

Nils Lynen
Dr. med.

Qualitative und quantitative Polymerasekettenreaktion aus Blut- und Liquorproben HIV-1 infizierter Patienten zur Diagnose von HCMV-Enzephalitiden

Geboren am 06.08.1968 in Heidelberg
Reifeprüfung am 16.05.1987 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1989 bis zum WS 1995
Physikum am 15.03.1991 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Paris und Heidelberg
Staatsexamen am 08.11.1995

Promtionsfach: Neurologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Hacke

Das HCMV-Virus wurde, nachdem seine zentrale Rolle im Krankheitsverlauf immunsupprimierter Patienten festgestellt wurde, Gegenstand intensiver Forschung. Eine bei 40% aller HIV-seropositiven Patienten auftretende Komplikation ist die HCMV-Enzephalitis (Snider et al. 1983, Levy et al. 1985, Morgello et al. 1987). Gerade aber diese Infektion läßt sich in vivo mit herkömmlichen Nachweisverfahren nur schwer diagnostizieren (Pillay et al. 1993, Dix et al. 1994). Ein erfolgversprechender Ansatz schien daher die 1988 von Saiki et al. vorgestellte Polymerasekettenreaktion zu sein, mit der es möglich ist, einzelne Genabschnitte nachzuweisen (Saiki et al. 1988).

Anhand eines Patientenkollektivs von 17 Patienten im Stadium AIDS und einem Kontrollkollektiv von 12 immunkompetenten Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen untersuchten wir die Wertigkeit der PCR zur Diagnose einer HCMV-Enzephalitis. Als Referenz dienten 5 AIDS Patienten, die eine autopsisch gesicherte HCMV-Enzephalitis hatten. Alle untersuchten Blut- und Liquorproben waren antemortem gewonnen worden. Es zeigte sich, daß die nested-PCR sehr sensitiv HCMV sowohl im Blut als auch im Liquor nachwies. In peripheren Blutmonozyten fand sich mit dieser Methode in allen untersuchten Proben HCMV-DNA, während man im Liquor aller AIDS Patienten und bei 5 der 12 immunkompetenten Patienten HCMV-DNA nachweisen konnte. Die Häufigkeit des Nachweises von HCMV-DNA bei immungesunden bzw. latent infizierten Patienten zeigte, daß durch den rein qualitativen Nachweis von HCMV-DNA kein Rückschluß auf eine manifeste Erkrankung gemacht werden konnte.

Zur Differenzierung einer latenten von einer manifesten HCMV-Enzephalitis untersuchten wir die Proben nochmals mit Hilfe eines semiquantitativen PCR-Protokolls, bei dem durch serielle Verdünnungsreihen die Virusbelastung bestimmt wurde.

Im Blut konnte dabei auch mit der quantitativen PCR keine sichere Aussage für das Vorhandensein einer HCMV-Enzephalitis gemacht werden. Dies lag zum einen daran, daß sich die Virusbelastung von Patienten mit einer HCMV-Enzephalitis zu solchen ohne diese Diagnose nicht stark unterschied. Zum anderen ließ sich auch deshalb kein statistisch signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Virusbelastung von Patienten mit einer HCMV-Enzephalitis zu solchen ohne eine HCMV-ZNS Erkrankung machen, weil zu wenige Blutproben von Patienten mit einer gesicherten HCMV-Enzephalitis untersucht werden konnten. Es konnte jedoch als Tendenz beobachtet werden, daß Patienten mit einer gesicherten HCMV-Enzephalitis durchschnittlich 14 Viruskopien je 105 Bluteukozyten aufwiesen und damit eine im Vergleich zu den beiden anderen Patientengruppen deutlich

höhere virale Belastung hatten. Bei AIDS-Patienten ohne eine HCMV-Enzephalitis fand sich eine Virusbelastung von 1,6 je 105 Leukozyten, während immunkompetente Patienten durchschnittlich eine virale Last von 0,65 je 105 Leukozyten hatten.

In den Liquorproben von Patienten mit einer autoptisch gesicherten HCMV-Enzephalitis lag die durchschnittliche Virusbelastung bei 3.558 je 105 Zellen (1.667-5.333, Median = 3.333). Sie lag damit signifikant über der Virusbelastung sowohl von AIDS-Patienten ohne den Verdacht einer HCMV-Enzephalitis für die sich eine durchschnittliche Virusbelastung von 295/ 105 Zellen (9-1.000, Median = 281, $p < 0.01$) errechnete als auch über den Werten von immunkompetenten Patienten mit einer durchschnittlichen Virusbelastung von 52/ 105 Zellen (0-562, Median = 19, $p < 0.01$).

Zur Etablierung eines schnellen und kontaminationssicheren Routine-Screening-Verfahrens untersuchten wir 14 Liquorproben erneut mit Hilfe einer modifizierten single PCR, mit einem "cut off" der Nachweisgrenze bei 500 viralen Kopien je 105 Zellen, was den Nachweis latent infizierter Liquorproben verhindern sollte. HCMV-DNA wurde in allen Liquorproben der Patienten mit einer gesicherten HCMV-Enzephalitis gefunden. Bei weiteren 5 untersuchten AIDS-Patienten fand sich nur in 2 Proben ein positiver HCMV-Nachweis mit der single PCR. Beide hatten zuvor auch in der quantitativen PCR eine hohe Viruslast aufgewiesen. Bei keinem der 5 seronegativen Patienten ließ sich mit dieser Methode HCMV-DNA nachweisen. Die single PCR erwies sich somit in größeren Patientenkollektiven als geeignet zum routinemäßigen Screening und zum Erfassen von Patienten mit einem erhöhten Risiko einer HCMV-ZNS Erkrankung. Zur Bestätigung der single PCR sowie zur Bestimmung des Ausmaßes einer HCMV-Erkrankung sollte in jedem Fall eine quantitative PCR angeschlossen werden. Im Verlauf einer antiviralen Therapie kann die Virusbelastung als Surrogatmarker für das Ansprechen der Therapie genutzt werden sowie zum frühzeitigen Erkennen einer Resistenzentwicklung gegenüber antiviralen Medikamenten.