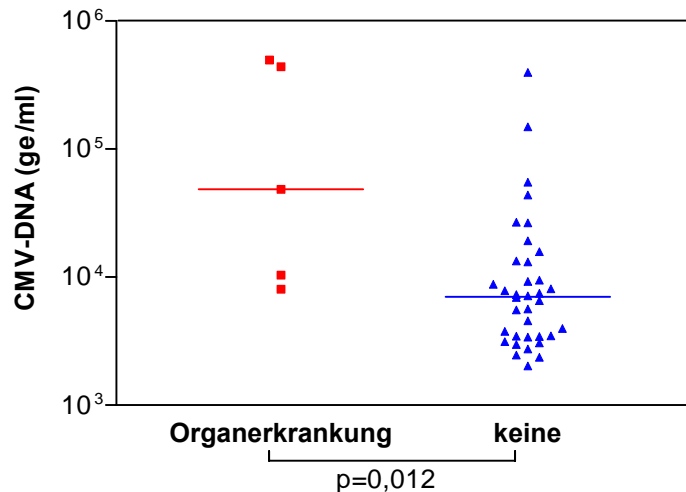


Abbildung 3-14: Maximale CMV DNA Last der Patienten mit und ohne CMV Organerkrankung

Darstellung der Mediane der maximalen DNA Last durch horizontale Balken: mit Organerkrankung $4,8 \times 10^4$ ge/ml, ohne Organerkrankung 7×10^3 ge/ml.

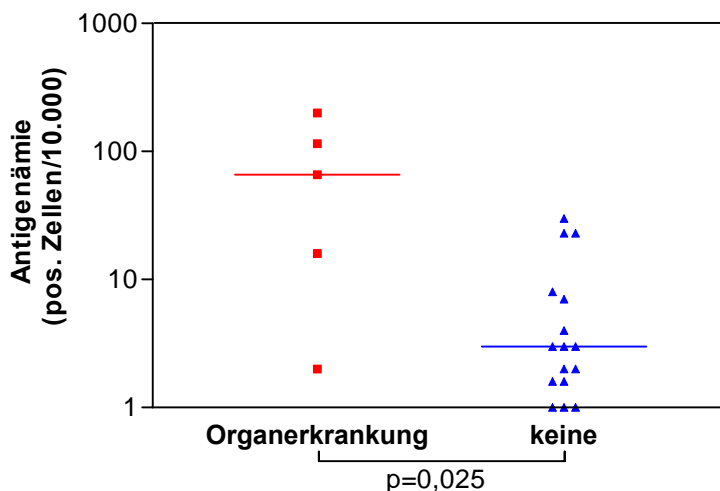


Abbildung 3-15: Maximale Anzahl der antigenpositiven Zellen der Patienten mit und ohne Organerkrankung

Darstellung der Mediane der maximalen Anzahl positiver Zellen durch horizontale Balken: mit Organerkrankung 66 positive Zellen/10.000, ohne Organerkrankung 3 positive Zellen/10.000.

3.4.3 Sensitivität und Spezifität von quantitativer PCR und Antigennachweis

Um die Aussagekraft der Ergebnisse der qPCR und der des Antigennachweises zu vergleichen, wurden die Parameter Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert in bezug auf eine CMV Organmanifestation errechnet.

Bei 5 von den 82 untersuchten Patienten trat eine CMV Organerkrankung auf. Alle fünf Patienten waren vor der CMV Organerkrankung DNA positiv. Zwei der Patienten waren jedoch vor der Diagnose nicht antigenpositiv, in ihrem Probenmaterial konnte erst ein bzw. drei Tage danach erstmalig eine Antigenämie nachgewiesen werden.

Die Sensitivität des CMV DNA Nachweises in bezug auf das Auftreten einer CMV Organerkrankung betrug 100 %, alle Patienten, die eine Organerkrankung bekamen, waren vorher CMV DNA positiv. Die Spezifität war jedoch nur 53 %, nur etwa die Hälfte der Patienten ohne Organerkrankung hatte keinen CMV DNA Nachweis, die andere Hälfte wurde als CMV positiv detektiert. Der positive Vorhersagewert war mit 12 % nur sehr gering, d. h. nur wenige der durch den CMV DNA Nachweis als positiv erkannten Patienten entwickelten eine Organerkrankung. Der negative Vorhersagewert betrug 100 %, keiner der Patienten ohne CMV DNA Nachweis entwickelte eine CMV Organmanifestation.

Tabelle 3-11: Nachweis von CMV DNA in Abhängigkeit einer CMV Organerkrankung in den untersuchten Patienten

	CMV Organerkrankung			
		nein	ja	
Nachweis von CMV DNA	nein	41 (50 %)	0 (0 %)	41 (50 %)
	ja	36 (44 %)	5 (6 %)	41 (50 %)
		77 (94 %)	5 (6 %)	

Da zwei Patienten mit einer CMV Organerkrankung vor dieser Diagnose nicht antigenpositiv waren, betrug die Sensitivität des Antigennachweises nur 60 %. Die Spezifität betrug 79 %, nur 16 von 77 Patienten ohne Organerkrankung hatten positive Resultate im Antigennachweis. Der positive Vorhersagewert betrug 16 % und der negativer Vorhersagewert 97 %.

Tabelle 3-12: Antigennachweis in Abhängigkeit einer CMV Organerkrankung in den untersuchten Patienten

	CMV Organerkrankung			
		nein	ja	
Antigen-nachweis	nein	61 (74 %)	2 (2 %)	63 (77 %)
	ja	16 (20 %)	3 (4 %)	19 (23 %)
		77 (94 %)	5 (6 %)	

Beim Vergleich der beiden untersuchten Methoden fällt auf, dass die Sensitivität des Antigennachweises bezüglich des Auftretens einer Organerkrankung nur 60 % beträgt. Die Spezifität ist mit 79 % jedoch höher als die des CMV DNA Nachweises (53 %).

3.4.3.1 Grenzwert für die Ergebnisse der qPCR

Wir untersuchten, ob die Spezifität des CMV Nachweises steigt, wenn man erst PCR-Ergebnisse ab einem arbiträren Grenzwert als positiv wertet.

Die geringste Maximallast eines an einer CMV Organerkrankung erkrankten Patienten dieses Kollektivs lag bei 8.060 ge/ml, deshalb wurde ein möglicher Grenzwert bei 7.500 ge/ml festgelegt. Patienten deren Maximallast unter 7.500 ge/ml liegt werden nun zu den CMV DNA negativen Patienten gezählt (siehe Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Nachweis von CMV DNA > 7.500 ge/ml in der qPCR in Abhängigkeit einer CMV Organerkrankung in den untersuchten Patienten

	CMV Organerkrankung			
		nein	ja	
Nachweis von CMV DNA >7.500 ge/ml	nein	62 (76 %)	0 (0 %)	62 (76 %)
	ja	15 (18 %)	5 (6 %)	20 (24 %)
		77 (94 %)	5 (6 %)	

Die Sensitivität und der negative Vorhersagewert bleiben 100 %. Die Spezifität beträgt nun 80 % statt vorher 53 %. Der positive Vorhersagewert steigt von 12 % auf 25 %.

4 Diskussion

4.1 Nachweis und Risikofaktoren für CMV und HHV-6A und -6B nach SZT

Die allogene Stammzelltransplantation ist eine häufig eingesetzte Therapie zur Behandlung von malignen und nichtmalignen Erkrankungen der Hämatopoese. Virusinfektionen, vor allem mit Herpesviren, tragen maßgeblich zu Morbidität und Mortalität in diesen Patienten bei. Insbesondere durch das Zytomegalievirus (CMV) verursachte Erkrankungen, wie die interstitielle Pneumonie und Kolitis, stellen schwerwiegende Komplikationen nach SZT dar. Das Humane Herpesvirus 6 mit seinen zwei Varianten HHV-6A und -6B ist ebenfalls ein β -Herpesvirus und mit CMV eng verwandt. Im Vergleich zu CMV ist aber relativ wenig über die klinischen Konsequenzen einer HHV-6 Infektion nach Stammzelltransplantation bekannt. Verschiedene Erkrankungen konnten jedoch bereits mit einer HHV-6 Infektion assoziiert werden, wie zum Beispiel Pneumonie und Enzephalitis [93, 95]. Das Auftreten klinischer Symptome hängt von der Schwere der Infektion ab und steht damit im Zusammenhang mit der Höhe der gemessenen Viruslast. So haben Patienten mit einer hohen CMV DNA Last ein höheres Risiko, eine CMV Erkrankung zu entwickeln als Patienten mit einer geringen CMV DNA Last [89].

An dieser Stelle sollen Inzidenz, Kinetik und Risikofaktoren für das Auftreten von CMV und HHV-6 Infektionen nach Stammzelltransplantation diskutiert werden.

CMV, HHV-6A und HHV-6B wurden dazu mittels quantitativer real-time PCR in Plasmaproben des untersuchten Patientenkollektivs nachgewiesen. Es wurden Plasmaproben analysiert, da es vermutlich durch die lytische Virusreplikation zum Untergang infizierter Zellen kommt und infolgedessen Virus DNA ins Plasma übertritt [142]. Somit deutet der Nachweis von Virus DNA im Plasma höchstwahrscheinlich auf eine aktive Infektion hin [117, 143], wohingegen bei Nachweis in peripheren Blutleukozyten auch latente Infektionen möglich sind [144, 145].

4.1.1 CMV

Im Einklang mit verschiedenen Studien konnten wir bei 50 % der Patienten nach Stammzelltransplantation CMV DNA nachweisen. Die Wahrscheinlichkeit für einen CMV Nachweis bis zum Tag 200 nach Transplantation lag bei 52 % [62, 101, 141]. Der Beginn der CMV Infektionen war im Median an Tag 35 nach SZT und die mediane Maximallast betrug $7,5 \times 10^3$ ge/ml.

Einer der Hauptrisikofaktoren für das Auftreten einer CMV Erkrankung ist ein positiver CMV Serostatus. Am meisten gefährdet sind dabei CMV seropositive Empfänger mit seronegativem Spender [91]. Auch in der vorliegenden Arbeit hatten Patienten mit serologischer Risikokonstellation (Empfänger, Spender oder beide CMV seropositiv) ein höheres Risiko für eine CMV Infektion als seronegative Patienten mit seronegativem Spender ($p=0,035$). In einer Risikofaktorenanalyse für das Auftreten einer CMV Antigenämie im selben Patientenkollektiv (vergleiche [146]) konnte gezeigt werden, dass seronegative Patienten mit einem seropositiven Spender ein geringeres Risiko für eine CMV Infektion haben als seropositive Patienten. In einer univariaten Analyse zur Feststellung der Risikofaktoren für einen CMV DNA Nachweis bei serologischer Risikokonstellation konnte keine der eingeschlossenen Variablen (Konditionierung, Alter, Matchstatus, Transplantat, aGvHD, GvHD-Prophylaxe, CMV Serostatus, Nachweis von HHV-6A oder -6B DNA) mit dem Auftreten von CMV DNA assoziiert werden. Dies kann durch die hohe Sensitivität der verwendeten quantitativen PCR bedingt sein, da die gleiche Analyse für den CMV DNA Nachweis an mindestens zwei hintereinanderfolgenden Terminen eine akute GvHD Grad II bis IV als Risikofaktor identifizierte ($p=0,009$). Entsprechend wiesen Patienten mit einer akuten GvHD höhere maximale Viruslasten auf als Patienten ohne akute GvHD ($p=0,0018$).

Wichtige Risikofaktoren für eine CMV Infektion scheinen somit der Serostatus von Spender und Empfänger, sowie das Auftreten einer GvHD zu sein.

Die Inzidenz von CMV Erkrankungen nach Stammzelltransplantation liegt heute durch Fortschritte in Prävention, Diagnose und Therapie bei etwa 5 - 10 % [82].

Entsprechend wurde in dieser Arbeit bei 5 von 82 untersuchten Patienten (6 %) eine CMV Organerkrankung diagnostiziert. In Übereinstimmung mit mehreren Studien wiesen Patienten mit Organerkrankung im Median eine signifikant höhere maximale DNA Last auf als Patienten ohne Organerkrankung ($p=0,012$) [62, 147]. Griffiths et al. führten in einer Studie eine Risikofaktorenanalyse zum Auftreten einer CMV Erkrankung durch, dabei blieb in der multivariaten Analyse einzig eine hohe CMV Last als signifikanter Risikofaktor bestehen [62]. Eine hohe Viruslast scheint somit einer der wichtigsten Hinweise für das Entstehen einer CMV Erkrankung zu sein. Trotz dessen ist der Ausbruch einer CMV Erkrankung außerdem stark von der lokalen Immunantwort im betroffenen Organ abhängig.

4.1.2 HHV-6

Die in dieser Arbeit angewandte quantitative PCR zum Nachweis von HHV-6 weist spezifisch die beiden Varianten A und B nach. Diese Unterscheidung ist wichtig, da vermutet wird, dass die Variante B für die Mehrheit der symptomatischen HHV-6 Infektionen nach SZT verantwortlich ist [62, 92].

In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv konnten HHV-6A und -6B bei 29 % und 43 % der Patienten nachgewiesen werden. Diese Inzidenzen entsprechen publizierten Daten über den Nachweis von HHV-6A Infektionen bei 33 % der Patienten [141] und HHV-6B Infektionen bei bis zu 60 % der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation [99, 103, 117, 145]. Nitsche et al. beobachteten, dass HHV-6A nur selten in den peripheren Blutleukozyten (PBL), aber häufig in dem korrespondierenden Plasma nachweisbar ist. Die DNA Last von HHV-6B in den PBLs dagegen entspricht der im korrespondierenden Plasma [139]. Somit könnte in Studien, die PBLs als Untersuchungsmaterial für die PCR einsetzen, die Inzidenz von HHV-6A Infektionen unterschätzt worden sein [101]. Außerdem wurde in vielen Studien, die zwischen HHV-6A und -6B unterschieden, nur eine geringe Anzahl an Proben untersucht [148]. Bedenkt man die recht hohe Anzahl an Patienten mit HHV-6A Infektionen in dieser Arbeit, so erscheint es wichtig, die Auswirkungen der beiden Varianten getrennt voneinander zu untersuchen.

Im Gegensatz zu früheren Berichten traten HHV-6 Infektionen in unserem Patientenkollektiv später auf. Der mediane Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises von HHV-6A und -6B lag bei Tag 38 und 41 nach Transplantation. Wohingegen andere Studien HHV-6 im Median 2 Wochen nach allogener Stammzelltransplantation nachweisen konnten [103, 141]. Dies könnte zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass wir Patienten über einen Zeitraum von einem Jahr auf das Auftreten von HHV-6 Infektionen überwacht haben und andere Arbeiten nur über 2 Monate nach SZT [103, 144]. Eine Plasma-PCR zum Nachweis von HHV-6 Infektionen bei einem großen Patientenkollektiv wurde bisher nur in einer Studie von Zerr et al. beschrieben [148]. In dieser Studie lag der erstmalige Nachweis von HHV-6 bei 23 Tagen nach Transplantation. Allerdings wurde in der zitierten Arbeit ein deutlich niedrigerer theoretischer Grenzwert für die PCR angesetzt. Die mediane Maximallast betrug 138 Kopien/ml, im Gegensatz zu 9800 Kopien/ml in unserer Arbeit. Ferner bestehen wichtige klinische Unterschiede zwischen den beiden Patientenkohorten. Gegensätzlich zu unserer Arbeit bekamen die meisten von Zerr et al. untersuchten Patienten TBI, das

Konditionierungsregime enthielt kein ATG und die Mehrzahl der Patienten wurde mit Knochenmark transplantiert. Im Einklang mit Veröffentlichungen konnten wir die Verwendung von Knochenmark als Transplantatquelle mit einem häufigeren Auftreten von HHV-B Infektionen assoziieren [100]. Die Wirkungen von TBI und ATG auf die Kinetik von HHV-6 Infektionen sind nicht bekannt. Die beschriebenen Faktoren sowie eine unterschiedliche Sensitivität der verwendeten PCR Assays könnten ursächlich sein, für die verschiedenen Kinetiken der HHV-6 Infektionen in der Studie von Zerr et al. und in unserer Studie.

In einer univariaten Analyse konnten außer der Transplantatquelle ($p=0,035$) eine GvHD ($p=0,031$) und ein positiver CMV Serostatus ($p=0,041$) mit dem Auftreten einer HHV-6B Infektion in Zusammenhang gebracht werden. Keine der untersuchten Variablen wurde mit einem HHV-6A Nachweis assoziiert. Es gibt indirekte Hinweise für eine Korrelation zwischen dem Auftreten von HHV-6 Infektionen und der Intensität des Konditionierungsregimes. Im Gegensatz zu anderen Berichten [141] konnten wir aber keinen Einfluss des Konditionierungsregimes auf HHV-6A oder -6B Infektion nachweisen ($p=0,258$ und $0,171$).

4.1.3 Vergleich von CMV, HHV-6A und HHV-6B

Insgesamt ließ sich im Plasma von 73 % der Patienten Virus DNA nachweisen, 52 % davon reaktivierten mehr als ein Virustyp. Vergleicht man die Häufigkeit der drei untersuchten Viren, fällt auf, dass CMV Infektionen im Vergleich zu HHV-6A und HHV-6B Infektionen am häufigsten nachweisbar waren (50 % zu 29 % und 43 %). Der Zeitpunkt des erstmaligen Virusnachweises unterschied sich nicht signifikant für die drei Viren (35, 38 und 41Tage nach SZT).

Eine Interaktion von HHV-6 und CMV wird in verschiedenen Studien vermutet, eine kausale Beziehung ist jedoch nicht bewiesen [63]. Wang et al. berichteten in einer Studie, dass HHV-6 durch Hemmung einer CMV spezifischen Immunantwort die Entstehung einer CMV Erkrankung fördert [104]. Auch andere Studien vermuteten HHV-6 als Risikofaktor für eine CMV Erkrankung [101, 105, 106]. Umgekehrt könnte auch eine CMV Infektion eine HHV 6 Infektion auslösen, und die HHV-6 Infektion dann zu den klinischen Manifestationen eines CMV Syndroms beitragen [149]. Wir konnten keinen klaren Zusammenhang zwischen HHV-6 und CMV nachweisen. Auch in der Risikofaktorenanalyse konnte der Nachweis des einen Virus nicht mit einer höheren Inzidenz des anderen analysierten Virus assoziiert werden. Berichte, wonach HHV-6

Infektionen CMV Infektionen vorweg laufen [63, 141], konnten mit unseren Daten nicht bestätigt werden. Es scheint eher, als würde CMV vor HHV-6B auftreten, da doppelt so viele Patienten erst CMV und dann HHV-6B reaktivierten.

Betrachtet man die Dauer des Virusnachweises, so ist erkennbar, dass HHV-6A und -6B Virämien kürzer andauerten als CMV Virämien. CMV war im Median für 13 Tage nachweisbar, HHV-6A und -6B je nur für 8 Tage. Im Vergleich zu CMV konnte HHV-6 kurzzeitig und intermittierend nachgewiesen werden. Mehrere im Wochenrhythmus hintereinanderfolgende Virus-positive Proben wie bei CMV waren selten. Dies passt zu Berichten, dass HHV-6 auch bei aktiven Infektionen nur selten im Plasma nachweisbar ist [144, 145, 148, 150, 151]. Angesichts der nur kurzzeitigen HHV-6 Virämien scheint eine wöchentliche Überwachung, wie sie bei CMV üblich ist, in Bezug auf HHV-6 Infektionen nicht ausreichend zu sein. Kürzere Abstände der Untersuchungen sind zur genauen Erfassung der Inzidenz und Dauer von HHV-6 Infektionen notwendig.

4.2 Einfluss des Konditionierungsregimes auf das Auftreten von CMV Infektionen

Bei Patienten mit einer Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation und Kontraindikationen gegen eine konventionelle myeloablative Behandlung stellt die dosisreduzierte Konditionierung eine vielversprechende und mittlerweile häufig eingesetzte Behandlungsmöglichkeit dar. Die Kombination von Fludarabin, Busulfan und ATG als nicht-myeloablatives, dosisreduziertes Konditionierungsregime wurde 1998 von Slavin et al. eingeführt [30]. Dieses Regime ist sehr gut verträglich, gewährleistet ein stabiles Engraftment der transplantierten Blutstammzellen und konnte seit seiner Einführung mehrfach bestätigt werden [152]. Trotz allem wird die Einjahres-Mortalität, Tod durch Krankheitsrückfall nicht eingerechnet, bei Hochrisikopatienten mit 30 % angegeben, was hauptsächlich durch das Auftreten von späten Infektionen im Zusammenhang mit einer akuten oder chronischen Graft-versus-Host-Reaktion verursacht ist [134]. Die Frühmortalität aufgrund von Infektionen scheint jedoch nach dosisreduzierter Konditionierung geringer zu sein [10, 30]. Begründet ist dies durch eine kürzere Neutropeniedauer und geringere Organschäden aufgrund einer verminderten Akut-Toxizität der dosisreduzierten Zytostatika. Bei Anwendung von dosisreduzierten Konditionierungsregimes, die Campath – einen panlymphozytären Antikörper – enthielten, wurde allerdings über eine hohe Inzidenz von CMV Infektionen berichtet [153, 154].

In diesem Abschnitt sollen das Auftreten und die Schwere von CMV Infektionen nach dosisreduzierter Konditionierung und nach myeloablativer Konditionierung verglichen werden.

Wir untersuchten diese Frage anhand von Daten unseres Transplantationszentrums zu 82 konsekutiv transplantierten Patienten. Dabei verglichen wir die Inzidenz von CMV-Infektionen bei 45 Patienten, die eine dosisreduzierte Konditionierung, bestehend aus Fludarabin, Busulfan und ATG, erhalten hatten, mit der Inzidenz von Infektionen von 37 konsekutiven Patienten, die im gleichen Zeitraum eine myeloablative Behandlung nach Standardprotokollen erhalten hatten.

Bei diesem Vergleich fällt ein Trend zu höheren Inzidenzen nach dosisreduzierter Konditionierung auf, welcher statistisch aber nicht bestätigt wurde. So ließ sich im Probenmaterial von 58 % der Patienten mit dosisreduzierter Konditionierung und von 47 % der Patienten mit myeloablativer Konditionierung CMV DNA nachweisen ($p=0,120$). Legt man den Nachweis von CMV-Antigen zugrunde, wurden Infektionen bei 31 % bzw. 19 % der Patienten erkannt ($p=0,208$). Auch die Diagnose einer CMV Organerkrankung war in den beiden Konditionierungsgruppen statistisch nicht unterschiedlich häufig ($p=0,978$). Für Patienten mit serologischer Risikokonstellation für eine CMV Infektion wurde eine univariate Analyse zur Feststellung der Risikofaktoren eines CMV DNA Nachweises durchgeführt. Dabei hatte die Art der Konditionierung keinen Einfluss auf das Auftreten einer CMV Infektion ($p=0,571$).

Die maximale CMV DNA Last ist mit der Schwere der CMV Infektion assoziiert [155]. Die gemessenen maximalen CMV DNA Lasten waren in den beiden Behandlungsgruppen statistisch nicht unterschiedlich ($p=0,499$). Auch der Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises von CMV DNA unterschied sich nicht ($p=0,261$). Aus diesem Grund sind starke Unterschiede in der CMV Immunität nach dosisreduzierter und myeloablativer Konditionierung unwahrscheinlich.

Obwohl mit dieser Studie kleine Unterschiede zwischen den beiden Konditionierungsregimen nicht ausgeschlossen werden können, scheint der nur geringe Einfluss der Dosisintensität auf das Auftreten von CMV Infektionen kaum relevant zu sein, insbesondere aufgrund des starken Einflusses der akuten GvHD (RR 4,78; 95 % KI 1,5 bis 15,5, $p=0,009$).

In einer Studie verglichen Junghans et al. [156] das Auftreten von CMV Infektionen nach dosisreduzierter Konditionierung mit 200 cGy TBI und myeloablativer Konditionierung. Dabei zeigte sich eine Tendenz zu geringer ausgeprägten und später

einsetzenden CMV Antigenämien und Virämien nach dosisreduzierter Konditionierung. Junghanss et al. vermuteten, dass die von ihnen beobachtete Reduktion von frühen Infektionen in der dosisreduzierten Gruppe durch eine Persistenz von immunkompetenten Zellen im Spenderorganismus zustande kommt, welche so einen gewissen Schutz vor frühen CMV Infektionen bieten. Eine mögliche Ursache dafür, dass in unserer Arbeit konträre Ergebnisse gefunden wurden, ist die Zusammensetzung des verwendeten dosisreduzierten Regimes. Das von uns verwendete Konditionierungsregime aus Fludarabin, Busulfan und ATG verursacht trotz Dosisreduktion eine signifikante Hematotoxizität und induziert innerhalb eines Monats einen vollständigen Spender-Chimärismus, wohingegen das von Junghanss et al. verwendete, auf 200 cGy TBI basierende Regime tatsächlich nicht-myeloablativ ist und über eine Dauer von drei Monaten einen gemischten Chimärismus entstehen lässt [134]. Dosisreduzierte Konditionierungsregime unterscheiden sich vermutlich stark hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Wirkung und der nachfolgenden Immunrekonstitution.

In einer retrospektiven Multicenterstudie analysierten Martino et al. [157] das Risiko schwerer CMV Infektionen nach dosisreduzierter im Vergleich zu myeloablativer Konditionierung. Darin wird über eine sehr niedrige Inzidenz von CMV Infektionen berichtet. Das von Martino et al. verwendete dosisreduzierte Konditionierungsregime ist dem in dieser Arbeit beschriebenen sehr ähnlich, außer dass es kein ATG enthält. In der Studie war das Auftreten von CMV Infektionen bei Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko für eine Reaktivierung nach dosisreduzierter Konditionierung geringer als nach myeloablativer Konditionierung (21 % zu 43 %, $p=0,01$). Somit könnte die Verwendung von ATG in dem von uns angewendeten Protokoll ursächlich für die hohe Inzidenz an CMV Infektionen in dieser Arbeit sein. Da auch die meisten myeloablativen Konditionierungsregime in unserer Studie ATG enthielten, konnten wir die Rolle von ATG nicht mit unseren Daten untersuchen. Im Allgemeinen erhöht eine T-Zell-Depletion das Risiko einer verzögerten Regeneration der CMV Immunität. So berichteten Mohty et al. [154] über eine hohe Inzidenz von CMV Infektionen nach dosisreduzierter Konditionierung mit Fludarabin, Busulfan und ATG (Merieux). Ein Vergleich von verschiedenen GvHD Prophylaxen mit und ohne ATG zeigte in einer randomisierten Studie jedoch kein häufigeres Auftreten von CMV Infektionen nach ATG Gabe [158]. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass ATG zwar zum einen die Immunsuppression des Empfängers verstärkt, zum anderen aber das Auftreten und den

Schweregrad einer GvHD reduziert, was sich vorteilhaft auf eine Reaktivierung von CMV auswirkt. Ein anderes Medikament zur T-Zell-Depletion ist Alemtuzumab, das zunehmend in dosisreduzierten Konditionierungsregimen Anwendung findet. Eine Studie über ein dosisreduziertes Konditionierungsregime, welches Alemtuzumab enthielt, beschrieb eine hohe Rate an CMV Infektionen. So erlitten 85 % der seropositiven Patienten eine CMV Infektion, und 71 % der Patienten hatten wiederkehrende Infektionen [153].

Pérez-Simón et al. verglich retrospektiv zwei prospektive Studien aus Großbritannien und Spanien über das Auftreten einer GvHD nach dosisreduzierter Konditionierung [159, 160, 161]. Beide Gruppen verwendeten Fludarabin und Melphalan als Konditionierung und eine unterschiedliche GvHD Prophylaxe. In Großbritannien wurde CSA und Alemtuzumab eingesetzt und in Spanien eine Kombination aus CSA vor und MTX nach der Transplantation. Nach Gabe von Alemtuzumab trat seltener eine GvHD auf, die Inzidenz von CMV Infektionen war jedoch höher als nach Gabe von MTX (47 % zu 23 %; $p=0,018$). Allerdings wurden in den beiden Gruppen verschiedene Techniken zum CMV Nachweis verwendet, was das Ergebnis beeinflusst haben könnte. Die Gruppe von Patienten, welche Alemtuzumab bekam, wurde mittels PCR überwacht, die andere Gruppe durch Antigennachweis. So ist beispielsweise in unserer Arbeit die Anzahl der CMV Infektionen, gemessen mit einer quantitativen PCR (58 %) höher als mit dem Antigennachweis (31 %).

Aufgrund der starken Assoziation zwischen CMV Infektionen und der akuten GvHD ist es wichtig, den Einfluss von T-Zell-depletierenden Mitteln, die zur GvHD Prophylaxe eingesetzt werden, auf das Auftreten von CMV Infektionen zu untersuchen. Dies kann nur in prospektiven randomisierten Studien geklärt werden.

Bei Betrachtung der Therapie-assoziierten Mortalität am Tag 100 nach Transplantation fällt auf, dass diese in unserer Arbeit nach dosisreduzierter Konditionierung signifikant niedriger ist als nach myeloablativer Konditionierung (5 % zu 30 %; $p=0,002$). Nur ein Patient aus jeder Gruppe verstarb an einer CMV Organerkrankung. Somit führte die hohe Rate an CMV Infektionen nach dosisreduzierter Konditionierung nicht zu einer hohen Therapie-assoziierten Mortalität am Tag 100. Der Nachweis einer CMV Antigenämie beeinflusste jedoch die Therapie-assoziierte Mortalität am Tag 100 signifikant nach myeloablativer Konditionierung ($p=0,003$). Möglicherweise hat in dieser Gruppe eine Kombination aus toxischen Organschäden durch die Myeloablation,

längerer Zytopeniedauer, akuter GvHD und Nebenwirkungen einer Ganciclovir Therapie stark schädigende Auswirkungen trotz einer erfolgreichen antiviralen Therapie.

Die Aussage dieser Arbeit über den Einfluss des Konditionierungsregimes auf das Auftreten von CMV Infektionen ist durch die Verwendung verschiedener myeloablativer Protokolle und verschiedener Arten der GvHD Prophylaxe eingeschränkt. Wegen der großen Anzahl an heutzutage eingesetzten Protokollen zur dosisreduzierten Konditionierung und den unterschiedlichen Wirkungen der dabei eingesetzten Medikamente können die Ergebnisse unserer Studie nur auf die Kombination Fludarabin, Busulfan und ATG angewendet werden.

Es konnte aber gezeigt werden, dass bei Patienten, die fast ausschließlich ATG zur GvHD Prophylaxe erhielten, das Auftreten von CMV Infektionen weniger von der Dosisintensität des Konditionierungsregimes, als vom Auftreten einer GvHD und dem CMV Serostatus abhängt. Die Kombination von Fludarabin, Busulfan und ATG wirkt stark immunsuppressiv. Die Rekonstitution der CMV Immunität scheint sich nach dieser Konditionierung nicht wesentlich von der nach myeloablativer Konditionierung zu unterscheiden, so dass der Nachweis von CMV eine häufige Komplikation nach dieser dosisreduzierten Konditionierung ist.

4.3 Einfluss von HHV-6 Infektionen auf hämatologisches Engraftment und GvHD

Nach einer Stammzelltransplantation sind HHV-6 Infektionen häufig nachweisbar, über die klinischen Auswirkungen ist jedoch noch wenig bekannt. Verschiedene Erkrankungen wurden mit HHV-6 in Zusammenhang gebracht, wie beispielsweise Enzephalitis, interstitielle Pneumonie, Hautausschlag und Knochenmarksuppression [93, 94, 95].

Daher wird in diesem Abschnitt auf die klinischen Auswirkungen von HHV-6 Infektionen nach SZT eingegangen und hierbei insbesondere auf die Fragen, ob HHV-6 Infektionen während der Aplasie das hämatologische Engraftment verzögern und ob sie mit einem erhöhten Risiko für eine GvHD assoziiert sind.

Um den Einfluss von HHV-6 Infektionen auf das hämatologische Engraftment zu untersuchen, wurden Patienten mit einer Infektion vor dem Tag 28 nach Transplantation herangezogen. Weder eine frühe HHV-6A noch -6B Infektion konnte mit der Regeneration der neutrophilen Granulozyten in Zusammenhang gebracht werden ($p=0,451$ und $p=0,351$).

Ein verzögertes thrombozytäres Engraftment jedoch wurde mit einer frühen HHV-6B

Infektion assoziiert ($p=0,006$). Bei Patienten mit einer HHV-6B Infektion vor dem Tag 28 fand die Regeneration der Thrombozyten im Median 14 Tage später statt, und die Therapie-assoziierte Mortalität war im Vergleich zu Patienten ohne frühe HHV-6B Infektion erhöht. In verschiedenen Studien wurde schon länger die Vermutung einer Assoziation zwischen HHV-6 Infektionen und Thrombozytopenien geäußert [100, 101, 162, 163, 164, 165, 166]. Andere Gruppen konnten diese Vermutung aber nicht bestätigen [103, 167]. In zwei großen retrospektiven Studien untersuchten Ljungman et al. und Zerr et al. Patienten nach allogener SZT. Beide beschrieben einen deutlichen Zusammenhang von HHV-6 Infektionen mit einem verzögerten thrombozytären Engraftment und einem erhöhten Bedarf an Thrombozytentransfusionen [99, 148]. In Übereinstimmung mit diesen Studien deuten unsere Daten darauf hin, dass HHV-6 Infektionen insbesondere während der Aplasie ein klinisches Problem darstellen. Interessanterweise konnten wir nur einen Zusammenhang von frühen Infektionen mit der Variante HHV-6B und einem verzögerten thrombozytären Engraftment aufzeigen. Eine Infektion mit HHV-6A vor dem Tag 28 ist nicht mit dem Risiko einer verzögerten Thrombozytenregeneration verbunden ($p=0,999$). Ein unterschiedlicher Einfluss der beiden Varianten HHV-6A und -6B wird schon länger angenommen. So konnten Carrigan und Knox bei 6 von 15 Patienten mit Knochenmarksuppression HHV-6B nachweisen, jedoch nur bei einem Patienten die Variante HHV-6A [163]. Experimentelle Daten verschiedener Studien weisen darauf hin, dass aber zumindest einige Virusstämme der Variante HHV-6A eine starke Knochenmarksuppression auslösen können [56, 94].

Auch das Auftreten einer akuten GvHD konnte nur mit einer HHV-6B Infektion (multivariate Analyse: $p=0,025$), nicht aber mit einer HHV-6A Infektion ($p=0,250$) in Zusammenhang gebracht werden. Viele Studien, die in letzter Zeit veröffentlicht wurden, berichteten über eine Assoziation zwischen dem Nachweis von HHV-6 und dem Auftreten einer aGvHD [99, 103, 141, 145, 148]. Andere Autoren konnten diese Assoziation jedoch nicht bestätigen [100, 101, 150]. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv ließen sich die meisten HHV-6 Infektionen erst nach der Diagnose einer GvHD nachweisen ($p= 0,001$). Außerdem traten CMV und HHV-6 Infektionen etwa zeitgleich auf. Dieses lässt vermuten, dass auch das HHV-6 Virus nach SZT reaktiviert, wenn der Wirtsorganismus schwer immunsupprimiert ist.

Insgesamt konnten klinische Korrelate nur für den Nachweis von HHV-6B DNA, jedoch nicht für HHV-6A DNA gefunden werden. HHV-6 Infektionen in der Aplasie wurden

dabei mit einem verzögerten Engraftment der Thrombozyten, einer akuten GvHD und mit einer höheren Therapie-assoziierten Mortalität in Zusammenhang gebracht. Da Maximallast und Kinetik der beiden Varianten nicht unterschiedlich waren, ist zu vermuten, dass biologische Eigenschaften, außer der Fähigkeit zu reaktivieren, verantwortlich für die verschiedenen klinischen Auswirkungen der beiden HHV-6 Varianten sind.

Unsere Daten scheinen perspektivisch für die Durchführung einer vergleichenden Studie zur präemptiven antiviralen Therapie bei Nachweis von HHV-6B in der aplastischen Phase zu sprechen. Die Voraussetzungen für eine Therapiestudie sind jedoch derzeit noch nicht gegeben. Erstens müsste eine behandlungsbedürftige Reaktivierung verlässlich definiert werden – ein einmaliger HHV-6B DNA-Nachweis reicht nicht aus, sondern müsste mindestens in einer zweiten Probe bestätigt werden. Zweitens müsste im Rahmen einer prospektiven Studie der Nachweis geführt werden, dass frühe HHV-6 Infektionen zu einer gesteigerten Mortalität führen. Einen weiteren wesentlichen Baustein müsste ein vertieftes Verständnis der Pathophysiologie von HHV-6 Infektionen liefern. In dem retrospektiv untersuchten Probensatz beobachten wir kurzfristige Reaktivierungen. Die Tatsache, dass HHV-6 DNA - anders als CMV - nur kurzzeitig im Plasma nachweisbar ist, spricht für ein beschränktes Potential der Virusreplikation. Der Nutzen einer präemptiven Therapie steht somit in Frage. Die Assoziation mit einer Organkrankheit, anhand unserer Daten die thrombopoetische Insuffizienz, spricht jedoch für eine nennenswerte Schädigung des betroffenen Knochenmarkes – speziell der Thrombopoese. Der Widerspruch zwischen einer selbstlimitierten Virämie und einem nachhaltigen Organschaden ist unverstanden. An diesem Punkt müssen weitere Forschungsarbeiten ansetzen. Im Rahmen dieser Dissertation kann jedoch gezeigt werden, dass die Unterscheidung zwischen den beiden Varianten, HHV-6A und -6B, essentiell ist. Patienten mit einer HHV-6A Infektion würden nach heutigem Verständnis nicht von einer präemptiven Therapie profitieren. Trotz allem müssen die Bedingungen zur Überwachung von HHV-6 Infektionen noch genau definiert werden und der Nutzen einer präemptiven antiviralen Therapie in prospektiven Studien geklärt werden.

4.4 Vergleich der real-time PCR im TaqMan Format mit dem Antigennachweis

Durch eine Therapie mit antiviralen Medikamenten kann eine CMV Infektion oder Reaktivierung erfolgreich behandelt werden, vorausgesetzt die Therapie beginnt

frühzeitig im Verlauf der Erkrankung. Deshalb sind sensitive und zuverlässige Nachweismethoden erforderlich.

In der Routinediagnostik erfolgt der CMV Nachweis meist durch Nachweis des viralen Strukturproteins pp65 (Antigennachweis) in infizierten peripheren Blutleukozyten (PBL) oder durch Nachweis viraler DNA mit der qualitativen PCR in PBL oder Plasma [140, 168, 169].

Vorteile des Antigennachweises sind eine schnelle Durchführbarkeit und die Möglichkeit der Quantifizierung, jedoch ist diese Methode relativ arbeitsintensiv und seine Interpretation subjektiv. Für die Durchführung ist eine ausreichende Anzahl an Leukozyten notwendig, somit ist dieser Test bei leukopenen Patienten nach Stammzelltransplantation nicht anwendbar. Außerdem ist eine rasche Bearbeitung der Blutproben notwendig, da die Leukozyten für die FärbeprozEDUREN intakt sein müssen [170, 171]. Die PCR umgeht diese Probleme. Sie kann sowohl in Leukozyten als auch in Plasma, weitgehend unabhängig von der Dauer der Lagerung und der Zellintegrität, durchgeführt werden. Die qualitative PCR ist jedoch nicht geeignet zur Beurteilung des Verlaufs einer Virusinfektion, da mit dieser Methode keine Aussagen über die DNA Last gemacht werden können, welche für die Einschätzung der Prognose wichtig sind. Ansätze zur Quantifizierung der DNA führten zur Entwicklung der real-time PCR in verschiedenen Formaten [138, 172].

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR im TaqMan Format mit dem konventionellen Antigennachweis verglichen werden.

In dem untersuchten Patientenkollektiv wurde CMV DNA wesentlich häufiger als eine Antigenämie nachgewiesen (50 % der Patienten zu 26 % der Patienten). Eine größere Übereinstimmung der Inzidenz von CMV ergibt sich beim Vergleich des CMV DNA Nachweises an zwei hintereinanderfolgenden Terminen (24% der Patienten) und dem mindestens einmaligen Antigennachweis (26 % der Patienten).

Trotz Berichten über eine Korrelation zwischen der quantitativen real-time PCR und dem Antigennachweis [173], konnte in dieser Arbeit keine eindeutige Korrelation zwischen der viralen DNA Last im Plasma und der Anzahl der antigenpositiven Zellen gefunden werden (Spearman Rangkorrelationskoeffizient = 0,387). Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien mit besseren Korrelationen, welche sich jedoch auf relativ geringe Patienten- und Probenanzahlen beziehen und somit möglicherweise nicht ganz die klinische Realität widerspiegeln [174, 175, 176]. Vergleicht man einzelne Proben, so ist es nicht erstaunlich, dass PCR und Antigennachweis nur eine mäßige

Übereinstimmung aufweisen, da verschiedene Moleküle in unterschiedlichen Blutkompartimenten verglichen werden – pp65 Antigen positive Leukozyten und CMV DNA in Plasma. Eine Studie zeigte bereits, dass diese beiden Moleküle unterschiedlichen Zeitverläufen unterliegen [138].

Die Sensitivität einer Nachweismethode ist ein wichtiger Gesichtspunkt. Die quantitative real-time PCR verfügt über eine sehr hohe Sensitivität, welche einen Nachweis von 10 ge/Assay, entsprechend 2000 ge/ml Plasma, zulässt [172]. Aufgrund der außerordentlichen Sensitivität der real-time PCR konnte in dieser Arbeit bei zusätzlichen 27 % der Patienten CMV DNA nachgewiesen werden als mit dem Antigennachweis ($p=0,000$). In einer Studie wurde über Patienten mit CMV Erkrankung berichtet, welche CMV DNA positiv waren, jedoch negativ im Antigennachweis [177]. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv erlitten 5/82 Patienten eine CMV Erkrankung, alle Patienten waren vor der histologischen Diagnose CMV DNA positiv, zwei Patienten jedoch nicht antigenpositiv. Weiterhin konnte durch die quantitative real-time PCR CMV DNA im Median 2 Wochen vor einer Antigenämie nachgewiesen werden (erstmaliger CMV DNA Nachweis nach 35 Tagen im Gegensatz zu erstmaliger Antigenämie nach 49 Tagen nach Transplantation, $p=0,000$). Andere Studien zeigten einen noch früheren Nachweis mit höheren Lasten auf, wenn die PCR mit Leukozyten statt Plasma durchgeführt wurde [178]. Solch sensitive Testverfahren können hilfreich sein, wenn es wichtig ist, bereits geringe DNA Lasten früh im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Trotz dessen scheint die PCR zu sensitiv zu sein, um zuverlässig die Patienten nach Stammzelltransplantation zu erkennen, die ein Risiko für die Entwicklung einer CMV Organerkrankung haben [173]. Um die Aussagekraft der beiden Testverfahren in bezug auf das Auftreten einer CMV Organerkrankung zu vergleichen, wurden in dieser Arbeit Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert berechnet. Dabei fällt auf, dass 2/5 Patienten mit CMV Organerkrankung erst einige Tage nach Diagnose einer Organerkrankung antigenpositiv wurden und die Sensitivität des Antigennachweises damit nur 60 % betrug. Die Sensitivität der PCR, bei einem positiven Ergebnis bei > 2000 ge/ ml Plasma, betrug 100 %, jedoch waren Spezifität und positiver Vorhersagewert niedriger als die des Antigennachweises (Spezifität: 53 % zu 79 %; positiver Vorhersagewert 12 % zu 16 %). Verringert man jedoch die Sensitivität der real-time PCR durch Einführung eines Grenzwertes bei 7500 ge/ ml, ab welchem eine Probe nun als positiv gilt, so erhöhen sich Spezifität (von 53 % auf 80 %) und positiver Vorhersagewert (12 % auf 25 %) der real-time PCR und gleichen sich

damit den Ergebnissen des Antigennachweises an. Ein ähnlicher Grenzwert von 7900 ge/ ml Plasma wurde in einer Studie zum CMV Nachweis bei nierentransplantierten Patienten mittels des Roche Amplicor CMV DNA Assays angegeben [179]. Ein anderer Ansatz zur Bestimmung eines Grenzwertes ist die Ermittlung der Fläche unter der Kurve bei graphischer Darstellung der Viruslast in Abhängigkeit von der Zeit [180]. Dieser Ansatz ist insofern vorteilhaft, da er die Erkenntnis einschließt, dass auch lang andauernde Virämien mit niedriger Viruslast ähnliche klinische Konsequenzen wie kürzere hochtitrige Virämien haben können.

Zur Beantwortung der abschließenden Frage, welches der hier verglichenen Testverfahren nun bevorzugt eingesetzt werden sollte, ist vor allem entscheidend, in welcher Absicht der Test durchgeführt wird: für einen sensitiven Nachweis von CMV und die möglichst genaue Überwachung einer CMV Infektion oder zur Identifizierung von Patienten mit Risiko eine CMV Erkrankung zu entwickeln. Der Antigennachweis erfordert eine ausreichende Anzahl Leukozyten aus frischem Blut, welches nicht gelagert oder eingefroren werden kann. Er hat eine mäßige Sensitivität bei gutem positiven Vorhersagewert und guter Spezifität, Patienten mit Risiko für eine CMV Erkrankung nach Stammzelltransplantation zu erkennen.

Die quantitative real-time PCR wird mit geringen Mengen an Plasma durchgeführt, eine Lagerung oder das Einfrieren von Proben ist möglich. Die Sensitivität ist in der Regel sehr hoch, sie hat dann einen niedrigen positiven Vorhersagewert und eine niedrige Spezifität. Die Sensitivität hängt von den Bedingungen des Assays ab. Durch verschiedene Ansätze kann ein Grenzwert eingeführt werden, ab welchem eine Probe als positiv gilt. Dieser Grenzwert sollte unter klinischen Bedingungen angepasst werden, um einen angemessenen positiven Vorhersagewert und eine angemessene Spezifität, möglichst nah an 100 %, zu erhalten. So können Patienten, mit dem Risiko eine CMV Erkrankung zu entwickeln, erkannt und unnötige CMV Therapien vermieden werden.

Die quantitative real-time PCR stellt somit eine sehr sensitive Methode zum Virusnachweis dar, welche durch Einführung eines Grenzwertes eine angemessen hohe Spezifität erhält.

5 Zusammenfassung

Patienten nach allogener Stammzelltransplantation sind durch Herpesvirusinfektionen stark gefährdet. Zum besseren Verständnis derartiger Infektionen und ihrer Auswirkungen wurden Ergebnisse quantitativer PCR Untersuchungen von 1241 Plasmaproben für CMV, HHV-6A und -6B mit den entsprechenden klinischen Daten 82 konsekutiv behandelter Patienten korreliert. Besonders interessierten dabei unter anderem der Zeitpunkt des Auftretens von Infektionen, Risikofaktoren, das Konditionierungsregime, das Vorhandensein von GvHD und die Kinetik des Engraftments. Darüber hinaus wurden für CMV die Ergebnisse der PCR mit denen der Antigenbestimmung verglichen.

Bei 50 % der untersuchten Patienten konnte CMV DNA in den Plasmaproben nachgewiesen werden. Als Risikofaktoren für eine CMV Infektion konnten eine serologische CMV Risikokonstellation ($p=0,035$), sowie eine akute GvHD II- IV ($p=0,0018$) identifiziert werden. Für das Auftreten einer CMV Organerkrankung ist einer der wichtigsten Indikatoren eine hohe CMV Viruslast.

HHV-6A und -6B konnten in dem untersuchten Patientenkollektiv bei 29 % und 43 % der Patienten nachgewiesen werden. Die HHV-6 Infektionen traten relativ spät auf, im Median an Tag 38 (HHV-6A) und 41 (HHV-6B) nach SZT. Als Risikofaktoren für eine HHV-6B Infektion konnten die Transplantatquelle ($p=0,035$), eine GvHD ($p=0,031$) und ein positiver CMV Serostatus ($p=0,041$) nachgewiesen werden. Keine der untersuchten Variablen konnte mit einem HHV-6A Nachweis assoziiert werden.

Ein klarer Zusammenhang zwischen dem Auftreten der untersuchten Viren konnte nicht nachgewiesen werden. Auffällig war, dass HHV-6A und -6B Virämien, im Vergleich zu CMV kürzer andauerten und intermittierend nachweisbar waren.

Unseren Ergebnissen nach bestanden keine Unterschiede zwischen der myeloablativen und der dosisreduzierten Konditionierung bezüglich der Häufigkeit des Nachweises von CMV DNA oder Antigen, Nachweiszeitpunkt oder maximaler DNA Last.

Wir untersuchten die klinischen Auswirkungen von HHV-6 Infektionen nach SZT. Dabei zeigte sich ein deutlich verzögertes thrombozytäres Engraftment bei Patienten mit einer frühen HHV-6B Infektion ($p=0,006$). Ebenso konnte das Auftreten einer akuten GvHD mit einer HHV-6B Infektion ($p=0,025$), in Zusammenhang gebracht werden. Die Unterscheidung zwischen den beiden Varianten HHV-6A und -6B nach SZT ist somit

von klinischer Bedeutung.

Beim Vergleich des Antigennachweises mit der quantitativen real-time PCR im TaqMan Format für den Nachweis von CMV, wurde CMV DNA wesentlich häufiger als eine Antigenämie nachgewiesen (50 % zu 26 % der Patienten). Eine Angleichung der Inzidenzen erreicht man beim Vergleich eines CMV DNA Nachweises an zwei hintereinanderfolgenden Terminen mit einem mindestens einmaligen Antigennachweis (24 % zu 26 % der Patienten). Durch die quantitative PCR konnte CMV DNA im Median 2 Wochen vor einer Antigenämie nachgewiesen werden ($p=0,000$). Die Sensitivität der quantitativen PCR in Bezug auf das Auftreten einer Organerkrankung betrug 100 %, jedoch waren Spezifität und positiver Vorhersagewert niedriger als die des Antigennachweises. Durch Einführung eines Grenzwertes, ab welchem eine PCR Probe als positiv gilt, erhöhen sich Spezifität und positiver Vorhersagewert der quantitativen PCR und gleichen sich den Ergebnissen des Antigennachweises an.

In der vorliegenden Arbeit wurde molekulare Diagnostik für die β -Herpesviren CMV und HHV-6 an einem großen Patientenkollektiv nach allogener Stammzelltransplantation angewendet. Durch Korrelation klinischer Parameter und infektiologischer Daten konnten Risikofaktoren für das Auftreten von Infektionen durch CMV und HHV-6 aufgezeigt werden. Durch die Korrelation von gestörtem thrombozytären Engraftment und frühen HHV-6B Infektionen konnte ein bedeutsamer klinischer Endpunkt definiert werden. Für CMV wurden durch den Vergleich mit dem Antigennachweis Sensitivität und Spezifität der PCR-Diagnostik definiert. Es bleibt zu wünschen, dass sich das zunehmende Wissen über Herpesvirusinfektionen nach allogener Stammzelltransplantation langfristig zum Nutzen der Patienten umsetzen lässt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Urbano-Ispizua, A.; Schmitz, N.; de Witte, T.; Frassoni, F.; Rosti, G.; Schrezenmeier, H.; Gluckman, E.; Friedrich, W.; Cordonnier, C.; Socie, G.; Tyndall, A.; Niethammer, D.; Ljungman, P.; Gratwohl, A.; Apperley, J.; Niederwieser, D. and Bacigalupo, A. (2002): Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe, *Bone Marrow Transplant* (vol. 29), No. 8, pp. 639-46.
- [2] Gratwohl, A.; Schmid, O.; Baldomero, H.; Horisberger, B. and Urbano-Ispizua, A. (2004): Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe 2002. Changes in indication and impact of team density. A report of the EBMT activity survey, *Bone Marrow Transplant* (vol. 34), No. 10, pp. 855-75.
- [3] Jansen, J.; Thompson, J. M.; Dugan, M. J.; Nolan, P.; Wiemann, M. C.; Birhiray, R.; Henslee-Downey, P. J. and Akard, L. P. (2002): Peripheral blood progenitor cell transplantation, *Ther Apher* (vol. 6), No. 1, pp. 5-14.
- [4] Thomas, E. D. (2000): Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation, *World J Surg* (vol. 24), No. 7, pp. 815-8.
- [5] Jacobson, LO; Marks, E.K.; Robson, M.J.; Gaston, E.O. and Zirkle, R.E. (1949): Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation., *J. Lab. Clin. Med.* (vol. 34), p. 1538.
- [6] Lorenz, E.; Uphoff, D.; Reid, T. R. and Shelton, E. (1951): Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections, *J Natl Cancer Inst* (vol. 12), No. 1, pp. 197-201.
- [7] Gatti, R. A.; Meuwissen, H. J.; Allen, H. D.; Hong, R. and Good, R. A. (1968): Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency, *Lancet* (vol. 2), No. 7583, pp. 1366-9.
- [8] Bach, F. H.; Albertini, R. J.; Joo, P.; Anderson, J. L. and Bortin, M. M. (1968): Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome, *Lancet* (vol. 2), No. 7583, pp. 1364-6.
- [9] Krause, D. S.; Fackler, M. J.; Civin, C. I. and May, W. S. (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility, *Blood* (vol. 87), No. 1, pp. 1-13.
- [10] McSweeney, P. A.; Niederwieser, D.; Shizuru, J. A.; Sandmaier, B. M.; Molina, A. J.; Maloney, D. G.; Chauncey, T. R.; Gooley, T. A.; Hegenbart, U.; Nash, R. A.; Radich, J.; Wagner, J. L.; Minor, S.; Appelbaum, F. R.; Bensinger, W. I.; Bryant, E.; Flowers, M. E.; Georges, G. E.; Grumet, F. C.; Kiem, H. P.; Torok-Storb, B.; Yu, C.; Blume, K. G. and Storb, R. F. (2001): Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects, *Blood* (vol. 97), No. 11, pp. 3390-400.
- [11] Ottinger, H. D.; Muller, C. R.; Goldmann, S. F.; Albert, E.; Arnold, R.; Beelen, D. W.; Blasczyk, R.; Bunjes, D.; Casper, J.; Ebell, W.; Ehninger, G.; Eiermann, T.; Einsele, H.; Fauser, A.; Ferencik, S.; Finke, J.; Hertenstein, B.; Heyll, A.; Klingebiel, T.; Knipper, A.; Kremens, B.; Kolb, H. J.; Kolbe, K.; Lenartz, E.; Lindemann, M.; Muller, C. A.; Mytilineos, J.; Niederwieser, D.; Runde, V.; Sayer, H.; Schaefer, U. W.; Schmitz, N.; Schroder, S.; Schulze-Rath, R.; Schwerdtfeger, R.; Siegert, W.; Thiele, B.; Zander, A. R. and Grosse-Wilde, H. (2001): Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells, *Ann Hematol* (vol. 80), No. 12, pp. 706-14.

- [12] Lennard, A. L. and Jackson, G. H. (2000): Stem cell transplantation, *Bmj* (vol. 321), No. 7258, pp. 433-7.
- [13] Ottinger, H.; Grosse-Wilde, M.; Schmitz, A. and Grosse-Wilde, H. (1994): Immunogenetic marrow donor search for 1012 patients: a retrospective analysis of strategies, outcome and costs, *Bone Marrow Transplant* (vol. 14 Suppl 4), pp. S34-8.
- [14] BMDW (2005): Bone Marrow Donors Worldwide, <http://www.bmdw.org>
- [15] Hansen, J. A.; Petersdorf, E.; Martin, P. J. and Anasetti, C. (1997): Hematopoietic stem cell transplants from unrelated donors, *Immunol Rev* (vol. 157), pp. 141-51.
- [16] Szydlo, R.; Goldman, J. M.; Klein, J. P.; Gale, R. P.; Ash, R. C.; Bach, F. H.; Bradley, B. A.; Casper, J. T.; Flomenberg, N.; Gajewski, J. L.; Gluckman, E.; Henslee-Downey, P. J.; Hows, J. M.; Jacobsen, N.; Kolb, H. J.; Lowenberg, B.; Masaoka, T.; Rowlings, P. A.; Sondel, P. M.; van Bekkum, D. W.; van Rood, J. J.; Vowels, M. R.; Zhang, M. J. and Horowitz, M. M. (1997): Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings, *J Clin Oncol* (vol. 15), No. 5, pp. 1767-77.
- [17] Petersdorf, E. W.; Gooley, T. A.; Anasetti, C.; Martin, P. J.; Smith, A. G.; Mickelson, E. M.; Woolfrey, A. E. and Hansen, J. A. (1998): Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient, *Blood* (vol. 92), No. 10, pp. 3515-20.
- [18] Petersdorf, E. W.; Anasetti, C.; Martin, P. J. and Hansen, J. A. (2003): Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation, *Tissue Antigens* (vol. 61), No. 1, pp. 1-11.
- [19] Morishima, Y.; Sasazuki, T.; Inoko, H.; Juji, T.; Akaza, T.; Yamamoto, K.; Ishikawa, Y.; Kato, S.; Sao, H.; Sakamaki, H.; Kawa, K.; Hamajima, N.; Asano, S. and Kodera, Y. (2002): The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors, *Blood* (vol. 99), No. 11, pp. 4200-6.
- [20] Goodman, J. W. and Hodgson, G. S. (1962): Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice, *Blood* (vol. 19), pp. 702-14.
- [21] Korbling, M.; Burke, P.; Braine, H.; Elfenbein, G.; Santos, G. and Kaizer, H. (1981): Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia, *Exp Hematol* (vol. 9), No. 6, pp. 684-90.
- [22] Kessinger, A.; Armitage, J. O.; Landmark, J. D. and Weisenburger, D. D. (1986): Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells, *Exp Hematol* (vol. 14), No. 3, pp. 192-6.
- [23] Olavarria, E. and Kanfer, E. J. (2000): Selection and use of chemotherapy with hematopoietic growth factors for mobilization of peripheral blood progenitor cells, *Curr Opin Hematol* (vol. 7), No. 3, pp. 191-6.
- [24] Tarella, C.; Benedetti, G.; Caracciolo, D.; Castellino, C.; Cherasco, C.; Bondesan, P.; Omede, P.; Ruggieri, D.; Gianni, A. M. and Pileri, A. (1995): Both early and committed haemopoietic progenitors are more frequent in peripheral blood than in bone marrow during mobilization induced by high-dose chemotherapy + G-CSF, *Br J Haematol* (vol. 91), No. 3, pp. 535-43.

- [25] Powles, R.; Mehta, J.; Kulkarni, S.; Treleaven, J.; Millar, B.; Marsden, J.; Shepherd, V.; Rowland, A.; Sirohi, B.; Tait, D.; Horton, C.; Long, S. and Singhal, S. (2000): Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial, *Lancet* (vol. 355), No. 9211, pp. 1231-7.
- [26] Korbling, M. and Anderlini, P. (2001): Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter?, *Blood* (vol. 98), No. 10, pp. 2900-8.
- [27] Champlin, R. E.; Schmitz, N.; Horowitz, M. M.; Chapuis, B.; Chopra, R.; Cornelissen, J. J.; Gale, R. P.; Goldman, J. M.; Loberiza, F. R., Jr.; Hertenstein, B.; Klein, J. P.; Montserrat, E.; Zhang, M. J.; Ringden, O.; Tomany, S. C.; Rowlings, P. A.; Van Hoef, M. E. and Gratwohl, A. (2000): Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), *Blood* (vol. 95), No. 12, pp. 3702-9.
- [28] Brown, R. A.; Adkins, D.; Khoury, H.; Vij, R.; Goodnough, L. T.; Shenoy, S. and DiPersio, J. F. (1999): Long-term follow-up of high-risk allogeneic peripheral-blood stem-cell transplant recipients: graft-versus-host disease and transplant-related mortality, *J Clin Oncol* (vol. 17), No. 3, pp. 806-12.
- [29] Gluckman, E.; Rocha, V. and Chastang, C. (1999): Peripheral stem cells in bone marrow transplantation. Cord blood stem cell transplantation, *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* (vol. 12), No. 1-2, pp. 279-92.
- [30] Slavin, S.; Nagler, A.; Naparstek, E.; Kapelushnik, Y.; Aker, M.; Cividalli, G.; Varadi, G.; Kirschbaum, M.; Ackerstein, A.; Samuel, S.; Amar, A.; Brautbar, C.; Ben-Tal, O.; Eldor, A. and Or, R. (1998): Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases, *Blood* (vol. 91), No. 3, pp. 756-63.
- [31] Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; Sondel, P. M.; Goldman, J. M.; Kersey, J.; Kolb, H. J.; Rimm, A. A.; Ringden, O.; Rozman, C.; Speck, B. and et al. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation, *Blood* (vol. 75), No. 3, pp. 555-62.
- [32] Kolb, H. J.; Schattenberg, A.; Goldman, J. M.; Hertenstein, B.; Jacobsen, N.; Arcese, W.; Ljungman, P.; Ferrant, A.; Verdonck, L.; Niederwieser, D.; van Rhee, F.; Mittermueller, J.; de Witte, T.; Holler, E. and Ansari, H. (1995): Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients, *Blood* (vol. 86), No. 5, pp. 2041-50.
- [33] Khouri, I. F.; Keating, M.; Korbling, M.; Przepiorka, D.; Anderlini, P.; O'Brien, S.; Giralt, S.; Ippoliti, C.; von Wolff, B.; Gajewski, J.; Donato, M.; Claxton, D.; Ueno, N.; Andersson, B.; Gee, A. and Champlin, R. (1998): Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies, *J Clin Oncol* (vol. 16), No. 8, pp. 2817-24.
- [34] Giralt, S.; Estey, E.; Albitar, M.; van Besien, K.; Rondon, G.; Anderlini, P.; O'Brien, S.; Khouri, I.; Gajewski, J.; Mehra, R.; Claxton, D.; Andersson, B.; Beran, M.; Przepiorka, D.; Koller, C.; Kornblau, S.; Korbling, M.; Keating, M.; Kantarjian, H. and Champlin, R. (1997): Engraftment of allogeneic hematopoietic

- progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy, *Blood* (vol. 89), No. 12, pp. 4531-6.
- [35] Barrett, J. and Childs, R. (2000): Non-myeloablative stem cell transplants, *Br J Haematol* (vol. 111), No. 1, pp. 6-17.
- [36] Gratwohl, A.; Baldomero, H.; Passweg, J. and Urbano-Ispizua, A. (2002): Increasing use of reduced intensity conditioning transplants: report of the 2001 EBMT activity survey, *Bone Marrow Transplant* (vol. 30), No. 12, pp. 813-31.
- [37] EBMT (2002): European Group for Blood and Marrow Transplantation, <http://ebmt.org>
- [38] Bensinger, W. I.; Martin, P. J.; Storer, B.; Clift, R.; Forman, S. J.; Negrin, R.; Kashyap, A.; Flowers, M. E.; Lilleby, K.; Chauncey, T. R.; Storb, R. and Appelbaum, F. R. (2001): Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers, *N Engl J Med* (vol. 344), No. 3, pp. 175-81.
- [39] Gratwohl, A.; Hermans, J.; Apperley, J.; Arcese, W.; Bacigalupo, A.; Bandini, G.; di Bartolomeo, P.; Boogaerts, M.; Bosi, A.; Carreras, E. and et al. (1995): Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Blood* (vol. 86), No. 2, pp. 813-8.
- [40] Billingham, R. E. (1966): The biology of graft-versus-host reactions, *Harvey Lect* (vol. 62), pp. 21-78.
- [41] Hiddemann, W.; Huber, H. and Bartram, C. R. (2004): *Die Onkologie, Teil 1*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [42] Przepiorka, D.; Smith, T. L.; Folloder, J.; Khouri, I.; Ueno, N. T.; Mehra, R.; Korbling, M.; Huh, Y. O.; Giralt, S.; Gajewski, J.; Donato, M.; Cleary, K.; Claxton, D.; Braunschweig, I.; van Besien, K.; Andersson, B. S.; Anderlini, P. and Champlin, R. (1999): Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation, *Blood* (vol. 94), No. 4, pp. 1465-70.
- [43] Weisdorf, D.; Hakke, R.; Blazar, B.; Miller, W.; McGlave, P.; Ramsay, N.; Kersey, J. and Filipovich, A. (1991): Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation, *Transplantation* (vol. 51), No. 6, pp. 1197-203.
- [44] Beatty, P. G.; Clift, R. A.; Mickelson, E. M.; Nisperos, B. B.; Flournoy, N.; Martin, P. J.; Sanders, J. E.; Stewart, P.; Buckner, C. D.; Storb, R. and et al. (1985): Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings, *N Engl J Med* (vol. 313), No. 13, pp. 765-71.
- [45] Atkinson, K.; Horowitz, M. M.; Gale, R. P.; van Bekkum, D. W.; Gluckman, E.; Good, R. A.; Jacobsen, N.; Kolb, H. J.; Rimm, A. A.; Ringden, O. and et al. (1990): Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation, *Blood* (vol. 75), No. 12, pp. 2459-64.
- [46] Einsele, H.; Bertz, H.; Beyer, J.; Kiehl, M. G.; Runde, V.; Kolb, H. J.; Holler, E.; Beck, R.; Schwerdfeger, R.; Schumacher, U.; Hebart, H.; Martin, H.; Kienast, J.; Ullmann, A. J.; Maschmeyer, G.; Kruger, W.; Niederwieser, D.; Link, H.; Schmidt, C. A.; Oettle, H. and Klingebiel, T. (2003): Infectious complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the

- German Society of Hematology and Oncology (DGHO), *Ann Hematol* (vol. 82 Suppl 2), pp. S175-85.
- [47] Leather, H. L. and Wingard, J. R. (2001): Infections following hematopoietic stem cell transplantation, *Infect Dis Clin North Am* (vol. 15), No. 2, pp. 483-520.
- [48] Meyers, J. D. (1984): Infections in marrow recipients, Mandell, GL et al., *Principales and practice of infectious diseases*, Wiley, New York.
- [49] Junghanss, C.; Marr, K. A.; Carter, R. A.; Sandmaier, B. M.; Maris, M. B.; Maloney, D. G.; Chauncey, T.; McSweeney, P. A. and Storb, R. (2002): Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study, *Biol Blood Marrow Transplant* (vol. 8), No. 9, pp. 512-20.
- [50] Modrow, S.; Falke, D. and Truyen, U (2003): *Molekulare Virologie*, 2. ed., Spektrum, Akad. Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, ISBN: 3-8274-1086-X.
- [51] Compton, T; Nowlin, D.M. and Cooper, N.R. (1993): Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate, *Virology* (vol. 193), pp. 834-841.
- [52] Rasmussen, L. (1999): Molecular pathogenesis of human cytomegalovirus infection, *Transpl Infect Dis* (vol. 1), No. 2, pp. 127-34.
- [53] Reschke, M, <http://biografix.de>
- [54] Schirmer, E. C.; Wyatt, L. S.; Yamanishi, K.; Rodriguez, W. J. and Frenkel, N. (1991): Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 88), No. 13, pp. 5922-6.
- [55] (1993): Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature, *Arch Virol* (vol. 129), No. 1-4, pp. 363-6.
- [56] Isegawa, Y.; Mukai, T.; Nakano, K.; Kagawa, M.; Chen, J.; Mori, Y.; Sunagawa, T.; Kawanishi, K.; Sashihara, J.; Hata, A.; Zou, P.; Kosuge, H. and Yamanishi, K. (1999): Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B, *J Virol* (vol. 73), No. 10, pp. 8053-63.
- [57] Dominguez, G.; Dambaugh, T. R.; Stamey, F. R.; Dewhurst, S.; Inoue, N. and Pellett, P. E. (1999): Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A, *J Virol* (vol. 73), No. 10, pp. 8040-52.
- [58] Nicholas, J. (1994): Nucleotide sequence analysis of a 21-kbp region of the genome of human herpesvirus-6 containing homologues of human cytomegalovirus major immediate-early and replication genes, *Virology* (vol. 204), No. 2, pp. 738-50.
- [59] Morris, C.; Luppi, M.; McDonald, M.; Barozzi, P. and Torelli, G. (1999): Fine mapping of an apparently targeted latent human herpesvirus type 6 integration site in chromosome band 17p13.3, *J Med Virol* (vol. 58), No. 1, pp. 69-75.
- [60] Daibata, M.; Taguchi, T.; Nemoto, Y.; Taguchi, H. and Miyoshi, I. (1999): Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA, *Blood* (vol. 94), No. 5, pp. 1545-9.
- [61] Krech, U. (1973): Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world, *Bull World Health Organ* (vol. 49), No. 1, pp. 103-6.
- [62] Griffiths, P. D.; Clark, D. A. and Emery, V. C. (2000): Betaherpesviruses in transplant recipients, *J Antimicrob Chemother* (vol. 45 Suppl T3), pp. 29-34.

- [63] Dockrell, D. H. (2003): Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features, *J Med Microbiol* (vol. 52), No. Pt 1, pp. 5-18.
- [64] Hall, C. B.; Caserta, M. T.; Schnabel, K. C.; Long, C.; Epstein, L. G.; Insel, R. A. and Dewhurst, S. (1998): Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A, *Clin Infect Dis* (vol. 26), No. 1, pp. 132-7.
- [65] Clark, D. A. (2000): Human herpesvirus 6, *Rev Med Virol* (vol. 10), No. 3, pp. 155-73.
- [66] van Loon, N. M.; Gummuluru, S.; Sherwood, D. J.; Marentes, R.; Hall, C. B. and Dewhurst, S. (1995): Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs, *Clin Infect Dis* (vol. 21), No. 4, pp. 1017-9.
- [67] Sissons, J. G. and Carmichael, A. J. (2002): Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection, *J Infect* (vol. 44), No. 2, pp. 78-83.
- [68] Gandhi, M. K. and Khanna, R. (2004): Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments, *Lancet Infect Dis* (vol. 4), No. 12, pp. 725-38.
- [69] Griffiths, P. D. and Baboonian, C. (1984): A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report, *Br J Obstet Gynaecol* (vol. 91), No. 4, pp. 307-15.
- [70] Stagno, S.; Pass, R. F.; Dworsky, M. E.; Henderson, R. E.; Moore, E. G.; Walton, P. D. and Alford, C. A. (1982): Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection, *N Engl J Med* (vol. 306), No. 16, pp. 945-9.
- [71] Boppana, S. B.; Pass, R. F.; Britt, W. J.; Stagno, S. and Alford, C. A. (1992): Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality, *Pediatr Infect Dis J* (vol. 11), No. 2, pp. 93-9.
- [72] Yamanishi, K.; Okuno, T.; Shiraki, K.; Takahashi, M.; Kondo, T.; Asano, Y. and Kurata, T. (1988): Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum, *Lancet* (vol. 1), No. 8594, pp. 1065-7.
- [73] Pruksananonda, P.; Hall, C. B.; Insel, R. A.; McIntyre, K.; Pellett, P. E.; Long, C. E.; Schnabel, K. C.; Pincus, P. H.; Stamey, F. R.; Dambaugh, T. R. and et al. (1992): Primary human herpesvirus 6 infection in young children, *N Engl J Med* (vol. 326), No. 22, pp. 1445-50.
- [74] Hall, C. B.; Long, C. E.; Schnabel, K. C.; Caserta, M. T.; McIntyre, K. M.; Costanzo, M. A.; Knott, A.; Dewhurst, S.; Insel, R. A. and Epstein, L. G. (1994): Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation, *N Engl J Med* (vol. 331), No. 7, pp. 432-8.
- [75] Goodman, A. D.; Mock, D. J.; Powers, J. M.; Baker, J. V. and Blumberg, B. M. (2003): Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions, *J Infect Dis* (vol. 187), No. 9, pp. 1365-76.
- [76] Carrigan, D. R.; Harrington, D. and Knox, K. K. (1996): Subacute leukoencephalitis caused by CNS infection with human herpesvirus-6 manifesting as acute multiple sclerosis, *Neurology* (vol. 47), No. 1, pp. 145-8.
- [77] Di Luca, D.; Dolcetti, R.; Mirandola, P.; De Re, V.; Secchiero, P.; Carbone, A.; Boiocchi, M. and Cassai, E. (1994): Human herpesvirus 6: a survey of presence

- and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders, *J Infect Dis* (vol. 170), No. 1, pp. 211-5.
- [78] Caserta, M. T.; Mock, D. J. and Dewhurst, S. (2001): Human herpesvirus 6, *Clin Infect Dis* (vol. 33), No. 6, pp. 829-33.
- [79] Watanabe, T.; Kawamura, T.; Jacob, S. E.; Aquilino, E. A.; Orenstein, J. M.; Black, J. B. and Blauvelt, A. (2002): Pityriasis rosea is associated with systemic active infection with both human herpesvirus-7 and human herpesvirus-6, *J Invest Dermatol* (vol. 119), No. 4, pp. 793-7.
- [80] Griffiths, P. D.; Cope, A. V.; Hassan-Walker, A. F. and Emery, V. C. (1999): Diagnostic approaches to cytomegalovirus infection in bone marrow and organ transplantation, *Transpl Infect Dis* (vol. 1), No. 3, pp. 179-86.
- [81] Meyers, J. D.; Flournoy, N. and Thomas, E. D. (1986): Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation, *J Infect Dis* (vol. 153), No. 3, pp. 478-88.
- [82] Zaia, J. A. (2002): Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* (vol. 29), No. 8, pp. 633-8.
- [83] Ljungman, P. and Plotkin, S.A. (1995): Workshop of CMV disease: definitions, clinical severity scores, and new syndroms., *Scand J Infect Dis - Suppl* (vol. 99), pp. 87-89.
- [84] Torok-Storb, B.; Boeckh, M.; Hoy, C.; Leisenring, W.; Myerson, D. and Gooley, T. (1997): Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation, *Blood* (vol. 90), No. 5, pp. 2097-102.
- [85] Steffens, H. P.; Podlech, J.; Kurz, S.; Angele, P.; Dreis, D. and Reddehase, M. J. (1998): Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma, *J Virol* (vol. 72), No. 6, pp. 5006-15.
- [86] Boeckh, M.; Nichols, W. G.; Papanicolaou, G.; Rubin, R.; Wingard, J. R. and Zaia, J. (2003): Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies, *Biol Blood Marrow Transplant* (vol. 9), No. 9, pp. 543-58.
- [87] Rubin, R. H. (1989): The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation, *Jama* (vol. 261), No. 24, pp. 3607-9.
- [88] Limaye, A. P.; Bowden, R. A.; Myerson, D. and Boeckh, M. (1997): Cytomegalovirus disease occurring before engraftment in marrow transplant recipients, *Clin Infect Dis* (vol. 24), No. 5, pp. 830-5.
- [89] Hebart, H. and Einsele, H. (2004): Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation, *Hum Immunol* (vol. 65), No. 5, pp. 432-6.
- [90] Ljungman, P.; Aschan, J.; Lewensohn-Fuchs, I.; Carlens, S.; Larsson, K.; Lonnqvist, B.; Mattsson, J.; Sparrelid, E.; Winiarski, J. and Ringden, O. (1998): Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients, *Transplantation* (vol. 66), No. 10, pp. 1330-4.
- [91] Clark, D. A.; Emery, V. C. and Griffiths, P. D. (2003): Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in hematological patients, *Semin Hematol* (vol. 40), No. 2, pp. 154-62.

- [92] Singh, N. and Carrigan, D. R. (1996): Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen, *Ann Intern Med* (vol. 124), No. 12, pp. 1065-71.
- [93] Carrigan, D. R.; Drobyski, W. R.; Russler, S. K.; Tapper, M. A.; Knox, K. K. and Ash, R. C. (1991): Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation, *Lancet* (vol. 338), No. 8760, pp. 147-9.
- [94] Carrigan, D. R. and Knox, K. K. (1995): Bone marrow suppression by human herpesvirus-6: comparison of the A and B variants of the virus, *Blood* (vol. 86), No. 2, pp. 835-6.
- [95] Drobyski, W. R.; Knox, K. K.; Majewski, D. and Carrigan, D. R. (1994): Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient, *N Engl J Med* (vol. 330), No. 19, pp. 1356-60.
- [96] Knox, K. K. and Carrigan, D. R. (1992): In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection, *J Infect Dis* (vol. 165), No. 5, pp. 925-9.
- [97] Yamada, M. (2001): Human herpesviruses 6 and 7: effects on hematopoiesis and mode of transmission, *Jpn J Infect Dis* (vol. 54), No. 2, pp. 47-54.
- [98] Isomura, H.; Yamada, M.; Yoshida, M.; Tanaka, H.; Kitamura, T.; Oda, M.; Nii, S. and Seino, Y. (1997): Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells, *J Med Virol* (vol. 52), No. 4, pp. 406-12.
- [99] Ljungman, P.; Wang, F. Z.; Clark, D. A.; Emery, V. C.; Remberger, M.; Ringden, O. and Linde, A. (2000): High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients, *Br J Haematol* (vol. 111), No. 3, pp. 774-81.
- [100] Maeda, Y.; Teshima, T.; Yamada, M.; Shinagawa, K.; Nakao, S.; Ohno, Y.; Kojima, K.; Hara, M.; Nagafuji, K.; Hayashi, S.; Fukuda, S.; Sawada, H.; Matsue, K.; Takenaka, K.; Ishimaru, F.; Ikeda, K.; Niiya, K. and Harada, M. (1999): Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation, *Br J Haematol* (vol. 105), No. 1, pp. 295-302.
- [101] Wang, F. Z.; Dahl, H.; Linde, A.; Brytting, M.; Ehrnst, A. and Ljungman, P. (1996): Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* (vol. 88), No. 9, pp. 3615-20.
- [102] Cone, R. W.; Huang, M. L.; Corey, L.; Zeh, J.; Ashley, R. and Bowden, R. (1999): Human herpesvirus 6 infections after bone marrow transplantation: clinical and virologic manifestations, *J Infect Dis* (vol. 179), No. 2, pp. 311-8.
- [103] Yoshikawa, T.; Asano, Y.; Ihira, M.; Suzuki, K.; Ohashi, M.; Suga, S.; Kudo, K.; Horibe, K.; Kojima, S.; Kato, K.; Matsuyama, T. and Nishiyama, Y. (2002): Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors, *J Infect Dis* (vol. 185), No. 7, pp. 847-53.
- [104] Wang, F. Z.; Larsson, K.; Linde, A. and Ljungman, P. (2002): Human herpesvirus 6 infection and cytomegalovirus-specific lymphoproliferative responses in allogeneic stem cell transplant recipients, *Bone Marrow Transplant* (vol. 30), No. 8, pp. 521-6.
- [105] DesJardin, J. A.; Gibbons, L.; Cho, E.; Supran, S. E.; Falagas, M. E.; Werner, B. G. and Snyderman, D. R. (1998): Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at

- risk for primary cytomegalovirus infection, *J Infect Dis* (vol. 178), No. 6, pp. 1783-6.
- [106] Dockrell, D. H.; Prada, J.; Jones, M. F.; Patel, R.; Badley, A. D.; Harmsen, W. S.; Illstrup, D. M.; Wiesner, R. H.; Krom, R. A.; Smith, T. F. and Paya, C. V. (1997): Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease, *J Infect Dis* (vol. 176), No. 5, pp. 1135-40.
- [107] Ljungman, P. (2002): Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient, *J Infect Dis* (vol. 186 Suppl 1), pp. S99-S109.
- [108] Peiris, M. (1999): Human herpesvirus-6 (HHV-6) and HHV-7 infections in bone marrow transplant recipients, *Crit Rev Oncol Hematol* (vol. 32), No. 3, pp. 187-96.
- [109] Prentice, H. G.; Gluckman, E.; Powles, R. L.; Ljungman, P.; Milpied, N.; Fernandez Ranada, J. M.; Mandelli, F.; Kho, P.; Kennedy, L. and Bell, A. R. (1994): Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group, *Lancet* (vol. 343), No. 8900, pp. 749-53.
- [110] Meyers, J. D.; Reed, E. C.; Shepp, D. H.; Thornquist, M.; Dandliker, P. S.; Vicary, C. A.; Flournoy, N.; Kirk, L. E.; Kersey, J. H.; Thomas, E. D. and et al. (1988): Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation, *N Engl J Med* (vol. 318), No. 2, pp. 70-5.
- [111] Goodrich, J. M.; Bowden, R. A.; Fisher, L.; Keller, C.; Schoch, G. and Meyers, J. D. (1993): Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant, *Ann Intern Med* (vol. 118), No. 3, pp. 173-8.
- [112] Boeckh, M. and Boivin, G. (1998): Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications, *Clin Microbiol Rev* (vol. 11), No. 3, pp. 533-54.
- [113] Gor, D.; Sabin, C.; Prentice, H. G.; Vyas, N.; Man, S.; Griffiths, P. D. and Emery, V. C. (1998): Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease, *Bone Marrow Transplant* (vol. 21), No. 6, pp. 597-605.
- [114] Reusser, P.; Einsele, H.; Lee, J.; Volin, L.; Rovira, M.; Engelhard, D.; Finke, J.; Cordonnier, C.; Link, H. and Ljungman, P. (2002): Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation, *Blood* (vol. 99), No. 4, pp. 1159-64.
- [115] Bacigalupo, A.; Bregante, S.; Tedone, E.; Isaza, A.; Van Lint, M. T.; Trespi, G.; Occhini, D.; Gualandi, F.; Lamparelli, T. and Marmont, A. M. (1996): Combined foscarnet-ganciclovir treatment for cytomegalovirus infections after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation, *Transplantation* (vol. 62), No. 3, pp. 376-80.
- [116] Ljungman, P.; Deliliers, G. L.; Platzbecker, U.; Matthes-Martin, S.; Bacigalupo, A.; Einsele, H.; Ullmann, J.; Musso, M.; Trenschele, R.; Ribaud, P.; Bornhauser, M.; Cesaro, S.; Crooks, B.; Dekker, A.; Gratecos, N.; Klingebiel, T.; Tagliaferri, E.; Ullmann, A. J.; Wacker, P. and Cordonnier, C. (2001): Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, *Blood* (vol. 97), No. 2, pp. 388-92.

- [117] Yoshikawa, T. (2004): Human herpesvirus 6 infection in hematopoietic stem cell transplant patients, *Br J Haematol* (vol. 124), No. 4, pp. 421-32.
- [118] Rapaport, D.; Engelhard, D.; Tagger, G.; Or, R. and Frenkel, N. (2002): Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients, *Transpl Infect Dis* (vol. 4), No. 1, pp. 10-6.
- [119] Tokimasa, S.; Hara, J.; Osugi, Y.; Ohta, H.; Matsuda, Y.; Fujisaki, H.; Sawada, A.; Kim, J. Y.; Sashihara, J.; Amou, K.; Miyagawa, H.; Tanaka-Taya, K.; Yamanishi, K. and Okada, S. (2002): Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* (vol. 29), No. 7, pp. 595-8.
- [120] Plachter, B.; Wiczorek, L.; Scholl, B. C.; Ziegelmaier, R. and Jahn, G. (1992): Detection of cytomegalovirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides of the large phosphorylated tegument protein pp150, *J Clin Microbiol* (vol. 30), No. 1, pp. 201-6.
- [121] van der Meer, J. T.; Drew, W. L.; Bowden, R. A.; Galasso, G. J.; Griffiths, P. D.; Jabs, D. A.; Katlama, C.; Spector, S. A. and Whitley, R. J. (1996): Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis and Cytomegalovirus Infection, *Antiviral Res* (vol. 32), No. 3, pp. 119-40.
- [122] Pillay, D.; Charman, H.; Lok, J. and Griffiths, P. D. (1992): Detection of cytomegalovirus by a rapid culture system: a comparison of monoclonal antibodies in a clinical setting, *J Virol Methods* (vol. 40), No. 2, pp. 219-24.
- [123] van der Bij, W.; Torensma, R.; van Son, W. J.; Anema, J.; Schirm, J.; Tegzess, A. M. and The, T. H. (1988): Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes, *J Med Virol* (vol. 25), No. 2, pp. 179-88.
- [124] Boeckh, M.; Bowden, R. A.; Gooley, T.; Myerson, D. and Corey, L. (1999): Successful modification of a pp65 antigenemia-based early treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease in allogeneic marrow transplant recipients, *Blood* (vol. 93), No. 5, pp. 1781-2.
- [125] Landry, M. L.; Ferguson, D.; Cohen, S.; Huber, K. and Wetherill, P. (1995): Effect of delayed specimen processing on cytomegalovirus antigenemia test results, *J Clin Microbiol* (vol. 33), No. 1, pp. 257-9.
- [126] Lautenschlager, I.; Linnavuori, K. and Hockerstedt, K. (2000): Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation, *Transplantation* (vol. 69), No. 12, pp. 2561-6.
- [127] Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* (vol. 230), No. 4732, pp. 1350-4.
- [128] Spector, S. A.; Wong, R.; Hsia, K.; Pilcher, M. and Stempien, M. J. (1998): Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients, *J Clin Invest* (vol. 101), No. 2, pp. 497-502.
- [129] Schafer, P. and Laufs, R. (1996): Experience with quantitative PCR for the management of HCMV disease, *Intervirology* (vol. 39), No. 3, pp. 204-12.
- [130] Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J. and Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR, *Genome Res* (vol. 6), No. 10, pp. 986-94.

- [131] Livak, K. J.; Flood, S. J.; Marmaro, J.; Giusti, W. and Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *PCR Methods Appl* (vol. 4), No. 6, pp. 357-62.
- [132] Förster, V.T. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annals of Physics* (Leipzig) (vol. 2), pp. 55-75.
- [133] Mackay, I. M.; Arden, K. E. and Nitsche, A. (2002): Real-time PCR in virology, *Nucleic Acids Res* (vol. 30), No. 6, pp. 1292-305.
- [134] Schetelig, J.; Kroger, N.; Held, T. K.; Thiede, C.; Krusch, A.; Zabelina, T.; Dubiel, M.; Rick, O.; Bornhauser, M.; Ehninger, G.; Zander, A. R. and Siegert, W. (2002): Allogeneic transplantation after reduced conditioning in high risk patients is complicated by a high incidence of acute and chronic graft-versus-host disease, *Haematologica* (vol. 87), No. 3, pp. 299-305.
- [135] Clift, R. A.; Radich, J.; Appelbaum, F. R.; Martin, P.; Flowers, M. E.; Deeg, H. J.; Storb, R. and Thomas, E. D. (1999): Long-term follow-up of a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide for patients receiving allogeneic marrow transplants during chronic phase of chronic myeloid leukemia, *Blood* (vol. 94), No. 11, pp. 3960-2.
- [136] Przepiorka, D.; Khouri, I.; Thall, P.; Mehra, R.; Lee, M. S.; Ippoliti, C.; Giralt, S.; Gajewski, J.; van Besien, K.; Andersson, B.; Korbling, M.; Deisseroth, A. B. and Champlin, R. (1999): Thiotepa, busulfan and cyclophosphamide as a preparative regimen for allogeneic transplantation for advanced chronic myelogenous leukemia, *Bone Marrow Transplant* (vol. 23), No. 10, pp. 977-81.
- [137] NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov>
- [138] Nitsche, A.; Steuer, N.; Schmidt, C. A.; Landt, O.; Ellerbrok, H.; Pauli, G. and Siegert, W. (2000): Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR, *J Clin Microbiol* (vol. 38), No. 7, pp. 2734-7.
- [139] Nitsche, A.; Muller, C. W.; Radonic, A.; Landt, O.; Ellerbrok, H.; Pauli, G. and Siegert, W. (2001): Human herpesvirus 6A DNA is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation, *J Infect Dis* (vol. 183), No. 1, pp. 130-3.
- [140] Schmidt, C. A.; Oettle, H.; Peng, R.; Neuhaus, P.; Blumhardt, G.; Lohmann, R.; Wilborn, F.; Osthoff, K.; Oertel, J.; Timm, H. and et al. (1995): Comparison of polymerase chain reaction from plasma and buffy coat with antigen detection and occurrence of immunoglobulin M for the demonstration of cytomegalovirus infection after liver transplantation, *Transplantation* (vol. 59), No. 8, pp. 1133-8.
- [141] Volin, L.; Lautenschlager, I.; Juvonen, E.; Nihtinen, A.; Anttila, V. J. and Ruutu, T. (2004): Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses, *Br J Haematol* (vol. 126), No. 5, pp. 690-6.
- [142] Secchiero, P.; Carrigan, D. R.; Asano, Y.; Benedetti, L.; Crowley, R. W.; Komaroff, A. L.; Gallo, R. C. and Lusso, P. (1995): Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction, *J Infect Dis* (vol. 171), No. 2, pp. 273-80.
- [143] Allen, U. D.; Tellier, R.; Doyle, J.; Petric, M.; Wasfy, S.; Kumar, P.; Calderwood, S.; Freedman, M. and Saunders, F. (2001): The utility of plasma polymerase chain reaction for human herpes virus-6 among pediatric bone marrow transplant

- recipients: results of a pilot study, *Bone Marrow Transplant* (vol. 28), No. 5, pp. 473-7.
- [144] Ihira, M.; Yoshikawa, T.; Suzuki, K.; Ohashi, M.; Suga, S.; Horibe, K.; Tanaka, N.; Kimura, H.; Kojima, S.; Kato, K.; Matsuyama, T.; Nishiyama, Y. and Asano, Y. (2002): Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR; comparison to detection of viral DNA in plasma by qualitative PCR, *Microbiol Immunol* (vol. 46), No. 10, pp. 701-5.
- [145] Boutolleau, D.; Fernandez, C.; Andre, E.; Imbert-Marcille, B. M.; Milpied, N.; Agut, H. and Gautheret-Dejean, A. (2003): Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients, *J Infect Dis* (vol. 187), No. 2, pp. 179-86.
- [146] Schetelig, J.; Oswald, O.; Steuer, N.; Radonic, A.; Thulke, S.; Held, T. K.; Oertel, J.; Nitsche, A. and Siegert, W. (2003): Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65-antigenemia, *Bone Marrow Transplant* (vol. 32), No. 7, pp. 695-701.
- [147] Cope, A. V.; Sweny, P.; Sabin, C.; Rees, L.; Griffiths, P. D. and Emery, V. C. (1997): Quantity of cytomegalovirus viruria is a major risk factor for cytomegalovirus disease after renal transplantation, *J Med Virol* (vol. 52), No. 2, pp. 200-5.
- [148] Zerr, D. M.; Corey, L.; Kim, H. W.; Huang, M. L.; Nguy, L. and Boeckh, M. (2005): Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation, *Clin Infect Dis* (vol. 40), No. 7, pp. 932-40.
- [149] Dockrell, D. H. and Paya, C. V. (2001): Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation, *Rev Med Virol* (vol. 11), No. 1, pp. 23-36.
- [150] Wilborn, F.; Brinkmann, V.; Schmidt, C. A.; Neipel, F.; Gelderblom, H. and Siegert, W. (1994): Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction, *Blood* (vol. 83), No. 10, pp. 3052-8.
- [151] Sashihara, J.; Tanaka-Taya, K.; Tanaka, S.; Amo, K.; Miyagawa, H.; Hosoi, G.; Taniguchi, T.; Fukui, T.; Kasuga, N.; Aono, T.; Sako, M.; Hara, J.; Yamanishi, K. and Okada, S. (2002): High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients, *Blood* (vol. 100), No. 6, pp. 2005-11.
- [152] Bornhauser, M.; Thiede, C.; Platzbecker, U.; Jenke, A.; Helwig, A.; Plettig, R.; Freiberg-Richter, J.; Rollig, C.; Geissler, G.; Lutterbeck, K.; Oelschlagel, U. and Ehninger, G. (2001): Dose-reduced conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors in 42 patients, *Clin Cancer Res* (vol. 7), No. 8, pp. 2254-62.
- [153] Chakrabarti, S.; Mackinnon, S.; Chopra, R.; Kottaridis, P. D.; Peggs, K.; O'Gorman, P.; Chakraverty, R.; Marshall, T.; Osman, H.; Mahendra, P.; Craddock, C.; Waldmann, H.; Hale, G.; Fegan, C. D.; Yong, K.; Goldstone, A. H.; Linch, D. C. and Milligan, D. W. (2002): High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution, *Blood* (vol. 99), No. 12, pp. 4357-63.
- [154] Mohty, M.; Faucher, C.; Vey, N.; Stoppa, A. M.; Viret, F.; Chabbert, I.; Chabannon, C.; Bouabdallah, R.; Ladaïque, P.; Collet, L.; Zandotti, C.;

- Maraninchi, D. and Blaise, D. (2000): High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation, *Bone Marrow Transplant* (vol. 26), No. 3, pp. 251-5.
- [155] Nichols, W. G.; Corey, L.; Gooley, T.; Drew, W. L.; Miner, R.; Huang, M.; Davis, C. and Boeckh, M. (2001): Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes, *Blood* (vol. 97), No. 4, pp. 867-74.
- [156] Junghanss, C.; Boeckh, M.; Carter, R. A.; Sandmaier, B. M.; Maris, M. B.; Maloney, D. G.; Chauncey, T.; McSweeney, P. A.; Little, M. T.; Corey, L. and Storb, R. (2002): Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study, *Blood* (vol. 99), No. 6, pp. 1978-85.
- [157] Martino, R.; Caballero, M. D.; Canals, C.; San Miguel, J.; Sierra, J.; Rovira, M.; Solano, C.; Bargay, J.; Perez-Simon, J.; Leon, A.; Sarra, J.; Brunet, S. and de la Camara, R. (2001): Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* (vol. 28), No. 4, pp. 341-7.
- [158] Bacigalupo, A.; Lamparelli, T.; Bruzzi, P.; Guidi, S.; Alessandrino, P. E.; di Bartolomeo, P.; Oneto, R.; Bruno, B.; Barbanti, M.; Sacchi, N.; Van Lint, M. T. and Bosi, A. (2001): Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO), *Blood* (vol. 98), No. 10, pp. 2942-7.
- [159] Perez-Simon, J. A.; Kottaridis, P. D.; Martino, R.; Craddock, C.; Caballero, D.; Chopra, R.; Garcia-Conde, J.; Milligan, D. W.; Schey, S.; Urbano-Ispizua, A.; Parker, A.; Leon, A.; Yong, K.; Sureda, A.; Hunter, A.; Sierra, J.; Goldstone, A. H.; Linch, D. C.; San Miguel, J. F. and Mackinnon, S. (2002): Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders, *Blood* (vol. 100), No. 9, pp. 3121-7.
- [160] Kottaridis, P. D.; Milligan, D. W.; Chopra, R.; Chakraverty, R. K.; Chakrabarti, S.; Robinson, S.; Peggs, K.; Verfuerth, S.; Pettengell, R.; Marsh, J. C.; Schey, S.; Mahendra, P.; Morgan, G. J.; Hale, G.; Waldmann, H.; de Elvira, M. C.; Williams, C. D.; Devereux, S.; Linch, D. C.; Goldstone, A. H. and Mackinnon, S. (2000): In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation, *Blood* (vol. 96), No. 7, pp. 2419-25.
- [161] Martino, R.; Caballero, M. D.; Canals, C.; Simon, J. A.; Solano, C.; Urbano-Ispizua, A.; Bargay, J.; Rayon, C.; Leon, A.; Sarra, J.; Odriozola, J.; Conde, J. G.; Sierra, J. and San Miguel, J. (2001): Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study, *Br J Haematol* (vol. 115), No. 3, pp. 653-9.
- [162] Drobyski, W. R.; Dunne, W. M.; Burd, E. M.; Knox, K. K.; Ash, R. C.; Horowitz, M. M.; Flomenberg, N. and Carrigan, D. R. (1993): Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo, *J Infect Dis* (vol. 167), No. 3, pp. 735-9.

- [163] Carrigan, D. R. and Knox, K. K. (1994): Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients, *Blood* (vol. 84), No. 10, pp. 3307-10.
- [164] Rosenfeld, C. S.; Rybka, W. B.; Weinbaum, D.; Carrigan, D. R.; Knox, K. K.; Andrews, D. F. and Shadduck, R. K. (1995): Late graft failure due to dual bone marrow infection with variants A and B of human herpesvirus-6, *Exp Hematol* (vol. 23), No. 7, pp. 626-9.
- [165] Singh, N.; Carrigan, D. R.; Gayowski, T.; Singh, J. and Marino, I. R. (1995): Variant B human herpesvirus-6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient, *Transplantation* (vol. 60), No. 11, pp. 1355-7.
- [166] Johnston, R. E.; Geretti, A. M.; Prentice, H. G.; Clark, A. D.; Wheeler, A. C.; Potter, M. and Griffiths, P. D. (1999): HHV-6-related secondary graft failure following allogeneic bone marrow transplantation, *Br J Haematol* (vol. 105), No. 4, pp. 1041-3.
- [167] Kadakia, M. P.; Rybka, W. B.; Stewart, J. A.; Patton, J. L.; Stamey, F. R.; Elsayy, M.; Pellett, P. E. and Armstrong, J. A. (1996): Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplantation, *Blood* (vol. 87), No. 12, pp. 5341-54.
- [168] Schmidt, C. A.; Oettle, H.; Neuhaus, P.; Wiens, M.; Timm, H.; Wilborn, F. and Siegert, W. (1993): Demonstration of cytomegalovirus by polymerase chain reaction after liver transplantation, *Transplantation* (vol. 56), No. 4, pp. 872-4.
- [169] Schmidt, C. A.; Oettle, H.; Wilborn, F.; Jessen, J.; Timm, H.; Schwerdtfeger, R.; Oertel, J. and Siegert, W. (1994): Demonstration of cytomegalovirus after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction, virus culture and antigen detection in buffy coat leukocytes, *Bone Marrow Transplant* (vol. 13), No. 1, pp. 71-5.
- [170] Gerna, G.; Percivalle, E.; Torsellini, M. and Revello, M. G. (1998): Standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay by means of in vitro-generated pp65-positive peripheral blood polymorphonuclear leukocytes, *J Clin Microbiol* (vol. 36), No. 12, pp. 3585-9.
- [171] Boeckh, M.; Woogerd, P. M.; Stevens-Ayers, T.; Ray, C. G. and Bowden, R. A. (1994): Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia, *J Clin Microbiol* (vol. 32), No. 3, pp. 832-4.
- [172] Nitsche, A.; Steuer, N.; Schmidt, C. A.; Landt, O. and Siegert, W. (1999): Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA, *Clin Chem* (vol. 45), No. 11, pp. 1932-7.
- [173] Li, H.; Dummer, J. S.; Estes, W. R.; Meng, S.; Wright, P. F. and Tang, Y. W. (2003): Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients, *J Clin Microbiol* (vol. 41), No. 1, pp. 187-91.
- [174] Tanaka, Y.; Kanda, Y.; Kami, M.; Mori, S.; Hamaki, T.; Kusumi, E.; Miyakoshi, S.; Nannya, Y.; Chiba, S.; Arai, Y.; Mitani, K.; Hirai, H. and Mutou, Y. (2002): Monitoring cytomegalovirus infection by antigenemia assay and two distinct plasma real-time PCR methods after hematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant* (vol. 30), No. 5, pp. 315-9.
- [175] Yakushiji, K.; Gondo, H.; Kamezaki, K.; Shigematsu, K.; Hayashi, S.; Kuroiwa, M.; Taniguchi, S.; Ohno, Y.; Takase, K.; Numata, A.; Aoki, K.; Kato, K.; Nagafuji,

- K.; Shimoda, K.; Okamura, T.; Kinukawa, N.; Kasuga, N.; Sata, M. and Harada, M. (2002): Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction, *Bone Marrow Transplant* (vol. 29), No. 7, pp. 599-606.
- [176] Griscelli, F.; Barrois, M.; Chauvin, S.; Lastere, S.; Bellet, D. and Bourhis, J. H. (2001): Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR, *J Clin Microbiol* (vol. 39), No. 12, pp. 4362-9.
- [177] Leruez-Ville, M.; Ouachee, M.; Delarue, R.; Sauget, A. S.; Blanche, S.; Buzyn, A. and Rouzioux, C. (2003): Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma, *J Clin Microbiol* (vol. 41), No. 5, pp. 2040-6.
- [178] Boivin, G.; Belanger, R.; Delage, R.; Beliveau, C.; Demers, C.; Goyette, N. and Roy, J. (2000): Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR PCR test after blood and marrow allogeneic transplantation, *J Clin Microbiol* (vol. 38), No. 12, pp. 4356-60.
- [179] Barrett-Muir, W.; Breuer, J.; Millar, C.; Thomas, J.; Jeffries, D.; Yaqoob, M. and Aitken, C. (2000): CMV viral load measurements in whole blood and plasma-- which is best following renal transplantation?, *Transplantation* (vol. 70), No. 1, pp. 116-9.
- [180] Schafer, P.; Tenschert, W.; Cremaschi, L.; Schroter, M.; Zollner, B. and Laufs, R. (2001): Area under the viraemia curve versus absolute viral load: utility for predicting symptomatic cytomegalovirus infections in kidney transplant patients, *J Med Virol* (vol. 65), No. 1, pp. 85-9.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

aGvHD	Akute Graft-versus-Host-Erkrankung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase
ATG	Antithymozytenglobulin
BUS	Busulfan
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cGvHD	Chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CSA	Ciclosporin A
C _T	Schwellenzyklus (engl. threshold cycle)
CY	Cyclophosphamid
DLI	Donor lymphocyte infusion
DNA	Desoxy-ribonucleic-acid
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DR	Dosisreduzierte Konditionierung
E	Empfänger
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Ezyme Linked Immunosorbent Assay
FAM	Verwandter Spender
FAM	6-Carboxyfluorescein
FK 605	Tacrolimus
FLU	Fludarabin
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FS	Fremdspender
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukemia-Effect
HD	Hochdosis Konditionierung
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSV	Herpes simplex Virus
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle

II	Interleukin
KI	Konfidenzintervall
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MH	Morbus Hodgkin
MHC	Major histocompatibility complex
MM	Mismatch
MM	Multiples Myelom
MMF	Mycophenolat Mofetil
MNC	Mononucleäre Zellen
mRNA	Messenger RNA
MTX	Methotrexat
NA	nicht anwendbar
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OD	optische Dichte
p	Signifikanz
PBL	periphere Blutleukozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBSZT	periphere Blutstammzelltransplantation
qPCR	Quantitative real-time PCR
RNA	Ribonucleic-acid
ROX	Carboxy-X-Rhodamine
RR	relatives Risiko
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SAA	Schwere Aplasitische Anämie
S	Spender
SIB	HLA-identisches Geschwister
SZT	Stammzelltransplantation
TAMRA	5-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TBI	Total body irradiation
TE	Tris-EDTA-Lösung
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRM	Transplantationsassoziierte Mortalität
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VP 16	Etoposid
vs	versus
VZV	Varizella-Zoster-Virus

7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1-1: Indikationen für eine allogene Stammzelltransplantation 2002.....	6
Tabelle 1-2: Klassifikation der humanen Herpesviren.....	10
Tabelle 2-1: Patientencharakteristika (n= 82)	28
Tabelle 2-2: Primer für die qualitative PCR	31
Tabelle 2-3: CMV: Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die qualitative PCR	31
Tabelle 2-4: HHV-6: Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die qualitative PCR	31
Tabelle 2-5: Primer und Sonden für die qPCR der untersuchten Viren	34
Tabelle 2-6: Reaktionsansätze der qPCR-Assays für die untersuchten Viren.....	35
Tabelle 2-7: Temperaturprofile für die qPCR Assays für die untersuchten Viren	35
Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Puffer für den Antigennachweis	38
Tabelle 2-9: Reagenzien und Materialien.....	40
Tabelle 3-1: Häufigkeit einer Virämiedauer >5 Tage für die untersuchten Viren	44
Tabelle 3-2: Zeitliche Abfolge des Virusnachweises.....	46
Tabelle 3-3: Univariate Analyse der Risikofaktoren für einen CMV DNA Nachweis.....	48
Tabelle 3-4: Univariate Analyse der Risikofaktoren für einen CMV DNA Nachweis in Folge	49
Tabelle 3-5: Univariate Analyse der Risikofaktoren für einen HHV-6A und –6B Nachweis (82 Patienten).....	50
Tabelle 3-6: Risikofaktoren für ein verzögertes Engraftment der Thrombozyten.....	54
Tabelle 3-7: Basisdaten und klinischer Verlauf der Patienten mit einer frühen HHV-6B Infektion	55
Tabelle 3-8: Nachweis von CMV im Probenmaterial der untersuchten Patienten	57
Tabelle 3-9: Nachweis von CMV im Probenmaterial der untersuchten Patienten	58
Tabelle 3-10: Patienten mit CMV Organerkrankung	61
Tabelle 3-11: Nachweis von CMV DNA in Abhängigkeit einer CMV Organerkrankung in den untersuchten Patienten.....	64
Tabelle 3-12: Antigennachweis in Abhängigkeit einer CMV Organerkrankung in den untersuchten Patienten.....	64
Tabelle 3-13: Nachweis von CMV DNA > 7.500 ge/ml in der qPCR in Abhängigkeit einer CMV Organerkrankung in den untersuchten Patienten.....	65

7.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1: Infektionen an verschiedenen Zeitpunkten nach SZT	9
Abbildung 1-2: Schematische (links) und elektronenmikroskopische (rechts) Darstellung eines β -Herpesvirus.....	12
Abbildung 1-3: Funktionsprinzip des Sondenabbaus und der Fluoreszenzemission der real-time PCR im TaqMan Format.	24
Abbildung 2-1: Amplifikationskurven der HHV-6A qPCR	36
Abbildung 2-2: Standardgerade der HHV-6A qPCR	37
Abbildung 3-1: Wahrscheinlichkeit für einen Virusnachweis.....	42
Abbildung 3-2: Vergleich der maximalen Virus DNA Last der untersuchten Viren	43
Abbildung 3-3: Dauer des Virusnachweises.....	44
Abbildung 3-4: Erstmaliger Nachweis von Virus-DNA	45
Abbildung 3-5: Anzahl der Patienten mit Virusnachweis.....	46
Abbildung 3-6: Vergleich der maximalen CMV DNA Last bei Patienten mit und ohne akuter GvHD	48
Abbildung 3-7: Konditionierung und Therapie-assoziierte Mortalität	52
Abbildung 3-8: Einfluss von frühen HHV-6B Infektionen auf das Engraftment der Thrombozyten.....	53
Abbildung 3-9: Frühe HHV-6B Infektionen und behandlungsassoziierte Mortalität	56
Abbildung 3-10: Erstmaliger Virusnachweis.....	58
Abbildung 3-11: Korrelation der CMV DNA Last mit der Anzahl antigenpositiver Zellen.....	59
Abbildung 3-12: CMV DNA Last bei Gruppierung der Ergebnisse des Antigennachweises	60
Abbildung 3-13: Verlauf der CMV Infektion des Patienten UPN 876	62
Abbildung 3-14: Maximale CMV DNA Last der Patienten mit und ohne CMV Organerkrankung.....	63
Abbildung 3-15: Maximale Anzahl der antigenpositiven Zellen der Patienten mit und ohne Organerkrankung.....	63

7.4 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Siegert, zum einen für die Vergabe dieses Themas, zum anderen für die ausgesprochen freundliche und geduldige Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Johannes Schetelig, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand, vielen Dank für die exzellente Betreuung. Für die Einführung in die Welt des Forschens und die intensive fachliche Betreuung des experimentellen Teils meiner Arbeit möchte ich Herrn Dr. Andreas Nitsche herzlich danken. Vielen lieben Dank an das „Herz“ unseres Labors Delia Barz, Dr. Stefanie Thulke und Aleksandar Radonic, sowie an meine Mitdoktoranden für die ganze Hilfe und Unterstützung und die schönen Stunden im und außerhalb des Labors. Zu guter Letzt gilt mein ausdrücklicher Dank meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, danke für die jahrelange Motivierung und Unterstützung. Einen ganz besonderen Dank meiner Omi, Frau Dr. Hildegard Völker, der ich diese Arbeit widmen möchte.

7.5 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.6 Veröffentlichungen/ Kongressbeiträge

Schetelig J, Oswald O, Steuer N, Radonic A, Thulke S, Held TK, Oertel J, Nitsche A, Siegert W.
Cytomegalovirus infections in allogeneic stem cell recipients after reduced-intensity or myeloablative conditioning assessed by quantitative PCR and pp65- antigenemia.
Bone Marrow Transplantation, 2003 Oct; 32 (7): 695- 701.

Nitsche A, Oswald O, Steuer N, Schetelig J, Radonic A, Thulke S, Siegert W.
Quantitative real-time PCR compared with pp65 antigen detection for cytomegalovirus (CMV) in 1122 blood specimens from 77 patients after allogeneic stem cell transplantation: Which test better predicts CMV disease development.
Clinical Chemistry. 2003 Oct; 49 (10): 1683-5.

Radonic A, Oswald O, Thulke S, Brockhaus N, Nitsche A, Siegert W, Schetelig J.
Infections with human herpesvirus 6 delay platelet engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
British Journal of Haematology, 2005 Nov; 131 (4):480-2

DGHO- Kongress Oktober 2002 (München), Poster:

Oswald O, Schetelig J, Steuer N, Nitsche A, Siegert W.
Incidence of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation:
A comparison of dose reduced and myeloablative conditioning

Oswald O, Steuer N, Schetelig J, Nitsche A, Siegert W.
Comparison of HCMV antigenemia assay and quantitative PCR of BMT patients.

Tagung der Gesellschaft für Virologie im März 2003 (Berlin), Poster:

Oswald O, Steuer N, Schetelig J, Nitsche A, Siegert W.
Influence of the conditioning regime of bone marrow transplantation on the incidence of cytomegalovirus infection.

DGHO- Kongress Oktober 2003 (Basel), Poster:

Oswald O, Steuer N, Schetelig J, Nitsche A, Siegert W.
Incidence and risk factors of human herpes virus infection after bone marrow transplantation.

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 29.02.2008