

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis des humanen Cytomegalievirus
in Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Endomyokardbiopsien nach
Herztransplantationen, bei Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Heike Jennert
aus Hattersheim

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie

Leiter Prof. Dr. med. A.Schulz

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Bohle

Gutachter: Prof. Dr. Friedrich

Tag der Disputation: 20.02.2004

1. Einleitung	5
1.1 Historischer Rückblick	5
1.2 Eigenschaften des Cytomegalievirus	5
1.3 Epidemiologie	7
1.4 Klinik der Cytomegalievirus-Erkrankung	7
1.4.1 Möglichkeiten der HCMV-Infektion	7
1.4.2 Symptomatik	7
1.4.3 Viruspersistenz	9
1.5 Bedeutung der Cytomegalievirus-Infektion bei immunsupprimierten Patienten	10
1.6 Bedeutung des Cytomegalievirus bei Myokarditis	10
1.7 Bedeutung des Cytomegalievirus bei der dilatativen Kardiomyopathie	11
1.8 Methoden zum Nachweis des Cytomegalievirus	13
1.8.1 Indirekte Nachweismethoden	13
1.8.1.1 Zellkultur	13
1.8.1.2 Virusnachweis durch Antikörperbestimmung	13
1.8.2 Direkter Nachweis von Virusbestandteilen	14
1.8.2.1 Elektronenmikroskopie	14
1.8.2.2 Antigennachweis	14
1.8.2.3 „ <i>In-situ</i> -Hybridisierung“	15
1.8.2.4 „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR)	15
2. Fragestellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Materialien	17
3.1.1 Geräte	17
3.1.2 Chemikalien	17
3.1.3 Puffer und Lösungen	18
3.1.3.1 „Sample-Prep-Buffer“ zur Extraktion von DNA aus Paraffinschnitten	19
3.1.3.2 10× TBE	19
3.1.3.3 Blaumarker für Agarosegele	19
3.1.3.4 20× SSC	19
3.1.3.5 DEPC-Wasser	20
3.1.3.6 DIG-Farblösung	20
3.1.3.7 DIG-Farblösung	20
3.1.3.8 DIG-Puffer 2,10×	20

Inhaltsverzeichnis

3.1.3.9	DIG-Puffer 3	20
3.1.3.10	DIG-Puffer 4	21
3.1.3.11	DIG-Waschpuffer	21
3.1.3.12	Ethidiumbromid 10 mg/ml	21
3.1.3.13	TAE 50×	21
3.1.3.14	TRIS/HCl 1 M	21
3.1.3.15	Denaturierungspuffer	22
3.1.3.16	Neutralisierungspuffer	22
3.1.3.17	dNTP-Mix	22
3.1.3.18	Hybridisierungspuffer	22
3.1.4	Patientenproben	22
3.2	Allgemeine Methoden	25
3.2.1	Vermeidung von Kontaminationen	25
3.2.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	26
3.2.3	Extraktion von DNA aus Paraffinschnitten	26
3.2.4	PCR	27
3.2.4.1	„Nested PCR“	27
3.2.4.2	Kombination aus „Nested PCR“ und „Touch Down PCR“	30
3.2.5	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
3.2.6	Detektion der Amplifikate und der Restriktionsenzym-spaltungsfragmente auf einem Agarosegel	38
3.2.7	Optimierung der PCR durch Variation der Mg^{2+} Konzentration	38
3.2.8	Weitere Spezifizierung der PCR Produkte	38
3.2.8.1	PCR-Produktanalyse durch „Southern Blot“	38
3.2.8.2	Hybridisierung	39
3.2.8.3	Detektion Digoxigenin-markierter Sonden mittels Farbreaktion	40
3.2.9	Einteilung der Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantationen	40
3.2.10	Einteilung der Myokarditis nach der Dallas-Klassifikation	41
3.2.11	HCMV-assoziierte klinische Symptomatik bei herztransplantierten Patienten	42
3.2.12	Die verwendete Software	43
3.2.13	Statistik	43
4.	Ergebnisse	44
4.1	Einfluß der $MgCl_2$ -Konzentration auf die PCR-Amplifikate	44
4.2	Spezifizierung der PCR-Amplifikate durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	44

Inhaltsverzeichnis

4.3	Spezifizierung der PCR-Amplifikate mittels „Southern Blot“	45
4.4	Prävalenz einer Cytomegalievirus-Infektion in den untersuchten Kollektiven	45
4.4.1	Prävalenz einer Cytomegalievirus-Infektion in der Kontrollgruppe	45
4.4.2	Herztransplantierte Patienten	46
4.4.2.1	Kinder	46
4.4.2.2	Erwachsene	48
4.4.2.3	Cytomegalievirus-Nachweis bei herztransplantierten Patienten: Vergleich zwischen Erwachsenen und Kindern	50
4.4.2.4	Mortalität nach einer Herztransplantation in Abhängigkeit vom Cytomegalievirus-PCR-Status in der Nullbiopsie und in der letzten Biopsie	51
4.4.3	Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM)	53
4.4.3.1	Patienten mit DCM und Fibrose	53
4.4.3.2	Patienten mit DCM und histologischem Nachweis von Entzündungszellen	55
4.4.4	Patienten mit Myokarditis oder Borderline-Myokarditis	55
4.5	Assoziation zwischen Cytomegalievirus-PCR-Resultaten und einer cytomegalievirusartigen klinischen Symptomatik bei herz- transplantierten Patienten	58
4.6	Vergleich der Cytomegalievirus-PCR mit der Cytomegalievirus-Serologie	60
4.7	Assoziation von Cytomegalievirus-PCR-Ergebnissen mit dem histologischen Rejektionstyp	61
4.7.1	Vaskuläre Rejektion	61
4.7.2	Zelluläre interstitielle Rejektion	62
4.7.3	Chronische endokardiale Rejektion	63
4.8	Assoziation einer Cytomegalievirus-positiven Endomyokardbiopsie mit der Entwicklung einer Vaskulopathie der großen Koronararterienäste	63
5. Diskussion		65
5.1	Methoden des Cytomegalievirus-Nachweises	65
5.2	Nachweis des Cytomegalievirus mittels PCR und klinische Symptomatik	67
5.3	Prävalenz des Cytomegalievirus bei Patienten mit Myokarditis, Borderline-Myokarditis, dilatativer Kardiomyopathie und in der Kontroll- Gruppe	68
5.4	Prävalenz des Cytomegalievirus bei organtransplantierten Patienten	69

Inhaltsverzeichnis

5.5	Zusammenhang zwischen einem Cytomegalievirus-Nachweis mittels PCR aus Endomyokardbiopsien und der Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen	70
5.6	Mortalität nach einer Herztransplantation in Abhängigkeit von dem Cytomegalievirus-PCR-Status der Herzmuskelbiopsie post transplantationem	74
6.	Zusammenfassung	76
7.	Literaturverzeichnis	77

1. Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

Die Cytomegalie beim Menschen, auch Einschlußkörperchenkrankheit oder Speicheldrüsenviruskrankheit (131) genannt, wurde erstmals 1881 von Ribbert unter dem Namen „Krankheit mit protozoenartigen Zellen“ bei einem totgeborenen Kind mit interstitieller Nephritis, welches in utero mit Lues infiziert worden war, beschrieben (117). Damals wurde eine infektiöse Genese durch Protozoen vermutet. Den eigentlichen Begriff „Cytomegalie“, der das wesentliche morphologische Korrelat dieser Erkrankung charakterisiert, prägten 1921 Goodpasture und Talbot (48). Die Diagnose der Cytomegalie konnte damals nur histologisch gestellt werden. Charakteristisch für die Erkrankung war hierbei ein Kern-Einschlußkörperchen, das wegen seines Aussehens auch als Eulenaug bezeichnet wurde (130). Erst 1956 gelang es, das Virus aus infizierten Organen in menschlichen Fibroblastenkulturen zu züchten (47).

1.2 Eigenschaften des Cytomegalievirus

Das Cytomegalievirus gehört in die Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*). In dieser Familie werden Viren zusammengefaßt, die beim Menschen und bei verschiedenen Wirbeltieren vorkommen. Man kennt bislang acht humanpathogene Herpesviren (63,158):

Herpes simplex Typ I und II (HSV)
Varizella-Zoster-Virus (VZV)
Humanes Cytomegalievirus (HCMV = HHV 5)
Epstein-Barr-Virus (EBV)
Humanes Herpesvirus 6 (HHV 6)
Humanes Herpesvirus 7 (HHV 7)
Humanes Herpesvirus 8 (HHV 8)

Diese Herpesviren besitzen folgende gemeinsame Eigenschaften:

1.) Ihr Genom besteht aus einer linear aufgebauten, doppelsträngigen DNA mit einem Molekulargewicht zwischen 80 und 150×10^6 Dalton. Das aus verschiedenen Kapsomeren in

ikosaedrischer Anordnung aufgebaute Nukleokapsid wird von einer Lipidmembran umgeben, die den Gesamtdurchmesser des Virus mit ca. 180 nm bestimmt.

Durch die Hülle ist das Virus empfindlich gegenüber Alkohol, Lösungsmitteln, Detergentien und Säuren. Weiterhin führt die Hülle dazu, daß das Virus außerhalb des Organismus nur kurze Zeit lebensfähig ist und leicht austrocknet (125).

2.) Herpesviren replizieren sich im Zellkern der Wirtszelle.

3.) Die Infektion erfolgt durch „fusion without“, d.h. das Virus lagert sich an die Wirtszelle an, die Zellmembran verschmilzt mit der Virushülle. Anschließend wird das Genom zur Kernmembran transportiert und gelangt durch die Kernporen in den Zellkern.

4.) Herpesviren führen zur Lyse der infizierten Wirtszelle.

5.) Das Virus persistiert in einem einmal befallenen Organismus. Dabei liegt das latente Virus als Genom in der Wirtszelle vor.

6.) Alle Herpesviren zeigen eine hohe Durchseuchungsrate in der Bevölkerung (158).

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) enthält in seinem Kern ein Genom von ca. 240.000 Basenpaaren (83), das für etwa 200 verschiedene Gene kodiert (24). In seiner Virushülle enthält es 6 Glykoproteine gegen die der Wirtsorganismus Antikörper bilden kann (83).

Während der Virusreplikation unterscheidet man drei voneinander abhängige Abschnitte: Die „immediate early phase“, die „early phase“ und die „late phase“ (83,135). In der ersten Phase werden Regulatorproteine gebildet, die für die Transkription und für den Beginn der Replikation notwendig sind. Während dieser Phase lassen sich „immediate early“-Antigene im Zellkern nachweisen (141). In der zweiten Phase erfolgt die DNA-Replikation mit der Synthese der dafür notwendigen Proteine. In der dritten Phase kommt es schließlich zur Bildung von „late“-Antigenen, hauptsächlich Strukturproteinen, welche sich im Zytoplasma und in den Plasmamembranen infizierter Zellen nachweisen lassen (149). Zusätzlich zu den „late“-Antigenen finden sich während dieser Phase auch „immediate early“ Antigene im Zytoplasma (139). Zuletzt erfolgt die Freisetzung des Virus.

Die Antigenstruktur der HCMV-Stämme ist weitgehend einheitlich, jedoch gibt es unterschiedliche Varianten, die sich in ihrer Antigenität geringfügig unterscheiden (83). So kennt

man 3 Subtypen, welche sich in der Struktur des Glykoproteins B (gB) unterscheiden (101) sowie mehrere genomische Varianten, welche im Genotyp des Hüllproteins gpUL 73 (insgesamt 4), dem MIEA (insgesamt 18), der DANN-Polymerase (insgesamt 8) oder dem Glykoprotein H (gH) (insgesamt 15) differieren (101,109).

1.3 Epidemiologie

Das humane Cytomegalievirus ist ubiquitär verbreitet. Die Durchseuchung der Bevölkerung in den Entwicklungsländern beträgt nahezu 100%. Schon im Alter von 5 Jahren sind dort praktisch alle Kinder mit HCMV infiziert. Wahrscheinlich werden die Neugeborenen und Säuglinge über die Muttermilch infiziert (83).

In den Industrieländern ist die Durchseuchung, zumindest unter Berücksichtigung der serologischen Daten, geringer. Bei den Erwachsenen beträgt die Prävalenz von HCMV 50%, in Risikogruppen, wie z.B. bei Homosexuellen 100% (135). Ho (65) gibt einen Anteil von 40-80% seropositiver Erwachsener an. In Deutschland beträgt die Durchseuchung bis zu 70% (4). Bei den Neugeborenen sind ca. 1% mit HCMV infiziert (64).

Wahrscheinlich ist die tatsächliche Prävalenz bei Erwachsenen in den Industrieländern noch größer, da in diesen Studien jeweils nur der Serostatus untersucht wurde, HCMV-Genom sich jedoch in bis zu 30% (156) auch in seronegativen Personen mittels PCR nachweisen läßt (135,156).

1.4 Klinik der Cytomegalievirus-Erkrankung

1.4.1 Möglichkeiten der HCMV-Infektion

Das humane Cytomegalievirus kann durch Nasen-Rachen-Sekret (135), Urin (25), Muttermilch (59), Blutproben (135), Herztransplantationen (26,111), Nierentransplantationen (98), Knochenmarkstransplantationen (70) und Lebertransplantationen (106) auf einen neuen Wirt übertragen werden. Mit der diaplazentaren Übertragung gehört das humane Cytomegalievirus zu den am häufigsten intrauterin auf den Föten übertragenen Erregern (83).

1.4.2 Symptomatik

Grundsätzlich müssen drei Zeitpunkte der Infektion unterschieden werden:

- 1.) Die intrauterin erworbene Infektion
- 2.) Die perinatal erworbene Infektion
- 3.) Die postnatal erworbene Infektion.

zu 1.) Intrauterine Infektion

Entscheidend für die Entwicklung schwerer Schäden durch eine intrauterin erworbene HCMV-Infektion ist die Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft. Reaktivierungen oder Sekundärinfektionen der Mutter führen in der Regel nicht zu einer Schädigung der Frucht, da durch die schon vorhandenen Antikörper ein gewisser Schutz für das ungeborene Leben besteht. 90% der intrauterin infizierten Neugeborenen sind bei der Geburt klinisch gesund, 5% haben leichte, sich völlig zurückbildende Symptome wie Ikterus und Hepatosplenomegalie, die restlichen 5% haben häufig bleibende Schäden, z.B. intrazerebrale Verkalkungen, Mikrozephalie, Chorioretinitis, geistige und körperliche Retardierung (83,135), diverse Organmißbildungen (135) oder eine Panzythämie (132). Manche intrauterin infizierten Neugeborenen werden durch eine generalisierte Infektion so stark geschädigt, daß sie nicht lebensfähig sind (83). Histologisch kann man in diesen Fällen post mortem charakteristische Einschlusskörperchen in den Zellen von Lunge, Nieren, Leber oder Pankreas finden (2). Auch bei intrauterin Infizierten, die zum Zeitpunkt der Geburt unauffällig waren, können sich noch Spätschäden wie mentale und körperliche Retardierung, Hörschäden und Knochenwachstumsstörungen zeigen.

zu 2.) Perinatal erworbene Infektion

Das Neugeborene kann sich während der Passage des Geburtskanals, durch virushaltige Muttermilch oder durch Austauschtransfusionen infizieren. In der Regel verlaufen perinatale Infektionen asymptomatisch, es können aber auch schwere Krankheitserscheinungen, wie z.B. Hautblutungen, Ikterus, Hepatosplenomegalie und Panzythämie auftreten (132), besonders nach Austauschtransfusionen (83).

zu 3.) Postnatal erworbene Infektion

Die HCMV-Infektion verläuft bei Gesunden im Kindes- und Erwachsenenalter zumeist asymptomatisch oder mild (74,135), z.B. ähnlich einer infektiösen Mononukleose (139). Bei jungen Säuglingen kann eine HCMV-Infektion auch zu einer interstitiellen Pneumonie, Hepatosplenomegalie, zu gastrointestinalen Verlaufsformen und zu Veränderungen an den schnell wachsenden Röhrenknochen führen (132).

Möglicherweise spielt das Virus durch seine Fähigkeit, das Immunsystem zu aktivieren und zu modulieren (82,89,120) eine wichtige Rolle beim Typ I Diabetes (135) und beim Guillain-Barré-Syndrom (135). Auch bei der HCMV-Pneumonie wird von manchen Autoren (55) eine Immunpathogenese vermutet, da die Virusreplikation in der Lunge nicht mit dem Entstehen pathologischer Effekte korreliert, sondern anscheinend erst die Immunantwort des Wirts zur Pneumonitis führt. Weiterhin wird das Virus beschuldigt, die zelluläre Abwehr, gemessen an einer signifikant verminderten T-Helfer/T-Suppressorzell-Ratio, zu vermindern (33) und so die Infektion durch Opportunisten zu begünstigen (33,49,150). Dies betrifft besonders organtransplantierte Patienten. Die Rolle des HCMV in der Pathogenese der Arteriosklerose ist umstritten (35,61,62), Melnick et al. (97) zeigten jedoch, daß hohe Antikörpertiter gegen HCMV mit einer Arteriosklerose assoziiert sind.

1.4.3 Viruspersistenz

Wie alle Herpesviren besitzt auch das humane Cytomegalievirus die Eigenschaft der lebenslangen Persistenz in einem einmal infizierten Wirtsorganismus. Der Ort dieser Viruspersistenz ist heute noch nicht genau bekannt. Es gibt Hinweise darauf, daß das HCMV-Virus hauptsächlich Monozyten, polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNL) und T-Lymphozyten infiziert (46,108,156). Dabei dienen die PMNL nicht nur als Virusträger, in ihnen erfolgt auch eine Virusreplikation (46). Einen Hinweis auf die Viruspersistenz in Monozyten bzw. das Aufrechterhalten einer langdauernden Virämie gibt die Tatsache, daß sich das HCMV sowohl in den Monozyten von seropositiven asymptomatischen als auch seronegativen Individuen (156) nachweisen läßt.

Maciewski et al. (92) sehen als Virusreservoir hämatopoetische Progenitorzellen an, einschließlich der (CD 34+)-Stammzellen, die trotz der Infektion mit HCMV normale blutbildende Kolonien bilden können. Sie konnten mittels PCR sowohl in erythroiden als auch in myeloiden Kolonien das Virus nachweisen. Möglicherweise persistiert HCMV auch noch in vielen anderen Zellen. So konnten z.B. Ustinov et al. (143) das Virus in Endothelzellen von Kapillaren im Herzen und Wu et al. (162) in den Koronararterien bei herztransplantierten Patienten mittels Antigennachweis detektieren.

1.5 Bedeutung der humanen Cytomegalievirus-Infektion bei immunsupprimierten Patienten

Die Infektion mit dem HCMV, die bei Immunkompetenten in der Regel asymptomatisch verläuft, kann bei Patienten mit der erworbenen Immunschwäche AIDS oder nach iatrogenen Immunsuppression im Rahmen von Organtransplantationen zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen (135). Durch eine verzögerte Reaktionsbereitschaft des Organismus auf HCMV steigt bei Transplantierten zusätzlich das Risiko einer sekundären Organinvasion (6).

Somit führt HCMV zu einer erhöhten Morbidität, Mortalität oder Transplantatschädigung (8,11,12,28,39,54,70,84,100,103,118,123,133,145,161).

Es kann auch zu einer Reaktivierung des Virus bei bereits infizierten und bis zum Zeitpunkt der Immunsuppression asymptomatischen Virusträgern kommen. Die Patienten scheiden das Virus dabei mit dem Rachensekret und dem Urin aus, meist zeigen sie außer leichtem Fieber keine weiteren klinischen Auffälligkeiten, obwohl gleichzeitig Organe massiv geschädigt werden können. Primärinfektionen und Reinfektionen mit einem anderen HCMV-Subtyp (siehe Seite 6) führen hierbei häufig zu schweren HCMV-Erkrankungen, die sich in Form einer atypischen interstitiellen Pneumonie, einer Colitis, Ösophagitis, gastro-intestinaler Ulzerationen, einer Retinitis oder Enzephalitis manifestieren können. Besonders bei Knochenmarkstransplantierten ist die HCMV-Infektion die häufigste infektiöse Todesursache mit einem Maximum um den 60. Tag post transplantationem (135). Die bei Organtransplantierten häufig vorkommende und eindeutig auf HCMV zurückzuführende Pneumonie (20) ist bei den Patienten mit der erworbenen Immunschwäche AIDS eher selten, vielmehr stehen bei ihnen Infektionen durch andere opportunistische Keime (z.B. Pneumozystis carinii) im Vordergrund, auch wenn sich in den pneumonischen Infiltraten oft zusätzlich auch HCMV nachweisen lässt (135).

1.6 Bedeutung des humanen Cytomegalievirus bei Myokarditis

Eine Myokarditis kann durch viele verschiedene Ursachen hervorgerufen werden. So unterscheidet man ätiologisch:

- a) Infektiöse Myokarditis (Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen)
- b) Immunologisch (hyperergische) bedingte Myokarditis
- c) Medikamenteninduzierte Myokarditis
- d) Myokarditis nach Bestrahlung des Mediastinums
- e) Idiopathische Myokarditis (z.B. Fiedler Myokarditis)

Ca. 5% der virusinfizierten Bevölkerung erleidet eine kardiale Beteiligung im Rahmen ihrer Erkrankung, beeinflusst durch Epidemien, Jahreszeit, Alter, Schwangerschaft und Geschlecht.

Als kardiotope Viren sind Influenza-, Coxsackie B-, CMV (1,69,88,94,95,126), Polio-, Echo-, Vaccina- und bei Kindern (95) Adeno-Viren bekannt (68,70,160). In der Literatur wird die Inzidenz einer durch HCMV verursachten Myokarditis zwischen 1% (95) und 14% (94), die Inzidenz einer durch HCMV verursachten Perimyokarditis mit 8,5% (94) aller virusinduzierten Peri-Myokarditiden angegeben.

Einerseits können Viren, wie auch HCMV, direkt Herzmuskelzellen schädigen, was besonders bei immunsupprimierten Patienten von Bedeutung ist, zum anderen können sie auch die Bildung von autoreaktiven Zellen induzieren, die nach der Viruselimination weiterhin auch nicht infizierte Zellen zerstören (160).

Pathogenetisch können folgende Autoimmunphänomene von Bedeutung sein (127):

- 1.) Bildung von organspezifischen Autoantikörpern
- 2.) Entzündungszellinfiltration
- 3.) Immunglobulinablagerungen
- 4.) Expression von HLA-Klasse I und II Antigenen
- 5.) Zytotoxische Reaktionen:
 - zellulär
 - humoral
 - komplement(un-)abhängig
- 6.) Verändertes T4/T8-Verhältnis
- 7.) Verminderte natürliche Killer- (NK-) Zellfunktion

1.7 Bedeutung des humanen Cytomegalievirus bei der dilatativen Kardiomyopathie

Eine primäre Kardiomyopathie ist eine Myokarderkrankung mit verminderter Kontraktionskraft und Dilatation des Herzens. Das Herzzeitvolumen ist hierbei herabgesetzt (Vorwärtsversagen) und es kommt zu einem Rückstau des Blutes vor dem Herzen (Rückwärtsversagen).

Man unterscheidet folgende Typen der Kardiomyopathien (119):

- Dilatative Kardiomyopathie
- Hypertrophe Kardiomyopathie
- Restriktive Kardiomyopathie
- Arrhythmogene Kardiomyopathie des rechten Ventrikels
- Unklassifizierte Kardiomyopathie
 - Fibroelastose
 - schwammartiges Myokard („spongy myocardium“)
 - systolische Dysfunktion mit minimaler Dilatation
 - Mitochondriopathien

- Spezifische Kardiomyopathie
 - ischämische Kardiomyopathie
 - Kardiomyopathie bei Herzklappendysfunktion
 - entzündliche Kardiomyopathie
 - metabolische Kardiomyopathie
 - Kardiomyopathie bei Systemerkrankungen
 - Kardiomyopathie bei Muskeldystrophien
 - Kardiomyopathie bei neuromuskulären Erkrankungen
 - Kardiomyopathie bei allergischen und toxischen Reaktionen
 - peripartale Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste Form der primären Kardiomyopathien. Ihre Inzidenz beträgt in den USA ca. 5-10 pro 100.000 Einwohner, in Afrika, Asien und Südamerika ist sie höher. Die Hauptmanifestation liegt zwischen dem 20. und dem 60. Lebensjahr (36). Eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung einer Kardiomyopathie haben virale Myokarditiden (32). Neben den enteroviralen Genomen (69) konnte in bis zu 22% der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie HCMV mittels PCR aus Endomyokardbiopsien nachgewiesen werden (68).

1.8 Methoden zum Nachweis des humanen Cytomegalievirus

1.8.1 Indirekte Nachweismethoden

Hierbei werden Viren aufgrund ihrer Infektiosität und Pathogenität nachgewiesen, indem das Untersuchungsmaterial auf einen für das gesuchte Virus empfänglichen Wirt verimpft wird. Die Veränderungen im Wirt zeigen dann das Vorhandensein des Virus an.

1.8.1.1 Zellkultur

Nach der Virusisolierung aus Speichel, Blut, Urin oder Gewebe werden „Monolayer“ von Fibroblasten, d.h. an einem Glas fest anhaftende Zellrasen, mit dem Virus infiziert. Die Virusvermehrung führt zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellkulturen, wie Abrunden, Riesenzellbildung und Übereinanderwuchern der Zellen. Dieses Phänomen bezeichnet man als zytopathogenen Effekt.

Nachteil der Kultur ist die lange Dauer bis zum Ergebnis und die schlechte klinische Korrelation mit der HCMV-Infektion (124). Weiterhin kann es durch unsachgemäße Materialgewinnung und unangemessenen Transport zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Auch durch toxische Effekte von Leukozyten kann das Ergebnis beeinflusst werden.

1.8.1.2 Virusnachweis durch Antikörperbestimmung

Zu Beginn einer Viruserkrankung lassen sich in der Regel noch keine Antikörper im Blut des Patienten nachweisen. Erst nach ca. 7-10 Tagen erscheinen IgM-Antikörper, die gegen Antigene des Virus gerichtet sind. Während der weiteren klonalen Expansion der Antikörperproduktion findet ein „*m*- γ -switch“ statt, wobei die schweren *m*-Ketten gegen γ -Ketten ausgetauscht werden. IgM-Antikörper bleiben im Blut ca. 3-6 Monate nachweisbar, während IgG-Antikörper wahrscheinlich ein ganzes Leben lang nachweisbar bleiben. Gelingt es also, im Patientenblut spezifische IgM-Antikörper nachzuweisen, kann man davon ausgehen, daß der Patient in den letzten 3-6 Monaten eine primäre Virusinfektion durchgemacht hat. Bei einer Sekundärinfektion kommt es zur sogenannten Booster-Reaktion mit einem schnellen Anstieg der IgG-Antikörper und häufig zu keinem signifikanten IgM-Antikörperanstieg. Gelingt es, den Antikörpertiteranstieg nachzuweisen, so ist von einer Reinfektion auszugehen. Problematisch ist der Antikörpernachweis bei persistierenden Viruserkrankungen. Hierbei lassen sich häufig auch über einen längeren Zeitraum hin IgM-Antikörper nachweisen, so daß man nicht weiß, ob es sich um eine persistierende Viruserkrankung oder um eine Primärinfektion handelt, was besonders bei

Schwangeren mit einer HCMV-Infektion sehr wichtig wäre. Immunsupprimierte können je nach Therapie bei einer akuten Virusinfektion keine oder nur eingeschränkt Immunglobuline bilden, so daß gerade bei diesen Patienten der alleinige Antikörpermachweis unzuverlässig ist.

Hingegen konnten Korcakova et al. (76) als Zeichen der Virusaktivierung und Reproduktion IgM bei Herztransplantierten nachweisen. Rice et al. (118) zeigten einen Zusammenhang eines hohen IgM-Index mit einer HCMV-Erkrankung bei herztransplantierten Patienten unter immunsuppressiver Therapie (Index > 2,4 bei an HCMV erkrankten gegenüber < 1,1 bei gesunden herztransplantierten asymptomatischen Patienten).

1.8.2 Direkter Nachweis von Virusbestandteilen

Hierbei werden Viren direkt als physikalische Partikel ohne vorherige Anzüchtung und Vermehrung im Patientenmaterial nachgewiesen.

1.8.2.1 Elektronenmikroskopie

Mittels Elektronenmikroskopie kann man Herpesviren nachweisen. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch die geringe Sensitivität. Ein negatives Ergebnis hat daher nur eine geringe Aussagekraft.

1.8.2.2 Antigennachweis

Spezifische Antikörper der Maus gegen HCMV binden an das vermutete Virusantigen. Durch einen weiteren Antikörper der Ziege, der gegen Immunglobuline der Maus gerichtet und mit Fluorescein oder Enzymen markiert ist, kommt es zu einer Anfärbung des Antigen/Antikörper-Komplexes. Vorteil des Antigennachweises, z.B. des pp 65 Proteins, einem „immediate early“ Matrixprotein, welches vom Exon 2 des Immediate-Early-Gens 1 kodiert wird und dessen vier Epitope von Antikörpern immunpräzipitiert werden können (163), ist eine große Spezifität (157) im Vergleich zur Serologie und die Quantifizierbarkeit der Antigenämie, die mit dem klinischen Bild einer HCMV-Erkrankung korreliert (79,108). Weiterhin kann man bereits nach 4-5 h mit einem Ergebnis rechnen (144). Nachteil bei der Detektion von HCMV-Antigenen aus Leukozyten ist, daß die interessierenden Proteine durch leukozyteneigene Enzyme modifiziert werden (70) und die geringere Sensitivität im Vergleich zur PCR.

1.8.2.3 „*In-situ*-Hybridisierung“

Mittels einer Gensonde, deren Nukleinsäuresequenz komplementär zur gesuchten viralen Nukleinsäuresequenz ist, werden bei dieser Methode virale DNA-Abschnitte nachgewiesen. Die Gensonde kann mit radioaktiven Markern oder mit Enzymen gekoppelt werden. Nach der Anlagerung der Gensonde an die gesuchte DNA kommt es dann zu einer enzymatischen Reaktion oder zu einer Schwärzung des Röntgenfilms.

Nachteilig ist bei dieser Methode, daß mindestens $1,5 \times 10^5$ identische virale DNA-Sequenzen im Untersuchungsmaterial vorhanden sein müssen, um zu einem positiven Ergebnis zu gelangen (154). Durch eine PCR vor der geplanten „*in situ*-Hybridisierung“ („*in-situ*-PCR“) kann die Sensitivität dieser Methode gesteigert werden (75).

1.8.2.4 „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion ist es möglich, virale DNA zu vervielfältigen, so daß man die gesuchte DNA direkt auf einem Agarosegel sichtbar machen kann. Eine weitere Spezifizierung kann anschließend durch eine zusätzliche „nested-PCR“, einen „Southern Blot“, eine Restriktionsenzymspaltung oder eine Sequenzierung erfolgen. Mit Hilfe der „real-time“-PCR gelang es in jüngster Zeit, eine quantitative Bestimmung der Viruslast im Blut oder im betroffenen Gewebe vorzunehmen (21,29,91).

Da die PCR die sensitivste Methode aller Nachweismethoden von HCMV ist (157) und nur geringste Mengen von Gewebe aus Herzmuskelbiopsien zur Verfügung standen und zusätzlich gerade bei immunsupprimierten Patienten eine zuverlässige und schnelle Diagnose der HCMV-Infektion essentiell ist, wurde für diese Studie zur Beurteilung einer möglichen Transplantat-Cytomegalievirus-Infektion der Virusgenomnachweis mittels PCR gewählt.

Wie bei allen Befunden ist auch hierbei eine kritische Wertung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der jeweiligen Klinik essentiell.

2. Fragestellung

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, wie häufig HCMV mittels PCR aus in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Endomyokardbiopsien bzw. Herzmuskelgewebe in folgenden Patientengruppen nachgewiesen werden kann:

1. Bei Patienten mit Myokarditis
2. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie
3. Bei Kindern und Erwachsenen nach einer Herztransplantation
4. Bei Verstorbenen ohne Herzerkrankung

Weiterhin sollte überprüft werden, ob Zusammenhänge zwischen einer HCMV-Infektion und der akuten, vaskulären oder chronischen Rejektion nach Herztransplantationen bestehen und ob sich Hinweise auf eine prognostische Bedeutung einer HCMV-Infektion im Herztransplantat anhand von Endomyokardbiopsien ergeben.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Die in der Arbeit verwendeten Geräte und Chemikalien werden im Folgenden unter Angabe des jeweiligen Herstellers aufgelistet:

3.1.1 Geräte

Autoklav	Certo Clav, Traun, Österreich
Gelkammer	Bächler Fein Tech M.A.K.I Hölstein
Mikrowelle	Samsung Classic Collection
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Beckmann, Mainz
Photometer	Ultrospec II Biochrom LKB, Freiburg
Polaroid MP4 Land Camera	Bachofer, Reutlingen
2303 XL Multidrive Power-Supply	Pharmacia, Erlangen
UV Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex	Heidolph, Kelkheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415	Eppendorf
Centrifuge 5417R	Eppendorf

3.1.2 Chemikalien

Agarose	FMC, Biozym, Hameln
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck
dATP	Boehringer
dCTP	Boehringer
dGTP	Boehringer
dTTP	Boehringer
DEPC	Serva, Heidelberg
DNA Marker ϕ X 174 Hinf I	Promega, Heidelberg

3. Material und Methoden

EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Eukitt	Boehringer
Gelatine	Sigma
Glycerin	Merck
HCl	Merck
KCl	Merck
Maleinsäure	Sigma
MgCl ₂	Merck
Mineralöl	Sigma
NaOH	Merck
NBT	Boehringer
NaCl	Merck
Natriumcitrat	Sigma
n-Oktan	Merck
N-Lauroylsarkosin	Sigma
Phenol:H ₂ O:Chloroform (68:18:14)	abi, Weiterstadt
Proteinase K	Sigma
Taq Polymerase	Perkin Elmer, Lingen
TRIS	BioRad, München
Tween 20	Sigma
X-Phosphat	Boehringer
Xylencyanol	Merck
Xylol	Merck

3.1.3 Puffer und Lösungen

Im folgenden werden die Zusammensetzung und die Herstellung der in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen charakterisiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle genannten Puffer und Lösungen vor Gebrauch bei 121 °C bei einem Überdruck von 1500 hPa über 30 min autoklaviert.

3.1.3.1 „Sample-Prep-Buffer“ zur Extraktion von DNA aus Paraffinschnitten

- 50 mM KCl
- 10 mM TRIS/HCl (pH 8.3)
- 1.5 mM MgCl₂
- 0.01% Gelatine
- 0.5% Tween

Vor Gebrauch werden 0.5 mg/ml Proteinase K hinzugefügt.

3.1.3.2 10× TBE

- 108 g TRIS
- 55 g Borsäure
- 8.3 g EDTA

- H₂O ad 1000 ml

3.1.3.3 Blaumarker für Agarosegele

- 5% Glycerin
- 0.5% SDS
- 10 mM EDTA
- 0.025% Bromphenolblau
- 0.025% Xylencyanol

(nicht autoklaviert)

3.1.3.4 20× SSC

- 3 M NaCl
- 0.3 M Na-Citrat

auf pH 7.0 (20 °C) eingestellt

3.1.3.5 DEPC-Wasser

- 1 l H₂O dest
- 1 ml DEPC

60 min gerührt, anschließend autoklaviert

3.1.3.6 DIG-Farblösung

- 10 ml DIG-Puffer 3
- 45 ml NBT (Boehringer)
- 35 ml X-Phosphat (Boehringer)

3.1.3.7 DIG-Farblösung

- 0.1 M Maleinsäure
- 0.15 M NaCl

mit 10 N NaOH auf pH 7.5 eingestellt

3.1.3.8 DIG-Puffer 2, 10×

- 10 g Blocking Reagenz (Boehringer)
- 100 ml DIG-Puffer 1

3.1.3.9 DIG-Puffer 3

- 0.1 M TRIS/HCl (pH 9.5)
- 0.1 M NaCl
- 50 mM MgCl₂

3.1.3.10 DIG-Puffer 4

- 10 mM TRIS/HCl
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

3.1.3.11 DIG-Waschpuffer

- Puffer 1
- 0.3 % Tween (Sigma)

3.1.3.12 Ethidiumbromid 10 mg/ml

- 1 g Ethidiumbromid
- 100 ml H₂O

(lichtgeschützt aufbewahren, nicht autoclavieren)

3.1.3.13 TAE 50×

- 242 g TRIS Base
- 57.1 ml Eisessig
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ad 1 l H₂O

3.1.3.14 TRIS/HCl 1 M

- 121.1 g TRIS Base

pH nach Bedarf mit konz. HCl einzustellen

3.1.3.15 Denaturierungspuffer

- 0.5 N NaOH
- 1.5 M NaCl

3.1.3.16 Neutralisierungspuffer

- 0.5 TRIS/HCl pH 7.4
- 0.5 M NaCl

3.1.3.17 dNTP-Mix

- 25 ml dATP
- 25 ml dCTP
- 25 ml dGTP
- 25 ml dTTP

ad 1000 ml H₂O

3.1.3.18 Hybridisierungspuffer

- 10ml: 2.5 ml 20× SSC
2.0 ml Blockierungsreagenz (nach Detektion Kit)
(10%ige Blockringlösung in 1×Puffer 1)
2.0 ml 1%ige Lauryl-Sarcosine in H₂O
40 ml 10%iges SDS
9.0 ml H₂O

3.1.4 Patientenproben

Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum zwischen 14.12.1993 und 20.12.1996 195 Gewebeproben von 122 Patienten untersucht. Diese entstammten dem Untersuchungsgut des

3. Material und Methoden

Institutes für Pathologie (n=107) und des Institutes für Rechtsmedizin (n=15) der Universität Gießen. Zur Konservierung waren alle Proben Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet. Bei der Kontrollgruppe handelt es sich um Herzmuskelgewebe von 15 Personen, die keine Herzerkrankung hatten und durch einen Verkehrsunfall, durch ein Verbrechen oder durch eine Subarachnoidalblutung plötzlich ums Leben gekommen sind. Von diesen waren 11 männlichen und 4 weiblichen Geschlechts in einem Alter zwischen 2 und 89. Das durchschnittliche Alter betrug 44 ± 20 Jahre (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Bei der Gruppe der Kardiomyopathien handelt es sich um 26 Patienten in einem Alter zwischen 9 und 89 Jahren (20 männlich, 6 weiblich) mit klinisch und histologisch gesicherter dilatativer Kardiomyopathie. Das durchschnittliche Alter betrug 50 ± 20 Jahre.

Der Gruppe der Myokarditisfälle wurden 23 Patienten in einem Alter zwischen 1 und 84 Jahren (17 männlich, 6 weiblich) mit histologisch gesicherter Myokarditis und Borderline-Myokarditis zugeordnet. Das durchschnittliche Alter betrug 44 ± 27 Jahre.

In die Gruppe der Herztransplantierten fielen 18 Erwachsene in einem Alter zwischen 33 und 59 Jahren (17 männlich, 1 weiblich) und 23 Kinder in einem Alter zwischen 1 Tag und 15 Jahren (14 männlich, 9 weiblich) zum Zeitpunkt der Herztransplantation, die im Zeitraum von 1988 bis 1994 an der Universität Gießen oder in der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim herztransplantiert wurden. Das durchschnittliche Alter der Erwachsenen betrug zum Ende des Untersuchungszeitraums 1998 58 ± 8 Jahre, das Durchschnittsalter der Kinder 7 ± 5 Jahre. Untersucht wurden die Nullbiopsien (Biopsien aus dem Spenderherz) bzw. die Explantate und die letzten zur Verfügung stehenden Transplantationsbiopsien. Die klinischen Befunde wurden retrospektiv vom 1.1.1980 bis zum 1.1.1998 erhoben. Die Patientendaten wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bauer von der Abteilung Kinderkardiologie am Zentrum für Kinderheilkunde und von Herrn Prof. Dr. Haberbosch von der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Klinik I der Justus-Liebig-Universität zur Verfügung gestellt.

3. Material und Methoden

Tabelle 1: Charakterisierung der herztransplantierten Erwachsenen

Zahl der untersuchten Erwachsenen	18
Männer/Frauen	17/1
Alter (Jahre) zum Zeitpunkt der Herztransplantation	33-59
präoperative Diagnose:	
-ischämische Herzerkrankung	13
-dilatative Kardiomyopathie	5
Medikation:	
-Cyclosporin A, Azathioprin, Aciclovir und Anti-CMV-IgG	18
-zusätzlich zur o.g. Medikation: Prednisolon	5

Tabelle 2: Charakterisierung der herztransplantierten Kinder

Zahl der untersuchten Kinder	21
Jungen/Mädchen	13/8
Alter zum Zeitpunkt der Herztransplantation	ein Tag-15 Jahre
präoperative Diagnose:	
-hypoplastisches Linksherzsyndrom	9
-Endomyokardfibroelastose	2
-Kardiomyopathie	7
-andere	3
Medikation:	
-Cyclosporin A, Azathioprin, Aciclovir und Anti-HCMV-IgG	21
-zusätzlich zur o.g. Medikation: Ganciclovir	2

3.2 Allgemeine Methoden

3.2.1 Vermeidung von Kontaminationen

DNA menschlicher, tierischer, pflanzlicher oder mikrobieller Herkunft ist ubiquitär vorhanden. Um eine Kontamination der zu untersuchenden Patientenproben zu vermeiden, ist es wichtig, sorgfältigst und mit Handschuhen zu arbeiten und Maßnahmen zur Dekontamination zu ergreifen. Diese sind im Folgenden aufgeführt:

1. Desinfektion der Arbeitsflächen mit 70% igem Ethanol
2. Backen der verwendeten Glasmaterialien bei 180°C über 12 h
3. Behandlung von H₂O mit DEPC
4. Autoklavieren aller Lösungen und Puffer bei 121°C mit 1.5 AtÜ für 30 min
5. Verwendung von gestopften Pipettenspitzen.

Weiterhin wurden die Arbeitsplätze und die verwendeten Materialien für die DNA-Extraktion, für den PCR-Ansatz, sowie für die Gelpräparation strengstens voneinander getrennt.

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Vor jeder DNA-Extraktion wurden HE-Kontrollschnitte angefertigt und mikroskopiert. Hierzu wurden mit einem Schlittenmikrotom Paraffinschnitte von ca. 5 μ m Dicke hergestellt und anschließend nach folgendem Protokoll gefärbt:

2× 20 min in Xylol entparaffiniert,
jeweils kurz in 100%, in 96%, dann in 70% Ethanol und schließlich kurz in H₂O eingetaucht,
7 min in Hämalaun inkubiert,
unter Leitungswasser abgespült,
4 min in Eosin gefärbt,
dann kurz in 70%, 90%, 100% Ethanol und anschließend in Xylol eingetaucht.

Zum Schluß wurde der Schnitt mit Eukitt und mit einem Deckglas eingedeckt.

3.2.3 Extraktion von DNA aus Paraffinschnitten

Je nach Gewebemenge des Paraffinblöckchens wurden 1-5 Schnitte von 5 μ m Dicke durch Zugabe von 1 ml n-Oktan entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben 5 min zentrifugiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt.

Danach wurde das Pellet mit 500 μ l 100%igem Ethanol zwei Mal gewaschen, 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach 1h Trocknen in einem auf 50 °C vorgeheizten Wärmeblock wurden die Proben in 100 μ l H₂O, das 20 μ g Proteinase enthielt, resuspendiert,

1 h bei 55 °C inkubiert und 10 min gekocht.

Bei dem Extraktionsverfahren wurde neben den zu untersuchenden Patientenproben immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle benutzten Lösungen der DNA-Extraktion enthielt. Hierdurch sollte gesichert werden, daß die DNA aus den Patientenproben stammt und keine Kontamination darstellte. Weiterhin wurden zur Etablierung der Methode zunächst eine HCMV-Viruskultur, die Alkohol-fixiert wurde (freundlicherweise von Herrn Dr. Willems, Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt) und bei den weiteren Untersuchungen ein Paraffinschnitt einer immunhistologisch gesicherten HCMV-Plazentitis als Positivkontrolle mitgeführt.

3.2.4 PCR

3.2.4.1 „Nested PCR“

Vor der Untersuchung auf HCMV-Genom in humanem Formalin fixiertem, Paraffin eingebettetem Herzmuskelgewebe mußte zur Vermeidung falsch negativer Resultate sichergestellt werden, daß ausreichend amplifizierbare DNA im Paraffinmaterial vorhanden war. Daher wurde zunächst eine Sequenz des H-*ras*-1 Gens untersucht, das in allen humanen Zellen vorhanden ist. Durch Mitführen einer Negativkontrolle wurde eine nachträgliche Kontamination mit fremder DNA ausgeschlossen. Anhand publizierter Sequenzen (14) wurden folgende Primer für das erste Exon des *ras*-Gens für eine Nested PCR gewählt:

H 12/13 ext „upstream“: 5' GGA GAC CCT GTA GGA GGA CCC 3'
(Nucleotidposition 1625-1645)

H 12/13 ext „downstream“: 5' TCT ATA GTG GGG TCG TAT TCG TCC 3'
(Nucleotidposition 1779-1756)

H 12/13 int „upstream“: 5' GCA GGC CCC TGA GGA GCG ATG 3'
(Nucleotidposition 1652-1672)

H 12/13 int „downstream“: 5' AAA ATG GTT CTG GAT CAG CTG GAT G 3'
(Nucleotidposition 1753-1729)

3. Material und Methoden

Hierbei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Reaktionsgemisch für die externe PCR:

5 ml	DNA-Extrakt
5 ml	10 × PCR-Puffer
0,3 ml	dNTP-Mix
0,4 ml	Taq-Polymerase (5 U/ml)
4 pMol	H 12/13 ext upstream Primer
4 pMol	H 12/13 ext downstream Primer

ad 50 ml H₂O dest.

(mit 20 ml Mineralöl überschichtet)

Zyklen:

Zyklus 1	5 min	94 °C
	1 min	60 °C
	1 min 15s	74 °C
Zyklus 2-34	1 min	94 °C
	1 min	60 °C
	1 min 15s	74 °C
	Time Extension 3s	
Zyklus 35	1 min	94 °C
	1 min	60 °C
	7 min	74 °C

Während der externen PCR entstehen auch unspezifische Amplifikate, die später auf dem Agarosegel die Beurteilung der Ergebnisse entscheidend erschweren können. Mit Hilfe der „Nested PCR“ lassen sich diese unspezifischen Produkte reduzieren.

Hierbei werden in einer zweiten PCR hauptsächlich die spezifischen Amplifikate nochmals vervielfältigt, indem neue Primer so ausgewählt werden, daß eine kürzere Sequenz innerhalb der erwarteten PCR-Produkte erneut amplifiziert wird (4,43,110).

3. Material und Methoden

Protokoll für die interne PCR:

Reaktionsgemisch:

1 ml	PCR Produkt aus der externen PCR
5 ml	10 × PCR-Puffer
0,3 ml	dNTP-Mix
0,4 ml	Taq-Polymerase (5 U/ml)
4 pMol	H 12/13 int upstream Primer
4 pMol	H 12/13 int downstream Primer

ad 50 ml H₂O dest.

(mit 20 ml Mineralöl überschichtet)

Zyklen:

Zyklus 1	2 min	94 °C
	1 min	60 °C
	1 min 15s	74 °C
Zyklus 2-24	1 min	94 °C
	1 min	60 °C
	1 min 15s	74 °C
	Extensionszeit 3s	
Zyklus 25	1 min	94 °C
	1 min	60 °C
	7 min	74 °C

Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgte die Zugabe von DNA erst nach allen anderen Chemikalien. Die PCR-Produkte der externen PCR waren 156 bp lang, die Amplifikate der internen PCR 102 bp. Durch eine anschließende elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel konnten die Amplifikate in der erwarteten Höhe ausreichend spezifiziert werden.

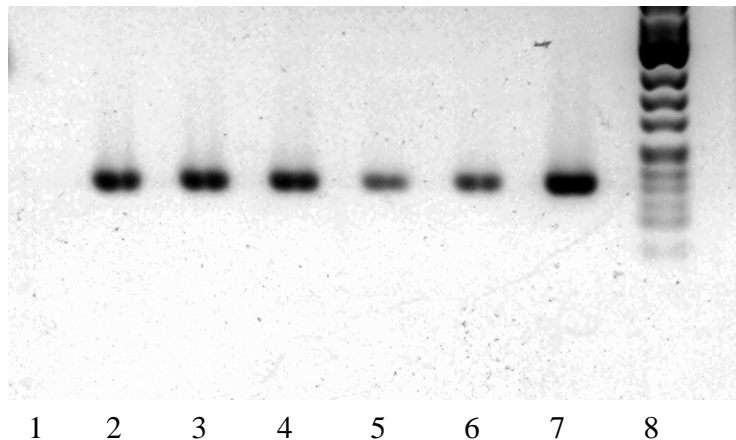


Abbildung 1: *H 12/13 ext/int PCR* (Spur 1: Negativkontrolle, Spuren 2-7: positive Proben (102bp), Spur 8: Marker ϕ X 174 *Hinf I*)

3.2.4.2 Kombination aus „Nested PCR“ und „Touch Down PCR“

Diese Methode wurde zum Nachweis der HCMV-DNA durch Amplifikation der Nukleotidsequenzen, die

- a) für das HCMV-„major immediate early“-Antigen (HCMV-MIEA)
- b) für das HCMV- „major late“-Antigen (HCMV-MLA)

kodieren, benutzt.

Anhand der publizierten Sequenzen des „major immediate early“-Antigens (3,136) und des „major late“-Antigens gp 64 (105) wurden folgende 4 Primerpaare für eine „nested PCR“ ausgewählt.

1.) HCMV-MIEA:

Externe PCR:

CEEXT 1: 5'Oligonukleotid Primer:	5' CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC 3'
	(Nucleotidposition 1306-1326)
CEEXT 2: 3'Oligonukleotid Primer:	5' CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC 3'
	(Nucleotidposition 1468-1448)

3. Material und Methoden

Interne PCR:

ceint 1: 5'Oligonukleotid Primer: 5' TCT GAT TCT CTG GTG TCA CC 3'
(Nucleotidposition 1327-1347)

ceint 2: 3'Oligonukleotid Primer: 5' TCC TCC TCT TCC TCA TCA CT 3'
(Nucleotidposition 1447-1427)

2.) HCMV-MLA:

Externe PCR:

Primer 7: 5'Oligonukleotid Primer: 5' AAC CTG GTG CCC ATG GTG GTG GCT A 3'
(Nucleotidposition 7655-7677)

Primer 8: 3'Oligonukleotid Primer: 5' TTT GGG TTG CGC AGC GGG CTG 3'
(Nucleotidposition 7787-7766)

Interne PCR:

Primer 9: 5'Oligonukleotid Primer: 5' CGG TTC AGG GTC AGA ATC TG 3'
(Nucleotidposition 7678-7698)

Primer 10: 3'Oligonukleotid Primer: 5' CCA TAC GCC TTC CAA TTC GG 3'
(Nucleotidposition 7766-7746)

Bei der Synthese der Oligonukleotid Primer wurden die Sequenzen der Primer so gewählt, daß die optimale „Annealingtemperatur“ der jeweiligen Primerpaare nahezu identisch ist. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß die 3' Enden der Primer diskordant sind, um die Bildung von „primer dimern“ zu verhindern.

3. Material und Methoden

Protokoll für die externe PCR:

5 ml	DNA-Extrakt
5 ml	10×PCR Puffer, 1,5 mM MgCl ₂ (Perkin Elmer)
0,3 ml	dNTP-Mix
0,13 ml	je Primer CEEEXT 1, CEEEXT 2, Primer 7, Primer 8 (je 20 pmol)
0,4 ml	Taq-Polymerase (5 U/ml)

ad 50 ml H₂O dest

(mit 20 ml Mineralöl überschichtet)

Zyklen:

Zyklus 1	4 min	94 °C
	2 min	64 °C
	2 min	72 °C
Zyklus 2-34	1 min	94 °C
	2 min	64 °C
	2 min	72 °C
Zyklus 35	1 min	94 °C
	2 min	64 °C
	5 min	72 °C

Anschließend wurde als interne PCR eine „Touch Down PCR“ durchgeführt.

Die „Touch Down PCR“ ist besonders hilfreich, wenn der Identitätsgrad der Primer zur DNA Sequenz unbekannt ist (122). Dieses Problem taucht auf, wenn die Primer anhand von Aminosäuresequenzen ausgewählt werden, Produkte einer multigenen Familie amplifiziert werden oder wenn homologe Sequenzen zwischen verschiedenen Spezies existieren.

Bei der „Touch Down PCR“ wird systematisch die „Annealingtemperatur“ verändert. Man beginnt mit einer Temperatur, die 10 °C über der berechneten „Annealingtemperatur“ liegt. Hierbei lagern sich die Primer an die DNA-Abschnitte mit der größten Komplementarität an. Anschließend wird bei jedem Schritt die Temperatur um 0,5 °C gesenkt. Zum Schluß erfolgen noch 17 Zyklen mit der berechneten „Annealingtemperatur“ (T_m). Auch wenn während dieser

3. Material und Methoden

Schritte die T_m der unspezifischen Amplifikate durchlaufen wird, werden immer die spezifischen Amplifikate bevorzugt vervielfältigt.

Folgendes Protokoll wurde für die interne „Touch Down PCR“ angewandt:

Protokoll der „Touch Down PCR“, interne PCR:

2 ml	PCR Produkt aus externer PCR, 1:100 verdünnt
5 ml	10×PCR Puffer
0,3 ml	dNTP
0,13 ml	je Primer ceint 1, ceint 2, Primer 9, Primer 10 (je 20 pmol)
0,4 ml	Taq-Polymerase

ad 50 ml H₂O dest.

(mit 20 ml Mineralöl überschichten)

Zyklen:

Zyklus 1	5 min	94 °C
	1 min	65 °C
	1 min	72 °C
Zyklus 2-18	1 min	94 °C
	1 min	65 °C (-0,5 °C je Zyklus)
	1 min	72 °C
Zyklus 19-36	1 min	94 °C
	1 min	55 °C
	1 min	72 °C
Zyklus 37	1 min	94 °C
	1 min	55 °C
	5 min	72 °C

3. Material und Methoden

Nach der ersten PCR-Runde beträgt die Anzahl der erwarteten Basenpaare beim HCMV-MIEA 162 bp und beim HCMV-MLA 132 bp. Nach der zweiten Runde ist das amplifizierte Produkt beim HCMV-MIEA 120 bp und beim HCMV-MLA 89 bp lang.

Da bei der Anwendung von beiden Primerpaaren die Sensitivität der PCR besonders aus Paraffinmaterial steigt, wurden immer beide Abschnitte der viralen DNA in einem gemeinsamen PCR-Ansatz (wie in der Arbeit von Wilkens et al. (157) beschrieben) untersucht (Multiplex PCR) (95).

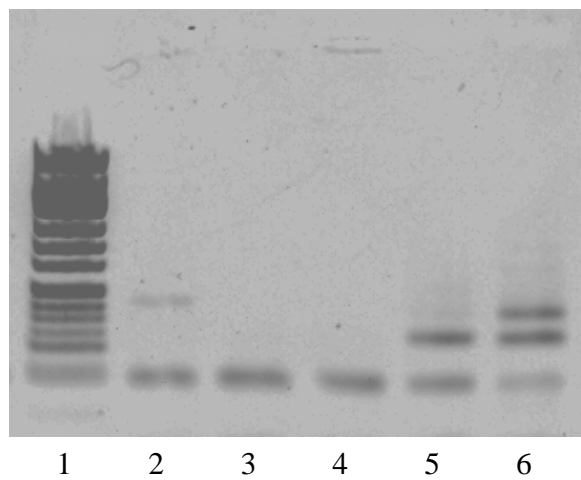


Abbildung 2: Multiplex PCR (Spur 1: Marker ϕ X 174 Hinf I, Spur 2: HCMV-MIEA positiv, Spuren 3 und 4 negativ, Spuren 5 und 6: HCMV-MIEA und HCMV-MLA positiv)

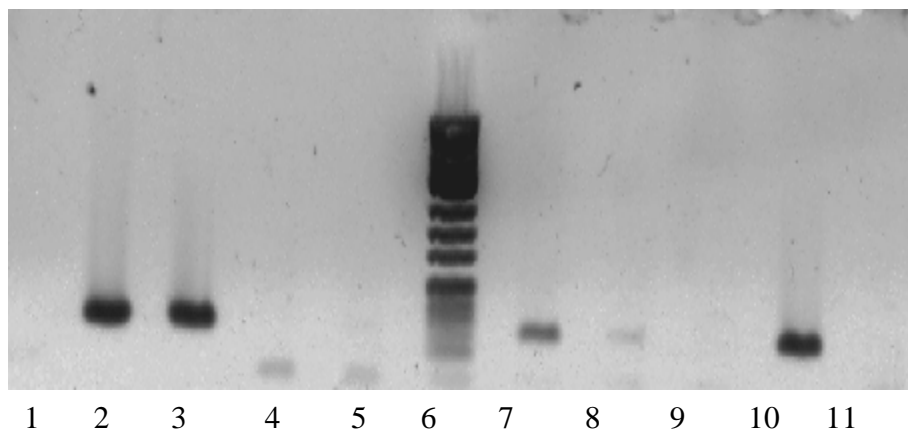


Abbildung 3: Multiplex PCR (Spuren 1,4,5,9,11: HCMV-MIEA und HCMV-MLA negative Proben, Spuren 2,3,7,8,10: HCMV-MLA positive Proben, Spur 6: Marker ϕ X 174 Hinf I)

3. Material und Methoden

Ein positives PCR-Ergebnis lag vor, wenn entweder das HCMV-MIEA oder das HCMV-MLA, oder wenn beide auf dem Agarosegel ein sichtbares Amplifikat zeigten. Semiquantitativ wurden die auf dem Gel sichtbaren Banden eingeteilt in folgende Stärken:

- Stärke 0= keine sichtbare Bande
- Stärke 1= gerade noch sichtbare Bande
- Stärke 2= gut sichtbare Bande
- Stärke 3= sehr gut sichtbare Bande

Als endgültiges positives Ergebnis galten reproduzierbare spezifische Banden (Stärke 1 und größer) auf dem Agarosegel mit anschließender typischer Restriktionsenzymsspaltung (s.u.) oder einer positiven Hybridisierungsreaktion im „Southern Blot“ (vgl. 3.2.8.1). Als endgültiges negatives Ergebnis galten nicht reproduzierbare Banden (schwache oder nicht in der erwarteten Position liegende Banden wurden ein zweites Mal untersucht), Banden außerhalb der erwarteten Position auf dem Agarosegel, eine negative Restriktionsspaltung oder eine negative Hybridisierungsreaktion.

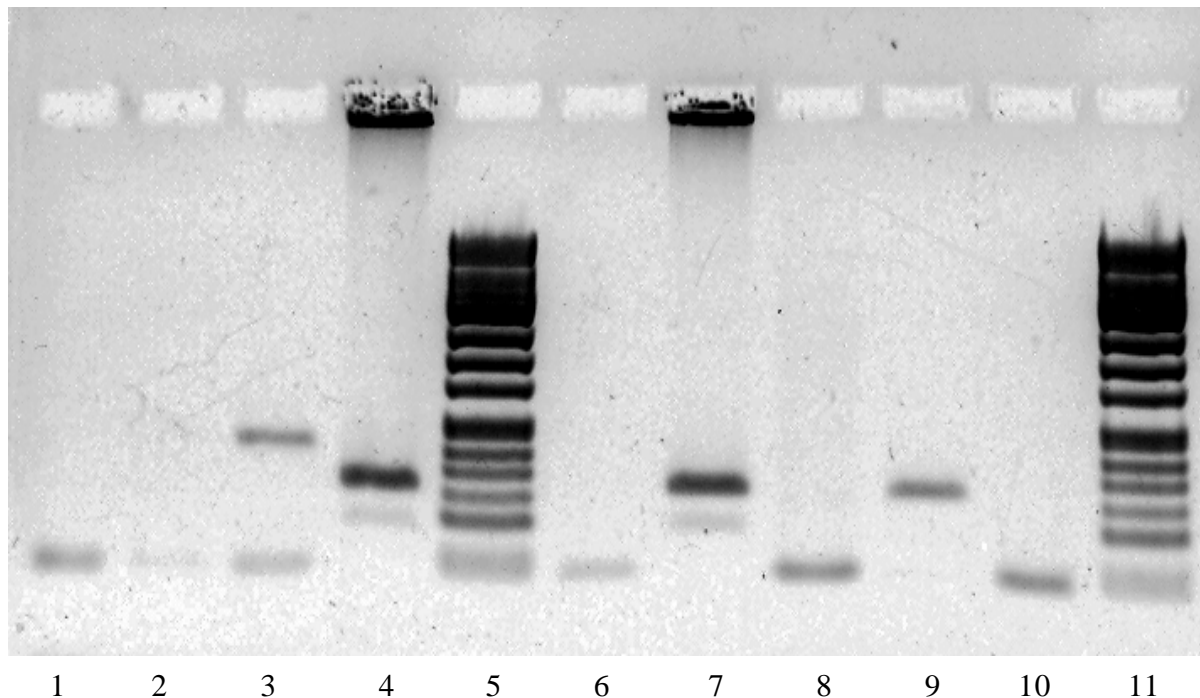


Abbildung 2: Restriktionsspaltung HCMV-MLA positiver Proben mit *ScrFI* (Spuren 1 und 2: negative Proben, Spur 3: unverdaute Probe HCMV-IEA positiv (120bp), Spur 4: verdaute Probe HCMV-MLA (89bp und 60bp), Spur 5: Marker ϕ X 174 Hinf I, Spur 6: negative Probe, Spur 7: verdaute Probe HCMV-MLA (89bp und 60bp), Spur 8: negativ, Spur 9: unverdaute Probe HCMV-MLA positiv (89bp), Spur 10: negativ, Spur 11: Marker ϕ X 174 Hinf I)

3. Material und Methoden

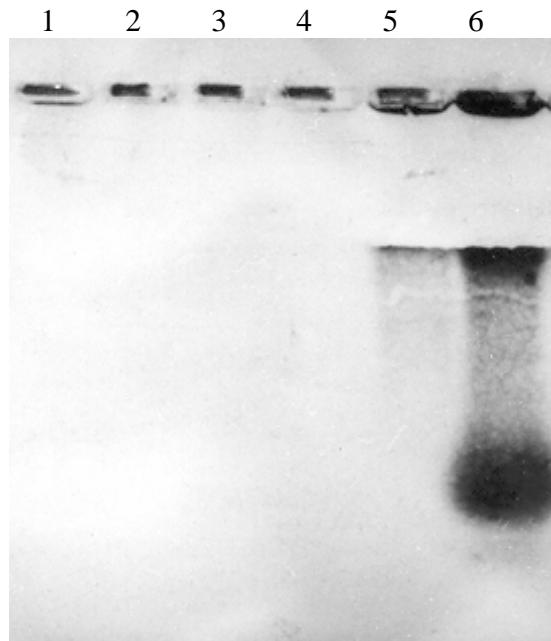


Abbildung 3: Hybridisierung („Southern Blot“) HCMV-IEA (Spur 1: Negativkontrolle, Spuren 2-5: negative Proben, Spur 6: positive Probe)

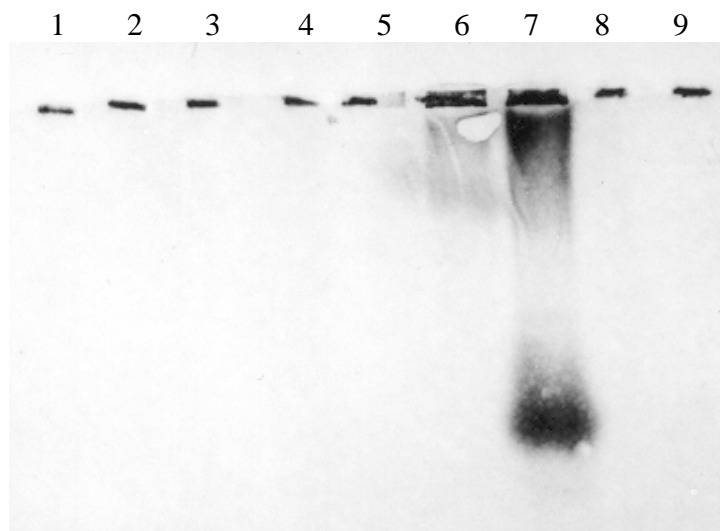


Abbildung 4: Hybridisierung („Southern Blot“) HCMV-LA (Spur 1: Negativkontrolle, Spuren 2-6: negative Proben, Spur 7: positive Probe, Spuren 8 und 9: negative Proben)

3.2.5 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

PCR-Produkte können spezifiziert werden, indem man mit Hilfe von Restriktionsenzymen das erwartete Amplifikat an definierten Stellen schneidet. Hierdurch und durch die anschließende erneute Auftrennung der DNA auf einem Agarosegel können unspezifische von spezifischen Produkten unterschieden werden. Das Enzym Bst U 1 schneidet das 120 bp lange PCR Amplifikat, das für das HCMV-„major immediate early“-Antigen kodiert, in zwei Fragmente von 80 bp und 40 bp. Das PCR-Produkt des HCMV-„major late“-Antigens mit einer Länge von 89 bp läßt sich durch das Restriktionsenzym Scr F 1 in zwei DNA-Abschnitte mit 60 bp und 29 bp teilen.

Spaltung der HCMV-„major late“-Antigen-Amplifikate:

Ansatz: 2 ml 10x Puffer (Sigma)
 1 ml Enzym, Scr F 1 (10 U/ml, Sigma)
 8 ml PCR-Produkt
 ad 20 ml H₂O dest.

Inkubation bei 37 °C über 4 h.

Das Enzym ScrF1 schneidet an folgender Erkennungssequenz:

5` CC/GG 3`

Spaltung der HCMV-„major immediate early“-Antigen-Amplifikate:

Ansatz: 2 ml 10x Puffer (Amersham)
 1 ml Enzym, Bst U 1 (Amersham)
 8 ml PCR-Produkt
 ad 20 ml H₂O dest

Inkubation bei 60 °C über 4 h.

Das Enzym BstU1 schneidet an folgender Erkennungssequenz:

5` CG/CG 3`

3.2.6 Detektion der Amplifikate und der Restriktionsenzymsspaltungsfragmente auf einem Agarosegel

DNA besitzt in wässriger Lösung ein negativ geladenes Zucker-Phosphat-Gerüst, weiterhin ist das Verhältnis von Ladung und Molekülgröße bei Nukleinsäuren konstant. Aufgrund dieser Eigenschaften ist die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld abhängig von der Molekülmasse. Während der Elektrophorese werden die Nukleinsäuren nach diesen Kriterien aufgetrennt.

Herstellung eines Agarosegels:

3% Agarose wurden in $1\times$ TBE durch Kochen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 2 ml Ethidiumbromid hinzupipettiert und das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten wurden 1 ml PCR-DNA mit 4ml Blaumarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V bis zur gewünschten Laufstrecke. Durch das Ethidiumbromid, das sich in die Tertiärstruktur der DNA einlagert, wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar (312 nm).

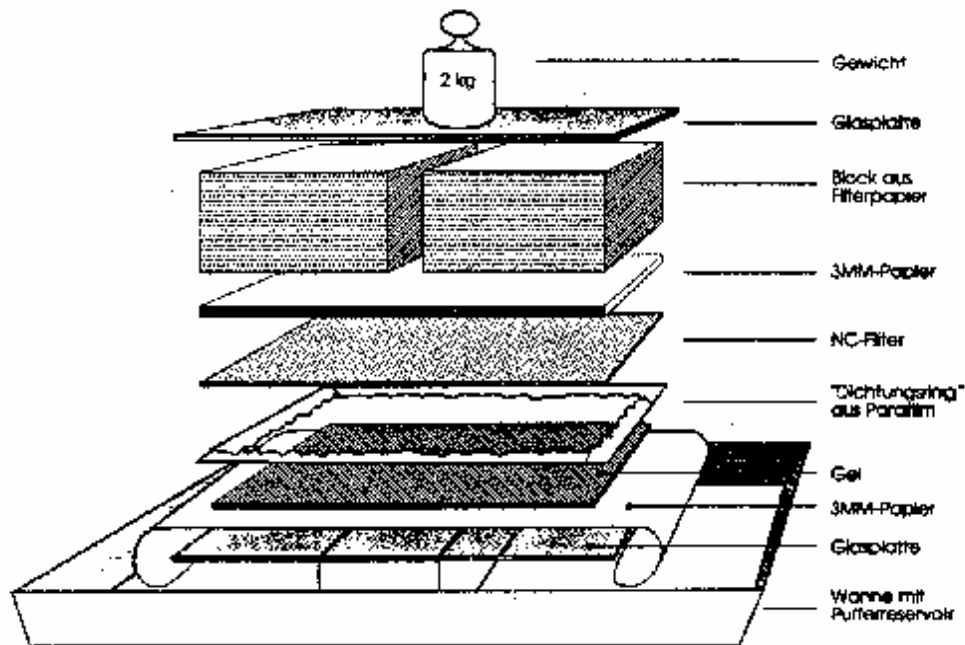
3.2.7 Optimierung der PCR durch Variation der Mg^{2+} Konzentration

Um die optimale Mg^{2+} Konzentration im PCR-Puffersystem herauszufinden, wurden verschiedene PCR-Ansätze mit 1 mM, 1,5 mM, 2 mM und 2,5 mM $MgCl_2$ für eine Positivkontrolle, die 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt wurde, pipettiert. Anschließend wurde die jeweilige Bandenstärke auf einem Agarosegel beurteilt.

3.2.8 Weitere Spezifizierung der PCR-Produkte

3.2.8.1 PCR-Produktanalyse durch „Southern Blot“

Für den „Southern Blot“ wurde zunächst ein Agarose/TAE- Gel durch Kochen von 3% Agarose in $1\times$ TAE hergestellt. Anschließend wurde die DNA in diesem aufgetrennt und durch einen ständigen kapillären Flüssigkeitsstrom durch das Gel auf eine Nylonmembran transferiert, fixiert und schließlich hybridisiert. Dieser Transfer dauerte ca. 12 h und konnte unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das Agarose/TAE-Gel wurde zunächst für 60 min in den Denaturierungspuffer gelegt, anschließend für 30 min in der Neutralisierungslösung inkubiert, dann in $6\times$ SSPE äquilibriert und in folgende Apparatur eingespannt:



Nach ca. 12 h war der Transfer abgeschlossen und die DNA wurde durch Backen bei 80 °C für 2 h auf der Nylonmembran fixiert.

3.2.8.2 Hybridisierung

Die mit DNA beladene Nylonmembran wurde mit 1 ml Hybridisierungslösung / (10 cm² Oberfläche) in Folie eingeschweißt und bei 10 °C (T_m-10°C) für 2 h vorhybridisiert.

Nach dem Ausleeren dieser „Vor“-Hybridisierungslösung wurde jetzt die eigentliche Hybridisierungslösung, die mit 1 ml einer 100 mM Sonde/1 ml Hybridisierungslösung versetzt worden war, in den Beutel gefüllt und für mindestens 18 h bei 10 °C mit der mit DNA beladenen Membran im Wasserbad inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde bei Raumtemperatur zunächst mit 2×SSC, 0,1×SDS, anschließend mit 0,2×SSC, 0,1×SDS bei 10 °C (T_m-10°C) gewaschen.

3.2.8.3 Detektion Digoxigenin-markierter Sonden mittels Farbreaktion

Die mit DNA beladenen, hybridisierten Nylonmembranen wurden nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert:

5 min	Puffer I
30 min	Puffer II
30 min	Schaf Anti-DIG-Alk.-Phosphatase-Antikörperkonjugat in Puffer II, 1:5000
2×15 min	Waschpuffer
2× 5 min	Puffer III
10 min	Puffer IV

Positive Proben sollten deutlich an der Farbreaktion erkennbar sein. Als Negativkontrolle diente der Marker.

3.2.9 Einteilung der Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantationen

Für die Einteilung der Biopsien nach dem Grad der Abstoßungsreaktionen wurde die „IUC-Inter University Classification“ verwendet (72). Sie ist eine revidierte Version der sogenannten „Hannover“-Klassifikation (72).

Folgende Schweregrade der akuten Abstoßungsreaktion werden unterschieden:

A0	keine Abstoßung
A1	minimale akute Abstoßung
A2	leichte akute Abstoßung
A3	mäßige, nicht therapiebedürftige, jedoch kontrollbedürftige akute Abstoßung
A4	mäßige therapiebedürftige akute Abstoßung
A5	schwere akute Abstoßung

Folgende Grade der vaskulären Rejektion werden unterschieden:

V0	keine vaskuläre Abstoßung
V1	leichte vaskuläre Abstoßung
V2	schwere vaskuläre Abstoßung

Bei der chronischen Rejektion gibt es folgende Subtypen:

CH-CT	„common type“
CH-V	vaskulärer Typ
CH-E	endokardialer Typ, mit den Untergruppen: E1, geringer Grad der endokardialen Rejektion E2, mittlerer Grad der endokardialen Rejektion E3, schwerer Grad der endokardialen Rejektion
CH-M	myopathischer Typ
CH-C	kombinierter Typ

3.2.10 Einteilung der Myokarditis nach der Dallas-Klassifikation (7)

Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, müssen mindestens 5 Endomyokardbiopsien unterschiedlicher Lokalisation entnommen werden. Beurteilt werden:

-Herzmuskelveränderungen: Myozytenfragmentation/-nekrosen
Myozytenvakuolisierung
„intrazelluläre“ Entzündungszellen

-Entzündungsinfiltrate: mild, moderat, schwer
fokal, konfluierend, diffus
Einbeziehung des Endokards

-Fibrose: perivaskulär, interstitiell, endokardial
mild, moderat, schwer

Per definitionem darf die Diagnose „Myokarditis“ nur gestellt werden, wenn eine Herzmuskelzellnekrose und/oder -degeneration, assoziiert mit einem entzündlichen Infiltrat, nachgewiesen werden kann.

Bei der ersten Biopsie sind folgende Diagnosen möglich:

- Myokarditis mit oder ohne Fibrose
- „Borderline“ Myokarditis (hierbei ist zwar eine Entzündungszellinfiltration, nicht aber eine direkte Zerstörung oder Degeneration der Myozyten nachweisbar).
- Keine Myokarditis

Bei einer Folgebiopsie sind folgende Diagnosen möglich:

- Anhaltende Myokarditis
- Abheilende Myokarditis
- Abgeheilte Myokarditis

3.2.11 HCMV-assoziierte klinische Symptomatik bei herztransplantierten Patienten

Als eine HCMV-assoziierte klinische Symptomatik (63) nach einer Herztransplantation wurden gewertet:

- Fieber
- Pneumonie
- Hepatosplenomegalie
- Ikterus, Transaminasenanstieg
- Colitis, gastrointestinale Ulcerationen
- Retinitis
- Enzephalitis
- Ösophagitis
- Knochenmarksschädigung
- akute, chronische und vaskuläre Rejektionen nach Herztransplantationen

3.2.12 Die verwendete Software

Die folgende Software wurde bei der Auswertung der Studiendaten und bei der Textverarbeitung verwendet:

Die patientenbezogenen Daten wurden mit der Datenbank dBase IV (Borland) verwaltet. Die statistischen Tests wurden mit der Hilfe des Mathematik-Programms MathCad (MathSoft) programmiert und durchgeführt. Die Texte und die Tabellen wurden mit Hilfe von Word for Windows 2.0 (Microsoft) und die Graphiken mit Hilfe von Excel 5.0 (Microsoft) erstellt.

3.2.13 Statistik

Die Grundlagen der in der Studie verwendeten statistischen Tests stammen aus dem Werk „Grundriß der biologischen Statistik“ von E. Weber, erschienen 1980 im Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.

Folgende statistische Prüfverfahren kamen zur Anwendung:

Bestimmung von Konfidenzintervallen für eine relative Häufigkeit, der exakte Test nach R.A. Fisher zum Prüfen auf Unabhängigkeit und der G-Test zum Prüfen der Unabhängigkeit von zwei Zufallsgrößen. Die jeweils verwendeten Prüfverfahren werden zusammen mit den daraus zu folgernden Ableitungen im unten folgenden Ergebnisteil angegeben.

Die für die Berechnung der statistischen Größen benötigten Tafeln der Chi-Quadrat-Verteilung und die Tafeln der F-Verteilung zur Bestimmung der Konfidenzintervalle stammen aus dem Werk „Tafeln der mathematische Statistik“, von P.H. Müller, P. Neumann und R. Storm, erschienen 1973 im Fachbuchverlag Leipzig.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluß der MgCl₂-Konzentration auf die PCR-Amplifikate

Untersucht wurden die Konzentrationen 1 mM, 1,5 mM und 2 mM von MgCl₂ im PCR Ansatz bei verschiedenen Verdünnungen einer Positivkontrolle (1:10, 1:100, 1:1000). Gut und sehr gut sichtbare Banden (Stärken 2 und 3) erhielt man für alle drei Verdünnungsstufen bei einer MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM.

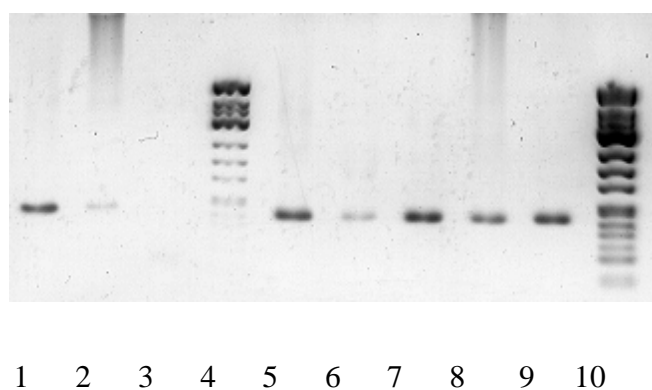


Abbildung 1: Verschiedene MgCl₂-Konzentrationen bei Verdünnungen der Positivkontrollen
(Spur 1: 1:10 mM, Spur 2: 1:100 mM, Spur 3: 1:1000 mM, Spur 4:
Marker ϕ X 174 Hinf I, Spur 5: 1,5:10 mM, Spur 6: 1,5:100 mM,
Spur 7: 1,5:1000 mM, Spur 8: 2:100 mM, Spur 9: 2:1000 mM,
Spur 10: Marker ϕ X 174 Hinf I)

4.2 Spezifizierung der PCR-Amplifikate durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Auch nach Optimierung der PCR Bedingungen waren in einem Teil der Fälle zusätzliche Banden nachweisbar, in der Regel mit höherer Basenpaaranzahl, die eine Interpretation der Ergebnisse erschwerten oder sogar unmöglich machten. Bei insgesamt 18 sehr schwachen Banden (1= gerade sichtbare Bande auf dem Agarosegel) war weder der Verdau des HCMV-MIEA- noch des HCMV-MLA-Amplifikates mit Restriktionsendonukleasen möglich. Da es bei dem Reaktionsansatz zum Restriktionsverdau zu einer weiteren Verdünnung (2:5 Verdünnung) der PCR-Amplifikate kam, war anschließend auf dem Gel keine DNA in der erwarteten Höhe mehr sichtbar. Bei stärkeren Banden auf dem Agarosegel (2= gut sichtbare Bande, oder 3= stark

sichtbare Bande auf dem Gel) ließen sich die PCR Produkte durch eine Restriktionsenzymspaltung in allen Fällen, insgesamt 4 der Bandenstärke 2 und 4 der Stärke 3, leicht spezifizieren.

4.3 Spezifizierung der PCR-Amplifikate mittels „Southern Blot“

Um auch diejenigen Banden weiter zu spezifizieren, die auf dem Agarosegel gerade sichtbar und für die Restriktionsenzymspaltung nicht geeignet waren, wurden diese PCR-Produkte mittels „Southern Blot“-Hybridisierung weiter untersucht. Dabei ließen sich beim HCMV-MIEA 4 der 10 PCR-Produkte, beim HCMV-MLA 2 der 8 Amplifikate als spezifische HCMV-Produkte identifizieren. Somit sind gerade die sehr schwachen Banden auf dem Agarosegel zu 60% bis 75% mit der angewandten Methodik nicht weiter spezifizierbar und dürften in erster Linie unspezifischen PCR-Produkten entsprechen. Diese Proben wurden im Rahmen der weiteren Auswertung als HCMV-negativ gewertet. Die Banden der Stärke 2 ließen sich beim HCMV-MIEA in 6 von 10 Fällen (60%), beim HCMV-MLA bei 8 von 9 Fällen (89%) mittels „Southern Blot“ weiter spezifizieren. Hingegen konnten die Banden der Stärke 3 sowohl beim HCMV-MIEA als auch beim HCMV-MLA zu 100% als spezifische HCMV-DNA-Amplifikate mittels Hybridisierung identifiziert werden. In 6 von 46 Fällen, bei denen sich entweder nur die DNA für das HCMV-MIEA oder nur für das HCMV-MLA nachweisen ließ, konnten mittels Hybridisierung beide PCR-Amplifikate detektiert werden. Somit ließ sich durch eine zusätzliche Hybridisierung auch die Sensitivität des HCMV-Nachweises steigern.

4.4. Prävalenz einer Cytomegalievirus-Infektion in den untersuchten Kollektiven

4.4.1 Prävalenz einer Cytomegalievirus-Infektion in der Kontrollgruppe

Untersucht wurden 15 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 44 ± 20 Jahren (vgl. 3.1.4). Hinsichtlich des Alters und des Geschlechts war die Kontrollgruppe mit der Gruppe der Kardiomyopathie-Patienten und der Gruppe der Myokarditispatienten vergleichbar. Bei keinem der Patienten in der Kontrollgruppe ließ sich HCMV mittels PCR aus dem Endomyokard nachweisen (siehe Abbildung 12, Seite 58). Ein falsch negativer Befund, bedingt durch nicht ausreichend amplifizierbare DNA in dem Paraffinmaterial, wurde zuvor durch eine positive *H-ras-1*-PCR ausgeschlossen.

4.4.2 Herztransplantierte Patienten

4.4.2.1 Kinder

Untersucht wurden insgesamt 23 Kinder mit einem Durchschnittsalter von 7 ± 5 Jahren am Ende des Untersuchungszeitraumes 1998. Bei 21 Kindern ließ sich als Beleg strukturell intakter und ausreichend amplifizierbarer DNA ein typisches *H-ras-1*-Amplifikat gewinnen. Bei 2 der Kinder ließ sich aus dem Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebe keine DNA amplifizieren, so daß diese Proben von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden.

Weiter untersucht wurden letztlich 8 Mädchen und 13 Jungen, die in einem Alter zwischen dem 1. Lebenstag und dem 15. Lebensjahr herztransplantiert wurden. Davon wurden 6 Kinder im Neugeborenenalter, 9 Kinder im Säuglingsalter, 3 im Kleinkindesalter und 3 nach dem 6. Lebensjahr herztransplantiert. Als Untersuchungsmaterial diente jeweils die sogenannte Nullbiopsie (eine Endomyokardbiopsie aus dem Spenderherzen, die noch vor der Reperfusion während der Herztransplantation entnommen wird) bzw. eine Biopsie aus dem Explantat (siehe Tabelle 1). Als Folgebiopsien (n=21) dienten jeweils die letzten vor der PCR-Analyse zur Verfügung stehenden Herzbiopsien. Untersuchungsmaterial der ersten Transplantatbiopsie stand nicht zur Verfügung.

Tabelle 1: Untersuchungsmaterial der herztransplantierten Kinder

Explantat	Null-Biopsie Transplantat	erste Biopsie Transplantat	Folgebiopsie Transplantat
7	14	0	21

11 der kleinen Patienten waren sowohl in der ersten zur Verfügung stehenden Biopsie (8 in der Nullbiopsie, 3 im Explantat) als auch in der letzten Biopsie PCR-HCMV negativ. 10 der 21 Kinder (48%) waren mindestens in einer der untersuchten Biopsien PCR-HCMV positiv und ließen sich zusätzlich durch einen „Southern Blot“ oder einen Restriktionsenzym-spaltung bestätigen (siehe Abbildung 5, Seite 50 und Abbildung 12, Seite 58). Der Nachweis von PCR-HCMV war somit signifikant häufiger in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe (G-Test, $p=0,05$; Fisher-Test, $p=0,01$). Bei 2 der Patienten (ein Neugeborenes und ein Säugling) waren dabei in der Nullbiopsie sowohl das HCMV-MIEA als auch das HCMV-MLA nachweisbar (siehe Tabelle 2, Seite 47), wobei bei einem der Patienten in der Folgebiopsie nur das HCMV-MLA positiv war (Patient 6) und bei dem anderen Patienten HCMV-MIEA und HCMV-MLA

4. Ergebnisse

detektiert werden konnten (Patient 3). Bei 6 der Patienten (2 Neugeborene, 3 Säuglinge und ein Kleinkind) fand eine Konversion hinsichtlich des HCMV-PCR-Status von negativ in der Ausgangsbiopsie (drei Nullbiopsien und drei Explantate) nach positiv in der Folgebiopsie statt (Patienten 2, 4, 5, 8, 9, 10). Dabei fanden sich in drei Fällen in der Folgebiopsie nur das HCMV-MIEA, in zwei Fällen nur das HCMV-MLA und in einem Fall sowohl das HCMV-MIEA als auch das HCMV-MLA.

4 der 6 hinsichtlich des HCMV-PCR-Status konvertierten Kinder verstarben kurze Zeit postoperativ. Bei ihnen waren in zwei Fällen nur HCMV-MLA und in zwei Fällen nur HCMV-MIEA nachweisbar.

Bei einem Neugeborenen fand eine Konversion von HCMV-PCR positiv in der Nullbiopsie nach HCMV-PCR negativ in der Folgebiopsie statt (Patient 1). In diesem Fall ließ sich dabei nur HCMV-MLA nachweisen. Bei einem Kleinkind fand sich HCMV im Explantat, wobei sich sowohl HCMV-MIEA als auch HCMV-MLA nachweisen ließen, jedoch nicht mehr in der Folgebiopsie (Patient 7).

Tabelle 2: HCMV-PCR-Nachweis bei herztransplantierten Kindern

Patient	Nullbiopsie		Explantat		Folgebiopsie	
	HCMV-MIEA	HCMV-MLA	HCMV-MIEA	HCMV-MLA	HCMV-MIEA	HCMV-MLA
1	Negativ	Positiv			Negativ	Negativ
2 verstorben	Negativ	Negativ			Negativ	Positiv
3	Positiv	Positiv			Positiv	Positiv
4	Negativ	Negativ			Positiv	Negativ
5 verstorben	Negativ	Negativ			Positiv	Negativ
6	Positiv	Positiv			Negativ	Positiv
7			Positiv	Positiv	Negativ	Negativ
8 verstorben			Negativ	Negativ	Negativ	Positiv
9 verstorben			Negativ	Negativ	Positiv	Negativ
10			Negativ	Negativ	Positiv	Positiv
11 verstorben	Negativ	Negativ			Negativ	Negativ
12-18	Negativ	Negativ			Negativ	Negativ
19-21			Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

4.4.2.2 Erwachsene

Untersucht wurden die Nullbiopsie, die Explantate oder die erste zur Verfügung stehende Biopsie und jeweils eine Folgebiopsie der 18 herztransplantierten Erwachsenen, die in einem Alter zwischen 33 Jahren und 59 Jahren herztransplantiert wurden (siehe Tabelle 3). Das Durchschnittsalter am Ende des Untersuchungszeitraumes 1998 betrug 58 ± 8 Jahre.

Tabelle 3: Untersuchungsmaterial der herztransplantierten Erwachsenen

Explantat	Null-Biopsie Transplantat	erste Biopsie Transplantat	Folgebiopsien Transplantat
4	10	4	18

Bei 8 der 18 Patienten (44%) war im Verlauf mindestens einmal HCMV in einer Herzbiopsie mittels PCR nachweisbar (siehe Abbildung 5, Seite 50). 10 der Patienten waren sowohl in der ersten zur Verfügung stehenden Biopsie (4 im Explantat, 4 in der ersten Biopsie und 2 in der Null-Biopsie) als auch in der letzten Biopsie negativ.

Von diesen 8 HCMV-positiven Patienten (siehe Tabelle 4, Seite 49) war

-bei einem Patienten (Patient 1) in der Nullbiopsie und in der Folgebiopsie HCMV nachweisbar (nur HCMV-MIEA positiv).

-bei 6 Patienten in der Nullbiopsie HCMV nicht, aber in der Folgebiopsie nachweisbar (ein Patient (Patient 2) nur HCMV-MIEA positiv, 5 Patienten (Patienten 3,4,5,6,7) HCMV-MIEA und HCMV-MLA positiv).

-bei einem Patienten (Patient 8) HCMV in der Nullbiopsie, aber nicht in der Folgebiopsie nachweisbar (HCMV-MIEA und HCMV-MLA positiv).

Ebenso wie in der Gruppe der herztransplantierten Kinder war hier der Nachweis von HCMV signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (G-Test, $p=0,05$).

4. Ergebnisse

Tabelle 4: HCMV-PCR-Nachweis bei herztransplantierten Erwachsenen

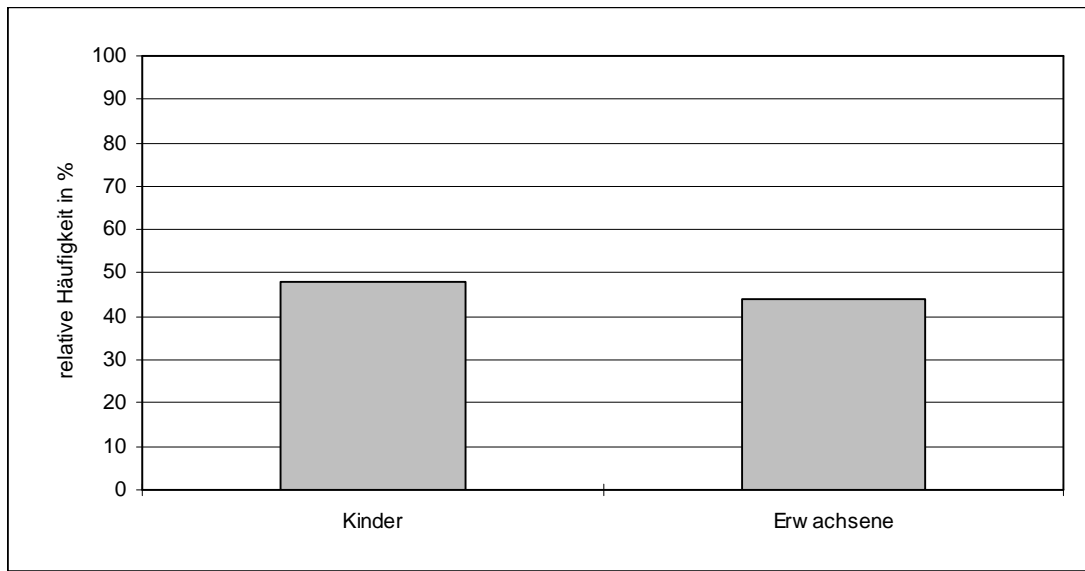
Patient	Nullbiopsie		Folgebiopsie	
	HCMV-MIEA	HCMV-MLA	HCMV-MIEA	HCMV-MLA
1	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
2	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ
3	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv
4	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv
5	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv
6	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv
7 verstorben	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv
8	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ
9	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
10	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

Patient	Explantat		Folgebiopsie	
	HCMV-MIEA	HCMV-MLA	HCMV-MIEA	HCMV-MLA
11-14	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

Patient	1.Biopsie		Folgebiopsie	
	HCMV-MIEA	HCMV-MLA	HCMV-MIEA	HCMV-MLA
15-18	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ

4.4.2.3 Cytomegalievirus-Nachweis bei herztransplantierten Patienten:
Vergleich zwischen Erwachsenen und Kindern

Abbildung 5: HCMV-Nachweis mittels PCR



Von den insgesamt 18 HCMV-PCR-positiven Kindern (n=10) und Erwachsenen (n=8) ließen sich somit in 5 Fällen ausschließlich das HCMV-MIEA, in 3 Fällen ausschließlich das HCMV-MLA und in 10 Fällen beide DNA-Abschnitte nachweisen (s. Abbildung 12, Seite 58).

Im Folgenden bezieht sich die Auswertung des Merkmals „HCMV-PCR-positiv“ sowohl auf die Patienten mit ausschließlicher HCMV-MIEA-Positivität, mit ausschließlicher HCMV-MLA-Positivität und auf Patienten, die sowohl HCMV-MIEA- als auch HCMV-MLA-positiv waren.

4.4.2.4 Mortalität nach einer Herztransplantation in Abhängigkeit vom Cytomegalievirus-PCR-Status in der Nullbiopsie und in der letzten Biopsie

Von den insgesamt 39 herztransplantierten Kindern und Erwachsenen waren 15 in der letzten zur Verfügung stehenden Biopsie HCMV-PCR-positiv. Von diesen 15 Patienten sind 5 post transplantationem verstorben. Hingegen ist von den 24 in der letzten Biopsie HCMV-PCR-negativen Transplantierten bislang nur einer verstorben (siehe Abbildung 6, Seite 52). Nach dem Fisher-Test besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen Mortalität und HCMV-PCR-Status in der letzten Biopsie ($p=0,02$).

Betrachtet man die Untergruppe der herztransplantierten Erwachsenen gesondert, so läßt sich aufgrund der geringen Mortalität von 5,6 % keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Mortalität und HCMV-Nachweis aus der letzten Endomyokardbiopsie prä mortem herstellen, auch wenn der einzige verstorbene Patient von HCMV-PCR-negativ in der Nullbiopsie zu HCMV-PCR-positiv in der letzten Biopsie konvertiert ist.

Untersucht man nur die Patientengruppe der herztransplantierten Kinder, so zeigt sich bei einer Gesamtmortalität von 24% bei den in der letzten Biopsie prä mortem HCMV-PCR-positiven Kindern sowohl im Fisher-Test ($p=0,05$) als auch im G-Test ($p=0,05$) eine signifikant höhere Mortalität im Vergleich zu den HCMV-PCR-negativen Kindern.

Der HCMV-PCR-Status in der Nullbiopsie stand hingegen in keinem Zusammenhang mit der Mortalität post transplantationem: Bei 24 der insgesamt 39 herztransplantierten Kindern und Erwachsenen stand eine Nullbiopsie zur Verfügung. Von den 19 hierbei HCMV-PCR-negativen Patienten in der Nullbiopsie verstarben 4, wohingegen von den 5 HCMV-PCR-positiven Transplantierten bislang keiner verstorben ist. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Fisher-Test, $p=0,36$). (Abbildung 7, Seite 52).

Es standen insgesamt 11 Explantate zur Verfügung. Von den im Explantat 10 HCMV-PCR-negativen Patienten sind zwei verstorben, wohingegen 1 im Explantat HCMV-PCR-positiver Patient lebt. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Fisher-Test, $p=0,8$).

4. Ergebnisse

Abbildung 6: Mortalität der Erwachsenen und Kinder nach einer Herztransplantation in Abhängigkeit vom HCMV-PCR-Status in der letzten zur Verfügung stehenden Endomyokardbiopsie

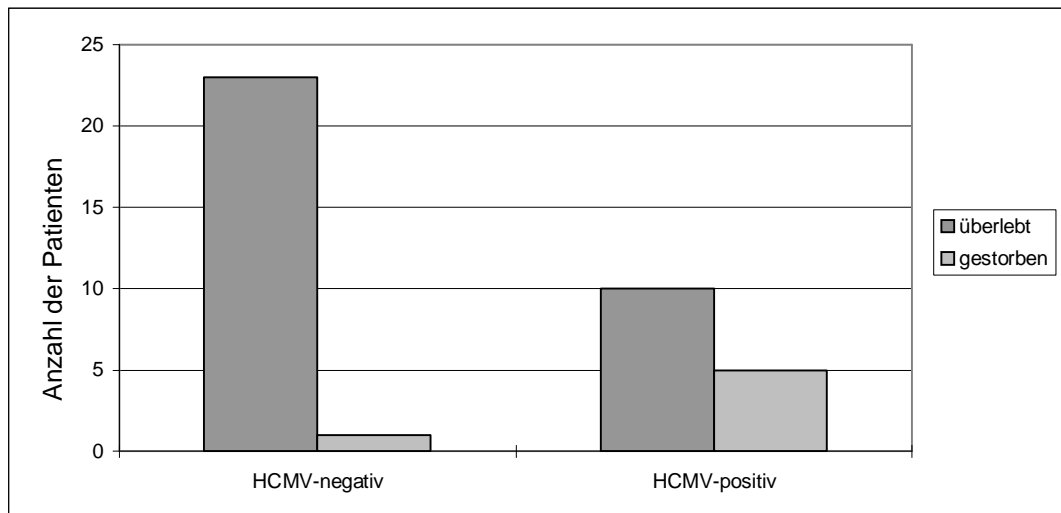
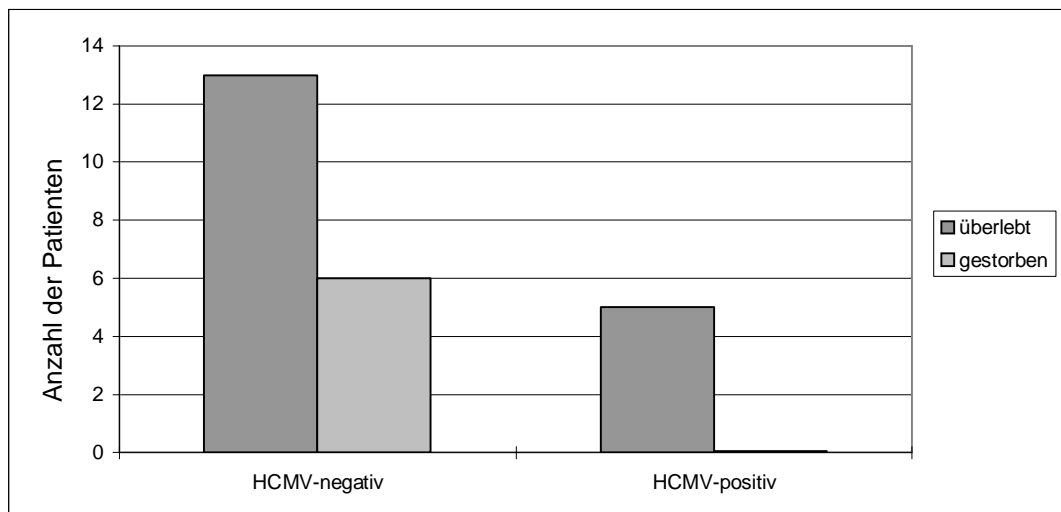


Abbildung 7: Mortalität der Erwachsenen und Kinder nach einer Herztransplantation in Abhängigkeit vom HCMV-PCR-Status in der Nullbiopsie



4.4.3 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM)

Untersucht wurden insgesamt 26 Patienten mit der Diagnose „dilatative Kardiomyopathie“, die ein Durchschnittsalter von 50 ± 20 Jahren aufwiesen (Alter zwischen 9 und 89 Jahren).

Bei 2 der 26 (7,7%) Patienten konnte HCMV mittels PCR aus Endomyokardbiopsien nachgewiesen und gleichzeitig mit Restriktionsenzymspaltung oder Hybridisierung verifiziert werden. In beiden Fällen ließen sich nur das MIEA nachweisen. MLA war nicht nachweisbar (siehe Abbildung 12, Seite 58). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die HCMV-Prävalenz bei den Patienten mit DCM statistisch nicht höher (G-Test, Fisher-Test).

4.4.3.1 Patienten mit DCM und Fibrose

22 der 26 Kardiomyopathie-Patienten hatten eine diffuse oder fokale Fibrose, 4 Patienten hatten keine Fibrose. Bei 2 der 22 Patienten (9.1%) mit Fibrose ließ sich HCMV nachweisen, während die Patienten ohne Fibrose alle HCMV-negativ waren (siehe Tabelle 5), ein signifikanter Unterschied ließ sich weder im Fisher- noch im G-Test nachweisen.

Die histologischen Bilder einer DCM mit Fibrose bzw. ohne Fibrose zeigen die Abbildungen 8 und 9, Seite 54.

Tabelle 5: HCMV-Nachweis bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie mit und ohne Fibrose

	DCM mit Fibrose	DCM ohne Fibrose
HCMV-positiv	2	0
HCMV-negativ	20	4

Abbildung 8: DCM mit Fibrose

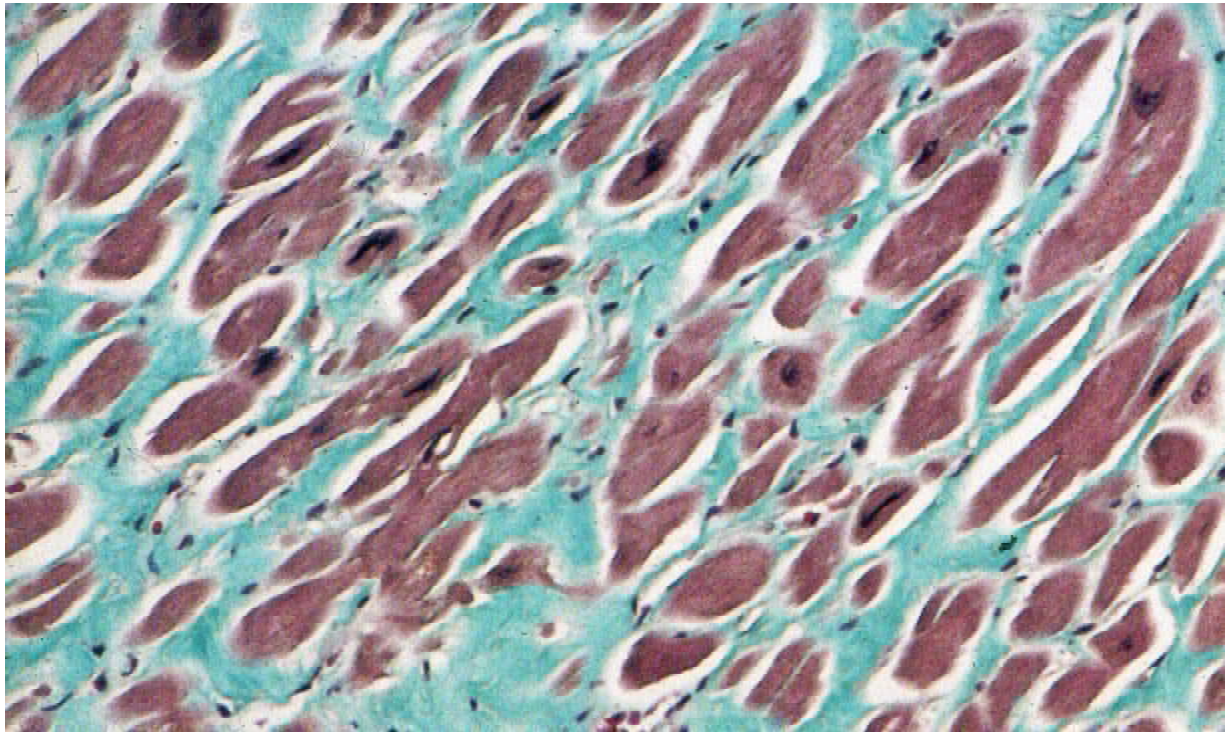
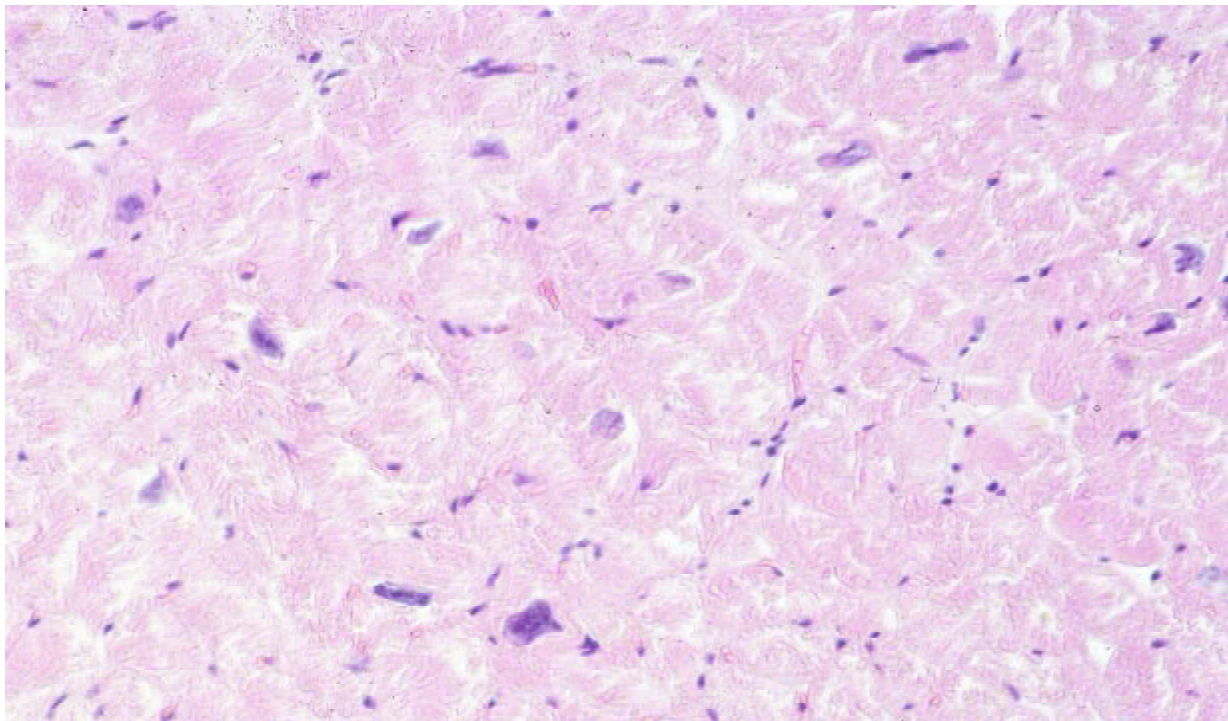


Abbildung 9: DCM ohne Fibrose



4.4.3.2 Patienten mit DCM und histologischem Nachweis von Entzündungszellen

Bei 5 der 26 Patienten mit DCM ließen sich histologisch im Interstitium fokal wenige Lymphozyten nachweisen, bei 21 Patienten mit DCM hingegen nicht. Kriterien einer Myokarditis lagen nicht vor.

HCMV ließ sich bei 2 dieser 21 Patienten mit DCM ohne Entzündungszellen nachweisen (9.5%), jedoch bei keinem Patienten mit DCM und Entzündungszellen (s. Tabelle 6).

Insgesamt waren die Merkmale „Nachweisbarkeit von Entzündungszellen“ und „HCMV-Nachweis“ statistisch voneinander unabhängig (G-Test, Fisher-Test).

Tabelle 6: HCMV-PCR-Nachweis bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie mit und ohne histologisch nachweisbaren Entzündungszellen

	DCM mit Entzündungszelle n	DCM ohne Entzündungszellen
HCMV- positiv	0	2
HCMV- negativ	5	19

4.4.4 Patienten mit Myokarditis oder Borderline-Myokarditis

Untersucht wurden 23 Patienten mit histologisch gesicherter Myokarditis oder Borderline-Myokarditis in einem durchschnittlichen Alter von 44 ± 27 Jahren (Alter zwischen 1 und 84 Jahren). Bei 3 der 23 (13%) Patienten ließ sich mittels PCR aus Endomyokardbiopsien HCMV nachweisen und mittels anschließender Hybridisierung oder mittels Restriktionsenzymspaltung auch spezifizieren. Dabei handelte es sich in einem Fall um HCMV-MIEA-DNA und in den beiden anderen Fällen um HCMV-MLA-DNA. DNA beider Antigene ließ sich nicht gleichzeitig nachweisen. 4 weitere Patienten waren in der PCR schwach positiv (Bandenstärke 1), aber die Amplifikate ließen sich weder mit Restriktionsenzymspaltung noch mittels Hybridisierung verifizieren. Daher gelten diese Proben als HCMV-negativ.

4. Ergebnisse

10 der 23 Patienten hatten eine floride Myokarditis. 3 dieser Patienten waren HCMV-positiv (30%). Von diesen drei HCMV-positiven Patienten hatten zwei in der Histologie ein lymphozytäres Infiltrat und ein Patient ein gemischtzelliges Infiltrat.

Die restlichen 13 Patienten dieses Kollektivs hatten eine Borderline-Myokarditis. Bei diesen Patienten ließ sich HCMV mittels PCR nicht nachweisen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: HCMV-PCR-Nachweis bei Patienten mit einer Myokarditis, Borderline- Myokarditis und in der Kontrollgruppe

	Myokarditis	Borderline-Myokarditis	Kontrollgruppe
HCMV-positiv	3	0	0
HCMV-negativ	7	13	15

Vergleicht man die HCMV-Prävalenz bei den Borderline- und Myokarditispatienten mit der in der Kontrollgruppe, so läßt sich zunächst kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen. Betrachtet man jedoch die Untergruppe der Patienten mit Myokarditis gesondert, so ist der Unterschied zur Kontrollgruppe signifikant (G-Test, $p=0,05$). Beim Vergleich der Patientengruppe mit Myokarditis mit der Borderline-Myokarditis-Gruppe läßt sich ebenfalls eine signifikant höhere HCMV-Prävalenz darstellen (G-Test, $p=0,05$).

Typische histologische Bilder einer Myokarditis bzw. einer Borderline-Myokarditis zeigen die Abbildungen 10 und 11, Seite 57.

4. Ergebnisse

Abbildung 10: Myokarditis

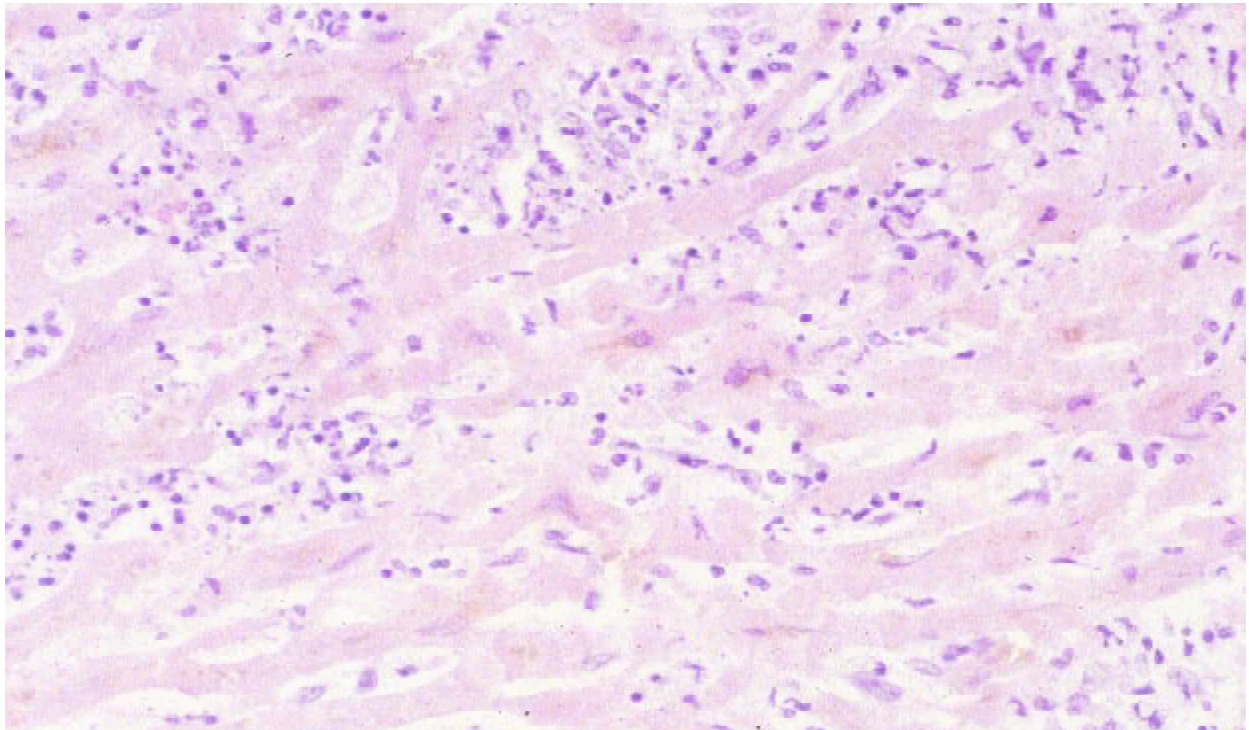


Abbildung 11: Borderline-Myokarditis

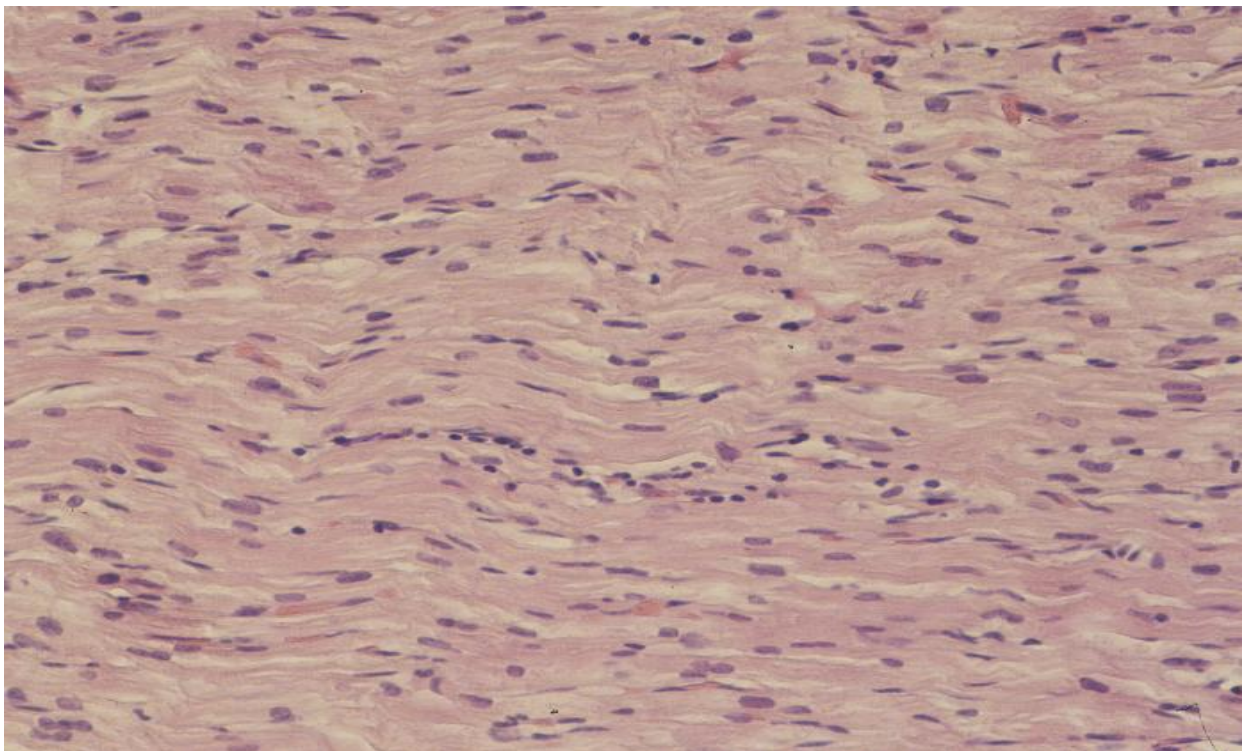
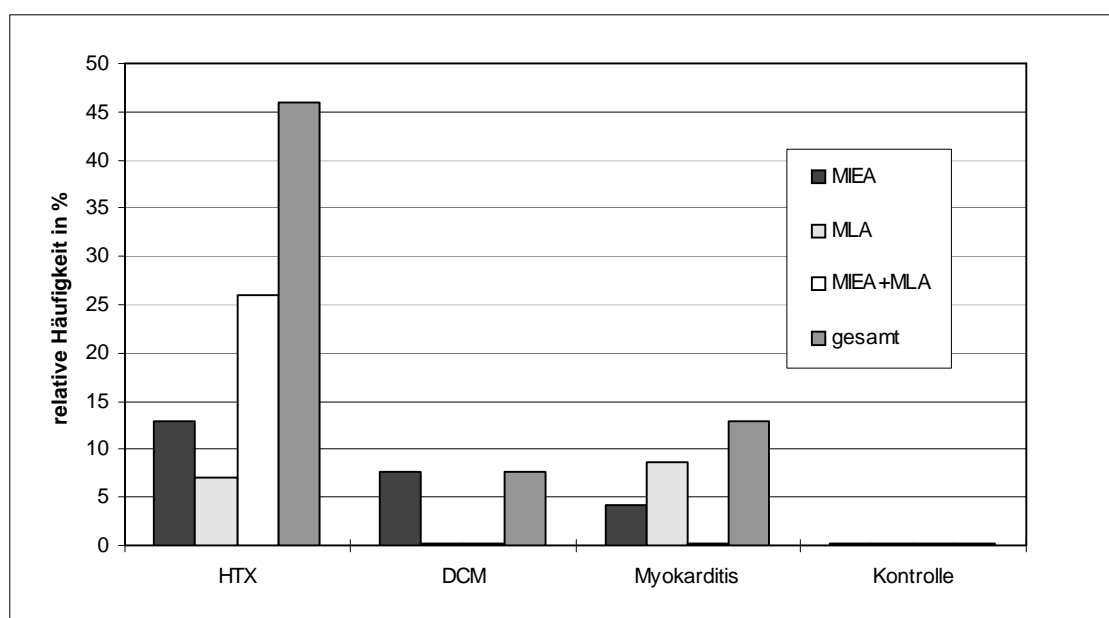


Abbildung 12: HCMV-DNA im Herzmuskelgewebe bei herztransplantierten Patienten (HTX), bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und bei Patienten mit einer Myokarditis im Vergleich zum Kontrollkollektiv

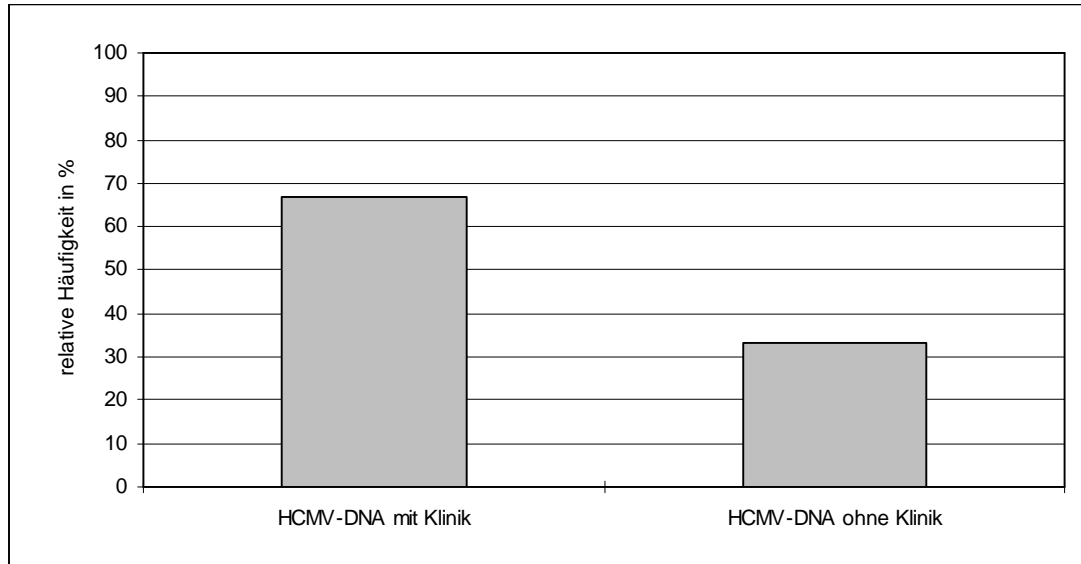


4.5. Assoziation zwischen Cytomegalievirus-PCR-Resultaten und einer cytomegalievirus-artigen klinischen Symptomatik bei herztransplantierten Patienten

Von den insgesamt 18 HCMV-PCR-positiven herztransplantierten Kindern und Erwachsenen war bei 6 (33%) der Patienten keinerlei klinische HCMV-assoziierte Symptomatik eruiert, 12 (67%) der 18 HCMV-positiven Patienten boten eine möglicherweise durch HCMV hervorgerufene Symptomatik (siehe Abbildung 13, Seite 59 und Tabelle 8, Seite 60). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

4. Ergebnisse

Abbildung 13: HCMV-Nachweis mittels PCR bei herztransplantierten Patienten und Auftreten einer HCMV-assoziierten klinischen Symptomatik



Vier dieser 12 Patienten verstarben kurze Zeit postoperativ. Bei allen 4 dieser verstorbenen Patienten fand eine Konversion hinsichtlich des HCMV-Status statt. Todesursachen waren hierbei bei 2 Patienten ein Rechtsherzversagen bei wahrscheinlich bereits präoperativ bestehender asymptomatischer Pneumonie sowie bei 2 weiteren Patienten eine akute vaskuläre Rejektion.

Einer der 12 klinisch symptomatischen Patienten erlitt eine fokale chronische Myokarditis, 1 Patient eine HCMV-Pneumonie, 1 Patient hatte einen plötzlichen Transaminasenanstieg, 1 Patient erlitt eine Myelopathie, 4 Patienten hatten im Verlauf eine akute humorale Abstoßungsreaktion (siehe Tabelle 8, Seite 60).

Tabelle 8: Mögliche HCMV-assoziierte klinische Symptomatik der herztransplantierten Patienten

Klinik	Anzahl der Patienten
fokale chronische Myokarditis	1
HCMV-Pneumonie	1
Transaminasenanstieg	1
Myelopathie, Fieber	1
Rejektion im Verlauf nach HTX	4
-davon:	
--A3R1V0CHE0	--1
--A4-5V2E2R2	--1
--A0V1CH0	--1
--A1V0E0	--1
Tod	4
-Todesursache:	
--Pneumonie/Rechtsherzversagen	--2
--Transplantatvaskulopathie	--2

4.6 Vergleich der Cytomegalievirus-PCR mit der Cytomegalievirus-Serologie

Insgesamt wurden 72 Herzmuskelbiopsien von 39 Herztransplantierten mittels PCR aus Herzmuskelgewebe untersucht und retrospektiv mit der Serologie dieser Patienten, welche routinemäßig während der einzelnen stationären Aufenthalte durch das Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde, verglichen. Bei 45 der 72 Ergebnisse (62.5%) stimmten die Serologie und die PCR-Ergebnisse aus den Endomyokardbiopsien überein. Von den restlichen 27 Ergebnissen waren 15 in der PCR positiv und in der Serologie negativ, 12 in der Serologie positiv aber in der PCR negativ (siehe Tabelle 9, Seite 61).

Nach dem Fisher-Test sind die Ergebnisse der PCR aus Endomyokardbiopsien nicht mit den Ergebnissen der Serologie korreliert.

Tabelle 9: Vergleich der HCMV-PCR aus Herzmuskelgewebe mit der HCMV-Serologie

	HCMV-Serologie- positiv	HCMV-Serologie- negativ
HCMV-PCR positiv	4	15
HCMV-PCR negativ	12	41

4.7 Assoziation von Cytomegalievirus-PCR-Ergebnissen mit dem histologischen Rejektionstyp

4.7.1. Vaskuläre Rejektion

Insgesamt wurden 40 Biopsien von 39 herztransplantierten Patienten histologisch untersucht und nach dem Grad der Abstoßungsreaktion nach der IUC-Klassifikation eingeteilt. 29 der untersuchten Biopsien hatten keine vaskuläre Abstoßungsreaktion (V0), 7 eine Abstoßungsreaktion vom Grad V1 und 4 der Biopsien eine Abstoßungsreaktion vom Grad V2. Von den V0-Biopsien waren 7 HCMV-positiv (24%). 6 der 11 Patienten mit einer vaskulären Abstoßungsreaktion waren HCMV-positiv (55%) (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: HCMV-PCR-Status und vaskuläre Rejektion

Abstoßungsgrad	HCMV-positiv	HCMV-negativ
V0	7	22
V1	3	4
V2	3	1

Vergleicht man die Prävalenz von HCMV in der Gruppe V0 mit der in der Gruppe V1 und größer, so läßt sich ein starker Hinweis (Fisher-Test, Irrtumswahrscheinlichkeit 7,5%) bezüglich einer Assoziation zwischen einer vaskulären Abstoßungsreaktion und dem Nachweis von HCMV erkennen.

4.7.2 Zelluläre interstitielle Rejektion

Insgesamt wurden 40 Herzmuskelbiopsien von 39 herztransplantierten Patienten histologisch untersucht und nach der IUC-Klassifikation eingeteilt. 15 der 40 Biopsien hatten eine Abstoßungsreaktion vom Grad A0, ebenfalls 15 eine Abstoßungsreaktion vom Grad A1, 5 vom Grad A2, 4 vom Grad A3 und 1 vom Grad A4. Bei 10 der 35 Biopsien vom Abstoßungsgrad A0-A2 (29%) ließ sich HCMV nachweisen, bei 25 von 35 (71%) nicht (siehe Tabelle 11). Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Auch bei einer Zusammenfassung der nicht therapiebedürftigen Rejektionsgrade A0, A1, A2 und einem Vergleich mit dem HCMV-PCR-Status des kontrollbedürftigen Rejektionsgrades A3 bzw. mit dem HCMV-PCR-Status der therapiebedürftigen Rejektionsgrade A4, A5 ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Tabelle 11: HCMV-PCR-Status und interstitielle Rejektion

Abstoßungsgrad	HCMV-positiv	HCMV-negativ
A0	6	9
A1	4	11
A2	0	5
A3	1	3
A4	1	0
A5	0	0

4.7.3 Chronische endokardiale Rejektion

Nach der IUC-Klassifikation hatten 31 der 39 herztransplantierten Patienten einen Abstoßungsgrad E0. 21 (68%) dieser Biopsien waren HCMV-negativ. 4 Patienten hatten einen Abstoßungsgrad E1, 4 einen Abstoßungsgrad E2 und ein Patient einen Abstoßungsgrad E3. 4 der Patienten mit einem Abstoßungsgrad von E1 und größer waren HCMV-positiv (44%)(siehe Tabelle 12). Statistisch gesehen bestand keine Korrelation des Rejektionsgrades endokardialer Art zur Prävalenz von HCMV bei herztransplantierten Patienten.

Tabelle 12: HCMV-PCR-Status und endokardiale Rejektion

Abstoßungsgrad	HCMV-positiv	HCMV-negativ
E0	10	21
E1	1	3
E2	2	2
E3	1	0

4.8 Assoziation einer Cytomegalievirus-positiven Endomyokardbiopsie mit der Entwicklung einer Vaskulopathie der großen Koronararterienäste

31 der herztransplantierten Patienten wurden mindestens einmal koronarangiographiert.

Von diesen waren 5 HCMV-positiv und hatten eine angiographisch oder endosonographisch gesicherte Transplantatvaskulopathie.

6 Patienten hatten eine Vaskulopathie, aber waren HCMV-negativ.

8 Patienten waren HCMV-positiv, aber hatten keine Vaskulopathie.

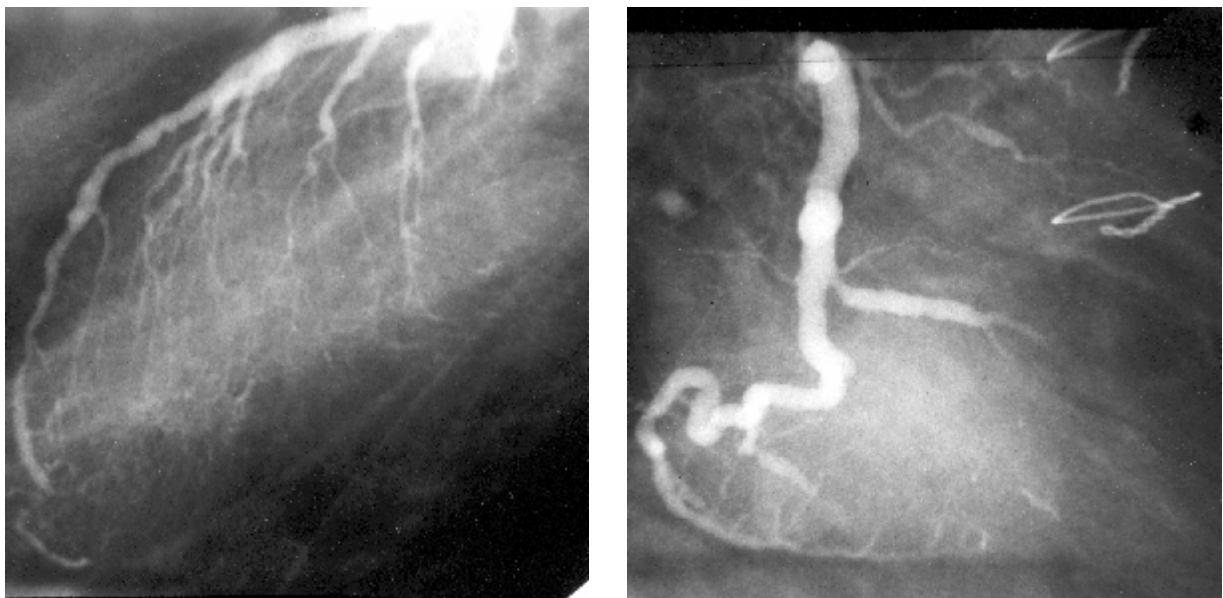
12 Patienten hatten weder eine Vaskulopathie noch waren sie HCMV-positiv.

Statistisch läßt sich zwischen der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie der großen Koronararterienäste und einem HCMV-Nachweis kein Zusammenhang erkennen (siehe Tabelle 13, Seite 64).

Tabelle 13: HCMV-PCR-Status und Transplantatvaskulopathie

	HCMV-positiv	HCMV-negativ
Vaskulopathie	5	6
keine Vaskulopathie	8	12

Abbildung 14: Typische koronarangiographische Veränderungen bei Transplantatvaskulopathie



Hier erkennbar sind

- Veränderungen der mittelgroßen intramyokardialen Gefäße (13)
- tubuläre segmentale Läsionen (13)
- das „concentric narrowing“ (104)

5. Diskussion

5.1 Methoden des Cytomegalievirus-Nachweises

Vergleicht man die Zellkultur, die „*in-situ*-Hybridisierung“, die Immunhistochemie, die Histologie, die Gewebekultur, die Serologie und die PCR hinsichtlich des HCMV-Nachweises, so gilt die PCR von allen Methoden als die bei weitem sensitivste (19,23,47,113). Sie hat eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 100% (31). Durch ein zusätzliches Blottingverfahren der PCR-Produkte kann sich die Sensitivität auf 100% erhöhen (31). Jiwa et al. (70) konnten mit einer einfachen PCR HCMV ab fünf Genomkopien pro 10.000 Zellen nachweisen, Cassol et al. (23) ab einem Virusgenom pro 40.000 Zellen. Im Vergleich zur einfachen PCR ist die „Nested PCR“ noch sensitiver. Für ein positives Ergebnis sind nach Brytting et al. (18) nur ein Zehntel des Virusgenoms der einfachen PCR für ein positives Ergebnis mittels „Nested PCR“ notwendig. Vergleichsweise hierzu beträgt die Sensitivität der Viruskultur 17-43%, des „shell vial assay“, einer Kombination aus Viruskultur und Immunfluoreszenz, 21-38% und die Sensitivität bei Kombination beider Methoden 36-46% (107,114,124).

Es besteht eine gute Korrelation der PCR mit der Antigenämie, wobei die PCR in der Regel früher positiv wird (45) als die anderen Nachweisverfahren wie beispielsweise die Kultur und/oder „shell vial assay“ (23,145). Ein Problem der PCR ist die Beurteilung eines Ergebnisses auf dem Agarosegel. Durch die Kontamination mit DNA-Fragmenten, die sich gegenseitig überlappen und „primen“ entsteht ein Hintergrund, der das Ablesen der Ergebnisse erschwert oder sogar unmöglich macht. Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete „Nested PCR“ läßt sich dieses Problem weitgehend (110), wenn auch nicht vollständig lösen. Trotz Optimierung aller Reaktionsbedingungen während der Extraktion und der PCR erschwerten manchmal ein Hintergrund und zusätzliche Banden die Interpretation der PCR-Ergebnisse auf dem Agarosegel. In 25% (HCMV-MLA) bis 40% (HCMV-MIEA) der Banden der Stärke 1 auf dem Agarosegel gelang eine weitere Spezifizierung mittels „Southern Blot“, so daß aus diesem Grunde bei Amplifikaten mit schwachen Banden, und somit unklaren Befunden, eine weitere Spezifizierung durch die Hybridisierung erfolgen sollte.

Weiterhin muß man bei einer PCR aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe darauf achten, daß das erwartete Amplifikat weniger als 250 bp lang ist, da die DNA in Abhängigkeit von der Fixierungsdauer fragmentiert wird und lange DNA-Abschnitte nicht mehr amplifizierbar sind (51,52). Für die in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte wurden aus diesem Grunde Längen von 162 bp und 132 bp für die externe PCR, sowie 120 bp und 89 bp für die interne PCR gewählt. Die Amplifikation kürzerer Sequenzen hingegen wird erst bei einer

Fixierung, die länger als 72 h dauert, beeinflusst (51,121). Da trotzdem immer DNA durch die Fixierung geschädigt wird, ist es sinnvoll zwei Primerpaare, wie hier für das HCMV-MIEA und das HCMV-MLA, für unterschiedliche Zielsequenzen einzusetzen, um nicht falsch negative Ergebnisse zu erhalten.

In der Studie von Wilkens et al. (157) ließ sich unter Einsatz zweier Primerpaare nach einer Fixierungszeit von 24 h in allen 9 Fällen mit klinisch und serologisch gesicherter akuter HCMV-Infektion in Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Lungengewebe HCMV nachweisen, wenn auch mit sehr schwacher Bandenstärke. Eine zusätzliche „Nested PCR“ erfolgte nicht.

Cassol et al. (23) konnten bei Patienten nach einer Knochenmarkstransplantation eine Korrelation der Serologie mit dem Nachweis von HCMV-DNA im Blut und Urin zeigen, auch hierbei war die PCR die sensitivere Untersuchungsmethode, andere Autoren konnten HCMV-DNA auch bei seronegativen Patienten nachweisen (40,135,156).

In der hier vorliegenden Studie stimmten Serologie und CMV-Nachweis aus Endomyokardbiopsien in 62,5% überein und in 37,5% nicht. Von diesen 37,5% waren in 56% der Fälle die PCR positiv und die Serologie negativ, in 44% der Fälle die Serologie positiv und die PCR negativ. Nach dem Fisher-Test ergab sich somit keine Korrelation der PCR-Ergebnisse aus Endomyokardbiopsien mit denen der Serologie bei herztransplantierten Patienten. Die falsch negativen PCR-Befunde sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß HCMV während einer Virämie trotz Immunsuppression nur selten das Herz befällt und dort auch seltener, z.B. in Endothelzellen, persistiert, sondern daß vielmehr Blutzellen wie Monozyten, Lymphozyten oder polymorphkernige Granulozyten als Orte der Viruspersistenz und der Replikation dienen (46,108,156). Dennoch konnten wiederum Machida et al. (91) bei 79% immunkompetenten Patienten nach einer Knochenmarkstransplantation HCMV-Antikörper im Blutplasma nachweisen, während HCMV-DNA in sämtlichen kernhaltigen Blutzellen negativ war. Im Rahmen einer Virämie konnten Ghisetti et al. (47) HCMV-DNA in unfixierten Herzmuskelbiopsien in 23% mittels PCR nachweisen. Ursache hierfür könnte entweder die ausgedehnte Virämie mit 125 pp65 positiven Leukozyten/200 Zellen gewesen sein oder ein niedriger Anteil an HCMV-DNA in zirkulierenden Leukozyten.

Eine weitere Ursache für die falsch negativen PCR-Befunde könnte die Tatsache sein, daß Herzmuskelbiopsien untersucht wurden. Da bei einem Organbefall mit dem Cytomegalievirus wahrscheinlich nicht sämtliche Areale des Endomyokards gleichermaßen befallen werden, sind auch, durch die angewandte Methode (Endomyokardbiopsien) bedingt, falsch negative Ergebnisse möglich.

Die falsch negativen Befunde der Serologie können daran liegen, daß die PCR einfach die sensitivere Methode darstellt (23,156). So lässt sich HCMV-DNA in gesunden seronegativen Individuen in 30% mittels PCR aus der Granulozyten-Monozyten-Fraktion des peripheren Blutes isolieren (156). Ein weiterer Grund könnte jedoch auch die Tatsache sein, daß gerade immunsupprimierte Patienten auf eine Infektion nicht mit der Bildung von Antikörpern adäquat reagieren können. So kommt es bei herz- und nierentransplantierten Patienten erst nach ein bis vier Wochen zu einem IgM- und IgG-Anstieg (140). Nach Allen et al. (6) führt wiederum eine verzögerte Reaktionsbereitschaft des Organismus, auf Infektionen mit der Bildung von IgM und IgG zu reagieren, zu einem erhöhten Risiko einer sekundären Organinvasion nach Herztransplantationen.

5.2 Nachweis des Cytomegalievirus mittels PCR und klinische Symptomatik

Einige Autoren erheben den Einwand, die PCR weise aufgrund ihrer großen Sensitivität auch bei eher nicht aktiven Virusinfektion und bei asymptomatischen Personen HCMV-DNA nach (15,30,159) und stellen somit die klinische Relevanz und Therapiebedürftigkeit in Frage. Hinsichtlich der herztransplantierten Patienten ließ sich in der vorliegenden Studie HCMV auch bei asymptomatischen herztransplantierten Patienten nachweisen, 67% der PCR-positiven Patienten waren symptomatisch und 33% der PCR-positiven Patienten asymptomatisch (vgl. S. 58). Es bestand in dieser Patientengruppe statistisch kein Zusammenhang des HCMV-DNA Nachweises mit der klinischen Symptomatik. Zwischen einer latenten und einer aktiven CMV-Infektion des Transplantates nach einer Herztransplantation konnten Fernando et al. (40) mit Hilfe einer semiquantitativen PCR aus Endomyokardbiopsien differenzieren. Bei der Differenzierung einer tatsächlichen Infektion des Transplantates und dem Nachweis peripherer Blutzellen, die gerade das Organ passiert haben, könnte zudem eine zusätzliche „*in-situ*-PCR“ Aufschluß geben.

Mit Hilfe von Blutproben konnten Camargo et al. (21) mit einer quantitativen PCR zwischen einer aktiven und einer latenten HCMV-Infektion nach einer Herztransplantation differenzieren. Preiser et al. (112) konnten bei stammzelltransplantierten und Cope et al. (29) bei lebertransplantierten Patienten mit einer quantitativen PCR sowie Wilkens et al. (157) mit der Densitometrie zwischen aktiver und latenter HCMV-Infektion unterscheiden. Van Dorp et al. (145) konnten mittels PCR aus Blut bei 98% der nierentransplantierten Patienten mit einer akuten HCMV-Infektion das Virus nachweisen, hingegen war die PCR nur in 6.7% der Patienten ohne akute HCMV-Infektion positiv. Dieses Ergebnis zeigt eine gute Korrelation einer akuten HCMV-

Infektion mit dem Virusnachweis mittels PCR aus dem Blut. Keiner dieser o.g. Autoren beschäftigte sich jedoch mit der Infektion des Transplantates selbst durch das Virus.

Die Prävalenz von HCMV in der Gruppe der Patienten mit Myokarditis war signifikant höher als in der Kontrollgruppe, was auf eine ursächliche Beteiligung von HCMV auch bei diesem Krankheitsbild hinweist. Für diese Theorie sprechen auch die Beobachtungen von Li et al. (88), die mittels „*in-situ*-Hybridisierung“ signifikant häufiger HCMV in der Myokarditisgruppe als in der Kontrollgruppe nachweisen konnten.

5.3 Prävalenz des Cytomegalievirus bei Patienten mit Myokarditis, Borderline-Myokarditis, dilatativer Kardiomyopathie und in der Kontrollgruppe

In der Literatur wird der Anteil der seropositiven Personen mit bis zu 70% der deutschen Bevölkerung angegeben (4). Wahrscheinlich ist der tatsächliche Anteil der HCMV-infizierten aber asymptomatischen Personen eher noch größer, da sich HCMV mittels PCR aus Blut auch bei seronegativen Personen in bis zu 30% nachweisen läßt (156).

In der Kontrollgruppe ließ sich bei keinem der untersuchten Personen mittels PCR aus Endomyokardbiopsien HCMV nachweisen. Wahrscheinlich ist das Herz ein Organ, welches normalerweise während einer HCMV-Infektion nur selten mitbefallen ist und welches auch nicht der prädominierende Ort der Viruspersistenz ist, auch wenn Ustinov et al. (143), wenn auch in wesentlich geringerem Maße als in der Niere und der Leber, CMV in Endothelzellen in Rattenherzen während einer akuten iatrogenen Infektion mit CMV der Ratte in sehr geringen Mengen mittels Antigendetektion nachweisen konnten. Als Virusreservoir werden eher hämatopoetische Progenitorzellen (92) aber auch Monozyten, polymorphkernige neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten angesehen. Sie können für eine langandauernde Virämie verantwortlich sein (46,156).

Bei Patienten mit einer akuten Myokarditis war in der vorliegenden Studie HCMV in 30% der Herzmuskelbiopsien nachweisbar. Der Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe war signifikant. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Li et al. (88), die mittels „*in-situ*-Hybridisierung“ signifikant häufiger HCMV in der Myokarditisgruppe als in der Kontrollgruppe nachweisen konnten, was auf eine ursächliche Beteiligung von HCMV in der Pathogenese dieses Krankheitsbildes hinweist. In deren Myokarditisgruppe ließ sich HCMV in Kardiomyozyten in 24%, in Endothelzellen in 16% und in Zellen des Interstitiums in 28% nachweisen. Schonian et al. (126) konnten in bis zu 14% der Patienten mit einer Myokarditis HCMV-DNA aus Herzmuskelbiopsien nachweisen, jedoch zeigten sich die HCMV-Antigene lediglich im Interstitium und nicht in Myozyten. Diese Tatsache weist eher auf eine latente oder persistierende

als auf eine aktive Infektion hin. Bei Patienten mit einer Borderline-Myokarditis, also einer Patientengruppe mit erhöhter interstitieller Lymphozytenzahl, war in der vorliegenden Studie HCMV in keinem Fall nachweisbar, dieses Kollektiv unterschied sich somit in dieser Hinsicht statistisch nicht von der Kontrollgruppe.

Maisch et al. (94) konnten durch „*in-situ*-Hybridisierungen“ belegen, daß Cytomegalieviren im Interstitium und in Endothelzellen persistieren können, ohne daß klinische Symptome oder morphologische Auffälligkeiten resultieren. War dagegen Virusgenom in den Kernen von Myozyten nachweisbar, zeigte sich der Befund einer Myokarditis.

Bei den Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie waren 7,7% der Biopsien HCMV-DNA-positiv. Diese Patientengruppe unterschied sich hinsichtlich der HCMV-Prävalenz statistisch nicht von der Kontrollgruppe. Schonian et al. (126) konnten in 22% der Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie HCMV in Endomyokardbiopsien mittels PCR nachweisen, die anschließend durchgeführte „*in-situ*-Hybridisierung“ zeigte jedoch HCMV-Antigene lediglich im Interstitium und nicht im Myokard. Somit ist die Infektion mittels HCMV bei diesem Krankheitsbild eher eine persistierende, latente als eine aktive Infektion. Auch nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie scheint HCMV in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie, im Gegensatz zur akuten Myokarditis, keine Rolle zu spielen.

Maehashi et al. (93) fanden bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und fokaler Fibrose stärkere lymphozytäre Infiltrationen als bei Patienten mit einer DCM und einer diffusen Fibrose. Sie sehen daher die Myokarditis bei dieser Untergruppe der DCM als einen wesentlichen ätiologischen Faktor in der Pathogenese dieses Krankheitsbildes an. In der hier vorliegenden Studie konnte jedoch HCMV, ein möglicher Verursacher einer Myokarditis, nicht häufiger in der Gruppe der DCM-Patienten mit Fibrose nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe oder der Patientengruppe mit DCM und diffuser Fibrose.

5.4 Prävalenz des Cytomegalievirus bei organtransplantierten Patienten

In der Literatur gibt es ganz unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit des HCMV-Nachweises bei organtransplantierten Patienten. So läßt sich im Blut bei Nierentransplantierten HCMV bei 21% bis 80% der Patienten nachweisen (56,70,139,145). Knochenmarkstransplantierte sind in bis zu 45% HCMV-PCR-positiv (56), sie erleiden in 21% eine HCMV-Virämie (70). Lebertransplantierte Patienten sind in bis zu 32% HCMV-PCR im peripheren Blut positiv (29). Bei Patienten nach einer Herztransplantation beträgt die Prävalenz einer HCMV-Infektion

zwischen 43% und 93% mit den Methoden Serologie und Viruskultur, PCR aus Leukozyten oder Antigennachweis (21,37,54,84,103,107,118,161). Diese Ergebnisse entsprechen denen in dieser Studie, hierbei konnte mittels PCR aus Endomyokardbiopsien bei 44% der Erwachsenen und 48% der herztransplantierten Kinder HCMV nachgewiesen werden. Hingegen befand sich in der Kontrollgruppe kein HCMV-DNA-positiver Proband. Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant (G-Test, Fisher-Test). Vergleicht man die HCMV-Prävalenz in der Gruppe der herztransplantierten Kinder mit der in der Gruppe der herztransplantierten Erwachsenen, so läßt sich kein Unterschied erkennen (siehe Abbildung 5, Seite 50). Bei der Differenzierung einer asymptomatischen Viruspersistenz von einem klinisch relevanten Transplantatbefall könnte eine zusätzlich durchgeführte „*in-situ*-Hybridisierung“ nützlich sein. Der Nachweis von HCMV-Antigenen im Interstitium würde hierbei eher für eine Viruspersistenz als für eine aktive Infektion des Transplantates sprechen, dagegen würde der Nachweis von HCMV-Antigenen in Myozyten für eine pathogenetische Bedeutung des Virus sprechen (126). Keineswegs alle herztransplantierten Patienten, welche in der PCR aus Leukozyten HCMV-positiv sind, erleiden auch eine HCMV-Erkrankung. Mit einer quantitativen PCR aus Leukozyten konnten Camargo et al. (21) zwischen einer asymptomatischen HCMV-Infektion und einer HCMV-Erkrankung differenzieren. Als Grenzwerte legten sie hierbei 50.000 und 100.000 Viruskopien/10⁶ Leukozyten fest.

Neben dem erhöhten Risiko einer HCMV-Infektion bei Patienten, die ein Organ eines seropositiven Spenders erhalten haben (s.o.), werden in der Literatur noch andere Risikofaktoren beschrieben. Diese sind ein Cyclosporinspiegel über 550 µg/l im Serum (11), eine verstärkte Immunsuppression nach einer Rejektion in den letzten 2 Wochen (11), eine verminderte Fraktion der weißen Blutzellen (11), der Einsatz von OKT3 (27) und ein Alter von größer als 120 Tagen zum Zeitpunkt der Transplantation bei Kindern (41). Hingegen konnten Dummer et al. (34) keine Assoziation einer symptomatischen HCMV-Infektion mit der Gabe von Cyclosporin erkennen.

5.5 Zusammenhang zwischen einem Cytomegalievirus-Nachweis mittels PCR aus Endomyokardbiopsien und der Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen

Die Entwicklung einer Transplantatarteriosklerose ist zur Zeit der größte limitierende Faktor des „Langzeitüberlebens“ bei Patienten nach Herztransplantationen (53). Ihre Prävalenz steigt mit zunehmender Zeit nach der Transplantation an und beträgt nach 1 Jahr 18%, nach 2 Jahren 27% und nach 3 Jahren 44% (142). Olivari et al. (102) fanden eine Inzidenz der Transplantatvaskulopathie von 8% pro Jahr post transplantationem. 35% der Kinder entwickeln innerhalb von 2 Jahren post transplantationem Anomalien der Koronararterien (16). Dies sind

besonders Veränderungen der kleinen intramyokardialen Gefäße (13), tubuläre segmentale Läsionen, abrupte Obliterationen von Hauptgefäßen und das „concentric narrowing“ (104). Das Auftreten dieser GCD („graft coronary disease“) wird von verschiedenen Autoren mit einer HCMV-Infektion in Verbindung gebracht (138). So ist eine Entzündungsreaktion der Gefäßwände des Transplantats mit Veränderungen der kleinen intramyokardialen Gefäße, die zur Reduktion des Gefäßlumens führen, mit einer HCMV-Infektion assoziiert (77,81).

Eine akute HCMV-Infektion induziert eine intimale Entzündungsreaktion (Endothelialitis) bei Ratten und Menschen nach einer Herztransplantation (81), wobei nicht aktivierte T-Lymphozyten und Monozyten das Bild beherrschen. Hruban et al. (66) sind der Ansicht, die beschleunigte Atherosklerose bei Herztransplantierten sei durch eine cytotoxische T-Zell-vermittelte Endothelialitis bedingt. Lemström et al. (87) zeigten in ihrer Studie, daß es nach einer CMV-Infektion bei Ratten zur CMV-Antigenexpression, Endothelzellproliferation und zur Intimaverdickung im Herztransplantat kommt. Dies deutet darauf hin, daß Ratten-CMV die Transplantatarteriosklerose beschleunigt, besonders in den kleinen intramyokardialen Gefäßen, vermittelt durch eine Entzündungsreaktion in den Gefäßwänden und perivaskulär. Auch Handa et al. (58) fanden eine schwere Transplantatvaskulopathie bei Ratten, die präoperativ mit CMV infiziert wurden. Über die Art und Weise, wie HCMV zu einer beschleunigten Atherosklerose der Koronargefäße des Transplantats führt, besteht bisher nur eine Theorie (73), nach der es nach einer HCMV-Infektion unter anderem zu einer Lyse der infizierten Endothelzellen mit verstärkter Expression von Endothel-Leukozyten Adhäsionsmolekülen, zu einer vermehrten Expression von HCMV-Antigenen auf dem Endothel und zu einer direkten T-Zell Zytotoxizität der infizierten Zellen kommt. Dies bewirkt eine vermehrte Ausschüttung von „Von Willebrand Faktor“ durch das Endothel, was zu einer Thrombozytenaggregation und zur Thrombusbildung führt.

In der hier vorliegenden Studie lag die Prävalenz einer koronarangiographisch oder endosonographisch gesicherten Transplantatvaskulopathie bei 35% der herztransplantierten Kinder und Erwachsenen, ein Ergebnis welches mit den Angaben in der Literatur übereinstimmt. Statistische Zusammenhänge zwischen dem HCMV-Genom-Nachweis im Endomyokard und der Transplantatvaskulopathie ließen sich nicht sichern. Hammond et al. (57) konnten zeigen, daß Patienten mit einer vaskulären Rejektion das größte Risiko für die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie haben. Bei akuten Abstoßungsreaktionen vom vaskulären Typ läßt sich HCMV im Blut in 86% der untersuchten Fälle nachweisen (99).

In der vorliegenden Studie fand sich bei Rejektionen vom vaskulären Typ (V1 und größer) ein starker Hinweis bezüglich einer Assoziation mit dem Nachweis von HCMV in den Endomyokardbiopsien, welcher, möglicherweise aufgrund der geringen Patientenzahl mit einer vaskulären Rejektion (n=11), noch nicht signifikant war. Hinsichtlich der chronischen

endokardialen Rejektion zeigte sich, möglicherweise aufgrund der niedrigen Patientenzahl mit einem Rejektionsgrad E2 (4 Patienten) oder E3 (1 Patient), statistisch gesehen keine Korrelation zum HCMV-Nachweis mittels PCR aus Endomyokardbiopsien (Seite 63).

Van Willebrand et al. (148) geben an, daß eine HCMV-Infektion signifikant mit einer Transplantatabstoßungsreaktion bei Nierentransplantierten assoziiert ist. Grattan et al. (50) fanden in ihrer Studie eine erhöhte Inzidenz von Abstoßungsreaktionen in den ersten drei Monaten post transplantationem bei HCMV-positiven herztransplantierten Patienten gegenüber HCMV-negativen Patienten. Darüberhinaus entwickelten HCMV-positive Patienten signifikant häufiger eine Transplantatvaskulopathie als HCMV-negative Patienten. Das größte Risiko der Atherosklerose des Transplantates hatten hierbei Patienten, die prä transplantationem HCMV-seropositiv waren und ein seronegatives Transplantat bekamen. Dies bedeutet, daß die *de novo*-Infektion des Transplantates eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Transplantatatherosklerose spielt. Andere Autoren fanden einen starken Hinweis (28) oder auch eine Signifikanz (155) in Richtung einer erhöhten Inzidenz von akuten Abstoßungsreaktionen bei HCMV-positiven Patienten. Mittels „Nested-PCR“ ließ sich HCMV signifikant häufiger in Biopsien mit moderater oder schwerer Abstoßungsreaktion nachweisen als in solchen mit geringer oder fehlender Rejektion (40). Im Tierversuch verursacht das Cytomegalievirus der Maus (MCMV) bei herztransplantierten Mäusen neben einer beschleunigten Abstoßungsreaktion bei MCMV-positiven Empfängern (22) akute und chronische Perimyokarditiden (42).

In der hier vorliegenden Studie ließ sich HCMV in 29% der Biopsien mit einer Abstoßungsreaktion vom Grad A0 bis A2 nachweisen und in 40% der Fälle in Biopsien mit einem Abstoßungsgrad A3 oder größer. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Somit kann kein Zusammenhang zwischen einer akuten Abstoßungsreaktion vom interstitiellen Typ und dem Nachweis von HCMV aus Endomyokardbiopsien hergestellt werden.

Bezüglich der Frage, auf welche Weise HCMV eine Transplantatabstoßungsreaktion bewirken kann, gibt es in der Literatur verschiedene Theorien, die im Folgenden kurz umrissen werden sollen.

HCMV kann die Immunantwort über mehrere Mechanismen modulieren. Einerseits kann es in infizierten Endothelzellen die Expression von Antigenen der MHC-Klasse II inhibieren und die Heraufregulation von Antigenen der MHC-Klasse I durch Interferon- γ und TNF- α verhindern (129) und auf diese Art in den Endothelzellen persistieren. Andererseits kann es aber auch in infizierten Endothelzellen die Neoexpression von MHC-Klasse II-Molekülen an ihrer Oberfläche induzieren. Aktivierung der MHC-Klasse II-Antigene führt zu einer Präsentation von HCMV-

Antigenen durch APC-Zellen gegenüber (CD 4+)-Zellen (44) und anschließend zur Lyse der Endothelzellen durch zytotoxische Zellen (87). Eine ähnliche Heraufregulation von MHC-II- und auch MHC-I-Antigenen wird auch in der Pathogenese der Transplantatabstoßungsreaktionen beobachtet (120). Während einer primären HCMV-Infektion läßt sich weiterhin eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber MHC-Antigenen der Klassen I und II des Spenders nachweisen (103). Ein weiterer möglicher Mechanismus in der Pathogenese der mit einer HCMV-Infektion assoziierten Abstoßungsreaktion ist die Fähigkeit des Virus, in infizierten Endothelzellen die Expression von ICAM-1 zu stimulieren. ICAM-1 gehört in die Immunglobulin-Superfamilie der Adhäsionsmoleküle, die auf Endothelzellen, B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Granulozyten sitzen. Es bindet an LFA-1, ist ein Co-Stimulator bei der Antigenpräsentation und wird durch TNF- α , LPS, IFN- γ und IL-1 heraufreguliert (128,146,152). ICAM-1 ist ein starker Co-Stimulus für die Aktivierung von (CD 4+)-T-Zellen (151). Eine erhöhte Expression von ICAM-1 bei Transplantierten wird mit dem Fortschreiten einer Abstoßungsreaktion assoziiert (129). Im Tiermodell können anti-ICAM-1- und anti-LFA-1-Antikörper die Abstoßungsreaktion reduzieren (147,153). Auch auf Leberzellen ließ sich nach einer HCMV-Infektion eine vermehrte Expression von ICAM bei Lebertransplantierten feststellen. Die Intensität der ICAM-Expression stieg mit der Antigenämie an und dauerte so lange wie die generelle milde Immunaktivierung. Die Induktion der ICAM-1-Expression geht der lymphozytären Aktivierung der akuten Leber-Abstoßungsreaktion voraus (86).

Weiterhin ist die Induktion von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), einem Adhäsionsmolekül, stark mit einer HCMV-Infektion assoziiert. Wenig oder kein VCAM ist während einer milden Abstoßungsreaktion oder in Kontrollbiopsien nachweisbar (80).

Eine wichtige Rolle scheint das VCAM-1-/VLA-4-Ligandenpaar bei der Adhäsion von Lymphozyten und Monozyten am Kapillarendothel während einer HCMV-Infektion zu spielen. Es trägt somit möglicherweise zur erhöhten Inzidenz der Transplantatvaskulopathie bei HCMV-infizierten Herztransplantierten bei (80). Auch andere Autoren (16,39,50,78,82,90,96) sehen in einer HCMV-Infektion einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung einer beschleunigten Atherosklerose. Einige Studien bezweifeln eine entscheidende Rolle von HCMV in der Pathogenese der Entwicklung einer Transplantatatherosklerose (9,17,71,104,115). Lardelli et al. (85) fanden weder morphologische Veränderungen oder entzündliche Infiltrate noch einen Einfluß auf das Schicksal des Nierentransplantates durch HCMV. Stovin et al. (137) konnten während einer akuten HCMV-Infektion keine vermehrten zellulären Infiltrate, Veränderungen der Myozyten, der interstitiellen Zellen oder der Zellkerne von Endothelzellen bei Herztransplantierten nachweisen. Weiterhin ließ sich HCMV auch in 5% in Endomyokardbiopsien ohne Rejektion mittels „*in-situ*-Hybridisierung“ nachweisen (17).

5.6 Mortalität nach einer Herztransplantation in Abhängigkeit von dem Cytomegalievirus-PCR-Status der Herzmuskelbiopsie post transplantationem

Dank zunehmender Erfahrungen mit Herztransplantationen bei Neugeborenen und Säuglingen ist es gelungen, die Mortalität am Kinderherzzentrum in Giessen von 50% in der Anfangsphase (1988-1993) auf 8% (1994-1996) zu reduzieren. Die 1-Jahres-Überlebensrate in der letztgenannten Gruppe betrug hierbei sogar 100% (11).

In der vorliegenden Studie fanden sich statistisch signifikant mehr Todesfälle in der Patientengruppe der herztransplantierten Kinder und Erwachsenen, die in der Biopsie post transplantationem HCMV-PCR-positiv waren, als bei den in der Endomyokardbiopsie HCMV-PCR-negativen Patienten. Es bestand hingegen kein Zusammenhang zwischen dem HCMV-PCR-Status der Nullbiopsie und der Mortalität. Nach diesen vorliegenden Ergebnissen ist es somit hinsichtlich der Mortalität der Patienten nicht von Bedeutung, ob es sich bei den HCMV-PCR-positiven Biopsien post transplantationem um eine Reaktivierung des bereits im Spenderherzen persistierenden Virus, eine Infektion des Transplantates durch den Empfänger oder eine Primärinfektion mit dem humanen Cytomegalievirus handelt. Krogsgaard et al. (84) und Best et al. (11) zeigten eine erhöhte Inzidenz akuter HCMV-Infektionen bei Patienten, die ein Organ eines HCMV-positiven Spenders erhielten, wohingegen der HCMV-Empfängerstatus hinsichtlich einer HCMV-Infektion bzw. Reaktivierung unbedeutend war (84). Hingegen konnten Fernando et al. (40) eine klinisch manifeste HCMV-Erkrankung besonders bei seronegativen Empfängern nachweisen, die ein Organ eines seropositiven Spenders erhielten. Auch Sia et al. (134) fanden bei HCMV seronegativen Empfängern, welche ein Transplantat eines seropositiven Spenders erhielten, mittels quantitativer PCR aus dem peripheren Blut eine erhöhte Viruslast, welche zudem trotz Therapie mit Ganciclovir persistierte. Die primäre HCMV-Infektion (seronegativer Empfänger, seropositiver Spender) ist ein unabhängiger Marker für eine HCMV-Erkrankung (134).

Eines der untersuchten Kinder verstarb während der Transplantationsoperation. Serologisch und klinisch hatte dieses Kind präoperativ keinerlei Hinweis auf eine aktive HCMV-Infektion, zudem war das Explantat HCMV-PCR-negativ. Trotz des HCMV-Nachweises in der letzten Biopsie ist eine akute HCMV-Infektion des Transplantates als Todesursache aufgrund der zu kurzen Inkubationszeit unwahrscheinlich. Zwei Patienten verstarben an vaskulären Rejektionen. Zwei weitere Patienten verstarben an Rechtsherzversagen am ersten postoperativen Tag bei wahrscheinlich bereits präoperativ asymptomatischer Pneumonie. In diesen vier Fällen wäre eine ursächliche Beteiligung des humanen Cytomegalievirus am Tod der Patienten im Rahmen einer Primärinfektion oder einer Reaktivierung, bei bis zu 30% der seronegativen Patienten ist HCMV

mittels PCR aus Leukozyten nachweisbar (156), denkbar. Alle vier verstorbenen Patienten waren sowohl serologisch als auch in der Nullbiopsie (3 Patienten) bzw. im Explantat (1 Patient) HCMV-PCR-negativ und in der letzten Biopsie HCMV-PCR-positiv. Es war also eine Konversion des HCMV-Status aufgetreten.

Berücksichtigt man die Untergruppe der herztransplantierten Erwachsenen gesondert, so läßt sich aufgrund der zu geringen Mortalität von 5,6 % keine Korrelation zwischen Mortalität und HCMV-Nachweis aus den letzten Endomyokardbiopsien prä mortem herstellen, auch wenn der einzige verstorbene Patient in der Nullbiopsie HCMV-PCR-negativ war und zu HCMV-PCR-positiv in der letzten Biopsie konvertiert ist.

Mit Hilfe einer HCMV-PCR, insbesondere, wenn sie auch aus Gewebeextrakten/Biopsaten weiterer parenchymatöser Organe durchgeführt würde, könnte man zwischen einer Infektion des Transplantates und einer Infektion des Gesamtorganismus differenzieren. Somit könnte die HCMV-PCR weitere Aufschlüsse zur Klärung der Todesursache nach einer Herztransplantation bringen.

6. Zusammenfassung

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist ubiquitär verbreitet, die Durchseuchung beträgt in den Industrieländern ca. 50% bei den Erwachsenen. Als Herpesvirus persistiert es lebenslang in einem einmal befallenen Organismus. Die postnatale Infektion verläuft bei Gesunden zumeist asymptomatisch und hat klinisch in der Regel keine Relevanz. Bei immunsupprimierten Patienten oder nach Organtransplantationen führt das Virus jedoch zu einer erhöhten Morbidität, Transplantatschädigung und Mortalität. Weiterhin wird das HCMV beschuldigt, in der Pathogenese der Transplantatvaskulopathie, der akuten Rejektion, der Myokarditis und der dilatativen Kardiomyopathie eine wichtige Rolle zu spielen. Ein wichtiges Ziel dieser Studie war es, die Prävalenz des HCMV mittels „Nested-PCR“ in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Endomyokardbiopsien in den Patientenkollektiven mit Myokarditis, dilatativer Kardiomyopathie und bei herztransplantierten Kindern und Erwachsenen zu ermitteln und mit der Prävalenz des HCMV bei herzgesunden Patienten zu vergleichen.

Mit Hilfe einer „Nested-PCR“ aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Endomyokardbiopsien wurden 26 Patienten mit einer histologisch gesicherten dilatativen Kardiomyopathie, 23 Patienten mit einer Myokarditis, 39 herztransplantierte Kinder und Erwachsene sowie 15 herzgesunde Patienten hinsichtlich des MLA (major late antigen) und des MIEA (major immediate early antigen) des humanen Cytomegalievirus (HCMV) untersucht. Darüber hinaus wurden die jeweiligen Abstossungsreaktionen nach den Herztransplantationen mikroskopisch anhand der IUC-Klassifikation eingeteilt.

HCMV ließ sich in der Gruppe der Patienten mit einer histologisch gesicherten Myokarditis mit 30% signifikant häufiger nachweisen als in der Kontrollgruppe (null Prozent). Die Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie unterschieden sich hinsichtlich der Prävalenz des HCMV (7,7%) nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Bei den herztransplantierten Kindern konnte in 44% und bei den Erwachsenen in 48% HCMV nachgewiesen werden, signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Zudem zeigte sich ein Trend ($p=0,07$) zu einer Assoziation einer akuten vaskulären Rejektion mit dem Nachweis von HCMV aus Endomyokardbiopsien. In der Patientengruppe, welche in der letzten Biopsie HCMV-positiv war, fanden sich signifikant mehr Todesfälle als in der Gruppe der Herztransplantierten, welche in der letzten Biopsie HCMV-negativ war ($p=0,02$).

HCMV spielt in der Pathogenese der Myokarditis eine wichtige Rolle, führt zu einer erhöhten Mortalität nach einer Herztransplantation und ist möglicherweise mit einer akuten vaskulären Rejektion assoziiert. Hingegen scheint HCMV bei der dilatativen Kardiomyopathie pathogenetisch nicht von Bedeutung zu sein.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Adachi N., Kiwaki K., Tsuchiya H., Migita M., Yoshimoto T., Matsuda I.:
Fatal cytomegalovirus myocarditis in a seronegative ALL patient.
Acta Paediatr Jpn 1995;37:211-216
- 2 Akihiko M., Tetsutaro S., Yuko S., Takeshi K.:
A comparative study of congenital and postnatally acquired human cytomegalovirus infection in infants: Lack of expression of viral immediate early protein in congenital cases.
Virchows Archiv 1994;24:121-128
- 3 Akrigg A., Wilkinson G.W., Oram J.D.:
The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD 169.
Virus Research 1985;2:107-121
- 4 Albert S., Kuhn P., Sibrowski W., Seidl S., Doerr H.W.:
Die Bedeutung des Zytomegalievirus im Blutspendewesen.
Infusionstherapie 1990;17:48-56
- 5 Alexander L.K., Small J.D., Edwards S., Baric R.S.:
An experimental model for dilated cardiomyopathy after rabbit coronavirus infection.
J Infect Dis 1992;166:978-985
- 6 Allen M.D., Denny C.F., Kruse A.P., Revkin J.H., Fishbein D.P., Ashley R.L.:
Limited cytomegalovirus specific immunoglobulin M and immunoglobulin G profiles in heart transplant recipients.
J Heart Lung Transplant 1991;10:664-673
- 7 Aretz H.T.:
Myokarditis: The Dallas criteria.
Hum Pathol 1987;18:246-256
- 8 Avery J., Longworth P.:
Viral pulmonary infections in thoracic and cardiovascular surgery.
Semin Thorac Cardiovasc Surg 1995;7:88-94
- 9 Balk A.H.M.M., Weimar W., Rothbarth P.H., Meeter K., Metselaar H.J., Mochtar B., Simoons M.L.:
Passive immunization against cytomegalovirus in allograft recipients. The Rotterdam heart transplant program experience.
Infection 1993;21:195-200
- 10 Bauer J., Dapper F., Kroll J., Hagel K.J., Thul J., Zickmann B., Michel-Behnke I., Stastny B., Will J.C., Bohle R.M., Schranz D.:
Heart transplantation in infancy: Experiences at the Giessen Pediatric Heart Center.
Z Kardiol 1998;87:209-217
- 11 Best N.G., Trull A., Tan K.K.C., Spiegelhalter D.J., Wreghitt T.G., Wallwork J.:
Blood cyclosporine concentrations and cytomegalovirus infection following heart transplantation.
Transplantation 1995;60:689-694
- 12 Betts R.F., Hanshaw J.B.:
Cytomegalovirus in the compromised hosts.
Annu Rev Med 1977;28:103-110

7. Literaturverzeichnis

- 13 Billingham M.E.:
Histopathology of graft coronary disease.
J Heart Lung Transplant 1992;11:38-44
- 14 Bohle R.M., Brettreich S., Repp R., Borkhardt A., Kosmehl H., Altmannsberger H.M.:
Single somatic ras gene point mutation in soft tissue malignant fibrous histiocytomas.
Am J Pathol 1996;148:731-738
- 15 Boland G.J., Weger R.A., Tilanus M.G.J., Ververs C., Bosboom-Kalsbeek K., de Gast G.:
Detection of cytomegalovirus (CMV) in granulocytes by polymerase chain reaction
compared with the CMV antigen test.
J Clin Microbiol 1992;30:1763-1767
- 16 Braunlin E.A., Hunter D.W., Canter C.E., Gutierrez F.R., Ring W.S., Olivari M.T., Titus
J.L., Spray T.L., Bolman R.M.:
Coronary artery disease in pediatric cardiac transplant recipients receiving triple-drug
immunosuppression.
Circulation 1991;84:303-309
- 17 Bruneval P., Amrein C., Guillemain R., Belair M.-F., Bariety J.:
Poor diagnostic value of in situ hybridization and immunohistochemistry in
endomyocardial biopsies to detect cytomegalovirus after heart transplantation.
J Heart Lung Transplant 1992;11:773-777
- 18 Brytting M., Sundqvist V.-A., Stalhandske P., Linde A., Wahren B.:
Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer
oligonucleotides.
J Virol Methods 1991;32:127-138
- 19 Buffone G.J., Frost A., Samo T., Demmler G.J., Cagle P.T., Lawrence E.C.:
The diagnosis of CMV pneumonitis in lung and heart/lung transplant patients by PCR
compared with traditional laboratory criteria.
Transplantation 1993;56:342-347
- 20 Cagle P.T., Buffone G., Holland V.A., Samo T., Demmler G.J., Noon G.P., Lawrence
E.C.:
Semiquantitative measurement of cytomegalovirus DNA in lung and heart-lung
transplant patients by in vitro DNA amplification.
Chest 1992;101:93-96
- 21 Camargo L.F., Uip D.E., Simpson A.A., Caballero O., Stolf N.A., Vilas-Boas L.S.,
Pannuti C.S.:
Comparison between antigenemia and a quantitative-competitive polymerase chain
reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after heart transplantation.
Transplantation 2001;71:412-417
- 22 Carlquist J.F., Shelby J., Shao Y.L., Greenwood J.H., Hammond M.E., Anderson J.L.:
Accelerated rejection of murine cardiac allografts by murine cytomegalovirus-infected
recipients.
J Clin Invest 1993;91:2602-2608

7. Literaturverzeichnis

- 23 Cassol S.A., Poon M.-C., Pal R., Naylor M.J., Culver-James J., Bowen T.J., Russell J.A., Krawetz S.A., Pon R.T., Hoar D.I.:
Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA.
J Clin Invest 1989;83:1109-1115
- 24 Chee M.S., Bankier A.T., Beck S., Bohni R., Brown C.M., Cerny R., Horsnell T., Hutchinson C.A., Kouzarides T., Martignetti J.A., Preddie E., Sachwell S.C., Tomlinson P.A., Weston K.M., Borell B.C.:
Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169.
Curr Top Microbiol Immunol 1990;154:125-170
- 25 Chou S., Merigan T.C.:
Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization.
N Engl J Med 1983;308:921-925
- 26 Chou S., Norman D.J.:
The influence of donor factors other than serologic status on transmission of cytomegalovirus to transplant recipients.
Transplantation 1988;46:89-93
- 27 Constanzo-Nordin M.R., Swinnen L.J., Fisher S.G., Osullivan E.J., Pifarre R., Heroux A.L., Mullen G.M., Johnson M.R.:
Cytomegalovirus in heart transplant recipients: Relationship to immunosuppression.
J Heart Lung Transplant 1992;11:837-846
- 28 Cooper D.K.C., Novitzky D., Schlegel V., Muchmore J.S., Cucchiara A., Zuhdi N.:
Successful management of symptomatic cytomegalovirus disease with ganciclovir after heart transplantation.
J Heart Lung Transplant 1991;10:656-663
- 29 Cope A.V., Sabin C., Burroughs A., Rolles K., Griffith P.D., Emery V.C.:
Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation.
J Infect Dis 1997;176:1484-1490
- 30 Delgado R., Lunbreras C., Alba C.:
Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients.
J Clin Microbiol 1992;30:1876-1878
- 31 Demmler G.J., Schimbor C.M., May R.A. :
Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification.
J Inf Dis 1988;158:1177-1184
- 32 Dong R., Liu P., Wee L., Butany J., Sole M.J.:
Verapamil ameliorates the clinical and pathological course of murine myocarditis.
J Clin Invest 1992;90:2022-2030

- 33 Dummer J.S., Ho M., Rabin B., Griffith B.P., Hardesty R.L., Bahnson H.T.:
The effect of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection on T-lymphocyte subsets
in cardiac transplant patients on cyclosporine.
Transplantation 1984;38:433-435
- 34 Dummer J.S., White L.T., Ho M., Griffith B.P., Hardesty R.L., Bahnson H.T.:
Morbidity of cytomegalovirus infection in recipients of heart or heart-lung transplants
who received cyclosporine.
J Infect Dis 1985;152:1182-1191
- 35 Dummer S., Lee A., Breinig M.K., Kormos R., Ho M., Griffith B.:
Investigation of cytomegalovirus infection as a risk factor for coronary atherosclerosis in
the explanted hearts of patients undergoing heart transplantation.
J Med Virology 1994;44:305-309
- 36 Edwards W.D.:
Cardiomyopathies.
Mayo Foundation 1990;13:257-292
- 37 Egan J.J., Barber L., Lomax J., Yonan N., Fox A., Rahman A.N., Campbell C.S.,
Deiraniya A.K., Carroll K.B., Craske J., Turner A., Woodcock A.A.:
Detection of human cytomegalovirus antigenaemia: A rapid diagnostic technique for
predicting cytomegalovirus infection/ pneumonitis in lung and heart transplant
recipients.
Thorax 1995;50:9-13
- 38 Elkins C.C., Frist W.H., Dummer J.S., Stewart J.R., Merrill W.H., Carden K., Bender
H.W.:
Cytomegalovirus disease after heart transplantation: Is acyclovir prophylaxis indicated?
Ann Thorac Surg 1993;56:1267-1273
- 39 Everett J.P., Hershberger R.E., Norman D.J., Chou S., Ratkovec R.M., Cobanoglu A., Ott
G.Y., Hosenpud J.D.:
Prolonged cytomegalovirus infection with viremia is associated with development of
cardiac allograft vasculopathy.
J Heart Lung Transplant 1992;11:133-137
- 40 Fernando S., Booth J., Boriskin Y., Butcher P., Carrington D., Steel H., Tryhorn Y.,
Corbishley C., Keeling P., Murday A., McKenna W.:
Association of cytomegalovirus infection with post- transplantation cardiac rejection as
studied using the polymerase chain reaction.
J Med Virology 1994;42:396-404
- 41 Fukushima N., Gundry S.R., Razzouk A.J., Bailey L.L.:
Cytomegalovirus infection in pediatric heart transplantation.
Transplant Proc 1993;25:1423-1425
- 42 Gang D.L., Barrett L.V., Wilson E.J., Rubin R.H., Medearis D.N.:
Myopericarditis and enhanced dystrophic cardiac calcification in murine cytomegalovirus
infection.
Am J Pathol 1986;124:207-215
- 43 Garson J.A., Ring C., Tuke P., Tedder R.S.:
Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA.
Lancet 1990;336:878-879

7. Literaturverzeichnis

- 44 Gehrz R.C., Fuad S., Liu Y.-N.C., Bach F.H.:
HLA class II restriction of T helper cell response to cytomegalovirus (CMV).
Immunogenetic control of restriction.
J Immunol 1987;138:3145-3151
- 45 Gerna G., Zipeto D., Parea M., Revello M.G., Silini E., Percivalle E., Zavattoni M.,
Grossi P., Milanesi G:
Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart
transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia.
J Infect Dis 1991;164:488-498
- 46 Gerna G., Zipeto D., Percivalle E., Parea M., Revello M.G., Maccario R., Peri G.,
Milanesi G.:
Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and
evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic
patients.
J Infect Dis 1992;166:1236-1244
- 47 Ghisetti V., Barbui A., Rocci M.P., Donegani E., Bobbio M., Pucci A., Papandrea C.,
Pansini S., Zattera G., Mollo F., Di Summa M., Marchiaro G.:
Detection of human cytomegalovirus myocardial involvement by polymerase chain
reaction during systemic infection and correlation with pp65 antigenemia and DNAemia
in infected heart recipients.
Transplantation 1996;15:1072-1075
- 48 Goodpasture E.W., Talbot F.B.:
Concerning nature of „protozoan like” cells in certain lesions of infancy.
J Infect Dis 1920;26:347-350
- 49 Gorenssek M.J., Stewart R.W., Keys T.F., Mc Henry M.C., Babiak T., Goormastic M.:
Symptomatic cytomegalovirus infection as a significant risk factor for major infections
after cardiac transplantation.
J Infect Dis 1988;158:884-887
- 50 Grattan M.T., Moreno-Cabal C.E., Starnes V.A., Oyer P.E., Stinson E.B., Shumway N.E.:
Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and
atherosclerosis.
JAMA 1989;261:3561-3566
- 51 Greer C.E., Peterson S.L., Kiviat N.B., Manos M.M.:
PCR amplification from paraffin embedded tissues. Effect of fixative and fixation time.
Am J Clin Pathol 1990;95:117-124
- 52 Greer C.E., Lund J.K., Manos M.M.:
PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Recommendations on fixatives for
long-term storage and prospective studies.
Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991;1:46-50
- 53 Griep R.B., Stinson E.B., Bieber C.P., Reitz B.A., Copeland J.G., Oyer P.E.,
Shumway N.E.:
Control of graft arteriosclerosis in human heart transplant recipients.
Surgery 1977;81:262-269

- 54 Grossi P., Minoli L., Percivalle E., Irish W., Vigano M., Gerna G.:
Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart
transplant recipients.
Transplantation 1995;59:847-851
- 55 Grundy J.E., Shanley J.D., Griffiths P.G.:
Is cytomegalovirus interstitial pneumonitis in transplant recipients an
immunopathological condition?
Lancet 1987;10:996-998
- 56 Halwachs-Baumann G., Wilders-Truschnik M., Enzinger G., Eibl M., Linkesch W.,
Dornbusch H.J., Santner B.I., Marth E., Kessler H.H.:
Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: The impact of
molecular assays.
J Clin Virol 2001;20:49-57
- 57 Hammond E.H., Yowell R.L., Price G.D., Menlove R.L., Olsen S.L., Oconnell J.B.,
Bristow M.R., Doty D.B., Millar R.C., Karwande S.V., Jones K.W., Gay W.A., Renlund
D.G.:
Vascular rejection and its relationship to allograft coronary artery disease.
J Heart Lung Transplant 1992;11:111-119
- 58 Handa N., Hatanaka M., Baumgartner W.A., Reitz B.A., Sandford G., Esa A.,
Herskowitz A.:
Late cyclosporine treatment ameliorates established coronary graft disease in rat
allografts.
Transplantation 1993;56:535-540
- 59 Hayes K.D., Danks M., Jack I.:
Cytomegalovirus in human milk.
N Engl J Med 1972;287:177-178
- 60 Heim A., Canu A., Kirschner P., Simon T., Mall G., Hofschneider P.H., Kandolf R.:
Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-
infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts.
J Infect Dis 1992;166:958-965
- 61 Hendrix M.G.R., Dormans P.H.J., Kitslaar P., Bosman F., Bruggeman C.A.:
The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial wall of atherosclerotic and
nonatherosclerotic patients.
Am J Pathol 1989;134:1151-1157
- 62 Hendrix M.G.R., Daemen M., Bruggeman C.A.:
Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree.
Am J Pathol 1991;138:563-567
- 63 Herold G.:
Innere Medizin.
Herold 2001;687-692
- 64 Ho M.:
Epidemiology of cytomegalovirus infection in man. Biology and infection.
Plenum 1982; New York:79-104

- 65 Ho M.:
Epidemiology of cytomegalovirus infections.
Rev Infect Dis 1990;12:701-710
- 66 Hruban R.H., Beschoner W.E., Baumgartner W.A., Augustine W.M., Ren H., Reitz B.A., Hutchins G.M.:
Accelerated arteriosclerosis in heart recipients is associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis.
Am J Pathol 1990;137:871-882
- 67 Hsia K., Spector D.H., Lawrie J., Spector S.A.:
Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction.
J Clin Microbiol 1989;27:1802-1809
- 68 Jiang J.:
Possible relationship between viral myocarditis and dilated cardiomyopathy.
Chung Hua Hsin Hsueh Kuan Ping Tsa Chih 1992;20:4-6,69
- 69 Jin O., Sole M.J., Butany J.W., Chia W.K., Mc Laughlin P.R., Liu P., Liew C.C.:
Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction.
Circulation 1990;82:8-16
- 70 Jiwa M.N., Van Gemert G.W., Raap A.K., Van de Rijke F.M., Mulder A., Lens P.F., Salimans M.M.M., Zwaan F.E., Van Dorp W., Van der Ploeg M.:
Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction.
Transplantation 1989;48:72-76
- 71 Johnson M.R.:
Transplant coronary disease: Nonimmunologic risk factors,
J Heart Lung Transplant 1992;11:124-132
- 72 Kemnitz J., Heublein B., Cohnert T.R., Hetzer R., Zarkowski H.R., Altmannsberger M.:
Some histopathologic aspects regarding onset of antirejection therapy after heart transplantation.
J Heart Transplant 1990;9:662-667
- 73 Kendall T.J., Wilson J.E., Radio S.J., Kandolf R., Gulizia J.M., Winters G.L., Costanzo-Nordin M.R., Malcom G.T., Thieszen S.L., Miller L.W., Mc Manus B.M.:
Cytomegalovirus and other herpesviruses: Do they have a role in the development of accelerated coronary arterial disease in human heart allografts?
J Heart Lung Transplant 1992;11:14-20
- 74 Kinney J.S., Onorato I.M., Stewart J.A., Pass R.F., Stagno S., Cheeseman S.H., Chin J., Kumar M.L., Yaeger A.S., Herrmann K.L.:
Cytomegaloviral infection and disease.
J Infect Dis 1985;51:772-774
- 75 Komminoth P., Aidan A., Long M.D., Ronnie Ray M.D., Hubert J., Wolfe M.D.:
In situ polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins.
Diagn Mol Pathol 1992;1:85-97

7. Literaturverzeichnis

- 76 Korcakova L., Kaslik J., Svobodova J., Nozickova M., Horak J., Kocandrlje V., Fabian J., Raska I., Lejnar J., Frankova V., Haskova V.:
Natural killer cells and cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in cardiac graft recipients.
Cor Vasa 1988;30:435-441
- 77 Koskinen P.K., Krogerus L.A., Nieminen M.S., Mattila S.P., Lautenschlager I., Häyry P.:
Quantitation of cytomegalovirus infection-associated histologic findings in endomyocardial biopsies of heart allografts.
J Heart Lung Transplant 1993;12:343-354
- 78 Koskinen P., Nieminen M.S., Mattila S.P., Krogerus L.A., Lemström K.A., Häyry P., Lautenschlager I.T.:
Cytomegalovirus infection accelerates allograft vasculopathy: Correlation between angiographic and endomyocardial biopsy findings in heart transplant patients.
Transpl Int 1993;6:341-347
- 79 Koskinen P.K., Markku S., Nieminen M.S., Mattila S.P., Häyry P., Irmeli T., Lautenschlager T.:
The correlation between symptomatic CMV infection and CMV antigenemia in heart allograft recipients.
Transplantation 1993;55:547-551
- 80 Koskinen P.K.:
The association of the induction of vascular cell adhesion molecule-1 with cytomegalovirus antigenemia in human heart allografts.
Transplantation 1993;56:1103-1108
- 81 Koskinen P.K., Lemström K., Bruggeman C., Lautenschlager I., Häyry P.:
Acute cytomegalovirus infection induces a subendothelial inflammation (endothelialitis) in the allograft vascular wall.
Am J Pathol 1994;144:41-50
- 82 Koskinen P.K., Krogerus L.A., Nieminen M.S., Mattila S.P., Lautenschlager I., Häyry P.:
Cytomegalovirus infection-associated generalized immune activation in heart allograft recipients: A study of cellular events in peripheral blood and endomyocardial biopsy specimens.
Transpl Int 1994;7:163-171
- 83 Krech U.:
Zytomegalievirus-Infektionen
Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag 1988;650-653
- 84 Krogsgaard K., Boesgaard S., Aldershvile J., Abendrup H., Mortensen S.A., Petterson G.:
Cytomegalovirus infection rate among heart transplant patients in relation to anti-thymocyte immunoglobulin induction therapy.
Scand J Infect Dis 1994;26:239-247
- 85 Lardelli P., Aguilar D., Gomez-Morales M., Anton I., Navarro N., Montes A., Andujar M., Bustos M., Ovalle F., Aneiros J., Garcia del Moral R.:
Presence of cytomegalovirus genome and leukocyte subsets in renal transplant biopsies.
Path Res Pract 1994;190:142-150

- 86 Lautenschläger I., Höckerstedt K.:
Induction of ICAM-1 on hepatocytes precedes the lymphoid activation of acute liver allograft rejection and cytomegalovirus infection.
Transpl Proc 1993;25:1429-1430
- 87 Lemström K.B., Koskinen O., Krogerus L., Daemen M., Bruggeman C., Häyry P.:
Cytomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and intimal thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection.
Circulation 1995;92:2594-2604
- 88 Li W., Crombach M., Schonian U., Yang Y.Z., Maisch B., Chen H.Z.:
Detection of cytomegalovirus genome by in situ hybridization in paraffin embedded endomyocardial biopsy specimens of viral myocarditis.
Chin Med J (Engl) 1994;107:888-91
- 89 Lindsley M.D., Torpey D.J., Rinaldo C.R.:
HLA-DR-restricted cytotoxicity of cytomegalovirus-infected monocytes mediated by Leu 3 positive T cells.
J Immunol 1986;136:3045-3051
- 90 Loebe M., Schüler S., Zais O., Warnecke H., Fleck E., Hetzer R.:
Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplanted heart.
J Heart Lung Transplant 1990;9:707-711
- 91 Machida U., Kami M., Fukui T., Kazuyama Y., Kinoshita M., Tanaka Y., Kanda Y., Ogawa S., Honda H., Chiba S., Mitani K., Kimura S., Hirai H.:
Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation.
J Clin Microbiol 2000;38:2536-2542
- 92 Maciewski J.P., Bruening E.E., Donahue R.E., Mocarski E.S., Young N.S., St.Jeor S.C.:
Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus.
Blood 1992;80:170-178
- 93 Maehashi N., Yokota Y., Takarada A., Usuki S., Maeda S., Yoshida H., Sugiyama T., Fukuzaki H.:
The role of myocarditis and myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy.
Jpn Heart J 1991;32:1-15
- 94 Maisch B., Schonian U., Crombach M., Wendl I., Bethge C., Herzum M., Klein H.H.:
Cytomegalovirus associated inflammatory heart muscle disease.
Scand J Infect Dis 1993;88:135-148
- 95 Martin A., Webber S., Fricker J., Jaffe R., Demmler G., Kearney D., Zhang Y.-H., Bodurtha J., Gelb B., Ni J., Bricker J.T., Towbin J.A.:
Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children.
Circulation 1994;90:330-339
- 96 Mc Donald K., Rector T.S., Braunlin E.A., Kubo S.H., Olivari M.T.:
Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection.
Am J Cardiol 1989;64:359-362

- 97 Melnick J.L., Adam E., Debakey M.E.:
Cytomegalovirus and atherosclerosis.
Eur Heart J 1993;14:30-38
- 98 Naraqi S., Jackson G.G., Jonasson O., Rubenis M.:
Search for latent cytomegalovirus in renal allografts.
Infect Immun 1978;19:699-703
- 99 Normann S.J., Salomon D.R., Leelachaikul P., Khan S.R., Staples E.D., Alexander J.A.,
Mayfield W.R., Knauf D.G., Sadler A.L., Selman S.:
Acute vascular rejection of the coronary arteries in human heart transplantation:
Pathology and correlations with immunosuppression and cytomegalovirus infection.
J Heart Lung Transplant 1991;10:674-687
- 100 Novick R.J., Menkis A.H., McKentie F.N., Reid K.R., Ahmad D.:
Should heart-lung transplant donors and recipients be matched according to
cytomegalovirus serologic status?
J Heart Transplant 1990;9:699-706
- 101 Numazaki K., Ikehata M., Chiba S.:
Subtyping of cytomegalovirus strains obtained from immunocompetent children.
In Vivo 2000;14:745-746
- 102 Olivari M.T., Homans D.C., Wilson R.F., Kubo S.H., Ring W.S.:
Coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving triple-drug
immunosuppressive therapy.
Circulation 1989;80:111-115
- 103 Ouwehand A.J., Balk A.H.M.M., Baan C.C., Vaessen L.M.B., Jutte N.H.P.M., Bos E.,
Claas F.H.J., Weimar W.:
Cytomegalovirus infection and allospecific cytotoxic activity of graft-infiltrating cells
after heart transplantation.
J Med Virol 1994;42:175-181
- 104 Pahl E., Fricker F.J., Armitage J., Griffith B.P., Taylor S., Uretzky B.F., Beerman L.B.,
Zuberbuhler J.R.:
Coronary arteriosclerosis in pediatric heart transplant survivors: Limitation of long term
survival.
J Pediatr 1990;116:177-183
- 105 Pande H., Baak S.W., Riggs A.D., Clark B.R., Shively J.E., Zaia J.A.:
Cloning and physical mapping of a gene fragment coding for a 64-kilodalton major late
antigen of human cytomegalovirus.
Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:4965-4969
- 106 Paya C.V., Hermans P.E., Wiesner R.H., Lugwig J., Smith T.F., Rakela J., Krom R.A.F.:
Cytomegalovirus in liver transplantation: Prospective analysis of 93 consecutive orthotopic
liver transplantations.
J Infect Dis 1989;160:752-756
- 107 Paya C.V., Wold A.D., Smith T.F.:
Detection of cytomegalovirus from blood leukocytes separated by Sephadex-MN and
Ficoll-Paque/Macrodex methods.
J Clin Microbiol 1988;26:2031-2033

7. Literaturverzeichnis

- 108 Perol Y., Caro V.:
Human cytomegalovirus pp65 detection in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes is a useful marker of HCMV disease.
European Clinical Laboratory 1993;6:12
- 109 Pignatelli S., Dal Monte P., Landini M.P.:
GpUL73 (gN) genomic variants of human cytomegalovirus isolates are clustered into four distinct genotypes.
J Gen Virol 2001;82:2777-2784
- 110 Porter-Jordan K., Rosenberg E.I., Keiser J.F., Gross J.D., Ross A.M., Nasim S., Garrett T.C.:
Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA.
J Med Virol 1990;30:85-91
- 111 Preiksaitis J.K., Rosno S., Grumet C., Merigan T.C.:
Infection due to herpesviruses in cardiac transplant recipients: Role of the donor heart and immunosuppressive therapy.
J Infect Dis 1983;147:974-981
- 112 Preiser W., Brauninger S., Schwerdtfeger R., Ayliffe U., Garson J.A., Franck S., Doerr H.W., Rabenau H.F.:
Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplantation.
J Clin Virol 2001;20:59-70
- 113 Pucci A., Ghisetti V., Donegani E., Barbui A., David E., Fortunato M., Papandrea C., Pansini S., di Summa M.:
Histologic and molecular diagnosis of myocardial human cytomegalovirus infection after heart transplantation.
J Heart Lung Transplant 1994;13:1072-1080
- 114 Rabella N., Drew L.:
Comparison of conventional and shell vial cultures for detecting cytomegalovirus infection.
J Clin Microbiol 1990;28:806-807
- 115 Radovancevic B., Poindexter S., Birovljev S., Velebit V., McAllister H.A., Duncan J.M., Vega D., Lonquist J., Burnett C.M., Frazier O.H.:
Risk factors for development of accelerated coronary artery disease in cardiac transplant recipients.
Eur J Cardiothorac Surg 1990;4:309-313
- 116 Reusser P.:
Klinik und Therapie der Infektion mit dem Zytomegalievirus.
Internist 1992;33:593-596
- 117 Ribbert H., Jesionek A., (zitiert von Seifert G. und Oehmke J., 128):
Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern.
Zbl Path 1904;15:945

- 118 Rice P.S., Kudesia G., Price C., Smith G.H.:
Diagnosis of cytomegalovirus infection in heart transplant recipients.
J Clin Pathol 1992;45:636-637
- 119 Richardson P., Mc Kenna W., Bristow M., Maisch B., Mautner B., O'Connell J., Olsen E.,
Thiene G., Goodwin J., Gyarfas I., Martin I., Nordet P.:
Report of the 1995 world health organization/international society and federation of
cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies.
Circulation 1996;93:841-842
- 120 Rinaldo R.C.:
Modulation of major histocompatibility complex antigen expression by viral infection.
Am J Pathol 1994;144:637-650
- 121 Rogers B.B., Alpert L.C., Hine E.A.S., Buffone G.J.:
Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction.
Am J Pathol 1990;136:541-548
- 122 Roux P., Lavrard I., Poirot J.L., Chouaid C., Denis M., Olivier J., Nigou M., Miltgen M.:
Usefulness of PCR for detection of pneumocystis carinii DNA.
J Clin Microbiol 1994;32:2324-2326
- 123 Rubin R.H.:
The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation.
JAMA 1989;261:3607-3609
- 124 Schirm J., Timmerije W., Van der Bij W., The T.H., Wilderdink J.B., Tegzess A.M., Van
Son W.J., Schroder F.P.:
Rapid detection of infectious cytomegalovirus in blood with the aid of monoclonal
antibodies.
J Med Virol 1987;23:31-40
- 125 Schneweis K.E.:
Herpes simplex-Virus (HSV).
Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag 1988;643-647.
- 126 Schonian U., Crombach M., Maser S., Maisch B.:
Cytomegalovirus-associated heart muscle disease.
Eur Heart J 1995;16:46-49
- 127 Schultheiß H.P.:
Immunsuppressive Therapie bei Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie?
Internist 1992;33:650-662
- 128 Sedmak D.D., Roberts W.H., Stephens R.E., Buesching W.J., Morgan L.A., Davis D.H.,
Waldman W.J.:
Inability of cytomegalovirus infection of cultured endothelial to induce HLA class II
antigen expression.
Transplantation 1990;49:458-62
- 129 Sedmak D.D., Roberts W.H., Stephens R.E., Buesching W.J., Morgan L.A., Davis D.H.,
Waldman W.J.:
Cytomegalovirus inhibits major histocompatibility class II expression on infected
endothelial cells.
Am J Pathol 1994;144:683-692

7. Literaturverzeichnis

- 130 Seifert G., (zitiert von Seifert G.und Oehmke J.,132):
Über Kerneinschlüsse im menschlichen Pankreas
Zbl Path 1952;88:203
- 131 Seifert G., Geiler H., (zitiert von Seifert G.und Oehmke J.,132):
Zur Pathologie der kindlichen Kopfspeicheldrüse.
Beitr path Anat 1956;116:1
- 132 Seifert G., Oehmke J.:
Pathologie und Klinik der Cytomegalie.
Veb Georg Thieme Leipzig 1957;1-18
- 133 Sharples L.D., Scott J.P., Dennis C., Higenbottam T.W., Stewart S., Wreghitt T., Large S.R., Wells F.C., Wallwork J.:
Risk factors for survival following combined heart-lung transplantation.
Transplantation 1994;57:218-223
- 134 Sia I.G., Wilson J.A., Groettum C.M., Espy M.J., Smith T.F., Paya C.V.:
Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation.
J Infect Dis 2000;181:717-720
- 135 Sissons J.G.P., Borgsiewicz L.K.:
Human cytomegalovirus infection.
Thorax 1989;44:241-246
- 136 Stenberg R.M., Thomsen D.R., Stinski M.F.:
Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus.
J Virol 1984;49:190-199
- 137 Stovin P.G., Wreghitt T.G., English T.A.H., Wallwork J.:
Lack of association between cytomegalovirus infection of heart and rejection-like inflammation.
J Clin Pathol 1989;42:81-83
- 138 Stovin P.G., Sharples L., Hutter J.A., Wallwork J., English T.A.:
Some prognostic factors for the development of transplant related coronary artery disease in human cardiac allografts.
J Heart Lung Transplant 1991;10:38-44
- 139 Tong C.Y., Cuevas L.E., Williams H., Bakran A.:
Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative polymerase chain reaction.
Transplantation 2000;69:985-991
- 140 Toyoda M., Galfayan K., Galera O.A., Petrosian A., Czer L.S., Jordan S.C.:
Cytomegalovirus infection induces anti-endothelial cell antibodies in cardiac and renal allograft recipients.
Transpl Immunol 1997;5:104-111
- 141 Tsutsui Y., Yamazaki Y.:
Subcellular distribution of the major immediate early proteins of human cytomegalovirus changes during infection.
J Gen Virol 1991;72:1415-1419

- 142 Uretsky B.F., Murali S., Reddy P.S.:
Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisolone.
Circulation 1987;76:827-834
- 143 Ustinov J., Loginov R., Bruggeman C., Suni J., Häyry P., Lautenschlager I.T.:
CMV-induced class II antigen expression in various rat organs.
Transpl Int 1994;7:302-308
- 144 Van der Bij W., Torensma R. Van Son W.J., Anema J., SchirmJ., Tegzess A.M., The T.H.:
Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes.
J Med Virol 1988;25:179-188
- 145 Van Dorp W.T., Vlieger A., Jiwa N.M., Van Es L.A., Van der Ploeg M., Van Saase J.L.C.M., Van der Woude F.J.:
The polymerase chain reaction, a sensitive and rapid technique for detecting cytomegalovirus after renal transplantation.
Transplantation 1992;54:661-664
- 146 Van Dorp W.T., Jonges E., Bruggeman C.A., Daha M.R., Van Es L.A., Van der Woude F.J.:
Direct induction of MHC class I, but not class II, expression of endothelial cells by cytomegalovirus infection.
Transplantation 1989;48:469-472
- 147 Van Seventer G.A., Shimizu Y., Horgan K.J., Shaw S.:
The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells.
J Immunol 1990;15:144:4579-4586
- 148 Van Willebrand E., Pettersson E., Ahonen J., Hayry P.:
CMV infection, class II antigen expression, and human kidney allograft rejection.
Transplantation 1986;42:364
- 149 Van Zanten J., Van der Giessen M., Van Son W.J., The T.H.:
Antibody responses to human cytomegalovirus-specific polypeptides studied by immunoblotting in relation to viral load during cytomegalovirus infection.
J Med Virol 1993;39:80-87
- 150 Wagner J.A., Ross H., Hunt S., Gamberg P., Valantine H., Merigan T.C., Stinson E.B.:
Prophylactic ganciclovir treatment reduces fungal as well as cytomegalovirus infections after heart transplantation.
Transplantation 1995;60:1473-1477
- 151 Waldman W.J., Knight D.A., Huang E.H.:
An in vitro model of T cell activation by autologous cytomegalovirus (CMV)-infected human adult endothelial cells contribution of CMV-enhanced ICAM-1.
J Immunol 1998;160:3143-3151
- 152 Waldman W.J., Adams P.W., Orosz C.G., Sedmak D.D.:
T lymphocyte activation by cytomegalovirus-infected, allogeneic cultured human endothelial cells.
Transplantation 1992;54:887-896

7. Literaturverzeichnis

- 153 Waldman W.J., Knight D.A., Van Buskirk A., Adams P.W., Orosz C.G., Sedmak D.D.:
Endothelial HLA class II induction mediated by allogeneic T cells activated by
cytomegalovirus-infected cultured endothelial cells.
Transplant Proc 1993;25:1439-1440
- 154 Wattanamano P., Clayton J.L., Kopicko J.J., Kissinger P., Elliot S., Jarrott C., Rangan S.,
Beilke M.A.:
Comparison of three assays for cytomegalovirus detection in AIDS patients at risk for
retinitis.
J Clin Microbiol 2000;38:727-732
- 155 Weimar W., Balk A.H.A.M.M., Metselaar H.J., Mochtar B., Rothbarth P.H.:
On the relation between cytomegalovirus infection and rejection after heart
transplantation.
Transplantation 1991;52:162-164
- 156 Wiedemann J.T., Sissons J.P.G., Borysiewicz L.K., Sinclair J.H.:
Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood
mononuclear cells.
J Gen Virol 1991;72:2059-2064
- 157 Wilkens L., Werner M., Nolte M., Wasielewski R.V., Verhagen W., Flik J., Klempnauer
J., Georgii A.:
Influence of formalin fixation on the detection of cytomegalovirus by polymerase chain
reaction in immunocompromised patients and correlation to in situ hybridization,
immunohistochemistry, and serological data.
Diagn Mol Pathol 1994;3:156-162
- 158 Weber R., Willems W.R.:
Herpesviren.
Medizinische Mikrobiologie 1991; Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung:
62-69
- 159 Wolfe H.J., Ross D., Wolfe B.:
Detection of infectious agents by molecular methods at the cellular level.
Verh Dtsch Ges Pathol 1990;74:295-300
- 160 Woodruff J.F.:
Viral Myocarditis.
Am J Pathol 1980;2:428-479
- 161 Wreghitt T.G., Hakim M., Gray J.J., Wallwork J., Englisc T.A.H.:
Cytomegalovirus infections in heart and heart and lung transplant recipients.
J Clin Pathol 1988;41:660-667
- 162 Wu T.-C., Hruban R.H., Ambinder R.F., Pizzorno M., Cameron D.E., Baumgartner W.A.,
Reitz B.A., Hayward G.S., Hutchins G.M.:
Demonstration of cytomegalovirus nucleic acids in the coronary arteries of transplanted
hearts.
Am J Pathol 1992;140:739-747

7. Literaturverzeichnis

- 163 Zal B., Booth J., Chadwick J., Baboonian C.:
Epitope mapping of mouse monoclonal antibodies to the ppUL83 lower matrix phosphoprotein of human cytomegalovirus.
J Med Virol 1999;57:290-297
- 164 Zhao X.-M., Citrin B., Miller G.G., Frist W.H., Merrill W.H., Fischell T.A., Atkinson J.B., Yeoh T.-K.:
Association of acid fibroblast growth factor and untreated low grade rejection with cardiac allograft vasculopathy.
Transplantation 1995;59:1005-1009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R.M. Bohle, Oberarzt am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Giessen, danke ich ganz herzlich für seine ausgezeichnete Betreuung.

Herrn Prof. Niehuus, Physiker an der Fachhochschule Friedberg und Giessen, danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Zusätzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Bauer aus der Abteilung für Kinderkardiologie und Herrn Prof. Dr. med. Haberbosch aus der Abteilung für Kardiologie für die zur Verfügung gestellten Patientendaten danken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Wallenfels für ihre technische Hilfe.

Ich erkläre:

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

Heike Jennert

Lebenslauf

Heike Jennert, geb. am 24. Oktober 1969 in Bad Nauheim, verheiratet
Zaunkönigweg 4
65795 Hattersheim
Tel.: 06190-917181

Schulbildung

1976-1980	Besuch der Grundschule
1980-1989	Ernst-Ludwig-Gymnasium Bad Nauheim
18.05.1989	Reifeprüfung

Studium und berufliche Tätigkeit

WS 1989	Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen
1990-1996	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
01.01.1997 bis 30.4.1997	Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Kardiologie, Angiologie und Pulmonologie an der Universitätsklinik Heidelberg
1.5.1997 bis 31.1.1999	Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin am Stadtkrankenhaus Rüsselsheim
15.2.1999 bis 31.5.2002	Wissenschaftliche Angestellte in der Klinik für Diagnostische Radiologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen
seit 1.6.2002	Ärztliche Mitarbeiterin in der Praxis für Radiologie, Nuklearmedizin und Strahlentherapie an der Horst-Schmidt-Klinik in Wiesbaden