

# Aspekte der Virusdiagnostik bei immunsupprimierten Patienten

## Aspects of Viral Diagnosis in Immunocompromised Patients

S. Buxbaum<sup>1,2</sup> und H. F. Rabenau<sup>1</sup>

**Zusammenfassung:** Zur speziellen Laboratoriumsdiagnostik viraler Erkrankungen stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: zum einem der direkte Nachweis des viralen Erregers bzw. seiner Bestandteile, zum anderen der indirekte Nachweis über die bei einer Infektion spezifisch gebildeten Antikörper. Immunsupprimierte Patienten stellen eine besondere Risikogruppe für Infektionserkrankungen gerade auch mit viralen Erregern dar. Da bei diesem Patientenkollektiv die Immunreaktionen unterdrückt sind und die Erkrankungen sehr uncharakteristisch verlaufen können, ist die klinische Diagnostik oft erschwert. Zudem können bei Immunsuppression einige Virusinfektionen reaktiviert werden und sich mit schweren Krankheitsbildern manifestieren.

Da die Anzahl der Patienten, die zeitweise oder dauerhaft unter einer iatrogenen oder pathologischen Immunsuppression stehen, deutlich zugenommen hat, ist eine gezielte Labordiagnostik in Zusammenarbeit mit dem behandelnden Arzt unerlässlich, einerseits zur Auswahl der geeigneten Nachweismethoden und des passenden Untersuchungsmaterials, andererseits zur Interpretation der erzielten Untersuchungsergebnisse.

**Schlüsselwörter:** Virusinfektionen; Diagnose; Immunsuppression.

**Summary:** The specific laboratory diagnosis of viral infections may be achieved through the direct detection of the virus or its components, or indirectly by detection of specific antibodies. Immunocompromised patients are at high risk for infectious diseases, particularly from viral agents. Due to immunosuppression, the course of disease can be uncharacteristic and diagnosis will be difficult; in addition, virus infections can reactivate with serious clinical manifestations. Considering the fact that the number of patients with temporary or permanent iatrogenic or pathologic immunosuppression is on the increase, a targeted laboratory diagnosis in cooperation with the clinicians is of great importance for the correct choice of the appropriate

methods and materials on the one hand and for the interpretation of test results on the other hand.

**Keywords:** Virus infection; Diagnosis; Immunosuppression.

Etwa jeder dritte Todesfall weltweit ist infektionsbedingt; es wird geschätzt, daß jährlich etwa 13 Millionen Menschen an Infektionskrankheiten versterben, d. h. täglich ca. 30.000. Nach Angaben der World Health Organisation (WHO Report on Infectious Diseases 1999) waren 1998 etwa 90% der durch Infektionskrankheiten verursachten Todesfälle allein auf sechs Erkrankungen zurückzuführen: Pneumonien, HIV/AIDS, infektiöse Durchfallerkrankungen, Tuberkulose, Malaria und Masern. Vornehmlich betroffen sind Patienten in Ländern mit niedrigem hygienischen Standard und hier vor allem Kinder und junge Erwachsene.

Ein hohes Risiko für Infektionserkrankungen liegt bei Schwächung des Immunsystems vor, wie z. B. bei HIV als Grunderkrankung oder bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Doch auch bedingt durch die Fortschritte in der Neonatal-, Transfusions- und Transplantationsmedizin, sowie der Therapie von AIDS- und Tumor-Patienten, hat die Zahl von Personen, die mit einem noch unausgereiften Immunsystem bzw. einer pathologischen oder iatrogenen Immunsuppression leben, erheblich zugenommen. Gerade auch Infektionen mit viralen Erregern stellen für diese Risikogruppen eine besondere Gefährdung dar.

Da bei immunsupprimierten Patienten die Krankheitsbilder erheblich von denen bei immunkompetenten Patienten abweichen können, ist die klinische Diagnostik oft erschwert. Einige Virusinfektionen verlaufen bei eingeschränkter Immunabwehr sogar subklinisch, weil mit dem Immunsystem auch die Immunpathogenese unterdrückt ist. Hierfür typisch ist z. B. die HBV-Infektion beim Neugeborenen oder AIDS-Patienten. Viele anderen Virusinfektionen werden bei reduzierter Immunabwehr „opportunistisch“ reaktiviert mit z. T. massiven, sonst selten gesehenen Krankheitsmanifestationen [1].

Tabelle 1 und 2 geben einen Überblick über Virusinfektionen und ihre Erreger, welche insbesondere bei Immunsupprimierten zu schweren Komplikationen führen können.

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Virologie der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland

<sup>2</sup>Korrespondenzadresse: Dr. Sigune Buxbaum, Institut für Med. Virologie, Universitätsklinik Frankfurt, Paul-Ehrlich Str. 40, 60596 Frankfurt, Deutschland. Fax: +49-69-6301-83061

E-mail: S.Buxbaum@em.uni-frankfurt.de

Eingegangen: 15. November 2000/Angenommen: 20. November 2000

**Tabelle 1** Darstellung viraler Erreger mit besonderer Relevanz bei Immunsuppression: Überblick über Klinik, Inkubationszeit, Nachweismethoden und Untersuchungsmaterial

Virus	Klinik	Inkubationszeit	Nachweismethoden	Material
Adenovirus	Atemwegs-, Augen-, Darminfektionen	2-10 Tage	Zellkultur, EM, Antigen-test, PCR, Serologie	Abstrich, BAL, Stuhl, Serum, Biopsie, Sputum
Herpes simplex Virus (HSV)	Herpes labialis/genitalis, Keratitis, Meningitis, Enzephalitis	2-14 Tage	Zellkultur, EM, Antigen-test, PCR, Serologie	Abstrich, BAL, Liquor, Serum, Biopsie, Sputum
Epstein-Barr Virus (EBV)	Infektiöse Mononukleose, Enzephalitis, Hepatitis, Splenomegalie	14-50 Tage	PCR, Serologie	Liquor, Serum, BAL, Biopsie
Humanes Cytomegalie-Virus (HCMV)	Mononukleose-ähnlich, Hepatitis, Pneumonie, Retinitis, Enzephalitis, Splenomegalie	20-60 Tage	Zellkultur, PCR, pp65-Antigentest, Serologie, EM	Urin, BAL, Liquor, EDTA-Blut, Serum, Augenkammerwasser, Biopsie, Sputum
Varizella-Zoster Virus (VZV)	Varizellen, Zoster, Hepatitis, Pneumonie, Enzephalitis	10-28 Tage	Zellkultur, PCR, Serologie	Abstrich, Liquor, Serum, Biopsie
Humanes Herpes Virus 6 (HHV6)	Exanthema subitum	3-15 Tage	Serologie, PCR, Zellkultur	Serum, Liquor, Biopsie
Parvovirus B19	Ringelröteln, Störung der Hämatopoese	7-10 Tage	Serologie, PCR	Serum, Liquor, Biopsie
Polyoma-Viren: BK-Virus	Nephritiden, hämorrhagische Zystitis, Pneumonie	unbekannt	PCR, EM	Urin, Liquor
JC-Virus	PML	unbekannt	PCR, EM	Urin, Liquor
Hepatitis A Virus (HAV)	Hepatitis	14-42 Tage	PCR, Serologie, EM	Stuhl, Serum
Hepatitis B Virus (HBV)	Hepatitis	1-6 Monate	PCR, Serologie	Serum, Biopsie
Masernvirus	Masern, Enzephalitis, Pneumonie	10-14 Tage	Zellkultur, PCR, Serologie	Abstrich, Serum, Urin, Biopsie, Liquor
Influenza A Virus	respiratorische Infektion, Tracheobronchitis, Pneumonie (superinfiziert)	1-3 Tage	Zellkultur, EM, PCR, Antigen-test, Serologie	Abstrich, Serum

EM: Elektronenmikroskopie  
BAL: Bronchoalveoläre Lavage  
PCR: Polymerase-Kettenreaktion  
PML: Progressive multifokale Leukoenzephalopathie

Akute Virusinfektionen greifen in den Zellstoffwechsel mit der Folge eines zytopathogenen bzw. zytolytischen Effektes ein. Die veränderte Zelle zieht eine starke Immunreaktion auf sich, die möglicherweise den Krankheitsprozeß zunächst verstärkt, aber damit die Infektion beendet.

Allerdings zeigt der klinische Alltag häufig, daß die Abheilung einer Virusinfektion nicht zwingend bedeutet, daß die Infektionserreger eliminiert sind.

Bei persistierenden oder chronischen Infektionen verbleiben Viren, bzw. Virusbestandteile lebenslang oder zumindest für einen längeren Zeitraum (von Monaten bis hin zu Jahrzehnten) im Körper. Dabei läßt sich unterscheiden zwischen Viren, die sich bei chronischen Infektionen kontinuierlich vermehren oder im infizierten Gewebe nachweisbar sind (z. B. Hepatitis B Virus [HBV], Humanes Immundefizienz Virus [HIV]) und solchen, die zwischenzeitlich eine nicht-infektiöse latente Form einnehmen, jedoch gelegentlich reakti-

viert werden können (z. B. Herpesviren) [2]. Solche reaktivierten Infektionen stellen häufig an die Virusdiagnostik besondere Anforderungen, da die immunologische Antwort meist schwach verläuft bzw. das Antikörperprofil meistens keine Aussage über den klinischen Zustand erlaubt.

### Methoden der virologischen Labor-diagnostik

Für die Diagnostik viraler Infektionen gibt es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten (vgl. Tabelle 3). Diese bestehen zum einen in dem direkten Virusnachweis mittels Isolierung auf Zellkultur, Elektronenmikroskopie bzw. dem Nachweis viraler Bestandteile mittels Antigen-ELISA und dem Nukleinsäurenachweis über eine Hybridisierung oder mit der Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT), z. B. der Polymerase Kettenreaktion (PCR). Ferner bieten serologische

**Tabelle 2** Virusinfektionen und assoziierte Krankheitsbilder bei Patienten mit Immunsuppression

Erreger	klinische Manifestationen
Adenoviren	Pneumonie, Hepatitis, Meningoenzephalitis
Herpes simplex Virus (HSV)	schwere Verlaufsformen, Tendenz zur Dissemination und Befall der inneren Organe, sowie Selektion Virostatika-resistenter Isolate
Epstein-Barr Virus (EBV)	Non-Hodgkin-Lymphome, PTLD
Humanes Cytomegalievirus (HCMV)	interstitielle Pneumonie (KMT), Enterokolitis, Retinitis, Graft versus host disease (GVHD), Enzephalitis, CMV-Mononukleose, schwere, lebensbedrohende Verläufe
Varizella-Zoster-Virus (VZV)	Varizellen: progredienter Verlauf, interstitielle Pneumonie, Hepatitis, Thrombozytopenie und Leukopenie (bakterielle Superinfektion) Herpes Zoster: ausgedehnter (multipler) Dermatombefall und Tendenz zur hämatogenen Streuung
Humanes Herpes Virus 6 (HHV 6)	interstitielle Pneumonie (KMT), Enzephalitis
Parvovirus B19	aplastische Anämie
Polyomaviren (BK)	hämorrhagische Zystitis (KMT)
Polyomaviren (JCV)	progressive multifokale Leukoenzephalopathie (PML)
Hepatitis A Virus (HAV)	protrahierte Verläufe mit asymptomatischer Virusausscheidung, schwere, evt. lebensbedrohende Verläufe
Hepatitis B Virus (HBV)	bei HBV-Trägern: Risiko einer Reaktivierung mit Lebersversagen nach Absetzen der immunsuppressiven Chemotherapie
Masernvirus	Riesenzellpneumonie, Masern-Einschlußkörperenzephalitis
Influenza A Virus	schwere Verläufe mit Pneumonie, evt. bakteriell superinfiziert, verlängerte Ausscheidungsdauer

KMT: Knochenmarktransplantation

PTLD: „Post-transplant lymphoproliferative disorder“

**Tabelle 3** Möglichkeiten der virologischen Laboratoriumsdiagnostik (3)**1. Nachweis des viralen Infektionserregers**

- Mikroskopie und Elektronenmikroskopie
- Kultivierung des Virus in Zellkulturen (ggf. Brutei, Tierversuch)
- Nachweis viraler Strukturbestandteile mit definierten Antikörpern (Antigentest)
- Nachweis einer viralen bzw. viruskodierten Nukleinsäure mit definierten Sonden (molekularbiologische Diagnostik)

**2. Nachweis der virusinduzierten Immunreaktion mit definierten Antigenen**

- Analyse der humoralen Immunreaktion (Antikörpertest)
- Analyse der zellulären Immunreaktion (Lymphozytenstimulationstest)

Untersuchungen auf spezifische Antikörper die Möglichkeit zum indirekten Nachweis einer Infektion. Hier kann zusätzlich differenziert werden nach verschiedenen Immunglobulinklassen (IgG, IgM, IgA). Während der Nachweis von IgM und/oder eine IgG-Serokonversion in der Regel für eine akute primäre Infektion spricht, stellt bei den meisten herpetischen Erkrankungen ein mehr als zweifacher Anstieg des IgG-Titers einen starken Hinweis, das Auftreten eines erhöhten IgA-Titers nahezu einen Beweis für eine Reaktivierung dar. Bei der Labordiagnose der Virusinfektion als ätiologisches Agens der Infektionskrankheit bei Patienten mit Immundefizit gelten im Prinzip die gleichen Regeln wie bei immunkompetenten Personen. Aller-

dings kann der Nachweis von IgM-Antikörpern bei Immunsuppression manchmal schwierig sein. Hier bietet sich dann die Bestimmung der IgA-Antikörper an.

### Labordiagnose von Virusinfektionen bei Patienten mit immunsupprimierenden Grunderkrankungen

Im Folgenden soll die Wertigkeit der verschiedenen Methoden der Virusdiagnostik am Beispiel von HSV, VZV und CMV als bedeutsamste und relativ häufige virale Erreger - gerade auch mit Reaktivierung bei ge-

schwächtem Immunsystem - erläutert werden. Für die Labordiagnose stehen hier mehrere Verfahren zur Verfügung, auf die im Einzelnen später näher eingegangen wird.

Neben diesen Viren erlangt eine zunehmende Bedeutung das Herpes Virus Typ 6 (HHV6). Dieser Erreger führt gewöhnlich im Kindesalter (6 bis 24 Monaten) zum „Exanthema subitum“, kann jedoch auch Infektionen im Erwachsenenalter insbesondere bei Immunsupprimierten - speziell bei organtransplantierten und HIV-infizierten Patienten - verursachen [4]. Diskutiert wird außerdem ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer HHV6-Infektion und dem Fortschreiten der Immunsuppression [4, 5]. Die Diagnose einer HHV 6-Infektion erfolgt anhand der Serologie, Zellkultur und einer qualitativen PCR.

Ebenso läßt sich auch das Epstein-Barr-Virus - neben der Serologie - mittels einer PCR nachweisen. Die Bedeutung des EBV-Virus liegt in seiner Assoziation zu einer großen Gruppe unterschiedlicher Tumorerkrankungen wie z. B. zum Burkitt-Lymphom, einigen Non-Hodgkin-Lymphomen, dem Nasopharyngeal-Karzinom und dem Adenokarzinom des Magens [6]. Eine besondere Gefährdung zur Entwicklung von Lymphomen - und damit auch zu den mit EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen - findet sich auch hier wiederum bei HIV- und AIDS-Patienten [7-10]. Gefürchtet sind auch EBV-assoziierte Komplikationen nach Organtransplantation („Post-transplant lymphoproliferative disorder“, PTLD) mit unterschiedlichen klinischen Ausprägungen von einem Mononukleose-ähnlichem Krankheitsbild bis hin zu poly- oder monoklonalen Lymphproliferationen. Die Inzidenz dieser Erkrankung nach Organtransplantation wird mit insgesamt etwa 3% angegeben, kann aber auch höher liegen, z.B. bei 8% nach Lungentransplantation im Vergleich zu etwa 1-2% bei Nierentransplantierten [11-13]. EBV-Seronegativität des Rezipienten vor Transplantation und gleichzeitige EBV-Positivität des Donors scheint dabei das Erkrankungsrisiko zu erhöhen [14, 15].

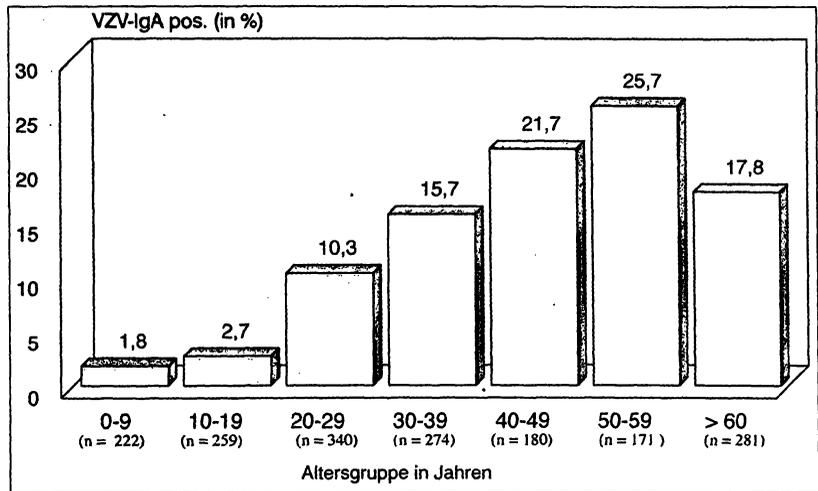
Auch das Parvovirus-B19, ein Erreger, der zu der sich selbst limitierenden Erkrankung des „Erythema infectiosum“ - hauptsächlich im Kindesalter - führt, kann aufgrund seiner Persistenz gerade bei Immunschwäche zu einer schwerwiegenden chronischen Anämie führen [16, 17]. Neben der Serologie steht auch hier mittlerweile eine PCR zum Nachweis des viralen Genoms zur Verfügung.

Akute Infektionen mit Herpes simplex und Varizellen, bzw. auch eine Varizellen-Reaktivierung (Herpes Zoster), lassen sich im allgemeinen anhand ihrer recht typischen klinischen Symptomatik schnell und sehr verlässlich diagnostizieren. Unter immunsuppressiver und antitumoraler Therapie ist das durch eine HSV- oder VZV-Primär- bzw. Sekundärinfektion verursachte Krankheitsbild häufig uncharakteristisch und erfordert wegen der Gefahr einer lokalen Disseminierung und dem Befall innerer Organe eine schnelle Labordiagnostik, um rechtzeitig therapeutische Maßnahmen einleiten zu können.

Es stehen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung:

- Eine einfache Methode ist die Entnahme eines Abstriches und die Anfertigung eines Abstrichpräparates aus den Effloreszenzen, das mikroskopisch nach intranukleären Einschlüssen bzw. mittels virusspezifischer poly- und monoklonaler Antikörper in Immunoassays (ELISA, bei HSV zusätzlich im IFT) auf virales Antigen untersucht wird [18]. Auch mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie läßt sich aus Abstrichen oder Bläschenpunkaten eine schnelle, wenn auch aufwendige Diagnostik betreiben.
- Weiterhin kann man versuchen, das infektiöse Agens in Zellkulturen anzuzüchten. Für HSV sind Zellen verschiedener Herkunft geeignet, während VZV sich am besten auf humanen Fibroblasten isolieren läßt. Gegebenenfalls ist ein Nachweis auch auf RPE („humane retinal-pigmental-epitheliale“-Zellen möglich. Im infizierten Zellrasen bilden sich jeweils charakteristische zytopathogene Effekte (CPE) heraus, bei VZV allerdings oft erst nach langer Beobachtungszeit. Hier hat sich der Einsatz monoklonaler Antikörper bewährt, welche bereits innerhalb von wenigen Tagen virale Strukturproteine in infizierten Zellen vor Erscheinen eines CPE nachweisen. Um das Auftreten infizierter Zellen zu beschleunigen, kann das Inokulum außerdem auf die Zellen zentrifugiert werden; diese „durch Zentrifugation beschleunigte Virusanzucht“ wird als „Shell-Vial“- Technik bezeichnet [19].
- Bei einem ZNS-Befall stellt die PCR die Methode der Wahl dar. Wegen des relativ niedrigen Virustiters im Liquor cerebrospinalis sind die klassischen Verfahren, wie Virusisolierung und Antigennachweis, in den allermeisten Fällen zu unempfindlich. Die Nachweisgrenze der PCR liegt bei 1-10 Kopien viraler DNA/µl Liquor [20]. Mit Hilfe der PCR ist eine qualitative oder (semi)quantitative Bestimmung der viralen DNA innerhalb von 6-8 Std. möglich. Die prinzipiellen Nachteile dieser Methode sind der relativ hohe Arbeits- und Kostenaufwand. Falsch positive Ergebnisse, bedingt durch Kontaminationen, werden durch eine strikte räumliche Trennung der verschiedenen Reaktionsschritte und durch sorgfältige Aufarbeitung des Patientenmaterials vermieden. Inhibitoren der Polymerase können zu falsch negativen PCR-Ergebnissen führen, was sich aber durch das Mitführen interner Standards vermeiden läßt.

Bei der serologischen Untersuchungen von Zoster-Patienten finden sich primär IgG-Antikörper, die von der früher durchgemachten Windpockeninfektion stammen. In der Regel gelingt die Diagnose des Zoster leicht, indem man den IgG-Antikörperanstieg in sukzessiven Blutproben feststellt, z. B. mit dem EIA. Weiterhin kann man in der Hälfte der Fälle auch Antikörper der Klasse IgM finden und noch häufiger erhöhte IgA-Titer. Bei immunsupprimierten Patienten tritt die



**Abbildung 1** Verteilung der VZV-IgA positiven Untersuchungsergebnisse (Titer: 1:  $\geq 320$ ) bei HIV-negativen Patienten in verschiedenen Altersgruppen (Patienten des Klinikums der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt am Main; [23])

humorale Immunantwort verzögert ein. Bei Knochenmarkstransplantations-Patienten bleibt sie häufig jedoch aus. Aus diesem Grund und bedingt dadurch, daß der Erregernachweis der Antikörperbildung um mehrere Tage vorausgeht, spielt die Serologie eine untergeordnete Rolle für die Labordiagnose einer aktiven HSV- oder VZV-Infektion. Ihr Stellenwert liegt vor allem bei der Risikoeinschätzung durch eine Überprüfung des Immunstatus.

Epidemiologische Untersuchungen zur Verteilung von höhertitrigem VZV-IgA zeigen eine deutliche Zunahme der Häufigkeit dieses Markers in Abhängigkeit vom Alter der Patienten (siehe Abb. 1). Das Risiko, einen Zoster zu entwickeln, steigt ebenfalls mit dem Lebensalter. Betroffen sind hierbei hauptsächlich Menschen über dem 5. Lebensjahrzehnt, bzw. mit geschwächtem Immunsystem, beispielsweise bei HIV-Infektion, Immunsuppression bei Transplantation und unter Chemo- oder Strahlentherapie. Bei diesen Patientenkollektiven ist zudem das Komplikationsrisiko eines Herpes Zoster wesentlich höher. Für die USA wird eine jährliche Inzidenz an Zoster von 1,3/1000 Personen angegeben mit einer geschätzten Gesamterkrankungszahl von 200.000-500.000 Fällen pro Jahr [21, 22].

Das Humane Cytomegalievirus (HCMV) ist einer der häufigsten viralen opportunistischen Infektionserreger bei immunsupprimierten Patienten (AIDS, Organtransplantation, maligne Grunderkrankungen). Hier ist eine zuverlässige und schnelle Labordiagnose von besonderer Bedeutung, da eine effektive antivirale Chemotherapie möglichst frühzeitig erfolgen sollte. Da die differentialdiagnostische Abgrenzung von anderen Infektionskrankheiten für die therapeutische Intervention von erheblicher Relevanz ist, wurden in den letzten Jahren weitreichende Verbesserungen des labordiagnostischen Instrumentariums angestrebt. Hierzu gehören die Weiterentwicklung der Virusisolierung und der Serologie, aber auch molekularbiologischer

Verfahren wie z. B. der PCR. Neben der konventionellen Virusisolierung auf Fibroblasten-Kulturen mit Auswertung des typischen CPE nach dessen Auftreten - in der Regel nach 5-7 Tagen, manchmal jedoch erst nach Wochen - steht auch hier die Methode des „shell vial assays“ zum schnelleren Nachweis einer Infektion zur Verfügung.

Als ein einfacher diagnostischer Marker der HCMV-Infektaktivität gilt der Nachweis des HCMV-Strukturproteins (pp65-Matrixphosphoprotein) in Leukozyten. Die klinische Relevanz dieser Technik zum Nachweis von HCMV in Leukozyten gilt als sehr hoch. Im Vergleich zur PCR erwies sich dieser Test in verschiedenen Studien bei einer direkten Korrelation mit klinischen Symptomen bei Organtransplantierten als Verfahren mit relativ hoher Pathognomität (71%) bei reduzierter Sensitivität (55%), während die HCMV-PCR erwartungsgemäß eine höhere Sensitivität (77%) bei geringerer Pathognomität (41%) aufzeigte [24]. Der pp65-Antigenämietest zeigt im Vergleich zum „shell vial assay“ eine höhere Sensitivität und erfaßt zudem schneller eine Virusreplikation [25, 26]. Der Nachweis von HCMV im Urin der Patienten erbrachte, ebenso wie die serologischen Befunde, im Vergleich zum pp65-Antigenämietest eine schlechtere klinische (prognostische) Relevanz.

Neben einer qualitativen PCR existieren als weitere molekularbiologische Verfahren mit unterschiedlichen Sensitivitäten die NASBA („Nucleic Acid Sequence Based Amplification“) zur Bestimmung der mRNA („immediate early“ und „late“(pp67) mRNA) als Marker einer aktiven Virusreplikation, wie auch Verfahren zur quantitativen Bestimmung viraler HCMV-DNA. Hier sind die quantitative PCR, das „branched DNA“-Assay und das „hybrid capture“-Assay zu nennen. Diese Methoden dienen dabei nicht nur der Früherkennung und Diagnose einer Erkrankung, sondern werden auch zum Therapiemonitoring einer HCMV-Infektion eingesetzt. Mittels quantitativer PCR (z. B.

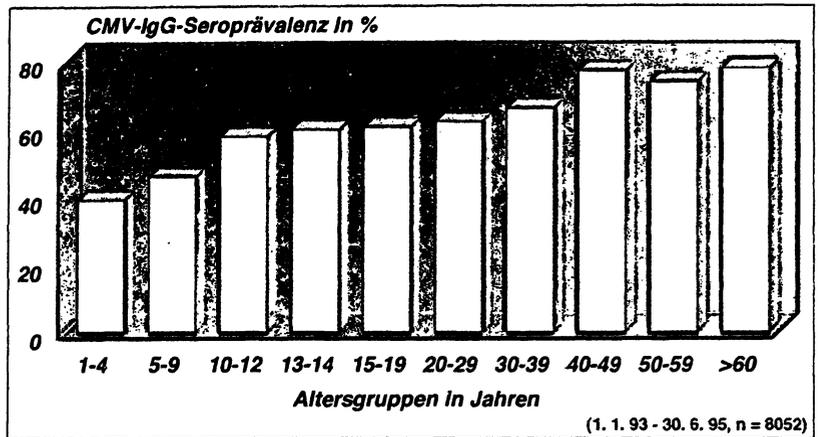


Abbildung 2 Altersabhängige HCMV-Durchseuchung beim Patientenkollektiv der Universitätskliniken Frankfurt [37]

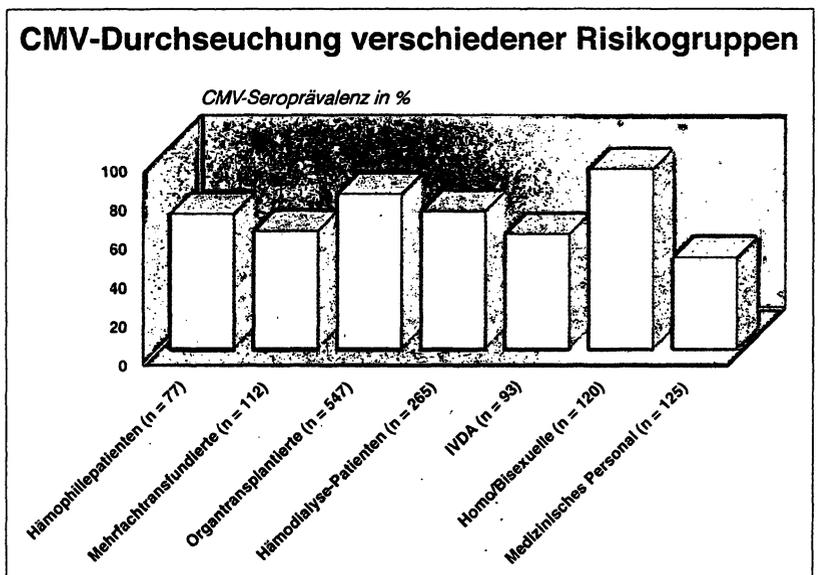


Abbildung 3 HCMV-Durchseuchung bei verschiedenen Patientenkollektiven der Universitätskliniken Frankfurt [37]. IVDA: Intravenöser Drogenabusus

Amplicor HCMV-PCR, Roche) läßt sich virale DNA im Plasma innerhalb eines dynamischen Meßbereiches von 400-100.000 Kopien/ml bestimmen. Je nach Verfahren (unterschiedliche „in house“-PCR-Assays) ist es jedoch auch möglich, geringere Kopienzahlen von 20-100 Kopien/ml zu ermitteln. Entscheidend hierbei ist, ob das Virus zellgebunden oder zellfrei vorliegt. Dies ist wiederum abhängig vom zu untersuchenden Material. Das Problem sehr hoher Sensitivitäten ist, daß eventuell latentes Virus erfaßt wird, so daß ggf. ein klinisch relevanter „cut off“ definiert werden muß; hier liegt der Vorteil der Bestimmung der mRNA, die trotz geringerer Sensitivität zum Nachweis der aktiven Virusreplikation geeignet ist.

In mehreren klinischen Studien ließen sich höhere Viruslasten bei symptomatischen Patienten bzw. bei Primärinfektionen im Vergleich zu Reaktivierungen

zeigen und eine Korrelation zwischen Viruslast und Wahrscheinlichkeit bzw. Schweregrad der klinischen Manifestationen beobachten [27-30]. Trotzdem konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein prognostisch relevanter Schwellenwert der HCMV-DNA-Kopienzahl ermittelt werden [31]. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, daß bei verschiedenen Krankheitsbildern immunpathologische Mechanismen eine wesentliche Rolle spielen.

Betrachtet man die Sensitivität der unterschiedlichen Nachweismethoden, so sind die molekularbiologischen Verfahren den herkömmlichen Nachweismethoden überlegen und verdrängen diese zunehmend [27, 32-35]. Im Vergleich zu HSV- und VZV-Infektionen hat die Serologie bei opportunistischen HCMV-Erkrankungen einen mittleren Stellenwert. Der Erregernachweis mittels PCR geht der humoralen Immun-

antwort durchschnittlich um zwei Wochen voraus. Der negative Vorhersagewert der IgM-Antikörperbestimmung liegt je nach eingesetztem Testverfahren und Patientenkollektiv bei unter 50% [36]. Die serologische Diagnostik dient auch hier vor allem der Risikoabschätzung, da Primärinfektionen im allgemeinen zu schwerwiegenden Komplikationen führen als Reinfektionen oder endogene Reaktivierungen.

Seroepidemiologische Untersuchungen zeigen, daß in industrialisierten Ländern ca. jeder Zweite mit HCMV infiziert ist (vgl. Abb. 2), sich in Entwicklungsländern jedoch Durchseuchungsraten von bis zu 100% finden lassen. Altersabhängig gibt es zwei Zeiträume, in denen es zu Infektionen kommt: zum einen in der frühen Kindheit und des Weiteren im jungen Erwachsenenalter, in dem dann meist die endgültigen Seropositivitätsraten einer Bevölkerungsgruppe erreicht werden. Dagegen ist in verschiedenen Risikokollektiven die Prävalenz z. T. jedoch wesentlich höher (vgl. Abb. 3).

Auch bei HCMV kann, analog zu VZV, der Nachweis von spezifischem IgA ein Hinweis auf eine Reaktivierung des endogenen Virus bzw. einer Reinfektion mit einem heterologem Stamm sein. Daher ist bei Verdacht auf eine aktive HCMV-Infektion sowohl die serologische Untersuchung auf HCMV-spezifisches IgG (in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsproben) als auch die Bestimmung von IgA als ergänzende Untersuchung zum Erregernachweis mittels PCR bzw. quantitativer pp65-Antigenbestimmung bei Patienten mit moderater Immunsuppression sinnvoll. HCMV-spezifische IgM-Antikörper können, müssen jedoch in diesen Fällen nicht auftreten. Dies trifft insbesondere bei immunsupprimierten Patienten zu.

## Empfehlungen zur Probengewinnung und geeignete Testverfahren

Grundsätzlich gilt, daß jede Erkrankung bzw. klinische Symptomatik spezifische Anforderungen an die virologische Laboratoriumsdiagnostik stellt. Dies bedeutet u. a., daß die enge Absprache zwischen behandelndem Arzt und Labormediziner erforderlich ist, um eine optimale Diagnostik zu ermöglichen. Gleichzeitig ist von entscheidender Bedeutung, daß das richtige Untersuchungsmaterial unter bestmöglichen Bedingungen ins Labor gelangt. Nur so kann gewährleistet werden, daß beispielsweise das negative Resultat bei einem Virusnachweis (Zellkulturen, PCR) nicht auf eine artifizielle Zerstörung der Viren in der Probe zurückzuführen ist.

Abschließend dazu sollen die folgenden Empfehlungen zur Wahl des geeigneten Materials für die einzelnen Untersuchungen gegeben werden [3]:

- Für serologische Untersuchungen, Serum oder Nativblut einsenden - bei Verdacht auf akute Erkrankung möglichst Serumpaare im Abstand von 10-14 Tagen.
- Zum Virusnachweis ist die Probengewinnung möglichst in der Frühphase der klinischen Symptome

vorzunehmen. Das Material sollte gekühlt transportiert werden; Ausnahme: Urin zur HCMV-Isolierung sollte handwarm ins Labor gebracht und nur bei längeren Transporten auf 4° C gekühlt werden. Nicht einfrieren!

- Zum Virusnachweis in Leukozyten (Isolierung, Virusantigen, PCR) EDTA-Blut einsenden.
- Gewebe und Biopsien dürfen nicht austrocknen! Daher in steriler physiologischer Kochsalzlösung transportieren.
- Virusisolierung aus Liquor: Bei 4° C aufbewahren und transportieren.
- Virusisolierungen aus Rachengurgelwasser: Mit physiologischer Kochsalzlösung gurgeln lassen.
- Virusisolierungen aus Bläschenflüssigkeit: Entweder mit steriler physiologischer Kochsalzlösung oder einem geeigneten Medium vor dem Eintrocknen schützen.
- Abstriche in feuchtem Transportmedium aufbewahren.

## Literatur

1. Doerr HW. Prinzipien der virologischen Laboratoriumsdiagnostik. In: Postmann T, editor. Virusdiagnostik. Berlin/Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1996:1-30.
2. Doerr HW. Alte und neue Aspekte in der Pathogenese von Viruskrankheiten. In: Wacha H, editor. Infektiologie heute - Zeit zum Umdenken. München/Bern/Wien/New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 1999:77-87.
3. Doerr HW. Viruskrankheiten. In: Thomas L, editor. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. Frankfurt/Main (Deutschland): TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:1248-91.
4. Dockrell DH, Smith TH, Paya CV. Human herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc* 1999;74(2):163-70.
5. Ablashi DV, Marsh S, Kaplan M, Whitman Jr JE, Pearson GR. HHV-6 infection in HIV-infected asymptomatic and AIDS patients. *Intervirology* 1998;41(1):1-9.
6. Hsu JL, Glaser SL. Epstein-Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;34(1):27-53.
7. Okano M, Gross TG. A review of Epstein-Barr virus infection in patients with immunodeficiency disorders. *Am J Med Sci* 2000;319(6):392-6.
8. Schneider U, Ruhnke M, Delecluse HJ, Stein H, Huhn D. Regression of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in patients with acquired immunodeficiency syndrome during therapy with foscarnet. *Ann Hematol* 2000;79(4):214-6.
9. Sud A, Venkatesh S, Sehgal S, Wanchu A, Bamberg P, Deodhar SD. Epstein-Barr virus induced non-Hodgkin's lymphoma as a presenting manifestation of acquired immune deficiency syndrome. *J Assoc Physicians India* 1999;47(4):442-3.
10. Weiss RA. Viruses, cancer and AIDS. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26(3-4):227-32.
11. Boubenider S, Hiesse C, Goupy C, Kriaa F, Marchand S, Charpentier B. Incidence and consequences of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *J Nephrol* 1997;10(3):136-45.
12. Caillard S, Heibel F, Benaïcha M, Moulin B. Post-transplantation lymphomas and Epstein-Barr virus. *Nephrologie* 1998;19(8):481-8.
13. Nalesnik MA. Clinicopathologic features of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Ann Transplant* 1997;2(4):33-40.
14. Swinnen LJ. Diagnosis and treatment of transplant-related lymphoma. *Ann Oncol* 2000;11 Suppl 1:45-8.
15. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, Habermann TM, McGregor CG, Paya CV. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis* 1995;20(5):1346-53.

16. Mitchell SA, Welch JM, Weston-Smith S, Nicholson F, Bradbeer CS. Parvovirus infection and anaemia in a patient with AIDS: case report. *Genitourin Med* 1990;66(2):95-6.
17. Vadlamudi G, Rezuke WN, Ross JW, Cartun RW, Ackroyd R, Knibbs DR, Tsongalis GJ. The use of monoclonal antibody R92F6 and polymerase chain reaction to confirm the presence of parvovirus B19 in bone marrow specimens of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123(9) 768-73.
18. Rabenau H, Runne U, Selb B, Doerr HW. Die Labordiagnose von Herpes simplex: Nachweis von Virusantigen mit dem Enzymelinked-immunosorbent-assay und dem indirekten Immunfluoreszenztest. *Lab Med* 1986;10: 324-6.
19. Döller G. Virusanzucht, Schnelldifferenzierung und Direkt-nachweis viraler Antigene. *Mikrobiologie* 1996;6:3-7.
20. Sakrauski A, Weber B, Kessler HH, Pierer K, Doerr HW. Comparison of two hybridisation assays for the rapid detection of PCR amplified HSV genome sequences from cerebrospinal fluid. *J Virol Meth* 1994;50:175-84.
21. National Institutes of Health. Trial of Varicella Vaccine for the Prevention of Herpes Zoster and Its Complications. Clinical research studies 1999; Protocol Number: 99-1-0106.
22. Ragozzino MW, Melton LJ 3d, Kurland LT, Chu CP, Perry HO. Population-based study of herpes zoster and its sequelae. *Medicine (Baltimore)* 1982;61(5) 310-6.
23. Wutzler P, Doerr HW. Der Herpes zoster - ein Morbus Herpes non simplex. *DMW* 1995;120:1133-8.
24. 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;43 187-93.
25. Erice A, Holm MA, Gill PC, Henry S, Dirksen CL, Dunn DL, Hillam RP, Balfour HH Jr. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *J Clin Microbiol* 1992;30(11):2822-5.
26. Veal N, Payan C, Fray D, Sarol L, Blanchet O, Kouyoumdjian S, Lunel F. Novel DNA assay for cytomegalovirus detection: comparison with conventional culture and pp65 antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):3097-100.
27. Aitken C, Barrett-Muir W, Millar C, Templeton K, Thomas J, Sheridan F, Jeffries D, Yaqoob M, Breuer J. Use of molecular assays in diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease following renal transplantation. *J Clin Microbiol* 1999;37(9) 2804-7.
28. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):533-54.
29. Hebart H, Gamer D, Loeffler J, Mueller C, Sinzger C, Jahn G, Bader P, Klingbiel T, Kanz L, Einsele H. Evaluation of Murex CMV DNA hybrid capture assay for detection and quantitation of cytomegalovirus infection in patients following allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 1998;36(5):1333-7.
30. Vanpoucke H, Van Vliem B, Vanholder R, Van Renterghem L. Significance of qualitative polymerase chain reaction combined with quantitation of viral load in the diagnosis and follow-up of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. *Intervirology* 1999;42(5-6) 398-404.
31. Goodrich J, Khardori N. Cytomegalovirus: the taming of the beast? *Lancet* 1997;350:1718-9.
32. Barrett-Muir WY, Aitken C, Templeton K, Raftery M, Kelsey SM, Breuer J. Evaluation of the murex hybrid capture cytomegalovirus DNA assay versus plasma PCR and shell vial assay for diagnosis of human cytomegalovirus viremia in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1998;36(9) 2554-6.
33. Gerna G, Baldanti F, Middeldorp JM, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Revello MG. Clinical significance of expression of human cytomegalovirus pp67 late transcript in heart, lung, and bone marrow transplant recipients as determined by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):902-11.
34. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Alessandrino E, Paganini A, Locatelli F, Middeldorp J, Revello MG. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38(5): 1845-53.
35. Preiser W, Bräuninger 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.
36. Weber B, Hamann A, Ritt B, Rabenau H, Braun W, Doerr HW. Comparison of shell vial culture and serology for the diagnosis of human cytomegalovirus infection in neonates and immunocompromised subjects. *Clin Investig* 1992;70(6):503-7.
37. Weber B, Rabenau H, Berger A, Scheuermann EH, Staszewsky S, Kreuz W, Scharrer I, Schoeppe W, Doerr HW. Seroprevalence of HCV, HAV, HBV, HDV, HCMV in high risk groups/Frankfurt a. M., Germany. *Zbl Bakt* 1995b;282:102-12.