

Quantifizierung von CMV-DNA als diagnostisches Werkzeug zur verbesserten Behandlung und Überwachung von Risikopatienten

CMV Genome Quantification as a Diagnostic Tool for Improving Treatment and Monitoring of Risk Patients

Corinna Fleckenstein, H. W. Doerr, W. Preiser

Zusammenfassung: Die Entwicklung neuer Technologien zur Diagnose von Zytomegalievirus-Infektionen hat zu maßgeblichen Fortschritten beim Management von Risikopatienten und bei der Überwachung der antiviralen Behandlung geführt. Zu den Quantifizierungsmethoden mittels Virusisolierung und Antigennachweis gesellen sich in den letzten Jahren vermehrt molekularbiologische Techniken, die auf einem quantitativen Nachweis viraler Nukleinsäuren in Patientenproben basieren. Diese finden zunehmend Eingang in die virologische Routinediagnostik, eine Entwicklung, die durch die Verfügbarkeit verschiedener kommerzieller Tests noch verstärkt wird. Die sogenannte „Viruslast“-Testung, wie die Quantifizierung meist genannt wird, erfüllt verschiedene klinische Zwecke: Neben der Nutzung als diagnostisches Werkzeug wird sie auch als prognostischer Marker hinsichtlich einer CMV-Erkrankung sowie als therapeutischer Marker zur Überwachung der Wirksamkeit einer antiviralen Therapie und schließlich zur Abschätzung der Infektiosität verwendet. Dieser Übersichtsartikel stellt die neuen Methoden kurz vor und beschäftigt sich mit der Bedeutung des quantitativen CMV-DNA-Nachweises für klinische Zwecke zur verbesserten Behandlung und Überwachung von Risikopatienten.

Schlüsselwörter: Virus-Quantifizierung; Zytomegalievirus (CMV); virale Nukleinsäuren; antivirale Medikamente; Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Summary: The development of new technologies for the diagnosis of cytomegalovirus (CMV) infections has led to remarkable progress in the management of at-risk patients and in the monitoring of antiviral therapy. In addition to quantification methods based on virus isolation and antigen detection, molecular biological methods on the quantitative detection of viral nucleic acids

in patient samples have been developed. These new techniques are increasingly utilised in virological routine diagnosis, a process strengthened by several commercially available tests. So-called „viral load“ testing, as virus quantification is often referred to, fulfills various diagnostic purposes besides its use as a diagnostic tool: as a prognostic marker for CMV disease, as a therapeutic marker for monitoring the success of antiviral therapy, and to assess infectivity. This review article briefly describes the new methods and then deals with the significance of quantitative CMV detection for clinical purposes to improve management and surveillance of at-risk patients.

Keywords: virus quantification; cytomegalovirus (CMV); viral nucleic acids; antiviral drugs; polymerase chain reaction (PCR).

Das humane Cytomegalievirus (CMV) verursacht bei etwa 60–80 % der Bevölkerung in Industrieländern eine lebenslang persistierende Infektion (Abb. 1).

Eine CMV-Infektion kann als Folge einer Primärinfektion, einer (endogenen) Reaktivierung oder einer (exogenen) Re-(Super-)Infektion entstehen. Die beiden letztgenannten Entitäten können im klinischen Alltag normalerweise nicht voneinander abgegrenzt werden und werden daher meist unter Reaktivierung subsumiert.

Das Virus ist in der Lage, aus dem Latenzzustand heraus zu reaktivieren und so unter Umständen eine ernsthafte Erkrankung hervorzurufen. Nach wie vor stellt das CMV – meist im Rahmen einer reaktivierten Infektion – eine der Hauptursachen für Erkrankungen und Todesfälle nach Transplantationen dar. Weitere Risikogruppen sind schwangere Frauen und HIV-Infizierte. So haben Empfänger von Knochenmarkstransplantaten ein 15–35%iges Risiko, eine CMV-Erkrankung zu entwickeln [1], und vor der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) entwickelte ein Drittel der AIDS-Patienten eine CMV-Retinitis [2]. Während bei immunkompetenten CMV-Infizierten die Infektion – ob primär oder reaktiviert – in der Regel asymptomatisch bleibt, verlagert sich bei den Risikogruppen das immunologische Gleichgewicht

Institut für Medizinische Virologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland.

Korrespondenz: Wolfgang Preiser, Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Paul-Ehrlich-Straße 40, 60596 Frankfurt am Main, Deutschland.

Fax: +49 69 63 01-64 77

E-Mail: W.Preiser@en.uni-frankfurt.de

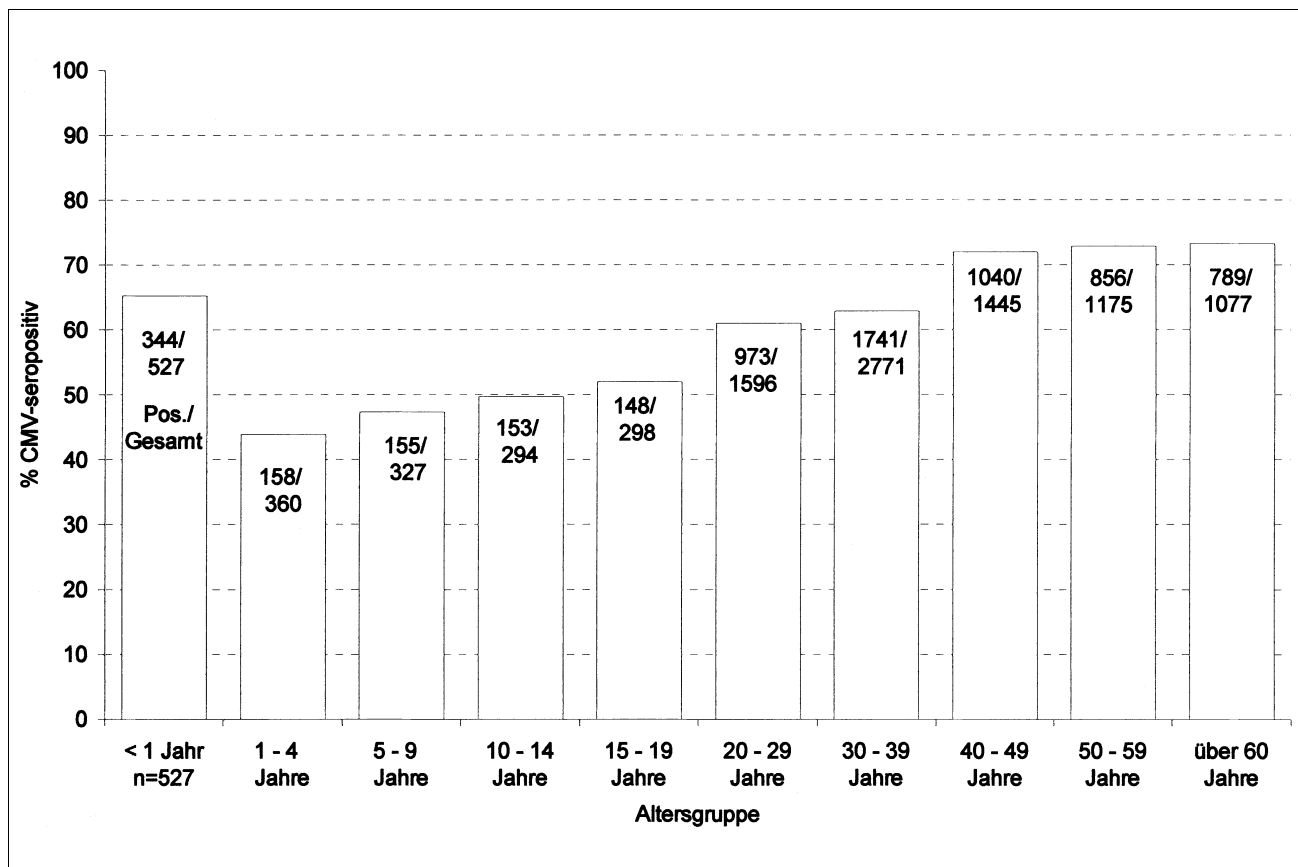


Abbildung 1 Altersspezifische CMV-IgG-Seroprävalenzraten bei den Einsendungen an das Institut für Medizinische Virologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main 1996 bis 1999. Insgesamt wurden n = 9870 Patienten getestet, davon waren 6357 (64,4 %) CMV-IgG-positiv

zugunsten des Virus, da die Balance zwischen zellulärer (cytotoxische T-Lymphozyten) und humoraler (gegen CMV gerichtete Antikörper) Immunität und Virus schwer gestört ist [3]. Im Rahmen einer hohen viralen Replikationsaktivität kann – muß aber nicht – eine CMV-Erkrankung ausgelöst werden.

Eine CMV-Infektion kann als direkte Auswirkung ein recht uncharakteristisches virales Syndrom oder auch eine CMV-Endorgan-Erkrankung wie z. B. Pneumonitis, Hepatitis, Retinitis, Myocarditis u. a. zur Folge haben. Die relative Häufigkeit verschiedener Organmanifestationen unterscheidet sich erheblich zwischen den unterschiedlichen Risikogruppen (Hauptmanifestation bei AIDS-Patienten: Retinitis, bei KMT-Empfängern: Pneumonitis).

Die ubiquitäre Natur des CMV und die hohe Durchseuchung der Bevölkerung stellen ein Problem für die virologische Diagnostik dar. Ein qualitativer Virusnachweis alleine bedeutet nicht zwingend eine CMV-Erkrankung, da es auch beim Immungesunden in regelmäßigen Abständen zu einer Virusreaktivierung kommt. Daher wurden Kriterien zur Definition einer CMV-Erkrankung entwickelt, die regelmäßig im Lichte neuer

Entwicklungen diagnostischer Technologien und Erkenntnisse über CMV-assoziierte Erkrankungen überarbeitet werden [4, 5]. Eine CMV-Erkrankung wird diagnostiziert, wenn der Patient das entsprechende klinische Syndrom zeigt und der Nachweis des Virus möglichst im betroffenen Körperteil erfolgt. Als indirekte CMV-Auswirkungen betrachtet man die Möglichkeit der Transplantatabstoßung sowie die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Atherosklerose nach Herztransplantation sowie das verstärkte Auftreten von Sekundärinfektionen mit Pilzen und Bakterien [6].

Therapeutische und diagnostische Ansätze

In den letzten Jahren konnten viele Fortschritte hinsichtlich der Handhabung von CMV-Infektionen und -Krankheiten erzielt werden. Derzeit sind eine Reihe von CMV-wirksamen Chemotherapeutika verfügbar [7]. Acyclovir und Penciclovir bzw. ihre oralen Prodrugs haben nur eine relativ schwach hemmende Wirkung auf die Replikation des CMV und werden deshalb

allenfalls prophylaktisch eingesetzt. Mittel der Wahl ist ein weiteres Nukleosidanalogon, das Ganciclovir (GCV, DHPG). Verglichen mit Acyclovir ist es jedoch deutlich toxischer; insbesondere die dadurch ausgelöste Myelotoxizität ist gerade bei Knochenmarktransplantierten nachteilig. Das GCV hat außerdem nur eine geringe orale Bioverfügbarkeit (5 bis 9 %). Ein Valinester des GCV, das Valganciclovir, wurde als oral zu verabreichendes Prodrug entwickelt; jüngste klinische Studien zeigen eine gute Wirksamkeit sogar zur Induktionstherapie bei CMV-Retinitis [8]. Ist GCV aufgrund seines Nebenwirkungsspektrums kontraindiziert oder besteht der Verdacht auf einen GCV-resistenten CMV-Stamm, so bietet Foscarnet als allosterischer DNA-Polymerasehemmer eine Alternative. Auch hierbei bereitet die Toxizität (Nierenfunktionsstörungen, Elektrolytverschiebungen) häufig Probleme. Eine weitere Alternative zum GCV stellt das bereits über eine Phosphatgruppe verfügende und somit ebenso wie das Foscarnet gegenüber Mutationen im UL97-Gen unempfindliche Nukleotidanalogon Cidofovir dar; es ist in Deutschland bislang zur Behandlung der CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten (als Therapie der zweiten Wahl) zugelassen. Als weltweit erstes „Antisense“-Präparat kann zudem Fomivirsin (ISIS 2922) mittels intravitrealer Injektion bei anderweitig nicht behandelbaren Fällen von CMV-Retinitis angewandt werden. Es handelt sich hierbei um ein modifiziertes Oligonucleotid, das sich aufgrund seiner zu einer Teilsequenz der CMV-messenger-RNA komplementären Sequenz daran anlagert, so die Translation der „major immediate early“-Region 2 (IE2) des CMV verhindert und die Bildung der für die CMV-Replikation notwendigen Proteine unterbindet.

Trotz dieses umfangreichen Arsenal hat die derzeitige antivirale Therapie gegen CMV mit diversen Problemen zu kämpfen; neben der Toxizität der Medikamente und ihren unerwünschten Nebenwirkungen sind dies die hohen Kosten und das Problem, daß die Behandlung einer einmal manifesten CMV-Erkrankung oftmals nicht mehr zum Erfolg führt. Daraus ergeben sich hohe Anforderungen an die Labordiagnostik, um den Patienten einerseits hinreichend, andererseits aber auch nur soweit wirklich erforderlich therapieren zu können.

Es ist daher notwendig, möglichst rasch so viele Informationen wie möglich über die Aktivität der CMV-Infektion zu erhalten. Mittlerweile gibt es eine Reihe von prinzipiell hierfür geeigneten Verfahren, insbesondere durch die Entwicklung neuer diagnostischer Techniken im Bereich der Molekularbiologie. Eine besondere Rolle spielen dabei verstärkt quantitative Nachweismethoden, vor allem der Nachweis frei zirkulierender DNA in menschlichem Plasma, die eine deutliche Verbesserung im Hinblick auf das Patientenmanagement bedeuten [9]. Ähnlich wie dies auch bei anderen viralen Erregern der Fall ist, kann die Virusquantifizierung, insbesondere durch Quantifizierung des viralen Genoms als sogenannte „Viruslast“-Testung, in mehrfacher Weise diagnostisch eingesetzt werden [10]: als diagnostischer Marker, als prognostischer Marker, als therapeutischer Marker sowie zur Abschätzung der Infektiosität. Nur dadurch wird es möglich, die anti-CMV-Chemotherapie möglichst gezielt einzusetzen.

Möglichkeiten des CMV-Nachweises

Es gibt vielfältige Möglichkeiten der CMV-Diagnostik. Man unterscheidet zwischen direkten (Virus oder Virusbestandteile) und indirekten Methoden (über die spezifische Immunantwort). Einen Überblick über die für die CMV-Diagnostik zur Verfügung stehenden Methoden bietet Tabelle 1.

Die Auswahl im konkreten Fall muß anhand der diagnostischen Fragestellung erfolgen. So ist der Nachweis virusspezifischer IgG-Antikörper als Durchseuchungsmarker bei CMV-Risikopatienten wertvoll und dient u. a. zur Abschätzung des Risikos einer Primärinfektion bzw. Reaktivierung im Vorfeld. Antikörpertests erlauben jedoch nur eine sehr eingeschränkte Aussage über eine Infektreaktivierung oder das Erkrankungsrisiko. Für die Überwachung von Risikopatienten ist daher der direkte Virusnachweis bzw. der Nachweis von Virusbestandteilen vorzuziehen.

Der qualitative Virusnachweis alleine ist jedoch nicht ausreichend, um als prognostischer und therapeutischer Marker für klinisch relevante Aussagen herangezogen

Tabelle 1 Prinzipielle Möglichkeiten der CMV-Diagnostik

Nachweis des Virus oder von Virusbestandteilen

- Virusisolierung auf Fibroblasten-Zellkulturen
- modifizierte Virus-Schnellkultur („shell vial“, DEAFF-Test)
- direkte Visualisierung im Elektronenmikroskop
- Nachweis von CMV-pp65-Antigen in peripheren Granulozyten (Antigenämietest)
- Nachweis von viraler Nukleinsäure, z. B. mittels PCR: qualitativ, quantitativ („Viruslast“), charakterisierend (Sequenzierung)

Nachweis der antiviralen Immunantwort

- humoral: Antikörper verschiedener Klassen (IgG, IgM, IgA) und Subklassen, z. B. mittels ELISA
- zellulär: virusspezifische T-Lymphozyten (noch nicht routinemäßig)
- unspezifisch: Interferone etc. (nicht routinemäßig)

zu werden. Besonders hochempfindliche molekulare Methoden zeigen nur eine niedrige Korrelation zwischen positiven Testergebnissen und dem Auftreten einer CMV-Erkrankung [11].

Der quantitative Virusnachweis hingegen macht mit Hilfe der Bestimmung der „Viruslast“ eines Patienten eine prädiktive Aussage über eine bestehende oder drohende Erkrankung oder den Therapieerfolg möglich. Es gibt mehrere konventionelle, d. h. nicht-molekularbiologische Methoden, um Viren aus klinischem Probenmaterial zu quantifizieren. Neben der quantitativen Viruskultur, auch im modifizierten Schnellverfahren, wird der quantitative Nachweis von Virusantigen häufig eingesetzt. Obwohl diese Methoden sich bei verschiedenen Fragestellungen und in verschiedenen Patientengruppen als äußerst aussagekräftig erweisen, so stoßen sie doch in vielen Fällen an ihre Grenzen, sei es weil sie aus vielen Probenmaterialien wegen Toxizität nicht gelingen, in manchen Fällen zu langwierig sind oder bei Leukopenie unzureichend Zellen zur Verfügung stehen [12, 13].

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die derzeit verwendeten quantitativen Nachweismethoden von CMV, wobei die konventionelle Zellkultur, der „shell vial assay“ und der pp65-Antigenämietest keine viralen Nukleinsäuren nachweisen und somit keine molekularbiologischen Nachweismethoden sind [14]. Auch bei der CMV-Diagnostik geht der Trend aufgrund ihrer Vorteile (Tabelle 3) in Richtung molekularbiologischer Methoden, vor allem bei Empfängern von Knochenmarktransplantaten, bei denen nicht-molekulare Testverfahren deutlich unterlegen sind [15].

Neben einer Reihe von „in-house“-Verfahren [16] sind drei der in Tabelle 2 aufgeführten molekularen Testmethoden kommerziell erhältlich und werden bereits erfolgreich routinemäßig zur Quantifizierung der Viruslast bei Patienten mit CMV-Infektion eingesetzt [17]. Trotz eines weiterhin fehlenden internationalen CMV-DNA-Quantifizierungsstandards stimmen die mittels der unterschiedlichen Methoden erhaltenen Resultate erstaunlich gut miteinander überein [15]. Sie können als mittlerweile recht ausgereift gelten und sind teilweise weitgehend automatisierbar [18].

Stellenwert der Quantifizierung von CMV-DNA für klinische Fragestellungen

Im folgenden soll näher auf die Rolle der Quantifizierung des viralen Genoms von CMV für die klinisch-diagnostische Virologie eingegangen werden.

CMV-„Viruslast“ als diagnostischer Marker

Wie bereits erwähnt, bedeutet der Nachweis von CMV nicht automatisch eine pathologische Rolle bei einem gleichzeitig bestehenden Krankheitsbild, da auch beim Gesunden nicht selten eine asymptomatische CMV-Reaktivierung vorliegt. Ob mit hochempfindlichen Nukleinsäure-Nachweismethoden wie etwa der „nested“ PCR

im Vollblut oder in der Leukozytenfraktion tatsächlich latentes (zellassoziertes) CMV nachgewiesen werden kann, ist umstritten; es könnte sich auch um eine auf niedrigstem Niveau abspielende aktive Infektion handeln. Es besteht jedoch kein Zweifel daran, daß ein solcher Nachweis geringster CMV-DNA-Mengen praktisch keine klinische Bedeutung hat. Für eine Reihe von CMV-assozierten Krankheitsbildern wurde inzwischen gezeigt, daß die Menge des nachzuweisenden Virus und damit die virale Replikationsaktivität mit dem Schweregrad der klinischen Erkrankung korreliert [19], so etwa bei Kindern mit intrauteriner CMV-Infektion [20], Transplantatempfängern [21] oder bei AIDS-Patienten [22]. In solchen Fällen kann daher die CMV-„Viruslast“-Bestimmung bei der diagnostischen Bewertung sehr hilfreich sein [23].

CMV-„Viruslast“ als prognostischer Marker

Nicht alle Patienten, die eine Reaktivierung von CMV durchmachen, entwickeln notwendigerweise auch eine klinisch manifeste CMV-Erkrankung; dies gilt auch für Risikogruppen wie AIDS-Patienten und Transplantierte. Eine Überwachung von Risikopatienten mittels regelmäßig wiederholter „Viruslast“-Bestimmung ermöglicht es, den viralen Replikationsgrad zu bestimmen und somit eine Aussage über das individuelle Risiko der Entwicklung einer CMV-Erkrankung zu treffen [10]. Neben dem absoluten Wert ist die Kinetik der CMV-„Viruslast“, d. h. die Geschwindigkeit eines Anstieges, hierbei offensichtlich ein wichtiger Faktor [24, 25]. Eine entsprechende regelmäßige Überwachung („surveillance“) erlaubt es, eine sogenannte suppressive oder prä-emptive antivirale Chemotherapie rechtzeitig einzuleiten, bevor es zu einer dann nur noch schlecht therapeutisch zu beherrschenden manifesten CMV-Erkrankung kommt.

Noch immer ist die antivirale Behandlung einer manifesten CMV-Erkrankung problematisch. Die prophylaktische Gabe der erhältlichen antiviralen Medikamente verhindert zwar recht zuverlässig die Entstehung einer CMV-Erkrankung, führt aber in den meisten Fällen zu einer unnötigen „Überbehandlung“ von Patienten, die ohnehin nie eine CMV-Erkrankung entwickelt hätten. Damit ergeben sich Probleme in Bezug auf Toxizität, Durchführbarkeit und Kosten. Die prophylaktische Gabe von Gancyclovir bei Knochenmarktransplantierten reduziert zwar die Episoden einer CMV-Erkrankung, verlängert aber die neutropene Phase aufgrund der toxischen Wirkung auf das Knochenmark und steigert dadurch die Wahrscheinlichkeit von opportunistischen Infektionen mit Bakterien oder Pilzen, so daß sich unter dem Strich kein signifikanter Vorteil der anti-CMV-Prophylaxe ergibt [26, 27].

Aus den genannten Gründen werden heutzutage alternativ suppressive oder prä-emptive (auch frühe) Behandlungsstrategien bevorzugt [28], vor allem bei den Hochrisikogruppen wie KMT-Empfängern (Tabelle 4). Dieser Ansatz basiert auf der regelmäßigen Überwachung der Patienten mit Hilfe geeigneter Nachweismethoden.

Tabelle 2 Quantitative Methoden zur Bestimmung der CMV-„Viruslast“ für die klinische Routinediagnostik

Methoden	Prinzip	Dauer	Vorteile	Nachteile	Probenmaterial
konventionelle Zellkultur	Plaque assay, Inkubation von Verdünnungsreihen aus Probenmaterial	2–4 Wochen	sehr spezifisch, Virusisolate verwendbar für weitergehende Charakterisierung (antivirale Suszeptibilitätstestung etc.)	sich langsam entwickelnder cytopathischer Effekt (CPE), schnelle Abnahme der Infektiosität in den klinischen Proben, häufig Toxizität und Kontamination, kaum standardisiert, geringe Reproduzierbarkeit	prinzipiell alle vom Patienten zu erhaltende Proben; unterschiedlich gut geeignet, v.a. periphere Leukozyten
„Shell vial assay“ oder DEAFF-Test (detection of early antigen fluorescent foci)	Aufzentrifugation des Inokulums auf die Zellkultur, nach 24–48 Std. Anfärbung mittels monoklonaler Antikörper gegen 72 kDa Protein (early antigen)	16–48 h	nicht nur für Blutproben geeignet, relativ schneller Nachweis von infektiösem Virus	geringere Sensitivität, schnelle Abnahme der CMV-Infektiosität in den klinischen Proben, häufig Toxizität und Kontamination, kaum standardisiert, geringe Reproduzierbarkeit	prinzipiell alle vom Patienten zu erhaltende Proben; unterschiedlich gut geeignet, v.a. periphere Leukozyten
pp65 Antigenämietest	Nachweis des viral kodierten „lower matrix“ Proteins (UL83) pp65 in Granulocyten durch angefärbte monoklonale Antikörper	5 h	schnelle Diagnosestellung, mögliche Richtlinie für präemptive CMV-Therapie	schnelle Probenverarbeitung nötig, subjektive Ergebnisinterpretation, bei Leukopenie geringe Sensitivität, geringe Reproduzierbarkeit, kaum standardisiert	periphere Leukozyten aus Patientenblut
„branched DNA assay“ (bDNA)	Signalamplifikation mit bDNA Multiplern	24 h	gute Reproduzierbarkeit	lange Inkubationszeit, nicht geeignet für Patienten mit geringer Leukozytenzahl, teuer	Leukozytenfraktion aus Patientenblut oder Liquor
„Hybrid capture“ DNA assay	Signalamplifikation: DNA-RNA Hybride werden auf einer antikörpermarkierten Oberfläche „gefangen“	6 h	schnelle und einfache Methode	benötigt viele Kontrollen, teuer	Vollblut von Patienten
COBAS AmpliCor CMV Monitor (Roche)	kommerziell erhältliche, quantitative PCR, die mit interner Kontrolle und Standard quantifiziert	4 h	sehr sensitiv, spezifisch und schnell; auch geringe Mengen an viraler DNA werden detektiert – Monitoring von Patienten	teuer	Patientenplasma
„real-time detection PCR“ (RTD-PCR)	fluoreszenzmarkierte Sonden als „sichtbares“ PCR-Signal, interner & externer Standard zur Quantifizierung	2 h	sehr sensitiv, spezifisch und schnell; auch geringe Mengen an viraler DNA werden detektiert – Monitoring von Patienten; keine Kontamination durch Post-Amplifikationschritte	nicht standardisiert	Patientenplasma oder auch Vollblut

Tabelle 3 Stellenwert des viralen Nukleinsäurenachweises in der klinischen Routinediagnostik (nach [10])

Qualitativer Nachweis von Virusgenom:

Vorhandensein von viraler Nukleinsäure als Infektionsmarker

- schwer oder in vitro nicht anzüchtbares Virus bzw. nicht mit anderen Methoden detektierbares Virus
- geringes Probenvolumen oder geringe Anzahl infektiöser Partikel
- Antikörpertestung versagt wegen einer möglichen akuten Infektion („diagnostisches Fenster“), passiv erworbener Antikörper oder bei immunsupprimierten Patienten
- um eine Infektiosität von beispielsweise Blut oder Blutprodukten auszuschließen

Quantifizierung des viralen Genoms: „Viruslast“-Testung

- diagnostischer Marker (z. B. CMV-Viruslast bei mutmaßlicher CMV-Erkrankung)
- prognostischer Marker (z. B. HIV, HCV)
- therapeutischer Marker zur Überwachung einer antiviralen Chemotherapie (z. B. HIV, HCV)
- zur Abschätzung der Infektiosität, wie beispielsweise das Risiko einer vertikalen Übertragung (z. B. HIV)

Charakterisierung des viralen Genoms: Genotypisierung, um mutante Viren und Virusstämme zu entdecken

- prognostischer Marker aufgrund unterschiedlicher Virulenz der verschiedenen Varianten oder Stämme (z. B. HCV)
- Epidemiologie, um eine Infektionskette zurückzuverfolgen bzw. einen Infektionsherd zu lokalisieren (z. B. HIV, Rotaviren)
- therapeutischer Marker zur Überwachung einer antiviralen Chemotherapie und der damit verbundenen Möglichkeit zur Entwicklung von resistenz-assoziierten Mutationen (z. B. HIV)

thoden. Erst wenn der Nachweis einer aktiven CMV-Infektion erbracht ist, wird mit antiviralen Medikamenten behandelt, noch bevor es jedoch zu einer manifesten CMV-Erkrankung kommt. Dieser Therapieansatz ist kostensparend und ist vor allem auch eine Verbesserung für den Patienten, da er die toxischen Auswirkungen der antiviralen Medikamente reduziert. Doch auch bei den verschiedenen Möglichkeiten zum Virusnachweis eignet sich nicht jede Methode für einen in der prä-emptiven Therapie notwendigen Vorhersagewert. So sind die nicht-molekularbiologischen Testmethoden, wie der „shell vial assay“, für eine prädiktive Aussage oft nicht sensitiv genug und könnten damit eine rechtzeitige Behandlung der Patienten nicht gewährleisten. Hingegen sind die hochsensitiven qualitativen Nukleinsäure-Tests oftmals zu sensitiv, da hier die Wahrscheinlichkeit, bei einem positiven Transplantatempfänger latentes bzw. in verschiedenen Geweben persistierendes Virus zu entdecken, sehr hoch ist. Der Einsatz dieser nicht-quantitativen Methoden zur Überwachung der Patienten im Rahmen eines prä-emptiven Ansatzes führt dementsprechend noch immer zur Überbehandlung der Betroffenen [29].

Die Quantifizierung von CMV als ein Marker für aktiv replizierendes Virus stellt somit eine deutliche Verbesserung für die prä-emptive Therapie dar und erlaubt eine bessere Einschätzung von Patienten, die einem hohen Risiko zur Entwicklung einer CMV-Erkrankung ausgesetzt sind [9, 14]. Die am besten geeigneten quantitativen Testmethoden vereinen dabei ein notwendiges Maximum an Sensitivität mit einem möglichst guten Vorhersagewert bezüglich der Krankheitsentwicklung [30, 31].

Eine Hauptschwierigkeit besteht in der Ermittlung eines Grenzwertes für die Viruslast, der eine Erkrankung zuverlässig vorhersagen kann. Dieser Grenzwert

muß zwischen einer häufig vorkommenden, klinisch irrelevanten CMV-„Viruslast“, wie sie durch Latenz, Persistenz des Virus in unterschiedlichen Geweben oder eine asymptomatische Reaktivierung hervorgerufen werden kann, und einer hohen „Viruslast“ als Folge einer hoch-aktiven Virusreplikation, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Erkrankung führen wird, unterscheiden können. Vorläufige Ergebnisse aus verschiedenen Studien zeigen einen weiteren, nicht zu vernachlässigenden Aspekt: Solche Grenzwerte können sich zwischen den verschiedenen Risikogruppen deutlich unterscheiden [12] und müssen zahlreiche individuelle, vom Patienten abhängige Faktoren wie seine Anamnese oder bei Transplantatempfängern die Art und das Ausmaß der iatrogenen Immunsuppression oder -modulation berücksichtigen.

Studien, die die Definition eines prädiktiven Grenzwertes zum Ziel haben, sind allerdings aus ethischen Gründen abzulehnen; denn sie nehmen eine möglicherweise lebensbedrohende Erkrankung eines Patienten an einer schweren CMV-Infektion in Kauf, da eine rechtzeitige Therapie auf Grundlage einer positiven CMV-Viruslastbestimmung vorenthalten wird trotz ihrer nachgewiesenen Fähigkeit, den Krankheitsausbruch zu verhindern [10]. Abgesehen von kaum zu kontrollierenden patienten- und behandlungsinduzierten Faktoren sind die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zu diesem Thema auch aufgrund unterschiedlicher, nicht-standardisierter Testmethoden kaum miteinander vergleichbar [32]. Standardisierte Grenzwerte und Testverfahren für eine prädiktive Aussage über das Risiko zur Entwicklung einer möglichen CMV-Erkrankung wären jedoch wünschenswert, um die Ergebnisse verschiedener Tests und Laboratorien miteinander vergleichen zu können. Unterschiede treten bei der Art des verwendeten Probenmaterials auf (z. B. Vollblut, Plasma oder

Tabelle 4 Therapeutische Ansätze für das Patientenmanagement bei CMV-Infektionen

antivirale Behandlung einer manifesten CMV-Erkrankung	prophylaktische Therapie für alle Risikopatienten	suppressive oder präemptive Therapie aufgrund des Nachweises einer aktiven CMV-Infektion in Bronchoalveolarlavage, Urin etc. bzw. systemisch (im Blut)
<ul style="list-style-type: none"> • kein „unnötiger“ Einsatz von antiviralen Chemotherapeutika • oft erfolglos 	<ul style="list-style-type: none"> • verhindert eine CMV-Erkrankung • setzt Patienten antiviralen Medikamenten (Toxizität, Preis) aus, die möglicherweise keine Erkrankung entwickeln würden • dadurch insgesamt kein Überlebensvorteil 	<ul style="list-style-type: none"> • vereint die Vorteile der beiden anderen Strategien • erfordert verlässliche, schnelle und sensitive Methoden zur regelmäßigen Überwachung von Risikopatienten zur Detektion einer aktiven Infektion

Leukozytenfraktion), bei der Probenaufbereitung, bei der Menge an eingesetztem Testvolumen und natürlich bei der Empfindlichkeit der Nachweismethode. Trotz dieser weiterhin ungelösten Fragen beruht die verbesserte CMV-Prävention während der frühen Posttransplantationsphase zumindest ebenso auf den Verbesserungen in der diagnostischen Virologie wie auf denen der Chemotherapie [13].

CMV-„Viruslast“ als therapeutischer Marker zur Überwachung einer antiviralen Chemotherapie

Durch regelmäßige „Viruslast“-Testung des Patienten kann ein Therapieerfolg anhand der Abnahme der Viruslast beobachtet werden. Analog der Situation beim HIV kann die Überwachung im Verlauf der Medikation ein Therapieversagen anzeigen. Dieses kann unter anderem auf einer Resistenzentwicklung beruhen und gerade bei Risikopatienten ein nicht zu unterschätzendes Problem bei der Therapiegestaltung darstellen [33]. Hier kann die CMV-DNA-Quantifizierung als Surrogatmarker für eine antivirale Suszeptibilitätstestung eingesetzt werden; diese sollte dann im Einzelfall und wenn sonstige Faktoren wie ungenügende Dosierung, mangelnde Compliance oder andere Wirtsfaktoren ausgeschlossen wurden, folgen [34].

Die Überwachung der antiviralen Therapie mittels regelmäßiger „Viruslast“-Testungen protokolliert nicht nur den Therapieerfolg, sondern kann auch einen Mißerfolg aufzeigen, ohne jedoch zwischen den möglichen Ursachen hierfür zu unterscheiden. So kann sowohl ein Therapieversagen aufgrund von viraler Medikamentenresistenz auftreten als auch ein Versagen aufgrund von Faktoren, die vom Patienten abhängen (eigenmächtiger Therapieabbruch bei oraler Medikation, mangelhafte Resorption aus dem Darm, zelluläre Resistenzfaktoren). Die CMV-DNA-Quantifizierung erlaubt es, den Patienten individuell hinsichtlich seiner Reaktion auf eine Behandlung zu überwachen [35].

CMV-„Viruslast“ zur Abschätzung der Infektiosität

Nur am Rande gestreift werden soll hier eine weitere Anwendung der CMV-DNA-Quantifizierung, um bei-

spielsweise das Risiko einer vertikalen Übertragung einschätzen zu können.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Genomquantifizierung von CMV mit Hilfe der dargestellten Methoden hat sich in den letzten Jahren zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der klinischen Routinediagnostik entwickelt. Gerade die PCR als äußerst sensitive, zunehmend robuste und automatisierbare Methode der Virusdiagnostik hat in diesem Bereich eine rapide Entwicklung vom reinen Forschungsinstrument zu einer weit verbreiteten und zuverlässigen virologisch-diagnostischen Methode durchgemacht [36].

Der quantitative Virusnachweis hat gegenüber dem qualitativen Nachweis vielfältige Vorteile; er dient nicht nur als diagnostischer, sondern auch als prognostischer Marker und ermöglicht ein Monitoring der antiviralen Therapie, unter anderem um eine Resistenzentwicklung festzustellen.

Die zahlenmäßig meisten CMV-„Viruslast“-Bestimmungen werden im Rahmen einer prä-emptiven Managementstrategie bei Hochrisikopatienten wie Knochenmarktransplantierten durchgeführt. Hier besteht die dringende Notwendigkeit, weitere Daten über die Korrelation zwischen der Viruslast und dem Risiko der Entwicklung einer CMV-Erkrankung für die unterschiedlichen Risikogruppen zu erheben. Aufbauend darauf sollten auch die Behandlungsstrategien individuell für verschiedene Patientengruppen definiert werden. Die Daten müssen reproduzierbar und die verwendeten Tests nachvollziehbar und untereinander vergleichbar sein [14, 37].

Noch immer ist dies allerdings oft nicht der Fall. Neben einer Vielzahl unterschiedlicher Testprotokolle können auch biologische Faktoren wie z. B. verschiedene Virusstämme Schwierigkeiten bereiten. Einen Lösungsansatz bietet hier die Entwicklung und Einführung von internationalen Quantifizierungsstandards [38] – bisher gibt es keinen WHO-Standard, jedoch zwei kommerzielle CMV-DNA-Standards: Advanced Bio-

technology Inc., USA (<http://www.abionline.com>) mit elektronenmikroskopisch quantifizierter Viruspartikelkonzentration; CLB Viral Diagnostic Laboratory (<http://www.clb.nl>), Holland – und die Etablierung von Qualitätskontrollprogrammen zwischen den einzelnen Laboratorien (z. B. Quality Control for Molecular Diagnostics; siehe: <http://www.qcmd.org>). Die Entwicklung neuer Quantifizierungsmethoden sollte immer von einer gründlichen Testvalidierung begleitet werden, um so den Meßbereich festzulegen und die Testparameter zu ermitteln.

Der Stellenwert, der heutzutage der Viruslastbestimmung gerade für bestimmte Fragestellungen eingeräumt wird, sowie die schnelle Entwicklung immer neuer und potenter antiviraler Chemotherapeutika hat auch zur Entwicklung einer Vielzahl von kommerziell erhältlichen Tests zur Genomquantifizierung geführt. Diese sind relativ ausgereift, jedoch lassen sich weitere Verbesserungen erzielen. Zum einen kann ein mit jeder Probe mitzuführender Interner Standard zur Kontrolle von Extraktions-, Amplifikations- und Detektionseffizienz falsch-negative oder fälschlich niedrige Testergebnisse gleich welcher Ursache aufdecken und so die diagnostische Sicherheit erhöhen [39]; zum anderen ist für den breitgestreuten Einsatz im Labor eine weitere Automatisierung erstrebenswert [40].

Eine Aussicht auf eine weitere, signifikante Verbesserung bei der „Viruslast“-Bestimmung bieten „real-time“-PCR-Methoden; diese ermöglichen nicht nur eine weitere Beschleunigung des Testes, sondern stellen darüber hinaus eine relativ gesehen kostengünstige und äußerst sensitive Methode des viralen Genomnachweises dar. Inzwischen sind eine Reihe von kommerziellen Geräten erhältlich, die eine quantitative PCR in weniger als zwei Stunden, manche sogar in weniger als einer Stunde versprechen. Die gleichzeitig stattfindende Amplifikation und Detektion verhindert eine mögliche Kontamination durch zusätzliche, nach der PCR notwendigen Detektionsschritte [41–44]. „Real-time“-PCR-Methoden zum CMV-DNA-Nachweis wurden entwickelt [45], auch eine voll-kontrollierte Quantifizierung mit internem und externem Standard wurde kürzlich vorgestellt [46]. Der Einsatz von Plasma erlaubt es auch hierbei, weitestgehend nur zellfreies, also einer aktiven Replikation entstammendes Virus zu detektieren, bei andererseits sehr hoher Empfindlichkeit.

Literatur

1. Hebart H, Jahn G, Sinzger C, Kanz L, Einsele H. CMV Infection in Bone Marrow and Solid Organ Transplant Patients in the Era of Antiviral Prophylaxis. *Herpes* 2000;7(1):13–17.
2. Deayton JR. Changing trends in cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *Herpes* 2001;8(2):37–40.
3. Griffiths PD, Cope AV, Hassan-Walker AF, Emery VC. Diagnostic approaches to cytomegalovirus infection in bone marrow and organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 1999;1(3):179–186.
4. de Jong MD, Boucher CA, Danner SA, Gazzard B, Griffiths PD, Katlama C, Lange JM, Richman DD, Vella S. Summary of the international consensus symposium on management of HIV, CMV and hepatitis virus infections. *Antiviral Res* 1998;37(1):1–16.
5. de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* 1998;39(3):141–62.
6. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34(8):1094–1097.
7. Preiser W, Berger A, Doerr HW. Neue Ansätze in der Therapie viraler Erkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2000;97 [Heft 50]: A3433–3439.
8. Martin DF, Sierra-Madero J, Walmsley S, Wolitz RA, Macey K, Georgiou P, Robinson CA, Stempien MJ. A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis. *N Engl J Med* 2002;346(15):1119–1126.
9. Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Furione M, Torsellini M, Revello MG. Diagnostic significance and clinical impact of quantitative assays for diagnosis of human cytomegalovirus infection/disease in immunocompromised patients. *New Microbiol* 1998;21(3):293–308.
10. Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother* 2002;49(5):713–21.
11. Weber B, Nestler U, Ernst W, Rabenau H, Braner J, Birkenbach A, Scheuermann EH, Schoeppe W, Doerr HW. Low correlation of human cytomegalovirus DNA amplification by polymerase chain reaction with cytomegalovirus disease in organ transplant recipients. *J Med Virol* 1994;43(2):187–193.
12. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):746–752.
13. Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *J Clin Virol* 2001;21(3):213–221.
14. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):533–554.
15. Preiser W, Brauninger S, Schwerdtfeger R, Ayliffe U, Garson JA, Brink NS, Franck S, Doerr HW, Rabenau HF. Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *J Clin Virol* 2001;20(1–2):59–70.
16. Vogel JU, Cinatl J, Lux A, Weber B, Driesel AJ, Doerr HW. New PCR assay for rapid and quantitative detection of human cytomegalovirus in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1996;34(2):482–3.
17. Preiser W, Elzinger B, Brink NS. Quantitative molecular virology in patient management. *J Clin Pathol* 2000;53(1):76–83.
18. Preiser W, Rabenau HF, Vogel JU, Brixner V, Doerr HW. Performance characteristics of an automated PCR assay for the quantification of cytomegalovirus DNA in plasma. *J Virol Methods* 2002;101(1–2):149–157.
19. Griffiths PD, Cope AV, Hassan-Walker AF, Emery VC. Diagnostic approaches to cytomegalovirus infection in bone marrow and organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 1999;1(3):179–186.
20. Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 1999;14(1):57–66.
21. Fox JC, Kidd IM, Griffiths PD, Sweny P, Emery VC. Longitudinal analysis of cytomegalovirus load in renal transplant recipients using a quantitative polymerase chain reaction: correlation with disease. *J Gen Virol* 1995;76(Pt 2):309–19.

22. Spector SA, Wong R, Hsia K, Pilcher M, Stempien MJ. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J Clin Invest* 1998;101(2):497–502.
23. Emery VC. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol* 2001;54(2): 84–88.
24. Emery VC. Viral dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology. *Intervirology* 1999;42(5–6):405–11.
25. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet*. 2000;10;355(9220):2032–6.
26. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 1993;118(3):173–8.
27. Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, Du Mond C, Ebeling DF, Buhles WC, Champlin RE. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med* 1993;118(3):179–84.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *MMWR* 2000;49(No. RR-10):1–128.
29. Peggs KS, Preiser W, Kottaridis PD, McKeag N, Brink NS, Tedder RS, Goldstone AH, Linch DC, Mackinnon S. Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2000;111(3):782–90.
30. Caliendo AM, St George K, Kao SY, Allegra J, Tan BH, LaFontaine R, Bui L, Rinaldo CR. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38(6):2122–2127.
31. Boivin G, Belanger R, Delage R, Beliveau C, Demers C, Goyette N, Roy J. Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the COBAS AMPLICOR CMV MONITOR PCR test after blood and marrow allogeneic transplantation. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4356–4360.
32. von Müller L, Hampl W, Hinz J, Meisel H, Reip A, Engelmann E, Heilbronn R, Gartner B, Kramer O, Einsele H, Hebart H, Ljubicic T, Löffler J, Mertens T. High variability between results of different in-house tests for cytomegalovirus (CMV) monitoring and a standardized quantitative plasma CMV PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002;40(6):2285–2287.
33. Chou S. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl Infect Dis* 1999;1(2):105–114.
34. Emery VC. Progress in understanding cytomegalovirus drug resistance. *J Clin Virol* 2001;21(3):223–228.
35. Reusser P, Einsele H, Lee J, Volin L, Rovira M, Engelhard D, Finke J, Cordonnier C, Link H, Ljungman P. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99(4):1159–64.
36. Caliendo AM, Schuurman R, Yen-Lieberman B, Spector SA, Andersen J, Manjiry R, Crumpacker C, Lurain NS, Erice A. Comparison of quantitative and qualitative PCR assays for cytomegalovirus DNA in plasma. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1334–1338.
37. Pellegrin I, Garrigue I, Binquet C, Chene G, Neau D, Bonot P, Bonnet F, Fleury H, Pellegrin JL. Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3124–3132.
38. Saldanha J. Validation and standardisation of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. *J Clin Virol* 2001;20(1–2):7–13.
39. Preiser W, Brink N S, Ayliffe U, Peggs K, Mackinnon S, Tedder R, Garson J. (2002) Development and clinical application of a fully controlled quantitative PCR assay for cell-free cytomegalovirus in human plasma. *J Clin Virol* 2002, in press.
40. Tedder RS, Ayliffe U, Preiser W, Brink NS, Grant PR, Peggs KS, Mackinnon S, Kreig-Schneider F, Kirk S, Garson JA. Development and evaluation of an internally controlled semiautomated PCR assay for quantification of cell-free cytomegalovirus. *J Med Virol* 2002;66(4):518–523.
41. Schutten M, Niesters HG. Clinical utility of viral quantification as a tool for disease monitoring. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1(2):153–162.
42. Guiver M, Fox AJ, Mutton K, Mogulkoc N, Egan J. Evaluation of CMV viral load using TaqMan CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients. *Transplantation* 2001;71(11):1609–15.
43. Mackay I, Arden K, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30(6):1292–1305.
44. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* 2001;25(4):419–429.
45. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, Barjot P, Garbarg-Chenon A, Lebon P, Freymuth F. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):1767–1772.
46. Fleckenstein C, Stürmer M, Preiser W, Doerr H.W. Development of a Novel, Fully Controlled Method for Quantitative Cytomegalovirus Genome Detection by Multiplex Real-Time PCR („TaqMan“). *J Lab Med* 2002;26(3/4):206.