

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Institut für Medizinische Virologie
Direktor: Prof. Dr. med. H.W. Doerr

Präanalytik zur HCMV-Diagnostik

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Gabrielle Travers-Podmaniczky
aus Laval (Frankreich)

Tübingen, 2010

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. H.W. Doerr

Koreferent: Prof. Dr. J. Lötsch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Humane Cytomegalovirus.....	1
1.1.1 Klassifikation.....	1
1.1.2 Morphologie und Genomstruktur.....	1
1.1.3 Viruswachstum.....	2
1.2 Epidemiologie.....	3
1.2.1 Seroepidemiologie der HCMV-Infektion.....	3
1.2.2 Übertragungswege der HCMV-Infektion.....	3
1.2.3 Vertikale Infektion.....	4
1.2.3.1 Intrauterine Infektion.....	4
1.2.3.2 Perinatale Infektion.....	5
1.3 Pathogenese der HCMV-Infektion.....	6
1.3.1 Allgemeine Pathogenese.....	6
1.3.2 Pathogenese der kongenitalen Infektion.....	6
1.4 Klinik der HCMV-Infektion.....	8
1.4.1 Kongenitale Infektion.....	8
1.4.1.1 Symptomatische Infektion.....	8
1.4.1.2 Asymptomatische Infektion.....	9
1.4.2 Perinatale Infektion.....	10
1.5 Diagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion.....	11
1.5.1 Klinische Proben.....	11
1.5.2 Zellkulturverfahren.....	11
1.5.3 HCMV-DNA Nachweis.....	12
1.5.4 Die Relevanz quantitativer Nachweismethoden.....	13
1.6 Prävention und Therapie der HCMV-Infektion bei Neugeborenen.....	14
1.6.1 Prävention durch Aufklärung und Beratung.....	14
1.6.2 Prävention durch Impfung.....	14
1.6.3 Therapie.....	15
2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
3 Material und Methoden.....	19
3.1 Untersuchungsproben.....	19
3.1.1 Filterpapiere.....	19
3.1.2 Dilutionsreihen.....	20
3.1.3 Klinische Proben.....	20
3.2 Bestimmung der optimalen Stanzengröße.....	21
3.3 Interne Kontrolle.....	21
3.4 Sensitivitätsbestimmung der Methode mit Standards und Proben bekannter Konzentration.....	22
3.5 Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung der Methode mit klinischen Proben.....	22
3.6 Testung der klinischen Anwendbarkeit.....	22
3.7 Virusisolierung aus der Zellkultur.....	23
3.7.1 „Shell Vial“-Verfahren.....	23
3.7.2 Färbung mit monoklonalen Antikörpern.....	24
3.8 Virus-DNA Isolierung.....	27
3.8.1 DNA Isolierung aus Filterpapier.....	27
3.8.2 DNA-Extraktion.....	28
3.8.2.1 mittels QIAamp RNA-Extraktion.....	29
3.8.2.2 mittels QIAamp DNA-Extraktion (manuelle Extraktion).....	30

3.9	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Taq Man)	32
3.9.1	Prinzip der Real-Time Taq Man PCR	32
3.9.2	Materialien und Durchführung	33
4	Ergebnisse	37
4.1	Bestimmung der optimalen Stanzengröße	37
4.2	Interne Kontrolle	38
4.3	Sensitivitätsbestimmung der Methode mit Dilutionsreihen	39
4.3.1	HCMV AD 169 Dilutionsreihen	39
4.3.2	Dilutionsreihen aus hoch positiven Proben	42
4.4	Sensitivität und Spezifität der Methode bei Testung klinischer Proben	43
4.4.1	Mittels Indicating FTA [®] Classic Card	43
4.4.2	Mittels FTA Elute- und 903 [®] Specimen Collection-Paper	47
4.5	Testung der klinischen Anwendbarkeit	51
5	Diskussion	53
5.1	Technische Aspekte	53
5.2	Sensitivitätsbestimmung mittels Dilutionsreihen	54
5.3	Sensitivität und Spezifität bei klinischen Proben	56
5.4	Quantifizierung	58
	Zusammenfassung	61
	Summary	63
	Literaturverzeichnis	65
	Abbildungsverzeichnis	73
	Tabellenverzeichnis	75
	Danksagung	77
	Ehrenwörtliche Erklärung	79
	Curriculum Vitae	81

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACE	Amino-Ethyl-Carbazol
CMV	CytomegaloVirus
CT	Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
gB	Glykoprotein B
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
MAK	Monoklonale Antikörper
MCMV	Maus Cytomegalovirus
MEM	Minimal Essential Medium
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pp	Phosphoprotein
PMNL	Polymorphonuklear Leukocytes
RT	Raumtemperatur
STD	Sexuell Transmitted Disease
Tab	Tabelle
ZKI	Zentrum Kinderheilkunde
ZNS	Zentral Nervöses System

1 Einleitung

1.1 Das Humane Cytomegalovirus

1.1.1 Klassifikation

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviridae. Die Familie der Herpesviridae wurde durch die Herpesvirus Study Group des International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) in drei Unterfamilien eingeteilt. Das HCMV zählt mit den humanen Herpesviren 6A, 6B und 7, und dem Muromegalovirus (MCMV) zu den Betaherpesviridae. Weitere Vertreter dieser Familie sind das Herpes simplex Virus 1, das Herpes simplex Virus 2 und das Varizella Zoster Virus, die zum Genus alphaherpesviridae gehören, sowie das Epstein-Barr-Virus und das humane Herpes simplex Virus 8 die zum Genus gammaherpesviridae gezählt werden. Charakteristisch für Virionen aus der Herpesgruppe sind eine lineare Doppelstrang-DNA, ein ikosaedrisches Kapsid, ein Tegument und eine äußere pleomorphe Hülle. Des Weiteren zeigen Herpesviren gemeinsame biologische Eigenschaften: eine für die Klinik sehr bedeutende Eigenschaft ist die Fähigkeit, im Wirtsorganismus zu persistieren und im Latenzzustand zu verweilen. Das Virus ist in latent infizierten Zellen zwar nachweisbar, zeigt jedoch keine, oder so gut wie keine Replikation. Mehrere Monate oder Jahre nach einer Primärinfektion kann das Virus durch unterschiedliche Faktoren reaktiviert werden und zum Wiederauftreten der Erkrankung führen. Die Mitglieder der verschiedenen Unterfamilien unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften. Die Betaherpesviridae zeichnen sich durch ein langsames Viruswachstum aus und führen durch Ansammlung von Virionen in Nukleus und Golgiapparat zu einer Vergrößerung der infizierten Zelle. (Roizman et al., 2001).

1.1.2 Morphologie und Genomstruktur

Mit einem Durchmesser von etwa 200-250 nm ist HCMV das größte Virus in der Gruppe der Herpesviren. Das Nukleokapsid setzt sich aus einem 240 Kb großen, linearen Doppelstrang-DNA Molekül und einem ikosaedrischen Kapsid aus 162 Kapsomeren zusammen. Das Kapsid ist von einem Tegumen mit geringer Dichte aus Phosphorproteinen

umgeben und ist selbst von einer lipidhaltigen Membran umhüllt. Diese äußere Virushülle wird beim Knospen durch die Zellkernmembran erworben und setzt sich sowohl aus zelleigenen, als auch aus viralen Proteinen und Glykoproteinen zusammen. Im Zytoplasma HCMV-infizierter Zellen trifft man neben infektiösen Virionen auch nicht infektiöse, defekte Virusformen an, die aus einem leeren Kapsid und einer Lipidhülle bestehen. Die Konzentration dieser sogenannten „dense Bodies“ ist sogar 1000 Mal höher als die der infektiösen Virionen (Stagno et al., 1995).

1.1.3 Viruswachstum

In der Zellkultur zeigt das Virus einen eingeschränkten Zielzelltropismus. Die gegenüber einer HCMV-Infektion empfindlichsten Kulturzellen sind primär differenzierte humane Fibroblasten aus Haut oder Lunge und Endothelzellen.

Nach Adsorption und Penetration gelangt das virale Nukleokapsid in den Nukleus, wo sofort die Genomtranskription beginnt. Die Genprodukte des HCMV werden in verschiedene kinetische Gruppen eingeteilt: Alpha (immediate-early), Beta (delayed early), sowie Gamma (Late) Genprodukte. Diese Genprodukte unterscheiden sich im Transkriptionsbeginn und in der Wirksamkeit als Inhibitoren der Proteinsynthese oder der viralen DNA-Synthese. In den infizierten Zellen findet die Replikation von Tausenden von Genomkopien statt, die nach Inversion und Maturation im Zellkern in fertige Kapside eingebaut werden. Der Zusammenbau findet in einer fibrillären Matrix im Zellkern statt. Die Nukleokapside kumulieren im Nukleus in Form von Einschlusskörperchen, die zusammen mit einer Cytoplasmavergrößerung (Cytomegalie) elektronmikroskopisch als „Eulenaugen“ beschrieben werden. Periodisch werden die fertigen Virionen durch die Kernmembran freigesetzt und werden nach Glykosylierung im Golgiapparat an die Zelloberfläche transportiert. 24 bis 48 Stunden nach der Infektion werden zahlreiche infektiöse Virionen aus den infizierten Zellen freigesetzt (Mocarski et al., 1996).

1.2 Epidemiologie

1.2.1 Seroepidemiologie der HCMV-Infektion

Das HCMV ist weltweit in allen Bevölkerungsgruppen nachzuweisen. Auffällig ist eine deutlich höhere HCMV-Prävalenz vor allem von Kindern und Jugendlichen in Entwicklungsländern gegenüber den industrialisierten Ländern. Während in Indien, Thailand und auf Mauritius 93-95% aller Blutspender HCMV-spezifische Antikörper aufweisen (Kothari et al., 2002; Urwijitaroon et al., 1993; Pultoo et al., 2001), weisen die in Australien und USA Seroprävalenzraten von nur 57-59% auf (Seale et al., 2006; Staras et al., 2006).

Innerhalb einer westlichen Bevölkerungsgruppe scheinen die HCMV-Prävalenzraten mit demographischen Risikofaktoren in Verbindung zu stehen: höheres Einkommen, Hochschulabschluss, Ledigkeit oder kleinere Familie gehen mit niedrigeren HCMV-Seroprävalenzen einher. Mehrköpfige Familien mit niedrigen Einkommen, und kurzer Schulausbildung haben deutlich höhere HCMV-Durchseuchungsraten (Staras et al., 2006). Mit steigendem Alter steigt auch in jeder Bevölkerungsgruppe die HCMV-Seroprevalenz. Eine in Giessen durchgeführte Studie untersuchte im Zeitraum von 11 Jahren gesunde Blutspender und stellte eine Serokonversionsrate von 0,55% pro Jahr fest. Während bei 18-20 jährigen eine Seroprevalenz von 30-35% errechnet wurde, war sie bei 65 jährigen bei etwa 80%. Weibliche Spender zeigten in einer Studie sowohl höhere HCMV-Serokonversionraten als auch HCMV-Seroprevalenzen (Hecker et al., 2004).

1.2.2 Übertragungswege der HCMV-Infektion

Das HCMV wird durch direkten Kontakt mit infektiösem Material übertragen, wie Urin, Speichel, Tränen, Ejakulat und weiteren Genitalsekreten, so dass ein enger Kontakt und eine lange Expositionszeit zu diesen Körperflüssigkeiten mit einem erhöhten Infektionsrisiko einhergeht.

Ein wichtiger Übertragungsweg ist der Sexualkontakt. Frauen, die ihr Sexualleben früh beginnen, mehrere Sexualpartner haben und Geschlechtskrankheiten durchgemacht haben, weisen höhere HCMV-Prevalenzraten auf (Collier et al., 1995). Bei jungen Frauen zeigte sich in den Jahren, in denen sie sexuell aktiv wurden, ein Anstieg der HCMV-Infektionsraten (Stanbery et al., 2004).

Zu HCMV-Infektionen kommt es über Kontakt mit Speichel häufig in Kindertagesstätten. In einer in Japan durchgeführten Studie wurde im Speichel von 20,6% der Kinder, die eine Kinderkrippe besuchten, HCMV nachgewiesen, während nur bei 6,5% der Kinder, die zu Hause betreut wurden (Kashiwaghij et al., 2001). Zur Übertragung kommt es bei Kindern durch gehäuften Mundkontakt mit Händen, Spielzeugen und Körperflüssigkeiten wie Urin oder Speichel. Kinderbetreuer weisen auch ein deutlich höheres Infektionsrisiko auf als die Gesamtbevölkerung, und dann besonders, wenn sie selbst Kinder haben (Joseph et al., 2005). Die jährliche Serokonversionsrate bei seronegativen Kinderbetreuern in den USA liegt bei 11-20%, während sie in der Gesamtbevölkerung nur 2-2,5% erreicht (Adler et al., 1989; Pass et al., 1990). Eltern mit kleinen, in einer Kindertagesstätte betreuten Kindern, haben auch ein deutlich höheres HCMV-Infektionsrisiko. In einer longitudinalen serologischen Studie konnten Pass et al. bei 20% initial seronegativen Eltern, deren Kinder eine Kinderkrippe besuchten, nach zwei Jahren eine HCMV-Antikörperserokonversion nachweisen. (Pass et al., 1990).

1.2.3 Vertikale Infektion

Die Mutter-Fetus-, bzw. Mutter-Neonaten-Übertragung spielt eine untergeordnete Rolle in der Verbreitung und Erhaltung des HCMV in der Bevölkerung. Das Virus kann von der Mutter transplazentar, intrapartum oder postpartum über Stillen und Speichelkontakt übertragen werden.

1.2.3.1 Intrauterine Infektion

Die Inzidenz kongenitaler Infektionen liegt in Europa zwischen 0,15-2% (Gaytant et al., 2002). In Entwicklungsländern, in denen die HCMV-Seropositivitätsraten bei über 90% liegen, ist die Inzidenz kongenitaler Infektionen höher (Yamamoto et al., 2001).

Die Inzidenz einer primären HCMV-Infektion während der Schwangerschaft liegt bei 0,75-4% (Gaytant et al., 2002). In 40-50% der Fälle kommt es dabei zur symptomatischen Infektion des Fetus (Stagno, 1995). Seit der fundamentalen Studie von Stagno et al. wurde angenommen, dass die HCMV-Übertragungsrate im Schwangerschaftsverlauf konstant ist (Stagno et al., 1986). Aus neueren Studien geht jedoch hervor: je früher die Infektion in der Schwangerschaft stattfindet, desto grösser ist das Infektionsrisiko des Feten.

Eine Studie von Revello et al. in Italien untersuchte die HCMV-Übertragungsraten bei prekonzeptioneller (3 Monate vor der Befruchtung, Gruppe 1, n=12) und perikonzeptioneller (bis zu 4 Wochen nach Befruchtung, Gruppe 2, n=30) Infektion. Während es in der ersten Gruppe nur in 9,1% der Fälle zur Infektion des Fetus kam, lag in der zweiten Gruppe die Infektionsrate bei 30,7% (Revello et al., 2002). Eine Studie von Daiminger et al. zeigte vergleichbare Ergebnisse (Daiminger et al., 2005).

Transplazentare Infektionen kommen nicht nur bei primären HCMV-Infektionen vor, sondern auch bei Frauen, die eine HCMV-Infektion schon mehrere Jahre vor einer Schwangerschaft durchgemacht haben. Die Übertragungsrate liegt wegen hoher Titer neutralisierender Antikörper bei 1%, also viel niedriger als bei Frauen mit primärer Infektion. Es wird angenommen, dass rezidivierende Infektionen sowohl durch Reinfektion mit einem neuen Stamm als auch durch Reaktivierung des latenten Virus ausgelöst werden (Gaytant et al., 2002). Reinfektion scheint jedoch eine besonders wichtige Rolle zu spielen. Eine durch Boppana et al. durchgeführte Studie zeigte, dass Mütter mit prekonzeptioneller Immunität, die sich zwischen zwei Schwangerschaften mit einem neuen Virusstamm reinfiziert hatten, ihre Kinder häufiger infizierten als immune Schwangere, die mit keinem neuen Virusstamm in Kontakt gekommen waren (Boppana et al., 2001).

1.2.3.2 Perinatale Infektion

Peripartum kann es durch Kontakt mit HCMV-haltigen mütterlichen Genitalsekreten zur Infektion des Kindes kommen. HCMV-Ausscheidung im Genitaltrakt kommt bei 13-40 % der schwangeren Frauen vor (Shen et al., 1993). Risikofaktoren dafür sind früher Beginn, Dauer der sexuellen Tätigkeit mit Partnerwechsel während der Schwangerschaft, sowie vorausgegangene genitale Infektionen (Shen et al., 1993). Ist das Virus während der Geburt im Genitaltrakt in Sekreten und Blut vorhanden, kommt es in etwa 50% der Fälle zur Infektion des Neugeborenen. Der häufigste Weg einer postnatalen HCMV-Infektion ist die Mutter-Kindübertragung durch Muttermilch. In der Milch seropositiver Frauen ist in 95% HCMV-DNA nachweisbar, so dass man von einer Virusreaktivierung während der Laktationsphase ausgehen kann. Die Übertragungsrate bei Ernährung mit infektiöser Milch liegt bei Frühgeborenen zwischen 37-42%. Diese Kinder entwickeln in 12-15% der Fälle eine schwere symptomatische HCMV-Infektion (Meier et al., 2005; Hamprecht et al., 2001). Bei reifen Neugeborenen seropositiver Mütter kommt es ebenfalls zur

Virusübertragung mit Übertragungsraten von 30-59%. Die Kinder entwickeln jedoch selten eine symptomatische HCMV-Infektion (Schleiss, 2006).

1.3 Pathogenese der HCMV-Infektion

1.3.1 Allgemeine Pathogenese

Die genauen pathogenetischen Mechanismen der HCMV-Infektion sind noch weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass das Virus sich aufgrund seiner besonderen Affinität zu Epithelzellen über die Mukosa von Schleimhäuten in das Blut gelangt und im Organismus verbreitet. Ein weiterer Infektionsweg ist der hämatogene Weg, der sowohl bei Transfusionen, Organtransplantaten und fetaler Infektion eine zentrale Rolle spielt (Pass et al., 2001).

Bidirektionelle Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen scheinen die Verbreitung des Virus im Organismus zu fördern. Im Autopsiematerial von Patienten mit disseminierter HCMV-Infektion zeigt sich ein massiver Befall von Endothelzellen, sowie Leukozyten. Dies weist darauf hin, dass im Blut zirkulierende infizierte Leukozyten für den multiplen Organbefall verantwortlich sein könnten (Percivalle et al., 1993). Das HCMV konnte sowohl in immunsupprimierten als auch immunkompetenten Patienten in Leukozyten nachgewiesen werden (Gerna et al., 2004). Die Untersuchung von Autopsiematerial zeigte, dass HCMV im Verlauf der Erkrankung multiple Organe und Zelltypen befällt. Die am häufigsten befallenen Organe sind Lunge und Nebennieren (Joshi et al., 2004). In Präparaten aus Lunge und Pankreas ist HCMV in Mesenchymalzellen, Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, Epithelzellen, Muskelzellen und Granulozyten nachzuweisen. Insgesamt weisen am häufigsten dukta Epithelzellen HCMV-typische Veränderungen auf (Bissinger et al., 2002).

1.3.2 Pathogenese der kongenitalen Infektion

Sowohl bei der primären als auch der sekundären mütterlichen Infektion kann es zur intrauterinen Übertragung des Virus kommen. Nach jetzigem Erkenntnis wird von dem folgenden pathogenetischen Mechanismus ausgegangen: nach primärer Infektion der Mutter kommt es zur Zirkulation von infizierten Leukozyten, die HCMV freisetzen und uterine, mikrovaskuläre Endothelzellen infizieren können (Maidji et al., 2002). In Vitro

Infektionsversuche von Chorionzotten mit HCMV konnten zeigen, dass nur Zytotrophoblasten virale Proteine exprimieren, während Synzytiotrophoblasten keine Virusproteine aufweisen (Fisher et al., 2000). Es wird also angenommen, dass die Virusübertragung an fetale Endothelzellen durch infizierte Zytotrophoblasten erfolgt (siehe Abb. 1).

Bei sekundärer Infektion geht man von einem ähnlichen pathogenetischen Mechanismus aus. In diesem Fall scheint es zu lokaler Virusreaktivierung in Makrophagen und dendritischen Zellen zu kommen. Bei Frauen mit niedrigen HCMV-Antikörpertitern kommt es daraufhin zur Infektion von Deziduaellen, sowie zur Virusreplikation in Zytotrophoblasten und Kapillaren der Plazenta, während bei Frauen mit hohem HCMV-Antikörpertiter die Replikation durch Neutralisation in den Deziduaellen verhindert wird (Revello et al., 2002; Pereira et al., 2003).

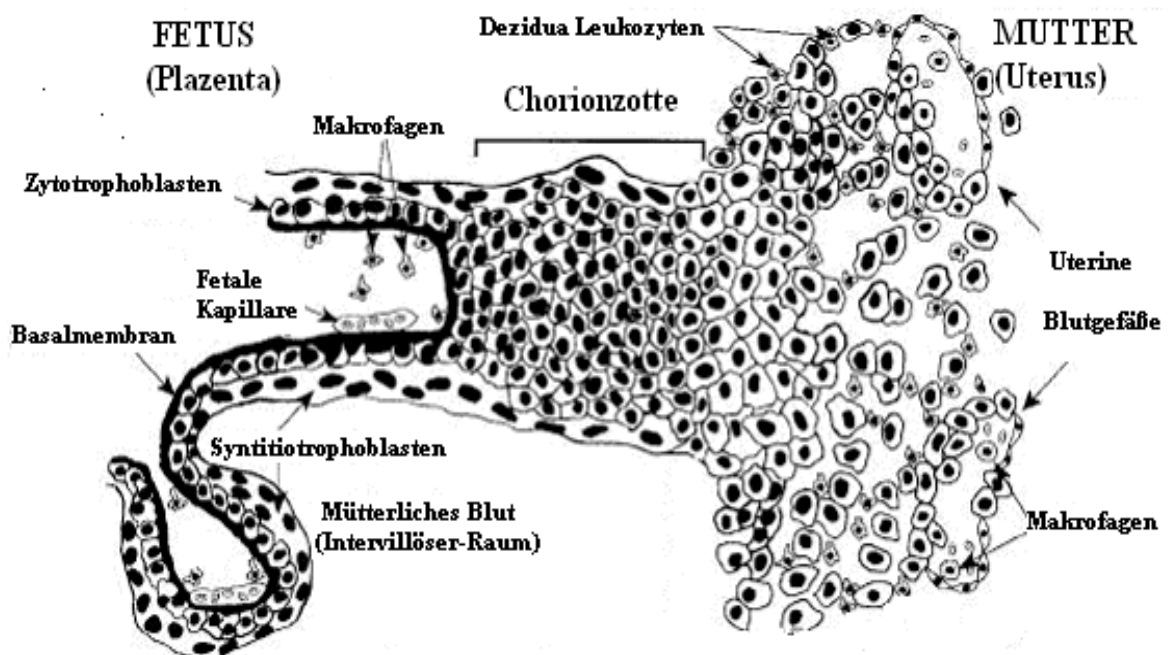


Abb. 1: Schematische Darstellung der Plazenta (Modifiziert nach Fisher et al., 2000)

1.4 Klinik der HCMV-Infektion

Die meisten HCMV-Primärinfektionen verlaufen in immunkompetenten Erwachsenen asymptomatisch. In seltenen Fällen kann sich ein mononukleoseartiges Bild oder ein grippeähnliches Bild mit Fieber und Kopfschmerzen entwickeln. Bei Erwachsenen mit einem geschwächten Immunsystem und bei Neugeborenen, die das Virus intrauterin oder perinatal erworben haben, kann es zur Entwicklung einer lebensbedrohlichen Erkrankung kommen (Preiser et al., 2002).

1.4.1 Kongenitale Infektion

1.4.1.1 Symptomatische Infektion

In 35-45% der Fälle kommt es bei symptomatischen Kindern zur Entwicklung von Ikterus, Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie und Petechien. 5-20% der Kinder entwickeln Symptome wie Pneumonie, Anämie, Enzephalitis und Myokarditis (Munro et al., 2005). Die Morbiditäts- und Mortalitätsrate bei symptomatischer HCMV-Infektion ist hoch. Die Länge eines Krankenhausaufenthaltes liegt bei Reifgeborenen bei 13 Tagen und bei Frühgeborenen bei 22 Tagen. Die Mortalitätsrate beträgt zirka 12% (Boppana et al., 1992). Kongenitale Infektionen bei primärer HCMV-Infektion in der Schwangerschaft gehen mit einem hohen Übertragungsrisiko einher und führen in über 10-18% der Fälle zu einer symptomatischen Infektion (Fowler et al., 1992; Lipitz et al., 2002; Pass et al., 2006). Es wurde Jahre lang angenommen, dass mütterliche Immunität bei kongenitaler Infektion einen gewissen Schutz gegen durch HCMV hervorgerufene Schäden bietet (Fowler et al., 1992). Neuere Studien scheinen jedoch zu zeigen, dass primäre und sekundäre Infektionen in gleichem Maße zu einer symptomatischen Infektion des Fetus führen können. Rekurrente Infektionen waren in einer schwedischen Langzeitstudie in 28% der Fälle mit Symptomen verbunden, während es bei primärer Infektion in 30% der Fälle zur Entwicklung einer akuten Symptomatik kam (Ahlfors et al., 1999). Auch eine neue amerikanische Publikation wies ähnliche Ergebnisse auf (Boppana et al., 1999). Insgesamt scheint es also, dass Sekundärinfektionen die gleiche Pathogenese aufweisen wie Primärinfektionen.

Im weiteren Verlauf entwickeln z. 50% der kongenital infizierten Kinder ZNS-Veränderungen (Munro et al., 2005). Zwischen akuter Symptomatik und Entwicklung von

Spätschäden scheint es keinen Zusammenhang zu geben. Kinder, die bei der Geburt Zeichen eines zerebralen Befalls aufweisen, entwickeln im Verlauf nicht unbedingt eine ZNS-Symptomatik.

Zu den klassischen ZNS-Symptomen gehören Chorioretinitis, uni- oder bilateraler Hörverlust, Epilepsie, Zerebralpareesen, Entwicklungsrückstand, Mikrozephalie und mentale Retardierung (Ahlfors et al., 1999). 20-30% aller Taubheitsfälle werden mit einer intrauterinen HCMV-Infektion in Zusammenhang gebracht (Barbi et al., 2003). Ob primäre und sekundäre mütterliche Infektionen im gleichen Ausmaß zu Spätschäden führen, ist noch unklar. Nach neuester Datenlage scheint, dass die Folgen sekundärer Infektionen lange Jahre unterschätzt wurden. Eine Langzeitstudie aus Schweden untersuchte 16 474 Neugeborene zwischen 1977 und 1985 auf HCMV-Infektion. Eine kongenitale HCMV-Infektion konnte bei 76 Kindern nachgewiesen werden. Infizierte Kinder von Müttern mit Sekundärinfektion entwickelten ebenso häufig ZNS-Symptome wie Kinder, deren Mütter sich primär mit HCMV infiziert hatten. Rekurrente Infektionen waren in 26% der Fälle mit Spätschäden verbunden, während es bei Primärinfektion in 19% der Fälle zur Entwicklung von neurologischen Symptomen kam (Ahlfors et al., 1999). Auch neuere Daten der amerikanischen Arbeitsgruppe zeigten vergleichbare Ergebnisse (Boppana et al., 1999). Die mütterliche präkonzeptionelle, intakte Immunität scheint jedoch gegen Hörschädigung einen gewissen Schutz zu bieten (Ross et al., 2006). Bei primärer Infektion der Mutter scheint zudem der Infektionszeitpunkt während der Schwangerschaft mit unterschiedlichen Ausprägungen der ZNS-Symptomatik verbunden zu sein (Ahlfors et al., 1999). In einer Studie von Pass et al. waren Infektionen im ersten Trimenon mit einem besonders hohen Risiko verbunden, Spätschäden, insbesondere Hörschädigung, zu entwickeln (Pass. et al., 2006).

1.4.1.2 Asymptomatische Infektion

Kongenitale Infektionen sind in 70-80% der Fälle bei der Geburt asymptomatisch. Dies trifft sowohl für Kinder von Müttern mit bestehender HCMV-Immunität, als auch für Kinder von Müttern mit Primärinfektion in der Schwangerschaft zu.

Ein Teil der Kinder (5-17%), die nach intrauteriner Infektion bei der Geburt asymptomatisch sind, entwickeln jedoch im Verlauf Spätschäden. Das Risiko Hörschäden zu entwickeln, liegt bei asymptomatischen Kindern mit kongenitaler Infektion bei 7%. Die Symptomatik reicht von leichter unilateraler, bis zu schwerer bilateraler Schädigung. Von

allen Kindern mit Hörschädigung, entwickelt sich die Hörstörung bei 18% erst nach einer Latenzzeit von 27 Monaten. Bei 50% der Kinder kommt es in den ersten zwei Jahren zu einer deutlichen Verschlechterung des ursprünglichen Befundes (Fowler et al., 1997). Wenn Kinder mit kongenitaler Infektion in den ersten 12 Monaten eine normale Entwicklung aufweisen, so ist das Risiko sehr gering, dass sie Spätschäden wie mentale Retardierung oder andere neurologische Auffälligkeiten entwickeln (Ivarsson et al., 1997).

1.4.2 Perinatale Infektion

Perinatale Infektionen spielen zwar eine wichtige Rolle in der Epidemiologie des HCMV, sind aber nur bei Frühgeborenen und Neugeborenen HCMV-negativer Mütter von klinischer Bedeutung. Reife Neugeborene HCMV-seropositiver Mütter, die sich durch Kontakt mit Genitalsekreten oder Muttermilch infizieren, weisen weder akute noch Langzeitschäden auf (Schleiss, 2006). Es wird angenommen, dass reife Neugeborene HCMV-negativer Mütter bei Verfütterung von HCMV-haltiger Milch ein deutlich höheres Risiko haben, eine klinisch relevante Infektion zu entwickeln. Eine weitere Risikogruppe sind Frühgeborene. Eine in Tübingen durchgeführte Studie zeigte, dass perinatale Infektionen mit HCMV bei Frühgeborenen in 12% der Fälle zur Entwicklung eines sepsisartigen Bildes führen. Zum klinischen Bild gehören Apnoe, Bradykardie, erweiterte Darmschlingen, Blässe und Blutparameterveränderungen, wie Leukopenie, Thrombozytopenie und hohes CRP (Hamprecht et al., 2001). Eine Berliner Studie zeigte ähnliche Ergebnisse. 12% der perinatal infizierten Frühgeborenen entwickelten eine schwere symptomatische HCMV-Infektion. Es wurde sowohl von Fällen mit sepsisartigen Symptomen, als auch von Fällen mit Hepatitis, Cholestase und Ikterus berichtet (Meier et al., 2004).

1.5 Diagnostik der kongenitalen HCMV-Infektion

1.5.1 Klinische Proben

Definitionsgemäß liegt eine kongenitale Infektion vor, wenn HCMV in den ersten drei Lebenswochen in Körpersekreten eines Neugeborenen nachgewiesen wurde. Bei einem Virusnachweis innerhalb von drei Wochen bis zu einem Monat geht man von einer perinatal erworbenen Infektion aus (Trincado et al., 2001).

Verschiedene klinische Proben können zur Diagnostik eingesetzt werden. HCMV-infizierte Kinder scheiden das Virus in verschiedenen Körperflüssigkeiten aus, wie Urin oder Speichel. Des Weiteren kann HCMV in Nabelschnurblut, peripherem Blut und Liquor nachgewiesen werden. Bei kongenitaler Infektion ist die Viruslast im Vergleich zu Nabelschnurblut oder Liquor im Urin besonders hoch. Infizierte Kinder scheiden das Virus noch bis zu 4 Jahren nach der Infektion im Urin aus. Daher eignet sich Urin also besonders zum Virusnachweis und wird auch wegen der einfachen Probennahme am häufigsten eingesetzt (Halwachs-Baumann et al., 2002; Noyola et al., 2000; Shibata et al., 1990).

1.5.2 Zellkulturverfahren

Der aktuelle Goldstandard ist das seit den 80er Jahren eingesetzte „Shell-Vial“- Verfahren, oder „Early Antigen“- Verfahren. Die Methode basiert auf dem Nachweis von einem durch HCMV gebildeten „immediate early“- Antigen. Nach einer „low-speed“- Zentrifugation der in eine Fibroblastenkultur pipettierte Probe und kurzer Inkubationszeit werden gegen das p72 Protein gerichtete markierte, monoklonale Antikörper eingesetzt und die infizierten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Im Vergleich zur traditionellen Virusisolierung zeigt das „Shell Vial“-Verfahren beim Einsatz von Urinproben eine Sensitivität von 85-95% bei einer Spezifität von 99,5-100% und liefert schon nach 48 Stunden Ergebnisse (Daiminger et al., 1994; Boppana et al., 1992). Die Methode zeigt beim Einsatz von Speichel statt Urin eine ähnliche Sensitivität und Spezifität (Warren et al., 1992).

1.5.3 HCMV–DNA Nachweis

Seit Ende der 80-er Jahre wird die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von HCMV-DNA im Urin von Neugeborenen eingesetzt. Diese Methode weist gegenüber der Zellkultur folgende Vorteile auf: geringere Probenmenge, kurze Nachweiszeit und Einsatzmöglichkeit von gefrorenen Proben ohne infektiöse Virusbestandteile (Revello et al., 2002). Die konventionelle PCR und das neuere „Light Cycler“- PCR System zeigen eine mit dem „Shell Vial“ Assay vergleichbare Sensitivität und Spezifität (Schalasta et al., 2000). Auch Paixao et al. berichten über mit der Standardmethode vergleichbare Ergebnisse beim Einsatz einer nested-PCR (Paixao et al., 2005).

Aufgrund der einfacheren Probengewinnung wurde in neueren Studien die Einsatzmöglichkeit von Speichel als klinische Probe mittels PCR untersucht. Die Übereinstimmung zwischen PCR aus Speichel und PCR aus Urin lag bei 99,7% (Yamamoto et al., 2006).

Auch Proben wie Blut oder Serum können zum HCMV-DNA Nachweis eingesetzt werden. Blut hat gegenüber Plasma jedoch eine höhere Sensitivität (Garrique et al., 2006). Im Jahre 1995 berichteten Nelson et al. über den Nachweis von HCMV-DNA im Serum von 18/18 (100%) Kindern mit symptomatischer kongenitaler Infektion, 1/2 asymptomatischen Kindern und 0/32 Kontrollkindern (Nelson et al., 1995). In einer späteren Studie von Revello et al. lag die Sensitivität und Spezifität von DNA-Quantifizierung aus Urin mittels PCR bei 100%, im Vergleich zu Antigennachweis mit 42,5%. (Revello et al., 1999). Die Entwicklung von multiplex PCRs ist ein neuer Ansatz in der Diagnostik kongenitaler Infektionen. Durch die Anwendung von multiplen Primern können verschiedene Erreger kongenitaler Infektionen, darunter auch HCMV, im selben Reaktionsansatz parallel nachgewiesen werden (McIver et al., 2005).

Eine relativ neue Option in der HCMV Diagnostik ist der HCMV-DNA-Nachweis aus getrocknetem Blut auf Filterpapier, wie er auch in der Diagnostik von Stoffwechseldefekten eingesetzt wird. Eine Arbeitsgruppe aus Mailand veröffentlichte mehrere Publikationen zu diesem Thema. Im Vergleich zum Zellkulturverfahren zeigte diese Methode eine 100%ige Sensitivität und 99%ige Spezifität (Barbi et al., 1996; Barbi et al., 2000; Binda et al., 2004). Eine 2006 publizierte Studie aus Japan setzte diese diagnostische Methode zum HCMV-Nachweis bei 1176 Neugeborenen ein und konnte bei zwei asymptomatischen Kindern eine kongenitale Infektion diagnostizieren (Yamagishi et al., 2006). Aufgrund der langen Haltbarkeit der Proben ermöglicht der Einsatz von auf

Filterpapier gesammelten Blutproben auch eine retrospektive Diagnostik (Johansson et al., 1997). Die Einsatzmöglichkeit von auf Filterpapier getrockneten Urinproben ist ein weiterer Anstanz in der Diagnostik von kongenitaler Infektion (Yamamoto et al., 2001).

1.5.4 Die Relevanz quantitativer Nachweismethoden

Der qualitative Nachweis von HCMV in verschiedenen Körperflüssigkeiten von Neugeborenen reicht zwar für die Diagnose einer kongenitalen Infektion aus, jedoch ermöglicht er keine Aussage zu Prognose und Verlauf der Erkrankung, da sowohl symptomatische als auch asymptomatische Kinder Virus ausscheiden können.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Viruslast grob mit dem klinischen Zustand korreliert. Es zeigte sich, dass die HCMV-DNA-Last im Blut von symptomatischen Kindern deutlich höher ist als bei asymptomatischen Kindern (Revello et al., 1999). Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte den Zusammenhang zwischen Viruslast im Serum und Entwicklung von klinischen Symptomen und Spätschäden, insbesondere Hörverlust bei kongenital infizierten Neugeborenen. Die Viruslast im Serum korrelierte mit der Entwicklung von Symptomen wie Petechien, Hepatosplenomegalie und Thrombozytopenie. Virämische Kinder hatten ein höheres Risiko, einen Hörverlust zu entwickeln; die Viruslast schien dabei jedoch keine Rolle zu spielen (Bradford et al., 2005). Eine 2006 publizierte Studie von Lanari et al. bestätigt die Ergebnisse von Revello und Bradford et al. Die neonatale Viruslast scheint ein unabhängiger prognostischer Faktor des weiteren Verlaufs der kongenitalen HCMV-Infektion bei Neugeborenen zu sein, der für die Klinik von großer Bedeutung ist. Die Bestimmung der Viruslast im Blut von HCMV-infizierten Neugeborenen kann zu Identifizierung von Risikogruppen beitragen und Entscheidungen über Therapie und Verlaufskontrollen erleichtern (Lanari et al., 2006).

1.6 Prävention und Therapie der HCMV-Infektion bei Neugeborenen

1.6.1 Prävention durch Aufklärung und Beratung

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass sexuelle Aktivität, sowie enger Kontakt zu Kleinkindern mit einem erhöhten Risiko einer kongenitalen HCMV-Infektion des Kindes einhergehen (Fowler et al., 2006), dass das Risiko einer HCMV-Infektion bei Kindern höher ist, deren Mütter eine starke sexuelle Aktivität entfalten. Prävention durch Aufklärung über Übertragungswege der HCMV-Infektion, wie Vermeidung des Kontakts mit Speichel und anderen Körperflüssigkeiten, sowie Hygienemaßnahmen wie z. B. regelmäßige Händedesinfektion scheinen bei seronegativen Frauen, deren Schwangerschaft zu einem frühen Zeitpunkt bekannt ist, sehr effektive Methoden zu sein. Mehrere Studien wurden zu diesem Thema von Adler et al. in den USA durchgeführt. Keine der aufgeklärten schwangeren Frauen zeigte eine Serokonversion innerhalb der ersten 8,4 Monate. Aufgeklärte, nicht schwangere Frauen hatten deutlich niedrigere Serokonversionsraten als nicht aufgeklärte Frauen. Schwangere Frauen scheinen also empfindlicher gegenüber Aufklärung zu sein und eine höhere Motivation aufzuweisen (Adler et al., 1996). Eine weitere Studie, die sich ausschließlich mit schwangeren Frauen befasste, konnte dies bestätigen (Adler et al., 2004).

1.6.2 Prävention durch Impfung

In den letzten 30 Jahren hat es viele vielversprechende Ansätze in der HCMV-Impfentwicklung gegeben, ein wirksamer klinisch getesteter Impfstoff fehlt jedoch weiterhin. Die einzigen Impfstoffe, die bis dato in einer Phase III-Studie getestet wurden oder gerade getestet werden, sind die Towne-Impfung und die gB-Glykoprotein-Impfung. Die Towne-Impfung, ein attenuierter Lebendimpfstoff, scheint für HCMV-seronegative und -seropositive Probanden gut verträglich zu sein und sowohl eine zelluläre, als auch eine humorale Immunantwort zu induzieren. Die gB-Glykoprotein-Impfung, ein rekombinanter Spaltimpfstoff aus einem immundominanten Protein des HCMV, zeigte eine gute Verträglichkeit und Immunogenität in Phase I- und II-Studien. Die Phase III-Studie zur Einschätzung der Wirksamkeit ist noch nicht abgeschlossen. Weitere

Impfansätze wie DNA-, ALVAC-gB/pp65- und Towne/Toledo-Impfungen wurden bis dato nur in Phase I-Studien untersucht. Rekombinanten Spaltimpfstoffe aus verschiedenen Alpha- und Pockenviren und neuere Entwicklungen, wie Peptid- und Dense Body-Impfstoffe wurden nur in präklinischen Studien untersucht. Insgesamt fehlt es also nicht an Ansätzen, deren Ergebnisse jedoch weitere klinische Studien nicht rechtfertigen. (Schleiss et al., 2005; Schleiss et al., 2006; Wang et al., 2006).

1.6.3 Therapie

Die ersten Therapieversuche bei kongenitalen Infektionen mit 5-Fluorodesoxyuridin, 5-Iododeoxyuridin, 5-Iododeoxyuridin und Cytosinarabinosid in den 70-er Jahren waren mit zweifelhaften Ergebnissen und erheblicher Toxizität auf Nieren und Knochenmark verbunden (Demmler et al., 2003).

1991 begann die erste randomisierte, nicht blinde Phase III-Studie über den Einsatz von Ganciclovir bei Neugeborenen. Nur Kinder mit nachgewiesener ZNS-Beteiligung wurden in die Studie aufgenommen und in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wurde 6 Wochen lang mit Ganciclovir behandelt, die zweite Gruppe wurde nicht behandelt. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Gesamtmortalität der beiden Gruppen und auch keine signifikante Besserung der akuten Symptomatik. Die behandelten Kinder schienen jedoch im Vergleich zu nichtbehandelten Kindern weniger Hörschäden zu entwickeln (Kimberlin et al., 2003). Eine 2005 publizierte Studie bestätigte den preventiven Effekt einer Ganciclovir-Therapie auf die Entwicklung von Hörschäden bei virämischen Neugeborenen (Bradford et al., 2005). Bis jetzt wurden jedoch zu wenige Studien durchgeführt, um evidenzbasierte Empfehlungen machen zu können (Smets et al., 2006). Präklinische Studien mit Cidofovir zeigten vor kurzem vielversprechende Ergebnisse. Die Cidofovir-Therapie konnte in trächtigen Meerschweinchen die Übertragung an das Fetus komplett verhindern. Klinische Studien sind wegen der hohen Toxizität und Teratogenität von Cidofovir nicht indiziert (Schleiss et al., 2006).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die kongenitale HCMV-Infektion ist der häufigste Auslöser geistiger Retardierung viraler Genese und ist für die meisten neurosensorischen Hörstörungen nicht genetischen Ursprunges verantwortlich (Demmler et al., 1991; Barbi et al., 2003). Die damit verbundenen Kosten sind unverhältnismäßig hoch. In den USA gehen kongenitale Infektionen mit jährlichen Kosten von 1,86 Milliarden Dollar beziehungsweise 300.000 Dollar pro Kind einher (Porath et al., 1990). Die Klinik der HCMV-Infektion bei Neugeborenen ist vielfältig und reicht von der asymptomatischen Infektion bis zur tödlichen Sepsis. Spätschäden können sowohl nach symptomatischer als auch nach asymptomatischer Infektion auftreten. Aufgrund des anfangs oft unauffälligen klinischen Bildes wurde diese „stumme Epidemie“ jedoch lange Jahre unterschätzt. „HCMV ist der Elephant in unseren Wohnzimmern. Er ist seit Jahren da, und es ist an der Zeit dass wir ihn sehen“ warnt Gail Demmler in seinem 2006 publizierten Artikel „HCMV Infection: Back to the Future or no more Elephants“. Die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention der HCMV-Infektion bei Neugeborenen sei also von höchster Relevanz (Demmler et al., 2006). Prävention durch Aufklärung und Sensibilisierung schwangerer Frauen, die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes, die Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten und universelle Screeningprogramme für Schwangere und Neugeborene sind wichtige Ansatzpunkte (Griffiths et al., 2002).

Die antenatale HCMV-Diagnostik kann jedoch beim aktuellen Stand der Diagnostik und Therapie nicht als Screeningmethode empfohlen werden. Der serologische Nachweis von HCMV-IgM Antikörpern bei Schwangeren ist aufgrund einer 40% Prävalenz und einer 40% Übertragungsrate nicht beweiskräftig für eine fetale Infektion. Somit müssen invasivere diagnostische Methoden (bspw. Amniozentese) eingesetzt werden, die mit großem Stress und einem Fehlgeburtsrisiko einhergehen, bei gleichzeitig fehlenden Therapiemöglichkeiten während der Schwangerschaft (Collinet et al., 2005).

Eine routinemäßige Sammlung und Aufbewahrung von Proben (Urin, Speichel, Blut) von Neugeborenen in den ersten Lebenswochen, wie sie zur Analyse von metabolischen Defekten (Guthrie Card) eingeführt wurde, ist mit keinen Risiken für das Kind verbunden und könnte bei entsprechender Symptomatik einen frühen therapeutischen Einsatz und ein konsequentes Monitoring ermöglichen. Um dies in der Praxis einsetzen zu können, wird jedoch eine Vereinfachung der Probengewinnung und die Entwicklung einer schnellen und sensitiven Nachweismethode benötigt. Das routinemäßig eingesetzte sehr

sensitive „Shell Vial“-Verfahren ist aus mehreren Gründen als Screeningmethode ungeeignet. Erstens ist die Probengewinnung sehr mühsam, da die flüssigen Urinproben nur durch Ankleben von Plastikbeuteln an das Genitale der Kinder gewonnen werden können. Des Weiteren müssen sowohl Transport und Diagnostik rasch erfolgen, da durch diese Methode nur infektiöse Virusbestandteile nachgewiesen werden können. Aufbewahrung der Proben bei 4°C über 7 Tage, Lagerung bei Raumtemperatur oder Einfrieren der Proben geht mit einem massiven Sensitivitätsverlust einher (Revello et al., 2002). Der Einsatz der PCR bei Urinproben ermöglicht den Nachweis von nicht-infektiösen Virusbestandteilen bei geringen Probemengen und kurzen Nachweiszeiten. Das Problem der aufwendigen Probengewinnung bleibt jedoch bestehen.

Der Einsatz der PCR bei auf Filterpapier gesammelten Blut- oder Urinproben würde eine einfache Probengewinnung, einen weniger aufwendigen Versand und längere Lagerungszeiten ermöglichen. Diese Methode wurde bis jetzt bei Blutproben in mehreren Studien erfolgreich angewendet (Barbi et al., 2006). Die Einsatzmöglichkeit von Urin statt Blut wurde bis jetzt nur in einer Studie im Jahre 2001 publiziert (Yamamoto et al., 2001). Zur Anwendbarkeit von neueren Filterpapiertypen liegen keine Arbeiten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Anwendbarkeit von mehreren im Handel für DNA-Analysen angebotenen Filterpapieren zur Gewinnung von Urinproben und ihre Verwendung im Rahmen der HCMV-Diagnostik mittels PCR untersucht. Hauptziel dieser Arbeit war die Sensitivität und Spezifität der Methode im Vergleich zum „Shell-Vial“-Verfahren und PCR aus nativem Urin zu bestimmen. Ferner wurde die klinische Anwendbarkeit der verschiedenen Filterpapiere getestet, um zu klären, ob die Probengewinnung durch Einlegen der Filterpapiere in die Windel im Klinikalltag praktikabel ist.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsproben

3.1.1 Filterpapiere

Eigenschaften:

Indicating FTA[®] Classic Card Whatman, Dassel

Die Indicating FTA[®] Classic Card (Ind. FTA-Filterpapier) enthält eine chemische Substanz, die Zellen lysiert, Proteine denaturiert und DNA vor Nukleasen, Oxidation und UV-Einwirkungen schützt. Die freigesetzte DNA wird durch Interaktionen mit der Matrix an das Papier gebunden.

FTA[®] Elute Whatman, Dassel

Das FTA[®] Elute (FTA Elute-Filterpapier) ist auch mit Reagenzien behandelt, die Organismen inaktivieren, Zellen lysieren und zur Freisetzung der DNA führen. Die DNA wird jedoch weniger stark gebunden und kann leichter eluiert werden.

903[®] Specimen Collection Paper Whatman, Dassel

Das 903[®] Specimen Collection Paper (903-Filterpapier), auch „Guthrie card“ genannt, wird weltweit für Neugeborenen-Screenings auf metabolische Defekte eingesetzt. Es handelt sich um ein einfaches Filterpapier ohne chemische Beschichtung.

Vorbereitung der Filterpapier-Proben:

Es wurden 50-125 µl aus den Urinproben entnommen und auf die markierten Bereiche der Filterpapiere pipettiert (125 µl/Kreis beim Ind. FTA, 50 µl/Kreis bei den FTA Elute- und 903-Filterpapieren) Die Papiere wurden über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet (siehe Abb. 2). Der Rest der Proben wurde im Eppendorf-Gefäß über Nacht bei -4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden sowohl die auf Filterpapier getrockneten als auch die nativen Urinproben extrahiert und in die PCR eingesetzt.



Abb. 2: Getrocknete Urinproben auf Ind. FTA-, FTA Elute- und 903- Filterpapier

3.1.2 Dilutionsreihen

Zellkulturüberstand aus einer mit HCMV-Laborstamm AD169 infizierten Fibroblastenkultur mit bekannter Konzentration wurde zur Sensitivitätsbestimmung der Methode eingesetzt. Die Suspension wurde 1:10, von 10^{-1} bis 10^{-5} , in HCMV-negative Urine und in Wasser (RNAsen-/DNAsen-frei) verdünnt.

Des weiteren wurden Dilutionsreihen aus in der Zellkultur als hoch positiv (>400 Kerne) getesteten Urinproben erstellt. Die originale Urinprobe wurde in Wasser (RNAsen-/DNAsen-frei) 1:10, von 10^{-1} bis 10^{-5} , verdünnt.

3.1.3 Klinische Proben

Alle untersuchten Proben stammten aus dem Einsendegut des Instituts für Medizinische Virologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

Berücksichtigt wurden Einsendungen im Zeitraum zwischen September 2004 und September 2006 von Neugeborenen und Säuglingen mit Verdacht auf HCMV-Infektion. Die Proben wurden nach Testung in der Zellkultur mit der Kernzahl beschriftet oder als HCMV-negativ markiert und bei -5°C gelagert.

3.2 Bestimmung der optimalen Stanzengröße

Zellkulturüberstand aus einer mit dem HCMV-Laborstamm AD169 infizierten Fibroblastenkultur mit bekannter Konzentration wurde in HCMV-negativem Urin 1:10, von 10^{-1} bis 10^{-5} , verdünnt. Aus jeder Dilution wurden Filterpapier-Proben auf Ind. FTA-Papier vorgenommen. Es wurden aus jeder getrockneten Probe drei Stenzen von 1,2, 2 und 3 mm Durchmesser mit verschiedenen Punches (Harris Uni-Core Punches (1.2 mm, 2.0 mm, 3 mm), Whatman) entnommen, isoliert und in die PCR eingesetzt.

3.3 Interne Kontrolle

Als interne Kontrolle wurde das Maus-Cytomegalie-Virus (MCMV) verwendet. Die Mitführung eines dem HCMV möglichst homologen Virus als interne Kontrolle dient zur Überwachung der Wirksamkeit von Extraktion, Amplifikation und Detektion.

Um die einzusetzende Konzentration der internen Kontrolle festzulegen, wurden Dilutionsreihen aus einer MCMV Stocklösung in HCMV-negativem Urin erstellt und nach der Nukleinsäureisolierung in der PCR getestet. Aus jeder Dilutionstufe wurden Filterpapier-Proben auf Ind. FTA-Filterpapier vorbereitet, nach Trocknen der Probe isoliert und in die PCR eingesetzt.

Um den Einfluss der gewählten MCMV-Konzentration auf die Sensitivität des HCMV-Nachweises zu untersuchen, wurde die interne Kontrolle in der gewählten Konzentration in jede Dilutionstufe einer in HCMV-negativem Urin erstellten Verdünnungsreihe aus HCMV AD 169-haltigem Zellkulturüberstand pipettiert. Es wurden aus jeder Dilution Filterpapier-Proben auf Ind. FTA-Filterpapier vorgenommen, nach Trocknen der Probe ausgestanzt und in die PCR eingesetzt.

3.4 Sensitivitätsbestimmung der Methode mit Standards und Proben bekannter Konzentration

Die Sensitivitätsbestimmung der Methode erfolgte ebenfalls mit einer Dilutionsreihe aus einer MCMV Stocklösung in HCMV-negativem Urin und/oder Wasser. Des Weiteren wurden Dilutionsreihen aus in der Zellkultur als hoch positiv (>400 Kerne) getesteten Urinproben eingesetzt.

Aus den jeweiligen Dilutionen wurden Filterpapier-Proben auf Ind. FTA-, FTA Elute- und 903-Filterpapier vorbereitet. Die Dilutionen und die daraus erstellten Filterpapier-Proben wurden isoliert und in die PCR eingesetzt.

3.5 Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung der Methode mit klinischen Proben

Es wurden nach Virusisolierung in der Zellkultur 70 Urinproben mittels Ind. FTA-Filterpapier und 10 Urinproben mittels bei FTA Elute- und 903-Filterpapier getestet. Die eingefrorenen Proben wurden aufgetaut, gut gemischt und Filterpapier-Proben wurden vorbereitet. Die auf Filterpapier getrockneten Urinproben und die nativen Urinproben wurden isoliert und in die PCR eingesetzt.

3.6 Testung der klinischen Anwendbarkeit

Um eine hemmende Wirkung der in Windeln enthaltenen Stoffe auf die Methode auszuschließen, wurden die untersuchten Filterpapiere in vitro in Windeln (Babysmile, Schlecker) gelegt, mit 10 ml hoch positivem (>600 Kerne) Urin begossen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filterpapier-Proben isoliert und in die PCR eingesetzt.

Um die Verträglichkeit und Anwendbarkeit der Filterpapiere zu untersuchen, wurden einige Proben in der Kinderklinik (ZKI) eingesetzt. Es wurden Proben aus Ind. FTA-, FTA Elute- und 903-Filterpapier an Mütter von Neugeborenen verteilt. Sie wurden angewiesen, beim Wickeln eine Probe in die Windel des Kindes zu legen und beim Windelwechsel die mit Urin getränkte Probe in ein Plastikgefäß zu legen.

Des Weiteren wurde das 903-Filterpapier bei zwei Kindern mit diagnostizierter HCMV-Infektion eingesetzt. Es wurden 2x2 cm Proben aus dem Papier in die Windel der Kinder gelegt und die Urin-getränkte Probe in ein Plastikgefäß gegeben. Die Probe wurde isoliert und in die PCR eingesetzt. Am selben Tag wurde auch eine native Urinprobe der Kinder gewonnen. Der HCMV-Nachweis erfolgte bei der Urinprobe des ersten Kindes mittels „Shell Vial“-Verfahren, während die Urinprobe des zweiten Kindes mittels PCR auf HCMV-DNA getestet wurde.

3.7 Virusisolierung aus der Zellkultur

3.7.1 „Shell Vial“-Verfahren

Material

Geräte und Zubehör

Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
0,45 µm Sterifilter Millex HA	Millipore, Schwalbach
1,5 ml Safe-Lock-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch Mikrotiterplatte	Biozym, Hess. Oldendorf
Sterile 5 ml Plastikröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Sterile Einweg-Pasteurpipetten	Greiner, Frickenhausen
Sterile nicht toxische Abklebefolie (8,3 cm x 13,3 cm)	Ratiolab, Dreeich-Buchsschlag

Reagenzien

Natriumbikarbonat (NaCO ₃)	Merck, Darmstadt
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Hepes	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin (P/S)	Sigma, Deisenhofen

Benötigte Zellen

Humane Vorhautfibroblasten, Wirtszellen u.a für HCMV im eigenen Labor isoliert

Kontrollviren

HCMV Typ A 169

Zellkulturmedium: Minimal Essential Medium (MEM)

Die benötigte Menge an MEM in eine Glasflasche umfüllen.

- +2% Natriumbikarbonat (NaCO₃)
- +2% Hepes
- +1% Penicillin/Streptomycin (P/S)
- +1% FCS

Durchführung

Die Urinproben wurden zuerst filtriert, um Bakterien und größere Urinbestandteile zu entfernen. Dann wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten humane Vorhautfibroblasten mit 200 µl MEM und mit 200 µl der Probenaufschwemmung beimpft. Pro Patient wurden 8 Wells (Vertiefungen in der Mikrotiterplatte) beimpft und mit steriler Abdeckfolie verschlossen. Die Negativkontrolle bildete den Abschluss unter der letzten Patientenprobe (Negativkontrolle: nur frisches MEM). Als Positivkontrolle wurde der kryokonservierte HCMV-Stamm AD 169 verwendet (Lagerung bis zu 6 Monate bei -20°C bzw. -80°C). Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 700 g über 40 Minuten, um die Sedimentation der Viruspartikel auf den Zell-Monolayer zu beschleunigen („Shell-Vial“-Verfahren). Die Proben wurden wieder abpipettiert, mit je 200 µl MEM aufgefüllt und mit steriler Abdeckfolie erneut verschlossen. Eine Inkubation über 48 Stunden bei 37°C im 5%igem CO₂-Milieu schloss sich an.

3.7.2 Färbung mit monoklonalen Antikörpern

Material

Geräte und Zubehör

Auflichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Sterile Einweg-Pasteurpipetten	Greiner, Frickenhausen

Reagenzien

Amino-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma, Deisenhofen
Aqua bidest.	Delta Select, Pfullingen
Essigsäure (Eisessig), 100%	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich

Methanol (CH ₃ OH)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
N-N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Perhydrol 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Thimerosal	Merck, Darmstadt
TRIS	Amersham, Freiburg
Tween 20	Merck, Darmstadt
Anti-Cytomegalie Virus (immediate early Antigen)	Biotrend, Köln
Ziege Anti Maus IgG F(ab ₉) ₂ Fragment, biotinmarkiert	Dianova, Hamburg
Streptavidin/Peroxidase Konj.	Calbiochem, Schwalbach

Puffer und Lösungen

Waschpuffer:	TRIS	4,84 g
	NaCl	23,6 g
	BSA	2 g
	1% Thimerosal	20 ml
	Tween 20	4 ml
	Aqua bidest., mit HCl auf pH 7,45 einstellen	2 l
	AEC Lösung:	3 Amino-Ethylcarbazol (AEC)
	N-N-Dimethylformamid	45 ml
	Acetatpuffer pH 5,0	105 ml
Acetatpuffer :	Natriumacetat	2,05 g
	Aqua bidest., mit Essig auf pH 5,0 einstellen	ad 500 ml

Durchführung

An die Inkubationsphase schloss sich, ohne auf einen zytopathologischen Effekt zu warten, der Virusantigen-Nachweis mittels Immunperoxidase-Färbung an. Nach Entfernen des Mediums aus den Wells erfolgte die Fixation der Zellen mit 100 µl eiskaltem Aceton/Methanol-Gemisch (Verhältnis 40:60) für 15 Minuten bei RT. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurden 50 µl monoklonale Mausantikörper gegen HCMV hinzugefügt (optimale Antikörperkonzentration wurde bereits vorher durch Austitration ermittelt) und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit verworfen und die Wells dreimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen.

Danach erfolgte die Zugabe von je 50 µl biotinylierten Anti-Maus IgG-Antikörpern (optimale Antikörperkonzentration wurde bereits vorher durch Austitration ermittelt) und eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 37°C, sowie im Anschluss daran dreimaliges Waschen.

Dann wurden 50 µl Streptavidin/Peroxidase-Konjugat zu den Wells hinzugefügt (die optimale Konzentration wurde vorher durch Austitration ermittelt), 30 Minuten bei 37°C inkubiert und wieder dreimal gewaschen.

Zum Schluss wurden 50 µl AEC-Lösung mit 1% H₂O₂ in die Wells pipettiert, wiederholt bei 37°C über 30 Minuten inkubiert und zum Abstoppen das Substrat entfernt und alle Vertiefungen mit Waschpuffer aufgefüllt.

Die Auswertung der Zellkulturen erfolgte mikroskopisch. In Abwesenheit von HCMV blieb eine Bindung des gegen HCMV gerichteten monoklonalen Mausantikörpers (Primärantikörper) aus. In Anwesenheit von HCMV-Antigenen erfolgte zuerst die Bindung des monoklonalen Mausantikörpers (Primärantikörper), dann die Bindung des biotinylierten Anti-Maus-IgG Antikörpers (Sekundärantikörper). Nach Zugabe von Konjugat (Streptavidin-Peroxidase) und Substrat (Indikator AEC) wurde dieses durch Enzymkatalyse umgesetzt. Bei positivem Nachweis erfolgte ein Farbumschlag und die HCMV-infizierten Zellen konnten anhand einer rötlichen Färbung der Kerne identifiziert werden.

3.8 Virus-DNA Isolierung

3.8.1 DNA Isolierung aus Filterpapier

a) Indicating FTA[®] Classic Card

Material

Thermomixer (Modell 5436)		Eppendorf, Hamburg
Harris Uni-Core Punch, 3.00 mm		Whatman, Dassel
1,5 ml Safe Lock Gefäße		Eppendorf, Hamburg
FTA Purification Reagent		Whatman, Dassel
TE-1 Puffer:		
Tris-HCl	10mM	Merck, Darmstadt
EDTA	0,1 mM	Merck, Darmstadt
pH 8		

Durchführung

In den Vorversuchen wurde aus dem Zentrum der getrockneten Proben eine 1,2, 2 oder 3 mm Stanze entnommen und in ein Safe Lock Gefäß gegeben. In den Hauptversuchen wurde eine 3 mm Stanze pro Probe eingesetzt. Um Kontaminierungen zu vermeiden, wurden nach jeder Probenentnahme 3 Stanzen aus probenfreiem Filterpapier entnommen und verworfen. Daraufhin wurden 200 µl FTA Purification Reagent zu den Proben hinzugegeben, gut gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Das Reagenz wurde abpipettiert, und dieser Waschschrift insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend wurden 200 µl TE-1 Puffer hinzugegeben, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Puffer abpipettiert und dieser Waschschrift noch zweimal durchgeführt. Abschließend wurde der Puffer vollständig abpipettiert und die Stanzen bei 56°C getrocknet. Die Stanzen wurden danach in den PCR-Mastermix eingesetzt.

b) 903[®] Specimen Collection Paper

Material

Thermomixer (Modell 5436)		Eppendorf, Hamburg
Harris Uni-Core Punch, 3.00 mm		Whatman, Dassel
Safe Lock Gefäße		Eppendorf, Hamburg

RNAsen/DNAsen freies Wasser

Cambrex, Velviers, Belgium

Durchführung (modifiziert nach Yamamoto et al., 2001)

Eine 3 mm Stanze wurde aus dem Zentrum der getrockneten Proben entnommen und in ein „Eppendorf Safe Lock“ Gefäß gegeben. Um Kontaminierungen zu vermeiden, wurde die Stanze wie in Kap. 3.8.1. a) beschrieben gereinigt. Es wurden 200 µl RNAsen-/DNAsen-freies Wasser zu den Stanzen pipettiert. Dann wurden die Proben gut gemischt und eine Stunde im Thermoblock auf 95°C erhitzt. Nach Kühlung auf Eis wurden 10 µl aus dem Eluat in den Mastermix eingesetzt.

c) FTA[®] Elute

Material

Thermomixer (Modell 5436)

Eppendorf, Hamburg

Harris Uni-Core Punch, 3 mm

Whatman, Dassel

Safe Lock Gefäße

Eppendorf, Hamburg

RNAsen/DNAsen freies Wasser

Cambrex, Velviers, Belgium

Durchführung

Eine 3 mm Stanze wurde aus dem Zentrum der getrockneten Proben entnommen und in ein „Eppendorf Safe Lock“ Gefäß gegeben. Um Kontaminierungen zu vermeiden, wurde die Stanze wie in Kap. 3.8.1. a) beschrieben gereinigt. Es wurden 200 µl RNAsen-/DNAsen-freies Wasser zu den Proben gegeben. Die Proben wurden 3 x 5 sec gemischt und die Flüssigkeit wurde abpipettiert. Nach 5 sec Zentrifugation wurde die Rest-Flüssigkeit entnommen und verworfen. Abschließend wurden 50 µl RNAsen-/DNAsen-freies Wasser hinzugegeben und die Proben wurden 30 min im Thermoblock auf 95°C erhitzt. Nach Kühlung der Proben wurden 10 µl des gewonnenen Eluates in den Mastermix eingesetzt.

3.8.2 DNA-Extraktion

Prinzip

Das Probenmaterial wird in ein Puffersystem gegeben, das eine definierte Menge eines internen Standards beinhaltet, und mit Protease (DNA) bzw. Guanidiniumthiocyanat

(RNA) verdaut. Die zellulären und proteinhaltigen Bestandteile der Probe werden dadurch lysiert, so dass die Nukleinsäuren frei in der Lösung vorliegen. Durch Zugabe von Ethanol wird die Bindung der Nukleinsäuren an die QIAamp-Membran optimiert. Nach Zugabe der vorbehandelten Probe auf die Extraktionssäulen und kurzen Zentrifugieren kommt es zur Bindung der Nukleinsäuren an die QIAamp Silica-Gel-Membran. Salz- und pH-Konditionen sind so eingestellt, dass Proteine und andere Probeninhaltsstoffe, die die PCR hemmen könnten, die Membran passieren und ins Auffanggefäß gespült werden. Durch mehrmaliges Waschen der Säule (ethanolhaltig) wird sichergestellt, dass alle störenden Inhaltsstoffe ausgewaschen werden, ohne die Nukleinsäuren von der Membran zu lösen. Im letzten Isolierungsschritt werden die Nukleinsäuren mit wässrigem Puffer oder Wasser von der Membran gelöst und in ein Probengefäß zentrifugiert. Die isolierten Nukleinsäuren können direkt für den PCR-Ansatz verwendet werden.

3.8.2.1 mittels QIAamp RNA-Extraktion

Diese Methode diente zur Isolierung der Nukleinsäuren aus Urin.

Material

Tischzentrifuge (Modell 5415C/5417R/5417)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer (Modell 5436)	Eppendorf, Hamburg
QIAamp Viral RNA Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
Ethanol abs. p.a.	Merck, Darmstadt
RNAsen/DNAsen freies Wasser	Cambrex, Velviers, Belgium

Durchführung

Mittels des QIAamp Viral RNA Mini Kits wurden die Nukleinsäuren aus Urin isoliert (Qiagen-Proben). Es wurden 200 µl Probe mit 600 µl AVL-Puffer versetzt. Die Proben wurden sofort gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurden je 600 µl Ethanol zu den Proben pipettiert und gut gemischt. Die Säulen (Spin-Columns) wurden auf ein Auffanggefäß gesetzt und die Hälfte des Reaktionsansatzes jeweils in das obere Reservoir pipettiert. Die Auffanggefäße inklusive Säulen wurden 60 sec bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß verwendet. Der gesamte Rest des Reaktionsansatzes wurde auf die Säule gegeben und 60 sec bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß verwendet. Dann wurden 500

µl Waschpuffer AW1 auf die Säule geben und 60 sec bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß verwendet. Es wurden 500 µl Waschpuffer AW2 zugegeben, erst 3 min bei 6.000 g und nach Wechseln des Auffanggefäßes 3 min bei 20.800 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und ein Eppendorf Safe Lock Gefäß für die Elution verwendet. Es wurden 50 µl AVE-Puffer auf die Säulen pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Säulen ein letztes mal 3 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die Säulen wurde wurden daraufhin verworfen und 10 µl der eluierten Nukleinsäuren wurden in die PCR eingesetzt.

3.8.2.2 mittels QIAamp DNA-Extraktion (manuelle Extraktion)

Sie diene als Alternativmethode zur Isolierung der Nukleinsäuren aus Urin.

Material

Tischzentrifuge (Modell 5415C/5417R/5417)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer (Modell 5436)	Eppendorf, Hamburg
Safe Lock Gefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Schraubdeckelgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubdeckel	Sarstedt, Nümbrecht
Combitip biopur	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Safe-Lock	Sarstedt, Nümbrecht
QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
Ethanol abs. p.a.	Merck, Darmstadt
RNAsen/DNAsen freies Wasser	Cambrex, Velviers, Belgium

Vorbereitung

110 mg QIAGEN Protease wurde in 5,5 ml Protease-Lösemittel suspendiert und in 1,5 ml „Eppendorf Safe Lock“ Gefäße aliquotiert.

Für die Herstellung der AL-Puffer-Gebrauchlösung wurde eine Vorverdünnungsreihe aus MCMV-Zellkulturüberstand (MCMV Stamm Smith; American Type Kultur Collection

(ATCC) VR-1399) in 10er log-Stufen in AL-Puffer vorbereitet, die als interne Kontrolle diente. Die AL-Puffer-Gebrauchslösung wurde dann aus AL-Puffer und Vorverdünnung pipettiert und bei 2-8°C gelagert.

Die AW1 und AW2 Waschpuffer wurden jeweils mit 125 ml und 160 ml Ethanol abs p.a. komplettiert. Die Kalibrierung der Methode erfolgte an einem externen Standard, eine Dilutionsreihe eines Zellkulturüberstandes, der eine bekannte HCMV-Konzentration (Laborstamm AD 169) enthielt. Diese Verdünnungsreihe wurde bei jedem Ansatz aus einer bei -80° C gelagerten HCMV Stocklösung neu erstellt und von der Isolierung an mitgeführt.

Durchführung

Mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kits wurden die Nukleinsäuren aus Urin isoliert. Es wurden 200 µl Proben, Kontrollen (Negatives Kontrollplasma und eine Verdünnung des AD169 in negativem Plasma) und Standards mit 200 µl AL-Puffer-Gebrauchslösung und danach mit 20 µl Protease versetzt. Die Proben wurden sofort gut gemischt und 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Dann wurden je 200 µl Ethanol zu den Proben pipettiert und gut gemischt. Die Säulen (Spin-Columns) wurden in ein Auffanggefäß gesetzt und die Proben jeweils in das obere Reservoir pipettiert. Die Auffanggefäße inklusive Säulen wurden 60 sec bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß verwendet. Es wurden 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Säule geben und 60 sec bei 6.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß verwendet. Es wurden 500 µl Waschpuffer AW2 zugegeben und 3 min bei 6.000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und ein Eppendorf Safe Lock Gefäß für die Elution verwendet. Es wurden 50 µl AVE-Puffer auf die Säulen pipettiert und 1-3 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Säulen ein letztes mal 3 min bei 6.000 zentrifugiert. Die Säulen wurden daraufhin verworfen und 10 µl der eluierten Nukleinsäuren wurden in die PCR eingesetzt.

3.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Taq Man)

3.9.1 Prinzip der Real-Time Taq Man PCR

Dem Verfahren liegt der 5'-Nuklease Assay zugrunde, bei dem man sich die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze macht. Der 1993 von der Firma Applied Biosystems entwickelte TaqMan PCR Assay verwendet als Sonde ein Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit dem Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat, zumeist 6-Carboxy-Fluoreszein, FAM) und dessen 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, zumeist 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) markiert ist. Die Fluoreszenzemission des Reporter-Farbstoffes wird durch die räumliche Nähe zum Quencherfarbstoff unterdrückt. Während der Annealing-Phase binden Primer und Sonden an die DNA. Die durch Primeranlagerung angefangenen Doppelstränge werden durch die Taq-Polymerase verlängert. Erreicht die Polymerase eine angelagerte Sonde, spaltet sie diese durch ihre Exonukleaseaktivität. Die dabei erfolgende räumliche Trennung von Reporter und Quencher erzeugt ein messbares Signal, das vom ABI PRISM 7900 detektiert wird (siehe Abb. 3). Bei jedem Amplifikationszyklus entsteht ein Messsignal, das proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts ist. Entscheidend für die Quantifizierung ist dabei nicht die Stärke des Signals, das in den letzten Zyklen meistens ein Plateau erreicht, sondern in welchem Zyklus das Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Wert übersteigt (CT= threshold cycle). In Abhängigkeit von der Menge an DNA, die zu Beginn der Amplifikation vorlag, verschiebt sich dieser Wert mit steigender Menge zu einem früheren Zyklus (niedriger CT Wert) und umgekehrt.

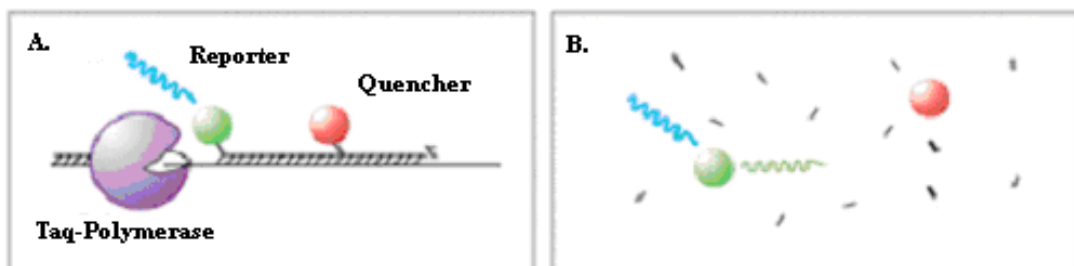


Abb. 3: Prinzip der Taq- Man PCR. A: Die Taq-Polymerase spaltet mit ihrer Nuklease Aktivität die hybridisierte Sonde. B: Räumliche Trennung von Reporter und Quencher. Erhöhung des Fluoreszenz-Signals proportional zur Anzahl der gebildeten Amplikons

3.9.2 Materialien und Durchführung

Material

ABI PRISM 7900 Applied Biosystems, Darmstadt

Multiplate 96 (PCR Tube) Biozym, Hess. Oldendorf

Pipettenspitzen gestopft Starlab, Ahrensburg

Mastermix: QuantiTect Probe PCR (200) Qiagen, Hilde

Primer und Sonden: Tip Molbiol, München

CMV-S:

5' CgT Tgg TgT TgT AgC AAC Tgg C

CMV-A:

5' TgT gCT CAA AgA ggT CgA gTT Cg

CMV-Maus-S :

5' CgT TAg TgT TgT AgC AgC Tgg C

CMV-Maus-A:

5' CgT gCT CAA AgA ggT CgA gTT C

Fluoreszenzmarkierte Sonden Applied Biosystems, Darmstadt

CMV-Sonde:

5' -VIC-CgC gAA ggT gTg gCg gCA g TAMRA-3'

CMV-Maus-Sonde:

5' -FAM-CggCCC gAg AAC ATC CgC TTg TAMRA-3'

Durchführung

Mastermix (für eine Probe)

PCR QuantiTect PCR Mix	25 µl
QIAgen Wasser	10,2 µl
Primer CMV-S	1 µl
Primer CMV-A	1 µl
Sonde-VIC	1 µl
Primer CMV-Maus-S	0,6 µl

Primer CMV-Maus-A	0,6 µl
Sonde CMV-Maus-FAM	0,6 µl
gebrauchsfertiger Mastermix	40 µl

Der bei -20°C gelagerte Mastermix wurde aufgetaut und 40 µl in PCR-Tubes vorgelegt. Daraufhin wurde 10 µl eluierte DNA dazupipettiert. Bei den Proben aus dem FTA-Filterpapier wurde nicht das Eluat, sondern die Stanze in den Mastermix eingesetzt. Die Tuben wurden mit Deckelstreifen verschlossen und in den TaqMan eingesetzt. In die letzte Tube wurde keine DNA eingefüllt, da diese als Mastermix-Kontrolle diente.

Amplifikationsparameter

Das Standard-TaqMan-Programm

Cycle	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (min)	Wiederholung
HOLD	50,00	2:00	
HOLD	95,00	15:00	
CYCLE	95,00	15:00	40
	60,00	1:00	
HOLD	RT	unendlich	

Berechnung der HCMV-Konzentrationen der Patientenproben

Die Quantifizierung basierte auf einer externen Standardkurve. Diese wurde nach der Testung von Dilutionsreihen aus Zellkultur-Überstand mit bekannter HCMV-Konzentration (Stamm AD 169) erstellt. Diese Verdünnungsreihen wurden vor jedem Ansatz neu erstellt und immer mitgeführt. Die gemessenen CT-Werte wurden normalisiert (CT-Werte HCMV \div CT-Werte MCMV), mit den korrespondierenden HCMV-DNA Kopien/ml der Standards graphisch aufgeführt und die HCMV-Konzentration der Patienten-Proben ausgerechnet (siehe Abb. 4) (Preiser et al., 2003).

Die Quantifizierung der Filterpapier-Proben basierte auf demselben Prinzip. Aus Dilutionsreihen aus HCMV AD 169 Stocklösung wurden Filterpapier-Proben erstellt, in der PCR getestet und eine Standardkurve für jedes Filterpapier erstellt. Die Standardkurven wurden jedoch nicht bei jedem Ansatz neu erstellt.

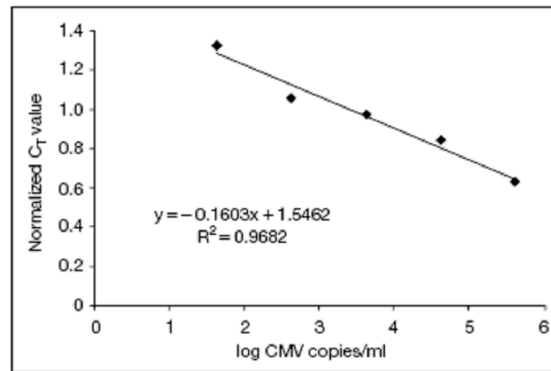


Abb. 4: Standardkurve: Normalisierte CT-Werte (CT für HCMV geteilt durch CT für MCMV) in Abhängigkeit der Zahl der HCMV-DNA Kopien pro Milliliter Standard (nach Preiser et al. 2003)

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der optimalen Stanzengröße

Der Durchmesser und die Zahl der entnommenen Stanzen aus der Filterpapier-Probe wirkten sich auf die Sensitivität der Methode aus. Die erstellte 1:10 Dilutionsreihe aus HCMV AD 169-haltigen Zellkulturüberstand bekannter Konzentration reichte von der Originalprobe mit 4 Millionen Kopien/ ml, bis zu einer Dilution mit 40 Kopien/ml. Die Nachweisgrenze der Methode lag beim Einsatz von Stanzen mit einem Durchmesser von 2 oder 3 mm bei 4.000 Kopien/ml. Die zwei Stanzen unterschieden sich in den für dieselbe Probe gemessenen CT-Werten; die niedrigsten CT-Werte wurden bei dem Einsatz der 3 mm Stanze gemessen. In dieser Stanze lag also die größte Menge viraler DNA zu Beginn der Amplifikation vor. Die Anwendung einer Stanze mit einem Durchmesser von 1,2 mm verschlechterte die Sensitivität der Methode. Die Nachweisgrenze lag dann nur noch bei 40.000 Kopien/ml, und die gemessenen CT-Werte waren deutlich über die der 3 mm Stanze (siehe Abb. 5). Beim Einsatz von mehr als einer 3 mm Stanze aus der Originalprobe mit 4 Millionen Kopien/ml wurden die PCR-Ergebnisse negativ. In den weiteren Versuchen wurde also aus jeder Filterpapier-Probe eine einzige 3 mm Stanze entnommen und für die PCR vorbereitet.

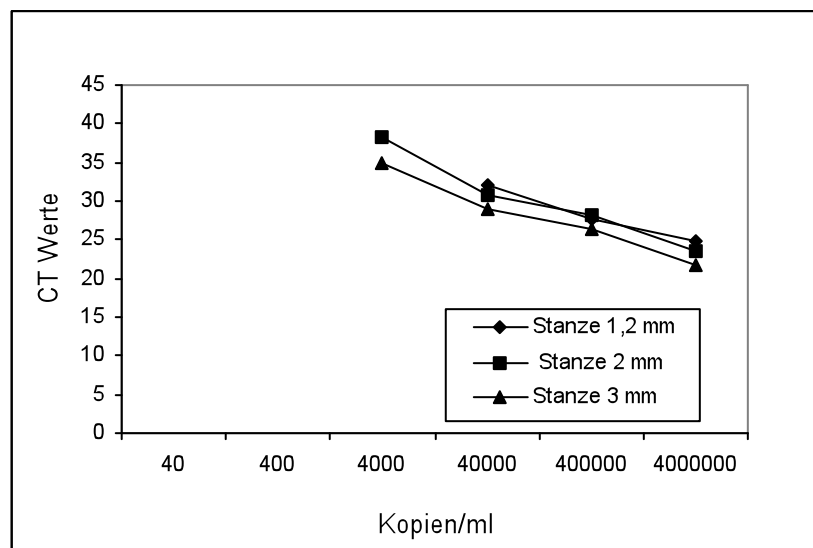


Abb. 5: HCMV DNA Nachweis in Filterpapier-Proben (Ind. FTA-Filterpapier) aus einer AD 169 Dilutionsreihe in Abhängigkeit der bekannten HCMV-Konzentration der Proben. Vergleich der Ergebnisse beim Einsatz unterschiedlicher Stanzengrößen

4.2 Interne Kontrolle

Als interne Kontrolle wurde MCMV verwendet. Die Mitführung eines dem HCMV möglichst homologen Virus als interne Kontrolle sollte zur Überwachung der Wirksamkeit von Extraktion, Amplifikation und Detektion dienen. Da ein gewisser Grad an Konkurrenz zwischen dem Zielvirus HCMV und dem Spike MCMV besteht, musste die Konzentration der internen Kontrolle also so gewählt werden, dass sie in der Probe sicher detektiert wird, jedoch so niedrig wie möglich ist.

Um die einzusetzende Konzentration der internen Kontrolle festzulegen, wurden 1:10 Dilutionsreihen aus einer MCMV-Stocklösung mit einem CT-Wert von 17 in HCMV-negativem Urin mittels PCR getestet. In den mit QIAamp Viral RNA Kit isolierten Urinproben (Qiagen-Proben) lag die Nachweisgrenze des MCMV bei der 10^{-5} Dilution. In den aus Filterpapier isolierten Urinproben (Filterpapier-Proben) war das Virus erst bei einer höheren MCMV-Konzentration der Probe nachzuweisen. Die Nachweisgrenze lag bei der 10^{-3} Dilution. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 zu sehen. Um eine in der Filterpapier-Probe noch nachweisbare interne Kontrolle zu haben, wurde also eine um 3 Logstufen diluierte MCMV-Stocklösung (Stocklösung 10^{-3}) als interne Kontrolle gewählt.

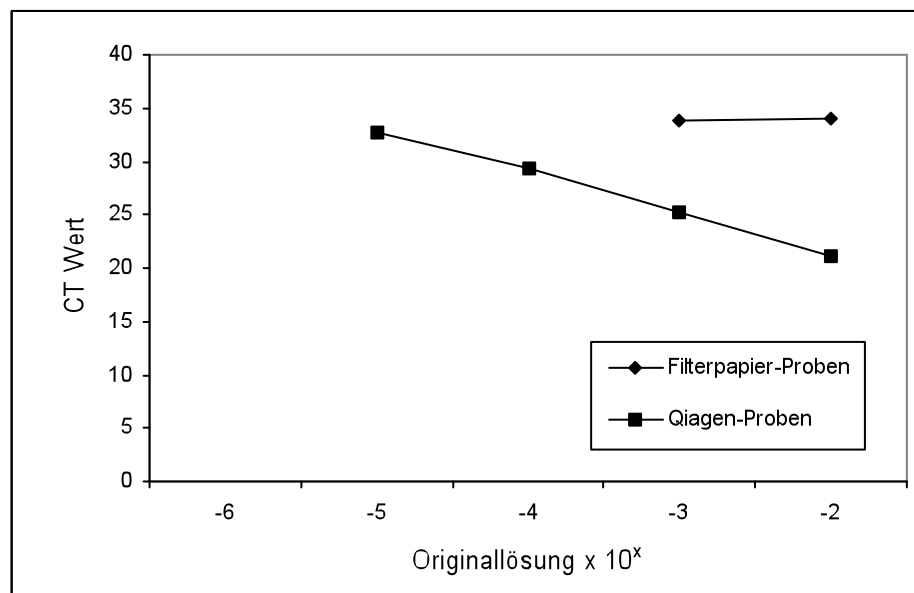


Abb. 6: MCMV-Nachweis mittels PCR in Filterpapier-Proben (Ind. FTA Papier) und Qiagen-Proben aus einer MCMV-Dilutionsreihe in Abhängigkeit der MCMV-Konzentration der Proben

Um den Einfluss der gewählten MCMV-Konzentration auf die Sensitivität des HCMV-Nachweises zu untersuchen, wurde die gewählte interne Kontrolle in einer Verdünnungsreihe aus HCMV AD 169-haltigen Zellkulturüberstand in HCMV-negativem Urin pipettiert. Parallel dazu wurde dieselbe Verdünnungsreihe ohne interne Kontrolle getestet. Es zeigte sich keine Veränderung der Sensitivität der Methode durch den Einsatz einer internen Kontrolle (siehe Abb. 7).

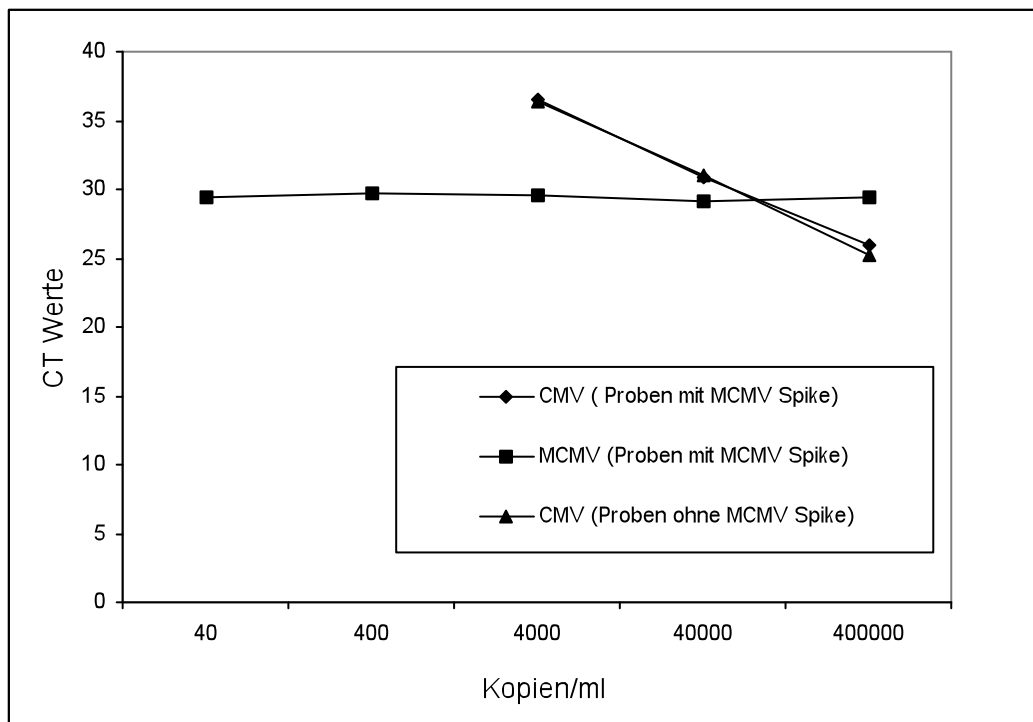


Abb. 7: Vergleich der Sensitivität des HCMV-Nachweises mittels PCR in Filterpapier-Proben (Ind. FTA-Filterpapier) aus einer HCMV AD 169 Dilutionsreihe mit internen Kontrolle (MCMV-Stocklösung 10^{-3}) und ohne internen Kontrolle

4.3 Sensitivitätsbestimmung der Methode mit Dilutionsreihen

4.3.1 HCMV AD 169 Dilutionsreihen

In einem ersten Versuch wurde eine HCMV AD 169 Dilutionsreihe in Wasser erstellt und die auf Ind. FTA-Filterpapier vorbereiteten Proben in die PCR eingesetzt. Es zeigte sich eine Nachweisgrenze von 4.000 Kopien/ml (siehe Abb. 8).

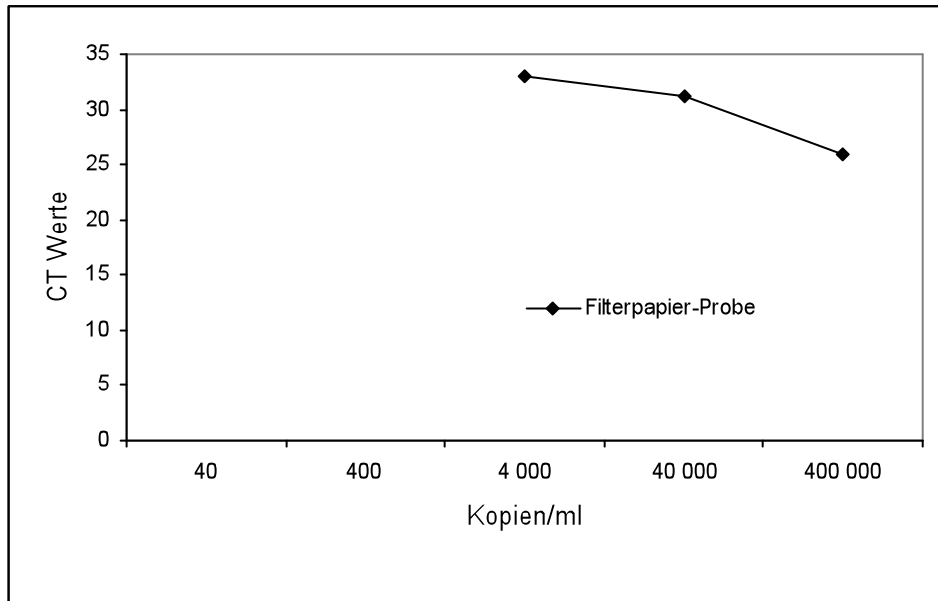


Abb. 8: HCMV-Nachweis in Filterpapier-Proben (Ind. FTA-Filterpapier) aus einer HCMV AD 169 Dilutionsreihe in Wasser in Abhängigkeit der bekannten HCMV-Konzentration der Proben

In einem zweiten Versuch wurde eine HCMV AD 169 Dilutionsreihe in Urin erstellt. Die auf Ind. FTA-, FTA Elute- und 903-Filterpapier vorbereiteten Proben (Ind.FTA-, FTA Elute-, 903-Proben) wurden in die PCR eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 zusammengefasst.

Während bei der Anwendung des Ind. FTA-Filterpapiers die Nachweisgrenze der Methode bei 4.000 Kopien/ml lag, konnte beim Einsatz der FTA Elute- und 903-Filterpapiere noch aus Proben mit 400 Kopien/ml, HCMV-DNA nachgewiesen werden. Bei der Anwendung des FTA Elute-Filterpapiers wurden die niedrigsten CT-Werte für die jeweiligen Dilutionen gemessen (siehe Abb. 9).

Die bei Ind. FTA-, FTA Elute- und 903-Proben gemessenen CT Werte lagen im Schnitt um jeweils 6,22, 5,86 und 9,38 CT höher als bei den korrespondierenden Qiagen isolierten Urinproben (Qiagen-Proben). Für dieselben Urinproben war also die gemessene DNA-Menge in den Ind. FTA-, FTA Elute und 903-Proben um jeweils 1,88, 1,77 und 2,83 Logstufen niedriger als in den Qiagen isolierten Proben.

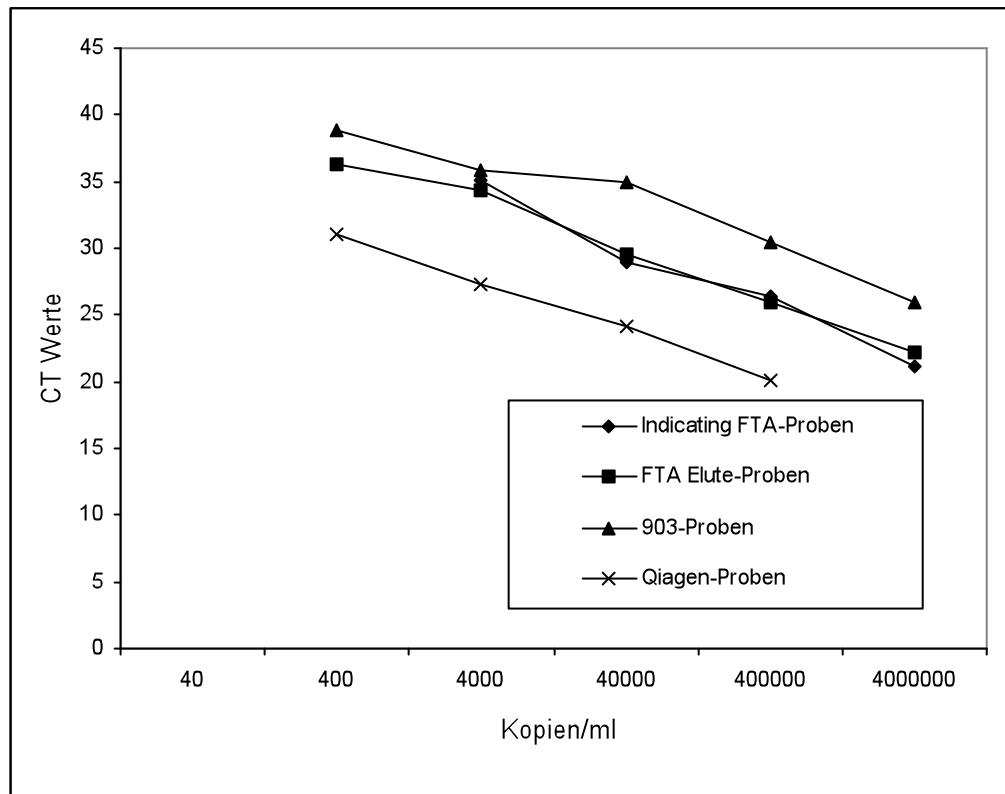


Abb. 9: Sensitivitätsbestimmung der Methode: HCMV-Nachweis mittels PCR aus Qiagen- und Filterpapier-Proben (Ind. FTA-, FTA Elute- und 903- Papier) in Abhängigkeit der bekannten HCMV-Konzentration der Proben

Bei einer errechneten Probenmenge von 2 μ l/Stanze, einer Elutionsflüssigkeit von 50-200 μ l und einer vollständigen Lösung der DNA vom Filterpapier entspricht die Nachweisgrenze von 400 Kopien/ml der FTA Elute und 903-Filterpapiere, einer Konzentration von jeweils 16 Kopien/ml und 8 Kopien/ml im aus der Stanze gewonnenen Eluat. Beim Ind. FTA-Filterpapier entspricht die Nachweisgrenze von 4.000 Kopien/ml einer Konzentration von 7,2 Kopien/Stanze. Bei einer 100% Lösung der DNA vom Filterpapier würden also 7,2 Kopien im Mastermix am Beginn der Reaktion vorliegen.

Die Nachweisgrenze bei den Qiagen isolierten Urinproben variierte zwischen 40 und 400 Kopien/ml. In 3 von 4 Versuchen lag die Nachweisgrenze bei 400 Kopien/ml (siehe Abb 9). Bei einer eingesetzten Probenmenge von 200 μ l und einer Elutionsflüssigkeit von 50 μ l entspricht diese Nachweisgrenze einer Konzentration von 1.600 Kopien/ml im Eluat, am Ende der Extraktion. Davon werden wiederum 10 μ l in den Mastermix eingesetzt, also liegen 16 Kopien im Mastermix zu Beginn der Reaktion vor.

Die im Mastermix zu erwartende Virusmenge müsste also bei den Ind. FTA-Proben um Faktor 2,2, bei den FTA Elute-Proben um Faktor 100 (2 Logstufen) und bei den 903-

Proben um Faktor 200 (2,3 Logstufen) niedriger liegen als bei den Qiagen isolierten Proben (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Volumina in den verschiedenen Vorbereitungsschritten für die PCR

	Urinprobe	FTA	FTA Elute	903
Auf die Filterpapiere pipettierte Probenmenge (µl)		125	50	50
In die Extraktion eingesetzte Probenmenge (µl)	200	1,8	2	2
Volumen der Elutionsflüssigkeit (µl)	50		50	200
In die PCR eingesetzte Probenmenge (µl)	10	Stanze	10	10

4.3.2 Dilutionsreihen aus hoch positiven Proben

Ferner wurden Dilutionsreihen aus in der Zellkultur als hoch positiv (>200 Kerne) getesteten Urinproben erstellt. Aus jeder Dilution wurden Filterpapier-Proben auf Ind. FTA-, FTA Elute- und 903-Filterpapier (Ind. FTA-, FTA Elute-, 903-Proben) vorbereitet. Die Dilutionsreihe und die Filterpapier-Proben wurden isoliert und in die PCR eingesetzt. Bei den Qiagen isolierten Urinproben (Qiagen-Proben) konnte sowohl aus der Originalprobe, als auch aus der Probe mit der niedrigsten Viruskonzentration (geschätzte Kernzahl = 1 Kern) HCMV-DNA amplifiziert werden.

Bei den 903-Proben waren die Ergebnisse uneinheitlich. Aus den ersten Dilutionsstufen war HCMV gut nachweisbar (Proben mit geschätzten Kernzahlen >75). Die Probe aus der nächsten Dilutionsstufe fiel aus. Alle Proben mit einer geschätzten Kernzahl unter 17 Kernen waren unter der Nachweisgrenze.

Das FTA Elute-Filterpapier zeigte deutlich bessere Ergebnisse. Sowohl in den Proben mit höheren Kernzahlen als in den Proben aus den letzten Dilutionsstufen konnte HCMV nachgewiesen werden. Alle Proben mit weniger als 4 Kernen lagen unter der Nachweisgrenze (siehe **Abb. 10**).

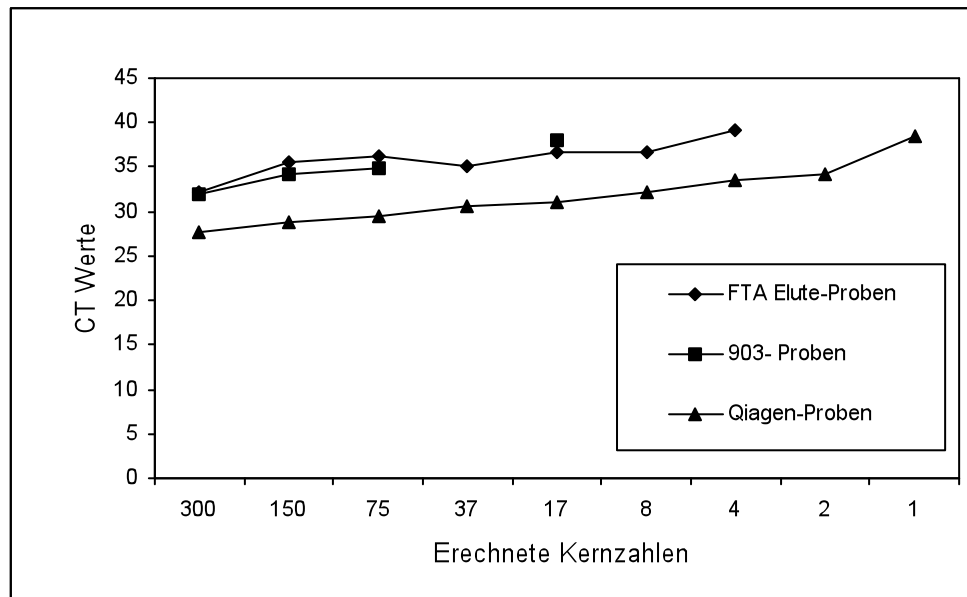


Abb. 10: HCMV-DNA-Nachweis in Qiagen isolierten Urinproben (Qiagen-Proben) und aus Filterpapier isolierten Urinproben (Filterpapier-Proben) in Abhängigkeit der geschätzten Kernzahl der Proben

4.4 Sensitivität und Spezifität der Methode bei Testung klinischer Proben

4.4.1 Mittels Indicating FTA® Classic Card

Nach Testung in der Zellkultur wurden aus 70 Urinproben Filterpapier-Proben auf Ind. FTA-Filterpapier (Ind. FTA-Proben) vorbereitet. Die Filterpapier-Proben und die nativen Urinproben wurden extrahiert und in die PCR eingesetzt.

Im Vergleich zur Virusisolierung aus der Zellkultur lag die Sensitivität der PCR aus den Qiagen isolierten Proben bei 64,8%.

Im Vergleich zum „Shell Vial“ Verfahren zeigte die Filterpapiermethode eine Sensitivität von 43,2% und eine Spezifität von 100%. Die Ergebnisse sind in der Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Vergleich des Virusnachweises mittels „Shell Vial“ Verfahren und PCR aus Ind. FTA-Proben

		„Shell Vial“ Verfahren	
		Positiv	Negativ
HCMV Nachweis aus Filterpapier-Proben	Positiv	16	0
	Negativ	21	35
	Gesamt	37	35
		Sensitivität 43,2%	Spezifität 100%

Tab. 3 fasst die Ergebnisse der Filterpapiermethode in Abhängigkeit der Kernzahl der im „Shell Vial“ Verfahren als HCMV-positiv getesteten Proben zusammen. Während in nur 26,9% der niedrig positiven Urinproben (weniger als 50 Kerne) HCMV mit der Filterpapiermethode nachgewiesen wurde, konnte bei allen Urinproben mit Kernzahlen über 100 HCMV aus den Filterpapier-Proben amplifiziert werden.

Tab. 3: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus Ind.FTA-Proben und positive Virusisolierung im „Shell Vial“ Verfahren in Abhängigkeit der Kernzahl der Proben

	Kernzahl	Zahl der Proben	HCMV-Nachweis aus Filterpapier-Probe	
			Positiv (%)*	Negativ (%)*
Positives „Shell Vial“ Verfahren	1-50	26	7 (26,9)	19 (73,1)
	50-100	5	2 (40)	3 (60)
	>100	6	6 (100)	0 (0)

* Prozent der Proben pro Kernzahl-Intervall

Im Vergleich zur PCR aus Qiagen isoliertem Urin lag die Sensitivität der Filterpapiermethode bei 58,3% und die Spezifität bei 95,8%. In zwei nach Qiagen-Isolierung unterhalb der Nachweisgrenz liegenden Urinproben konnte in der Filterpapier-Probe HCMV-DNA nachgewiesen werden. Diese Proben waren im „Shell Vial“ Verfahren beide positiv gewesen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Vergleich des HCMV-DNA-Nachweises mittels PCR aus Qiagen- und Ind.FTA-Proben

		HCMV-DNA-Nachweis aus Urin	
		Positiv	Negativ
HCMV-DNA-Nachweis aus Filterpapier-Proben	Positiv	14	2
	Negativ	10	46
Gesamt		24	48
		Sensitivität 58,3%	Spezifität 95,8%

In den mittels Qiagen extrahierten klinischen Proben wurden HCMV-Konzentrationen von 338 Kopien/ml bis 63.000 Kopien/ml errechnet. In Urinproben mit HCMV-Konzentrationen über 4.000/ml konnte auch mit der Filterpapiermethode das Virus nachgewiesen werden. Bei Urinproben mit Viruskonzentrationen unter 4.000 Kopien/ml sank die Sensitivität der Filterpapiermethode auf 0-20% (siehe Tab. 4.5).

Tab. 5: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus Ind. FTA-Proben und Qiagen-Proben in Abhängigkeit der Kopienzahl der Proben

Positive PCR Proben aus Qiagen extrahiertem Urin	Kopien/ml	Zahl der Proben	HCMV-Nachweis aus Filterpapier-Probe	
			Positiv (%)*	Negativ (%)*
	<400	1	0 (0)	1 (100)
	400-4 000	10	2 (20)	8 (80)
	4 000-40 000	10	10 (100)	0 (0)
	40 000-400 000	2	10 (100)	0 (0)

* Prozent der Proben pro Kopienzahl-Intervall

Quantifizierung

Um die HCMV-Konzentration der klinischen Proben auszurechnen, wurden für die Qiagen isolierten Urinproben und die aus Filterpapier isolierten Urinproben externe Standardkurven erstellt (siehe Abb. 11 und Abb. 12).

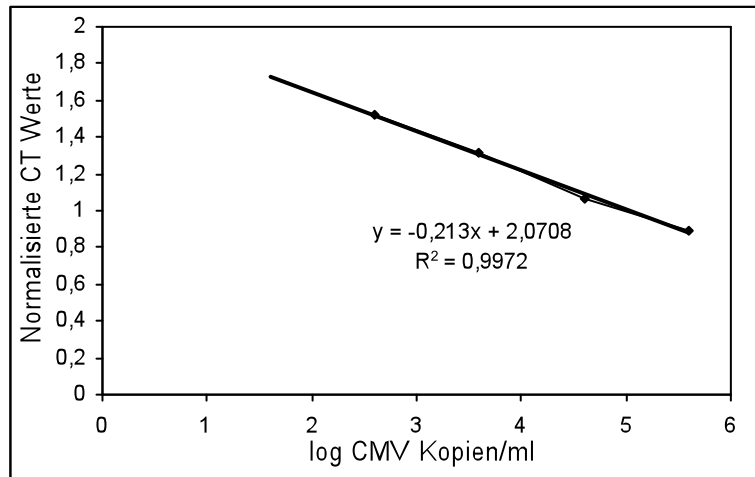


Abb. 11: Standardkurve für die Quantifizierung der Qiagen isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT-Werte HCMV ÷ CT-Werte MCMV) in Abhängigkeit der Zahl der HCMV-DNA Kopien pro Milliliter Standard

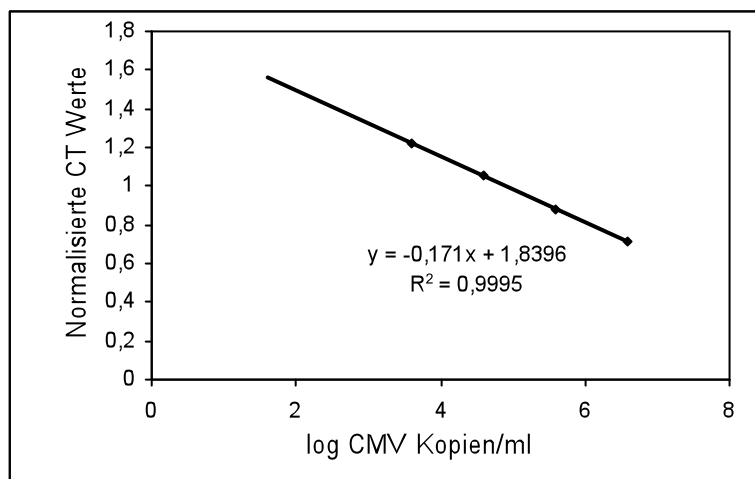


Abb. 12: Standardkurve für die Quantifizierung der aus Ind. FTA-Filterpapier isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT-Werte HCMV ÷ CT-Werte MCMV) in Abhängigkeit der HCMV-DNA-Konzentration im Standard

Die in den Urinproben nach Qiagen-Extraktion gemessenen HCMV-DNA-Konzentrationen wurden mit den nach Extraktion der Filterpapiere gemessenen Viruskonzentrationen verglichen (siehe Abb. 13). Die Proben, die in der Filterpapiermethode oder der Qiagenmethode unter der Nachweisgrenze lagen, wurden ausgeschlossen (n=11). Die lineare Regressionsanalyse der log₁₀-DNA Konzentration der Probenpaare zeigte, dass keine Korrelation zwischen der HCMV-DNA-Konzentration der Qiagen- und der Filterpapierproben besteht. Der errechnete Korrelationsfaktor lag bei 0,113.

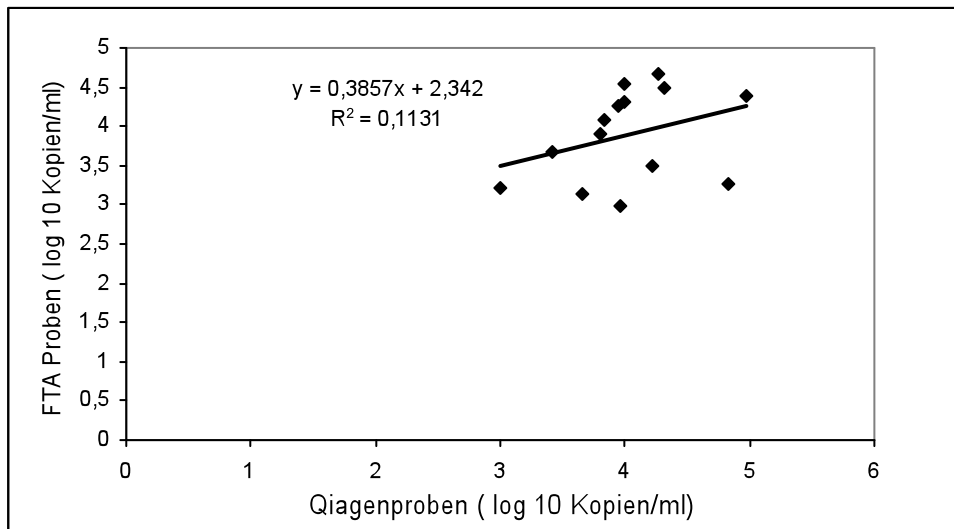


Abb. 13: Vergleich der in den Filterpapier-Proben gemessenen HCMV-DNA-Konzentration mit der in den Qiagenproben gemessenen HCMV-DNA-Konzentration

4.4.2 Mittels FTA Elute- und 903• Specimen Collection-Paper

Nach Testung in der Zellkultur wurden aus 10 positiven Urinproben Filterpapier-Proben auf FTA Elute- und 903-Filterpapier vorbereitet. Die Filterpapier-Proben und die nativen Urinproben wurden extrahiert und in die PCR eingesetzt.

Im Vergleich zum „Shell Vial“ Verfahren zeigte die Filterpapiermethode bei Anwendung des FTA Elute-Filterpapiers eine Sensitivität von 70%. Die Methode zeigte eine höhere Sensitivität bei niedrig positiven Kernzahlen. Während in nur 50% der Proben mit einer hohen Kernzahl (>100) mit der Filterpapiermethode HCMV nachgewiesen wurden, waren 75-100% der Proben mit niedrigeren Kernzahlen über der Nachweisgrenze. Die Ergebnisse sind in **Tab. 6** aufgeführt.

Im Vergleich zur PCR aus den Qiagen isolierten Urinproben (Qiagen-Proben) lag die Sensitivität der FTA Elute Methode bei 83,3%. Zwei im „Shell Vial“ Verfahren positive Proben waren bei der PCR aus Qiagen-Proben unterhalb der Nachweisgrenze. In diesen Proben konnte in der PCR aus FTA Elute-Proben das Virus amplifiziert werden.

Tab. 6: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus FTA Elute-Proben und positive Virusisolierung im „Shell Vial“ Verfahren in Abhängigkeit der Kernzahl der Proben

	Kernzahl	Zahl der Proben	HCMV-Nachweis aus Filterpapier-Probe	
			Positiv (%)*	Negativ (%)*
Positives „Shell Vial“ Verfahren	1-50	4	3 (75)	1(25)
	50-100	2	2(100)	0(0)
	>100	4	2(50)	2(50)

* Prozent der Proben pro Kernzahl-Intervall

Im Vergleich zum „Shell Vial“ Verfahren zeigte die Filterpapiermethode bei Anwendung des 903-Filterpapiers eine Sensitivität von 60%. Die Methode zeigte eine höhere Sensitivität bei Proben mit höheren Kernzahlen (>50). Während nur bei 25% der Proben mit einer niedrigen Kernzahl (<50) mit der Filterpapiermethode HCMV nachgewiesen wurden, lagen 75-100% der Proben mit höheren Kernzahlen über der Nachweisgrenze. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 aufgeführt.

Im Vergleich zur PCR aus Qiagen extrahiertem Urin lag die Sensitivität der Methode bei 50%.

Tab. 7: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus 903-Proben und positive Virusisolierung im „Shell Vial“ Verfahren in Abhängigkeit der Kernzahl der Proben

	Kernzahl	Zahl der Proben	HCMV-Nachweis aus Filterpapier-Probe	
			Positiv (%)*	Negativ (%)*
Positives „Shell Vial“ Verfahren	1-50	4	1(25)	3 (75)
	50-100	2	2(100)	0(0)
	>100	4	3(75)	1(25)

* Prozent der Proben pro Kernzahl-Intervall

Quantifizierung

Um die HCMV-Konzentration der klinischen Proben auszurechnen, wurden für die Qiagen isolierten Urinproben und die aus Filterpapier isolierten Urinproben externe Standardkurven erstellt (siehe Abb. 14 und Abb. 15).

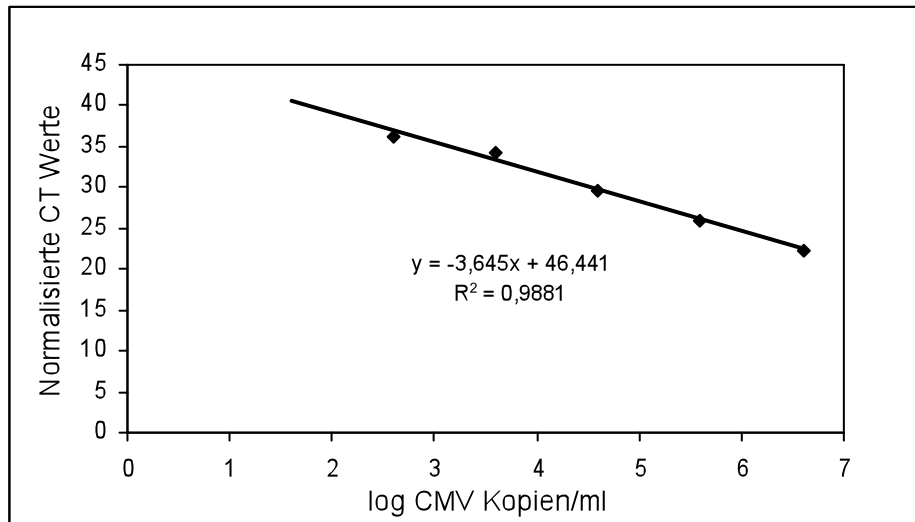


Abb. 14: Standardkurve für die Quantifizierung der aus FTA Elute-Filterpapier isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT-Wert HCMV ÷ CT-Wert MCMV) in Abhängigkeit der HCMV-DNA-Konzentration im Standard

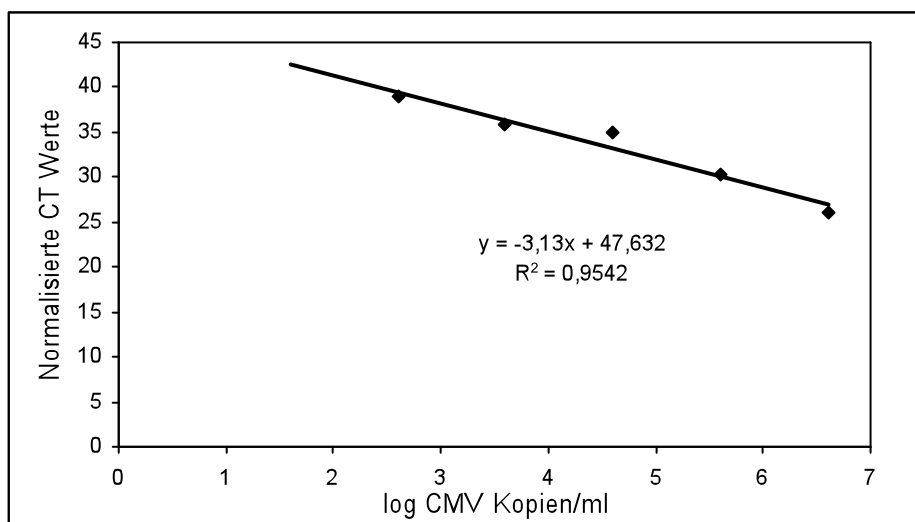


Abb. 15: Standardkurve für die Quantifizierung der aus 903-Filterpapier isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT-Wert HCMV ÷ CT-Wert MCMV) in Abhängigkeit der HCMV-DNA-Konzentration im Standard

Die in den Urinproben nach Qiagen Extraktion (Qiagen-Proben) gemessenen HCMV-DNA-Konzentrationen wurden mit den nach Extraktion der Filterpapiere gemessenen Viruskonzentrationen verglichen (siehe Abb. 16 und Abb. 17). Die Probenpaare, bei denen die Filterpapier- oder die Qiagen-Probe unter der Nachweisgrenze lag, wurden ausgeschlossen. Die lineare Regressions-Analyse der \log_{10} -DNA Konzentration der Probenpaare zeigte, dass bei der Anwendung des FTA Elute-Filterpapiers die beste Korrelation zwischen der HCMV-DNA-Konzentration der Qiagen- und der Filterpapier-

Proben besteht. Der errechnete Korrelationsfaktor lag bei 0,848. Beim 903-Filterpapier lag der Korrelationsfaktor nur bei 0,163. Es scheint also keine Korrelation zwischen den HCMV-DNA-Level der Qiagen- und der Filterpapier-Proben beim Einsatz des 903-Filterpapiers zu geben.

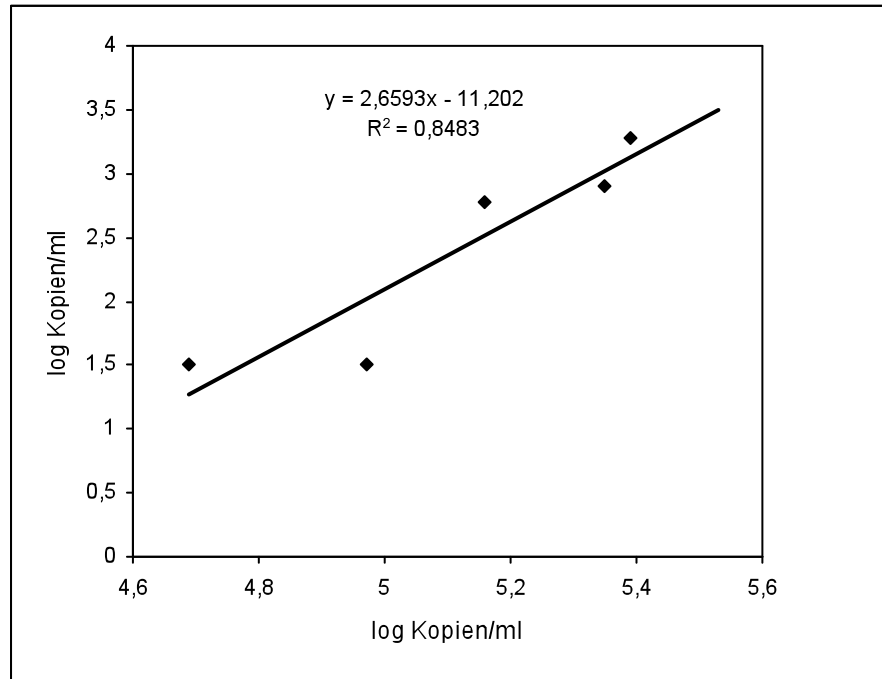


Abb. 16: Vergleich der in den Filterpapier-Proben gemessene HCMV-DNA-Konzentration mit der in den Qiagen-Proben gemessenen HCMV-DNA-Konzentration beim FTA Elute-Filterpapier

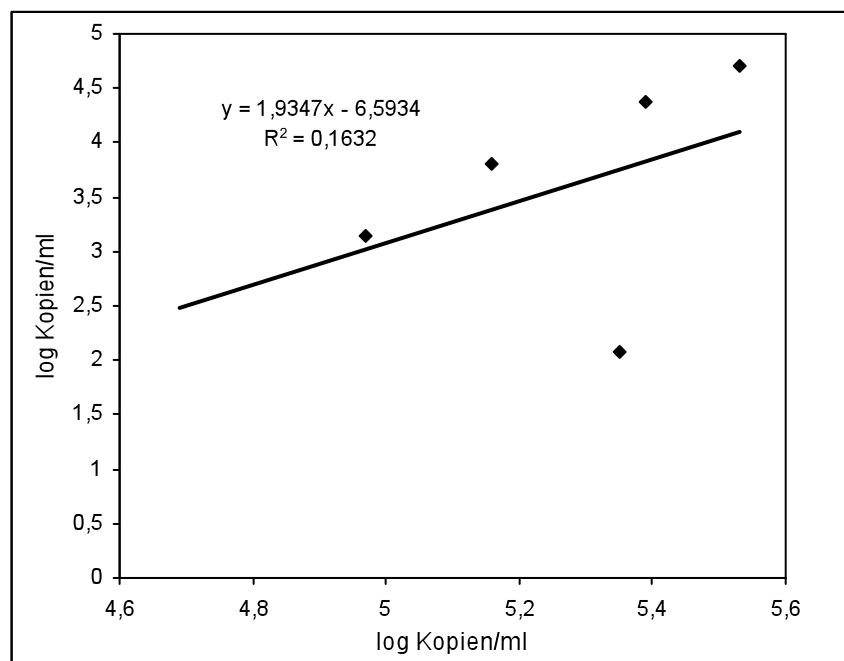


Abb. 17: Vergleich des HCMV-DNA-Nachweises mittels PCR aus Qiagen- und Ind. FTA-Proben

4.5 Testung der klinischen Anwendbarkeit

Um eine hemmende Wirkung der in Windeln enthaltenen Stoffe auf die Methode auszuschließen, wurden die untersuchten Filterpapiere in vitro in Windeln gelegt, mit hoch positivem (600 Kerne) Urin begossen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus allen Filterpapier-Proben konnte HCMV-DNA amplifiziert werden. Die höchsten HCMV-DNA-Konzentrationen wurden in den Proben aus dem FTA Elute Filterpapier gemessen.

Um die Verträglichkeit und Anwendbarkeit der Filterpapiere zu untersuchen, wurden einige Proben im ZKI eingesetzt. Die in Windeln eingelegten Papiere wurden alle mit Urin getränkt, und keine der Proben wurde mit Mekonium kontaminiert. Der Aufwand der Methode war sehr gering und die eingelegten Papiere schienen den Kindern keinerlei Beschwerden zu machen.

Das 903-Filterpapier wurde bei zwei Kindern mit diagnostizierter HCMV-Infektion eingesetzt. Im Urin des ersten Kindes konnte in der Zellkultur HCMV isoliert werden (Kernzahl: 428) In der PCR aus Urin des zweiten Kindes wurden eine HCMV-DNA-Konzentration von >200.000 Kopien/ml gemessen. Die in die Windeln eingelegten Filterpapiere wurden beide mit Urin getränkt und keine der Proben wurde mit Mekonium kontaminiert. Aus den mit Urin getränkten Filterpapieren konnte bei beiden Kindern HCMV-DNA amplifiziert werden.

5 Diskussion

Die kongenitale HCMV-Infektion ist der wichtigste Auslöser geistiger Retardierung viraler Genese und ist für die meisten neurosensorischen Hörstörungen nicht genetischen Ursprunges verantwortlich (Demmler et al. 1991; Barbi et al. 2003).

Die Einführung von universellen Screeningprogrammen bei Neugeborenen könnte die frühzeitige Erkennung einer Infektion und somit einen frühen therapeutischen Einsatz ermöglichen. Als klinische Probe eignet sich besonders Urin, da HCMV bei kongenitalen Infektionen schon kurz nach Geburt in hohen Konzentrationen ausgeschieden wird (Halwachs-Baumann et al., 2002). Das zur Zeit als Goldstandard geltender „Shell Vial“-Verfahren ist trotz hoher Sensitivität als Screening-Methode ungeeignet. Zum einen ist die Probengewinnung sehr mühsam, da die flüssigen Urinproben nur durch Ankleben von Plastikbeuteln an das Genitale der Kinder gewonnen werden können. Außerdem können durch diese Methode nur infektiöse Virusbestandteile nachgewiesen werden, so dass sowohl Transport als auch Diagnostik sehr rasch erfolgen müssen. Die Aufbewahrung der Proben bei 4°C über 7 Tage, Lagerung bei Raumtemperatur oder Einfrieren der Proben geht mit einem massiven Sensitivitätsverlust einher (Revello et al. 2002). Um durch die Vereinfachung der Probensammlung in Kombination mit einer schnellen Nachweismethode eine geeignete Screening-Methode empfehlen zu können, untersuchten wir die Einsatzmöglichkeit von verschiedenen Filterpapieren zur Sammlung von Urinproben für die HCMV-Diagnostik mittels PCR.

5.1 Technische Aspekte

Die Probensammlung und -gewinnung gestaltete sich bei allen Filterpapieren problemlos. Die durch die Mütter oder Krankenschwestern eingelegten Filterpapiere wurden beim Windelwechsel in den Analbereich der Kinder plaziert und beim erneuten Wechsel entnommen. Dieses Verfahren war deutlich einfacher und weniger zeitaufwendig als das Ankleben von Urinbeuteln. Alle Filterpapiere kamen mit Urin in Kontakt und keine Probe wurde mit Mekonium kontaminiert. Von Vorteil war beim Ind. FTA-Papier der Farbumschlag, der den Kontakt mit Urin deutlicher machte als bei den anderen Filterpapieren. Längerer Kontakt der Filterpapier-Proben mit Windel und Analbereich scheint keinen Einfluss auf die Nachweismethode zu haben. Da die PCR eine auf enzymatischen Reaktionen basierende Methode ist und durch inhibitorisch wirkende

Substanzen leicht beeinflusst werden kann, ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei Kontakt mit gewissen Pflegelotionen und Desinfektionsmitteln die Reaktion gehemmt werden kann.

Yamamoto et al. führten 2001 eine vergleichbare Studie durch. Urinproben von 322 Neugeborenen wurden durch das Einlegen von Filterpapieren in die Windeln der Kinder gewonnen und mittels PCR auf HCMV-DNA untersucht. Durch Kontamination mit Mekonium konnten 2 Proben nicht ausgewertet werden und bei 18% der kleinen Probanden konnte aus im Artikel nicht aufgeführten Gründen keine Urinprobe gewonnen werden (Yamamoto et al., 2001). Die guten Ergebnisse unserer klinischen Untersuchung lagen also möglicherweise auch an der geringen Probandenzahl. In umfangreicheren Studien wäre die Entnahme von zwei Proben pro Patient zu empfehlen.

Das Ind. FTA- und das FTA Elute-Filterpapier sind aufgrund ihrer chemischen Beschichtung, welche Zellen lysiert, Proteine denaturiert und DNA vor Nukleasen, Oxidation und UV-Einwirkungen schützt, besonders gut für Transport und Aufbewahrung geeignet. Alle Filterpapiere können nach dem Trocknen der Proben schnell und einfach in Umschlägen versendet werden. Die Entnahme der Stanzen war mit dem Harris Uni-Core Punch jedoch sehr zeitaufwendig. Die Harris Micro Punches waren deutlich stabiler und einfacher zu bedienen. Des Weiteren war beim FTA Elute- und 903-Filterpapier der mit Urin getränkte Bereich kaum von der probenfreien Zone zu unterscheiden. Es ist nicht auszuschließen, dass bei manchen Proben probenfreie Filterpapierbereiche gestanzt wurden. Beim Ind. FTA-Papier war dementsprechend der Farbumschlag im Bereich der Probe bei den fast farblosen Urinproben beim Stanzen von großem Nutzen. Die Vorbereitung für die PCR durch mehrere Waschschrte und der Transfer der getrockneten Stanze in die Multiplatte waren bei diesem Papier jedoch mit sehr viel Aufwand und technischen Schwierigkeiten verbunden. Die FTA Elute- und 903-Proben waren dafür sehr einfach zu extrahieren und das Eluat problemlos in die Multiplatte zu pipettieren.

5.2 Sensitivitätsbestimmung mittels Dilutionsreihen

Die durch die Testung von Dilutionsreihen ermittelte Sensitivität der Methode zeigte je nach Filterpapier unterschiedliche Ergebnisse.

Beim Ind. FTA-Papier wurde eine Nachweisgrenze von 4.000 Kopien/ml festgestellt. Diese Nachweisgrenze bestätigte sich bei der Testung klinischer Proben. Durch den Einsatz einer kleinen Stanze mit einem errechneten Volumen von 1,8 µl Probe, statt einer

normalen Probenmenge von 200 µl, war ein Sensitivitätsverlust zu erwarten. Im Vergleich zu den Qiagen extrahierten Urinproben wird beim Ind. FTA-Papier die Virusmenge pro Reaktionsansatz um mehr als die Hälfte reduziert. Die Rolle der Probenmenge zeigte sich auch bei der Festlegung der Stanzengröße. Während bei dem Einsatz der 3 mm- und 2 mm-Durchmesser-Stanzen noch in Ind. FTA-Proben aus einer Dilution mit 4.000 Kopien/ml HCMV-DNA amplifiziert werden konnte, war für die gleiche Probe beim Einsatz einer 1,2 mm-Stanze keine virale DNA mehr nachweisbar.

Die Reduktion der Probenmenge erklärt jedoch einen Sensitivitätsverlust um eine ganze Logstufe nicht. Wahrscheinlich wird ein Teil der DNA während der Waschschriffe abgelöst. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, dass durch die starke Bindung der DNA an die Filterpapiermatrix die PCR-Primer nicht an der DNA binden können. Der Versuch, die Sensibilität der Methode durch den Einsatz von mehr als einer Stanze zu verbessern, scheiterte. Die Anwesenheit von mehr als einer Stanze/Reaktionsansatz scheint die PCR zu inhibieren. Eine mit demselben Papier durchgeführte Studie, in der HIV-DNA aus auf Ind. FTA getrocknetem Blut amplifiziert wurde, zeigte ähnliche Ergebnisse. Bei dem Einsatz von mehr als einer 3 mm-Durchmesser-Stanze oder einer Stanze von 6 mm Durchmesser wurde die Reaktion inhibiert (Beck et al., 2001). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass in höherer Konzentration die Beschichtung des Ind.FTA-Papiers eine inhibitorische Wirkung aufweist.

Die beim Einsatz von FTA Elute- und 903-Filterpapieren ermittelte Nachweisgrenze von 400 Kopien/ml ist mit unserer „in house“ PCR mit Qiagen extrahiertem Urin vergleichbar. Im Vergleich zu den mit Qiagen extrahierten Urinproben wird bei den FTA Elute- und 903-Filterpapieren die Virusmenge im Reaktionsansatz um 2-2,3 Logstufen reduziert. Dies erklärt, warum die Probe mit 40 Kopien/ml bei den Filterpapieren nicht mehr detektiert wurde, während bei den mit Qiagen extrahierten Proben die Nachweisgrenze zwischen 40 und 400 Kopien/ml schwankte. Die im Vergleich zum Ind. FTA höhere Sensitivität der Methode bei diesem Papier trotz höherem Probenverlust durch zusätzliche Dilution bestätigt, dass beim Ind. FTA auch andere Faktoren für den Sensitivitätsverlust verantwortlich sind.

Die in einer Studie von Halwachs-Baumann et al. ermittelte durchschnittliche Viruslast im Urin von Neugeborenen mit kongenitaler Infektion liegt deutlich über unserer Nachweisgrenze. Im Urin der Kinder wurden im Schnitt $3,9 \times 10^5$ Kopien/ml vor Therapie gemessen und $2,0 \times 10^3$ Kopien/ml nach Therapie (Halwachs-Baumann et al., 2002). Diese Werte liegen weit über der Nachweisgrenze von 400 Kopien/ml vom FTA Elute- und 903-

Filterpapier. Bei den vor der Therapie gemessenen Viruslasten könnte sogar die Nachweisgrenze vom Indicating FTA mit 4.000 Kopien/ml ausreichen. Der Nachweis von HCMV-DNA aus auf 903-Filterpapier getrockneten Blutproben, das von zahlreichen Studien als Screeningmethode empfohlen wird, weist eine ähnliche Sensitivität auf als unsere Methode. In einer Studie von Barbi et al. wurde die Nachweisgrenze der Methode ermittelt. Dilutionsreihen aus dem HCMV AD 169 Stamm wurden in HCMV-negativem Blut erstellt, auf 903-Filterpapier pipettiert und mittels PCR auf HCMV getestet. Die Nachweisgrenze der Methode bezogen auf das in die PCR eingesetzte Eluat lag bei 400 Kopien/ml (Binda et al., 2004). Beim gleichen Filterpapier lag die Nachweisgrenze unserer Methode ebenfalls bei 400 Kopien/ml.

Die mittels Verdünnungsreihe aus Proben mit hoher Kernzahl ermittelte Nachweisgrenze machte einen Sensitivitätsverlust im Vergleich zur PCR aus der mit Qiagen extrahiertem Urin deutlicher. Während die PCR aus Urin auch die letzte Probe mit einer errechneten Kernzahl von einem Kern erfasste, lag die Nachweisgrenze der PCR aus FTA Elute-Proben bei vier Kernen und beim 903-Filterpapier bei 17 Kernen. Die im Vergleich zum FTA Elute höhere Dilution der Probe durch eine Eluatmenge von 200 µl statt 50 µl erklärt den Sensitivitätsverlust der Methode beim Einsatz des 903-Filterpapiers. Wahrscheinlich spielt auch die Beschichtung des FTA Elute-Filterpapiers eine wichtige Rolle, indem sie die DNA vor DNAsen schützt. Beim 903-Filterpapier wird möglicherweise ein Teil der DNA zerstört. Dies könnte auch erklären, warum bei diesem Papier einige Dilutionen mit Kernzahlen über 17 Kernen unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

5.3 Sensitivität und Spezifität bei klinischen Proben

Die Testung klinischer Proben bestätigte die Ergebnisse der Voruntersuchungen. Im Vergleich zur PCR aus Urin zeigte sich beim Einsatz von Filterpapier-Proben ein deutlicher Sensitivitätsverlust. Beim Einsatz des FTA Elute-Filterpapiers zeigte sich die höchste Sensitivität. Die im Vergleich zum 903-Filterpapier bessere Sensitivität des Ind. FTA-Papiers trotz höherer Nachweisgrenze in den Voruntersuchungen war überraschend. Dieses Ergebnis liegt am wahrscheinlichsten an der geringen Probenzahl, die mittels 903-Filterpapier getestet wurden.

Trotz der niedrigeren Sensitivität der Filterpapiermethode konnte bei einigen mit Qiagen extrahierten Urinproben, die in der PCR negativ waren, aus der Filterpapier-Probe HCMV-DNA amplifiziert werden. Wahrscheinlich enthielten diese Proben inhibitorische Substanzen. Urin ist einer der Hauptwege für die Exkretion von Abbauprodukten und Medikamenten, und seine Zusammensetzung variiert stark. Khan et al. konnten nachweisen, dass Urea ein potenter Inhibitor der PCR ist und bei Konzentrationen über 50 mM die Amplifikation komplett hemmt. Ferner wurde gezeigt, dass die inhibitorische Aktivität von Neugeborenenurin in direktem Zusammenhang zur Urea-Konzentration der Proben steht (Khan et al., 1991). Da die Konzentration der Probe beim Einsatz von Filterpapieren reduziert wird, wird auch die Konzentration der inhibitorischen Substanzen reduziert. Dies könnte erklären, warum bei der Testung der Filterpapier-Proben, die aus diesen inhibitorischen Urinen erstellt wurden, die Reaktion nicht inhibiert wurde.

Im Vergleich zum „Shell Vial“-Verfahren war die Sensitivität unserer Methode deutlich niedriger. In keiner der im „Shell Vial“-Verfahren als negativ getesteten Proben konnte mit der Filterpapiermethode HCMV-DNA nachgewiesen werden. Ein Sensitivitätsgewinn durch den Nachweis von HCMV-DNA statt infektiöser Virusbestandteile konnte in unseren Untersuchungen also nicht gezeigt werden. Das Ind. FTA-Papier erwies bei einer 100%igen Spezifität die niedrigste Sensitivität unter den untersuchten Filterpapieren. Eine besonders niedrige Sensitivität wurde bei Proben mit niedrigen Kernzahlen festgestellt. Die Sensitivität der Methode reichte bei den niedrig positiven Proben also nicht aus.

Die beste Sensitivität im Vergleich zum „Shell Vial“-Verfahren erreichten die Filterpapiere FTA Elute und 903. Zu bemerken ist jedoch, dass bei diesen Papieren die getestete Probenzahl sehr gering war (10 Proben). Die Ergebnisse korrelierten jedoch gut mit den in den Voruntersuchungen ermittelten Nachweisgrenzen. Die Filterpapiermethode zeigte beim Einsatz des 903-Filterpapiers eine Sensitivität von 60%. Auch in diesem Fall lag die Sensitivität der Methode bei Proben mit Kernzahlen <50 am niedrigsten. Die Mengenreduktion der Probe führt bei diesen niedrig positiven Proben zu nicht mehr nachweisbaren Viruskonzentrationen im aus der Stanze gewonnenen Eluat.

Die höchste Sensitivität im Vergleich zur Zellkultur erreichte die Methode beim Einsatz des FTA Elute-Filterpapiers mit 70%. Bei Proben mit sehr niedrigen Kernzahlen (<5 Kernen) zeigte die Methode eine sehr hohe Sensitivität. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit denen der Voruntersuchungen. In zwei Proben mit Kernzahlen über 400, in denen von einer höheren Viruslast auszugehen war, konnte keine HCMV-DNA nachgewiesen

werden. Bei diesem Ergebnis ist von einer fehlerhaften Verarbeitung der Probe auszugehen.

In der einzigen vergleichbaren Studie von Yamamoto et al. wurden 266 mit Urin getränkte Filterpapier-Proben von Neugeborenen gesammelt und auf HCMV-DNA untersucht. Parallel dazu wurden die Urinproben in der Zellkultur und nach Extraktion mittels PCR getestet. Es wurden 262 Proben mit den Referenzmethoden als negativ getestet, nur 4 Proben waren HCMV-positiv. Alle Filterpapier-Proben der HCMV-negative Kinder waren negativ. In keiner der Filterpapier-Proben, die von HCMV-positiv getesteten Kindern stammte, konnte virale DNA nachgewiesen werden. Erst beim Einsatz einer „nested“ PCR konnte aus allen 4 Proben HCMV-DNA amplifiziert werden (Yamamoto et al., 2001). Bei der „nested“ PCR wird an einen ersten Amplifikationszyklus ein zweiter Amplifikationszyklus mit internen Primern angeschlossen. Dies erhöht zwar die Sensitivität der Methode, ist jedoch mit einem erhöhten Risiko von Kontaminierung verbunden, bedeutet einen zusätzlichen Aufwand und geht mit höheren Kosten einher.

5.4 Quantifizierung

Bei der Testung von Standard-Dilutionsreihen war die in den Ind. FTA-Proben gemessene DNA-Menge im Schnitt um 1,88 Logstufen (Faktor 75,85) niedriger als in den Qiagen-Proben. Ein solcher Unterschied war bei einer Probenmengenreduktion um den Faktor 2,2 nicht zu erwarten. Der Unterschied zwischen der in der Qiagenprobe und der in der Filterpapier-Probe gemessenen DNA-Menge war jedoch nicht konstant und schwankte zwischen 1,4 und 2,4 Logstufen. Dies bestätigt also die Hypothese, dass keine 100%ige Elution aus der Filterpapier-Probe stattfindet und ein Teil der in der Stanze gebundenen DNA entweder ausgewaschen wird oder in der Stanze gebunden bleibt, so dass sie für die Primer unerreichbar ist. Die Quantifizierung der klinischen Proben bestätigte, dass zwischen der gemessenen HCMV-DNA-Konzentration der mit Qiagen extrahierten Proben und den aus den Filterpapieren extrahierten Proben starke Schwankungen bestehen (Korrelationsfaktor $R^2=0,113$). Die Bestimmung der Kopienzahl in den Ind. FTA-Proben erlaubt also keinen Rückschluss auf die in der Originalurinprobe enthaltene Viruskonzentration.

Bei der Testung von Standard-Dilutionsreihen war die in den FTA Elute-Proben gemessene DNA-Menge im Schnitt um 1,77 Logstufen niedriger als in den Qiagen-Proben.

Bei einer errechneten Probenmengenreduktion um 2 Logstufen war dieses Ergebnis überraschend gut. Der Unterschied zwischen der in der Qiagenprobe und der in der Filterpapier-Probe gemessene DNA-Menge zeigte kaum Schwankungen. Es scheint also, dass eine fast 100%ige Elution der DNA aus der Filterpapier-Probe stattfindet. Die Quantifizierung der klinischen Proben bestätigte, dass zwischen der gemessenen HCMV-DNA-Konzentration in den mit Qiagen extrahierten Urinproben und den aus den Filterpapieren extrahierten Urinproben eine starke Korrelation besteht (Korrelationsfaktor $R^2=0,848$). Die Anwendung eines Korrekturfaktors für die Errechnung der Probenkonzentration aus den in den Filterpapieren gemessenen Viruskonzentrationen scheint also möglich. Um dies zu bestätigen, müssten jedoch Untersuchungen mit höheren Probenzahlen durchgeführt werden.

Bei der Testung von Standard-Dilutionsreihen war die in den 903-Filterpapierproben gemessene DNA-Menge im Schnitt um 2,83 Logstufen (Faktor 676) niedriger als in den Qiagen-Proben. Ein solcher Unterschied war bei einer Probenmengenreduktion um 2,3 Logstufen zu erwarten. Die Differenz zwischen der in der Qiagenprobe und die in der Filterpapier-Probe gemessenen DNA-Menge war jedoch nicht konstant und schwankte zwischen 2,4 und 3,3 Logstufen. Es scheint also, dass auch bei diesem Papier keine 100%ige Elution aus der Filterpapier-Probe stattfindet, oder ein Teil der DNA zerstört wird. Die Quantifizierung der klinischen Proben bestätigte, dass zwischen der gemessenen HCMV-DNA-Konzentration in den mit Qiagen extrahierten Proben und den aus den Filterpapieren extrahierten Proben starke Schwankungen bestehen (Korrelationsfaktor $R^2=0,163$). Die Bestimmung der Kopienzahl in den 903-Filterpapierproben scheint also keinen Rückschluss über die in der Originalurinprobe enthaltene Viruskonzentration zu erlauben. Um dies zu bestätigen müssten jedoch Untersuchungen mit höheren Probenzahlen durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass der Nachweis viraler DNA in auf Filterpapier gesammelten Urinproben sich als eine in der Klinik gut einsetzbare Methode zur Routinediagnostik kongenitaler HCMV-Infektionen erwiesen hat. Es zeigte sich, dass der Einsatz unterschiedlicher Filterpapiere einen großen Einfluss auf die Sensitivität der Methode hat. Die Anwendung des Ind. FTA-Filterpapiers kann aufgrund des technischen Aufwandes bei der Probenvorbereitung für die PCR und der niedrigen Sensitivität der Methode nicht empfohlen werden. Das 903-Filterpapier zeigte insgesamt bessere

Ergebnisse. Die Probenvorbereitung war sehr einfach und die Sensitivität der Methode lag höher als beim Ind. FTA-Papier. Die besten Ergebnisse wurden jedoch mit dem FTA Elute Filterpapier erreicht. Die Vorbereitung der Proben war schnell und einfach und die Sensitivität lag mit 83% im Vergleich zur PCR aus mit Qiagen isolierten Proben am höchsten. Des Weiteren scheint mit dieser Methode auch ein Rückschluss auf die Virusmenge der Probe möglich. Die Sammlung von Urinproben auf FTA Elute Filterpapier als Screeningmethode bei kongenitalen Infektionen scheint also eine vielversprechende Methode zu sein. Um diese Methode für epidemiologische und diagnostische Zwecke empfehlen zu können, müssten jedoch noch umfangreichere klinische Studien durchgeführt werden.

Zusammenfassung

Die kongenitale HCMV-Infektion ist der wichtigste Auslöser geistiger Retardierung viraler Genese und ist für die meisten neurosensorischen Hörstörungen nicht genetischen Ursprunges verantwortlich. Die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention der HCMV-Infektion bei Neugeborenen ist also von höchster Dringlichkeit. Die Einführung von universellen Screeningprogrammen bei Neugeborenen könnte die frühzeitige Erkennung einer Infektion und somit einen frühen therapeutischen Einsatz ermöglichen. Um dies in die Praxis umsetzen zu können, wird jedoch eine Vereinfachung der Probengewinnung und die Entwicklung einer schnellen und sensitiven Nachweismethode benötigt.

Die Anwendbarkeit von verschiedenen im Handel für DNA-Analysen angebotenen Filterpapieren zur Sammlung von Urinproben für die HCMV-Diagnostik mittels PCR wurde untersucht und mit Referenzmethoden verglichen. Es wurden zwei mit Reagenzien behandelten Papiere, das Indicating FTA® Classic Card (Ind FTA Filterpapier) und das FTA® Elute (FTA Elute Filterpapier) und ein unbeschichtetes Papier, das 903® Specimen Collection Paper (903-Filterpapier) eingesetzt.

Insgesamt waren alle Papiere leicht einzusetzen, gut verträglich und die Gewinnung von Proben gestaltete sich problemlos. Dilutionsreihen aus Zellkulturüberstand aus einer mit dem HCMV-Laborstamm AD169 infizierten Fibroblastenkultur wurden zur Sensitivitätsbestimmung der Methode eingesetzt. Während bei der Anwendung der Indicating FTA® Classic Cards die Nachweisgrenze der Methode bei 4.000 Kopien/ml lag, wurden beim FTA® Elute- und 903® Specimen Collection-Paper noch Proben mit 400 Kopien/ml erfasst. Ferner wurden 70 klinische Proben mittels Ind. FTA-Papier getestet und 10 mittels FTA Elute- und 903-Filterpapier. Die Sensitivität der Methode betrug im Vergleich zum „Shell Vial Assay“ 43,2% beim Einsatz des Ind. FTA-, 60% beim 903- und 70% beim FTA Elute-Filterpapiers. Im Vergleich zur PCR aus mit Qiagen isoliertem Urin erreichte die Methode eine Sensitivität von jeweils 58,3% mit Ind. FTA-, 50% mit dem 903-, und 83,3% mit FTA Elute-Filterpapier. Eine Korrelation zwischen Viruslast in der Filterpapier-Probe und in der mit Qiagen isolierten Urinprobe bestand nur beim FTA Elute Filterpapier.

Der Nachweis von HCMV-DNA aus auf FTA Elute-Filterpapier getrockneten Urinproben scheint ein vielversprechender Ansatz in der HCMV-Diagnostik zu sein. Um diese Methode für epidemiologische und/oder diagnostische Zwecke empfehlen zu können, müssten noch umfangreichere klinische Studien durchgeführt werden.

Summary

Congenital HCMV infection is still a major cause of sensorineural hearing loss and mental retardation. Therefore, new intervention strategies for the prevention of HCMV infection are required. Universal screening programs would make an early therapy and an accurate monitoring possible. However, for the introduction of a neonatal screening program, simplification of collection protocols, sample processing techniques together with the development of rapid and sensitive tests are needed.

We evaluated the usefulness of urine samples collected on filter paper for detecting HCMV by PCR and compared the sensitivity of the assay with reference methods. We used two chemically treated filter papers, the Indicating FTA[®] Classic Card (Ind. FTA-Paper) and the FTA Elute paper, and a filter paper without additives, the 903 Specimen Collection Paper (903-Paper).

Sample collection, shipping and processing were very simple and rapid. Serial dilutions of supernatant prepared from human fibroblasts infected with HCMV AD 169 were used to evaluate the sensitivity of the assay. Using Ind. FTA paper the detection threshold of the test was 4,000 copies/ml; the assay reached a sensitivity of 400 copies/ml using FTA Elute and 903 Paper. The sensitivity of the filter paper assay compared with virus isolation was 43,2% using Ind. FTA-Paper, 60% using 903-Paper and 70% using FTA Elute-Paper. Sensitivity of our assay was 58,3% for Ind. FTA paper, 50% with 903 paper and 83,3% with FTA Elute paper compared with PCR using urine samples extracted with Qiagen. Correlation between the viral load in urine sample and the corresponding filter paper sample was found only using FTA Elute paper.

The detection of HCMV DNA in urine samples collected on FTA Elute Filterpaper seems to be a promising option for detecting congenital HCMV Infection. However, before widespread use of the methodology for screening and/or epidemiological studies, optimisation of the sensitivity of the assay and wider clinical studies are needed.

Literaturverzeichnis

Adler S.P. Cytomegalovirus and child day care. Evidence for an increased infection rate among day-care workers. *N Engl J Med* 1989;321:1290-300.

Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr* 2004;145:485-91.

Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of mother to child transmission of cytomegalovirus by changing behaviors: a randomised controlled trial. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:240-46.

Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis* 1999;31:443-57.

Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wieder role for congenital CMV infection in sensorineural hearing loss. *J Pediatr Infect Dis* 2003;22:39-42.

Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots, *Rev Med Virol* 2006;16:385-92.

Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, Dido P, Guidotti P, Corbetta C, Melotti D. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol* 2000;17:159-65.

Barbi M, Binda S, Primache V, Luraschi C, Corbetta C. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in dried blood spots. *Clin Diagn Virol* 1996;6:27-32.

Beck IA, Drennan KD, Melvin AJ, Mohan KM, Herz AM, Alarcon J, Piscocoya J, Velasquez C, Frenkel LM. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood samples for diagnosis in infants in the field. *J Clin Microbiol* 2001;39:29-33.

Binda S, Caroppo S, Dido P, Primache V, Veronesi L, Calvario A, Piana A, Barbi M. Modification of CMV DNA detection from dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection. *J Clin Virol* 2004;30:276-9.

Bissinger AL, Singer C, Kaiserling E, Jahn G. HCMV as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J Med Virol* 2002;67:200-6.

Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to

cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999;104:55-60.

Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, Britt WJ. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 2005;146:817-23.

Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *J Pediatr Infect Dis* 1992;11:93-9.

Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001; 344:1366-71.

Boppana SB, Smith RJ, Stagno S, Britt WJ. Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1992;30:721-3.

Bradford RD, Cloud G, Lakeman AD, Boppana S, Kimberlin DW, Jacobs R, Demmler G, Sanchez P, Britt W, Soong SJ, Whitley RJ. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *J Infect Dis* 2005;191:227-33.

Collier AC, Handsfield HH, Ashley R, Roberts PL, Derouen T, Meyers JD, Corey L. Cervical but not urinary excretion of cytomegalovirus is related to sexual activity and contraceptive practices in sexually active women. *J Infect Dis* 1995;171:33-8.

Collinet P, Houfflin-Debarge V, Subtil D. Against systematic screening of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:436-40.

Daiminger A, Bäder U, Enders G. Pre and periconceptional primary cytomegalovirus infection: risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOG* 2005;122:166-72.

Daiminger A, Schalasta G, Betzl D, Enders G. Detection of human cytomegalovirus in urine samples by cell culture, early antigen assay and polymerase chain reaction. *Infection* 1994; 22:24-8.

De Trincado DE, Rawlinson WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health*. 2001;37:187-92.

Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus infection treatment. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:1005-6. Review.

Demmler GJ. Cytomegalovirus Infection : Back to the future or no more Elephants? *Clin*

Infect Dis 2006;43:1152-3.

Demmler GJ. Summary on a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev Infect Dis 1991;13:315-29.

Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. J Virol 2000;74:6808-20.

Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. J Pediatr 1997;130:624-30.

Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. Pediatrics 2006;118:286-92.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med 1992;326:663-7.

Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M, Tabrizi R, Schrive MH, Fleury H, Lafon ME. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. J Clin Virol 2006;36:72-5.

Gaytant AM, Steegers EA, Semmekrot BA, Merckus HM, Galama JM. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. Obstet Gynecol Surv 2002;57:245-56. Review.

Gerna G, Baldonti F, Revello MG. Pathogenesis of HCMV Infection and cellular targets. Hum Immunol 2004;65:381-6:

Griffiths P.D. Strategies to prevent CMV infection in the neonate. Semin Neonatol 2002;7:293-9.

Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, Engele H, Roseggers H, Schalk A, Kessler HH, Trushing-Wilders M. HCMV load in various body fluids of congenitally infected newborns. J Clin Virol 2002;25:581-7.

Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infant by breastfeeding. Lancet 2001;357:513-8.

Hecker M., Qiu D, Marquardt K, Bein G, Hackstein H. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. Vox Sang 2004 ;86:41-4.

Ivarsson SA, Lenmark B, Svanberg L. Ten-year clinical, developmental, and intellectual

follow-up of children with congenital cytomegalovirus infection without neurologic symptoms at one year of age. *Pediatrics* 1997;99:800-3.

Johansson PJ, Jonsson M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Svanberg L, Guthenberg C. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. *Scand J Infect Dis* 1997;29: 465-8.

Joseph A, Beliveau C, Muecke CJ, Rahme E, Soto JC, Flowerdew G, Johnston L, Langille D, Gyorkos TW. Risk factors for cytomegalovirus seropositivity in a population of day care center educators in Montreal, Canada. *Occupat Med* 2005;55:564-7.

Joshi K, Nada R, Radotra BD, Jha V, Sakhia V. Pathological spectrum of cytomegalovirus infection of renal allograft recipients-an autopsy study from north India. *J Indian Pathol Microbiol* 2004;47:327-32.

Kashiwaghij Y, Nemoto S, Kawashima H, Takenuma K, Matsuno T, Hoshika A, Nozaki-Renard J. Cytomegalovirus DNA among children attending two day-care centers in Tokyo. *Pediatrics Internat* 2001;43 :493-5.

Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* 1991;44:360-5.

Kimberlin DW, Lin CY, Snachez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, Jacobs RF, Vaudry W, Pass RF, Kiell JM, Soong SJ, Whitley RJ; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003;143:16-25.

Kothari A, Ramachandran VG, Gupta P, Singh B, Talwar V, Seroprevalence of cytomegalovirus among voluntary blood donors in Delhi, India. *J Health Popul Nutr* 2002;20:348-51.

Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, Landini MP, Faldella G. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006;117:76-83.

Lipitz S, Achiron R, Zalel Y, Mendelson E, Tepperberg M, Garnzu R. Outcome of pregnancies with vertical transmission of primary cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2002;100:428-33.

Maidji E, Percivalle E, Gerna G, Fisher S, Pereira L. Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. *Virology* 2002;304:53-69.

McIver CJ, Jacuwes CF, Chow SS, Munro SC, Scott GM, Roberts JA, Craig ME, Rawlinson WD. Development of multiplex PCRs for detection of common viral pathogens and agents of congenital infections. *J Clin Microbiol* 2005;43:5102-10.

- Meier J, Lienicke U, Tschirch E, Krüger DH, Wauer RR, Prösch S. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol* 2005;43:1318-24.
- Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication. In: BN Fields, DM Knipe and PM Howley (ed.), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001:2641-55.
- Munro SC, Trincado D, Hall B, Rawlinson WD. Symptomatic infant characteristics of congenital cytomegalovirus disease in Australia. *J Pediatr Child Health* 2005;41:449-52.
- Nelson CT, Ista AS, Wilkerson MK, Demmler GJ. PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3317-8.
- Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, Griesser C, Sellers S, Llorente A, Littman T, Williams S, Jarret L, Yow MD. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr Infect Dis* 2000;19:505-10.
- Paixao P, Almeida S, Gouveia P, Binda S, Caroppo S, Barbi M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods* 2005;128:1-5.
- Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection : symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 2006;35:216-20.
- Pass RF, Hutto C, Lyon MD, Cloud G. Increased rate of cytomegalovirus infection among day care center workers. *Pediatr Infect Dis* 1990;9: 465-70.
- Pass RF. Cytomegaloviruses. In: BN Fields, DM Knipe and PM Howley (ed.), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Raven, 2001: 2677-83.
- Percivalle E, Revello MG, Vago L, Morini F, Gerna G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus are detected in disseminated HCMV infection with organ involvement. *J Clin Invest* 1993; 92:663.
- Pereira L, Maidji E, Mc Donagh S, Genbacev O, Fisher S. Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenetic bacteria and maternal immunity. *J Virol* 2003;77:13301-14.
- Porath A, McNutt RA, Smiley LM, Weigte KA. Effectiveness and cost benefit of a proposed live cytomegalovirus vaccine in the prevention of congenital disease. *Rev Infect Dis*. 1990;12:31-40.
- Preiser W, Buxbaum S, Fleckenstein C, Doerr HW. Measurement of CMV DANN levels and CMV-Specific CD4+ Lymphocyte count in patient specimens: Requirements for test quality and practicability in a routine diagnostic service. In: Prösch S, Cinatl J, Scholz M

(eds) *New Aspects of CMV- Related Immunopatology*. Monogr Virology. Basel: Karger, 2003:133-48.

Preiser W. Zytomegalievirus (CMV). In: Preiser W, Rabenau HF, Doerr HW (Hrsg) *Viren, Viruserkrankungen: Synopsis der Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie viraler Erkrankungen*. Steinen: Zett, 2002:205-9.

Pultoo A, Meeto G, Pyndiah MN, Khitto G. Seroprevalance of cytomegalovirus infection in mauritian volunteer blood donors. *Indian J Med Sci* 2001;55:73-8.

Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of HCMV infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:680-715.

Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G. Diagnostik and prognostik value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 1999;14:57-66.

Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorini G, Gerna G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary HCMV infections. *J Infect Dis* 2002;186:553-7.

Roizman B. Herpesviridae. In: BN Fields, DM Knipe, and PM Howley (ed.) Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001:2381-2.

Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, Boppana SB. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr* 2006;148:332-6.

Schalasta G, Eggers M, Schmid M, Enders G. Analysis of human cytomegalovirus DNA in urines of newborns and infants by means of a new ultrarapid real-time PCR-system. *J Clin Virol* 2000;19:175-85.

Schleiss MR. Progress in cytomegalovirus vaccine development. *Herpes* 2005;12:66-75.

Schleiss MR, Anderson JL, McGregor A. Cyclic cidofovir (cHPMPC) prevents congenital cytomegalovirus infection in a guinea pig model. *J Virol* 2006;3:9.

Schleiss MR, Stroup G, Pogorzelski K, McGregor A. Protection against congenital cytomegalovirus (CMV) disease, conferred by a replication-disabled, bacterial artificial chromosome (BAC)-based DNA vaccine. *Vaccine* 2006;24:6175-86.

Schleiss MR. Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection: recent advances. *Current Opin Pediatr* 2006;18:48-52. Review.

Seale H, Macintyre CR, Gidding HF, Backhouse JL, Dwyer DE, Gilbert L, National serosurvey of cytomegalovirus in Australia. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1181-4.

Shen CY, Chang SF, Chao MF, Yang SL, Lin GM, Chang WM, Wu CW, Yen MS, Ng HT, Thomas JC et al. Cytomegalovirus recurrence in seropositive pregnant women attending obstetric clinics. *J Med Virol* 1993;41:24-9.

Shen CY, Chang SF, Yen MS, Ng HT, Huang ES, Wu CW. Cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant woman. *J Clin Microbiol* 1993;31:1635-36.

Shibata M, Morishima T, Trashima M, Kimura H, Kuzushima H, Hanada N, Nishikawa K, Wanatabe K. Human cytomegalovirus infection during childhood: detection of viral DNA in peripheral blood by means of polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1990;179:245-53.

Smets K, De Coen K, Dhooge L, Standaert L, Laroche S, Mahieu L, Logghe N, Cossey V, Boudewyns A. Selecting neonates with congenital cytomegalovirus infection for ganciclovir therapy. *Eur J Pediatr* 2006;165:885-90.

Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to the fetus and clinical outcome. *JAMA* 1986;256:1904-8.

Stagno S. Cytomegalovirus In: Remington JS, Klein JO, (ed.) *Infectious diseases of the fetus and the newborn infant*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995:241-51.

Stanbery LR, Rosenthal SL, Mill L, Succop PA, Biro FM, Morrow RA, Bernstein DI, Longitudinal risk of herpes simplex virus (HSV) Type 1, Type 2, and cytomegalovirus infections among young adolescent girls. *Clin Infect Dis* 2004;39:1433-8.

Staras SAS, Dollard SC Radford KW, FlandersWD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United-States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 2006;43:1143-51.

Urwijitaroon Y, Teawpatanataworn S, Kitjareontarm A. Prevalence of cytomegalovirus antibody in thai-northeastern blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24:180-2.

Wang Z, La Rosa C, Lacey SF, Maas R, Mekhoubad S, Britt WJ, Diamond DJ. Attenuated poxvirus expressing three immunodominant CMV antigens as a vaccine strategy for CMV infection. *J Clin Virol* 2006;35:324-31.

Warren WP, Balcarek K, Smith R, Pass RF. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* 1992;30:786-9.

Yamagishi Y, Miyagawa H, Wada K, Matsumoto S, Arahori H, Tamura A, Taniguchi H, Kanekiyo T, Sashihara J, Yoda T, Kitagawa M, Ozono K. CMV DNA Detection in dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection in Japan. *J Med Virol* 2006;78:923-5.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Cristina P, Pinto G, Moraes-Figueiredo LT, Jorge SM. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:188-92.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Britto RM, Oliveira PF, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol* 2006;36:228-30.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PC, Figueiredo LT, Jorge SM. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique. *J Virol Methods* 2001;97:159-64.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Plazenta (Modifiziert nach Fisher et al., 2000).....	7
Abb. 2: Getrocknete Urinproben auf Ind. FTA-, FTA Elute- und 903- Filterpapier.....	20
Abb. 3: Prinzip der Taq- Man PCR. A: Die Taq-Polymerase spaltet mit ihrer Nuklease Aktivität die hybridisierte Sonde. B: Räumliche Trennung von Reporter und Quencher. Erhöhung des Fluoreszenz-Signals proportional zur Anzahl der gebildeten Amplikons....	32
Abb. 4: Standard Kurve: Normalisierte CT Werte (CT für HCMV geteilt durch CT für MCMV) in Abhängigkeit der Zahl der HCMV DNA Kopien pro Milliliter Standard (nach Preiser et al. 2003)	35
Abb. 5: HCMV DNA Nachweis in Filterpapier-Proben (Ind. FTA-Papier) aus einer AD 169 Dilutionsreihe in Abhängigkeit der bekannten HCMV Konzentration der Proben. Vergleich der Ergebnisse beim Einsatz unterschiedlicher Stanzengrößen.....	37
Abb. 6: MCMV Nachweis mittels PCR in Filterpapier-Proben (Ind. FTA Papier) und Qiagen-Proben aus einer MCMV Dilutionsreihe in Abhängigkeit der MCMV Konzentration der Proben	38
Abb. 7: Vergleich der Sensitivität des HCMV Nachweises mittels PCR in Filterpapier-Proben (Ind. FTA-Papier) aus einer HCMV AD 169 Dilutionsreihe mit internen Kontrolle (MCMV Stocklösung 10-3) und ohne internen Kontrolle.....	39
Abb. 8: HCMV Nachweis in Filterpapier-Proben (Ind. FTA-Filterpapier) aus einer HCMV AD 169 Dilutionsreihe in Wasser in Abhängigkeit der bekannten HCMV Konzentration der Proben.....	40
Abb. 9: Sensitivitätsbestimmung der Methode: HCMV Nachweis mittels PCR aus Qiagen- und Filterpapier-Proben (Ind. FTA-, FTA Elute- und 903- Papier) in Abhängigkeit der bekannten HCMV Konzentration der Proben	41
Abb. 10: HCMV DNA Nachweis in Qiagen isolierten Urinproben (Qiagen-Proben) und aus Filterpapier isolierten Urinproben (Filterpapier-Proben) in Abhängigkeit der geschätzten Kernzahl der Proben	43
Abb. 11: Standard Kurve für die Quantifizierung der Qiagen isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT-Werte HCMV/CT-Werte MCMV) in Abhängigkeit der Zahl der HCMV DNA Kopien pro Milliliter Standard.....	46
Abb. 12: Standard Kurve für die Quantifizierung der aus Ind. FTA-Filterpapier isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT- Werte HCMV/ CT -Werte MCMV) in Abhängigkeit der HCMV DNA Konzentration im Standard	46
Abb. 13: Vergleich der in den Filterpapier-Proben gemessene HCMV DNA Konzentration mit der in den Qiagenproben gemessenen HCMV DNA Konzentration	47

Abb. 14: Standard Kurve für die Quantifizierung der aus FTA Elute-Filterpapier isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT- Wert HCMV/ CT -Wert MCMV) in Abhängigkeit der HCMV DNA Konzentration im Standard 49

Abb. 15: Standard Kurve für die Quantifizierung der aus 903-Filterpapier isolierten Urinproben: Normalisierte CT-Werte (CT- Wert HCMV/ CT -Wert MCMV) in Abhängigkeit der HCMV DNA Konzentration im Standard 49

Abb. 16: Vergleich der in den Filterpapier-Proben gemessene HCMV DNA Konzentration mit der in den Qiagen-Proben gemessenen HCMV DNA Konzentration beim FTA Elute-Filterpapier..... 50

Abb. 17: Vergleich des HCMV DNA-Nachweises mittels PCR aus Qiagen- und Ind. FTA-Proben..... 50

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Volumina in den verschiedenen Vorbereitungsschritten für die PCR	42
Tab. 2: Vergleich des Virusnachweises mittels „Shell Vial“ Verfahren und PCR aus Ind. FTA-Proben.....	44
Tab. 3: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus Ind.FTA-Proben und positive Virusisolierung im „Shell Vial“ Verfahren in Abhängigkeit der Kernzahl der Proben	44
Tab. 4: Vergleich des HCMV DNA Nachweises mittels PCR aus Qiagen- und Ind.FTA-Proben.....	45
Tab. 5: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus Ind. FTA-Proben und Qiagen-Proben in Abhängigkeit der Kopienzahl der Proben.....	45
Tab. 6: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus FTA Elute-Proben und positive Virusisolierung im „Shell Vial“ Verfahren in Abhängigkeit der Kernzahl der Proben	48
Tab. 7: Vergleich des Virusnachweises mittels PCR aus 903-Proben und positive Virusisolierung im „Shell Vial“ Verfahren in Abhängigkeit der Kernzahl der Proben	48

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H.W. Doerr (Direktor des Instituts für Medizinische Virologie) danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Preiser danke ich für die Betreuung und Beratung beim ersten Teil meiner Arbeit. Herrn PD Dr. Martin Stürmer (Institut für Medizinische Virologie) danke ich herzlich für die Übernahme, die wertvolle fachliche Beratung und für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei Frau Marhild Kortenbusch bedanke ich mich für die Einweisung in die Arbeitstechniken, die qualifizierte Hilfestellung und vielfältige Beratung.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie, möchte ich für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Im Besonderen gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Großmutter für die finanzielle Unterstützung, Gonca Grau und Katalin Podmaniczky für die Durchsicht des Manuskripts, Carola Arfeller für die wertvolle Unterstützung bei der Formatierung sowie Gyöngyi Paetzke und Petra Fischlein die mich in jeder Phase der Promotion ermutigt haben und mir immer zur Seite standen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: **Präanalytik zur HCMV Diagnostik** im Zentrum der Hygiene, Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. H.W. Doerr ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Tübingen, 18.01.2010

Unterschrift

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Travers-Podmaniczky
Vorname: Gabrielle
Geburtsdatum: 19.09.1981
Geburtsort : Laval (F)

Schulausbildung

09/1986 - 09/1996 Grundschole in Ecommoy, Frankreich
09/1996 - 09/1999 Gymnasium im Lycee Montesquieu, Le Mans, Frankreich
Abschluß: Abitur (Baccalaureat general, serie scientifique)

Studium

10/1999 - 11/2001 Studium der Humanmedizin an der Semmelweiss
Universität, Budapest, Ungarn
08/2001 Ärztliche Vorprüfung
10/2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der J.W.
Goethe Universität, Frankfurt a. M.
03/2003 1.Staatsexamen
03/2005 2.Staatsexamen
05/2006 3.Staatsexamen

Berufliche Tätigkeiten

Seit 07/2007 Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie und
Psychotherapie, Uniklinikum Tübingen

Promotionsarbeit

04/2005 - 02/2011

Dissertation am Institut für Medizinische Virologie,
Universität Frankfurt/Main, unter der Leitung von Herrn
Prof. Dr. med. H.W. Doerr
Thema: Präanalytik zur HCMV Diagnostik

Tübingen, 18.01.2010

Unterschrift