

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
des Zentrums für Diagnostik  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Leiter Dr. med. Sven Peine

**Untersuchung der Beziehung zwischen latenten Infektionen mit Cytomegalieviren,  
Seropositivität, DNA-Positivität und HLA-System bei gesunden Blutspendern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Julia Marie Wikner, geb. Krizak

aus Hamburg

Hamburg 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 05.08.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. Thomas Eiermann

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Martin Aepfelbacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Kai Gutensohn

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>S. 5</b>
1.1	Das Cytomegalievirus (CMV)	S. 6
1.2	Die Bedeutung von CMV in der Transfusionsmedizin	S. 12
1.2.1	CMV bei Blutspendern und Blutprodukten	S. 15
1.3	Das HLA-System	S. 17
1.4	CMV und Immunreaktion	S. 20
1.4.1	Immunevasion und Latenz	S. 20
1.4.2	HLA-I/II-Interaktion	S. 23
1.5.	CMV- Diagnostik	S. 26
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>S. 29</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>S. 30</b>
3.1.	Experimenteller Teil	S. 30
3.1.1	Vorversuche	S. 32
3.1.2	DNA-Isolation	S. 35
3.1.3	Konzentrationsmessung und –angleichung	S. 36
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion und <i>nested</i> -PCR	S. 37
3.1.5	Agarosegel-Herstellung	S. 40
3.1.6	(Gel-)Elektrophorese	S. 41
3.1.7	Enzymimmunoassay (EIA)/ CMV-Antikörnernachweis	S. 42
3.1.8	HLA-Typisierung	S. 42
3.2.	Statistischer Teil	S. 44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>S. 47</b>
4.1	Kollektivdaten Blut- und Thrombozytenspender	S. 48
4.2	Kollektivdaten potentieller Stammzell- und Knochenmarkspender	S. 51
4.3.	Ergebnisse der experimentellen Arbeit	S. 54
4.4.	Ergebnisse der statistischen Auswertung	S. 62
4.4.1	Ergebnisse Blut- und Thrombozytenspender	S. 63
4.4.2	Ergebnisse potentieller Stammzell- und Knochenmarkspender	S. 72
4.4.3	Allelfrequenzen	S. 84
4.4.4	Zusammenfassung der statistischen Auswertungen	S. 96
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>S. 98</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S. 115</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>S. 117</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang:</b>	
	Abkürzungsverzeichnis	S. 136
	Tabellenverzeichnis	S. 138
	Probentabelle A	S. 141
	Abbildungsverzeichnis	S. 147
	Eidesstattliche Versicherung	S. 149
	Danksagung	S. 150
	Lebenslauf	S. 151
	Eigene Veröffentlichungen	S. 152

## 1. Einleitung

Humane Cytomegalieviren (CMV), die nach einer Primärinfektion im Körper zu lebenslang latenten Infektionen führen können nach Organ- und Knochenmarktransplantation durch Reaktivierung -wie auch durch Neuinfektion- Ursache schwerer Komplikationen sein. Diese Infektionen sind Gründe für erhebliche Morbidität und Mortalität nach Organ- und Knochenmarkverpflanzungen. Infektionen mit CMV, die bei Gesunden in der Regel klinisch inapparent verlaufen, sind bei Patienten unter Immunsuppression Ursache lebensbedrohlicher Erkrankungen. Nach Transplantation von allogenen Knochenmark (bzw. von peripheren Stammzellen), der Leber oder Niere erlangen CMV-Infektionen erhebliche klinische Bedeutung. Man geht davon aus, dass auch durch transfundierte Blutprodukte humane CMV-Viren übertragen werden können. Nach gültiger Lehrmeinung gelten Blut- und Thrombozytenkonserven nach Leukozytendepletion mit weniger als  $10^7$  Leukozyten/Einheit bezüglich einer CMV-Übertragung und anschließender CMV-Infektion als eher unbedenklich (Bowden et al., 1995; Dumont et al., 2001; Hillyer et al., 1994; Pamphilon et al., 1999). Die Gabe CMV-seronegativer Blutprodukte zur Vermeidung einer CMV-Infektion wird nicht empfohlen. Die Fähigkeit der Kontrolle bzw. der Abwehr einer Virusinfektion wird auch durch die HLA-Ausstattung des jeweiligen Wirtes beeinflusst. Bei bestimmten HLA-Konstellationen können Menschen wahrscheinlich Virusinfektionen besser kontrollieren oder abwehren als andere mit abweichenden HLA-Konstellationen. So konnten Wada et al. 1997 in ihrer Arbeit zeigen, dass die HLA-Klasse II-Moleküle bei der Abwehr der CMV-Infektion eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Nach diesen Untersuchungen erscheinen CMV-infizierte HLA-DR9-positive Probanden, bezüglich der Bildung neutralisierender anti-CMV-Antikörper als *responder*, die mit HLA-DR15 als *non-* oder *low-responder* zu reagieren (Wada et al., 1997).

Es gibt Hinweise darauf, dass sich bei vielen seropositiven Spendern auch mit sehr sensitiven molekularbiologischen Nachweismethoden wie der *nested-PCR* (*polymerase chain reaction*; PCR) keine Virus-DNA (*deoxyribonucleic acid*, DNA) nachweisen lässt, sie jedoch im Blut CMV-seronegativer Spender gefunden werden kann. Der übertragenen latenten oder akuten Infektion kommt bei immunsupprimierten Empfängern trotz hohem Wissenstandes ein hoher Stellenwert zu.

## 1.1 Das Cytomegalievirus (CMV)

### *Aufbau des Virus*

Erstmals in einer Kultur angezüchtet wurde das CM-Virus durch Smith et al. 1956 (Smith, 1956). Verschiedene Virusstämme wurden beschrieben (AD169, Toledo, Towne, Davis, Kerr u.a.). Das Cytomegalievirus gehört zur Familie der humanen Herpesviren (HHV). Diese werden unterteilt in die  $\alpha$ -*Herpaeviridae* Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1, HHV-1), Herpes simplex Virus Typ 2 (HSV-2, HHV-2) und Varizella zoster Virus (VZV, HHV-3), die  $\gamma$ -*Herpaeviridae* Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4) und humanes Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) und in die Untergruppe der  $\beta$ -*Herpaeviridae*, zu der das CMV (HHV-5), das humane Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) und das humane Herpesvirus Typ 7 (HHV-7) gehören. Bei den  $\beta$ -*Herpaeviridae* liegt das Genom in Form einer doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit ca. 230.000 Basenpaaren (bp) vor, wobei eine exakte Bestimmung möglich ist. So besteht das Genom des CMV-Stammes AD169 aus 229345 Basenpaaren (Chee et al., 1990) und das der Stämme Towne und Toledo aus weiteren 20.000 bp (Cha et al., 1996). Bei allen HHV findet man unique (spezifische) Sequenzabschnitte. Das CMV-Genom wird daher in ein kurzes Segment (*unique short region*, US) und ein langes Segment (*unique long region*, UL) unterteilt. Während der Infektion einer Zelle liegt die DNA als ein zirkuläres Molekül vor, welches im Kernplasma der Wirtszelle verweilt. Beim CMV kodiert dieser Strang über 200 Genprodukte. Das CMV ist das Herpesvirus mit der höchsten Kodierungskapazität. Umgeben wird die DNA von einem Nukleokapsid, einer unstrukturierten Proteinmatrix, dem sog. Tegument und einer Hüllmembran, die sich aus einer Doppellipidschicht mit verschiedenen enthaltenen Glykoproteinen und nicht-glykolysierten Polypeptiden (virale und zelluläre Proteine) zusammensetzt (Abb.1).

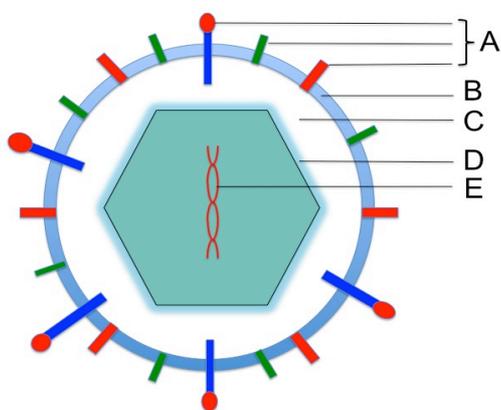


Abb.1: Schematisches Bild eines Virus

A) Glykoproteine, z.B. Glykoprotein B, gB; B) Virushülle; C) Tegument; D) Nukleokapsid; E) DNA, z.B. doppelsträngig

Letztgenannte bilden die Funktionseinheiten für Zelltransporte und Zellrezeptoren, die bei der Absorption, Penetration und Induktion der Wirtsantikörper eine wichtige Rolle spielen. Die Herpes-Glykoproteine B, D und H (gB, gD, gH) z.B. sind entscheidend an der Aufnahme des Virus in das Zytoplasma beteiligt. Gegen jedes dieser Polypeptide werden neutralisierende Antikörper gebildet. Durch die *unique long region 83* (UL83) wird z.B. auch das Phosphoprotein pp65 kodiert. Es handelt sich dabei um ein Tegumentprotein, eine Proteinkinase, deren Nachweis häufig in der CMV-Diagnostik verwendet wird.

### *Die Infektion*

Die Infektion des Wirtes durch das CMV wird in den lytischen Infektionszyklus und die lebenslange Latenz unterteilt. Die Virusreplikation ist zellassoziiert und kann in epithelialen Zellen, Endothelzellen, verschiedenen Parenchymzellen, duktalem Epithelzellen (z.B. Speicheldrüsen, Darm) und mononukleären Zellen des Blutes vorkommen (Fishman, 1998b). Das Virus hat einen langsamen Vermehrungszyklus und kann sich direkt von Zelle zu Zelle ausbreiten. Der lytische Anteil ist durch eine geordnete Aktivierung von Genen gekennzeichnet, in dem zunächst die die sehr frühen (*immediate early*, IE) Proteine (z.B. pp65), danach die frühen (*early*, E) Proteine (z.B. CMV-kodierte DNA-Polymerase) und zuletzt die späten (*late*, L) Proteine (v.a. Strukturproteine) kodierenden Gene aktiviert werden. Das Virus dringt in die Wirtszelle ein, die Hüllmembran verschmilzt mit der Zellmembran der Wirtszelle und das Nukleokapsid wandert in den Zellkern, wo es das Genom freisetzt. Im Zellkern wird die Transkription der Proteine initiiert. Die IE-Proteine koordinieren die Virusvermehrung und die Regulation der Zelle. Zum Beispiel wird der Transport der HLA-Antigene (MHC-Klasse-I-Proteine) zur Zelloberfläche verhindert. Bei der Betrachtung von CMV-Infektionen muss zwischen der Primärinfektion (Patient zuvor nicht infiziert und/oder anti-CMV-Antikörper-negativ), der Reaktivierung einer latenten Infektion (Patient mit Zustand nach CMV-Infektion und/oder anti-CMV-Antikörper-positiv) und der sekundären (es kommt zu einer erneuten Infektion mit z.B. einem anderen Virusstamm) unterschieden werden.

Die Primärinfektion ist charakterisiert durch eine Phase der aktiven Virusreplikation. Die Inkubationszeit beträgt 4-8 Wochen. Währenddessen kommt es zu einer Virämie. In dieser Zeit scheidet der Wirt Viruspartikel aus. Diese Infektion verläuft bei immunkompetenten klinisch inapparent oder mit einem Syndrom, das einer EBV-Infektion ähnelt. Dabei handelt es sich in der Regel um unspezifische Symptome, wie z.B. Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Gliederschmerzen/Myalgien und Halsschmerzen (Zanghellini et al., 1999). Im

Blutbild können infektassoziiert eine Thrombozytopenie und/oder eine Neutropenie auftreten (Prosch et al., 2000b). Nur in seltenen Fällen sind schwerwiegende Infektionen beschrieben worden (Eddleston et al., 1997).

Nach Ablauf der lytischen Phase beginnt die Latenz, die lebenslang bestehen bleibt. Das Virus bleibt in dieser Phase zellassoziiert. Zu einer Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion kommt es bei Immunsuppression, systemischen Entzündungen und bei Stresssituationen für den Organismus, bei denen es v.a. zu einer Störung der zellulären Wirtsimmunität kommt (Prosch et al., 2000b).

Zu einer Reaktivierung kommt es, wenn die CMV-spezifische CD4+ und CD8+-Zellantwort gestört ist. Die bestehenden Antikörper stellen keinen wirksamen Schutz dar.

Diagnostiziert wird eine Reaktivierung durch den Anstieg des Anti-CMV-IgG-Titers.

### *CMV-Übertragungswege*

Die Übertragung des Virus erfolgt i.d.R. von Mensch zu Mensch ohne einen Zwischenwirt. Bekannte Übertragungswege sind: intrauterin, peripartal, durch Muttermilch, enger Kontakt von Menschen aber auch familiäre Kontakte. Kinder können z.B. auch CMV-negative Eltern infizieren oder zu einer Sekundärinfektion mit einem anderen Virusstamm beitragen. Darüber hinaus stellen intime Kontakte, Bluttransfusion und Transplantation von Organen oder Stammzellen mögliche Übertragungswege dar (Diosi et al., 1967; Dworsky et al., 1983; Hayes et al., 1972; Munro et al., 2005; Pass et al., 2006; Stagno and Cloud, 1994; Stagno et al., 1980a; Stagno et al., 1980b).

Das Virus kann in Blut, Tränen, Urin, Speichel, Muttermilch, Sperma und vaginalem Sekret infizierter Personen nachgewiesen werden. In einer neuen Studie von Stowell et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass das Virus auch in der Lage ist bis zu 6 h außerhalb eines Wirtes auf feuchten oder angefeuchteten Oberflächen verschiedener Materialien zu überleben.

Wodurch sich weitere potentielle Übertragungsmöglichkeiten ergeben (Stowell et al., 2012).

### *CMV-Seroprävalenz*

In den Nicht-Entwicklungsländern liegt die allgemeine Seroprävalenz zwischen 40-70% und nimmt mit steigendem Alter zu (Lamberson and Dock, 1992; Prosch et al., 2000a). Die Faktoren weibliches Geschlecht und zunehmendes Alter konnten wiederholt als prädisponierende Faktoren bestätigt werden (Bevan et al., 1991; Hecker et al., 2004; Mustakangas et al., 2000; Stanberry et al., 2004; Ziemann et al., 2010). Die CMV-Seroprävalenz ist weltweit am höchsten in den Entwicklungsländern Süd- und

Mittelamerikas, Afrikas und Asiens. Untersuchungen haben gezeigt, dass Menschen mit niedrigem sozioökonomischen Hintergrund häufiger CMV-positiv sind (Kharrazi et al., 2010). In Entwicklungsländern findet man bei Frauen im gebärfähigem Alter bis zu 100% Durchseuchungsgrad u.a. in Chile, Südafrika und Indien (Manicklal et al., 2013). Die hohe Seroprävalenz lässt sich durch den bereits intrauterin beginnenden Prozess der Virusübertragung von der CMV-seropositiven Mutter an das Neugeborene, durch die Übertragung mit der Muttermilch, ein sehr enges Zusammenleben aus sozioökonomischen Gründen, etc. erklären. Diese Infektionen verlaufen in den meisten Fällen inapparent (Dworsky et al., 1983; Stagno and Cloud, 1994; Stagno et al., 1980b). Eine finnische Studie begleitete Kinder vom 3. Lebensmonat bis zum 8. Lebensjahr und untersuchte diese auf anti-CMV-Antikörper. Es zeigte sich, dass bereits mit 7 Monaten 27% der Kinder CMV-seropositiv waren. Bis zum 8. Lebensjahr stieg die Rate auf 41% (Aarnisalo et al., 2003).

#### *CMV-Infektion bei Immundefizienz*

Eine CMV-Infektion bei immundefizienten bzw. -supprimierten Individuen, dazu gehören z.B. Früh- und Neugeborene, HIV-/AIDS-Patienten und Patienten nach Transplantation von Organen oder Stammzellen kann trotz ständiger Verbesserung der frühzeitigen Virusdiagnostik und antiviraler Therapien immer noch Ursache komplizierter, lebensbedrohlicher Infektionen sein (Rubin, 1990). Schon lange ist bekannt, dass Infektionsverläufe im Rahmen einer Reaktivierung oder Reinfektion deutlich milder sind als bei Primärinfektion. Die Infektion kann sich in einem CMV-Syndrom zeigen, welches mit Fieber, Leukozytopenie, Müdigkeit, Arthralgien und/oder makulösem Erythem einhergehen kann. Komplizierend können Infektionen einzelner oder mehrerer Organe auftreten, z.B. Hepatitis, Enzephalitis, Chorioretinitis, Nephritis, Adrenitis, Enteritis oder Pneumonie (Dummer, 1990; Fishman and Rubin, 1998; Ibrahim et al., 1997; Reusser, 1992).

Das Cytomegalievirus stellt die häufigste infektiöse Ursache für angeborene Defekte des Neugeborenen dar. Die Inzidenz liegt zwischen 0,3% und 1,2% (Hamprrecht and Jahn, 2007). Das intrauterin erworbene Virus stellt die häufigste Ursache mentaler Retardierung und angeborener Taubheit dar. Die Übertragung erfolgt in der Regel durch eine erworbene Primärinfektion der Mutter. Kongenitale Symptome können alle Organsysteme betreffen (Pass et al., 2006; Stagno et al., 1982).

Zu CMV-Infektionen kommt es bei HIV-/AIDS- Patienten durch die Abschwächung der zellulären Immunität. Im Vordergrund stehen Infektion der Retina und des Magen-Darm-Traktes (Jacobson, 1997; Reusser, 1992).

Bei durch Immunsuppression bedingter Immuninkompetenz kann die CMV-Erkrankung auf unterschiedliche Weise ausgelöst werden. Eine Primär-, Sekundärinfektion oder Reaktivierung nach Transplantation eines serologisch CMV-positiven Organs oder Knochenmarkes ist denkbar. Darüber hinaus ist auch die Transfusion von CMV-positiven Blutprodukten bei bestehender immunsuppressiver Behandlung zu problematisieren (Kuhn, 2000; Sayers, 1994). Eine symptomatische Infektion tritt bei 20-60% aller transplantierten Patienten auf (Jenkins et al., 2003). Bei Patienten nach Organ- oder Knochenmarkstransplantation, erleiden 75% eine CMV-Primärinfektion oder eine CMV-Reaktivierung (Fishman, 1998a). Die CMV-Reaktivierung nach allogener oder autologer Stammzelltransplantation liegt bei ca. 30%. Bei CMV-seropositiven Empfängern als Hochrisikopatientengruppe sogar bei 72%. Von diesen bekamen 1% der Patienten eine CMV-Erkrankung (Ruell et al., 2007). Insbesondere die interstitielle CMV-Pneumonie ist eine regelmäßig auftretende Komplikation nach Knochenmarkstransplantation bzw. nach Übertragung von peripheren Stammzellen (de Medeiros et al., 2000; Einsele and Hebart, 1999). Die Sterblichkeit liegt unbehandelt > 80%, behandelt mit Ganciclovir zwischen 30 und 48% (Meyers, 1984; Nguyen et al., 1999). Kotsimbos et al. konnten bei 33% lungen-transplantierten Patienten *post transplantationem* eine CMV-Pneumonie dokumentieren (Kotsimbos et al., 1997). Diese Patienten verstarben in bis zu 76% der Fälle und in 96% der Erkrankten kam es zu einer chronischen *graft versus host disease* (GvHD) (Nguyen et al., 1999). Neben der CMV-Pneumonie treten gastrointestinale Ulzera und Retinitiden bei dieser Patientengruppe auf (Stocchi et al., 1999).

Nach Lebertransplantationen tritt bei 18-29% der Transplantierten eine CMV-Erkrankung auf (Singh et al., 2005). Mit CMV-Infektionen nach Lebertransplantation assoziiert ist eine erhöhte Anzahl an Leberventhrombosen über eine CMV-Modulation des Gerinnungssystems (Madalosso et al., 1998). In mehreren Arbeiten konnte eine erhöhte Anzahl an aufgetretenen Hepatitis C-Infektionen nach Lebertransplantation in Zusammenhang mit einer CMV-Infektion gebracht werden (Burak et al., 2002; Humar et al., 2007). Nach der Transplantation von Darmanteilen wurden bei serologisch CMV-negativen Empfängern ein erhöhtes Risiko für CMV-Enteritis, -Pneumonie und -Hepatitis gezeigt (Manez et al., 1995). Nach Herztransplantation CMV-seronegativer Empfänger mit CMV-positiven Organen traten bei 90,9% der Organempfänger symptomatische CMV-Infektionen auf (Grossi et al., 1995).

Neben akuten Krankheitsfällen sind CMV-Infektionen nach Transplantationen an akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen beteiligt. Die Untersuchung von Potena et al. (2003) zeigt,

dass eine CMV-Infektion Einfluss nimmt auf das koronare Remodeling nach einer Herztransplantation (Potena et al., 2003). Die renale Dysfunktion ist eine Komplikation während oder nach einer CMV-Infektion nach Kadavernierentransplantation (Baldwin et al., 1983).

Die verbesserten Therapieregime haben dieses Problem reduziert aber nicht eliminiert. Die preemptive Therapie nach Darmtransplantation kann z.B. eine CMV- Infektion nicht gänzlich verhindern (Manez et al., 1995). Die Medikamente der Wahl erzeugen zudem auch Resistenzen (Drew et al., 2001; Eid et al., 2008). Durch diese direkten und indirekten Effekte ist die CMV-Infektion ein entscheidender Faktor für die Prognose nach der Organtransplantation (Arthurs et al., 2008; Kijpittayarit-Arthurs et al., 2007; Limaye et al., 2006). Diese Daten zeigen die hohe Relevanz der Prävention der CMV-Infektion.

## 1.2 Die Bedeutung von CMV in der Transfusionsmedizin

### *Seroprävalenz bei Blutspendern*

Die Seroprävalenz des CMV bei deutschen Blutspendern liegt altersabhängig zwischen 33 und 73%.<sup>1</sup> Das entspricht auch einer vergleichbaren Arbeit aus New South Wales, Australien, in der gesunde Blutspender eine Seroprävalenz < 20 Jahre von 34,5%, bei 50-jährigen 72% hatten (Munro et al., 2005). Die jährliche Serokonversion bei deutschen Blutspendern liegt bei 0,55%. Die am häufigsten betroffenen Spender sind Frauen im Alter zwischen 30 und 35 Jahren (Hecker et al., 2004). Bei Thrombozytenspendern die zur Zytaphrese kommen ist die Rate etwas geringer (Boeke et al., 2008).

### *CMV-Infektion durch Blutprodukte*

Neben den o.g. Übertragungswegen, stehen insbesondere Transfusionen von Erythrozyten- und Thrombozytenpräparaten im Fokus als mögliche Infektionsquellen. Schon kurz nach der Erstbeschreibung der durch Bluttransfusion übertragenen CMV-Infektion wurde ein intaktes Virion des CMV erstmals auch im Blut gesunder Blutspender nachgewiesen (Diosi et al., 1969; Kaariainen et al., 1966). 1975 beschrieben Kane et al. 3% asymptotische Blutspender, unabhängig vom serologischen Status, bei denen die CMV-Anzucht im Urin gelang (Kane et al., 1975). In den 80er Jahren lag das Gesamtrisiko für eine CMV-Infektion nach Erhalt von Blutkomponenten bei 30-60% (Cervia et al., 2007; Meyers et al., 1986). Es gibt zahlreiche Studien, die vom Auftreten von Infektionen oder Erkrankungen nach Transfusion CMV-negativer Blutprodukte sowie leukozytendepletierter Konserven berichten (Bowden et al., 1995; Yeager et al., 1981).

Das Risiko einer posttransfusionellen CMV-Infektion ist dabei nachweislich auch abhängig von der Anzahl der erhaltenen Einheiten an Blutprodukten. Das Risiko pro transfundierte Einheit lag laut Preiksaitis et al. im Jahre 1988 insgesamt bei 0,14% und bei ca. 0,38% für CMV-seropositive Einheiten. Patienten, die mehr als 30 Konserven erhielten, hatten dabei ein signifikant höheres Risiko (Preiksaitis et al., 1988). Gesunde Spender von Vollblut oder Blutbestandteilen, die ggf. eine inapparent verlaufende primäre, sekundäre oder durch Reaktivierung induzierte CMV-Infektion haben, sind potentiell infektiös und können durch die routinemäßig durchgeführte Spenderbefragung nicht identifiziert werden (Ziemann et al., 2010). Um diese Probleme zu umgehen, sind in den letzten drei Jahrzehnten verschiedene

---

<sup>1</sup> Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesgesundheitsministeriums für Gesundheit: „Humanes Cytomegalievirus (HCMV)“; Bundesgesundheitsbl 2010 · 53:973–983 DOI 10.1007/s00103-010-1111-2; Springer-Verlag 2010 abgerufen am 10.10.2013 unter [http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/AK\\_Blut/Stellungnahmen/download/...](http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/AK_Blut/Stellungnahmen/download/...)

Maßnahmen zum Schutz der Risikopatientengruppen entwickelt worden. Dazu gehören die Anwendung von CMV-seronegativen Blutprodukten bei Risikopatienten und die Leukozytendepletion/-filtration. Der konsequente Einsatz serologisch CMV-negativer Blutprodukte bei seronegativen Empfängern von seronegativem Knochenmark führte zu einer nachweislichen Reduktion der Infektionshäufigkeit um ca. 90% (Bowden et al., 1995; Miller et al., 1991; Vamvakas, 2005). Bei CMV-seronegativen Empfängern von Blutprodukten wurde dadurch die Rate an transfusionsassoziierten CMV-Infektionen von 12,5% auf 1,8% gesenkt (Yeager et al., 1981). Foot et al. beobachteten 0,9% CMV-Infektionen und keine CMV-Erkrankungen bei Empfängern ausschließlich CMV-seronegativer Blutprodukte (Foot et al., 1998). Die zweite eingeführte Maßnahme war die Leukozytendepletion. Winston et al. und andere Autoren konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass eine eindeutig höherer Anzahl von transfusionsbedingten CMV-Infektionen nach Transfusion von leukozytenreichen Granulozytenpräparaten von CMV-seropositiven Spendern auftraten und dass nach Transfusion von frisch gefrorenem Plasma ebenfalls seropositiver Spender, das leukozytenarm ist, keine Infektionen beobachtet wurden (Bowden and Sayers, 1990; Winston et al., 1980). Die Rolle der mononukleären Zellen in der Übertragung des CMV durch das Blut wurde hervorgehoben. Es konnte abgeleitet werden, dass auch die Transfusion leukozytendepletierter Erythrozytenkonzentrate das Risiko transfusionsbedingter CMV-Infektionen reduzieren müsse. Durch Einführung der Leukozytendepletion konnte nachweislich die Anzahl der transfusionsbedingten CMV-Infektionen um 90% reduziert werden. Bowden et al. konnten bereits 1995 zeigen, dass Leukozytendepletionen zu weniger als 3% transfusionsassoziierten CMV-Infektionen führen. Sie verglichen die Rate an CMV-Infektionen oder Erkrankungen bei Empfängern CMV-seronegativer und leukozytendepletierter Blutprodukte, die keine preemptive Therapie erhielten. Bei Empfängern, die CMV-negative Blutprodukte erhielten, trat in 2,4% eine CMV-Infektion auf, aber es kam zu keiner CMV-Erkrankung. Bei Empfängern leukozytendepletierter Blutprodukte, trat je in 3,6% der Fälle eine CMV-Infektion, und ein Fall einer CMV-Erkrankung auf (Bowden et al., 1995). Die Effektivität der Leukozytendepletion führte zu einer Restinfektionsrate von unter 2,4% bei Patienten nach seronegativer-/seronegativer Stammzelltransplantation (Nash et al., 2012; Thiele et al., 2011). Wu und Mitarbeiter beschrieben 2010 ein Risiko von 6,5% einer *transfusion transmitted disease* im Sinne einer CMV- Infektion. Bis zu 0,23% konnten in Fällen leukozytendepletierter nicht auf CMV-untersuchter zellulärer Produkte ausgemacht werden (Wu et al., 2010).

Die Reduktion der Leukozytenzahl unter  $10^7$  Leukozyten/Einheit bei Erythrozyten- und Thrombozytenpräparaten gilt im Sinne des Übertragungsrisikos als eher unbedenklich (Bowden et al., 1995; Dumont et al., 2001; Pamphilon et al., 1999). Durch Aphaese hergestellte leukozytendepletierten Thrombozytenpräparate erhöhen das Basisrisiko einer CMV-Infektion nicht (Nichols et al., 2003). Für Plasmaprodukte wurde keine Übertragung von CMV beschrieben (Adler, 1988).

### 1.2.1 CMV bei Blutspendern und Blutprodukten

Neben der Beschreibung der Reduktion der beobachteten CMV-Infektionen und CMV-Erkrankungen beschäftigen sich viele Untersuchungen mit dem Nachweis von CMV-DNA im Blut von Blutspendern, bzw. in Blutprodukten. Die Ergebnisse verschiedener Studien mit dem Ziel des CMV-DNA-Nachweises zeigten, dass in Blutproben gesunder CMV-seronegativer und -seropositiver Individuen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) CMV-DNA nachweisbar ist. Die allgemeine Prävalenz der CMV-DNA in Blutprodukten durch auftretende Primärinfektionen bei Blutspendern wird auf 0,13% geschätzt (Ziemann et al., 2007).

#### *CMV-DNA bei seropositiven Blutspendern*

Vor der standardisierten Nutzung der Leukozytendepletion wurde bei 8,1% der seropositiven Blutspender CMV-DNA im Blut nachgewiesen (Smith et al., 1993). Eine Untersuchung von Blut seropositiver Blutspendern durch Zhang et al., wobei der *buffy coat* zur DNA-Extraktion genutzt wurde, erbrachte bei 2,7% einen CMV-DNA-Nachweis (Zhang et al., 1995). Larsson et al. gelang 1998 der Nachweis von CMV-DNA ebenfalls aus Leukozyten (PBMNC, *buffy coat*) in 41,4% der CMV-seropositiven Proben (Larsson et al., 1998). In bis zu 7,9% der Vollblutproben konnte ein DNA-Nachweis bei seropositiven gesunden Blutspendern geführt werden (Krajden et al., 1996). Roback et al. untersuchten gesunde Blutspender und fanden bei 0,2% seropositiver Blutproben CMV-DNA (Roback et al., 2003). Drew et al. fanden im Jahre 2003, dass CMV-DNA bei gesunden Blutspendern nach Serokonversion schon vor der Antikörperbildung nachgewiesen werden kann (Drew et al., 2003). Ziemann und Mitarbeiter bestätigten dies und nannten eine Nachweisrate zwischen 12%-62%, abhängig vom zeitlichen Abstand zum letzten negativen serologischen Status (Ziemann et al., 2007). Sie konnten zeigen, dass dies bis zu einem Jahr nach Serokonversion möglich ist (Ziemann et al., 2010).

#### *CMV-DNA bei seronegativen Blutspendern*

CMV-DNA kann auch in serologisch CMV-negativen Blutspendern gefunden werden. Larsson et al. fanden CMV-DNA in 13,6% der seronegativen Spender im Jahre 1998 (Larsson et al., 1998). In einer Studie von Nitsche et al. konnte in 19% ein DNA-Nachweis in Blutspenderproben gezeigt werden, davon 100% in Proben CMV-seronegativer Blutspender (Nitsche et al., 2000).

Einige Untersuchungen konnten weder in Proben gesunder CMV-seronegativer noch seropositiver Blutspender DNA nachweisen (Bitsch et al., 1992; Glock et al., 2003; Greenlee et al., 2002; Krajden et al., 1996; Urushibara et al., 1995).

Eindeutig ist, dass nach Einführung der Leukozytendepletion als standardisiertes Verfahren der Nachweis von CMV-DNA in Blutprodukten sank. Dumont et al. zeigten 2001, dass die Effektivität der Reduktion der CMV-DNA in Vollblut bei seropositiven Spendern durch Leukozytenfiltration 99,9% beträgt. Visconti et al. zeigen drei Jahre später, dass nach Leukozytendepletion noch 1,13 Kopien/ $\mu$ l DNA in Erythrozytenkonzentraten und 4,47 Kopien/ $\mu$ l DNA in Thrombozytenpräparaten zu finden sind (Visconti et al., 2004). Die Virämie in der Phase vor der Serokonversion scheint das entscheidende Problem zu sein, weshalb die CMV-Infektionen nach Transfusion trotz Verwendung von Leukozytendepletion und CMV-seronegativen Produkten weiterhin auftritt (Roback et al., 2000). Die jährliche Serokonversion bei deutschen Blutspendern liegt bei 0,55% (Hecker et al., 2004). Bei der aufgezeigten Studienlage werden CMV-seropositive Spender als potentiell infektiös für Risikopatienten betrachtet (Gajewski et al., 2008). Nach gegenwärtiger Meinung kann der Einsatz von CMV-seronegativen Blutprodukten das Risiko für eine CMV-Infektion erhöhen, da diese in der initialen Phase, vor der Serokonversion während der Virämie nur eingeschränkt erkannt werden können. Daher werden Blutprodukte von Spendern innerhalb des ersten Jahres nach der Serokonversion als potentiell infektiös und als gefährdend für Risikopatienten betrachtet. Am sichersten könnten daher leukozytendepletierete CMV-seropositive Blutprodukte von Spendern, die nach mehr als einem Jahr nach Serokonversion sind und die anti-gB-Antikörper-positiv sind (Ziemann and Hennig, 2014).

### 1.3 Das HLA-System

Die humanen Leukozytenantigene (HLA) spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. HLA-Moleküle dienen der Präsentation endo- und exogener Peptide. Es sind transmembranöse Proteine. Gene, die für die Produkte kodieren, liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6.

Ein Antikörper gegen ein humanes Leukozytenantigen wurde erstmals durch Dausset 1958 beschrieben (Dausset et al., 1958). Damit war der Grundstein der Entdeckung der HLA-Antigene gelegt. Er bezeichnete es damals als „MAC“. Heute ist es das HLA-A2. 1964 wurde damit begonnen, eine systematische und internationale Untersuchung des gefundenen HLA-Systems vorzunehmen. 1968 wurde das „WHO-Nomenclature Committee for factors of the HLA system“ gegründet. Dieses legte zentral die Benennung der gefundenen Antigene des HLA-Systems fest. Da sich 1970 auf dem Internationalen Histokompatibilitäts-Workshop auch eine einheitliche zelluläre Typisierungsmethode durchsetzte, konnte in dem Jahr nachgewiesen werden, dass die Merkmale an drei verschiedenen Genloci A, B und C lokalisiert sind. 1975 fand der Arbeitskreis heraus, dass ein weiterer Genort D existiert und auch Untergruppen vorhanden sind. Daher wurde erneut eine neue Nomenklatur festgelegt. Die Merkmale wurden z.B. als HLA-A2, HLA-Cw4, usw. bezeichnet. Diese Form der Nomenklatur wird bis heute als die „serologische Nomenklatur“ zusammengefasst. 1979 waren das erste komplette HLA-Klasse-I-Allel (damals HLA-B7.2) und das erste komplette HLA-Klasse-II-Allel (damals HLA-DRA1) entschlüsselt. 1987 wurde aufgrund der immer zahlreicheren Entschlüsselungen der HLA-Antigene, nicht zuletzt durch molekularbiologische Methoden, erneut die Nomenklatur verändert. Die ersten zwei Ziffern sollten weiterhin den serologischen, in der Regel auch mit der Allelgruppe identischen, Teil des Merkmals bezeichnen und zwei weitere Ziffern ein spezifisches Allel. Zudem wurde die Möglichkeit gegeben mit einer weiteren Ziffer Allele gleicher Aminosäuresequenz aber unterschiedlicher Nukleotidsequenzen hervorzuheben, z.B. HLA-B27011. Dabei wurden Merkmale, die an Hand ihrer Aminosäuresequenz entdeckt worden sind, mit einem Stern markiert, z.B. HLA-B\*2701. 1998 wurde die HLA-Datenbank des WHO-Komitees zur allgemeinen Nutzung freigegeben (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/> und <http://hla.alleles.org>). Regelmäßige monatliche Updates erfolgen durch die HLA-Informatik-Gruppe in Zusammenarbeit mit dem European Bioinformatics Institute mit Sitz im Vereinigten Königreich. Ende 2010 waren 4721 HLA-Klasse-I- und 1353 HLA-Klasse-II-Allele bekannt. Daher wurde bereits im Laufe des Jahres 2010 eine neue Nomenklatur eingeführt. Das erste Ziffernfeld beschreibt i.d.R. die

serologische oder zelluläre Spezifität. Das zweite Ziffernfeld bezeichnet die spezielle Zugehörigkeit zur Allelgruppe. Dabei ist immer die Aminosäuresequenz entscheidend. Das dritte Ziffernfeld beinhaltet Änderungen der Struktur des Allels, z.B. durch eine stumme Mutation, die zu einer Änderung der Nukleotidsequenz führt, aber keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hat. Für Variationen, die eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge haben, aber z.B. polymorphe Bereiche wie das Intron betreffen, steht ein viertes Ziffernfeld zur Verfügung. Zusätzlich wurden Buchstaben zur Kennung der Expression eingeführt, z.B. „N“ für „Null-Allel“, welches keine Proteine an der Zelloberfläche exprimiert. Die Ziffernfelder werden durch einen „Seperator“, den „:“, getrennt, so dass beliebig viele Allelgruppen und Allele bezeichnet werden können.<sup>2</sup>

Die HLA-Klasse-I-Antigene werden in HLA-A,-B und -C unterteilt. Der HLA-Klasse-I-Komplex ist aus einer schweren Kette und dem Beta2-Mikroglobulin zusammengesetzt. Der extrazelluläre Anteil der Alphakette ist in drei Domänen unterteilt, von denen die beiden äußeren die alloantigenen Determinaten tragen. Für die Genloci der drei HLA-Klasse-I-Untergruppen liegt ein ausgeprägter Polymorphismus vor. Zwischen den beiden äußeren Domänen aufgehängt, werden Peptide präsentiert. Die HLA-Klasse I Komplexe sind zuständig für die Präsentation von endogenen Proteinen und Virusproteinen bzw. deren Bruchstücken (Peptide).

Die HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DQ und -DP) setzen sich aus einer wenig polymorphen Alphakette und einer sehr polymorphen Betakette zusammen. An diesen Komplex können verschiedene exogene Peptide und Virusproteine gebunden und präsentiert werden. Werden diese durch T-Helferzellen erkannt, wird eine Immunreaktion initiiert. Vermehrt freigesetzte Zytokine aktivieren u.a. B-Zellen, die zur Bildung neutralisierender Antikörper angeregt werden.

Kennzeichnend für die HLA-Genprodukte ist ihre ausgeprägte Vielgestaltigkeit. Sie dient der HLA-Restriktion der Immunantwort. Das bedeutet, dass Zellen des Immunsystems nur gleichsinnig auf ein fremdes Peptid reagieren, wenn die beteiligten Partner das gleiche HLA-Genprodukt an der Zelloberfläche tragen. Eine peptidpräsentierende infizierte Zelle kann nur dann von einer CD8+ T-Zelle lysiert werden, wenn beide das gleiche HLA-I-Merkmal haben. Fremdsbstanz, die durch Monozyten präsentiert werden, können nur zu einer Stimulation

---

<sup>2</sup> am 11.10.2013 abgerufen unter <http://www.mta-dialog.de/thema/hla-system.htm>

von CD4+ T-Helferzellen führen, wenn diese mindestens ein gemeinsames HLA-Klasse-II-Merkmal haben.

Die HLA-Merkmale werden immer zur Hälfte von einem Elternteil an das Kind weitervererbt. Dadurch kommt es durch neue Kombinationen von Haplotypen immer wieder zu neuen Merkmalskombinationen. Diese Möglichkeiten der Vielfalt scheinen evolutionstechnisch erwünscht zu sein, da auf diese Art und Weise Individuen entstehen, die Bestandteile pathogener Erreger besonders effektiv den Zellen des Immunsystems präsentieren können. Die weltweit bekannten HLA-Merkmale unterscheiden sich z.T. sehr in ihrer Antigenfrequenz innerhalb der verschiedenen ethnischen Gruppen. Die Antigenfrequenz z.B. für DR9 ist bei Kaukasiern 0,8%, bei Mongoloiden 11,5% und bei Afrikanern 1,5%.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> V. Kiefel (2005) „HLA und Transplantation“, URL [www.tmed.uni-rostock.de/hla.pdf](http://www.tmed.uni-rostock.de/hla.pdf); abgerufen am 12.10.2013 unter <http://www.vkiefel.de/hla.pdf>; S. 21

## 1.4 CMV und Immunreaktion

Die Fähigkeit zur Kontrolle bzw. Abwehr einer Infektion durch ein Virus wird auch durch die HLA-Ausstattung des jeweiligen Wirtes mitbestimmt. Die im folgenden Abschnitt zitierten Studien weisen darauf hin, dass die humanen Leukozytenantigene u.U. einen Einfluss auf die Prädisposition bezüglich der CMV-Infektion haben. Darüber hinaus liefern sie Hinweise darauf, dass bestimmte HLA-Merkmale Einfluss auf die Qualität der Anti-CMV-Antikörper haben.

### 1.4.1 Immunevasion und Latenz

Im Laufe der Evolution haben Viren Wege gefunden der Immunantwort des Wirtes zu entgehen und dadurch bestimmte Formen der Persistenz zu erreichen. Insbesondere DNA-Viren haben spezifische Möglichkeiten der Immunevasion entwickelt. Dabei handelt es sich um einen Zustand, in dem nur das Virusgenom und einige virale Genprodukte vorliegen. Der Replikationszyklus ist inaktiv. Die Latenzphase ist durch nur geringen oder keinen quantitativen Virusnachweis gekennzeichnet. Das Virusgenom liegt in Form eines Episoms u.a. in den CD14<sup>+</sup> peripheren Monozyten und den CD33<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarks. Das Virus ist extrem wirtsspezifisch und zellassoziiert vorkommend (Wiertz et al., 1997). In einer künstlich erzeugten Reaktivierung *in vitro* konnte in >90% der Progenitor-Granulozyten Virusgenom nachgewiesen werden. *In vivo* fand man nach Gabe von Stimulation des Knochenmarkes im peripheren Blut CMV-seropositiver Spender 0,004-0,01% mononukleäre Zellen, die virales Genom enthielten (Slobedman and Mocarski, 1999). Als Zellen der Latenz in peripheren mononukleären Zellen sind bisher CD34<sup>+</sup>-positive hämatopoetische Progenitorzellen (Movassagh et al., 1996; Sindre et al., 1996), CD33<sup>+</sup>-positive hämatopoetische Progenitorzellen (Zhuravskaya et al., 1997), Monozyten (Taylor-Wiedeman et al., 1991), Dendritische Zellen (Soderberg-Naucler et al., 1997), neutrophile Granulozyten und Makrophagen identifiziert worden (Bolovan-Fritts et al., 1999; Larsson et al., 1998; Roback et al., 2007). 2014 veröffentlichten Soland et al. eine Studie, in der sie bei gesunden CMV-seropositiven Erwachsenen die perivaskuläre Stromazellen im Knochenmark als weitere Zellart zur Viruslatenz identifizieren konnten (Soland et al., 2014). Das Virus hat verschiedenen Mechanismen entwickelt dem Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Damit infizierte Zellen der Zytolyse durch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entgehen können, synthetisieren die Viren das Genprodukt UL18, ein HLA-Klasse-I-Homologon,

welches mit dem KIR-Rezeptor der NK-Zellen interagiert und deren physiologische Aktivierung verhindert (Leong et al., 1998; Reyburn et al., 1997). Bereits intrazellulär wird die Beladung der HLA-Klasse-I-Moleküle mit Viruspeptiden verhindert (Hengel et al., 1996). CMV beeinflusst auch die Anzahl der HLA-Moleküle, die an der Zelloberfläche infizierter Zellen präsentiert werden (Yamashita et al., 1993). Das geschieht durch die Beeinflussung der Stabilität der H-Ketten (Beersma et al., 1993). Durch die Reduktion der Anzahl wird entsprechend kein Viruspeptid an der Oberfläche präsentiert, wodurch diese infizierten Zellen der Erkennung durch die zelluläre Immunabwehr entgehen können. In der Viruskontrolle spielen insbesondere T-Helfer-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Limitierung der Virusreplikation und der Verhinderung der CMV-Erkrankung. Auch das Gen UL18 des CMV-Genoms kodiert für ein Protein, welches mittels eines Homologons die schwere Kette des MHC-I-Klasse Proteinkomplexes simuliert. Dies kann mit dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin interagieren. Beide zusammen können normalerweise als Komplex virale Antigene an der Oberfläche der Wirtszelle präsentieren. Durch das Homologon verarmen die Zellen aber an MHC-I-Oberflächenmolekülen und es wird kein Viruspartikel präsentiert, und auf diese Weise nicht mehr von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden und nicht durch natürliche Killerzellen lysiert werden. Diese Proteine spielen daher eine Rolle bei der Viruspersistenz. Der HLA-Klasse-I-Komplex scheint aber wenig Einfluss auf die Ausbreitung des Virus im Wirt zu haben. An dieser Stelle müssen andere Mechanismen, z.B. die humorale Immunabwehr, die entscheidende Rolle spielen (Polic et al., 1996). Wada et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass HLA-Klasse-II-Molekülen eine wichtige Rolle bei der CMV-Abwehr zukommt. Während HLA-DR9-Träger zu 93% neutralisierende Antikörper gegen die AD-1-Region des Glykoprotein B (gB) bildeten (*responder*), war das HLA-DR15-Allel bei 66,7% derer, die keine neutralisierenden Antikörper bildeten, vertreten (*low-/non-responder*). Daraus wurde geschlossen, dass bestimmte HLA-Klasse-II-Moleküle effektiver die Virusepitope präsentieren als andere (Wada et al., 1997). Während der Latenzphase werden die HLA-II-Antigene an der Oberfläche der infizierten Zelle herunterreguliert. Der Proteintransport in der Zelle wird durch Virusproteine blockiert. Dieser Umstand fördert die Immunevasion und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer lebenslangen Latenz (Slobedman et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass jedes HLA-Klasse-II-Merkmal mit einem anderen Epitop des gB-Proteins reagiert. Obwohl alle peripheren mononukleären Zellen, die ein bestimmtes HLA-Klasse-II-Merkmal exprimieren, in der Lage sind, ein HLA-restringiertes gB-Peptid gegenüber gB-spezifischen T-Zellen zu präsentieren, zeigten nicht alle Träger

eines bekannten HLA-Merkmals die entsprechende Immunreaktion auf das entsprechende gB-Peptid (Liu et al., 1993).

### *Glykoprotein B*

Beim CMV entspricht dem Glykoprotein B-Protein ein Homologon, das durch die *unique long region 55* (UL55) kodiert wird und im Vorläufermolekül aus 906 Aminosäuren besteht. Daraus entstehen durch proteolytische Spaltung, durch eine Furinprotease an Position 406, ein Heterodimer mit einem aminoterminalen gB93 und einem carboxyterminalen gB55 Anteil, welche durch Disulfidbrücken verbunden bleiben. Das Glykoprotein B ist an der Aufnahme der Herpesviren in das Zytoplasma der Wirtszelle beteiligt. Über das gB-Protein nimmt das CMV Kontakt zur Wirtszelle auf, die einen gB-Rezeptor hat. Danach kann die Zellmembran mit der Virusmembran verschmelzen und das Virus die Zelle infizieren (Compton et al., 1992). Dieser Vorgang ist auch von Zelle zu Zelle möglich. Gegen diesen Komplex werden die meisten neutralisierenden Antikörper gebildet (Bold et al., 1996; Wagner et al., 1992). Diese sind wichtig, um das Eindringen von Viren in die Zellen zu verhindern und dämmen damit die extrazelluläre Präsenz des Virus ein (Wang et al., 1996). Studien haben gezeigt, dass v.a. die Präsentation der terminalen Strukturen des viralen Glykoprotein B die B- und T-Zellantwort stimulieren (Liu et al., 1991).

### 1.4.2 HLA-I/-II-Interaktion

Die Bedeutung der humanen Leukozytenantigene (HLA) in Zusammenhang mit Prädisposition und Protektion gegenüber CMV-Infektionen und -Erkrankungen wurde durch verschiedene Autoren beschrieben. Unterschiedliche Moleküle der HLA-Klasse-I und -II sind aufzuführen.

#### *HLA-Klasse-I*

Einige Arbeiten berichten über Assoziationen zwischen einem HLA-Molekül und der anti-CMV-Antikörperbildung. In einer Gruppe japanischer gesunder Blutspender war HLA-A33 signifikant häufiger mit einem CMV-negativen Serostatus assoziiert. HLA-A33-Träger könnten daher als *non-/low-responder* bezeichnet werden (Machida et al., 1998).

Aber auch andere immunologische Parameter scheinen im Zusammenhang mit einer CMV-Infektion mit bestimmten HLA-Molekülen assoziiert zu sein. In einer Gruppe von chinesischen Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten hatten, waren Serokonversion und Antigenämie (pp65) signifikant häufiger bei Patienten, die die HLA-Merkmale A2 und DR11 aufwiesen. Bei DR11-Träger konnte in 100% der Fälle eine Antigenämie gezeigt werden. In einer Gruppe mit niedrigem Antigennachweis war A11 signifikant häufiger (Fan et al., 2006). In der Arbeit von Ma et al. war A24 mit einem geringeren pp65-Antigennachweis assoziiert (Ma et al., 2011).

Der IE1-2-Genotyp kann häufiger in HLA-A3-Trägern gefunden werden, ist jedoch unterrepräsentiert in Patienten mit dem DR11-Allel (Retiere et al., 2003).

#### *HLA-Klasse-II*

Analog zu den HLA-Klasse-II-Merkmalen sind auch Zusammenhänge der HLA-Klasse-II-Merkmale mit immunologischen Reaktionen im Rahmen einer CMV-Infektion beschrieben. HLA-Klasse-II-tragende infizierte Zellen präsentieren ein Virusantigen gegenüber Zellen des Immunsystems, die das gleiche HLA-Klasse-Molekül tragen und aktiviert diese, z.B. B-Zellen zur Bildung neutralisierender Antikörper. Es scheint, dass abhängig vom präsentierenden HLA-Klasse-II-Molekül z.B. die Effektivität der Antikörperbildung differiert. Wada et al. zeigten bereits 1997, dass ein Zusammenhang zwischen den HLA-DRB1-Merkmalen und der Antikörperreaktion des Wirtes besteht. HLA-DR9-Träger waren gute Antikörperbildner, sogenannte *responder*. Im Gegensatz dazu war die Gruppe der HLA-

DR15(DR2)-Träger signifikant häufiger CMV-seronegativ getestet, entsprechend sogenannter *low-/non-responder*. Daraus folgerte die Arbeitsgruppe, dass in Japan, das Merkmal HLA-DR9, unter den CMV-infizierten Individuen, mit der häufiger auftretenden Bildung von neutralisierenden Antikörpern assoziiert ist, und das HLA-DR15(DR2) mit der fehlenden bzw. nicht nachweisbaren Bildung von Antikörpern verbunden sein könnte (Wada et al., 1997). Für HLA-DRB1\*0901-Träger fielen erhöhte Werte einer pp65-Antigenämie nach Knochenmarkstransplantation bei den Empfängern auf (Ma et al., 2011).

Die T-Zellproliferation wird hauptsächlich durch HLA-DR-restringierte CD4-positive T-Zellen vermittelt (Gehrz et al., 1987). Der Einfluss des HLA-Klasse-II-Einflusses auf die Antikörperbildung wurde durch andere Arbeiten untermauert. Bei Patienten mit CMV-infektionsassoziiertes Transplantatfunktionseinschränkung nach Nierentransplantation konnte gezeigt werden, dass fast alle Patienten (90%), die anti-CMV-IgM-Antikörper bildeten, also HLA-DR3- oder DR7- positiv waren (Baldwin et al., 1983).

Studien zeigten, dass die mononukleären Zellen aller CMV-seropositiven Blutproben in Anwesenheit von CMV proliferieren. Bei der isolierten Stimulation mit rekombinantem gB proliferierten bei allen Probanden die mononukleären Zellen jedoch nicht gleichermaßen (Gehrz et al., 1991).

Die Proliferationsrate gB-spezifischer T-Zelllinien von *gB-high* und *-low-respondern*, die nur in einem DR-Allel mit den präsentierenden Zellen übereinstimmten wurden untersucht. Zellen der *gB-high-responder* bildeten nach der Stimulation immer Antikörper, die mit beiden, den N-terminalen gp93 und C-terminalen gp55-Anteilen des Glykoprotein B reagierten. Dagegen hatten *low responder* nur gp55-spezifische Antikörper, aber keine gp93-spezifischen Antikörper gebildet. Homozygote DR15-, DR4-, DR13-, DR14- und DR3-Träger zeigten wenig oder keine gB-Antikörper-Bildung; *gB-non-/low-responder* (Curtsinger et al., 1994).

Die Arbeit von Ishibashi et al. zeigte, dass z.B. Glykoprotein H zur Bildung von stamm-spezifischen neutralisierenden Antikörpern führt. Bei CMV-Infektion zeigten 86% der Patienten nach Nierentransplantation die erwartete Bildung von anti-gH-Antikörpern, wohingegen die anderen 16% keine bildeten. HLA-DR10 und DR11 waren mit einer geringeren Bildung von virus-neutralisierenden gH-Antikörpern assoziiert (Ishibashi et al., 2009).

### *Andere CMV/ HLA-Assoziation*

Neben den aufgeführten Assoziationen zwischen CMV-Infektionen und den immunologischen Reaktionen des Wirtes wird durch verschiedene Autoren über zahlreiche Assoziationen des Virus zu HLA-Merkmalen berichtet, was die Bedeutung der CMV-HLA-Interaktion unterstreicht.

Wiederholt wird HLA-DR7 prädisponierend für den Erwerb einer CMV-Infektion oder CMV-Erkrankung beschrieben (Blanco et al., 1992; Chen et al., 2001; Kraat et al., 1994; Schrier et al., 1994, 1995).

Yamada et al. zeigten, dass Patienten nach Knochenmarkstransplantation, die Merkmalsträger des HLA-B51 oder -B52 ein signifikant höheres Risiko haben an einer interstitiellen CMV-Pneumonie zu erkranken. Bei 81% der HLA-B51/-B52-Träger trat die CMV-Infektion bedingt durch eine Reaktivierung auf (Yamada et al., 2000).

## 1.5. CMV Diagnostik

Verschiedene Verfahren zur Diagnostik einer CM-Virusinfektion sind bekannt und werden im Folgenden vorgestellt.

### *Indirekte Verfahren*

#### *Zytologie/Histologie*

Die mit CMV-infizierten Zellen zeigen spezifische Veränderungen. Insbesondere der Nachweis von intranukleären Einschlusskörperchen und die Vergrößerung des Zellkerns sind pathognomonisch. Diese Zellen werden als Eulenaugen-Zellen oder Riesen-Zellen bezeichnet.

#### *Serologie*

In den 80er Jahren wurden Anti-CMV-Antikörper-Suchteste in der Untersuchungsroutine eingeführt, die Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin G (IgG) nachweisen konnten. Deren Nachteil besteht in einem diagnostischen Fenster, das zwischen dem Zeitpunkt des Erwerbs der Infektion und der Bildung der Antikörper liegt (IgM 1-2 Wochen, IgG 2-3 Wochen) (Beneke et al., 1984). Die standardisierte Diagnostikmethode bei gesunden Blutspendern stellt der serologische Nachweis von Antikörpern gegen Glykoproteine der Hüllmembran dar, v.a. das Glykoprotein B. Dazu werden Komplementbindungsreaktionen oder *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) -Tests verwendet. Bei den ELISA muss zwischen denen unterschieden werden, die nur IgG- oder auch zusätzlich IgM-Antikörper nachweisen können. Bei Tests, die nur IgG nachweisen können, verbleibt ein diagnostisches Fenster bis zur Bildung der IgG-Antikörper. Im ELISA macht man sich das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zu nutze. Das Grundprinzip besteht in der hochspezifischen Bindung eines zu bestimmenden Antigens durch einen Antikörper. Das zu bestimmende Antigen wird in eine Mikrotiterplatte pipettiert, an deren Wandungen spezifische Antikörper gebunden sind. Es wird ein mit einem Tracer, einem Enzym, gekoppeltes Agens beigefügt, welches gemeinsam mit dem Antigen um die freien Bindungsstellen konkurriert. Nach der Inkubationszeit werden alle nicht gebundenen Moleküle ausgewaschen. Es folgt die Substratzugabe für das Enzym, eine sogenannte chromogene Lösung, welche eine Indikator-Reaktion auslöst, deren Produkte photometrisch bestimmt werden können. Es wird umso mehr Farbstoff gebildet, je mehr Enzym als Tracer an die Antikörper der Wandungen binden kann. Je mehr nachzuweisendes Antigen jedoch in der Probe vorhanden ist, desto weniger

Tracer bindet an die Antikörper. Die quantitative Messung wird durch parallel laufende Messung mit Standards bekannter Konzentration ermöglicht.

#### *T-Zell-Antwort*

Die quantitative Messung der CMV-spezifischen CD4+ und CD8+-Zellen erlaubt die frühe Identifizierung von Risikopatienten. Ein Abfall der Zellzahl begünstigt eine Infektion bzw. Reaktivierung.

### ***Direkte Verfahren***

#### *Zellkultur*

Um die Serokonversionen bei gesunden Spendern zu detektieren, versuchte man initial den direkten Nachweis im Urin von Spendern durch Virusanzucht. Das Verfahren ist langwierig und aufwendig (Kane et al., 1975). Alternativ kann man sich den zytopathischen Effekt in der Kultur zunutze machen, welcher bei positivem Ergebnis bereits nach ca. drei Tagen sichtbar wird.

#### *CMV-pp65-Antigentest*

Es handelt sich um einen immunzytologischen Nachweis des pp65-Antigens in Granulozyten. Mononukleäre Zellen werden mit Antikörpern markiert, die pp65 binden können. Vorteile dieser Methode sind die hohe Spezifität und Sensitivität, die Möglichkeit der Quantifizierung und die hohe Prädiktivität für eine bestehende CMV-Erkrankung. Von Nachteil ist der Test bei Neutropenie, die insbesondere im Rahmen von Infektionen vorkommen kann. Als Untersuchungsmaterial kommt nur Blut in Frage. Es ist anzumerken, dass es sich nicht um ein standardisiertes Verfahren handelt.

#### *PCR*

Dieses Verfahren weißt DNA-Abschnitte bekannter Gene des CMV nach. Häufig verwendete Ziele (*targets*) der kurzen Sonden (*primer*) der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte des CMV-Genoms sind die Gene UL83, kodierend für pp65, UL122/123, kodierend für IE-1, UL54, kodierend für DNA-Polymerase und UL55, kodierend für das gB-Protein. Vorteile dieser Methode sind eine hohe Spezifität und Sensitivität, die mögliche Quantifizierbarkeit und die hohe Prädiktivität für eine CMV-Erkrankung. Die Untersuchung kann aus allen Körperflüssigkeiten und Materialien erfolgen. Die PCR kann eine CMV-Erkrankung früher als der pp65-Antigen-Test nachweisen. Von Nachteil ist, dass ein CMV-DNA-Nachweis nicht

zwangsweise zu einer CMV-Erkrankung führen muss, und dass bei der hohen Empfindlichkeit der Methode falsch positive Ergebnisse durch Kontaminationen im Labor auftreten können. Erst nach Einführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) war es theoretisch möglich, potentiell infektiöse Individuen vor nachweisbarer Serokonversion aufzuspüren. Die PCR wurde erstmals durch Saiki et al. 1985 beschrieben (Saiki et al., 1985). Diese etablierte sich als effektive CMV-DNA-Nachweismethode. Die schnellste und zuverlässigste Methode der Diagnosestellung bei einer akuten CMV-Infektion stellt die CMV-PCR dar. Vorzuziehen ist diese, da einzelne Studien nachgewiesen haben, dass es serologisch CMV-negative Spender gibt, bei denen sich mittels PCR CMV-DNA nachweisen ließ (Larsson et al., 1998).

### *Quantiferontest*

In diesem neuen Verfahren wird die spezifische zelluläre Immunität durch Messung der Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen gegen CMV untersucht. Zellen, die über ein bestimmtes HLA-Klasse-I-Molekül (A1, A2, A3, A24, B7, B8, B27, B35, B44, B52) verfügen und definierte Viruspeptide (pp-65, IE-1, IE-2, pp50, gB) präsentieren können, werden von Antigen-spezifischen T-Zellen (CD4+, CD8+) detektiert. Die Messung der Interferon- $\gamma$ -Konzentrationen erfolgt mittels *Enzyme Immunosorbent Assays* nach 18-24 Stunden.

## 2. Fragestellung

Die Fähigkeit der Kontrolle bzw. der Abwehr einer Virusinfektion wird nach Studienlage durch die HLA-Ausstattung des jeweiligen Wirtes mitbestimmt. Bei bestimmten HLA-Konstellationen können Menschen wahrscheinlich Virusinfektionen besser kontrollieren oder abwehren als andere mit abweichenden HLA-Konstellationen. Zur Verbesserung der Möglichkeit der Prophylaxe und der optimalen preemptiven Therapie bei immunsupprimierten Patienten mit übertragenen latenten oder akuten CMV-Infektionen kommt einer verbesserten Eingrenzung eines Risikoprofils ein hoher Stellenwert zu.

Vor den Hintergrund der aufgezeigten Literatur ergaben sich folgende Fragen in Zusammenhang mit diesem Projekt.

### *Experimenteller Nachweis*

Kann die hochsensitive molekularbiologische DNA-Nachweismethode, die *nested-PCR*, mit Einsatz der *primer* gB1-gB4 (UL-55) CMV-DNA im Blut gesunder serologisch CMV-positiver und/oder -negativer Blut- und Thrombozytenspender nachweisen?

### *Gemutmaßte statistische Zusammenhänge*

Besteht ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der *nested-PCR*, ggf. einer DNA-Positivität, zum CMV-Antikörper-Status und zu einem oder mehreren HLA-Merkmalen bei Blut- und Thrombozytenspendern? Von besonderem Interesse sind in der Literatur erwähnte Träger des Merkmals HLA-DR15.

Besteht bei gesunden potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern ein Zusammenhang zwischen HLA-Merkmalen und dem CMV-Antikörperstatus? Gibt es eine Assoziation von vermutlichen *low-* oder *non-respondern* bzw. *respondern* zu bestimmten HLA-Typen?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Experimenteller Teil**

Die Proben für den experimentellen Teil dieser Arbeit wurden im Rahmen der routinemäßigen Untersuchung des Blutes gesunder Blut- und Thrombozytenspender des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland gesammelt. Jedem Spender werden nach der Blutkomponentenspende routinemäßig 50 ml Blut zu diagnostischen Zwecken entnommen. Es erfolgt eine ausführliche infektiologische Diagnostik, u. a. eine serologische Bestimmung des CMV-Status, und die Bestimmung von ausgewählten Laborparametern. 10 ml dieses EDTA-Blutes wurden von Blut- und Thrombozytenspendern zur DNA-Isolierung abgenommen. Die Spender haben der Verwendung der Proben zugestimmt. Es bestand ein *informed consent*.

Zur Blut- und Thrombozytenspende sind grundsätzlich Frauen und Männer zwischen dem 18. und 68. Lebensjahr zugelassen, die regelmäßig durch die ärztlichen Mitarbeiter des Blutspendedienstes untersucht werden. In Einzelfällen kann nach ärztlicher Untersuchung sogar über das 68. Lebensjahr hinaus gespendet werden. Potentielle Spender, die zum Zeitpunkt der Probensammlung und Datenerhebung für diese Arbeit folgende Kriterien erfüllten wurden nicht zur Spende von Blutbestandteilen zugelassen (sog. Spenderrückstellgründe):

- erfolgte Schutzimpfung innerhalb der letzten vier Wochen
- röntgendiagnostische Maßnahmen in den vergangenen 4 Wochen
- Medikamenteneinnahme in den letzten 3 Wochen (auch Schmerzmittel)
- Arbeitsunfähigkeit, Erkrankungen, Fieber, Durchfall in den letzten 4 Wochen
- Zahnextraktionen in den letzten 7 Tagen
- endoskopische Eingriffe in den letzten 6 Monaten
- Krankenhausbehandlung bzw. operative Eingriffe seit der letzten Spende (bzw. in den letzten 6 Monaten)
- ungeschützter Sexualkontakt mit einem/r neuen Partner/in oder mit wechselnden Partnern in den letzten 4 Monaten
- Kontakt mit Gelbsuchtkranken in der Familie oder am Arbeitsplatz sowie Intimkontakt mit HIV-positiven, mit AIDS- bzw. Hepatitis-Risikopersonen oder mit Syphiliskranken
- Aufenthalt außerhalb von Europa

Für Frauen gelten zusätzlich als Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- Fehlgeburten oder Schwangerschaftsunterbrechungen

Durch diese Art der Vorselektion wird ein guter Gesundheitszustand der Blut- und Thrombozytenspender gewährleistet. Sie gelten als gesund. Dadurch soll eine Gefährdung der potentiellen Empfänger vermieden werden. Zum Zeitpunkt der Probensammlung für diese Untersuchung wurden im Gegensatz zu Blutspendern die Thrombozytenspender nur zur Spende zugelassen, wenn diese serologisch CMV-negativ waren. Ansonsten galten für Thrombozytenspender dieselben Ausschlusskriterien. Daher war es möglich, Proben von beiden Spenderkollektiven in die Probensammlung aufzunehmen. Die Sammlung der Proben erfolgte stich-probenartig in verschiedenen Zeitblöcken zwischen November 2002 und April 2003 (Daten der Probensammlung: 18.11. 2002- 27.11.2002 (Probe 1-113); 11.12.2002- 17.12.2002 (Probe 114-244); 07.07.- 21.07.2003 (Probe 245-366)). Die Proben 1-113 stammen von Thrombozytenspendern und die Proben 114-366 von Blutspendern. Ohne ein bestimmtes Kriterium vorzugeben, z. B. Alter, Geschlecht oder CMV-Status, wurden die Proben von den verantwortlichen MitarbeiternInnen des Blutspendedienstes im Rahmen der Routine der Blut- oder Thrombozytenspende entnommen. Zusätzlich wurden aus der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf (Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. Axel Rolf Zander, seit 2012 Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger) Proben (10 ml EDTA- Blut) von Patienten mit nachweislich aktiver CMV-Infektion gesammelt, die als Positivkontrollen in der experimentellen Versuchsreihe dienten. Das gesamte Kollektiv bestand aus den gesammelten Proben von 366 Spendern (113 Thrombozytenspender, 253 Blutspender). Im Rahmen der Aufarbeitung ergaben sich wiederholt Ausschlusskriterien\* für einige der Proben, sodass im Endeffekt 290 Proben in die endgültigen molekularbiologischen Versuchsreihen eingingen und in der Auswertung aufgeführt werden.

**\*Ausschlusskriterien:**

1. DNA in nicht ausreichender Menge isolierbar
2. hochgradige DNA-Verunreinigung (pure DNA:  $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8$ )
3. fehlende Daten zum Spender der Probe

### 3.1.1 Vorversuche

In den Vorversuchen ging es um die Etablierung der für die Arbeit entscheidenden Labormethoden unter unseren räumlichen Bedingungen. Ziel war es ein „Standardrezept“ und eine „Standarddurchführung“ für die *nested*-PCR zu etablieren.

#### *Quantifizierung der nested-PCR*

Zur Quantifizierung der *nested*-PCR wurde eine Referenzprobe bekannter CMV-Genomäquivalente (Kopien/ml) verwendet. Die Probe stammte aus einem Ringversuch. Diese dienen Laboren der internen Qualitätskontrolle in der Virusdiagnostik. Die verwendete Probe stammt aus dem „Ringversuch Virusgenom-Nachweis PCR-/NAT-CMV; Polymerase Chain Reaction (PCR) und andere Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis von Cytomegalievirus; Programm C, Gruppe 365, November 2002“, Probennummer 15039. Die Probe war ein lyophilisiertes Zell-Lysat aus MRC-5-Zellkulturen, das mit CMV infiziert war. Sie wurde mit Aqua bidest. (steril, pyrogenfrei, PCR-Grade) suspendiert (bei vorgegebenem Volumen 0,5 ml ergeben sich für HCMV-Zell-Lysat Nr. 15039 ca. 1.150.000 Kopien/ml (Genomäquivalente)). Es wurde eine Verdünnungsreihe für den CMV- Standard Nr. 15039 angesetzt, der zur Ermittlung der quantitativen Nachweisgrenze dienen sollte. Die Probe wurde mit 0,55 ml Aqua bidest. suspendiert, damit eine Konzentration von 1000 Kopien/ $\mu$ l als Ausgangslösung zu Verfügung stand. Zu beachten ist, dass bei der Verdünnung jeweils die theoretisch enthaltenden Genomäquivalente (Kopien/ml) rechnerisch ermittelt wurden. Daraus ergab sich z.B. für die Verdünnung von 1:1000 rechnerisch 1 Genomäquivalent/ $\mu$ l. Bei Proben im Bereich von 1 Genomkopie besagt die *Poisson*-Verteilung, dass in 37% der Proben mit einem Volumen von 1 $\mu$ l keine CMV-DNA enthält, während die anderen 63% eine oder mehr Genomkopien enthalten könnten (Roback et al., 2001). Im durchgeführten Versuch wurde die Referenzprobe mit theoretisch folgenden Genomäquivalenten in die *nested*-PCR eingebracht: 10000, 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100, 10, 1. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit Aqua bidest. gemacht.

#### *Interne Kontrolle-Human growth hormone (HGH)*

Die Replikation eines DNA-Abschnittes des humanen Wachstumshormons (*human growth hormone*, HGH) wurde im Verlauf der Vorversuche in den Reaktionsansatz mit eingebaut, da dies als interne Kontrolle für den Nachweis humaner DNA im einzelnen Versuchsansatz dienen sollte. Es gehört zu den sog. „*house keeping genes*“, die jeder menschlichen Zelle

eigen sind. Es wurde in den ersten Vorversuchen zunächst ein HGH-*primer*-Paar (HGH-s1; HGH-as4) verwendet, dessen Produkt 439 Basenpaare (bp) groß war. Da das Produkt in der Größe mit dem Produkt der ersten PCR der *nested*-PCR (gB1/gB2; 459 bp) nahezu übereinstimmte, und diese beiden sich in der Gelelektrophorese schlecht voneinander unterscheiden ließen, wurde ein anderes HGH-*primer*-Paar (Tab.1) in der *nested*-PCR etabliert, dessen Produkt 1070 bp hat und sich damit eindeutig von dem gB1/gB2-Produkt unterscheiden ließ. Um einen möglichst geringen DNA-Verbrauch durch das HGH-kodierende *primer*-Paar zu haben, wurden die HGH-*primer* im Vorversuch in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) getestet. In weiteren Vorversuchen wurde ermittelt, ob die Produkte der Glykoprotein-B-*primer* (gB1-4) und die HGH-*primer* sich gegenseitig Konkurrenz machen könnten. Es wurden Versuche durchgeführt, in denen jeweils nur das eine und das andere Produkt amplifiziert wurde, und wiederum beide zusammen.

**Tab. 1: Verwendete HGH-Primer mit Aminosäuresequenz und Angabe der PCR-Produktgröße**

Primer	Aminosäuresequenz	Produkt
HGH-S3 ( <i>sense-primer</i> )	5'-CAG TGC CTT CCC AAC CAT TTC CTT A-3'	439bp
HGH-AS4 ( <i>antisense-primer</i> )	5'-ATC CAC TCA CGG ATT GCT GTT GTG TTT C-3'	
HGH-S1 ( <i>sense-primer</i> )	5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'	1070bp
HGH-AS2 ( <i>antisense-primer</i> )	5'-GTC CAT GTC CTT CCT GAA GCA-3'	

#### *Positivkontrolle/Negativkontrolle*

Erste Vorversuche fanden mit den später als Positivkontrollen verwendeten Proben statt. Dazu wurde die DNA der Patienten mit nachweislich aktiver CMV-Infektion verwendet. Zum Beispiel die Probe einer klinisch CMV-erkrankten Patientin, 33 Jahre alt, mit Zustand nach allogener Stammzelltransplantation bei Haarzell-Leukämie. Die Diagnose war serologisch und immunogenetisch bestätigt. Die photometrische Konzentrationsmessung ergab bei dieser Probe eine DNA-Konzentration von 295 µg/ml. Diese wurde auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt. Die Vorversuche mit den Positivkontrollen zeigten, dass im ersten Teilschritt (1. PCR, gB1- und 2-*primer*) der *nested*-PCR stets nur die HGH-Bande erschien. Im zweiten Teilschritt (2. PCR, gB3- und 4-*primer*) aber die HGH-Bande und die erwartete gB3/gB4-Bande (gB3/gB4; 249 bp) sich darstellten. Als Negativkontrolle diente zweifach destilliertes

Wasser, Aqua bidest.. Die PCR-Reaktion fand unter den in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Bedingungen statt.

#### *DNA Size Marker*

Um die Größe der Amplifikationsprodukte beurteilen zu können, wurde ein DNA-Größen-Marker eingesetzt (z.B. Olerup SSP™DNA Size Marker, Fa. Olerup SSP AB, Saltsjöbaden, Schweden, Bioline HyperLadder II™, Fa. Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland). Das ist ein Agenz mit einer definierten Anzahl bekannt großer DNA-Fragmente, das als Referenz in einer Gelelektrophorese verwendet werden kann, um die Größe der Amplifikationsprodukte bestimmen zu können. Der verwendete Olerup SSP™ DNA Size Marker zeigt Referenzbanden von 50-1000 bp und die verwendete Bioline HyperLadder II zeigt Referenzbanden von 50-2000 bp. Letztere ist exemplarisch in Abbildung 2 aufgeführt.

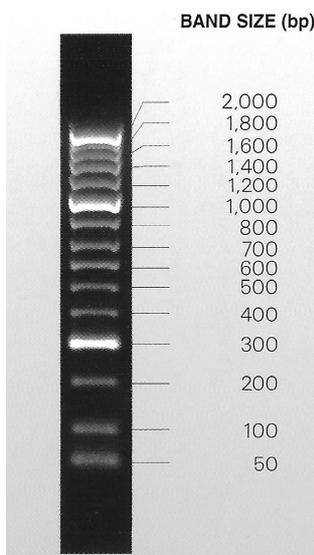


Abb.2: Bioline HyperLadder II (Fa. Bioline)

Mit dem in den Vorversuchen gefundenen „Standardrezept“ und einer etablierten „Standarddurchführung“ unter konsequenter Einhaltung der räumlichen Trennung von Prä- und Post-PCR-Arbeitsschritten folgte der Ansatz der Hauptversuchsreihen mit den gesammelten Blutproben der Blut- und Thrombozytenspender mittels *nested*-PCR.

### 3.1.2 DNA-Isolation

Nach der Abnahme der EDTA- Proben durch die MitarbeiterInnen des Blutspendedienstes wurden diese ordnungsgemäß im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Innerhalb von max. 48 h erfolgte die Extraktion der DNA. Dafür wurde ein allgemein etabliertes kommerzielles Extraktions-System (Super Quick-Gene Isolation Kit (Analytical Genetic Testing Center [AGTC], Denver, CO, USA) verwendet. Der Extraktion zugrunde liegt die von Jiwa et al. 1989 erstbeschriebene Aussalzmethode (Jiwa et al., 1989). In diesem Fall diente 10 ml EDTA-Blut, bzw. der daraus isolierte *buffy coat* als Ausgangsmaterial. Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach Hersteller-anweisung. Die Proben wurden für 5 min bei 3000 upm zentrifugiert. Die Auftrennung der Blutkomponenten erfolgt dabei in drei makroskopisch sichtbare Fraktionen wie in Abbildung 3 dargestellt: Serum (A), *buffy coat* (B) und Erythrozyten (C). Der *buffy coat* enthält die kernhaltigen Zellen (z.B. Monozyten, Makrophagen, u.a.), welche zur DNA-Extraktion benötigt werden.

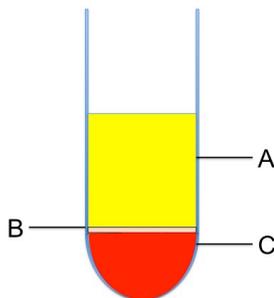


Abb. 3: Fraktionen der Blutkomponenten nach Zentrifugation: A) Plasma, B) mononukleäre Zellen; *buffy coat*, C) Erythrozyten

Die *buffy coats* wurden in Spitzbodenröhrchen umpipettiert, dem 7 ml gekühltem (4°C) Erythrozyten-Lyse-Puffers zugefügt wurde. Es folgte je 15 min Rühren auf einem Rollenmischer (z.B. HECHT Assistent Rollenmischgerät RM5 Taumel-Rollenmischer, Fa. Hecht, Sondheim, Röhn) und erneutes Zentrifugieren (5 min, 3000 upm). Der klare rötliche Überstand wurde dekantiert, der Rand des Röhrchens mit einem Labortuch (Fa. Kimberley-Clark Professionel, Koblenz-Rheinhafen, Deutschland) gesäubert und die am Boden abgesetzten korpuskulären Bestandteile wieder mit 7 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer beschichtet und erneut auf dem Rollenmischer gerührt. Danach wurden die Röhrchen wieder zentrifugiert (5 min, 3000 upm). Der Überstand wurde dekantiert. Zurück blieb der Bodensatz aus nicht-lysierten Leukozyten. Ein möglicherweise zurückgebliebener Erythrozytensaum am

Bodensatz der Röhrcchen wurde durch tröpfchenweises Pipettieren von Erythrozyten-Lyse-Puffer und vorsichtiges Schwenken ausgewaschen. Zu den gereinigten Zellpellets wurden je 2-3 ml Leukozyten-Lyse-Puffer gegeben. Nach ca. 5 min Schütteln auf dem Vortexer (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland), mit dem Ziel die Leukozytenzellmembranen zu zerstören, wurden die Röhrcchen bei 55°C für 20 min in einem Wasserbad inkubiert.

Danach wurde 0,2 ml eines 10%igen SDS-Puffers und 0.5 ml Protein-präzipitierendes Reagenz zugefügt und 1 min kräftig geschüttelt. Es folgte die Zentrifugation für 20 min bei 13000 upm. Die präzipitierten Proteine erschienen als Bodensatz und im klaren wässrigen Überstand verblieb die DNA. Der Überstand wurde in ein neues Röhrcchen übertragen und mit je 2 Volumenteil 98%igem 4°C kaltem Ethanol überschichtet. Unter leichtem Schwenken wurde eine Schlieren-bildende Zwischenschicht sichtbar. Dabei handelte es sich um das DNA-Präzipitat (DNA-Faden). Diese wurden mit Hilfe eines Kunststoffhäkchens bzw. einer Impföse, bekannt aus der Mikrobiologie, vorsichtig aufgefädelt und entnommen. Nach Abstreifen des Alkohols auf Parafilm®M (Fa. Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) wurde die DNA in je 110 µl Aqua. bidest. überführt. Abschließend wurde kurz auf einem Vortexer gerüttelt, um die optimale Auflösung und Verteilung der DNA innerhalb der Flüssigkeit zu gewährleisten. Diesen Vorgang unterstützten wir zusätzlich durch 2-3-tägiges Aufbewahren der DNA-Suspension im Kühlschrank bei 4°C bevor die Proben bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurden.

### **3.1.3 Konzentrationsmessung und -angleichung**

Im nächsten Schritt wurde die DNA-Konzentration der Proben photometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte photometrisch mit Hilfe eines Spectrophotometers (z.B. Pharmacia Ultrospec 1000 UV, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Die Konzentration von Nukleinsäuren wird bei 260 nm im UV-Spektrometer bestimmt. Die Lichtabsorption erfolgt in diesem Fall bei 260 nm und 280 nm. Zur Messung erfolgte die Verdünnung der extrahierten gelösten DNA 1:100 (5 µl + 495 µl). Von dieser Dilution wurden jeweils 21 µl in die Messzelle der Quarzküvette bläschenfrei pipettiert. Vor der ersten Messung und nach jeder 10. Messung erfolgte die Kontrolle des Referenzwertes mit Aqua bidest.. Nach jeder einzelnen Messung wurde die Küvette mehrfach mit gereinigtem Wasser gespült, die Spülflüssigkeit abgesaugt und die Küvette getrocknet. Bei der Photometrie wurde die Absorption des Lichtes bei 260, 280 und 320 nm gegen den Referenzwert gemessen und

durch das Spektrophotometer die Konzentration (1) und die Ratio (Optische Dichte; OD<sub>260 nm/280 nm</sub>) (2) der gemessenen Doppelstrang (ds)-DNA errechnet.

(1) *Formel:*

$$\text{Konzentration K} = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} \times 100 = X \text{ } \mu\text{g DNA/ml}$$

(2) *Formel:*

$$\text{OD } A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = \text{Ratio (Quotient)} (>/= 1.8 \text{ bzw. } </= 2.0); \text{ optimal } 1.8$$

Die Ratio  $\geq 1,8$  kennzeichnet eine gut gereinigte DNA,  $<1,8$  eine mit Proteinen und aromatischen Substanzen kontaminierte DNA. Ein Wert über 2.0 deutet auf eine Kontamination mit RNA hin. Die genannten Substanzen können eine PCR stören. Aus der ds-DNA-Konzentration wurde jeweils die notwendige Verdünnung der Probe berechnet, um die einheitliche Zielkonzentration für die *nested*-PCR von 100 ng/ $\mu$ l DNA zu bekommen. Proben, deren Konzentrationen unterhalb dieses Wertes lagen, mussten konsequenterweise in einer größeren Menge eingebracht werden, um eine einheitliche DNA-Menge in jedem Versuchsansatz zu erhalten. Bei gemessener DNA-Konzentration unterhalb 10 ng/ $\mu$ l wurde die Probe ausgeschlossen. Wir entschieden Proben mit einer Ratio von  $> 1,5$  und  $< 2,1$  in die Versuche mit der *nested*-PCR einzuschließen. Falls kein auswertbares PCR-Ergebnis zustande käme, sollten diese Proben aus der Auswertung herausgenommen werden.

### 3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und *nested*-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte bei bekannter Nukleotidsequenz. Sie wurde von K. Mullis et al. 1986 erstmals beschrieben und angewendet (Mullis et al., 1986). Es wurden seitdem verschiedene Abwandlungen dieses Verfahrens entwickelt, wie z.B. die *nested*-PCR, *real-time* PCR, u.a.. Die PCR ist eine etablierte Methode in der CMV-Diagnostik. Benötigt werden zwei Oligonukleotide, sog. *primer*, die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden Abschnittes hybridisieren. Der Abschnitt ist in der Regel  $< 1$  kbp lang, um die Fehlerrate bei der Amplifikation möglichst gering zu halten. Zusätzlich wird eine ausreichende Menge der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dGTP, dTTP, dCTP und eine spezielle, thermostabile Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*) benötigt. Für mehrere Proben wird daraus ein Mastermix angesetzt. Dieser wird auf die Cups verteilt und die DNA einzeln dazu pipettiert. Die PCR ist ein vollautomatisiertes Verfahren,

das in einem programmierbaren "Thermal-Cycler" abläuft. Die DNA-Doppelhelix wird im ersten Schritt thermisch denaturiert und dabei in zwei Einzelstränge zerlegt. Die folgende Abkühlung ermöglicht die Hybridisierung der *primer*, sog. Annealing. Sie binden an die komplementären Abschnitte der Einzelstränge. Diese verbundenen Abschnitte stellen für die Polymerase Signalstellen dar, an denen der Anbau von Nukleinsäuretriphosphaten katalysiert wird. Von diesen ausgehend werden nun in beide Richtungen, antiparallel, komplementäre Stränge synthetisiert, sog. Elongation. Anfang und Ende dieses Amplifikates werden durch die beiden Primer, sense- und antisense- primer, definiert. Dieser Zyklus wird mit demselben Reaktionsansatz 20-30mal wiederholt. Nach jedem Zyklus wächst die Anzahl der amplifizierten Stränge exponentiell.

### *Nested-PCR*

Für die Untersuchung der gesammelten Proben wurde eine Variation der ursprünglichen Methode gewählt; die *nested-PCR*. Sie unterscheidet sich von der herkömmlichen PCR, dadurch dass es zwei nacheinander ablaufende PCR-Reaktionen gibt. Das gesuchte Endprodukt ist das Amplifikat der zweiten PCR-Reaktion. In der 1. PCR-Reaktion entsteht ein Amplifikat, aus dem wiederum in der 2. PCR ein kleinerer Abschnitt amplifiziert wird. Mit diesem Verfahren wird die Spezifität erhöht. Diese spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion ist durch die zwei aufeinander folgenden Reaktionen mit zwei verschiedenen *primer*-Paaren besonders genau aber auch besonders anfällig für Verunreinigungen mit Fremd-DNA. Sie erfordert daher genauestes Arbeiten. Schon kleinste Mengen kontaminierender Fremd-DNA (insbesondere PCR-Produkte, die die zu amplifizierende Sequenz enthalten) können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Es muss daher immer mit neuen Handschuhen gearbeitet werden. Die einzelnen Arbeitsschritte müssen auf verschiedene Räume aufgeteilt erfolgen. Das Labor muss die Möglichkeit haben, einen Prä- und einen Post-PCR-Bereich einrichten zu können. In unserem Arbeitsbereich haben wir es einrichten können, dass die Arbeitsschritte entsprechend räumlich getrennt ablaufen konnten. Die Isolation der DNA fand in einem Bereich statt, der nicht im normalen Laborbetrieb involviert war, das heißt auch DNA für andere Untersuchungszwecke isoliert wurde. Das Vorbereiten und Pipettieren des Mastermixes in die Thermocycler-Platten für die 1. PCR fand im sog. Prä-PCR-Labor statt. Die Verdünnung des Produktes aus der 1. PCR auf 1:100 und das Pipettieren dessen in die vorbereiteten Thermocycler-Platten für die 2. PCR fanden in einem Laborbereich statt (am anderen Ende des Flures, ca. 20 m entfernt), in dem keine PCR-Verfahren durchgeführt werden. Die DNA oder die Amplifikate wurden stets zuletzt in die

tubes pipettiert. Das Auftragen der PCR-Produkte auf die Agarosegelplatten und die folgende Gelelektrophorese wurden im sog. Post-PCR-Labor durchgeführt. Das Pipettieren der DNA und der Amplifikate erfolgte stets mit Filterspitzen. Während aller Arbeitsschritte wurden Handschuhe getragen, die zwischen den einzelnen Schritten stets gewechselt wurden.

### *Glykoprotein-B-primer*

Das Ziel der durchgeführten *nested*-PCR war der Nachweis eines konservierten Abschnitts des CMV-Genoms innerhalb des Gens UL55, das das Glykoprotein-B kodiert.

Die Tabelle 2 folgt Meyer et al. 1999 und gibt einen Übersicht der verwendeten Primer (Meyer et al., 1999).

**Tab. 2: Verwendete Primer in der Glykoprotein-B-nested-PCR**

Primer	Nukleotidsequenz
gB1 ( <i>sense-primer</i> )	5`-CAA GAG GTG AAC ATG TCC GA-3`
gB2 ( <i>antisense-primer</i> )	3`-AGT CGA TAA GAG AGC CGG TA-5`
gB3 ( <i>sense-primer</i> )	5`-GGT TTG GTG GTG TTC TCG CA-3`
gB4 ( <i>antisense-primer</i> )	3`-AG CGT CTT CGG ACC ACA CAC-5`

#### *1. PCR-Ansatz gB1/gB2*

- 5 µl PCR-Puffer
- 5 µl dNTP (100 µM)
- je 2,5 µl gB1- /gB2- Primer (0,1 µM)
- je 2,5 µl HGH- sense-/antisense- Primer (0,5 µM)
- 0,5 µl Polymerase (2,5 Units)
- 1 µl DNA- Dilution (100 ng/µl)
- gereinigtes Wasser zum Erreichen von 50 µl Ansatzvolumen

*Programm 1. PCR (Thermo-Cycler, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 Thermal (Fa. Perkin Elmer, Wellesley, USA):*

1x	Initiale Denaturierung	94°C	4 min
30x	Denaturierung	94°C	1 min
	Anlagerung	60°C	1 min
	Verlängerung	72°C	1 min
1x	Finale Verlängerung	72°C	10 min
	Beendigung	10°C	forever

## 2. PCR-Ansatz gB3/gB4

- 5 µl PCR-Puffer
- 5 µl dNTP (100 µM)
- je 0,5 µl gB3- /gB4- Primer (je 0,05 µM)
- je 0,5 µl HGH- sense-/antisense- Primer
- 0,5 µl Polymerase (2,5 Units)
- 1 µl Amplifikat - Dilution (Produkt gB1/gB2 aus der 1. PCR 1:100 verdünnt)
- gereinigtes Wasser zum Erreichen von 50 µl Ansatzvolumen

Programm 2. PCR (Thermo-Cycler, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 Thermal (Fa. Perkin Elmer, Wellesley, USA):

1x	Initiale Denaturierung	94°C	4 min
30x	Denaturierung	94°C	1 min
	Anlagerung	65°C	1 min
	Verlängerung	72°C	1 min
1x	Finale Verlängerung	72°C	10 min
	Beendigung	10°C	forever

Tab. 3: Anzahl der Basenpaare der PCR- Produkte

PCR-Produkt	Anzahl der Basenpaare
gB1/gB2 (Produkt 1. PCR)	550 bp
gB3/gB4 (Produkt 2. PCR)	250 bp
HGH s3/as4 (1)	439 bp
HGH s1/as2 (2)	1070 bp

### 3.1.5 Agarosegel-Herstellung

Die Amplifikationsprodukte der PCR können elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die Gele bestehen aus dem Polysaccharid Agarose. Um die aufgetrennten Fragmente im UV-Licht sichtbar zu machen fügt man den Gelen Ethidiumbromid zu. Dies ist ein Interkalator, der nach Bindung an Desoxyribonukleinsäure unter UV-Licht eine starke Fluoreszenz zeigt. In dieser Arbeit wurde stets ein 2%-iges Agarose-Gel benutzt. Zu dessen Herstellung werden 4 g Agarose unter Erhitzung auf über 100°C in 200 ml TEA<sup>1)</sup>-Puffer aufgelöst. Anschließend werden 5 µl Ethidiumbromid zugefügt. Die auf ca. 70°C abgekühlte flüssige Agarose wird nun zügig in die dafür vorgesehene Gelwanne gegossen in der sog. Kämme eingehängt wurden, die später

Vertiefungen „Taschen“ im Gel zurücklassen, in die eine gefärbte Trägersubstanz mit dem PCR-Produkt pipettiert werden. Das abgekühlte Gel wird in der Gelwanne liegend nach Entfernung der Kämme in der Elektrophoresekammer mit TEA-Puffer bedeckt.

Reagenzien z.B. für ein 2%-iges Agarosegel:

200 ml TEA<sup>1)</sup>-Puffer

4 g Agarose

5 µl Ethidiumbromid (100 µg/ml)

<sup>1)</sup>(TEA-Puffer: *Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TEA-Puffer) Fa. AppliChem*

<i>Zusammensetzung:</i>	<i>EDTA . Na<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O:</i>	<i>18,61 g/l (0,05 M)</i>
	<i>Eisessig :</i>	<i>60,05 g/l (1 M)</i>
	<i>Tris:</i>	<i>242,28 g/l (2 M)</i>

### 3.1.6 (Gel-)Elektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, um PCR-Produkte sichtbar zu machen und ihre Größe zu bestimmen. Die Beweglichkeit von Molekülen in einem elektrischen Feld gegebener Stärke (V) hängt von ihrer Größe, der Form der Moleküle und von ihrer Ladung ab. Bei Nukleinsäuren ist das Verhältnis Ladung zu Masse konstant, da alle Nukleotid-Bausteine ähnliche Massen haben und jeweils eine negative Ladung tragen. Daher hängt die Beweglichkeit nur von der Masse der Moleküle ab. Der Vergleich mit einer sog. DNA-Leiter erlaubt die Identifikation der einzelnen Produkte anhand ihrer Molekülgrößen. In diesem Fall wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet, bei dessen Herstellung besonders darauf geachtet wurde, dass die Reagenzien, das Gießen des Gels und das Bestücken des Gels immer im post-PCR-Raum stattfand, um eine Kontamination mit Fremd-DNA zu verhindern. Um das Pipettieren der Amplifikationsprodukte der 1. und 2. PCR in der Elektrophoresekammer zu erleichtern, wurden je 10 µl des PCR-Produktes mit je 1 µl Ladepuffer vermischt. Neben den Amplifikationsprodukten werden DNA-Längenstandards aufgetragen. In dieser wurden zwei verschiedene DNA-Leiter verwendet: HyperLadder II (Fa. Bionline/ DNA Size Marker, Olerup SSP). Die optimale Auftrennung der PCR-Produkte fanden wir nach ca. 60 min Wanderung bei ca. 120 V. Auf einem UV-Transilluminator z.B. ECP-26.LMX Multiband-Transilluminator (Fa. LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg/B, Deutschland) wurden die Produkte durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Die Gele wurden mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

### 3.1.7 Enzymimmunoassay (EIA)/ CMV-Antikörpernachweis

In der Klinik für Transfusionsmedizin in der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf kam ein Mikropartikel-Enzymimmunassay (MEIA) zur Bestimmung der CMV-IgG-Antikörper in Serum oder Plasma zur Anwendung (AxSYM® CMV IgG, Fa. Abbott-Labs, Abbott Park, IL, USA). Zur Bestimmung können EDTA-, Heparinat- und Natriumcitratblut verwendet werden. Es handelt sich dabei um eine semiquantitative Methode, die Hinweise auf eine frühere oder akute Infektion mit CMV geben kann. Das Vorliegen von mindestens 15 Antikörper-Einheiten pro 1 ml Probe (AE/ml) ist ein Indiz für eine zurückliegende oder akute CMV-Infektion. Antikörper-Konzentrationen unter 15 AE/ml gelten als negativ für Anti-CMV-IgG-Antikörper.

### 3.1.8 HLA-Typisierung

Die molekularbiologische Bestimmung der HLA-Klasse-I und –II- Merkmale erfolgt auf Ebene der Antigene und Allele. Diese Methode wird zur Untersuchung von Spendern und Empfängern vor einer Organ- oder Stammzelltransplantation sowie zur Abklärung von Krankheitsassoziationen verwendet. Als Methode steht die Polymerase-Kettreaktion zur Verfügung stehen. Mit sequenzspezifischen *primern* werden gezielt bekannte HLA-Sequenzen amplifiziert (*sequence-specific-priming* (SSP)). Im Anschluss ist eine Sequenzierung möglich.

#### *Sequence-specific-priming* (SSP)

Die SSP ist eine etablierte Methode zur HLA-Allel-Typisierung. Die Aminosäuresequenzen der meisten HLA- Gene sind mittlerweile identifiziert. Daher ist es möglich, die Variationen dieser Sequenzen mittels synthetischer Sequenz-spezifischer Oligonukleotide (*sequence specific primer*) zu identifizieren. Durch Amplifikation genomischer DNA kann mit diesen spezifischen *primern* eine große Anzahl der bekannten Genotypen (niedrige Auflösung) und Allele (hohe Auflösung) identifiziert werden. Es binden jeweils nur spezifische komplementäre Sequenzen, d.h. der *primer* lagert sich spezifisch an einer definierten Sequenz an. Danach wird unter Katalyse einer Polymerase dieser Abschnitt amplifiziert. Das Produkt der PCR wird elektrophoretisch in einem Agarosegel, z.B. mit Ethidiumbromid versetzt, aufgetrennt. Unter dem UV-Transilluminator lassen sich die Produkte als Banden sichtbar machen und anhand ihrer Wanderungsweite im elektrischen Feld identifizieren.

*Beispiel: HLA-DRB1\*15/16-SSP (Fa. Olerup SSP AB, Saltsjöbaden, Schweden)*

Mit dem Kit von Olerup konnte eine DRB1\*15/16-SSP durchgeführt werden. Da HLA-DR15 von besonderem Interesse im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit war, wurden fünf Proben (Nr. 22, 209, 242, 261, 299) der Blut- und Thrombozytenspender mit diesem Kit nachtypisiert. Mit dem ist eine Unterscheidung der Allele 1501 bis 1513 und 1601 bis 1608 möglich. Mit Ausnahme von Probe Nr. 22, waren alle positiv für DRB1\*1501 (Abb.: 4)

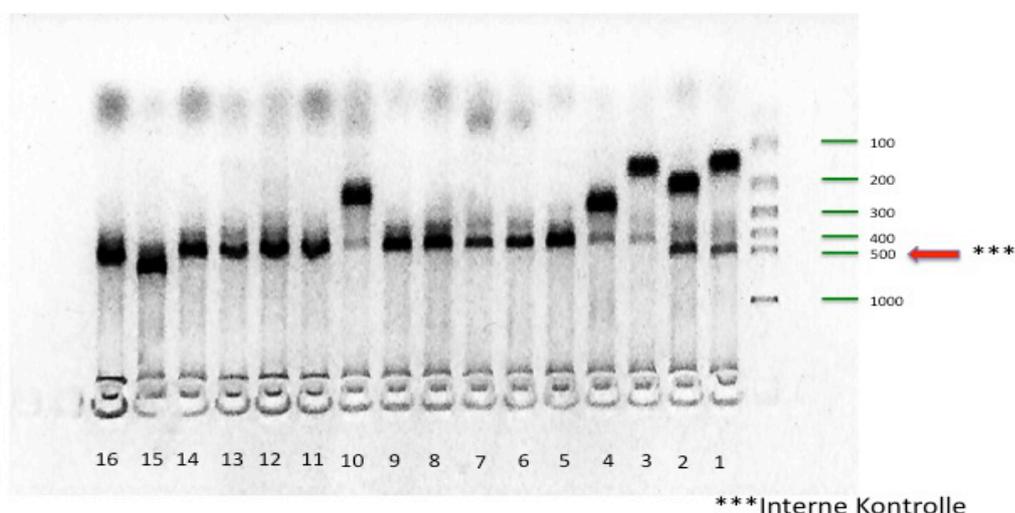


Abb. 4: Negativ der Fotografie des Gels einer DRB1\*15/16 SSP mit einem Kit von Olerup: Elektrophorese Laufrichtung von unten nach oben für 15 min. bei 150V, Ergebnis zeigt ein DRB1\*1501: Spur 1-4 und 10 positiv erwartet (Produktgröße Spur 1: 140 bp, Spur 2: 200 bp, Spur 3: 150 bp, Spur 4: 260 bp und Spur 10: 215 bp); Interne Kontrolle Spur 1/2 + 15: 515 bp, Spur 3-14 + 16: 430 bp;

Alternativ zur molekulargenetischen Bestimmung ist die serologische Bestimmung der HLA-Merkmale mit einem Lymphozyten-Crossmatch möglich. Dieser Test erfasst allerdings nicht die sequenziellen Unterschiede der Haupt- oder Untergruppen.

#### *Lymphozyten-Crossmatch (LCT)*

Beim LCT handelt es sich um die serologische Verträglichkeitsprobe im HLA-System. Zur Bestimmung der HLA-Merkmale werden isolierte Lymphozyten einer Probe mit verschiedenen bekannten Testseren in Kontakt gebracht. Der Test erfasst alle klinisch relevanten Anti-HLA-Antikörper. Er wird v.a. zur Untersuchung der Spender und Empfänger in der Vorbereitung einer Organ- oder Stammzelltransplantation und zur Verträglichkeitsuntersuchung HLA-ausgewählter Blutprodukte verwendet. Die Anti-HLA-Antikörper werden im Serum bestimmt. Es handelt sich um einen Mikrolymphozytotoxizitätstest.

### 3.2. Statistischer Teil

Um die statistischen Zusammenhänge zwischen den experimentellen Ergebnissen in dieser Arbeit, der CMV-Serologie und den HLA-Merkmalen der Blut- und Thrombozytenspender und der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender zu analysieren, verwendeten wir für die Auswertung Microsoft-Excel (Microsoft<sup>TM</sup>, Redmond, WA, USA).

#### *Hypothesenformulierung*

Zugrunde gelegt wurde eine Nullhypothese  $H_0$ . Es gilt diese innerhalb der Stichprobe als unwahrscheinlich zu beweisen. Ist eine Häufung zufällig oder besteht eine Gesetzmäßigkeit? Ein Ereignis gilt als signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen Zufallsbefund handelt, höchstens 5% beträgt, was mit dem Ausdruck  $p < 0,05$  angegeben wird. Dies ist international festgelegt. Oder anders formuliert, statistisch signifikant bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art (p-Wert) zwischen einem und fünf Prozent liegt.

*Nullhypothese ( $H_0$ ):* Personen, die ein Merkmal HLA-X tragen, sind genauso häufig CMV-seropositiv (-negativ) wie Nicht-Träger des Merkmals X.

*Alternativhypothese ( $H_1$ ):* Personen, die ein Merkmal HLA-X tragen, unterschiedlich häufig einen positiven (negativen) CMV-Antikörperstatus als Nicht-Träger des Merkmals X.

Festlegung des Signifikanzniveaus:  $\alpha = 5\%$

### Chi-Quadrat-Vierfeldertest

Es handelt sich um eine Form des Chi-Quadrat-Tests. Eine Vierfeldertafel ist eine (2x2)-Anordnung absoluter Häufigkeiten, die sich bei einer gleichzeitigen Betrachtung von zwei binären Merkmalen ergibt (Tab. 4).

**Tab. 4: Schematische Vierfeldertafel\***

	CMV-positiv	CMV-negativ	Gesamtheit, deren CMV-Antikörperstatus bekannt ist
HLA-X	a	b	a+b = n1
Nicht-HLA-X	c	d	c+d = n2
Gesamtheit, deren HLA-Typ bekannt ist	a+c	b+d	Gesamtumfang n

Vierfeldertafel auf der die statistische Auswertung durch den Chi-Quadrat-Test basiert. Darstellung der Variablen: a = Träger eines bestimmten (jeweils für eine Vierfeldertafel definiert) HLA-Merkmals und serologisch CMV-positiv, b = Träger des gleichen HLA-Merkmals wie in a, aber serologisch CMV-negativ, a+b = alle Träger eines bestimmten HLA-Merkmals, unabhängig der CMV-Serologie, c = alle, die nicht Träger eines bestimmten HLA-Merkmals und serologisch CMV-positiv sind, d = alle, die nicht Träger eines bestimmten HLA-Merkmals und serologisch CMV-negativ sind, a+c = alle serologisch CMV-positiv unabhängig von HLA-Merkmal, b+d = alle serologisch CMV-negativ unabhängig vom HLA-Merkmal, n1 = alle Träger eines bestimmten HLA-Merkmals, n2 = alle, die das bestimmte HLA-Merkmal der Vierfeldertafel nicht tragen, n = Summe der untersuchten Träger der Merkmalsgruppe

Mit dem Chi-Quadrat-Vierfeldertest können Ergebnisse schnell und einfach auf Signifikanz überprüft werden. Als erstes wird eine Prüfgröße ( $X^2$ ) berechnet.

$$X^2 = \frac{n(ad-bc)^2}{(a+b)c+d)(a+c)(b+d)}$$

Danach erfolgt die Prüfung, ob die Prüfgröße größer oder kleiner 3,84 ist, denn das ist der Grenzwert, um das Ergebnis statistisch signifikant oder nicht nennen zu können. Größer oder gleich 3,84 ist in medizinischen Untersuchungen im Konsens als signifikant definiert.

Entnommen werden die Werte einer Umrechnungstabelle von  $X^2$  in p-Werte.

**Tab. 5: Beispiel Vierfeldertafel für HLA-B7\* in Anlehnung an Tab. 4**

	CMV-positiv	CMV-negativ	Gesamt
HLA-B7	34	37	71
Nicht-HLA-B7	177	248	425
	211	285	496

Vierfeldertafel für HLA-B7, Werte aus der Auswertung der Gruppe der Blut- und Knochenmarkspender

### ***Bonferroni-Korrektur***

Diese Methode dient der Kontrolle, damit nicht irrtümlich falsch positive Aussagen durch die Nullhypothese abgelehnt werden, d.h. die Wahrscheinlichkeit, eine falsch positive Aussage zu machen nicht  $\alpha = 5\%$  überschreitet.

Das Gesamtniveau 5% wird durch die Anzahl  $n$  der untersuchten Hypothesen aus einer Matrix geteilt. Es werden alle Hypothesen angenommen, deren p-Werte kleiner dieser bestimmten Schranke sind.

$$\alpha_i = 1 - (1 - 0,05)^{1/n}$$

oder

$$\alpha_i = 0,05 / n$$

## 4. Ergebnisse

Im experimentellen Teil der Arbeit wurden die Proben der gesunden Blut- und Thrombozytenspender mittels einer *nested*-PCR auf CMV-DNA untersucht. Ziel war es zu prüfen, ob in den Proben mit diesem Verfahren CMV-DNA nachgewiesen werden kann. Neben der experimentellen Untersuchung der Blutproben gesunder Blut- und Thrombozytenspender des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden die Daten der 366 gesunden Blut- und Thrombozytenspender auch statistisch ausgewertet. Für 242 Proben lag ein CMV-Antikörperstatus vor und es sollte überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der PCR-Ergebnisse und dem serologischen Antikörperstatus gibt. Die Gruppe war in 108 (44,63%) serologisch negative und 134 (55,37%) positive Spender unterteilt. Zusätzlich sollte in der statistischen Auswertung der Daten untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem CMV-Antikörperstatus und der Häufigkeit eines HLA-A, -B, -DRB1 und/oder DQB1-Merkmals besteht. HLA-Cw wurde bei der kleinen Anzahl zur Auswertung stehender Allele in dieser Gruppe nicht betrachtet. Da in der statistischen Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender u.a. statistisch hochsignifikante Ergebnisse für einige der HLA-Merkmale bestimmt werden konnten, wurde die Fragestellung auf die zahlenmäßig deutlich größere Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender aus der Datei des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf angewendet. In diesem Kollektiv konnte bei ausreichender Anzahl der Daten auch HLA-Cw ausgewertet werden.

#### 4.1 Kollektivdaten Blut- und Thrombozytenspender

Insgesamt wurden 366 Proben von Blut- und Thrombozytenspendern gesammelt. Die Proben, die nach Anwendung der Ausschlusskriterien, sog. Spenderrückstellkriterien, experimentell untersucht wurden ( $n = 290$ ), waren 75 Thrombozytenspendern und 215 Blutspendern entnommen. 74 der Thrombozytenspender waren serologisch CMV-negativ. Ein Spender war serologisch CMV-positiv. Ob es sich dabei um eine Neukonversion handelt wurde nicht ermittelt, da es für die Untersuchung als nicht relevant einzustufen war. Die Blutspender waren in 93 serologisch CMV-negative, 117 CMV-positive und 5 serologisch nicht bestimmte Spender aufteilbar. In der Gruppe der Blutspender, deren Proben experimentell untersucht wurden, war die CMV-Seroprävalenz insgesamt 56%. Für die statistische Auswertung dieser Gruppe war entscheidend, dass eine CMV-Serologie vorlag. Diese Bedingung war bei 242 Datensätzen erfüllt. Die nicht serologisch typisierten Proben wurden daher nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Bei diesen insgesamt 242 Proben bot es sich an, analog zum zweiten untersuchten Kollektiv der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender die Altersstruktur des Kollektivs in Altersgruppen darzustellen (Tab. 6). Da zur Blutspende Spender von 18-68 Jahren zugelassen werden bilden diese Altersgruppen die Grenzen der Betrachtung der Altersverteilung. In dem untersuchten Kollektiv waren keine Spender unter 20 Jahren vertreten. In der kleinen Gruppe der  $>60$  Jährigen sind auch Spender, die in Einzelfällen nach ärztlicher Untersuchung bis über das 68. Lebensjahr zur Spende freigegeben sind. Die betrachtete Gruppe von 242 Blut- und Thrombozytenspendern besteht vor allem aus den Altersgruppen zwischen 20 und 60 Jahren (91,1%). Der größte Anteil der gesammelten Proben stammt von Spendern aus den drei Altersgruppen zwischen 30-44 Jahren. Die Altersgruppen 40-44 (13,64 %), 30-34 (13,22%) und 35-39 (13,22%) Jahre waren zu gleichen Teilen insgesamt am stärksten vertreten. Die Spender waren insgesamt zu 44,6% serologisch CMV-positiv und zu 55,4% serologisch CMV-negativ. Die CMV-Seroprävalenz bei den 20-24 jährigen lag bei 50% und stieg auf 70,8% in der Altersgruppe 55-59 an. Anhand dieser Zahlen zeigt sich, dass der Anteil CMV-seropositiver Spender mit zunehmendem Alter steigt. Der Tabelle 6 ist darüber hinaus zu entnehmen, dass es abhängig vom Anti-CMV-Antikörperstatus Unterschiede in der Verteilung der Spender innerhalb der Altersgruppen gibt. Die CMV-seropositiven Spender waren überwiegend auf die Altersgruppen zwischen 35 und  $> 60$  Jahre (80,55%) verteilt. Die anteilig stärkste Altersgruppe sind die 40-44 Jährigen (15,74%), dicht gefolgt von den 45-49 Jährigen (14,81%). Diese Altersgruppen (40-49 Jahre) stellen fast ein Drittel (30,55%) der gesamten Gruppe.

Die CMV-seronegativen Spender waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu 79,8% zwischen 25 und 54 Jahre alt. Die am stärksten vertretene Altersgruppe ist die der 30-34 Jährigen (20,15%). In den Altersgruppen von 25-34 Jahren überwiegen die CMV-seronegativen deutlich gegenüber den CMV-seropositiven. Anteilig überwiegen ab dem 35. Lebensjahr die CMV-seropositiven gegenüber den -seronegativen. Besonders deutlich wird das bei der linearen Darstellung der Daten (Abb. 6). Bei den Spendern < 35 Jahre überwiegen die CMV-seronegativen Spender. Mit Laufe des zunehmendem Alter kommt es zu einem Anstieg des Anteils serologisch CMV-positiver Spender und umgekehrt sind anteilig in jüngeren Altersgruppen (25-29, 30-34, 35-39 Jahre) mehr serologisch CMV-negative vertreten.

**Tab. 6: Anzahl der Blut- und Thrombozytenspender pro Altersgruppe (Einteilung der Altersgruppen: z.B. 20 - 24 = alle, die ab 1. Januar des beginnenden Jahres bis zum 31. Dezember des letzten Jahres geboren waren) absolut und prozentual, unterteilt in serologisch Anti-CMV-positiv, Anti-CMV-negativ und gesamt**

Altersgruppen	CMV-positiv		CMV-negativ		Anzahl gesamt	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
<20 <sup>1)</sup>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
20-24	9	8,33%	9	6,72%	18	7,44%
25-29	7	6,48%	18	13,43%	25	10,33%
30-34	5	4,63%	27	20,15%	32	13,22%
35-39	14	12,96%	18	13,43%	32	13,22%
40-44	17	15,74%	15	11,19%	33	13,64%
45-49	16	14,81%	14	10,45%	29	11,98%
50-54	13	12,04%	15	11,19%	28	11,57%
55-59	17	15,74%	7	5,22%	24	9,92%
>60 <sup>2)</sup>	10	9,26%	11	8,21%	21	8,68%
Summe	108	100,00%	134	100,00%	242	100,00%

<sup>1)</sup>entspricht allen Probanden, die beim Entnahmezeitpunkt zwischen 18 und 20 Jahre alt waren

<sup>2)</sup>entspricht allen Probanden, die beim Entnahmezeitpunkt zwischen 60 und 68 Jahre alt waren

In den Abbildungen 5 und 6 ist die Altersstruktur graphisch dargestellt. Im Säulendiagramm (Abb. 5) ist neben der Gesamtzahl der Spender in den jeweiligen Altersgruppen (20-24, ..., > 60 Jahre), die Unterteilung in serologisch CMV-positiv und -negativ gezeigt. Die Gruppe der < 20 Jährigen ist nicht dargestellt, da keine Spender aus dieser Altersgruppe erfasst wurden.

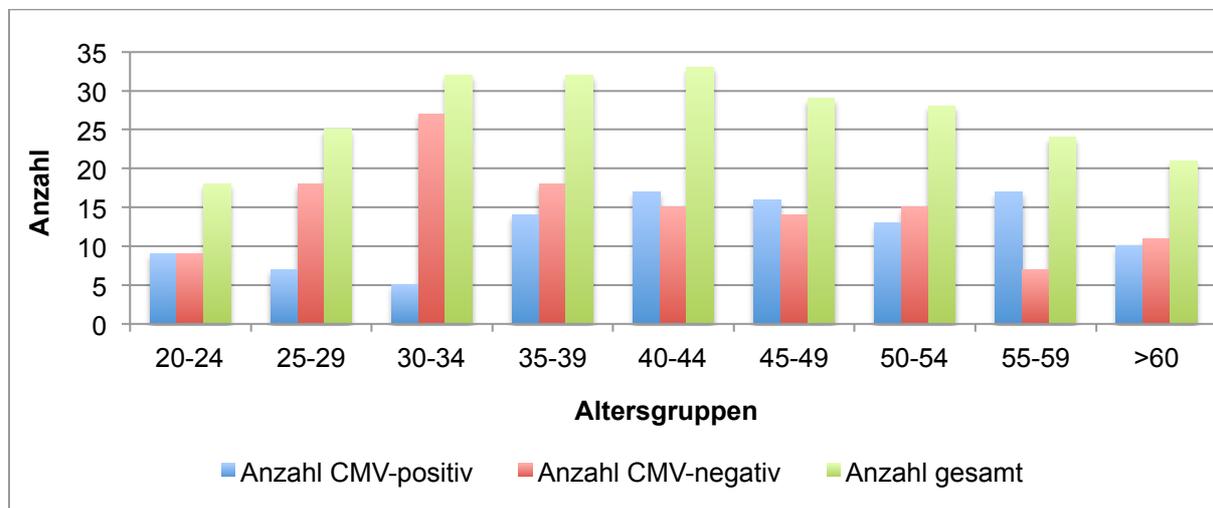


Abb. 5: Absolute Verteilung der Blut- und Thrombozytenspender auf die Altersgruppen insgesamt und unter Berücksichtigung der CMV-Serologie

Innerhalb der CMV-seronegativen ist ein abnehmender und innerhalb der CMV-seropositiven ein zunehmender Trend im Laufe des zunehmenden Alters zu sehen. Die Möglichkeit einer Serokonversion ist lebenslang gegeben (Abb.6).

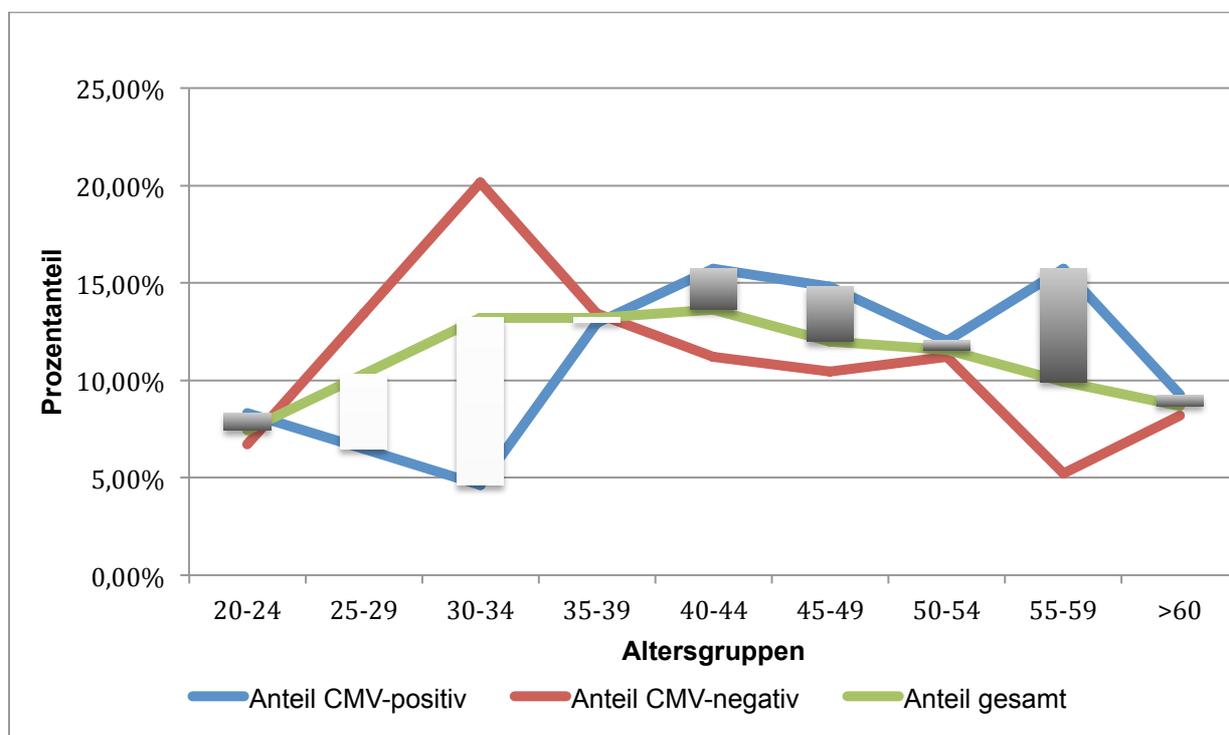


Abb. 6: Prozentuale Verteilung der Blut- und Thrombozytenspender in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf mit Darstellung der Abweichungen der serologisch CMV-positiven Spender von der Gesamtgruppe. Die Balken zeigen die zunächst negative und im Verlauf positive Abweichung des Anteils der serologisch CMV-positiven Spender anteilig von der Gesamtgruppe der Spender; (graue Balken positive Abweichung/weiße Balken negative Abweichung)

## 4.2 Kollektivdaten potentieller Stammzell- und Knochenmarkspender

Insgesamt standen zum Zeitpunkt der Datenerhebung (06/2006) 17.611 Datensätzen von potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern zur Verfügung. Davon mussten 1.775 vor der Auswertung ausgeschlossen werden, denn für diese lag kein serologisches Ergebnis einer Anti-CMV-Bestimmung vor. Die anderen 15.836 wurden in die Gruppen CMV-seropositiv (9.158) und -negativ (6.678) unterteilt. Aus diesen zwei Gruppen wurden jeweils alle, für die ein HLA-Merkmal (HLA-A, -B, -Cw, -DRB1 oder DQB1) bestimmt worden war, wieder in einer Untergruppe zusammengefasst.

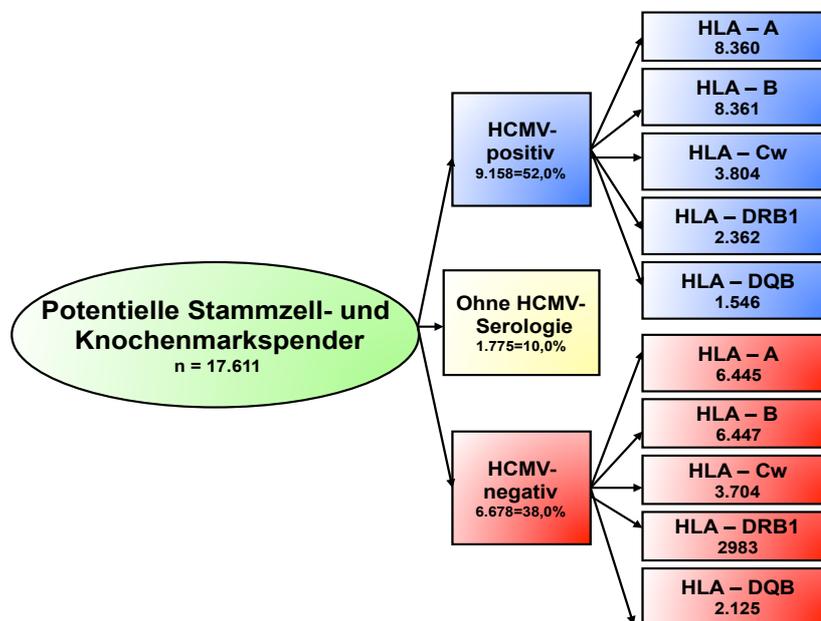


Abb. 7: Pfad der Datenanalyse mit Darstellung der vorhandenen Anzahl an Datensätzen

Abbildung 7 zeigt die Unterteilung des Ausgangskollektives in die betrachteten Untergruppen und fasst die Anzahl der jeweils zur Verfügungen stehenden Datensätze (z.B. Anti-CMV-negativ/ HLA-A 6.445 Datensätze) zusammen. Im Gegensatz zu Blut- und Thrombozytenspendern wird in der Kartei der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender keine Altersgrenze gesetzt. Eine Fremdspende ist theoretisch ab dem vollendeten 18. Lebensjahr möglich.

Aus Tabelle 7 kann die Altersstruktur der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender entnommen werden. Der Großteil, ca. 75%, setzt sich aus den Altersgruppen zwischen 30-59 Jahren zusammen. Die Gruppe der 40-44 Jährigen (18,03%) ist insgesamt am stärksten vertreten. Gefolgt wird sie von den Gruppen der 35-39 Jährigen (14,15%) und 44-49 Jährigen (14,09%). Diese drei Altersgruppen (35-49 Jahre) bilden zusammen fast die Hälfte aller potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (46,26%). Die CMV-Seroprävalenz lag insgesamt bei 57,8% (Anteil CMV-seropositiv von potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern mit bekannter Serologie).

**Tab. 7: Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender pro Altersgruppe (z.B.: 20-24=alle, die ab 1. Januar des beginnenden Jahres bis zum 31. Dezember des letzten Jahres geboren waren), absolut und prozentual unterteilt in serologisch Anti-CMV-positiv, Anti-CMV-negativ und als Gesamtgruppe**

Altersgruppen (Jahre)	CMV-positiv		CMV-negativ		Anzahl gesamt	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
<20	4	0,04%	3	0,04%	7	0,04%
20-24	201	2,19%	70	1,05%	271	1,71%
25-29	598	6,53%	195	2,92%	793	5,01%
30-34	764	8,34%	733	10,98%	1497	9,45%
35-39	1143	12,48%	1098	16,44%	2241	14,15%
40-44	1433	15,65%	1420	21,26%	2853	18,02%
44-49	1188	12,97%	1043	15,62%	2231	14,09%
50-54	948	10,35%	626	9,37%	1574	9,94%
55-59	963	10,52%	485	7,26%	1448	9,14%
60-64	795	8,68%	413	6,18%	1208	7,63%
65-69	678	7,40%	411	6,15%	1089	6,88%
70-74	312	3,41%	133	1,99%	445	2,81%
75-79	106	1,16%	39	0,58%	145	0,92%
>80	25	0,27%	9	0,13%	34	0,21%
Summe	9158	100,00%	6678	100,00%	15836	100,00%

Betrachtet man das Kollektiv unterteilt in die zwei serologischen Gruppen, zeigt sich eine Unterteilung in 57,8% CMV-seropositive und 42,2% CMV-seronegative potentielle Spender. Abbildung 8 zeigt die graphische Aufarbeitung der Daten aus Tabelle 7. Die absolute Anzahl an serologisch CMV-positiven überwiegt in jeder Altersgruppe gegenüber der Anzahl CMV-negativer. Betrachtet man diese potentiellen Spender in den Altersgruppen bis 49 Jahre, überwiegen bis auf die Gruppen zwischen 20 und 29 Jahren zunächst anteilig die CMV-seronegativen Spender in den jeweiligen Altersgruppen. Vom 50. Lebensjahr an überwiegen dagegen kontinuierlich die CMV-seropositiven potentiellen Spender. Die CMV-Seroprävalenz in der Altersgruppe 30-34 ist 51% gegenüber 62% in der Altersgruppe 65-69. Bei den über 80 Jährigen sind es 74%. Die serologisch CMV-positive Gruppe verteilt sich v.a.

auf die Altersgruppen zwischen 35-59 Jahre (61,97%) und die serologisch CMV-negative Gruppe überwiegend auf die Altersgruppen zwischen 30-49 Jahre (64,30%). Die Daten aus Tabelle 7 sind in Abbildung 8 und 9 graphisch dargestellt.

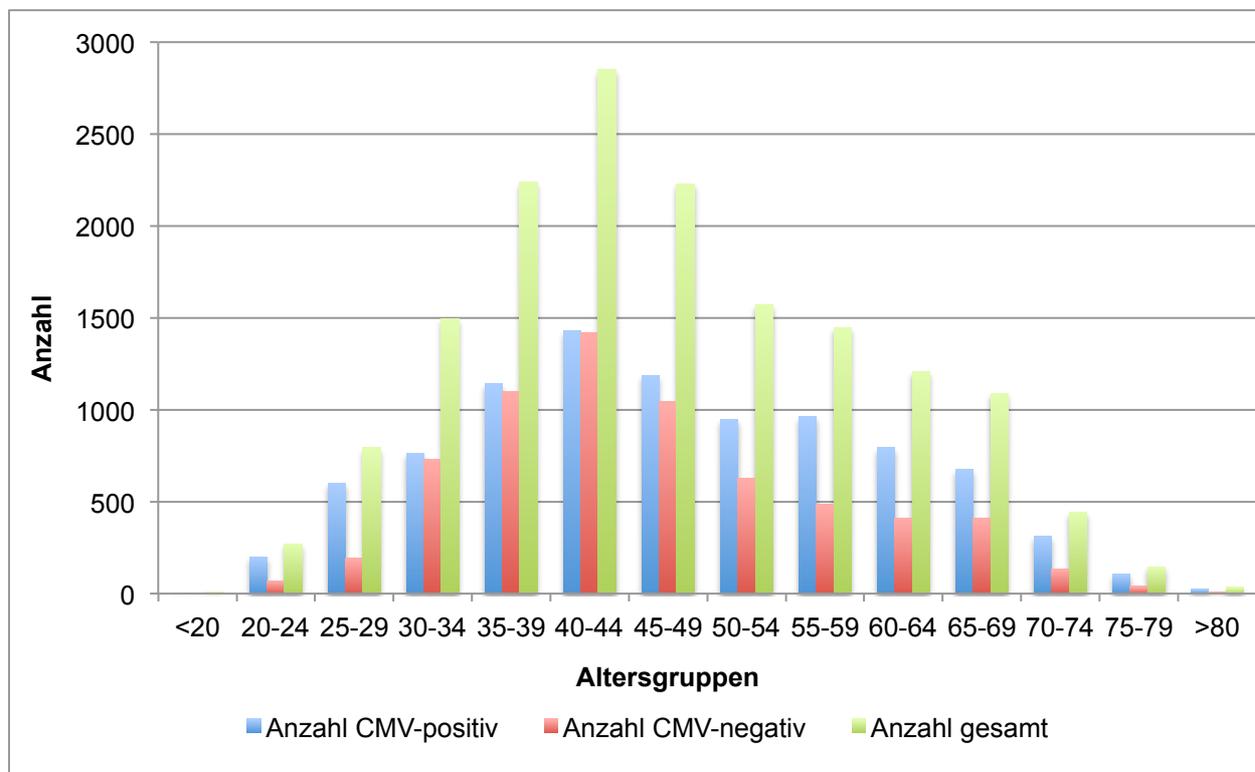


Abb. 8: Absolute Verteilung der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender auf die Altersgruppen insgesamt und unter Berücksichtigung der CMV-Serologie

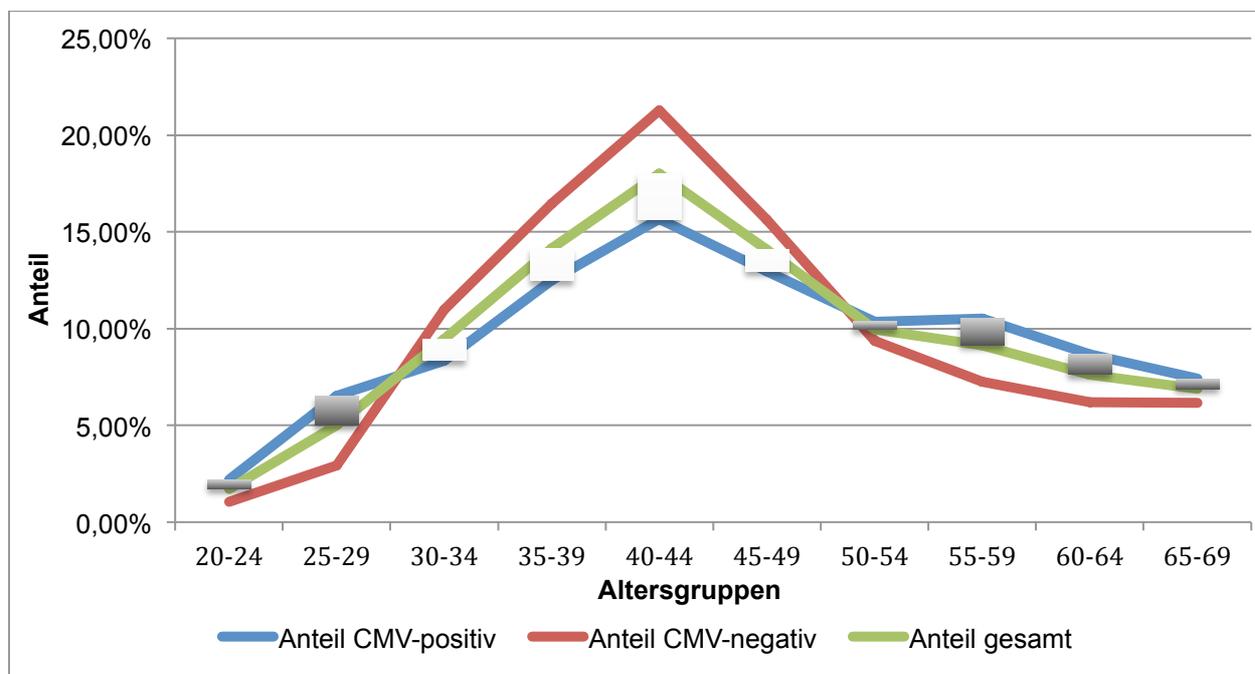


Abb. 9: Prozentuale Verteilung der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf mit Darstellung der Abweichungen der serologisch CMV-positiven von der Gesamtgruppe. Die Balken zeigen die zunächst gering positive und im Verlauf negative und wieder positiv werdende Abweichung des Anteils der serologisch CMV-positiven anteilig von der Gesamtgruppe (graue Balken positive Abweichung/weiße Balken negative Abweichung)  
Anmerkung: die Altersgruppen < 25 und > 69 Jahre sind aufgrund der kleinen Anteile nicht dargestellt.

### 4.3. Ergebnisse der experimentellen Arbeit

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse der notwendigen zielführenden Vorversuche zusammengefasst und anschließend die Auswertungen der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender vorgestellt.

#### *Ergebnisse - Vorversuche*

##### ***CMV-Standard-Probe aus Ringversuch „Ringversuch Virusgenom-Nachweis PCR-/NAT-CMV; Polymerase Chain Reaction (PCR) und andere Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis von Cytomegalievirus; Programm C, Gruppe 365, November 2002“***

Zur Semi-Quantifizierung der zur Probenanalyse verwendeten *nested*-PCR wurden Referenzproben bekannter CMV-Genomäquivalente (Kopien/ml) verwendet. Die Proben stammen aus einem Ringversuch („Ringversuch Virusgenom-Nachweis PCR-/NAT-CMV; Polymerase Chain Reaction (PCR) und andere Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis von Cytomegalievirus; Programm C, Gruppe 365, November 2002“). Ringversuche dienen Laboren der internen Qualitätskontrolle in der Virusdiagnostik. Die durchgeführte Verdünnungsreihe der Proben-Nr. 15039 (ca. 1.150.000 CMV-Genomäquivalente (Geq) = Genomkopien/ml (bei Verdünnung mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O/Aqua bidest.) zeigte, dass in der 1. PCR ein schwacher DNA- Nachweis bis zu einer Verdünnung von rechnerisch eingebrachten 10 Genomkopien/μl (in 50 μl Ansatz) und in der 2. PCR ein deutlicher DNA-Nachweis bis zu einer Verdünnung von rechnerisch eingebrachter 1 Genomkopien/μl (1: 100 verdünnt in 50 μl Ansatz) möglich ist. Die Reaktion ist demzufolge als sehr sensitiv anzusehen. Da die Standards (Proben des Ringversuchs) reine CMV-DNA enthalten, ist in dem Versuch, trotz in der *nested*-PCR eingesetztem HGH-*sense* und -*antisense-primer*, erwartungsgemäß jeweils keine HGH - Bande ersichtlich. Die CMV-Banden sind erwartungsgemäß in der 1. und der 2. PCR nachweisbar, so dass die HGH-*primer* offensichtlich die Reaktion in dem Reagenz bei vorhandener CMV-DNA nicht stört (Abb.10).

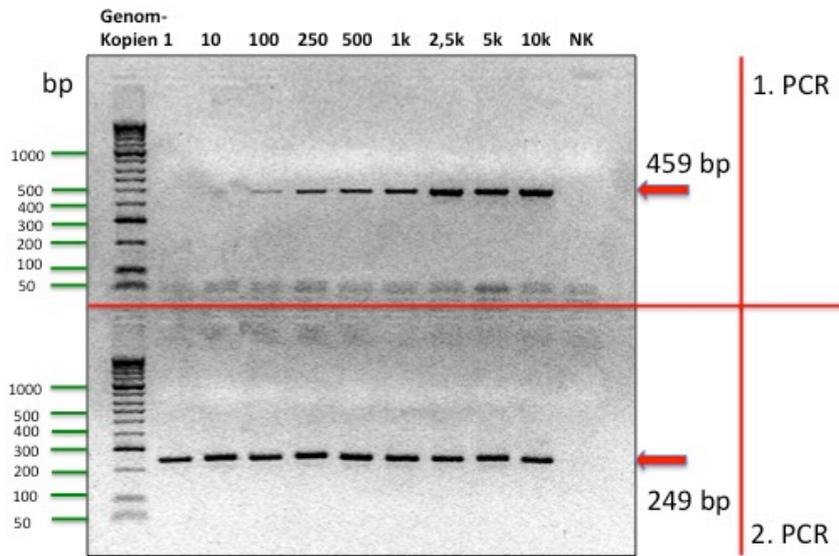


Abb. 10: Negativ der Photographie des Gels zur nested-PCR mit Probe Nr. 15039 (CMV ca. 1.150.000 Kopien/ml) aus dem „Ringversuch Virusgenom-Nachweis PCR-/NAT-CMV; Polymerase Chain Reaction (PCR) und andere Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis von Cytomegalievirus; Programm C, Gruppe 365, November 2002“, Elektrophorese: Laufrichtung von oben nach unten für 45 min bei 100 V, Betrachtung von links nach rechts; oben 1. PCR (Produkt 459 bp) unten 2. PCR (Produkt 249 bp): Spur 1: DNA-Hyperladder II, Bioline, Spur 2: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 1 Genkopie, Spur 3: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 10 Genkopien, Spur 4: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 100 Genkopien, Spur 5: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 250 Genkopien, Spur 6: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 500 Genkopien, Spur 7: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 1000 Genkopien, Spur 8: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 2500 Genkopien, Spur 9: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 5000 Genkopien, Spur 10: Produkt der *nested*-PCR mit rechnerisch 10000 Genkopien, Spur 11: Negativkontrolle (Aqua bidest.)

### ***Interne Kontrolle/ Positivkontrolle/ Negativkontrolle***

Die Replikation eines DNA-Abschnittes des humanem Wachstumshormons (*human growth hormone*, HGH) wurde im Verlauf der Vorversuche in den Versuchsaufbau eingebaut, da dies als Kontrolle für den Nachweis humaner DNA in der einzelnen Probe dienen sollte. Das HGH-*primer*-Paar -s1/-as4 wurde ausgewählt, da sich das Produkt mit 1070 bp deutlich von der Größe der erwarteten gB1/gB2- und gB3/gB4-Produkte mit 459 bp und 249 bp unterscheidet. So waren diese Banden in der Gelelektrophorese gut voneinander abgrenzbar. Es zeigte sich, dass eine Verdünnung 1:100 der Ausgangskonzentration ausreichend war. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis eines Vorversuchs, der mit vier verschiedenen Proben durchgeführt wurde (1. nachweislich CMV-erkrankter Patient (Positivkontrolle), 2. Probe eines gesunden Blutspenders, serologisch CMV-negativ, 3. Probe Nr. 354, aus der Gruppe der gesammelten Proben der Blut- und Thrombozytenspender, serologisch CMV-positiv und 4.

CMV-Standard (Probe Nr. 15039) mit Konzentration von 1000 Kopien/ $\mu$ l), um zu untersuchen, ob mit der internen Kontrolle die zu erwartenden Ergebnisse erzielt werden können.

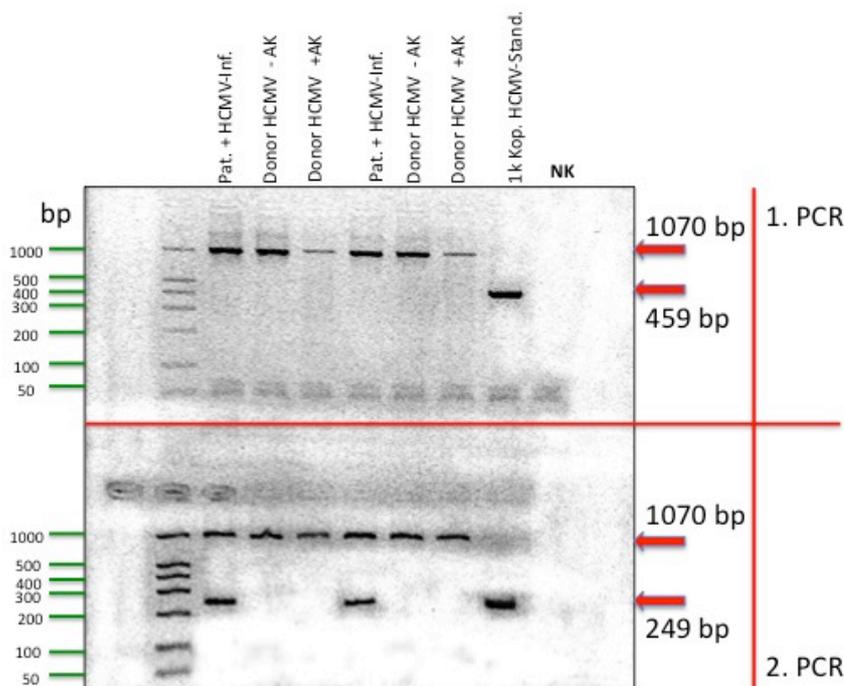


Abb. 11: Negativ der Photographie des Gels aus einem Vorversuch zur *nested*-PCR mit der internen Kontrolle (HGH), Elektrophorese: Laufrichtung von oben nach unten für 30 min bei 100 V, Betrachtung von links nach rechts; oben 1. PCR (1. Produkt: gB1/gB2 459 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as: 1070 bp) unten 2. PCR (1. Produkt: gB3/gB4 249 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as 1070 bp): Spur 1: Olerup SSP<sup>TM</sup> DNA Size Marker (5  $\mu$ l), Spur 2 + 5: Produkte der *nested*-PCR mit einer Probe eines nachweislich CMV-erkrankten Patienten (Positivkontrolle), Spur 3 + 6: Produkte der *nested*-PCR mit einer Probe eines Blutspenders, serologisch CMV-negativ, Spur 4 + 7: Produkte der *nested*-PCR Probe Nr. 354, aus der Probensammlung der Blut- und Thrombozytenspender, serologisch CMV-positiv, Spur 8: Produkt der *nested*-PCR mit CMV-Standard (Probe Nr. 15039) mit 1000 Kopien/ml aus dem „Ringversuch Virusgenom-Nachweis PCR-/NAT-CMV; Polymerase Chain Reaction (PCR) und andere Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis von Cytomegalievirus; Programm C, Gruppe 365, November 2002“, Spur 9: Negativkontrolle

Jede Probe, bis auf den CMV-Standard, wurde zweimal verwendet, um auszuschließen, dass das Ergebnis mit einer falsch negativen PCR zu erklären wäre. Für die Positivkontrolle (CMV-kranker Patient) konnte in der 1. und der 2. PCR das HGH-Produkt der internen Kontrolle gesehen werden. Damit war der Nachweis humaner DNA gegeben. Auch das gB3/gB4-Produkt des 2. PCR-Schrittes konnte amplifiziert werden. Allerdings blieb der Nachweis für das Produkt der 1. PCR (gB1/gB2) aus. Für die Proben der gesunden Blutspender (serologisch CMV-negativ/-positiv) erschien die interne Kontrolle in der 1. und der 2. PCR, aber kein gB-Produkt, d.h. es konnte keine CMV-DNA nachgewiesen werden.

Der Ansatz mit dem CMV-Standard Proben-Nr. 15039 zeigte die Produkte der 1. und der 2. PCR und keine interne Kontrolle. Dies Ergebnis war erwartet worden, da im Standard keine vollständige humane DNA enthalten war.

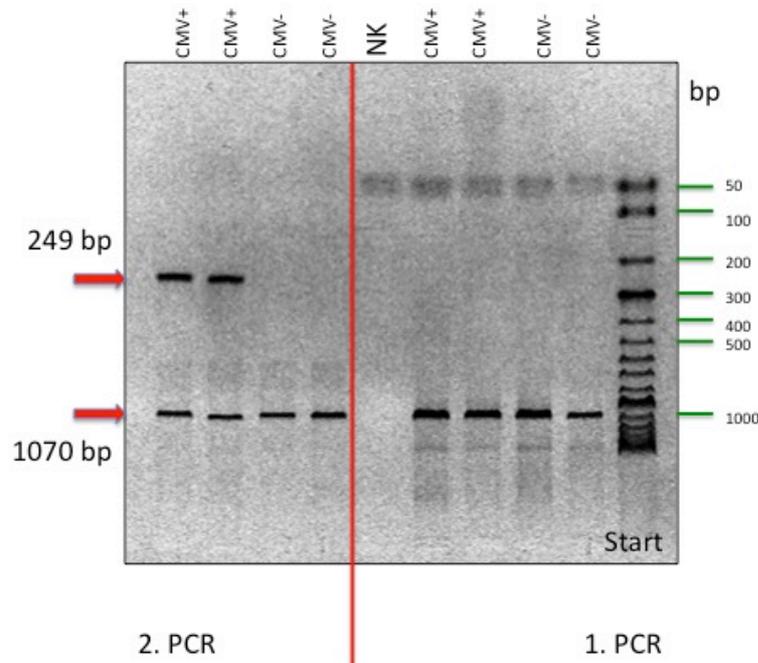


Abb. 12: Negativ der Photographie des Gels zur *nested*-PCR mit der internen Kontrolle und der Positivkontrolle, Elektrophorese: Laufrichtung von unten nach oben für 30 min bei 120 V, Betrachtung von rechts nach links; rechts 1. PCR (1. Produkt: gB1/gB2 459 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as 1070 bp) links 2. PCR (1. Produkt: gB3/gB4 249 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as 1070 bp): Spur 1: Hyperladder II, Bioline, Spur 2+3: Produkt der 1. PCR der *nested*-PCR mit der Probe eines serologisch CMV-negativen Blutspenders, Spur 4+5: Produkt der 1. PCR der *nested*-PCR mit der Probe eines nachweislich CMV-erkrankten KMT-Patienten (Positivkontrolle), Spur 6: Negativkontrolle, Spur 7+8: Produkt der 2. PCR der *nested*-PCR eines serologisch CMV-negativen Blutspenders, Spur 9+10: Produkte der 2. PCR der *nested*-PCR eines nachweislich CMV-erkrankten KMT-Patienten

Im Laufe der Versuchsreihe wurden mehrfach die Reagenzien erneuert (PCR-Mix, dNTP, Polymerase). Darunter zeigten sich keine Veränderungen der Ergebnisse. Da das Ergebnis der 1. PCR, das Fehlen eines gB1/gB2-Produktes, der *nested*-PCR mit der Positivkontrolle wiederholt in Vorversuchen wie beschrieben ohne gB1/gB2-Produkt ausfiel (Abb. 12), wurde für die folgenden Versuche kein Erscheinen des ersten Produktes (gB1/gB2, 459 bp) erwartet, sondern das Erscheinen des zweiten Produktes gB3/gB4 (249 bp) als ausreichendes Ergebnis festgelegt. Gleichzeitiger Nachweis der interne Kontrolle war beweisend für eine stattgefunden PCR. Die Tatsache, dass die interne Kontrolle gleichzeitig mit dem gB3/gB4-Produkt erschien, führte zum Ausschluss der Möglichkeit, dass die PCR-Reaktion durch das HGH-*primer*-Paar gestört wurde. Der Ansatz der 1. PCR wurde daher 1:100 Aqua bidest.

verdünnt in die 2. PCR eingesetzt. Das Erscheinen des gB3/gB4-Produktes in der 2. PCR der Positivkontrolle zeigte eindeutig, dass diese PCR funktioniert hatte.

In der *nested*-PCR mit dem CMV-Standard konnte in der 1. PCR das Produkt gB1/gB2 nachgewiesen werden (Abb. 10). Eine schwache Bande war bei einer rechnerischen Konzentration von 100 Genomkopien/  $\mu$ l zu sehen. Für eine deutliche Bande brauchte es allerdings in der 1. PCR rechnerisch 250 Genkopien/ $\mu$ l, die in den 50  $\mu$ l Ansatz eingebracht wurden. Für das erste *primer*-Produkt muss die Konzentration der vorhandenen DNA offensichtlich deutlich höher sein, als für das zweite *primer*-Produkt.

### ***Ergebnisse der nested-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender***

Zunächst wurde die *nested*-PCR nach festgelegtem Protokoll aus den Vorversuchen mit 100 ng DNA je Ansatz in der 1. PCR durchgeführt. Dieses führte zu Ergebnissen, in denen nach der Elektrophorese die Banden der PCR-Produkte in den Gelen z.T. schwierig zu beurteilen waren (Abb. 13).

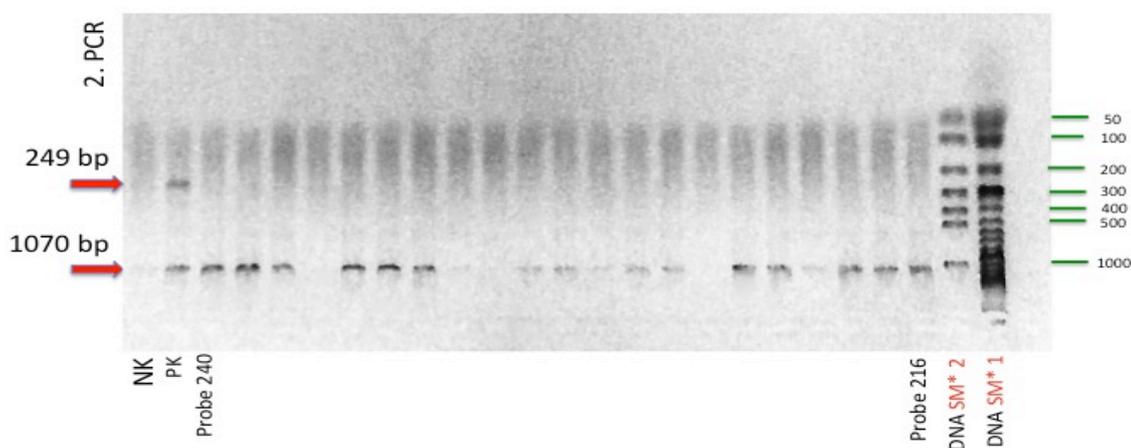


Abb. 13: Negativ der Photographie des Gels zur 2. PCR der *nested*-PCR mit Proben 216-240 der Blut- und Thrombozytenspender mit je 100 ng DNA pro PCR-Ansatz; Elektrophorese: Laufrichtung von unten nach oben für 30 min bei 120 V, 2. PCR (1. Produkt: gB3/gB4 249 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as 1070 bp) Betrachtung von rechts nach links: Spur 1: Bioline Hyperladder II, Spur 2: Olerup SSP™ DNA Size Marker, Spur 3-23: Probe 216-240, Spur 24: Positivkontrolle, Spur 25: Negativkontrolle (Aqua bidest.)

Daher wurde die DNA-Menge in einem zweiten Durchlauf der Proben auf 300 ng je Ansatz in der 1. PCR erhöht. Die Ergebnisse waren danach eindeutig auszuwerten. Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis einer *nested*-PCR mit Proben der Blut- und Thrombozytenspender mit 300 ng DNA in der 1. PCR und die Ergebnisse in der 2. PCR. Deutlich zu sehen ist, dass die Positivkontrolle in der 2. PCR positiv ist. Die Negativkontrolle ist eindeutig negativ. Die interne Kontrolle ist in beiden Reaktionen vorhanden. Wie schon in den Vorversuchen beschrieben, ist das gB1/gB2-Produkt in keiner der Reaktionen nachweisbar. Trotzdem wurde das Produkt des ersten Reaktionsansatzes 1:100 verdünnt und anschließend je 1 µl in der 2. PCR eingesetzt. In den in Abb. 14 gezeigten Proben 345-366 ist keine CMV-DNA in der *nested*-PCR nachweisbar. Für je zwei der Proben ist keine oder eine sehr schwache Reaktion zu sehen. Diese Proben wurden in einem weiteren Versuchsansatz wiederholt, um das Ergebnis zu verifizieren.

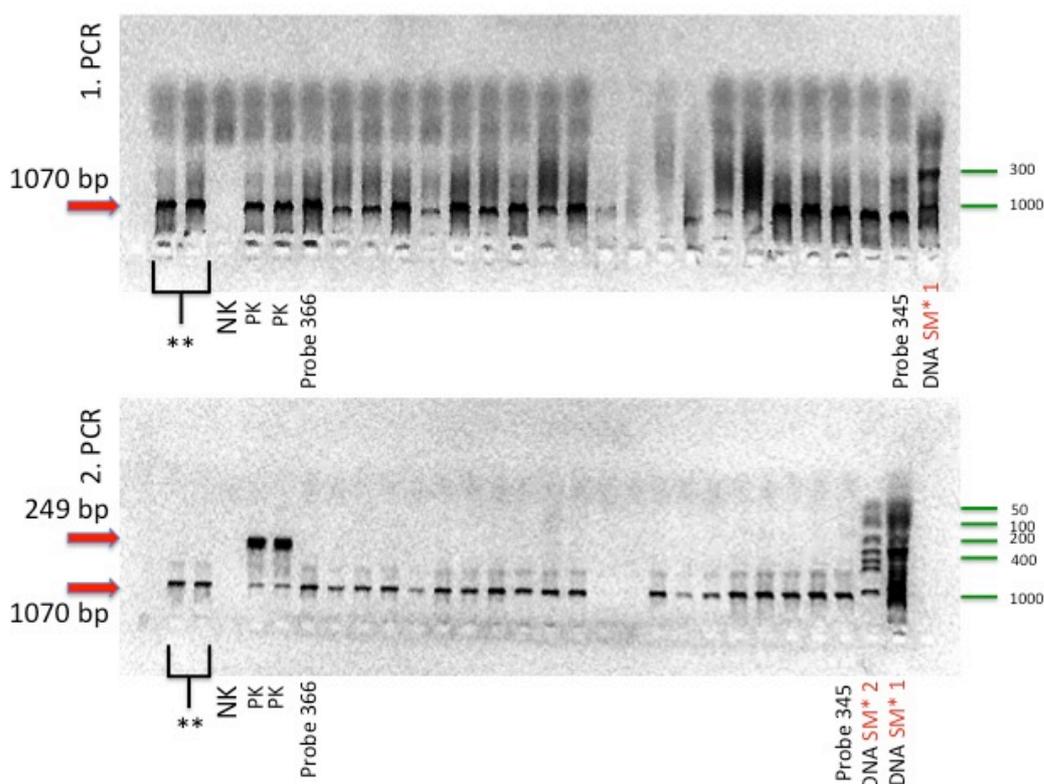


Abb. 14: Negativ der Photographie des Gels zur *nested*-PCR mit Proben 345-366 der Blut- und Thrombozytenspender mit je 300 ng DNA pro PCR-Ansatz; Elektrophorese: Laufrichtung von unten nach oben für 30 min bei 120 V, oben 1. PCR (1. Produkt: gB1/gB2 459 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as 1070 bp) unten 2. PCR (1. Produkt: gB3/gB4 249 bp, 2. Produkt: HGH-s/-as 1070 bp) Betrachtung von rechts nach links: Spur oben/unten 1: Bioline Hyperladder II, Spur 2-22 oben Proben 345-366, Spur 23/24 oben: Positivkontrolle, Spur 25 oben: Negativkontrolle, Spur 26/27 oben: Wiederholung Proben Vorversuch, Spur 2 unten: Olerup SSP™ DNA Size Marker, Spur 3-23 unten: Proben 345-366, Spur 24/25 unten: Positivkontrolle, Spur 26 unten: Negativkontrolle (Aqua bidest.), Spur 27/28 unten: Wiederholung aus Vorversuch  
SM\*) DNA Size Marker

\*\*) Proben aus Vorversuchen, die auf diesem Gel mitaufgetragen wurden, aber nicht mit der gezeigten PCR zusammenhängen

Die Ergebnisse aus dem Foto der Gelelektrophorese Abbildung 14 wurden in Tabelle 8 dokumentiert. Die in Tabelle 8 aufgezeigten Proben stehen exemplarisch für insgesamt 290 Proben, die untersucht wurden (Probentabelle A, Anhang S. 141).

**Tab. 8: PCR-Ergebnisse zu Abb. 14; Ausschnitt aus der Probentabelle A**

Nr.	Proben-Nr.	Photometr. DNA-Konz. (ng/µl)	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
270	345	315	1,907	+ <sup>1)</sup>	+
271	346	730	1,75	+	+
272	347	140	1,536	+	+
273	348	220	1,681	+	+
274	349	735	1,75	+	+
275	350	190	1,636	+	+
276	351	535	1,715	(+) <sup>2)</sup>	(+)
277	352	475	1,688	+	+
278	353	65	1,572	- <sup>3)</sup>	-
279	354	350	1,771	-	-
280	355	185	1,714	+	+
281	356	335	1,792	+	+
282	357	250	1,694	+	+
283	358	100	1,73	+	+
284	359	460	1,569	+	+
285	360	480	1,76	+	+
286	361	65	1,62	+	+
287	362	305	1,871	+	(+)
288	364	505	1,64	+	+
289	365	425	1,914	+	+
290	366	610	1,741	+	+

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

In dem experimentellen Teil dieser Arbeit wurden primär alle 366 gesammelten Proben der Blut- und Thrombozytenspender des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf einbezogen. Aus allen EDTA-Blutproben wurde die DNA extrahiert und deren Konzentration gemessen. Proben, die eine Konzentration von <10 µg/ml in der Photometrie aufwiesen oder deren Ratio < 1,5 und > 2,2 waren, wurden bereits zu diesem Zeitpunkt von der weiteren Durchführung der Versuchsreihe ausgeschlossen. Dies traf auf 46 Proben zu. Die übrigen 290 Proben wurden auf eine Konzentration von 100 ng/µl angeglichen und anschließend in der *nested*-PCR eingesetzt. Ein eindeutig auswertbares Ergebnis in der *nested*-PCR kam bei 244 Proben zustande. In allen Ansätzen, in denen mit max. je 96 Proben pro Reaktion bestückte Platten verwendet wurden, waren die Negativkontrollen in der PCR negativ, die Positivkontrollen positiv und die internen Kontrollen positiv. Waren diese Voraussetzungen erfüllt, so wurden die PCR-Ergebnisse ausgewertet und dokumentiert. Als auswertbar galten alle Proben, die ein eindeutiges Ergebnis in der 2. PCR und ein eindeutiges

HGH-Produkt hatten. Nach Auswertung aller *nested*-PCR-Ansätze konnte in keiner der Proben CMV-DNA nachgewiesen werden.

#### 4.4. Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Auswertung der zur Verfügung stehenden Daten erfolgte dreigliedrig. Zunächst wurden die Daten der Blut- und Thrombozytenspender ausgewertet, deren Proben bereits im experimentellen Teil dieser Arbeit eingebracht wurden. Anschließend erfolgte die Auswertung der entsprechenden Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender. Im Anschluss werden die ermittelten Allelfrequenzen aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit denen aus der Arbeit von *C. Müller* (2001)<sup>4</sup> verglichen. Dieser analysierte 13.386 Daten freiwilliger potentieller Knochenmarkspender, deren Daten der HLA-A, -B und DRB1-Typisierung ihm aus 38 Spenderdateien deutscher Kliniken zur Verfügung standen. Dies entspricht im Wesentlichen dem Zentralen Knochenmarkspender Register Deutschlands (ZKRD). Die Auswahl erfolgte aufgrund eines hohen Maßes an Vergleichbarkeit der untersuchten Kollektive und soll die Repräsentativität der erhobenen Daten belegen.

---

<sup>4</sup>C. Müller (2001) „Populationsgenetische Parameter der Gewebemerkmale der deutschen Bevölkerung und ihre Anwendungen bei der Suche nach nicht-verwandten Blutstammzellspendern“, Inauguraldissertation der Universität Ulm (ersch. 2002); am 10.03.2010 abgerufen unter [http://vts.uni-ulm.de/docs/2002/1224/vts\\_1224.pdf](http://vts.uni-ulm.de/docs/2002/1224/vts_1224.pdf)

#### 4.4.1 Ergebnisse Blut- und Thrombozytenspender

##### HLA-Klasse-I

##### HLA-A

Die Auswertung der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender ergab keine signifikanten Werte in der Verteilung der CMV-Serologie und dem HLA-A-Merkmal (Tab. 10).

**Tab. 10: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-A-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
A1	36	17,06%	175	39	14,61%	228	>0,05
A2	66	31,28%	145	96	35,96%	171	>0,05
A3	32	15,17%	179	34	12,73%	233	>0,05
A9	31	14,69%	180	27	10,11%	240	>0,05
A10	10	4,74%	201	15	5,62%	252	>0,05
A11	9	4,27%	202	15	5,62%	252	>0,05
A19	18	8,53%	193	27	10,11%	240	>0,05
A28	9	4,27%	202	14	5,24%	253	>0,05
A36	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A. <sup>5)</sup>
A80	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
Summe	211	100,00%		267	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der gesunden Blut- und Thrombozytenspender vorliegt

In beiden Gruppen (Anti-CMV-positiv/ Anti-CMV-negativ) war das HLA-Hauptgruppenmerkmal A2 am stärksten vertreten. Die Merkmale A1, A3, A9 sind mit je über 10% vertreten. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

In Tabelle 11 sind zu den Hauptgruppen des HLA-A-Merkmals die bekannten Untergruppen aufgeführt. Auch die Hauptgruppenmerkmale, die nicht weiter unterteilt werden können, verbleiben zur besseren Vergleichbarkeit und Vollständigkeit in der Darstellung. Die Auswertung ergab ebenfalls für die Subtypen (*splits*) des jeweiligen HLA-A-Untergruppenmerkmals keine signifikanten Unterschiede zwischen den serologisch CMV-positiven und -negativen Spendern. Die anteilig am stärksten auftretende Untergruppe war A24, welche der Hauptgruppe A9 zugeordnet wird.

**Tab. 11: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ		Prüfwert		
	Anzahl	Anteil (%)	Anzahl	Anteil (%)			
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>	d <sup>4)</sup>	p	
A1	36	17,06%	175	39	14,61%	228	>0,05
A2	66	31,28%	145	96	35,96%	171	>0,05
A3	32	15,17%	179	34	12,73%	233	>0,05
A9	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A. <sup>5)</sup>
A23	6	2,84%	205	5	1,87%	262	>0,05
A24	25	11,85%	186	22	8,24%	245	>0,05
A10	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
A25	3	1,42%	208	4	1,50%	263	>0,05
A26	6	2,84%	205	10	3,75%	257	>0,05
A34	0	0,00%	211	0	0,00%	267	>0,05
A43	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
A66	1	0,47%	210	1	0,37%	266	>0,05
A11	9	4,27%	202	15	5,62%	252	>0,05
A19	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
A29	6	2,84%	205	9	3,37%	258	>0,05
A30	2	0,95%	209	4	1,50%	263	>0,05
A31	4	1,90%	207	5	1,87%	262	>0,05
A32	6	2,84%	205	7	2,62%	260	>0,05
A33	0	0,00%	211	2	0,75%	265	>0,05
A74	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
A28	7	3,32%	204	7	2,62%	260	>0,05
A68	2	0,95%	209	7	2,62%	260	>0,05
A69	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
A36	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
A80	0	0,00%	211	0	0,00%	267	k.A.
	211	100,00%		267	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der gesunden Blut- und Thrombozytenspender vorliegt

## HLA-B

Die Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-B-Merkmal ergab bei dem Hauptgruppenmerkmalen HLA-B13 ein signifikantes Ergebnis. B13-Träger waren signifikant häufiger in der Gruppe der CMV-seronegativen Spender (43 negativ (15,09%) versus 7 positiv (3,32%),  $p < 0,0001$ ). Die Allelfrequenz *n. Müller* (2001) für dieses Allel ist 3,51%. Das entspricht dem Anteil der serologisch anti-CMV-positiven Gruppe. Die Anti-CMV-negativen Spender stechen anteilig mit 15,09% deutlich hervor (Tab. 12).

**Tab. 12: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-B-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV - positiv			CMV - negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
B5	14	6,64%	197	16	5,61%	269	>0,05
B7	34	16,11%	177	37	12,98%	248	>0,05
B8	27	12,80%	184	30	10,53%	255	>0,05
B12	28	13,27%	183	35	12,28%	250	>0,05
<b>B13</b>	<b>7</b>	<b>3,32%</b>	204	<b>43</b>	<b>15,09%</b>	242	<b>&lt;0,0001</b>
B14	2	0,95%	209	5	1,75%	280	>0,05
B15	16	7,58%	195	24	8,42%	261	>0,05
B16	8	3,79%	203	5	1,75%	280	>0,05
B17	12	5,69%	199	10	3,51%	275	>0,05
B18	10	4,74%	201	10	3,51%	275	>0,05
B21	3	1,42%	208	2	0,70%	283	>0,05
B22	4	1,90%	207	11	3,86%	274	>0,05
B27	7	3,32%	204	10	3,51%	275	>0,05
B35	13	6,16%	198	22	7,72%	263	>0,05
B37	3	1,42%	208	4	1,40%	281	>0,05
B40	21	9,95%	190	17	5,96%	268	>0,05
B41	1	0,47%	210	4	1,40%	281	>0,05
B42	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A. <sup>5)</sup>
B47	1	0,47%	210	0	0,00%	285	>0,05
B48	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B53	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B59	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B67	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B73	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B78	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B81	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B82	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B83	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
Summe	211	100,00%		285	100,00%		

<sup>1)</sup> a= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A.= keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der gesunden Blut- und Thrombozytenspender vorliegt

In den Tabellen 13 A und B sind zu den Hauptgruppen des HLA-B-Merkmals die bekannten Untergruppen aufgeführt. Auch die Hauptgruppenmerkmale, die nicht weiter unterteilt werden können, verbleiben zur besseren Vergleichbarkeit und Vollständigkeit in der Darstellung. Die *splits* HLA-B44 und -B45, die B12 bildend, sind beide statistisch hochsignifikant verteilt. B44 tritt nur bei serologisch CMV-positiven Spendern auf (27 positive (12,79%) versus 0 negative (0%),  $p < 0,0001$ ) und B45 tritt fast nur bei serologisch CMV-negativen Spendern auf (35 negative (12,28%) versus 1 positive (0,47%),  $p < 0,0001$ ).

**Tab. 13 a: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-B-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV - positiv		CMV - negativ			Prüfwert	
	Anzahl	Anteil (%)		Anzahl	Anteil (%)		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
B5	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A. <sup>5)</sup>
B51	13	6,16%	198	13	4,56%	272	>0,05
B52	1	0,47%	210	3	1,05%	282	>0,05
B7	34	16,11%	177	37	12,98%	248	>0,05
B8	27	12,79%	184	30	10,53%	255	>0,05
B12	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
<b>B44</b>	<b>27</b>	<b>12,79%</b>	184	<b>0</b>	<b>0,00%</b>	285	<b>&lt;0,0001</b>
<b>B45</b>	<b>1</b>	<b>0,47%</b>	210	<b>35</b>	<b>12,28%</b>	250	<b>&lt;0,0001</b>
<b>B13</b>	<b>7</b>	<b>3,32%</b>	204	<b>43</b>	<b>15,09%</b>	242	<b>&lt;0,0001</b>
B14	2	0,95%	209	5	1,75%	280	>0,05
B64	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B65	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B15	0	0,00%	211	2	0,70%	283	>0,05
B62	15	7,11%	196	22	7,72%	263	>0,05
B63	1	0,47%	210	0	0,00%	285	>0,05
B70	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B71	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B72	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B75	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B76	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B77	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B46	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B16	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B38	5	2,37%	206	4	1,40%	281	>0,05
B39	3	1,42%	208	1	0,35%	284	>0,05
B17	0	0,00%	211	1	0,35%	284	>0,05
B57	10	4,74%	201	8	2,81%	277	>0,05
B58	2	0,95%	209	1	0,35%	284	>0,05
B18	10	4,74%	201	10	3,51%	275	>0,05
B21	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.

<sup>1)</sup> a= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d= Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A.= keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der gesunden Blut- und Thrombozytenspender vorliegt

**Tab.13 b (Fortsetzung Tab.13 a): Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-B-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV - positiv		CMV - negativ		Prüfwert		
	Anzahl	Anteil (%)	Anzahl	Anteil (%)			
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>	d <sup>4)</sup>	p	
B49	3	1,42%	208	1	0,35%	284	>0,05
B50	0	0,00%	211	1	0,35%	284	>0,05
B22	0	0,00%	211	1	0,35%	284	>0,05
B54	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B55	3	1,42%	208	9	3,16%	276	>0,05
B56	1	0,47%	210	1	0,35%	284	>0,05
B27	7	3,32%	204	10	3,51%	275	>0,05
B35	13	6,16%	198	22	7,72%	263	>0,05
B37	3	1,42%	208	4	1,40%	281	>0,05
B40	2	0,95%	209	1	0,35%	284	>0,05
B60	13	6,16%	198	12	4,21%	273	>0,05
B61	6	2,84%	205	4	1,40%	281	>0,05
B41	1	0,47%	210	4	1,40%	281	>0,05
B42	0	0,00%	211	0	0,00%	285	>0,05
B47	1	0,47%	210	0	0,00%	285	>0,05
B48	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B53	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B59	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B67	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B73	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B78	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B81	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B82	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
B83	0	0,00%	211	0	0,00%	285	k.A.
Σ aus Tab. 13 A und B	211	100,00%		285	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der gesunden Blut- und Thrombozytenspender vorliegt

Dabei ist bemerkenswert, dass die Anti-CMV-positiven Spender anteilig der Allelfrequenz *n. Müller* (12,19%) sehr nahe kommen, während die Vergleichszahlen in der Gruppe der Anti-CMV-negativen Spender für dieses Allel mit 0% deutlich von dem erwarteten Wert abweichen. Für B45 verhält es sich ähnlich, die Allelfrequenz *n. Müller* 0,39% findet sich nur in einer der Gruppen, in diesem Fall in der Gruppe der anti-CMV-positiven Spender. Statistisch signifikant ist das Ergebnis aber für die Gruppe der anti-CMV-negativen Spender (1 positiver (0,47%) versus 35 negative (12,28%)). Gleiches gilt für das Merkmal B13, das mit  $p < 0,0001$  hochsignifikant zugunsten der anti-CMV-negativen Spender auffällt (7 positive

(3,32%) versus 43 negative (15,09%). Die Allelfrequenz n. Müller ist bei 3,51% anzunehmen. Dieser Wert kommt anteilig dem der anti-CMV-positiven Blut- und Thrombozytenspenden in der untersuchten Gruppe sehr nahe.

Durch Anwendung der Bonferroni-Korrektur für Tabelle 13 a-b ergibt sich ein korrigierter p-Wert von  $p < 0,002$ . Trotzdem verbleiben die Ergebnisse für HLA-B44, -B45 und -B13 statistisch hochsignifikant.

## HLA-Klasse-II

### HLA-DRB1

Die Datenauswertung innerhalb der Hauptgruppenmerkmale des HLA-DRB1-Merkmals ergab keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den Gruppen der serologisch CMV-positiven und -negativen Blut- und Thrombozytenspender. Bei den Anti-CMV-positiven Spendern war das Merkmal DR6 (19,48%) am häufigsten vertreten. Unter den Anti-CMV-negativen Spendern war dagegen DR2 (24,53%) am häufigsten vertreten (Tab. 14).

**Tab. 14: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DRB1-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ		Prüfwert		
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil			
	a <sup>1)</sup>	c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>	d <sup>4)</sup>	p		
DR1	3	3,90%	74	11	10,38%	95	>0,05
DR2	13	16,88%	64	26	24,53%	80	>0,05
DR3	13	16,88%	64	12	11,32%	94	>0,05
DR4	12	15,58%	65	12	11,32%	94	>0,05
DR5	10	12,99%	67	11	10,38%	95	>0,05
DR6	15	19,48%	62	15	14,15%	91	>0,05
DR7	6	7,79%	71	16	15,09%	90	>0,05
DR8	2	2,60%	75	2	1,89%	104	>0,05
DR9	1	1,30%	76	1	0,94%	105	>0,05
DR10	2	2,60%	75	0	0,00%	106	>0,05
Summe	77	100,00%		106	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

In Tabelle 15 sind zu den Hauptgruppen des HLA-DRB1-Merkmals die bekannten Untergruppen aufgeführt. Auch die Hauptgruppenmerkmale, die nicht weiter unterteilt werden können, verbleiben zur besseren Vergleichbarkeit in der Darstellung. In der Gruppe der Anti-CMV-positiven Spender sind die Subtypen DR17 (DR3) (10,39%) und DR11 (DR5) (10,39%) anteilig am häufigsten vertreten. Es waren sind signifikanten Unterschiede feststellbar. Dagegen traten in der Gruppe der Anti-CMV-negativen Spender die Allele DR15 (DR2) (17,92%) und DR13 (DR6) (10,38%) anteilig am stärksten hervor.

**Tab. 15: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DRB1-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ			Prüfwert	
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
DR1	3	3,90%	74	11	10,38%	95	>0,05
DR2	2	2,60%	75	6	5,66%	100	>0,05
DR15	7	9,09%	70	19	17,92%	87	>0,05
DR16	4	5,19%	73	1	0,94%	105	>0,05
DR3	5	6,49%	72	4	3,77%	102	>0,05
DR17	8	10,39%	69	8	7,55%	98	>0,05
DR18	0	0,00%	77	0	0,00%	106	k.A. <sup>5)</sup>
DR4	12	15,58%	65	12	11,32%	94	>0,05
DR5	0	0,00%	77	0	0,00%	106	k.A.
DR11	8	10,39%	69	10	9,43%	96	>0,05
DR12	2	2,60%	75	1	0,94%	105	>0,05
DR6	3	3,90%	74	2	1,89%	104	>0,05
DR13	11	14,29%	66	11	10,38%	95	>0,05
DR14	1	1,30%	76	2	1,89%	104	>0,05
DR7	6	7,79%	71	16	15,09%	90	>0,05
DR8	2	2,60%	75	2	1,89%	104	>0,05
DR9	1	1,30%	76	1	0,94%	105	>0,05
DR10	2	2,60%	75	0	0,00%	106	>0,05
Summe	77	100,00%		106	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der gesunden Blut- und Thrombozytenspender vorliegt

### HLA-DQB1

Die Auswertung des HLA-DQB-Merkmals zeigte keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

HLA-DQ1 und 3 waren am häufigsten vertreten, unabhängig vom Serostatus (Tab.16).

**Tab. 16: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DQB-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörper-Status**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ			Prüfwert	
	Anzahl	Anteil (%)		Anzahl	Anteil (%)		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
DQ1	52	42,62%	70	44	48,35%	47	>0,05
DQ2	27	22,13%	95	16	17,58%	75	>0,05
DQ3	40	32,79%	82	29	31,87%	62	>0,05
DQ4	3	2,46%	119	2	2,20%	89	>0,05
Summe	122	100,00%		91	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

In Tabelle 17 sind zu den Hauptgruppen des HLA-DQB-Merkmals die bekannten Untergruppen aufgeführt. Auch die Hauptgruppenmerkmale, die nicht weiter unterteilt werden können, verbleiben zur besseren Vergleichbarkeit in der Darstellung. Im Vergleich zu Tabelle 16 erschien in der Auswertung der Daten das Hauptgruppenmerkmal DQ1 statistisch signifikant (2 positive (1,64%) versus 7 negative (7,69%),  $p < 0,03$ ). Zu bemerken ist allerdings, dass hier DQ1 zahlenmäßig stark in seine Subtypen DQ5 und DQ6 zerlegt ist, welche beide keine signifikanten Unterschiede zeigen. In der Gruppe DQ1 verbleibt nur eine kleine Restanzahl, deren Ergebnis nur rechnerisch relevant erscheint, tatsächlich aber nicht gewertet werden darf. Von den Untergruppenmerkmalen erscheint als einziges DQ9 im Vergleich der serologischen Gruppen CMV-negativ und -positiv relevant (2 positive (1,64%) versus 8 negative (8,79%),  $p < 0,002$ ). DQ9 ist neben DQ7 und DQ8 ein *split* der Hauptgruppe DQ3.

**Tab. 17: Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DQB-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ			Prüfwert	
	Anzahl	Anteil (%)		Anzahl	Anteil (%)		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
<b>DQ1</b>	<b>2</b>	<b>1,64%</b>	120	<b>7</b>	<b>7,69%</b>	84	<b>&lt;0,03</b>
DQ5	20	16,39%	102	12	13,19%	79	>0,05
DQ6	30	24,59%	92	25	27,47%	66	>0,05
DQ2	27	22,13%	95	16	17,58%	75	>0,05
DQ3	3	2,46%	119	0	0,00%	91	>0,05
DQ7	27	22,13%	95	17	18,68%	74	>0,05
DQ8	8	6,56%	114	4	4,40%	87	>0,05
<b>DQ9</b>	<b>2</b>	<b>1,64%</b>	120	<b>8</b>	<b>8,79%</b>	83	<b>&lt;0,02</b>
DQ4	3	2,46%	119	2	2,20%	89	>0,05
<b>Summe</b>	<b>122</b>		<b>100%</b>	<b>91</b>	<b>100%</b>		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der gesunden Blut- und Thrombozytenspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

#### 4.4.2 Ergebnisse potentieller Stammzell- und Knochenmarkspender

Nach der Auswertung des ersten Kollektivs, der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender, und den dabei auftretenden statistisch hochsignifikanten Ergebnissen für HLA-B44, -B45 und -B13 erfolgte die Erweiterung der entsprechenden Datenanalyse auf eine deutlich größere Gruppe, um dieses Ergebnis bestätigen zu können. Daher wurden aus der Datei potentieller Stammzell- und Knochenmarkspender des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf die Datensätze (Daten zu einem potentiellen Spender gehörig) der registrierten potentiellen Spender ausgewertet, für die der CMV-Status serologisch bekannt war: anti-CMV-positiv oder anti-CMV-negativ. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung (06/2006 Datei zur Auswertung erhalten) standen eine Gesamt-anzahl von 17.611 Datensätzen von potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern zur Verfügung. Ziel der Analyse war es, zu prüfen, ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen einem bestimmten HLA-Merkmal und dem CMV-Antikörperstatus gibt, und ob die zuvor aufgestellte Nullhypothese angenommen oder abgelehnt werden kann. Für jedes Merkmals (HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DRB1, HLA-DQB1) stand je eine bestimmte Anzahl an Daten zur Verfügung. Dabei unterschieden sich die Gruppen zahlenmäßig, da nicht für jeden Spender die Bestimmung aller o.g. Merkmale zur Verfügung stand.

Da die untersuchten Daten aus der Datei der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender nach der von 1987 zugrunde gelegten Nomenklatur dokumentiert sind, werden eben diese Bezeichnungen der Allele in den folgenden Tabellen benutzt, um evtl. Übertragungsfehler zu vermeiden. Die Nomenklatur der HLA-Merkmale definiert, wie oben beschrieben, für jedes Merkmal Allel- bzw. Hauptgruppen, sog. *broads*, und spezifische Allele in Untergruppen, sog. *splits*. Nicht für jedes Hauptgruppenmerkmal sind Untergruppen definiert bzw. bekannt.

Es werden im Folgenden die Ergebnisse der Auswertungen für jedes Merkmal einzeln (HLA-A,-B,-Cw,-DRB1 und -DQB1) beschrieben. Die Analyse erfolgte jeweils aufgeteilt in die Allelhauptgruppen (*broads*) und an zweiter Stelle in die Alleluntergruppen (*splits*). Betrachtet wurden die Allele (Haplotypen) eines Chromosomenpaares eines Datensatzes getrennt bzw. unabhängig voneinander. Die Allelkombinationen wurden nicht berücksichtigt.

## HLA-Klasse-I

### HLA-A

Für 15.836 potentielle Stammzellspender lagen sowohl die Daten der serologischen CMV-Typisierung als auch die Daten für den HLA-A-Typ vor. In der CMV-Serologie waren 9.158 positiv und 6.678 negativ getestet worden. In der Gruppe der serologisch CMV-positiven Datensätze war für 8.360 das HLA-A Merkmal bekannt. Daraus berechnete sich die Anzahl 16.720 einzelnen Allelen. In 6.445 Datensätzen waren sowohl der negative Anti-CMV-Status, als auch das HLA-A-Merkmal bekannt. Daher standen in der Gruppe 12890 Allele zur Auswertung zur Verfügung. Innerhalb der Hauptgruppen, *broad*s, gab es keine statistisch signifikant auffallenden Merkmale. Die stärkste Gruppe ist HLA-A2 mit je ca. 31%, was ungefähr der allgemeinen Allelfrequenz von HLA-A2 von 29,66% in der deutschen Bevölkerung entspricht (*n. Müller*). Gefolgt von A1 mit 16,40% (*n. Müller* 16,25%) und A3 mit 14,78% (*n. Müller* 15,13%) (Tab. 18).

**Tab. 18: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
A1	2742	16,40%	13.978	2069	16,05%	10.821	>0,05
A2	5134	30,71%	11.586	4031	31,27%	8.859	>0,05
A3	2472	14,78%	14.248	2008	15,58%	10.882	>0,05 (<0,06)
A9	1832	10,96%	14.888	1367	10,61%	11.523	>0,05
A10	1064	6,36%	15.656	769	5,97%	12.121	>0,05
A11	914	5,47%	15.806	694	5,38%	12.196	>0,05
A19	1819	10,88%	14.901	1343	10,42%	11.547	>0,05
A28	743	4,44%	15.977	608	4,72%	12.282	>0,05
A36	1	0,01%	16.719	1	0,01%	12.889	>0,05
A80	0	0,00%	16.720	0	0,00%	12.890	k.A. <sup>5)</sup>
Summe	16720	100,00%		12890	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender vorliegt

Bei Betrachtung der Untergruppen, *splits* (Tab. 19), fiel das Merkmal HLA-A28 in der Gruppe der serologisch CMV-negativen statistisch signifikant auf. In der Gruppe der serologisch CMV-positiven potentiellen Spendergruppe zeigte sich für das Merkmal HLA-A33 eine statistische Signifikanz ( $p < 0,03$ ). Es waren 173 (1,03%) positiv für HLA-A33 und hatten einen positiven CMV-Serostatus, dagegen waren 101 (0,78%) innerhalb der Gruppe

der CMV-seronegativen für das HLA-A33-Merkmal getestet worden. Serologisch CMV-positiv waren 553 (3,31%) und CMV-negativ waren 488 (3,79%). Dieser Unterschied ist nach Anwendung des Chi-Quadrat-Tests statistisch relevant ( $p < 0,03$ ) zugunsten CMV-negativ. Die Allelfrequenzen für HLA-A33 und -A28 weichen nicht wesentlich von den Werten *n. Müller* ab.

**Tab. 19: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ			Prüfwert	
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
A1	2742	16,40%	13.978	2069	16,05%	10.821	>0,05
A2	5134	30,71%	11.586	4031	31,27%	8.859	>0,05
A3	2472	14,78%	14.248	2008	15,58%	10.882	>0,05 (<0,06)
A9	38	0,23%	16.682	34	0,26%	12.856	>0,05
A23	328	1,96%	16.392	248	1,92%	12.642	>0,05
A24	1466	8,77%	15.254	1085	8,42%	11.805	>0,05
A10	17	0,10%	16.703	14	0,11%	12.876	>0,05
A25	437	2,61%	16.283	317	2,46%	12.573	>0,05
A26	569	3,40%	16.151	413	3,20%	12.477	>0,05
A34	11	0,07%	16.709	7	0,05%	12.883	>0,05
A43	1	0,01%	16.719	0	0,00%	12.890	>0,05
A66	29	0,17%	16.691	18	0,14%	12.872	>0,05
A11	914	5,47%	15.806	694	5,38%	12.196	>0,05
A19	1	0,01%	16.719	1	0,01%	12.889	>0,05
A29	398	2,38%	16.322	288	2,23%	12.602	>0,05
A30	336	2,01%	16.384	271	2,10%	12.619	>0,05
A31	369	2,21%	16.351	263	2,04%	12.627	>0,05
A32	538	3,22%	16.182	414	3,21%	12.476	>0,05
<b>A33</b>	<b>173</b>	<b>1,03%</b>	16.547	<b>101</b>	<b>0,78%</b>	12.789	<b>&lt;0,03</b>
A74	4	0,02%	16.716	5	0,04%	12.885	>0,05
<b>A28</b>	<b>553</b>	<b>3,31%</b>	16.167	<b>488</b>	<b>3,79%</b>	12.402	<b>&lt;0,03</b>
A68	184	1,10%	16.536	116	0,90%	12.774	>0,05
A69	6	0,04%	16.714	4	0,03%	12.886	>0,05
A36	1	0,01%	16.719	1	0,01%	12.889	>0,05
A80	0	0,00%	16.720	0	0,00%	12.890	k.A. <sup>5)</sup>
Summe	16720	100,00%		12890	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender vorliegt

## HLA-B

Aus der Spenderdatei der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender waren die Daten von 14.808 Spendern, die serologisch CMV typisiert waren, und bei denen der HLA-B-Typ bestimmt worden war, bekannt. In der serologischen Untersuchung des CMV-Status waren 8.361 Spender positiv und 6.447 negativ. Aus diesen Gruppen ergab sich eine Anzahl von 29.620 zu untersuchenden HLA-B-Merkmalen (Tab. 20).

**Tab. 20: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-B-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
B5	1023	6,12%	15.703	824	6,39%	12.070	>0,05
B7	2314	13,83%	14.412	1865	14,46%	11.029	>0,05
B8	1877	11,22%	14.849	1505	11,67%	11.389	>0,05
B12	2101	12,56%	14.625	1579	12,25%	11.315	>0,05
B13	604	3,61%	16.122	420	3,26%	12.474	>0,05
B14	403	2,41%	16.323	330	2,56%	12.564	>0,05
B15	1454	8,69%	15.272	1151	8,93%	11.743	>0,05
<b>B16</b>	<b>633</b>	<b>3,78%</b>	16.093	<b>425</b>	<b>3,30%</b>	12.469	<b>&lt;0,03</b>
B17	718	4,29%	16.008	538	4,17%	12.356	>0,05
B18	740	4,42%	15.986	582	4,51%	12.312	>0,05
B21	338	2,02%	16.388	239	1,85%	12.655	>0,05
B22	371	2,22%	16.355	282	2,19%	12.612	>0,05
B27	788	4,71%	15.938	622	4,82%	12.272	>0,05
B35	1647	9,85%	15.079	1225	9,50%	11.669	>0,05
B37	236	1,41%	16.490	167	1,30%	12.727	>0,05
B40	1249	7,47%	15.477	997	7,73%	11.897	>0,05
B41	141	0,84%	16.585	93	0,72%	12.801	>0,05
B42	3	0,02%	16.723	2	0,02%	12.892	>0,05
B47	32	0,19%	16.694	20	0,16%	12.874	>0,05
B48	3	0,02%	16.723	2	0,02%	12.892	>0,05
B53	38	0,23%	16.688	21	0,16%	12.873	>0,05
B59	1	0,01%	16.725	0	0,00%	12.894	>0,05
B67	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A. <sup>5)</sup>
B73	12	0,07%	16.714	5	0,04%	12.889	>0,05
B78	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B81	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B82	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B83	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
<b>Summe</b>	<b>16726</b>	<b>100,00%</b>		<b>12894</b>	<b>100,00%</b>		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A.= keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender vorliegt

In den Hauptgruppen zeigte sich ein statistisch signifikantes Merkmal. HLA-B16 war in der Gruppe der serologisch CMV-positiven signifikant häufiger anzutreffen als in der Gruppe der serologisch CMV-negativen (633 positiv (3,78%) versus 425 negativ (3,30%),  $p < 0,03$ ).

Die Untersuchung der Untergruppen zeigte statistische Signifikanzen in der Gruppe der serologisch CMV-negativen potentiellen Stammzellspender für die HLA-B-Merkmale HLA-B38 und -B46 (Tab. 21 A und B).

**Tab. 21 a: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a		c	b		d	p
B5	29	0,17%	16.697	27	0,21%	12.867	>0,05
B51	864	5,17%	15.862	677	5,25%	12.217	>0,05
B52	130	0,78%	16.596	120	0,93%	12.774	>0,05
B7	2314	13,83%	14.412	1865	14,46%	11.029	>0,05
B8	1877	11,22%	14.849	1505	11,67%	11.389	>0,05
B12	29	0,17%	16.697	20	0,16%	12.874	>0,05
B44	1998	11,95%	14.728	1504	11,66%	11.390	>0,05
B45	74	0,44%	16.652	55	0,43%	12.839	>0,05
B13	604	3,61%	16.122	420	3,26%	12.474	>0,05
B14	360	2,15%	16.366	270	2,09%	12.624	>0,05
<b>B64</b>	<b>16</b>	<b>0,10%</b>	16.710	<b>28</b>	<b>0,22%</b>	12.866	<b>&lt;0,008</b>
B65	27	0,16%	16.699	32	0,25%	12.862	>0,05
B15	74	0,44%	16.652	74	0,57%	12.820	>0,05
B62	1292	7,72%	15.434	1034	8,02%	11.860	>0,05
B63	58	0,35%	16.668	31	0,24%	12.863	>0,05
B70	6	0,04%	16.720	5	0,04%	12.889	>0,05
B71	7	0,04%	16.719	1	0,01%	12.893	>0,05
B72	9	0,05%	16.717	5	0,04%	12.889	>0,05
B75	2	0,01%	16.724	1	0,01%	12.893	>0,05
B76	0	0,00%	16.726	1	0,01%	12.893	>0,05
B77	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
<b>B46</b>	<b>6</b>	<b>0,04%</b>	16.720	<b>0</b>	<b>0,00%</b>	12.894	<b>&lt;0,04</b>
B16	10	0,06%	16.716	4	0,03%	12.890	>0,05
<b>B38</b>	<b>314</b>	<b>1,88%</b>	16.412	<b>197</b>	<b>1,53%</b>	12.697	<b>&lt;0,03</b>
B39	309	1,85%	16.417	224	1,74%	12.670	>0,05
B17	81	0,48%	16.645	78	0,60%	12.816	>0,05
B57	511	3,06%	16.215	363	2,82%	12.531	>0,05
B58	126	0,75%	16.600	97	0,75%	12.797	>0,05
B18	740	4,42%	15.986	582	4,51%	12.312	>0,05
B21	10	0,06%	16.716	5	0,04%	12.889	>0,05
B49	179	1,07%	16.547	130	1,01%	12.764	>0,05
B50	149	0,89%	16.577	104	0,81%	12.790	>0,05

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender vorliegt

**Tab. 21 b: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a		c	b		d	p
B22	19	0,11%	16.707	22	0,17%	12.872	>0,05
B54	9	0,05%	16.717	2	0,02%	12.892	>0,05
B55	182	1,09%	16.544	128	0,99%	12.766	>0,05
B56	161	0,96%	16.565	130	1,01%	12.764	>0,05
B27	788	4,71%	15.938	622	4,82%	12.272	>0,05
B35	1647	9,85%	15.079	1225	9,50%	11.669	>0,05
B37	236	1,41%	16.490	167	1,30%	12.727	>0,05
B40	173	1,03%	16.553	164	1,27%	12.730	>0,05 (<0,06)
B60	838	5,01%	15.888	645	5,00%	12.249	>0,05
B61	238	1,42%	16.488	188	1,46%	12.706	>0,05
B41	141	0,84%	16.585	93	0,72%	12.801	>0,05
B42	3	0,02%	16.723	1	0,01%	12.893	>0,05
B47	32	0,19%	16.694	20	0,16%	12.874	>0,05
B48	3	0,02%	16.723	2	0,02%	12.892	>0,05
B53	38	0,23%	16.688	21	0,16%	12.873	>0,05
B59	1	0,01%	16.725	0	0,00%	12.894	>0,05
B67	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B73	12	0,07%	16.714	5	0,04%	12.889	k.A.
B78	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B81	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B82	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
B83	0	0,00%	16.726	0	0,00%	12.894	k.A.
Σ aus Tab. 21 A und B	16726	100%		12894	100%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>5)</sup> k.A. = keine Auswertung erfolgt, da dieses Merkmal bei keinem der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender vorliegt

HLA-B38 ist eine Untergruppe der Hauptgruppe B16, die bereits signifikant zugunsten der Anti-CMV-positiven aufgefallen. Die Gruppe der serologisch CMV-positiven potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender ist auch für den Subtypen gleichsinnig statistisch signifikant häufiger getestet worden (314 positive (1,81%) versus 197 (1,53%),  $p < 0,03$ ). Die zweite Untergruppe B39 der Hauptgruppe B16 zeigt keine Gewichtung zugunsten einer serologischen Anti-CMV-Gruppe. HLA-B46-Merkmalsträger waren ebenfalls statistisch signifikant mehr in der Gruppe der CMV-positiven Spender zu finden (6 positive (0,04%) versus 0 negative (0%),  $p < 0,04$ ). In der Gruppe die CMV-negativ getestet waren, war das Merkmal HLA-B64 statistisch signifikant (28 positive (0,22%) versus 16 negative (0,1%),  $p < 0,008$ ). Die Anwendung der Bonferroni-Korrektur in Analogie zu Tab. 13 a-b für zu einem

korrigierten p-Wert  $p < 0,001$ . Konsequenterweise würden nach dieser Korrektur keine statistisch signifikanten Ergebnisse für HLA-B-Merkmale in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender verbleiben. Insgesamt weichen die Allelfrequenzen nicht erwähnenswert von den Daten n. Müller ab.

### HLA-Cw

Für 7.508 potentielle Stammzell- und Knochenmarkspender lagen sowohl die CMV-Serologie als auch ein Ergebnis für das HLA-Cw-Merkmal vor. Darunter waren 3.704 potentielle Spender serologisch CMV-negativ und 3.804 CMV-positiv getestet worden. Insgesamt standen 15.016 Daten für dieses Merkmal zur Auswertung zur Verfügung.

In der Analyse der HLA-Cw-Daten wurden zunächst die Hauptgruppen betrachtet (Tab. 22). Es gibt acht definierte Hauptgruppen. Davon präsentierten sich nach der statistischen Analyse zwei als statistisch signifikant in der Verteilung. Unter den Hauptgruppen, *broads*, waren HLA-Cw2 und -Cw7 signifikant aufgefallen. Das Merkmal HLA-Cw2 kam in der Gruppe der serologisch CMV-negativ getesteten Proben statistisch signifikant häufiger vor (759 positive (9,98%) versus 871 negative (11,76%),  $p < 0,0005$ ). HLA-Cw7 stach in der Gruppe zugunsten der CMV-positiv getesteten hervor. Potentielle Spender, die dieses Merkmal in ihrem Haplotyp enthielten, waren überdurchschnittlich häufig CMV-positiv (1.755 positive (23,06%) versus 1.588 negative (21,44%),  $p < 0,02$ ).

**Tab. 22: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-Cw-Hauptgruppenmerkmal (*broads*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
Cw1	372	4,89%	7.236	352	4,75%	7.056	>0,05
<b>Cw2</b>	<b>759</b>	<b>9,98%</b>	6.849	<b>871</b>	<b>11,76%</b>	6.537	<b>&lt;0,0005</b>
Cw3	1842	24,22%	5.766	1810	24,43%	5.598	>0,05
Cw4	1432	18,82%	6.176	1455	19,64%	5.953	>0,05
Cw5	546	7,18%	7.062	511	6,90%	6.897	>0,05
Cw6	860	11,30%	6.748	780	10,53%	6.628	>0,05
<b>Cw7</b>	<b>1755</b>	<b>23,06%</b>	5.853	<b>1588</b>	<b>21,44%</b>	5.820	<b>&lt;0,02</b>
Cw8	42	0,55%	7.566	41	0,55%	7.367	>0,05
Summe	7608	100,00%		7408	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

Die weitere Analyse der HLA-Cw Merkmale in den Untergruppen, *splits*, erbrachte keine statistisch relevanten Ergebnisse (Tab. 23).

**Tab. 23: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-Cw-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ		Prüfwert		
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil			
	a <sup>1)</sup>	c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>	d <sup>4)</sup>	p		
Cw1	372	4,89%	7.236	352	4,75%	7.056	>0,05
<b>Cw2</b>	<b>759</b>	<b>9,98%</b>	<b>6.849</b>	<b>871</b>	<b>11,76%</b>	<b>6.537</b>	<b>&lt;0,0005</b>
Cw3	1810	23,79%	5.798	1784	24,08%	5.624	>0,05
Cw9	32	0,42%	7.576	25	0,34%	7.383	>0,05
Cw10	0	0,00%	7.608	1	0,01%	7.407	>0,05
Cw4	1432	18,82%	6.176	1455	19,64%	5.953	>0,05
Cw5	546	7,18%	7.062	511	6,90%	6.897	>0,05
Cw6	860	11,30%	6.748	780	10,53%	6.628	>0,05
<b>Cw7</b>	<b>1755</b>	<b>23,07%</b>	<b>5.853</b>	<b>1588</b>	<b>21,44%</b>	<b>5.820</b>	<b>&lt;0,02</b>
Cw8	42	0,55%	7.566	41	0,55%	7.367	>0,05
Summe	7608	100,00%		7408	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

## HLA-Klasse-II

### HLA-DRB1

Für das Merkmal HLA-DRB1 lagen die Daten von 5.345 potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern vor, für die sowohl der CMV-Status bekannt war als auch der HLA-DRB1-Typ. Davon waren 2.362 serologisch CMV-positiv und 2.983 serologisch CMV-negativ. Entsprechend konnten 10.690 Allele betrachtet werden.

In der statistischen Auswertung der Daten in den Hauptgruppen zeigte sich kein statistisch signifikantes Allel. Die Allelfrequenzen weichen nur geringfügig von den Vergleichswerten *n. Müller* ab (Tab. 24).

**Tab. 24: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DRB1-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
DR1	541	11,45%	4.183	700	11,73%	5.266	>0,05
DR2	780	16,51%	3.944	1057	17,72%	4.909	>0,05
DR3	614	13,00%	4.110	740	12,40%	5.226	>0,05
DR4	654	13,84%	4.070	868	14,55%	5.098	>0,05
DR5	626	13,25%	4.098	743	12,45%	5.223	>0,05
DR6	715	15,14%	4.009	878	14,72%	5.088	>0,05
DR7	570	12,07%	4.154	678	11,36%	5.288	>0,05
DR8	141	2,98%	4.583	186	3,12%	5.780	>0,05
DR9	41	0,87%	4.683	65	1,09%	5.901	>0,05
DR10	42	0,89%	4.682	51	0,85%	5.915	>0,05
Summe	4724	100,00%		5966	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

Bei Betrachtung der *splits* (Tab. 25) zeigt sich statistisch eine signifikante Verteilungen bei dem HLA-DRB1-Merkmal DR15. HLA-DR15 ist neben HLA-DR16 eine Untergruppe des Merkmals HLA-DR2. Innerhalb der potentiellen Stammzell- und Knochenmerkspender fand sich eine Verteilung zugunsten derer, die serologisch CMV-negativ waren (492 positive (10,41%) versus 710 negative (11,90%),  $p < 0,02$ ). Die Allelfrequenzen der Untergruppen weichen im Vergleich *n. Müller* ab. Bei Betrachtung der *splits* zeigt sich, dass der

Unterschied v.a. in HLA-DR15 (11,24% versus 15,77% n. Müller) besteht. Innerhalb der anderen *splits* erscheint HLA-DR3 im Vergleich zur isolierten Hauptgruppenbetrachtung statistisch signifikant zugunsten der Gruppe der CMV-positiv getesteten potentiellen Stammzellspender ( $p < 0,002$ ). Es ergibt sich aber ein anderes Verteilungsverhältnis der DR3-Gruppe, da nur für einen Teil der DR3-Gruppe auch die Untergruppen bekannt sind. Betrachtete man die Untergruppen HLA-DR17 und –DR18 zu HLA-DR3, so zeigte sich keine statistische Signifikanz zugunsten einer der beiden Untergruppen.

**Tab. 25: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DRB1-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv			CMV-negativ			Prüfwert
	Anzahl	Anteil		Anzahl	Anteil		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
DR1	541	11,45%	4.183	700	11,73%	5.266	>0,05
DR2	228	4,83%	4.496	261	4,37%	5.705	>0,05
<b>DR15</b>	<b>492</b>	<b>10,41%</b>	4.232	<b>710</b>	<b>11,90%</b>	5.256	<b>&lt;0,02</b>
DR16	60	1,27%	4.664	86	1,44%	5.880	>0,05
<b>DR3</b>	<b>294</b>	<b>6,22%</b>	4.430	<b>285</b>	<b>4,78%</b>	5.681	<b>&lt;0,002</b>
DR17	319	6,75%	4.405	453	7,59%	5.513	>0,05
DR18	1	0,02%	4.723	2	0,03%	5.964	>0,05
DR4	654	13,84%	4.070	868	14,55%	5.098	>0,05
DR5	13	0,28%	4.711	20	0,34%	5.946	>0,05
DR11	524	11,09%	4.200	603	10,11%	5.363	>0,05
DR12	89	1,88%	4.635	120	2,01%	5.846	>0,05
DR6	86	1,82%	4.638	112	1,88%	5.854	>0,05
DR13	530	11,22%	4.194	635	10,64%	5.331	>0,05
DR14	99	2,10%	4.625	131	2,20%	5.835	>0,05
DR7	570	12,07%	4.154	678	11,36%	5.288	>0,05
DR8	141	2,98%	4.583	186	3,12%	5.780	>0,05
DR9	41	0,87%	4.683	65	1,09%	5.901	>0,05
DR10	42	0,89%	4.682	51	0,85%	5.915	>0,05
Summe	4724	100,00%		5966	100,00%		

<sup>1)</sup> a = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d = Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

## HLA-DQB1

Isoliert betrachtet wurde auch das HLA-DQB1-Merkmal, obwohl es jeweils in enger Assoziation zu einem bestimmten HLA-DRB1 auftritt. Dabei standen Daten von 3.671 potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern, für die sowohl HLA-DQB1 Typisierung als auch die CMV-Serologie vorlag, zur Verfügung. Innerhalb der Hauptgruppen waren 1.546 serologisch CMV-positiv und 2.125 CMV-negativ. Daher standen 7.342 Allele zur Auswertung zur Verfügung.

Bei der statistischen Betrachtung der HLA-DQB1-Merkmalverteilung in den Hauptgruppen zeigten sich keine statistisch relevanten Verteilungen zwischen serologisch CMV-positiv und CMV-negativ getesteten potentiellen Stammzellspendern (Tab. 26).

**Tab. 26: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DQB-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ		Prüfwert		
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil			
	a <sup>1)</sup>	c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>	d <sup>4)</sup>	p		
DQ1	1331	43,05%	1.761	1871	44,02%	2.379	>0,05
DQ2	661	21,38%	2.431	891	20,96%	3.359	>0,05
DQ3	995	32,18%	2.097	1342	31,58%	2.908	>0,05
DQ4	105	3,40%	2.987	146	3,44%	4.104	>0,05
Summe	3092	100,00%		4250	100,00		

<sup>1)</sup> a= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

In der folgenden Betrachtung der *splits* fand sich eine statistisch relevante Verteilung innerhalb des Merkmals HLA-DQ6. HLA-DQ6 ist neben HLA-DQ5 eine Untergruppe von HLA-DQ1. In der Gruppe der serologisch CMV-positiven potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit dem Merkmal HLA-DQ1 waren nach Abzug der Untergruppen 298 (9,64%) und in der Gruppe der serologisch CMV-negativen waren 342 (8,05%). Das spricht theoretisch für eine statistische Signifikanz zugunsten der CMV-positiven Gruppe ( $p < 0,02$ ). Dies war aber in der Auswertung der Hauptgruppen nicht statistisch relevant aufgefallen. Allerdings war das Untergruppenallel HLA-DQ6 zahlenmäßig der Hauptgruppe überlegen

und zugunsten der CMV-negativen verteilt (618 positive (19,99%) versus 938 negative (22,07),  $p < 0,04$ ), so dass dieses Ergebnis aussagekräftiger gewertet wird (Tab. 27).

**Tab. 27: Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DQB-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus**

HLA-Merkmal	CMV-positiv		CMV-negativ			Prüfwert	
	Anzahl	Anteil (%)		Anzahl	Anteil (%)		
	a <sup>1)</sup>		c <sup>2)</sup>	b <sup>3)</sup>		d <sup>4)</sup>	p
<b>DQ1</b>	<b>298</b>	<b>9,64%</b>	2.794	<b>342</b>	<b>8,05%</b>	3.908	<b>&lt;0,02</b>
DQ5	415	13,42%	2.677	591	13,91%	3.659	>0,05
<b>DQ6</b>	<b>618</b>	<b>19,99%</b>	2.474	<b>938</b>	<b>22,07%</b>	3.312	<b>&lt;0,04</b>
DQ2	661	21,38%	2.431	891	20,96%	3.359	>0,05
DQ3	36	1,16%	3.056	39	0,92%	4.211	>0,05
DQ7	574	18,56%	2.518	754	17,74%	3.496	>0,05
DQ8	275	8,89%	2.817	397	9,34%	3.853	>0,05
DQ9	110	3,56%	2.982	152	3,58%	4.098	>0,05
DQ4	105	3,40%	2.987	146	3,44%	4.104	>0,05
Summe	3092	100,00%		4250	100,00%		

<sup>1)</sup> a= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende (je Zeile) Merkmal haben und serologisch CMV-positiv sind

<sup>2)</sup> c= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV positiv sind

<sup>3)</sup> b= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal haben und serologisch CMV-negativ sind

<sup>4)</sup> d= Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender, die das entsprechende Merkmal nicht haben und serologisch CMV-negativ sind

### 4.4.3 Allelfrequenzen

Für die Merkmale HLA-A, -B und -DRB1 konnte ein Vergleich mit Daten der erwähnten Arbeit von *C. Müller* (2001) herangezogen werden. Es sind im Folgenden tabellarisch alle Merkmale aufgeführt bei denen ein Ergebnis für ein vergleichendes HLA-Allel in den Tabellen *n. Müller* aufgeführt war. Der Vergleich der Daten wurde angestellt, um die Repräsentanz der Daten innerhalb der deutschen Bevölkerung abschätzen zu können. Zusätzlich wurden die gleichen Allelfrequenzen aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender denen von *C. Müller* gegenübergestellt. Da es sich bei den Blut- und Thrombozytenspendern um ein ausgewähltes Kollektiv handelt, wurde kein direkter Vergleich mit den Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender gemacht.

### **Potentielle Stammzell- und Knochenmarkspender**

Tatsächlich weichen die Allelfrequenzen der untersuchten potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender in nur geringem Maße von den Daten *n. Müller* ab, wobei die Allelfrequenz-Differenz zwischen 0,01% und 1,47% (Ausnahme HLA-DR15 4,53%) variierte.

#### *HLA-A*

In Tabelle 28 sind die Allelfrequenzen für HLA-A dargestellt. Die Werte der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender weichen kaum von den Daten *n. Müller* ab.

**Tab. 28: Allelfrequenzen HLA-A-Allele in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender**

HLA-A	Allelfrequenzen		
	Eigene Daten <sup>1)</sup>	<i>n. Müller</i> <sup>2)</sup>	Differenz <sup>3)</sup>
A1	16,25%	15,58%	0,67
A2	30,95%	29,66%	1,29
A3	15,13%	15,38%	0,25
A11	5,43%	5,33%	0,10
A23	1,95%	2,13%	0,18
A24	8,61%	9,26%	0,65
A25	2,55%	2,91%	0,36
A26	3,31%	3,59%	0,28
A28	4,56%	4,16%	0,40
A29	2,31%	2,37%	0,06
A30	2,05%	2,03%	0,02
A31	2,13%	2,11%	0,02
A32	3,22%	3,27%	0,05
A33	0,93%	0,95%	0,02
A34	0,00%	0,21%	0,21
A36	0,00%	0,01%	0,01
A43	0,01%	0,00%	0,01
A66	0,01%	0,10%	0,09
A74	0,00%	0,02%	0,02

<sup>1)</sup>Daten aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (UKE)

<sup>2)</sup>Daten *n. Müller* (2001)

<sup>3)</sup>Differenz der Werte der eigenen Daten zu den Werten *n. Müller* (2001)

Die größte Abweichung zeigt sich im Merkmal A2 mit 1,29%. In der untersuchten potentiellen Spendergruppe war der Anteil um diese höher, als in der von *Müller* untersuchten Gruppe.

Die Abbildung 15 verdeutlicht graphisch die Verteilung der Allele unter den potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern in Hamburg und in der Kartei deutscher potentieller Spender. Mit deutlichem Abstand am häufigsten vorkommend ist das Merkmal A2 (30,95%). Diesem folgen zu gleichen Anteilen die Merkmale A1 (16,25%) und A3 (15,13%).

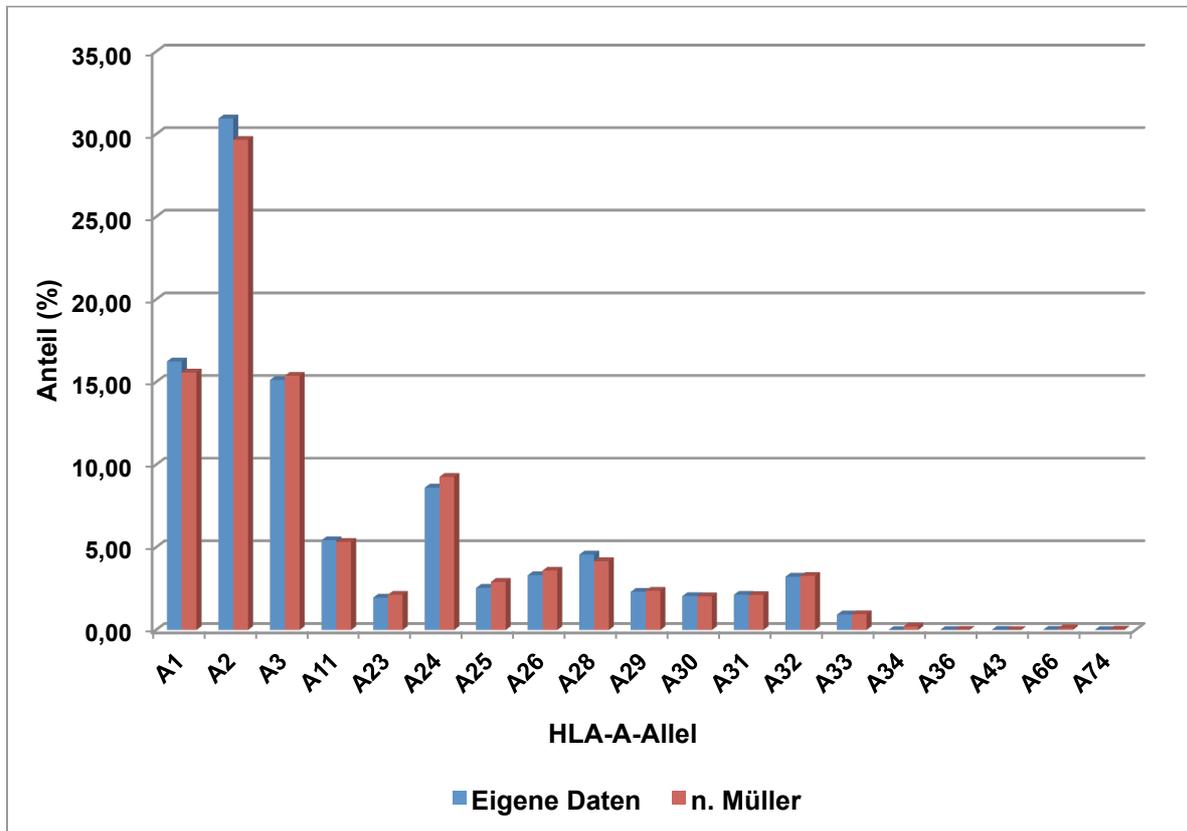


Abb. 15: Darstellung der HLA-A-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der eigenen Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (UKE) im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

## HLA-B

Die Tabelle 29 zeigt die Allelfrequenzen für das Merkmal HLA-B. Die Allelfrequenz-Differenz für die zu vergleichenden Merkmale beträgt maximal 1%. Dieser maximale Wert betrifft das Merkmal B8. Damit liegen die Ergebnisse der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender dieser Arbeit und der Arbeit *n. Müller* sehr nahe beieinander.

**Tab. 29: Allelfrequenzen HLA-B-Allele in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender**

HLA-B	Allelfrequenzen		
Allel	Eigene Daten <sup>1)</sup>	<i>n. Müller</i> <sup>2)</sup>	Differenz <sup>3)</sup>
B7	14,10%	13,68%	0,42
B8	11,42%	10,42%	1,00
B13	3,46%	3,51%	0,05
B14	2,50%	2,43%	0,07
B18	4,46%	4,73%	0,27
B27	4,76%	4,47%	0,29
B35	9,69%	9,39%	0,30
B37	1,36%	1,30%	0,06
B38	1,73%	2,11%	0,38
B39	1,90%	1,96%	0,06
B41	0,79%	0,89%	0,10
B42	0,02%	0,06%	0,04
B44	13,04%	12,19%	0,85
B45	0,40%	0,39%	0,01
B46	0,02%	0,01%	0,01
B47	0,18%	0,32%	0,14
B48	0,02%	0,03%	0,01
B49	1,04%	1,48%	0,44
B50	0,94%	0,93%	0,01
B51	5,20%	5,69%	0,49
B52	0,85%	0,78%	0,07
B53	0,20%	0,35%	0,15
B54	0,04%	0,03%	0,01
B55	1,05%	1,47%	0,42
B56	0,98%	0,89%	0,09
B57	2,95%	3,59%	0,64
B58	0,75%	0,59%	0,16
B59	0,00%	0,00%	0,00
B60	5,00%	5,85%	0,85
B61	1,44%	1,17%	0,27
B62	7,85%	7,78%	0,07
B63	0,30%	0,43%	0,13
B67	0,00%	0,03%	0,03
B70	0,04%	0,10%	0,06
B73	0,06%	0,06%	0,00
B75	0,01%	0,02%	0,01

<sup>1)</sup>Daten aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (UKE)

<sup>2)</sup>Daten nach Tabelle *n. Müller* (2001)

<sup>3)</sup>Differenz der Werte der eigenen Daten zu den Werten *n. Müller* (2001)

Die Abbildung 16 fasst die Verteilung der Hauptgruppen der HLA-B-Merkmale der registrierten potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender im Vergleich der in dieser Arbeit ausgewerteten Daten und der Ergebnisse *n. Müller* zusammen.

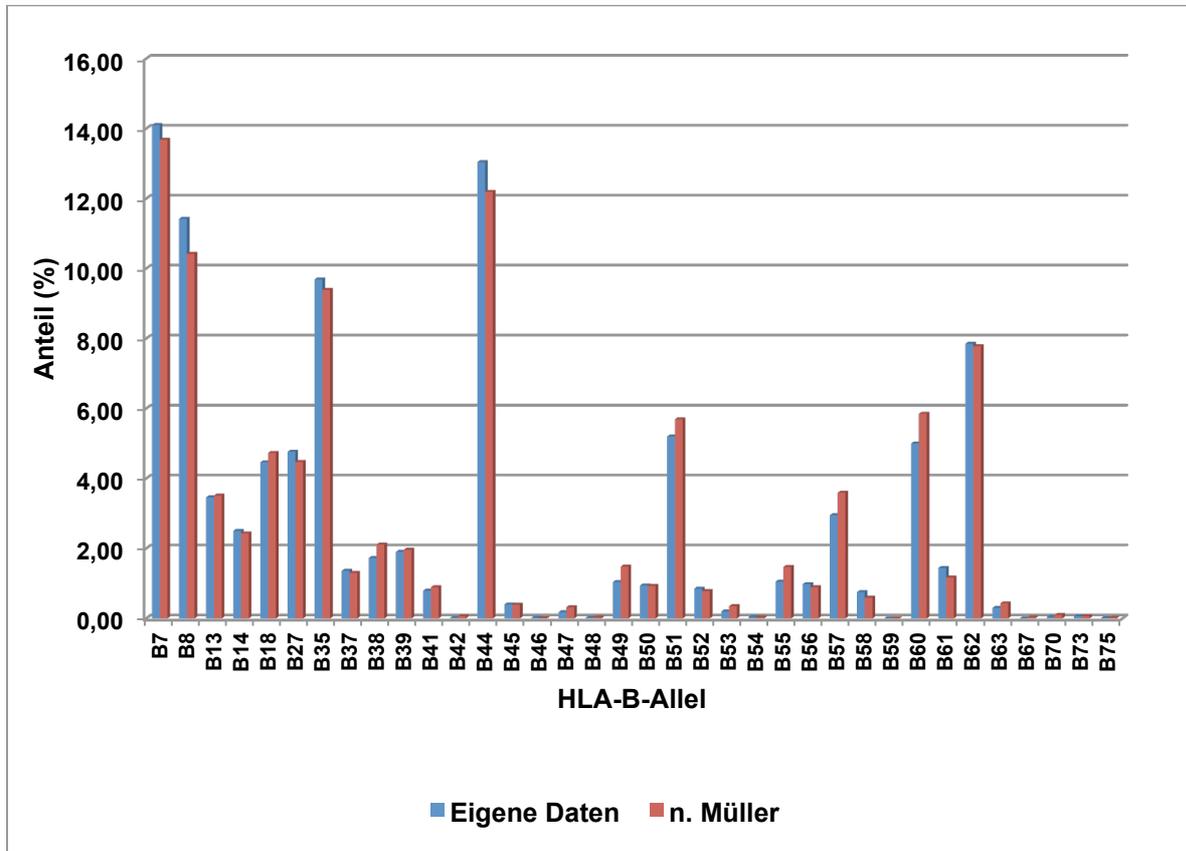


Abb. 16: Darstellung der HLA-B-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (UKE) im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

Deutlich zu entnehmen ist, dass die HLA-B-Merkmale B7 (14,1%) und B44 (13,04%) am häufigsten vorkommen. Diese werden von den Merkmalen B8 (11,42%) und B35 (9,69%) gefolgt.

### HLA-DRB1

Aus Tabelle 30 können die Allelfrequenzen des Merkmals HLA-DRB1 im Vergleich entnommen werden. Bei Betrachtung dieses Merkmals fiel eine einzige deutliche Abweichung der Allelfrequenzen zwischen den Hamburger Daten und den *n. Müller* auf. Das Merkmal DR15 (11,24%) war gegenüber den Daten *n. Müller* (15,24%) geringer in dieser Arbeit vertreten. Dieses Wertepaar fällt deutlich zwischen den anderen auf: Allelfrequenz-Differenz 4,53%. Für die übrigen Merkmale findet sich eine maximale Abweichung von 1,57%.

**Tab. 30: Allelfrequenzen HLA-DRB1-Allele in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender**

HLA-DRB1	Allelfrequenzen		
Allel	Eigene Daten <sup>1)</sup>	<i>n. Müller</i> <sup>2)</sup>	Differenz
DR1	11,60%	11,16%	0,44
DR3	12,66%	11,33%	1,33
DR4	14,24%	13,36%	0,88
DR7	11,67%	12,56%	0,89
DR8	3,06%	3,09%	0,03
DR9	0,99%	0,91%	0,08
DR10	0,87%	0,70%	0,17
DR11	10,54%	12,11%	1,57
DR12	1,96%	2,49%	0,53
DR13	10,90%	11,75%	0,85
DR14	2,15%	2,67%	0,52
DR15	11,24%	15,77%	4,53
DR16	1,37%	1,08%	0,29

<sup>1)</sup>Daten aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (UKE)

<sup>2)</sup>Daten nach Tabelle *n. Müller* (2001)

<sup>3)</sup>Differenz der Werte der eigenen Daten zu den Werten *n. Müller* (2001)

Aus Abbildung 17 ist die Verteilung des Merkmals HLA-DRB1 unter den von *Müller* und den in dieser Arbeit ausgewerteten Daten potentieller Stammzell- und Knochenmarkspendern zu entnehmen. Aus den Daten dieser Arbeit geht das Merkmal DR4 mit einem Anteil von 14,24% als das häufigste hervor, gefolgt von DR3 (12,66%). Es folgen DR1, DR7, DR11, DR13 und DR15, die alle zu ca. 11% vorkommen. Für das Merkmal DR15 zeigt sich ein nennenswerter Unterschied zwischen den in dieser Arbeit ausgewerteten Daten und den Daten *n. Müller*. Die Differenz liegt bei 4,53%. Der Anteil des Merkmals DR15 fällt bei *Müller* mit 15,77% höher aus.

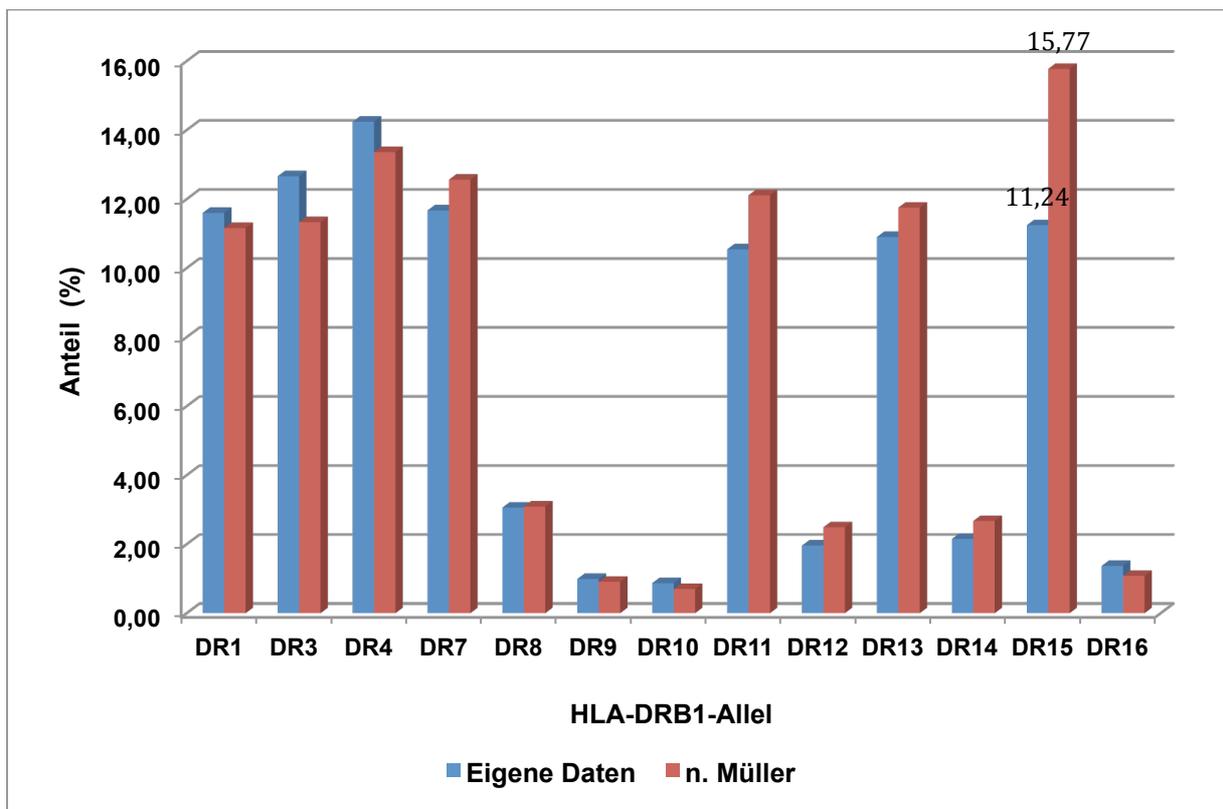


Abb. 17: Darstellung der HLA-DRB1-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender (UKE) im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

## ***Blut- und Thrombozytenspender***

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Auswertungen der Daten der untersuchten Blut- und Thrombozytenspender in dieser Arbeit und der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender von Müller (2001) werden keine Differenzen aufgezeigt, da die Kollektive sich in ihren Spender-Ausschlusskriterien, d.h. die Spenderrückstellgründe, unterscheiden. Sie sind daher nicht unmittelbar vergleichbar. Der Vollständigkeit halber sollen sie an dieser Stelle aufgeführt werden.

### *HLA-A*

In Tabelle 31 sind die Allelfrequenzen des Merkmals HLA-A in der untersuchten Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender aufgeführt. Innerhalb dieser 366 Datensätze waren anteilig Merkmalsträger mit dem Merkmal HLA-A2 (34,54%) am häufigsten vertreten. Im Vergleich zu den Daten *n. Müller* zeigte sich die maximale Allelfrequenz-Differenz beim Merkmal A3 mit 1,5%.

**Tab. 31: Allelfrequenzen HLA-A-Allele in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender**

<b>HLA-A</b>	<b>Allelfrequenzen</b>	
<b>Allel</b>	<b>Eigene Daten<sup>1)</sup></b>	<b><i>n. Müller</i><sup>2)</sup></b>
<b>A1</b>	15,99%	15,37%
<b>A2</b>	34,54%	33,20%
<b>A3</b>	14,07%	15,57%
<b>A11</b>	5,12%	4,92%
<b>A23</b>	2,35%	2,25%
<b>A24</b>	10,02%	9,63%
<b>A25</b>	1,49%	1,43%
<b>A26</b>	3,41%	3,28%
<b>A28</b>	2,99%	2,87%
<b>A29</b>	3,20%	3,07%
<b>A30</b>	1,28%	1,23%
<b>A31</b>	1,92%	1,84%
<b>A32</b>	2,77%	2,66%
<b>A33</b>	0,43%	0,41%
<b>A34</b>	k.A. <sup>3)</sup>	0,21%
<b>A36</b>	k.A.	0,01%
<b>A43</b>	k.A.	0,00%
<b>A66</b>	0,43%	0,10%
<b>A74</b>	k.A.	0,02%

<sup>1)</sup>Daten aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender

<sup>2)</sup>Daten nach Tabelle *n. Müller (2001)*

<sup>3)</sup>keine Auswertung möglich, da keine Probe eines Spenders mit diesem Merkmal vorhanden war

Die Abbildung 18 veranschaulicht graphisch die anteilige Verteilung der HLA-A-Merkmale in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender. Nach HLA-A2 sind in ähnlichen Anteilen A1 (15,99%) und A3 (14,07%) am häufigsten vertreten.

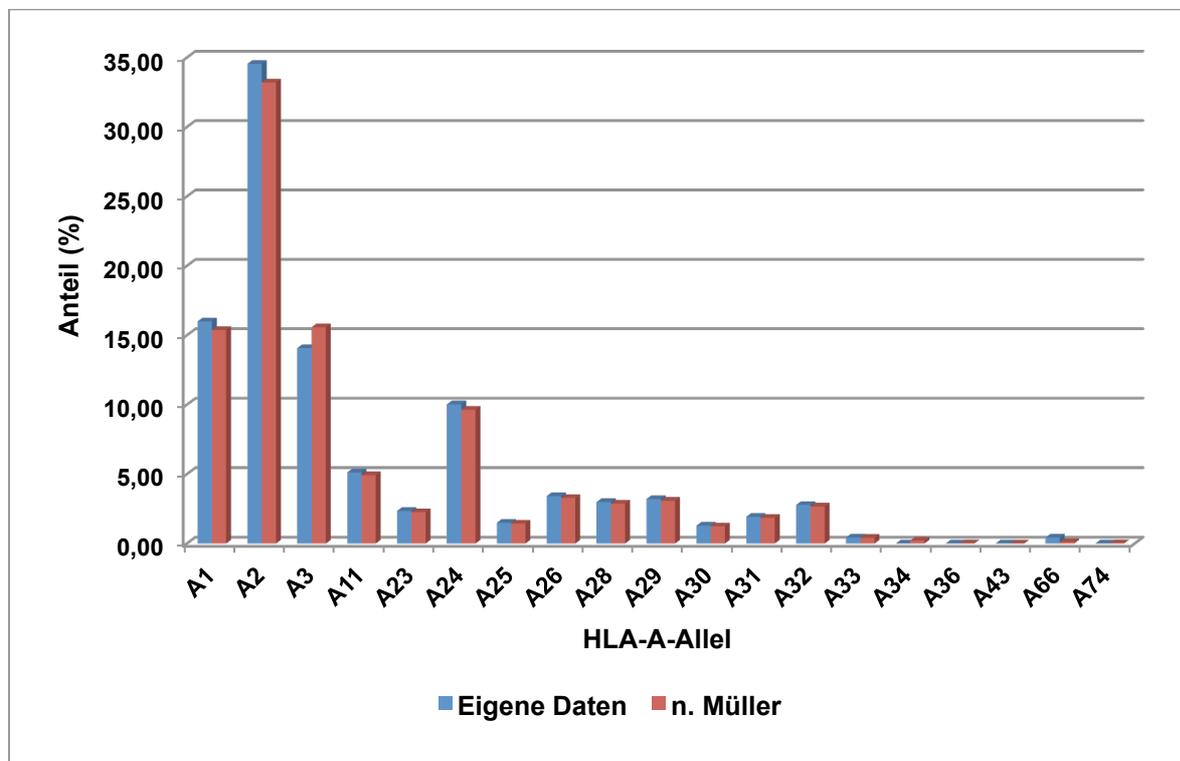


Abb. 18: Darstellung der HLA-A-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

## HLA-B

Die Allelfrequenzen des Merkmals HLA-B in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender sind in Tabelle 32 aufgeführt. Anteilig am häufigsten findet sich das Merkmal B7 (14,31%). Es folgen die Merkmale B8 (11,49%) und B13 (10,08%). In diesem Fall fielen bei drei Merkmalen auffällige Abweichungen zu den Daten *n. Müller* auf.

**Tab. 32: Allelfrequenzen HLA-B-Allele in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender**

HLA-B	Allelfrequenzen	
Allel	Eigene Daten <sup>1)</sup>	<i>n. Müller</i> <sup>2)</sup>
<b>B7</b>	14,31%	13,68%
<b>B8</b>	11,49%	10,42%
<b>B13</b>	10,08%	3,51%
<b>B14</b>	1,41%	2,43%
<b>B18</b>	4,03%	4,73%
<b>B27</b>	3,43%	4,47%
<b>B35</b>	7,06%	9,39%
<b>B37</b>	1,41%	1,30%
<b>B38</b>	1,81%	2,11%
<b>B39</b>	0,81%	1,96%
<b>B41</b>	1,01%	0,89%
<b>B42</b>	k.A. <sup>3)</sup>	0,06%
<b>B44</b>	5,44%	12,19%
<b>B45</b>	7,26%	0,39%
<b>B46</b>	k.A.	0,01%
<b>B47</b>	0,20%	0,32%
<b>B48</b>	k.A.	0,03%
<b>B49</b>	0,81%	1,48%
<b>B50</b>	0,20%	0,93%
<b>B51</b>	5,24%	5,69%
<b>B52</b>	0,81%	0,78%
<b>B53</b>	k.A.	0,35%
<b>B54</b>	k.A.	0,03%
<b>B55</b>	2,42%	1,47%
<b>B56</b>	0,40%	0,89%
<b>B57</b>	3,63%	3,59%
<b>B58</b>	0,60%	0,59%
<b>B59</b>	k.A.	0,00%
<b>B60</b>	5,04%	5,85%
<b>B61</b>	2,02%	1,17%
<b>B62</b>	7,46%	7,78%
<b>B63</b>	0,20%	0,43%
<b>B67</b>	k.A.	0,03%
<b>B70</b>	k.A.	0,10%
<b>B73</b>	k.A.	0,06%
<b>B75</b>	k.A.	0,02%

<sup>1)</sup>Daten aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender

<sup>2)</sup>Daten nach Tabelle *n. Müller (2001)*

<sup>3)</sup>keine Auswertung möglich, da keine Probe eines Spenders mit diesem Merkmal vorhanden war

Insbesondere die Merkmale B44 und B45, beides Untergruppen des Merkmals B12, weichen mit 6,75% und 7,26% von den Daten *n. Müller* ab. Auch B13 zeigt eine Allelfrequenz-Differenz von 6,57%. Bei den anderen HLA-B-Merkmalen findet sich eine maximale Abweichung von 2,33% beim Merkmal B35. Alle anderen liegen darunter.

Die Unterschiede in der HLA-B-Merkmalverteilung in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender zu den Werten *n. Müller* kann graphisch verdeutlicht der Abbildung 19 entnommen werden.

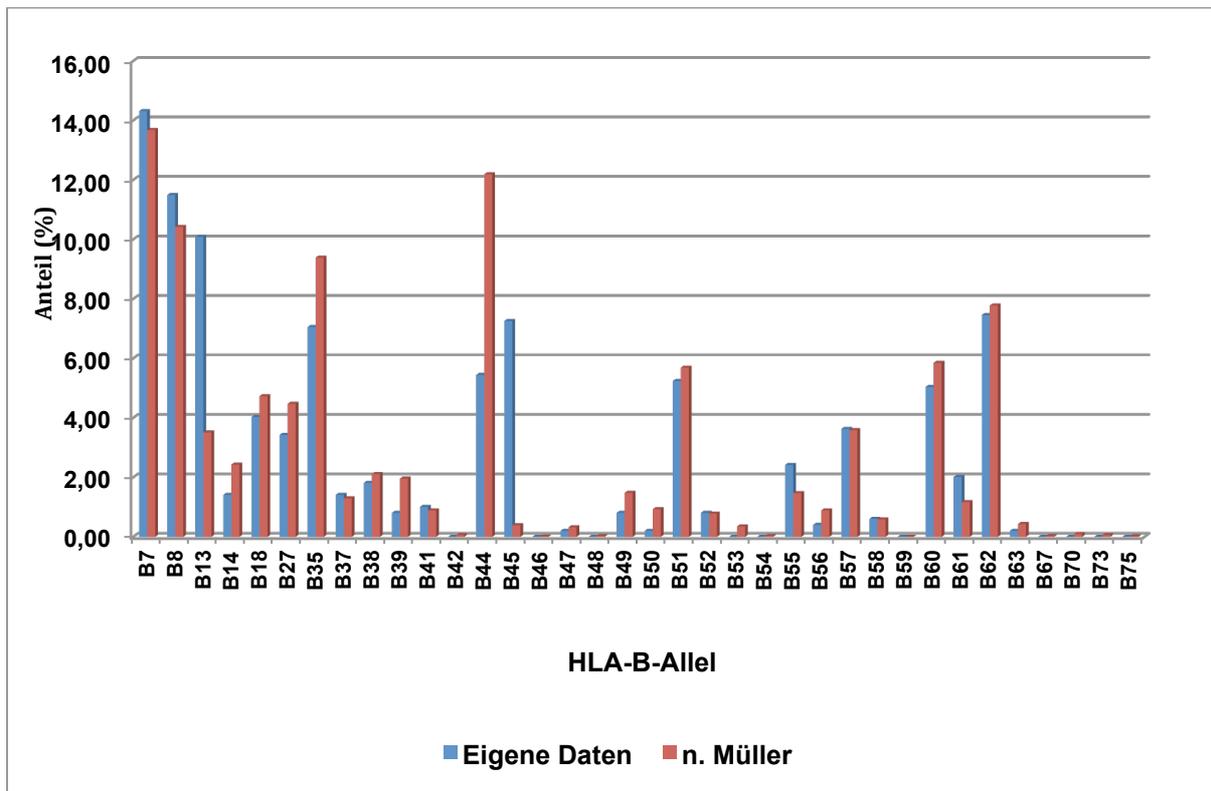


Abb. 19: Darstellung der HLA-A-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

## HLA-DRB1

In Tabelle 33 sind die Allelfrequenzen für das Merkmal HLA-DRB1 aufgeführt. Anteilig findet sich am häufigsten DR15 (14,21%). Diesem Merkmal folgen anteilig ähnlich verteilt DR3 (13,11%), DR7 (12,02%) und DR13 (12,02%).

Tab. 33: Allelfrequenzen HLA-DRB1 in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender

HLA-DRB1	Allelfrequenzen	
Allel	Eigene Daten <sup>1)</sup>	n. Müller <sup>2)</sup>
DR1	7,65%	11,16%
DR3	4,92%	11,33%
DR4	13,11%	13,36%
DR7	12,02%	12,56%
DR8	2,19%	3,09%
DR9	1,09%	0,91%
DR10	1,09%	0,70%
DR11	9,84%	12,11%
DR12	1,64%	2,49%
DR13	12,02%	11,75%
DR14	1,64%	2,67%
DR15	14,21%	15,77%
DR16	2,73%	1,08%

<sup>1)</sup>Daten aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender

<sup>2)</sup>Daten nach Tabelle n. Müller (2001)

Der Tabelle 33 und verdeutlichend aus Abbildung 20 ist zu entnehmen, dass es nennenswerte Differenzen zwischen den Allelfrequenzen der Blut- und Thrombozytenspender und den Werten n. Müller gibt. Insbesondere HLA-DR3 und DR1 fallen mit 6,41% und 3,51% Abweichung auf. Das Merkmal DR11 fällt mit der höchsten Abweichung (2,27%) auf.

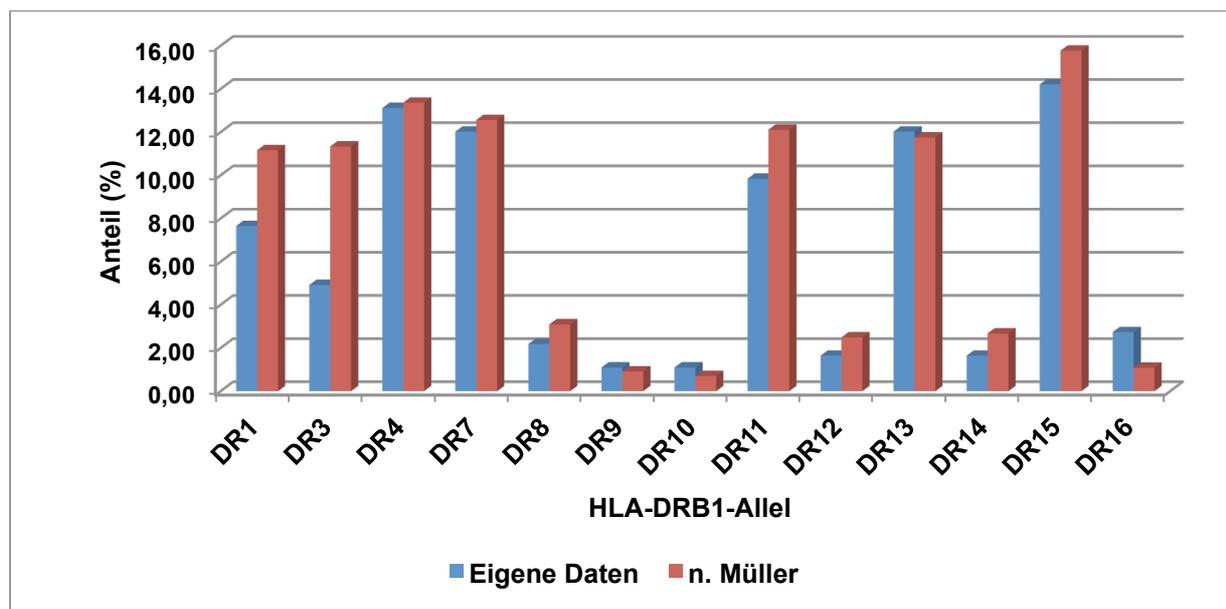


Abb. 20: Darstellung der HLA-DRB1-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender im Vergleich zu den Daten n. Müller (2001)

#### 4.4.4 Zusammenfassung der statistischen Auswertungen

In der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender waren 9.158 (52,0%) der Spender serologisch CMV-positiv. Innerhalb dieser Gruppe waren für die HLA-Klasse-I-Merkmale (HLA-A, -B, -Cw) fünf signifikant zugunsten der positiven Antikörperserologie verteilt. HLA-A33, -B16 (-B38), -B46 und -Cw7 waren signifikant häufiger in dieser Gruppe aufgetreten als bei den serologisch CMV-negativen. Für die HLA-Klasse-II waren HLA-DR3 und -DQ1 mit signifikant häufigerer Anti-CMV-Antikörperbildung verbunden, deren Zahlen nur eingeschränkt auswertbar ist, da jedes dieser Hauptgruppenmerkmale innerhalb der Hauptgruppen nicht signifikant auffiel, sondern erst nachdem die Untergruppen rausgerechnet waren. Aus der gesamten Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender waren dagegen 6.679 (38,0%) der Spender serologisch CMV-negativ. In dieser Gruppe ließ sich der negative Anti-CMV-Antikörperstatus signifikant häufiger assoziiert mit den HLA-Klasse-I-Allelen HLA-A28, -B64 (B14) und -Cw2 feststellen. Daneben traten in dieser Gruppe signifikant häufiger die HLA-Klasse-II-Allele HLA-DR15 und -DQ6 auf (Tab. 34).

**Tab. 34: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender**

HLA-Merkmal	Verteilung zugunsten Antikörperbildung (CMV-positiv)	Verteilung zugunsten keiner Antikörperbildung (CMV-negativ)
A28		X
A33 (A19) <sup>1)</sup>	X	
B16	X	
B38 (B16) <sup>1)</sup>	X	
B64 (B14) <sup>1)</sup>		X
B46 (B15) <sup>1)</sup>	X	
Cw2		X
Cw7	X	
DR15 (DR2) <sup>1)</sup>		X
DR3	(X) <sup>2)</sup>	
DQ1	(X) <sup>2)</sup>	
DQ6 (DQ1) <sup>1)</sup>		X

<sup>1)</sup> zugehörige Hauptgruppe

<sup>2)</sup> ( ) Hauptgruppenmerkmal, dass in der Auswertung der Untergruppen signifikant war, nicht innerhalb der Hauptgruppen

Die Auswertung der Datensätze aus der Gruppe der Blut-und Thrombozytenspender, deren Proben zur experimentellen Untersuchung auf CMV-DNA mittels *nested-PCR* gesammelt wurden, waren 134 (55,37%) CMV-positiv und 108 (44,63%) serologisch CMV-negativ. Nach der Analyse der Spenderdaten stach in der Gruppe der HLA-Klasse-I-Allele, das HLA-B44, signifikant häufiger zugunsten einer positiven CMV-Serologie heraus. Bei Betrachtung der Gruppe, die serologisch CMV-negativ war, zeigte sich für zwei HLA-Klasse-I-Allele, HLA-B13 und -B45 (B12), eine signifikante Verteilung zugunsten des anti-CMV-negativen Status. Auch für die HLA-Klasse-II-Merkmale DQ1 und DQ9 waren die Ergebnisse signifikant zugunsten des negativen serologischen Ergebnisses verteilt. Allerdings erschien HLA-DQ1 zunächst innerhalb der Hauptgruppen nicht als signifikant verteilt, sondern erst nach Abzug der Untergruppen in der Analyse dieser Subtypen. Daher wird das Ergebnis für DQ1 als eingeschränkt auswertbar angesehen (Tab. 35).

**Tab. 35: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten der Blut-und Thrombozytenspender**

HLA-Merkmal	Verteilung zugunsten Antikörperbildung (CMV-positiv)	Verteilung zugunsten keiner Antikörperbildung (CMV-negativ)
B13		X
B44 (B12) <sup>1)</sup>	X	
B45 (B12) <sup>1)</sup>		X
DQ1		(X) <sup>2)</sup>
DQ9 (DQ3) <sup>1)</sup>		X

<sup>1)</sup> zugehörige Hauptgruppe

<sup>2)</sup> ( ) Hauptgruppenmerkmal, dass in der Auswertung der Untergruppen signifikant war, nicht innerhalb der Hauptgruppen

## 5. Diskussion

*Mit der vorliegenden Arbeit wird der andauernden Debatte um die Problematik des sicheren Umgangs mit Blutprodukten und CMV-assoziierten Infektionen Rechnung getragen. Darauf bezogen werden die Ergebnisse des experimentellen Anteils dieser Arbeit diskutiert. Folgend wird auf methodenkritische Aspekte eingegangen werden müssen. Abschließend werden die Ausführungen zu den HLA-Merkmalen in Anlehnung an die Struktur des Ergebnisteils diskutiert.*

Die Prädiktion einer möglichen Immunantwort auf einen Kontakt mit dem humanen Cytomegalievirus ist von essentieller Bedeutung für Hochrisikopatienten, die regelmäßig Blutprodukte erhalten. Das rechtzeitige laborchemische Erfassen einer latenten, reaktivierten oder akuten Infektion mit oder ohne Symptome ist daher eine entscheidende Herausforderung im klinischen Umgang mit Spendern und Empfängern von Blutprodukten. Schwere, vital bedrohliche Krankheitsverläufe sind CMV-assoziiert möglich. Die primäre Infektion, die sekundäre Infektion oder die Reaktivierung im Zustand der Immunsuppression, z.B. nach Organ- oder Stammzelltransplantationen, kann sowohl systemisch sowie in verschiedenen Organen (u.a. Leber, Lunge, Niere) zu schweren Infektionen führen. Es wird davon ausgegangen, dass sich wahrscheinlich jeder CMV-seropositive potentielle Spender bzgl. des CMV-Virus in der Phase der Latenz befindet. Zu überlegen wäre, ob die Definition von sogenannten *non-/low-respondern* zusätzlich ein Kriterium wäre, um im Einzelfall Blutprodukte ausgewählter Spender für das Risikopatientenklientel auszuwählen (Wada et al., 1997).

Prosch et al. konstatierten im Jahre 2000, dass es zu einer Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion kommen kann, so zum Beispiel bei Immunsuppression, systemischen Entzündungen und bei Stresssituationen für den Organismus. Gemein ist diesen denkbaren Ursachen eine Störung der zellulären Wirtsimmunität (Prosch et al., 2000b).

Da frühzeitig Blutprodukte als mögliche Infektionsquelle für Risikopatienten galten und um das Risiko für die Übertragung einer CMV-Infektion auf diese Patientengruppen zu minimieren, stellte lange Zeit die Bevorzugung CMV-seronegativer Blutprodukte die Maßnahme der Wahl dar. Die transfusionsbedingte CMV-Infektion war vor der Einführung der Leukozytendepletion nachweislich ein nicht zu vernachlässigender Risikofaktor in der hämato-/onkologischen Therapie immuninkompetenter Patienten. Daher versuchte man die

Infektion CMV-seronegativer Empfänger zu verhindern, indem im optimalen Fall nur CMV-seronegative Blutprodukte übertragen werden sollten (Bowden et al., 1995; Bowden et al., 1991; Kuhn, 2000).

Bowden et al. konnten 1995 in Erweiterung des Konzeptes von Yeager et al. zeigen, dass Leukozytendepletionen zu weniger als 3% transfusionsassoziierten CMV-Infektionen führen. Sie verglichen dazu die Rate an CMV-Infektionen oder Erkrankungen bei Empfängern CMV-seronegativer und leukozytendepletierter Blutprodukte, die keine preemptive Therapie erhielten (Bowden et al., 1995; Yeager et al., 1981).

Mit Einführung der routinemäßigen Leukozytendepletion konnten mehrere Arbeiten nachweisen, dass die Minimierung des CMV-Infektionsrisikos gleichermaßen durch die Gabe leukozytendepletierter sowie CMV-seronegativer Blutprodukte geben war. Das Auftreten von transfusionsassoziiierter CMV-Infektion nach Transplantation seronegativer Organe durch leukozytendepletierte Blutkonserven von Spendern, unbekanntem CMV-Status, lag zwischen 1984 und 1996 bei 2,4%. Dabei waren am häufigsten Patienten nach Lungen- und Lebertransplantation betroffen (Preiksaitis et al., 2002).

Ljungman et al. untersuchten ebenfalls im Jahre 2002 Empfänger leukozytendepletierter Blutprodukte und Empfänger die sowohl CMV-seronegative als auch leukozytendepletierte Blutprodukte erhalten hatten. In der Gruppe der Empfänger rein CMV-seronegativer Blutprodukte konnten 3% CMV-Infektionen und keine CMV-Erkrankung festgestellt werden. In der Gruppe, die sowohl CMV-negative als auch leukozytendepletierte Blutprodukte erhielten, traten bei 6% der Empfänger CMV-Infektionen auf und ebenfalls keine Erkrankungen auf (Ljungman et al., 2002).

Um die Infektion seronegativer Knochenmark- oder Organempfänger zu verhindern, wurde die Empfehlung zur Gabe ausschließlich seronegativer Blutprodukte durch die der Gabe von leukozytendepletierten Blut- und Thrombozytenpräparaten erweitert (Bowden et al., 1995; Bowden et al., 1991; Kuhn, 2000).

Im weiteren Verlauf versuchten Forscher zu ergründen woher die ca. 3% der verbliebenen, mutmaßlich durch Blutprodukte übertragenden CMV-Infektionen herrührten. Nichols et al. verglichen 2003 Empfänger CMV-seronegativer oder leukozytendepletierter Blutprodukte mit Empfängern, die sowohl CMV-seronegative als auch leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate oder durch Aphaese gewonnene Thrombozytenkonzentrate erhalten hatten. Sie dokumentierten 1,7% CMV-Infektionen in der ersten Gruppe und 4% CMV-Infektionen in der zweiten Gruppe. Die Empfänger erhielten preemptive Therapien. Zusammenfassend waren bei dieser Beobachtung von Nichols et al. CMV-seronegative

Blutprodukte effektiver um eine transfusionsassoziierte CMV-Infektion zu verhindern (Nichols et al., 2003). Dagegen verglichen Ronghe et al. Bereits im Jahre 2002 Empfänger CMV-negativer Erythrozytenkonzentrate und Empfänger leukozytendepletierter Thrombozyten und konnten weder eine CMV-Infektion noch eine -Erkrankung beobachten (Ronghe et al., 2002).

Mit Veröffentlichung neuerer Forschungsergebnisse wurde bei fortgeführter Debatte in den letzten Jahren zunehmend deutlich, dass v.a. die nicht-erkannte Virämie während der Serokonversion mit noch nicht nachweisbaren Antikörpern das größte Problem bei der Übertragung des CMV durch Blutprodukte darstellt. Die Serokonversion gesunder Blutspender ist hierbei nur eine mögliche Quelle der Infektion für Risikopatienten. Zudem sind Spender mit sekundärer Infektion problematisch. Bei diesen ist der Serostatus bereits positiv, daher kann keine Serokonversion als Hinweis auf diese Form der Infektion genutzt werden. Die Spender sind immunkompetent und in der Regel symptomfrei. Die Infektion wird durch die Spenderbefragung und die Routinediagnostik der CMV-Antikörper nicht erfasst.

Novak et al. zeigten, dass es möglich ist, sich wiederholt mit CMV-Viren zu infizieren. Sie fanden Anti-CMV-Antikörper gegen das Hüllmembranprotein Glykoprotein N (gpUL73) und B (gpUL55) verschiedener CMV-Stämme im Urin und Blut in 93,7% aller untersuchten Proben gesunder CMV-seropositiver Individuen (Novak et al., 2008). Dies bestätigte Ergebnisse früherer Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass es im Laufe des Lebens möglich ist sich mit verschiedenen CMV-Stämmen zu infizieren (Baldanti et al., 1998; Bale et al., 1996; Chandler et al., 1987; Coaquette et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit, die nicht immer eindeutig von der sekundären Infektion zu differenzieren ist, ist die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion. Diese These stützten Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Boppana, die kongenitale Infektionen bei Neugeborenen nachwies, deren Mütter nachweislich ein Jahr vor oder noch früher vor Konzeption die CMV-Infektion durchlaufen hatten und mutmaßlich durch eine Reaktivierung der latenten Infektion der Mutter infiziert wurden (Boppana et al., 2001). Ross et al. zeigten 2011, dass bei CMV-seropositiven Frauen Anti-CMV-Antikörper verschiedener CMV-Stämme nachweisbar sind. Allerdings bei denen, die bereits Anti-CMV-Antikörper gegen einen oder mehrere Proteine (AP86, TO86, AP55, TO55) verschiedener Virusstämme hatten, es seltener zu einer Reinfektion mit einem weiteren Virusstamm gekommen war, als die bei denen keine Anti-CMV-Antikörper nachgewiesen wurden (Ross et al., 2011).

Ein entscheidender Aspekt in der Verbesserung der Versorgung der Risikopatientengruppen scheint die Optimierung der Virusdiagnostik einerseits in der Blut- und Thrombozytenspende, und im Behandlungsverlauf, um z.B. den richtigen Moment für den Beginn einer preemptiven Therapie bestimmen zu können, zu sein. Dem Nachweis der viralen DNA kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu.

In Leukozyten gesunder Blutspender, die serologisch CMV-IgM- und IgG-positiv waren fanden Glock et al. bei 6,25% CMV-DNA und bei denen, die IgM-negativ und IgG-positiv bei 0,5% (Glock et al., 2003). Nach dem ersten Jahr nach erfolgter Serokonversion ist CMV-DNA selten (ca. 0,2%) bei gesunden Blutspendern nachweisbar (Wu et al., 2009). Dumont et al. konnten 2001 zeigen, dass die Effektivität der Reduktion der CMV-DNA in Vollblut bei seropositiven Spendern durch Leukozytenfiltration 99,9% beträgt. Zum Vergleich konnte in 65% der Monozytenfraktionen und in 15% der Granulozytenfraktionen CMV-DNA nachgewiesen werden (Dumont et al., 2001). Ziemann et al. stellen 2010 die Vermutung auf, dass die Infektiosität sich nur bedingt über das Vorliegen von Antikörpern beurteilen lässt, da die Funktionalität dieser eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Antikörper gegen pp65 (und pp52) können bereits zeitgleich zur Serokonversion nachgewiesen werden. Dagegen Antikörper gegen IE1, pp150, gB1 und gB2 erst nach Tagen, Wochen bis Monaten erscheinen. Blutprodukte CMV-seropositiver Spender mit fehlendem gB-Antikörper oder einem gB-Antikörper mit niedriger Antigenbindungskapazität könnten potentiell infektiös für immunsupprimierte Empfänger sein. So führten Ziemann und Mitarbeiter 2010 aus, dass IgM-Antikörper bis zu 83-356 Tagen nach Serokonversion nachgewiesen werden können. Die Clearance hinsichtlich der Antikörper aber individuell sei. Der CMV-Antigennachweis und CMV-DNA-Nachweis gelangen der Forschergruppe zwischen 54 und 269 Tagen nach Serokonversion. Die Nachweisbarkeit der CMV-DNA korrelierte zeitlich mit besagter mutmaßlicher Clearance für IgM-Antikörper, mit der Entwicklung der IgG-Antikörper gegen Glykoprotein B und der Entwicklung von Anti-CMV-IgG-Antikörpern mit hoher Bindungsfähigkeit. Mit der Entwicklung von Anti-gB-Antikörpern sinkt die Menge an nachweisbarer DNA im Plasma deutlich ab und ist nicht mehr nachweisbar wenn die IgM-Antikörper verschwunden sind und die IgG-Antikörper mit hoher Bindungsfähigkeit auftreten. In dieser Studie konnte in Proben von 13 Blutspendern, die positiv auf CMV-DNA im Plasma getestet wurden nur bei eine Probe DNA in Leukozyten nachgewiesen werden. Blutprodukte von Spendern, deren Serokonversion erst seit einigen Monaten bekannt ist, sollten laut Ziemann et al. als potentiell infektiös für Risikopatienten erachtet werden (Ziemann et al., 2010).

Während der Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion ist ein Anstieg des zuvor bereits

bestehenden Anti-CMV-IgG-Titern zu beobachten. Allerdings tritt dieser wie bei einer Primärinfektion verzögert auf.

Einschränkend ist auf folgenden Umstand hinzuweisen: Die positive CMV-PCR bedeutet nicht zwangsläufig das Vorliegen eines intakten, pathogenen Virions. Es könnte sich auch um den Nachweis von CMV-Fragmenten handeln (Freymuth et al., 1994). Diese Erkenntnis erschwert zusätzlich die Einordnung der diagnostischen zur Verfügung stehenden Mittel in den Gesamtkontext der CMV-Diagnostik. Der CM-Virusnachweis durch Zellkultur, der Nachweis viraler Antigene auf Leukozyten und der Nachweis viraler DNA durch PCR sind Methoden zur Diagnostik einer CMV-Infektion bzw. -Erkrankung, die einen Virusnachweis bereits vor dem Auftreten von antiviralen Antikörpern ermöglichen (Einsele et al., 1991a)(Einsele et al., 1991b; Schafer et al., 1998). Da Nachweis der CMV-Antigenämie in hohem Maße mit dem Nachweis von CMV-DNA korreliert scheint aktuell die additive Anwendung dieses diagnostischen Verfahrens unabdingbar.

Bei Hochrisikopatienten, z.B. den Empfängern von allogener Knochenmark oder allogener Stammzellen ist die frühe zuverlässige Diagnostik von besonderer Bedeutung. Der pp65-Nachweis wird aber auch im Rahmen der Reaktivierungs-Diagnostik benutzt. Dieser Antigentest wird häufig zeitgleich oder kurz nach der PCR positiv (Ghaffari et al., 2008). Die PCR mit dem direkten Nachweis ist dem Zeitpunkt der realen Infektion näher, das diagnostische Fenster ist kleiner. Die Antigenämie (pp65) war in einer Arbeit von Weber et al. nur bei klinisch apparenter CMV-Erkrankung nachzuweisen. Aber auch 0,7% der Patienten mit Symptomen waren negativ für pp65. In der PCR waren die Blutproben bei 89% der klinisch CMV-erkrankten Patienten positiv. Die PCR war aber auch positiv bei 1,4% der Patienten, die keine CMV-Erkrankung zeigten (Weber et al., 1994). Nicht alle Patienten mit einer Virämie (DNAämie, Antigenämie) entwickeln eine CMV-Erkrankung. Diagnostiziert werden kann eine Reaktivierung frühzeitig durch den DNA-Nachweis, wobei verschiedene *cut-offs* (z.B. 500 Genomkopien/ml (Ikewaki et al., 2005)) als Kriterium für die Viruslast und den Beginn einer preemptiven Therapie beschrieben werden.

Die PCR ist ein in höchstem Maße standardisiertes Verfahren, das schnell reproduzierbare Ergebnisse liefert. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren der *nested*-PCR zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität aus. Studien in denen die *nested*-PCR verwendet wurden haben sehr niedrige DNA-Nachweisgrenzen. Bis zu eine Genomkopie wird häufig als Grenze angegeben, z.B. Larsson et al. (1998) (Larsson et al., 1998). Die

Qualität der Ergebnisse ist abhängig von der korrekten Anwendung der Methode und der Vermeidung von Kontaminationen (Kwok and Higuchi, 1989).

In der vorliegenden Arbeit konnte in den 290 Proben gesunder Blut- und Thrombozyten-spender unabhängig ihrer CMV-Serologie mittels der beschriebenen *nested*-PCR mit den Glykoprotein B- *primern* (gB-1-4; UL-55) keine CMV-DNA in den isolierten *buffy coats* gesunder Spender nachgewiesen werden. In Hinblick auf die Erkenntnisse der zuvor diskutierten Studienlage befand sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der untersuchten Gruppe kein CMV-seronegativer Spender in der Phase der Serokonversion und bei keinem der CMV-seropositiven Spender lag eine Sekundärinfektion und/oder eine Reaktivierung einer latenten Infektion vor. Das konsequente Bearbeiten der Proben unter räumlicher Trennung der Prä- und Post-PCR-Arbeitsschritte sowie der zwischen den Arbeitsschritten stattgefundenen Wechsel steriler Handschuhe, der Gebrauch steriler Einmalfilterspitzen beim Pipettieren, das Vorbereiten eines Mastermixes, das erst finale Hinzufügen der DNA in den einzelnen Reaktionsansatz und das zweimalige Durchführen der *nested*-PCR bei jeder Probe führte dazu, dass keine falsch positiven Ergebnisse zustande kamen.

Anzumerken ist beim Vergleich verschiedener Arbeiten die sich mit dem CMV-DNA-Nachweis mittels einer PCR beschäftigen, dass eine Vielzahl keine vergleichbaren PCR-Protokolle haben oder die unmittelbare Vergleichbarkeit zumindest eingeschränkt ist. Es wurden verschiedene PCR-Techniken angewendet, verschiedene *primer* ausgewählt und verschiedene Probenmaterialien genutzt. Folgend werden Arbeiten, die mittels einer *nested*-PCR CMV-DNA bei Blutspendern nachzuweisen suchten und deren Ergebnisse diskutiert.

Eine tabellarische Übersicht dazu bietet Tabelle 36(a-b).

**Tab. 36a: Tabellarische Übersicht der Studienlage zum CMV-DNA-Nachweis mit PCR bei Blutspendern im Vergleich zum Ergebnis der vorgestellten Arbeit**

Studie/ Jahr	Probanden/ Untersuchungs- material	PCR- Methode	Verwendete <i>primer</i>	Nachweis- grenze	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontamina- tionen	Ergebnis
<b>Studien mit positivem CMV-DNA-Nachweis</b>						
Stanier et al., 1989	Blutspender, Vollblut, <i>buffy coats</i> (n = 30)	PCR	MIE	k.A.	k.A.	CMV-DNA-Nachweis 83% bei seropositiven, kein Nachweis bei seronegativen Spendern
Smith et al., 1993	Blutspender, nur seropositive Spender, Vollblut (n = 86)	PCR	MIE	k.A.	k.A.	CMV-DNA-Nachweis 8,0% bei seropositiven Spendern
Yuen et al., 1995	Leukozyten (n = 220 Proben), Patienten nach Knochenmarktransplantation (n = 101)	<i>nested</i> -PCR	CMTR1-4 (Fragment 168 bp aus <i>morphological transforming region II (mtrII)</i> )	5 Geq/ml	ja	CMV-DNA-Nachweis 7,1% bei Proben mit positiver CMV-Kultur, 28,8% bei Proben mit negativer CMV-Kultur

**Tab. 36b: Tabellarische Übersicht der Studienlage zum CMV-DNA-Nachweis mit PCR bei Blutspendern im Vergleich zum Ergebnis der vorgestellten Arbeit (Fortsetzung)**

Krajden et al., 1996	Blutspender, Vollblut (n = 114; 101 CMV-seropositiv, 13 CMV-seronegativ)	Digene SHARP Signal System Assay (DSSSA)  <i>nested</i> -PCR	MIE-4 biotin/-5  JC/JD (305 bp) JB/JA (in Anlehnung an Jiwa et al., 1989)	50 Geq/PCR  1-5 Geq/PCR	ja	CMV-DNA-Nachweis 8% bei seropositiven, kein Nachweis bei seronegativen Spendern  CMV-DNA-Nachweis 34% bei seropositiven, kein Nachweis bei seronegativen Spendern
Larsson et al., 1998	Blutspender (n = 270), <i>buffy coats</i> (n = 285)	<i>nested</i> -PCR	MIE, pp150	1 Geq/ml	ja	CMV-DNA-Nachweis (identisch für beide <i>primer</i> ) 41,4% bei seropositiven, 13,6% bei seronegativen Spendern
Nitsche et al., 2000	Blutspender, Plasma (n = 27)	<i>real time</i> -PCR	MIE	k.A.	k.A.	CMV-DNA-Nachweis 19% nur bei seronegativen, kein Nachweis bei seronegativen Spendern
Drew et al., 2003	Blutspender (n = 252), Plasmaproben von Spendern mit Serokonversion (n = 192), konstanter Seropositivität (für > 7 Spenden) (n = 60)	Quantitative PCR	CMV-Polymerase Gen (365 bp)	400 Geq/ml	k.A.	CMV-DNA-Nachweis 1,6% bei beobachteter Serokonversion, kein Nachweis bei konstanter Seropositivität
Roback et al., 2003	Blutspender, Vollblut ( <i>buffy coats</i> ) (n = 1000; 416 CMV-seropositiv, 514 CMV-seronegativ)	<i>nested</i> -PCR  Roche Monitor PCR Assay	UL-93  UL-154	10 Geq/ml	ja	CMV-DNA-Nachweis 0,8% bei seropositiven, 0,4% bei seronegativen Spendern CMV-DNA-Nachweis 0,2% bei seropositiven, kein Nachweis bei seronegativen Spendern
Glock et al., 2003	Blutspender (n = 420) Plasma, Serum, Leukozyten	<i>real time</i> -PCR	CMV-Polymerase, MIE	4 Geq/ PCR bzw. 192 Geq/ml	k.A.	CMV-DNA-Nachweis 0,5% bei seropositiven Spendern
Ziemann et al., 2010	Blutspender, Vollblut, Urin (n = 39.993; Anzahl der untersuchten Spenderproben)		k.A.	4,88 Geq/PCR	k.A.	CMV-DNA-Nachweis 0,04% aller untersuchten Proben, 10% bei Serokonversion
Furui et al. 2013	Blutspender, Vollblut, <i>buffy coats</i> (n = 2400)	<i>TaqMan</i> PCR  <i>nested</i> -PCR	UL83  UL139	5-40 Geq/ml	k.A.	4,3% CMV-DNA-Nachweis bei seropositiven zwischen 60-70 Jahren, 1,0% Nachweis bei seropositiven < 60 Jahre, kein Nachweis bei seronegativen Spendern
<b>Studien ohne CMV-DNA-Nachweis</b>						
Bitsch et al., 1992	Vollblut, Blutspender (n = 116)	<i>real time</i> -PCR	k.A.	k.A.	k.A.	kein CMV-DNA-Nachweis
Urushi-bara et al., 1995	Leukozyten, Blutspender (n = 189), Patienten nach Knochenmarktransplantation (KMT) (n = 3)	<i>nested</i> -PCR	MIE	1 Geq/10 <sup>5</sup> Leukozyten	k.A.	kein CMV-DNA-Nachweis bei Blutspendern, 100% CMV-DNA-Nachweis bei Z.n. KMT
Greenlee et al. 2002	Vollblut, Blutspender (n = 203)	<i>real time</i> -PCR	MIE	5 Geq/ PCR	k.A.	kein CMV-DNA-Nachweis
Wikner 2014	Blut-/Thrombozytenspende Vollblut, <i>buffy coat</i> (n = 291)	<i>nested</i> -PCR	UL-55	1 Geq/ml	ja	kein CMV-DNA-Nachweis bei seropositiven und -negativen Spendern

Die Tabelle 36 zeigt zusammenfassend eine Übersicht methodologisch ähnlich gelagerter Studien mit den gewonnenen Erkenntnissen. Im ersten Abschnitt der Tabelle sind Studien mit positivem CMV-DNA-Nachweis und im zweiten Abschnitt Studien mit fehlendem CMV-DNA-Nachweis aufgeführt. Neben der *nested*-PCR kommt auch die *real time*-PCR (RT-PCR) häufig zum Einsatz. Die Erstbeschreibung geht auf Holland et al. zurück (Holland et al., 1991). Drago et al. konnten 2004 zeigen, dass die Ergebnisse einer RT-PCR und *nested*-PCR (gp58) in ihrer Spezifität und Sensitivität bzgl. CMV-DNA im Liquor vergleichbar sind (Drago et al., 2004). Daher werden Studien, die Ergebnisse mit dieser Methode präsentierten in dieser Arbeit zum Vergleich herangezogen.

Mehrere Autoren berichteten, dass sie mit der *nested*-PCR CMV-DNA unter anderen auch in gesunden Blutspendern nachweisen konnten. Yuen et al. verglichen 1995 die Ergebnisse ihrer *nested*-PCR zum Nachweis von CMV-DNA in Leukozyten von Patienten nach Knochenmarktransplantation mit den Ergebnissen des pp65-Antigentests. Alle Proben bei denen die CMV-PCR positiv war, hatten auch ein positives Ergebnis im Antigentest. In den doppelt positiven Proben war die PCR bereits durchschnittlich 10 Tage vor der Antigenämie positiv. Bei Proben mit negativem Antigennachweis waren trotzdem 30% positiv in der PCR. Diese Arbeit stellt eine der wenigen dar, die explizit auf das Einhalten der Regeln der Prävention falsch positiver Ergebnisse in der PCR hinweisen (Yuen et al., 1995). Mit bis zu 7,9% DNA-Nachweis mit einer *nested*-PCR in Vollblut bei CMV-seropositiven gesunden Blutspendern bestätigten Krajden et al. 1996, dass der Nachweis von CMV-DNA in gesunden Blutspendern mit dieser Methode möglich ist. In ihrer Untersuchung ergab sich kein CMV-DNA-Nachweis in serologisch CMV-negativen Proben (Krajden et al., 1996). Larsson et al. untersuchten 1998 ebenfalls Blutproben von Blutspendern. Mit einer *nested*-PCR gelang ihnen der Nachweis von CMV-DNA aus dem *buffy coat* in 41,4% der CMV-seropositiven und in 13,6% der seronegativen Spender. Die Nachweisgrenze war mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar (Larsson et al., 1998). Roback et al. untersuchten Vollblut mittels einer *nested*-PCR und fanden in 0,2% der Proben CMV-DNA, jedoch nur in seropositiven Blutproben (Roback et al., 2003). Furui et al. berichten 2013 über 4,3% CMV-DNA-Nachweis bei CMV-seropositiven Blutspendern zwischen 60 und 70 Jahren, sowie 1% bei Blutspendern mit gleichen Serostatus unterhalb 60 Jahren in Japan (Furui et al., 2013). Diese aktuelle Studie zeigt, dass auch das Alter der Spender bei der Auswahl der Blutprodukte herangezogen werden sollte.

Hervorzuheben ist die Studie von Urushibara und Mitarbeitern aus dem Jahre 1995 die zu einem unserer Studie ähnlichen Ergebnis kam. In der durchgeführten *nested*-PCR wurden

unter Anwendung des *primers* IE-1 bei einer Nachweisgrenze bei 1 Genomkopie/ 10 Leukozyten im Blut gesunder Blutspender untersucht. Es fand sich kein Nachweis viraler DNA (Urushibara et al., 1995).

Eine weitere Arbeit vergleicht die quantitative real time-PCR, die *nested*-PCR und den Nachweis einer Antigenämie bei Patienten mit T-Zell Leukämie. Die Ergebnisse in diesem Fall zeigen, dass die RT-PCR sensitiver ist als der Antigentest und die *nested*-PCR. In diesem Fall wurde der *primer* IE-1 verwendet. Die DNA-Nachweisgrenze war in der RT-PCR bei 18 Genomkopien/ml. In der *nested*-PCR entsprechend positiv bei 47,3% der Fälle bei 2.500-5.000 Genkopien/ml (Ikewaki et al., 2003). Mittels RT-PCR fanden Nitsche et al. in 19% der Blutspenderproben CMV-DNA, davon 100% in CMV-seronegativen Blutspenderproben (Nitsche et al., 2000).

Es finden sich auch Studien, deren Ergebnisse mit denen dieser Arbeit übereinstimmen. Wie bereits zuvor erwähnt wurden in Analogie zu unserer Studie durch Greenlee et al. und Bitsch et al. in Blutproben ebenfalls weder in CMV-seropositiven noch in -seronegativen Proben CMV-DNA gefunden (Bitsch et al., 1992; Greenlee et al., 2002).

Die *nested*-PCR eine höchst sensitive Diagnostikmethode, die aber auch hochgradig durch Kontamination gefährdet ist, falsch positive Ergebnisse zu produzieren. Allerdings weisen nur wenige Arbeiten darauf hin, wie unbedingt notwendig es ist, die räumliche Trennung bei der Arbeit mit PCR-Produkten einzuhalten. Ein Hinweis dazu oder das Erwähnen der Einhaltung der Antikontaminations-Regeln, die Kwok et al. bereits im Jahre 1989 zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse in der PCR aufstellten, erfolgt in den Arbeiten von Zipeto et al. (1992), Yuen et al. (1995), Krajden et al. (1996), Kotsimbos et al. (1997), Larsson et al. (1998) und Roback et al. (2003) (Kotsimbos et al., 1997; Krajden et al., 1996; Kwok and Higuchi, 1989; Yuen et al., 1995; Zipeto et al., 1992).

Eine aktuelle Studie von Li aus dem Jahr 2014 zeigte, dass die Anti-CMV-IgG-Serologie bei der Erkennung chronischer CMV-Infektionen nicht aussagekräftig genug ist, um die Infektiosität eines Individuums auszuschließen. Erst die ergänzende Untersuchung des pp65 (APAAP) und der CMV-DNA-Nachweis scheinen zielführend (Li et al., 2014). Unsere These stützend, konnten auch Leng et al. 2011 zeigen, dass die CMV-Serologie nicht ausreicht, um den Status quo einer chronischen CMV-Infektion, bzw. einer Latenz, zu charakterisieren und dass erst die Bestimmung der CMV-DNA und des pp65 eine genauere Einschätzung ermöglichen. Sie untersuchten gesunde ältere Individuen und fanden bei 56% der CMV-

seropositiven Probanden ebenfalls unter Anwendung der durch uns angewendeten *nested*-PCR CMV-DNA, wobei einschränkend konstatiert werden muss, dass diese in den unsererseits durchgeführten Testreihen nicht nachgewiesen wurde. Der IgG-Antikörpertiter hatte bei den Untersuchungen jeweils im Vorwege keinen Hinweis auf die zu erwartenden Ergebnisse der PCR oder des pp65-Tests geliefert (Leng et al., 2011a; Leng et al., 2011b). Bei einer Übertragung dieser Ergebnisse auf die Auswahl von Blutprodukten für Hochrisiko-Patienten wird deutlich, dass durch ergänzende Untersuchungen gesunder Blutspender bzw. derer Blutprodukte mit einer *nested*-PCR das Risiko einer CMV-Übertragung reduziert werden könnte. Bei der Untersuchung von Patienten nach Stammzelltransplantationen zum Nachweis möglicher CMV-Infektionen zum Festsetzen einer preemptiven Therapie hat sich die PCR mittlerweile als diagnostisches Mittel der Wahl etabliert. Dieser Untersuchung wird der Vorzug vor dem pp65-Test geben, da die PCR früher als der pp65-Nachweis positiv erscheint (Halfon et al., 2011). Bei CMV-seropositiven Spendern ist die Möglichkeit einer Sekundärinfektion zu berücksichtigen. Wu et al. konnten 2013 bei Patienten nach Stammzelltransplantation in 17,39% mittels RT-PCR CMV-DNA nachweisen, die von mindestens zwei Genotypen stammten (Wu et al., 2013). Eine zusätzliche Untersuchung der serologisch CMV-positiver Blutspender auf CMV-DNA könnte demnach zu einer Senkung der Infektionsraten bei Hochrisikopatienten führen.

Zusammenfassend lässt sich im Hinblick auf die vorlegte Arbeit folgendes konstatieren: Die *nested*-PCR ist eine geeignete Methode CMV-DNA nachzuweisen. Mit der Methode konnte in den beschriebenen Vorversuchen zuverlässig CMV-DNA gefunden werden. Mit dieser hochsensitiven molekularbiologischen sequenziellen DNA-Nachweismethode unter Einsatz der *primer* gB1/gB2 und gB3/gB4 (UL-55) konnte keine CMV-DNA im Blut von serologisch CMV-negativen sowie CMV-positiven Blut- und Thrombozytenspendern nachgewiesen werden. Ein sauberes Arbeiten mit getrennten räumlichen prä- und post-PCR-Arbeitsschritten keine falsch-positiven Ergebnisse in den untersuchten Proben der Blut- und Thrombozytenspender erbracht hatten. Dies impliziert das außergewöhnlich hohe Maß an Kontaminationsvermeidung in der Aufarbeitung der Proben sowie die augenscheinliche Absenz virämer Spender.

Die humanen Leukozytenantigene spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Die HLA-Klasse I Komplexe präsentieren endogene Proteine und Virusproteine bzw. deren Bruchstücke (Peptide). Sie tragen damit zur Differenzierung zwischen eigenen und fremden Antigenen entscheidend bei. Die HLA-Klasse-II-Moleküle können exogene Peptide darunter Virusproteine binden und präsentieren. T-Helferzellen erkennen Zellen mit identischer HLA-Signatur und initiieren bei z.B. präsentiertem Virusantigen eine zelluläre und humorale Immunreaktion. Vermehrt freigesetzte Zytokine aktivieren u.a. B-Zellen, die zur Bildung neutralisierender Antikörper angeregt werden. Bekannt ist, dass eine Störung der zellulären Wirtsimmunität zu einer höheren Empfänglichkeit gegenüber schweren CMV-Infektionen prädestiniert (Prosch et al., 2000b). Einige Untersuchungen an HIV-/AIDS-Patienten, die eine CMV-Erkrankung bekamen zeigen dies deutlich (Jacobson, 1997).

Das Ziel der statistischen Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender war das Finden von Assoziationen zwischen einem bestimmten HLA-Merkmal und der Bildung oder Nicht-Bildung von Anti-CMV-Antikörpern, basierend auf der Theorie, dass es *responder* und *non-responder* gibt. Von besonderem Interesse wären *non-responder*, die Virusträger sein könnten, ohne in der Serologie eine Konversion zu zeigen. Eine potenzielle Infektiosität eines potentiellen Blut- oder Thrombozytenspenders würde in diesen Fällen durch die Routinediagnostik nicht erfasst. Die Ergebnisse der Bestimmung der Allelfrequenzen in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender für die Merkmale HLA-A und -B stimmten bis auf maximale Abweichungen von 1,47% und bis auf eine Ausnahme überein. Als Ausnahme fiel nur das Merkmal HLA-DR15 auf, das eine negative Abweichung von 4,53% in den Ergebnissen dieser Arbeit im Vergleich zu den Ergebnissen n. Müller (2001) erbrachte. Das in dieser Arbeit ausgewertete Kollektiv war im Vergleich repräsentativ für die Verteilung der HLA-Merkmale-A, -B und -DR innerhalb der potentiellen deutschen Stammzell- und Knochenmarkspender. Diese Ergebnisse sind theoretisch mit Einschränkungen auch auf potentielle Blut- und Thrombozytenspender übertragbar. Zur vollständigen Datenanalyse dieser Arbeit gehörte auch das Einbeziehen des zweiten Kollektivs, den Blut- und Thrombozytenspendern. Bei der Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender wurde berücksichtigt, dass es sich um ein zahlenmäßig deutlich kleineres Kollektiv handelt und wie zuvor erwähnt wurde, eine besondere Vorselektion der Spender im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung erfolgt. Die Auswertung der Allelfrequenzen der beiden Kollektive erfolgte daher unabhängig voneinander. Allerdings waren die Ergebnisse der Allelfrequenzen der Blut- und

Thrombozytenspender für das HLA-A-Merkmal waren mit denen der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender dieser Arbeit und mit denen n. Müller (2001) vergleichbar. Bei der Auswertung des HLA-B-Merkmals fielen bei einzelnen Merkmalen deutliche Unterschiede auf. Insbesondere die Merkmale B44 und B45, beides Untergruppen des Merkmals B12, weichen mit minus 6,75% und plus 7,26% von den Daten n. Müller (2001) ab. Auch B13 zeigt eine Allelfrequenz-Differenz von plus 6,57%. Bei den anderen HLA-B-Merkmalen findet sich eine maximale Abweichung von 2,33% (B35). Allen anderen lagen darunter. Auch bei der Auswertung der Allelfrequenzen für das Merkmal HLA-DRB1 fielen bei zwei Merkmalen deutliche Unterschiede zu den Daten n. Müller (2001) auf. HLA-DR1 und -DR3 waren bei den ausgewerteten Blut- und Thrombozytenspendern dieser Arbeit mit minus 6,41% und minus 3,51% Abweichung aufgefallen. Sicherlich ist die im Vergleich der kleinen Anzahl der Spender der Stichprobe Rechnung zu tragen. An dieser Stelle könnten auch die Selektionskriterien, denen die Blut- und Thrombozytenspender unterworfen sind entscheidend ursächlich sein. Allerdings sind diese Kriterien zu vielfältig, um aus diesen Rückschlüsse auf diese Ergebnisse zu ziehen.

Zusammenfassend waren in dieser Arbeit die HLA-Klasse-I-Merkmale A33 (A19), B38 (B16), B46 (B15), B44 (B12) und Cw7 signifikant häufiger mit einem serologisch positivem Antikörperstatus vergesellschaftet. Bei Trägern dieser Merkmale könnte man von *respondern* sprechen. Dagegen waren die HLA-Klasse-I-Merkmale A28, B13, B64 (B14), B45 (B12), Cw2 und die HLA-Klasse-II-Merkmale, DR15 (DR2) und DQ6 (DQ1) signifikant mit einem serologisch negativem Antikörperstatus assoziiert aufgefallen. Diese können als *non-* oder *low-responder* bezeichnet werden (Tab. 37).

**Tab. 37: Assoziationen zwischen HLA-Merkmalen und einer Anti-CMV-Antikörperbildung oder keiner Anti-CMV-Antikörperbildung**

<b>Immunreaktion</b>	<b>Assoziierte HLA-Merkmale</b>
Anti-CMV-Antikörperbildung	<b>A33 (A19)<sup>1)</sup>, B38 (B16)<sup>1)</sup>, B46 (B15)<sup>1)</sup>, B44 (B12)<sup>1)</sup>, Cw7</b>
Keine Anti-CMV-Antikörperbildung	<b>A28, B13, B64 (B14)<sup>1)</sup>, B45 (B12)<sup>1)</sup>, Cw2, DR15 (DR2)<sup>1)</sup>, DQ6 (DQ1)<sup>1)</sup></b>

<sup>1)</sup>( ) zugehörige Hauptgruppe

Bei den serologisch negativen Spendern könnte ein stattgefundenen Viruskontakt durch die zelluläre Abwehr des Immunsystems übernommen worden sein, ohne über eine Aktivierung der B-Zellen zu einer Antikörperbildung zu führen. Das würde bedeuten, dass Spender, die Träger der HLA-Klasse-I-Merkmale A28, B13, B64 (B14), B45 (B12), Cw2 und die HLA-

Klasse-II-Merkmale, DR15 (DR2) und DQ6 (DQ1) sind, basierend auf der Theorie existierender *non-* oder *low-responder*, trotz einer negativen CMV-Serologie Virus- bzw. CMV-DNA-Überträger sein könnten, und dadurch mit der Übertragung von scheinbar CMV-seronegativen Blutprodukten an ausgewählte Patienten eine CMV-Infektion bzw. -Erkrankung induziert werden könnte.

Die in dieser Arbeit gefundenen Assoziationen zwischen der Bildung und der Nicht-Bildung von Antikörpern nach Kontakt mit dem CMV-Virus unterstützten die Meinung anderer Autoren, die zuvor zeigten, dass es im Sinne der immunologischen Reaktion auf den Viruskontakt *responder* und *low-* oder *non-responder* geben könnte. In der vorgestellten Arbeit von Wada et al. waren CMV-serologisch positiv getestete Blutspender, die HLA-DR15-Träger waren signifikant häufiger mit einer niedrigen Rate an Antikörpern gegen das Bindungsprotein AD-1 des CMV assoziiert, als die Nicht-Merkmalsträger. Daraus wurde durch die Autoren geschlossen, dass DR15 mit einer schlechten Antikörper-Bildung assoziiert war im Sinne von *non-* oder *low-respondern* (Wada et al., 1997). In Japan sind 76,6% der Blutspender CMV-Antikörper-positiv. In den Proben dieser CMV-Antikörper-positiven Spender fanden Furui et al. bei Spendern oberhalb des 60. Lebensjahres in 4,3% CMV-DNA, bei Spendern jünger als 60 Jahre bei 1%. Alle CMV-seronegativen Proben waren frei von CMV-DNA (Furui et al., 2013). Der von Wada et al. gefundene Zusammenhang konnte durch das Ergebnis der Auswertung der Daten der 15.836 potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern in dieser Arbeit untermauert werden, da das Merkmal DR15 mit einem negativen Anti-CMV-Antikörperstatus korreliert (Wada et al., 1997).

Eine andere Arbeit, die diese Theorie unterstützt, wurde 1994 von Curtsinger et al. veröffentlicht. Sie fanden, dass alle peripheren mononukleären Blutzellen in Gegenwart von CMV proliferierten, außer den Zellen, die Träger des DR15Dw2 waren, die wenig oder keine gB-Antikörper bildeten (Curtsinger et al., 1994). Eine Studie von Machida et al. aus dem Jahre 1998 unterstreicht die Verknüpfung von bestimmten HLA-Merkmalsträgern und dem Vorliegen von CMV-Antikörpern. HLA-A33 war in diesem Fall signifikant mit einer positiven CMV-Antikörperserologie verbunden. Dieses Merkmal wurde deutlich seltener in CMV-negativen japanischen Blutspendern gefunden, die in einem *follow-up* über 10 Jahre CMV-seronegativ geblieben sind. Erwähnenswert ist, dass die Durchseuchung der japanischen Bevölkerung mit CMV bei 90% zum Erhebungszeitpunkt lag (Machida et al., 1998).

Die in dieser Arbeit signifikant mit einem positiven oder negativen CMV-Antikörperstatus vergesellschafteten HLA-Merkmale werden z.T. bereits in der Literatur mit CMV- oder Herpesviren-assoziierten Erkrankungen verknüpft beschrieben.

Fan et al. fanden 2006 einen signifikanten Zusammenhang mit zwischen der Anwesenheit des HLA-B38 (B16) und selteneren CMV-Infektion bei Patienten nach Nierentransplantationen, daher wurde es als protektiv in diesem Zusammenhang eingestuft. Patienten, die dieses Merkmal trugen und eine CMV-Infektion hatten zeigten im Gegensatz zu Nicht-B16-Trägern keine klinischen Symptome zeigten (Fan et al., 2006).

HLA-B44 und der Haplotyp -A2, -B44, -DR4 (44.1) wurden signifikant häufiger bei HIV-Patienten gefunden, die nach Erhalt einer antiretroviralen Therapie eine CMV-Retinitis und/oder eine CMV-Enzephalopathie bekamen. Der genannte Haplotyp 44.1 wurde dabei signifikant häufiger bei HIV-Patienten gefunden, die eine CMV-Erkrankung entwickelten (Price et al., 2001). Die Arbeit von Ozawa et al. hinzuziehend, könnte ein Zusammenhang von HLA-B44 und der Entwicklung einer Erkrankung durch ein Herpesvirus (Herpes zoster, Retinitis, Enzephalitis) postuliert werden (Ozawa et al., 1999). Inwiefern die in dieser Arbeit gesehene Assoziation zu einer häufigeren Antikörperbildung relevant ist, kann mit der vorliegenden Literatur nicht abschließend beantwortet werden.

Für HLA-B12 gibt es den Hinweis, dass dies Einfluss auf den Verlauf einer CMV-Primärinfektion haben könnte. Varga et al. fanden in der Aufarbeitung jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (Varga et al., 2008).

Das HLA-DR15 bzw. DR2 findet in zahlreichen Veröffentlichungen, auch in Zusammenhang mit dem CMV-Virus, Erwähnung. Auf der einen Seite werden prädisponierende Assoziationen zu Erkrankungen genannt. HLA-DR2, -DR15 konnten als prädisponierender Faktor für das Myelodysplastische Syndrom, die Aplastische Anämie ausgemacht werden und waren mit erhöhter Empfänglichkeit für eine Sarkoidose assoziiert, bei der ein prognostischer Zusammenhang gemutmaßt wurde (Sauntharajah et al., 2002) (Rutherford et al., 2004).

Bei Patienten die HLA-DR15 und DQB1\*0602 (DQ6) Träger waren, fanden Beskow et al. 2001 signifikant häufiger HPV-Infektion mit protrahiertem Verlauf. Sie vermuteten, dass das Merkmal daran beteiligt ist, dass das Virus nicht suffizient eliminiert werden konnte (Beskow et al., 2001). Bei zeitgleiche Auftreten von DR15 mit anti-EBNA-1-Antikörpern wurde ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Multiplen Sklerose ausgemacht (De Jager et al., 2008). Betreffend das HSV-1 fanden Ozawa et. al., dass HLA-A33 und der -A33-B44-Haplotyp, signifikant mit der Entstehung einer postherpetischen Neuralgie vergesellschaftet waren (Ozawa et al., 1999).

Auf der anderen Seite werden Assoziationen zwischen DR15, bzw. DR2 gefunden, in denen dieses HLA-Merkmal einen positiven (protektiven) Einfluss auf den Verlauf von Infektionen oder Erkrankungen zu haben scheinen. DR15 und DQ6 wurden z.B. als protektiv bei Kindern im Zusammenhang mit Nierenerkrankungen beschrieben (Krasowska-Kwiecien et al., 2006). HLA-DR15 scheint mit reduziertem Risiko für das Entstehen einer *graft versus host disease* Grad II-IV assoziiert (Battiwalla et al., 2006). Bei dieser Patientengruppe erschien dieses Merkmal verknüpft mit einem erniedrigten Risiko eines Wiederauftretens der Erkrankung und einer höheren Überlebensrate nach empfangener Spende zu sein (Stern et al., 2006). Es (HLA-DRB1\*1501) konnte darüber hinaus als wichtiger Faktor in der selbst-limitierenden HCV-Infektion bei deutschen Hepatitis C Patienten ausgemacht werden (Lechmann et al., 1999). Diese Studien untermauern die mutmaßlich protektive Rolle von DR15 innerhalb des Immunsystems.

In einer Untersuchung gesunder Sizilianer wurde eine bei HLA-DR2 positiven Individuen signifikant höhere Anti-CMV -Antikörper- Serumkonzentrationen gefunden als bei Nicht-Merkmalsträgern. In diesem Fall scheint eine kompetente humorale Immunantwort stattzufinden. Das würde Wada et al. widersprechen, die DR-15-Trägern eine Rolle als *non-* oder *low-responder* zusprechen. Die Autoren um Lio schränken allerdings ein, dass die Anwesenheit von Antikörpern nicht gleichzusetzen ist mit einer effektiven Virusclearance. Die Bindungsfähigkeit der Antikörper wurde in diesem Fall nicht untersucht (Lio et al., 1994). In einer Gruppe Patienten nach familiärer HLA-identischer Stammzelltransplantation, die keine akute *graft versus host (GvH) disease* entwickelt hatten, aber Zeichen einer CMV-Infektion zeigten, war DR15 unter den betroffenen signifikant häufiger vertreten (Kekik et al., 2009).

Andere HLA-Merkmale, die in dieser Arbeit nicht signifikant auffielen, werden in der Literatur im Zusammenhang mit CMV-Infektionen bzw. -Erkrankungen aufgeführt. Da die Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche entscheidend für eine suffiziente Immunantwort ist, könnte aus diesen Arbeiten geschlossen werden, dass die Merkmale A2 und DR11 der Unterdrückung der Antigenpräsentation durch das CMV besser entgegenwirken können als Zellen, die Träger des A11- oder A24-Merkmals sind (Fan et al., 2006; Ma et al., 2011).

DR11 könnte allgemein prädisponierend für den Erwerb einer CMV-Infektion sein, was durch eine Arbeit von Retiere et al. als bestätigt gesehen werden kann, die bei Patienten nach Nierentransplantation eine höheren Rate an CMV-Infektionen des gB2-Stammes fanden (Retiere et al., 2003).

In einer Arbeit von Baldwin et al. Aus dem Jahre 1983 geht hervor, das DR3 und DR7-Träger prädisponiert sind eine primäre CMV-Infektion zu bekommen. Sie wurden als *responder* beschrieben. Insbesondere gB-Antikörper schienen in der Immunreaktion beeinflusst zu werden (Baldwin et al., 1983).

Auch die Rolle von DR9 bei der Immunreaktion auf CMV wurde bereits untersucht. In einer Multivariantenanalyse von Du et al. , die 2007 publiziert wurde, trat DR9 zusammen mit einem seronegativem CMV-Status und dem Auftreten einer akuten *graft versus host disease* assoziiert mit einer erhöhten Rate an CMV-Infektionen und –Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation auf (Du et al., 2007).

Darüber hinaus wurden auch andere immunologische Parameter im Zusammenhang mit einer CMV-Infektion und dem Auftreten bestimmter HLA-Molekülen betrachtet. In einer Gruppe von chinesischen Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten hatten, waren Serokonversion und Antigenämie signifikant häufiger bei Patienten, die die HLA-Merkmale A2 und DR11 aufwiesen. DR11-Träger boten dabei alle eine Antigenämie. In einer Gruppe mit niedrigem Antigennachweis war A11 signifikant häufiger. Eine Gruppe B16-Träger zeigte keine klinischen Zeichen bei CMV-Infektion (Fan et al., 2006).

AIDS-Patienten entwickeln in 25-35% eine CMV-Retinitis. In einer Untersuchung der Häufigkeit von HLA-Merkmalen bei AIDS-Patienten, die an CMV-Retinitis erkrankten, fand sich eine hohe Assoziation zu HLA-DR7. Patienten mit diesem Merkmal hatten eine signifikant niedrigerere T-Zellantwort auf das CMV (Schrier et al., 1994, 1995).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit und die aufgeführten Studien, dass die HLA-Moleküle im Rahmen der CMV-Infektionen bzw. -Erkrankungen eine wichtige Rolle in der Abwehrfähigkeit eines Organismus haben. Deren Einfluss und Bedeutung aber noch nicht eindeutig herausgearbeitet worden ist und weiter untersucht werden muss.

Trägern bestimmter HLA-Merkmale sollte in Ableitung der präsentierten Ergebnisse besondere Aufmerksamkeit in den CMV-Screeningverfahren prä- und postinterventionell zuteil werden. Um die CMV-Infektions- bzw. Erkrankungsrate der Risikopatienten zu reduzieren, könnte eine weitere Maßnahme die Gabe definierter Blutprodukte nach Anwendung spezifischer HLA-Untersuchungen der Spender bestehen.

HLA-Assoziationen zu CMV könnten entscheidend sein, um gefährdete Patienten nach Transplantationen effektiver identifizieren, kontrollieren und behandeln zu können. Die Zahl der in Deutschland seit 2009 an das Paul-Ehrlich-Institut gemeldeten Verdachtsfälle

transfusionsbedingter CMV-Infektionen ist glücklicherweise gering.<sup>5</sup> Zudem wurden seit 2010 nur zwei Fälle gemeldet, die nicht sicher als transfusionsassoziiert bestätigt werden konnten.<sup>6</sup> Die Rate an TT-CMV-Infektionen kann als insgesamt sehr gering eingeschätzt werden. Abseits betriebswirtschaftlicher Überlegungen ist bei vitaler Bedrohung einzelner Patienten eine Verbesserung in der Prophylaxe ausgesprochen wünschenswert. Eine Optimierung der preemptiven Behandlung ist unter Ausschöpfen der verfügbaren Diagnostik anzunehmen, der Stellenwert für Patienten *at risk* unter immunsupprimierender Therapie hervorzuheben.

---

<sup>5</sup> Homepage unter <http://www.pei.de/DE/home/de-node.html>; am 14.03.2014 abgerufen

<sup>6</sup> Mitteilungen des Arbeitskreises Blut des Bundesgesundheitsministeriums für Gesundheit: „Humanes Cytomegalievirus (HCMV)“; Bundesgesundheitsbl 2010 · 53:973–983 DOI 10.1007/s00103-010-1111-2; Springer-Verlag 2010 abgerufen am 10.10.2013 unter [http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/AK\\_Blut/Stellungnahmen/download/...](http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/AK_Blut/Stellungnahmen/download/...)

## 6. Zusammenfassung

Im Institut für Transfusionsmedizin des Zentrums für Diagnostik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden im Zeitraum 2004 bis 2006 die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten erhoben. Dafür wurden Blutproben von 366 Blut- und Thrombozytenspendern gesammelt, aufbereitet, molekularbiologisch untersucht und die Spenderdaten statistisch ausgewertet.

Im experimentellen Teil der vorgelegten Arbeit wurde mit der *nested*-PCR als einer hochsensitiven molekularbiologischen DNA-Nachweismethode unter Einsatz der *primer* gB1 - 4 (UL-55, CMV-Glykoprotein B) *buffy coats* von serologisch CMV-negativen sowie CMV-positiven Blut- und Thrombozytenspendern (n = 291) auf CMV-DNA untersucht. Es konnte keine CMV-DNA nachgewiesen werden. Dies impliziert das außergewöhnlich hohe Maß an Kontaminationsvermeidung in der Aufarbeitung der Proben sowie die Absenz virämischer Spender in der untersuchten Stichprobe. Da es keine Unterschiede bzgl. der PCR-Ergebnisse zwischen serologisch positiven und negativen Spendern gibt, können aus dieser Gruppe keine Aussagen über die Beziehung zwischen DNA-Positivität und dem Befund der CMV-Serologie und einem HLA-Merkmal gemacht werden. Die HLA-Ausstattung jedes einzelnen bestimmt die immunologische Antwort und deren Effektivität auf einen Kontakt mit dem humanen Cytomegalievirus. Ein Vergleich des Antikörperstatus jedes Blut- und Thrombozytenspenders mit allen zum Aufbereitungszeitpunkt bekannten HLA-Klassen I und II-Molekülen wurde bei verwertbarer Serologie in 242 Fällen durchgeführt. Eine positive Antikörperbildung konnte bei Trägern des Merkmals B44 (B12) als statistisch hochsignifikant ( $p < 0.0001$ ) im Sinne von *high-respondern* ausgemacht werden. Zugunsten einer negativen Antikörperbildung, also im Sinne von *non-respondern*, wurde eine Assoziation der Merkmale B13, B45 (B12) auf hochsignifikantem ( $p < 0.0001$ ) und für das Merkmal DQ9 (DQ3) auf signifikantem Niveau ( $p < 0.02$ ) festgestellt.

Darüber hinaus konnten Daten von 15.836 potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspendern hinzugezogen werden, deren Daten der statistischen Aufarbeitung zugeführt wurden. In Analogie zur Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender konnten in der ungleich größeren Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender gleichwohl Zusammenhänge herausgearbeitet werden. Zugunsten eines positiven Antikörperstatus erwiesen sich Träger der Merkmale A33 (A19) und B38 (B16) ( $p < 0.003$ ) sowie Cw7 ( $p < 0.02$ ) und nicht zuletzt B46 (B15) ( $p < 0.04$ ) als signifikant.

Eine nicht vorhandene Antikörperbildung trat auf signifikantem Niveau assoziiert mit den Merkmalen Cw2 (**p<0.0002**), B64 (B14) (**p<0.008**), DR15 (DR2) (**p<0.02**), A28 (**p<0.03**) und DQ6 (DQ1) (**p<0.04**) auf.

Den Blutprodukten von Blut- und Thrombozytenspendern die o.g. HLA-Merkmale A28, B13, B45 (B12), B64 (B14), Cw2, DR15 (DR2), DQ6 (DQ1) und DQ9 (DQ3) tragen sollte in Ableitung der präsentierten Ergebnisse besondere Aufmerksamkeit bzgl. der Auswahl des CMV-Screeningverfahrens zuteil werden. Eine zusätzliche Untersuchung mit einer *nested*-PCR erscheint bei diesen potentiellen *non-respondern* sinnvoll. Eine resultierende Verbesserung in Prophylaxe und eine Optimierung der preemptiven Behandlung im Einzelfall beim Empfänger ist anzunehmen und der Stellenwert für Patienten unter immunsupprimierender Therapie hervorzuheben. In der Zusammenschau der aktuellen Literatur wird deutlich, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Fragen nach dem optimalen Spender für Hochrisikopatienten und der geeignetsten CMV-Nachweismethode und der klinischen Konsequenz hinsichtlich einer potentiellen Übertragung von CMV oder einer möglichen Reaktivierung durch CMV-DNA-enhaltende Blutprodukte nicht abschließend geklärt sind.

## 7. Literatur

1. Aarnisalo, J., Ilonen, J., Vainionpaa, R., Volanen, I., Kaitosaari, T., and Simell, O. (2003). Development of antibodies against cytomegalovirus, varicella-zoster virus and herpes simplex virus in Finland during the first eight years of life: a prospective study. *Scand J Infect Dis* 35, 750-753.
2. Adler, S.P. (1988). Cytomegalovirus and transfusions. *Transfus Med Rev* 2, 235-244.
3. Arthurs, S.K., Eid, A.J., Pedersen, R.A., Kremers, W.K., Cosio, F.G., Patel, R., and Razonable, R.R. (2008). Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 46, 840-846.
4. Baldanti, F., Sarasini, A., Furione, M., Gatti, M., Comolli, G., Revello, M.G., and Gerna, G. (1998). Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains. *Arch Virol* 143, 1701-1709.
5. Baldwin, W.M., 3rd, Claas, F.H., van Es, A., Westedt, W.L., van Gemert, G., Daha, M.R., and van Es, L.A. (1983). Renal graft dysfunction during infection with cytomegalovirus: association with IgM lymphocytotoxins and HLA-DR3 and DR7. *Br Med J (Clin Res Ed)* 287, 1332-1334.
6. Bale, J.F., Jr., Petheram, S.J., Souza, I.E., and Murph, J.R. (1996). Cytomegalovirus reinfection in young children. *J Pediatr* 128, 347-352.
7. Battiwalla, M., Hahn, T., Radovic, M., Roy, H., Wahab, A., Duman, E., Bajwa, R., Padmanabhan, S., Becker, J., Barrett, A.J., *et al.* (2006). Human leukocyte antigen (HLA) DR15 is associated with reduced incidence of acute GVHD in HLA-matched allogeneic transplantation but does not impact chronic GVHD incidence. *Blood* 107, 1970-1973.
8. Beersma, M.F., Bijlmakers, M.J., and Ploegh, H.L. (1993). Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J Immunol* 151, 4455-4464.
9. Beneke, J.S., Tegtmeier, G.E., Alter, H.J., Luetkemeyer, R.B., Solomon, R., and Bayer, W.L. (1984). Relation of titers of antibodies to CMV in blood donors to the transmission of cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 150, 883-888.

10. Beskow, A.H., Josefsson, A.M., and Gyllensten, U.B. (2001). HLA class II alleles associated with infection by HPV16 in cervical cancer in situ. *Int J Cancer* 93, 817-822.
11. Bevan, I.S., Daw, R.A., Day, P.J., Ala, F.A., and Walker, M.R. (1991). Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus infection in a blood donor population. *Br J Haematol* 78, 94-99.
12. Bitsch, A., Kirchner, H., Dupke, R., and Bein, G. (1992). Failure to detect human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of healthy blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion* 32, 612-617.
13. Blacho, G., Josien, R., Douillard, D., Bignon, J.D., Cesbron, A., and Souillou, J.P. (1992). The influence of HLA A-B-DR matching on cytomegalovirus disease after renal transplantation. Evidence that HLA-DR7-matched recipients are more susceptible to cytomegalovirus disease. *Transplantation* 54, 871-874.
14. Boeke, C.E., Pauly, M.E., Hatch-Stock, H., and Jackson, J.B. (2008). CMV antibody prevalence and seroincidence in plateletpheresis donors. *J Clin Apher* 23, 63-65.
15. Bold, S., Ohlin, M., Garten, W., and Radsak, K. (1996). Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol* 77 (Pt 9), 2297-2302.
16. Bolovan-Fritts, C.A., Mocarski, E.S., and Wiedeman, J.A. (1999). Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* 93, 394-398.
17. Boppana, S.B., Rivera, L.B., Fowler, K.B., Mach, M., and Britt, W.J. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 344, 1366-1371.
18. Bowden, R., and Sayers, M. (1990). The risk of transmitting cytomegalovirus infection by fresh frozen plasma. *Transfusion* 30, 762-763.
19. Bowden, R.A., Slichter, S.J., Sayers, M., Weisdorf, D., Cays, M., Schoch, G., Banaji, M., Haake, R., Welk, K., Fisher, L., *et al.* (1995). A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 86, 3598-3603.
20. Bowden, R.A., Slichter, S.J., Sayers, M.H., Mori, M., Cays, M.J., and Meyers, J.D. (1991). Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red

- blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* 78, 246-250.
21. Burak, K.W., Kremers, W.K., Batts, K.P., Wiesner, R.H., Rosen, C.B., Razonable, R.R., Paya, C.V., and Charlton, M.R. (2002). Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 8, 362-369.
  22. Cervia, J.S., Wenz, B., and Ortolano, G.A. (2007). Leukocyte reduction's role in the attenuation of infection risks among transfusion recipients. *Clin Infect Dis* 45, 1008-1013.
  23. Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70, 78-83.
  24. Chandler, S.H., Handsfield, H.H., and McDougall, J.K. (1987). Isolation of multiple strains of cytomegalovirus from women attending a clinic for sexually transmitted disease. *J Infect Dis* 155, 655-660.
  25. Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., *et al.* (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 125-169.
  26. Chen, Y., Rocha, V., Bittencourt, H., Scieux, C., Loiseau, P., Esperou, H., Devergie, A., Guardiola, P., Socie, G., Chevret, S., *et al.* (2001). Relationship between HLA alleles and cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Blood* 98, 500-501.
  27. Coaquette, A., Bourgeois, A., Dirand, C., Varin, A., Chen, W., and Herbein, G. (2004). Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 39, 155-161.
  28. Compton, T., Nepomuceno, R.R., and Nowlin, D.M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 191, 387-395.
  29. Curtsinger, J.M., Liu, Y.N., Radeke, R., Bryon, M.K., Fuad, S., Bach, F.H., and Gehrz, R.C. (1994). Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glycoprotein B (gB). II. Low gB-specific T and B cell responses are associated with expression of certain HLA-DR alleles. *J Gen Virol* 75 ( Pt 2), 301-307.

30. Dausset, J., Colombani, J., and Evelin, J. (1958). Présence de l'antigène Rh (D) dans les leucocytes et les plaquettes humaines. *Vox Sang* 3, 266-276.
31. De Jager, P.L., Simon, K.C., Munger, K.L., Rioux, J.D., Hafler, D.A., and Ascherio, A. (2008). Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 70, 1113-1118.
32. de Medeiros, C.R., Moreira, V.A., and Pasquini, R. (2000). Cytomegalovirus as a cause of very late interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26, 443-444.
33. Diosi, P., Babusceac, L., Nevinglovschi, O., and Kun-Stoicu, G. (1967). Cytomegalovirus infection associated with pregnancy. *Lancet* 2, 1063-1066.
34. Diosi, P., Moldovan, E., and Tomescu, N. (1969). Latent cytomegalovirus infection in blood donors. *Br Med J (Clin Res Ed)* 4, 660-662.
35. Drago, L., Lombardi, A., De Vecchi, E., Giuliani, G., Bartolone, R., and Gismondo, M.R. (2004). Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect Dis* 4, 55.
36. Drew, W.L., Paya, C.V., and Emery, V. (2001). Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *Am J Transplant* 1, 307-312.
37. Drew, W.L., Tegtmeier, G., Alter, H.J., Laycock, M.E., Miner, R.C., and Busch, M.P. (2003). Frequency and duration of plasma CMV viremia in seroconverting blood donors and recipients. *Transfusion* 43, 309-313.
38. Du, J., Liu, J., Gu, J., and Zhu, P. (2007). HLA-DRB1\*09 is associated with increased incidence of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13, 1417-1421.
39. Dummer, J.S. (1990). Cytomegalovirus infection after liver transplantation: clinical manifestations and strategies for prevention. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 7, S767-775.
40. Dumont, L.J., Luka, J., VandenBroeke, T., Whitley, P., Ambruso, D.R., and Elfath, M.D. (2001). The effect of leukocyte-reduction method on the amount of human cytomegalovirus in blood products: a comparison of apheresis and filtration methods. *Blood* 97, 3640-3647.
41. Dworsky, M.E., Welch, K., Cassady, G., and Stagno, S. (1983). Occupational risk for primary cytomegalovirus infection among pediatric health-care workers. *N Engl J Med* 309, 950-953.
42. Eddleston, M., Peacock, S., Juniper, M., and Warrell, D.A. (1997). Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 24, 52-56.

43. Eid, A.J., Arthurs, S.K., Deziel, P.J., Wilhelm, M.P., and Razonable, R.R. (2008). Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transplant* 22, 162-170.
44. Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Vallbracht, A., Müller, M., Schmidt, H., Saal, J.G., Waller, H.D., and Muller, C.A. (1991a). Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet* 338, 1170-1172.
45. Einsele, H., and Hebart, H. (1999). Cytomegalovirus infection following stem cell transplantation. *Haematologica* 84 Suppl EHA-4, 46-49.
46. Einsele, H., Steidle, M., Vallbracht, A., Saal, J.G., Ehninger, G., and Müller, C.A. (1991b). Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood* 77, 1104-1110.
47. Fan, J., Meng, X.Q., Yang, M.F., Zhou, L., Chen, X.M., Hu, M.J., Fan, W.W., Ma, W.H., and Li, L.J. (2006). Association of cytomegalovirus infection with human leukocyte antigen genotypes in recipients after allogeneic liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5, 34-38.
48. Fishman, J.A. (1998a). Infection and xenotransplantation. Developing strategies to minimize risk. *Ann N Y Acad Sci* 862, 52-66.
49. Fishman, J.A. (1998b). The risk of infection in xenotransplantation. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 862, 45-51.
50. Fishman, J.A., and Rubin, R.H. (1998). Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338, 1741-1751.
51. Foot, A.B., Pamphilon, D., Caul, E.O., Roome, A.P., Hunt, L.P., Cornish, J.M., and Oakhill, A. (1998). Cytomegalovirus infection in recipients of related and unrelated donor bone marrow transplants: no evidence of increased incidence in patients receiving unrelated donor grafts. *Br J Haematol* 102, 671-677.
52. Freymuth, F., Gennetay, E., Petitjean, J., Eugene, G., Hurault de Ligny, B., Ryckelynck, J.P., Legoff, C., Hazera, P., and Bazin, C. (1994). Comparison of nested PCR for detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic antigenemia procedure for diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 32, 1614-1618.
53. Furui, Y., Satake, M., Hoshi, Y., Uchida, S., Suzuki, K., and Tadokoro, K. (2013). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion* 53, 2190-2197.

54. Gajewski, J.L., Johnson, V.V., Sandler, S.G., Sayegh, A., and Klumpp, T.R. (2008). A review of transfusion practice before, during, and after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood* *112*, 3036-3047.
55. Gehrz, R.C., Fuad, S., Liu, Y.N., and Bach, F.H. (1987). HLA class II restriction of T helper cell response to cytomegalovirus (CMV). I. Immunogenetic control of restriction. *J Immunol* *138*, 3145-3151.
56. Gehrz, R.C., Liu, Y.N., Eckhardt, J., and Klaus, A. (1991). Relevance of immune responses to pathogenesis of cytomegalovirus-associated diseases. *Transplant Proc* *23*, 75-84.
57. Ghaffari, S.H., Obeidi, N., Dehghan, M., Alimoghaddam, K., Gharehbaghian, A., and Ghavamzadeh, A. (2008). Monitoring of cytomegalovirus reactivation in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *Pathol Oncol Res* *14*, 399-409.
58. Glock, B., Schistal, E., and Mayr, W.R. (2003). CMV DNA in blood donors with IgM and IgG CMV antibodies. *Transfusion* *43*, 1493-1494.
59. Greenlee, D.J., Fan, H., Lawless, K., Harrison, C.R., and Gulley, M.L. (2002). Quantitation of CMV by real-time PCR in transfusable RBC units. *Transfusion* *42*, 403-408.
60. Grossi, P., Minoli, L., Percivalle, E., Irish, W., Vigano, M., and Gerna, G. (1995). Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation* *59*, 847-851.
61. Halfon, P., Berger, P., Khiri, H., Martineau, A., Penaranda, G., Merlin, M., and Faucher, C. (2011). Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive therapy initiation after hematopoietic cell transplantation. *J Med Virol* *83*, 490-495.
62. Hamprecht, K., and Jahn, G. (2007). Humanes Cytomegalievirus und kongenitale Infektionen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* *50*, 1379-1392.
63. Hayes, K., Danks, D.M., Gibas, H., and Jack, I. (1972). Cytomegalovirus in human milk. *N Engl J Med* *287*, 177-178.
64. Hecker, M., Qiu, D., Marquardt, K., Bein, G., and Hackstein, H. (2004). Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang* *86*, 41-44.
65. Hengel, H., Flohr, T., Hammerling, G.J., Koszinowski, U.H., and Momburg, F. (1996). Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the endoplasmic reticulum for MHC class I assembly. *J Gen Virol* *77 ( Pt 9)*, 2287-2296.

66. Hillyer, C.D., Emmens, R.K., Zago-Novaretti, M., and Berkman, E.M. (1994). Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: filtration versus the use of seronegative donor units. *Transfusion* 34, 929-934.
67. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280.
68. Humar, A., Washburn, K., Freeman, R., Paya, C.V., Mouas, H., Alecock, E., and Razonable, R.R. (2007). An assessment of interactions between hepatitis C virus and herpesvirus reactivation in liver transplant recipients using molecular surveillance. *Liver Transpl* 13, 1422-1427.
69. Ibrahim, A., Gautier, E., Roittmann, S., Bourhis, J.H., Fajac, A., Charnoz, I., Terrier, P., Salord, J.M., Tancrede, C., Hayat, M., *et al.* (1997). Should cytomegalovirus be tested for in both blood and bronchoalveolar lavage fluid of patients at a high risk of CMV pneumonia after bone marrow transplantation? *Br J Haematol* 98, 222-227.
70. Ikewaki, J., Ohtsuka, E., Kawano, R., Ogata, M., Kikuchi, H., and Nasu, M. (2003). Real-time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. *J Clin Microbiol* 41, 4382-4387.
71. Ikewaki, J., Ohtsuka, E., Satou, T., Kawano, R., Ogata, M., Kikuchi, H., and Nasu, M. (2005). Real-time PCR assays based on distinct genomic regions for cytomegalovirus reactivation following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 35, 403-410.
72. Ishibashi, K., Tokumoto, T., Shirakawa, H., Hashimoto, K., Kushida, N., Yanagida, T., Shishido, K., Aikawa, K., Yamaguchi, O., Toma, H., *et al.* (2009). Association between antibody response against cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes and HLA-DR. *Microbiol Immunol* 53, 412-416.
73. Jacobson, M.A. (1997). Ganciclovir therapy for severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 25, 1487-1488.
74. Jenkins, F.J., Rowe, D.T., and Rinaldo, C.R., Jr. (2003). Herpesvirus infections in organ transplant recipients. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 1-7.
75. Jiwa, N.M., Van Gemert, G.W., Raap, A.K., Van de Rijke, F.M., Mulder, A., Lens, P.F., Salimans, M.M., Zwaan, F.E., Van Dorp, W., and Van der Ploeg, M. (1989). Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of

- viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 48, 72-76.
76. Kaariainen, L., Klemola, E., and Paloheimo, J. (1966). Rise of cytomegalovirus antibodies in an infectious-mononucleosis-like syndrome after transfusion. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1, 1270-1272.
77. Kane, R.C., Rousseau, W.E., Noble, G.R., Tegtmeyer, G.E., Wulff, H., Herndon, H.B., Chin, T.D., and Bayer, W.L. (1975). Cytomegalovirus infection in a volunteer blood donor population. *Infect Immun* 11, 719-723.
78. Kekik, C., Besisik, S.K., Seyhun, Y., Oguz, F.S., Sargin, D., and Carin, M.N. (2009). Relationship between HLA tissue type, CMV infection, and acute graft-vs-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: single-center experience. *Transplant Proc* 41, 3859-3862.
79. Kharrazi, M., Hyde, T., Young, S., Amin, M.M., Cannon, M.J., and Dollard, S.C. (2010). Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 157, 191-197.
80. Kijpittayarit-Arthurs, S., Eid, A.J., Kremers, W.K., Pedersen, R.A., Dierkhising, R.A., Patel, R., and Razonable, R.R. (2007). Clinical features and outcomes of delayed-onset primary cytomegalovirus disease in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 26, 1019-1024.
81. Kotsimbos, A.T., Sinickas, V., Glare, E.M., Esmore, D.S., Snell, G.I., Walters, E.H., and Williams, T.J. (1997). Quantitative detection of human cytomegalovirus DNA in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 1241-1246.
82. Kraat, Y.J., Christiaans, M.H., Nieman, F.H., van den Berg-Loonen, P.M., van Hooff, J.P., and Bruggeman, C.A. (1994). Risk factors for cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients: HLA-DR7 and triple therapy. *Transpl Int* 7, 362-367.
83. Krajden, M., Shankaran, P., Bourke, C., and Lau, W. (1996). Detection of cytomegalovirus in blood donors by PCR using the digene SHARP signal system assay: effects of sample preparation and detection methodology. *J Clin Microbiol* 34, 29-33.
84. Krasowska-Kwiecien, A., Sancewicz-Pach, K., and Moczulska, A. (2006). Idiopathic nephrotic syndrome in Polish children - its variants and associations with HLA. *Pediatr Nephrol* 21, 1837-1846.

85. Kühn, J.E. (2000). Transfusion-Associated Infections with Cytomegalovirus and Other Human Herpesviruses. *Infusionsther Transfusionsmed* 27, 138-143.
86. Kwok, S., and Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238.
87. Lamberson, H.V., and Dock, N.L. (1992). Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion* 32, 196-198.
88. Larsson, S., Soderberg-Naucler, C., Wang, F.Z., and Moller, E. (1998). Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* 38, 271-278.
89. Lechmann, M., Schneider, E.M., Giers, G., Kaiser, R., Dumoulin, F.L., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (1999). Increased frequency of the HLA-DR15 (B1\*15011) allele in German patients with self-limited hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Invest* 29, 337-343.
90. Leng, S.X., Li, H., Xue, Q.L., Tian, J., Yang, X., Ferrucci, L., Fedarko, N., Fried, L.P., and Semba, R.D. (2011a). Association of detectable cytomegalovirus (CMV) DNA in monocytes rather than positive CMV IgG serology with elevated neopterin levels in community-dwelling older adults. *Exp Gerontol* 46, 679-684.
91. Leng, S.X., Qu, T., Semba, R.D., Li, H., Yao, X., Nilles, T., Yang, X., Manwani, B., Walston, J.D., Ferrucci, L., *et al.* (2011b). Relationship between cytomegalovirus (CMV) IgG serology, detectable CMV DNA in peripheral monocytes, and CMV pp65(495-503)-specific CD8+ T cells in older adults. *Age (Dordr)* 33, 607-614.
92. Leong, C.C., Chapman, T.L., Bjorkman, P.J., Formankova, D., Mocarski, E.S., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1998). Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med* 187, 1681-1687.
93. Li, H., Weng, P., Najjarro, K., Xue, Q.L., Semba, R.D., Margolick, J.B., and Leng, S.X. (2014). Chronic CMV infection in older women: Longitudinal comparisons of CMV DNA in peripheral monocytes, anti-CMV IgG titers, serum IL-6 levels, and CMV pp65 (NLV)-specific CD8(+) T-cell frequencies with twelve year follow-up. *Exp Gerontol* 54, 84-89.
94. Limaye, A.P., Bakthavatsalam, R., Kim, H.W., Randolph, S.E., Halldorson, J.B., Healey, P.J., Kuhr, C.S., Levy, A.E., Perkins, J.D., Reyes, J.D., *et al.* (2006). Impact

- of cytomegalovirus in organ transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation* 81, 1645-1652.
95. Lio, D., Caccamo, N., D'Anna, C., Cigna, D., Candore, G., and Caruso, C. (1994). Viral antibody titers are influenced by HLA-DR2 phenotype. *Exp Clin Immunogenet* 11, 182-186.
  96. Liu, Y.N., Curtsinger, J., Donahue, P.R., Klaus, A., Optiz, G., Cooper, J., Karr, R.W., Bach, F.H., and Gehrz, R.C. (1993). Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glycoprotein B. I. Mapping of HLA-restricted helper T cell epitopes on gp93. *J Gen Virol* 74 ( Pt 10), 2207-2214.
  97. Liu, Y.N., Klaus, A., Kari, B., Stinski, M.F., Eckhardt, J., and Gehrz, R.C. (1991). The N-terminal 513 amino acids of the envelope glycoprotein gB of human cytomegalovirus stimulates both B- and T-cell immune responses in humans. *J Virol* 65, 1644-1648.
  98. Ljungman, P., Griffiths, P., and Paya, C. (2002). Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34, 1094-1097.
  99. Ma, Y.D., Li, M.H., Meng, X.Q., Huang, Y.P., Hu, J.H., Chin, X.M., Fan, J., and Ma, W.H. (2011). [The study on high-resolution HLA and human cytomegalovirus (HCMV) viremia in bone marrow transplantation recipients]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 25, 427-430.
  100. Machida, S., Takahashi, T., Nomoto, K., and Murata, S. (1998). [HLA antigens are associated in seronegativity to cytomegalovirus(CMV)]. *Nihon Rinsho* 56, 129-133.
  101. Madalosso, C., de Souza, N.F., Jr., Ilstrup, D.M., Wiesner, R.H., and Krom, R.A. (1998). Cytomegalovirus and its association with hepatic artery thrombosis after liver transplantation. *Transplantation* 66, 294-297.
  102. Manez, R., Kusne, S., Green, M., Abu-Elmagd, K., Irish, W., Reyes, J., Furukawa, H., Tzakis, A., Fung, J.J., Todo, S., *et al.* (1995). Incidence and risk factors associated with the development of cytomegalovirus disease after intestinal transplantation. *Transplantation* 59, 1010-1014.
  103. Manicklal, S., Emery, V.C., Lazzarotto, T., Boppana, S.B., and Gupta, R.K. (2013). The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 26, 86-102.

104. Meyer, O., Hildebrandt, M., Schulz, B., Blasczyk, R., and Salama, A. (1999). Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5. *Transfusion* 39, 1256-1258.
105. Meyers, J.D. (1984). Cytomegalovirus infection following marrow transplantation: risk, treatment, and prevention. *Birth Defects Orig Artic Ser* 20, 101-117.
106. Meyers, J.D., Flournoy, N., and Thomas, E.D. (1986). Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 153, 478-488.
107. Miller, W.J., McCullough, J., Balfour, H.H., Jr., Haake, R.J., Ramsay, N.K., Goldman, A., Bowman, R., and Kersey, J. (1991). Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening. *Bone Marrow Transplant* 7, 227-234.
108. Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J.C., and Lemoine, F.M. (1996). Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood* 88, 1277-1283.
109. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harb Sym* 51, 263-273.
110. Munro, S.C., Hall, B., Whybin, L.R., Leader, L., Robertson, P., Maine, G.T., and Rawlinson, W.D. (2005). Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* 43, 4713-4718.
111. Mustakangas, P., Sarna, S., Ammala, P., Muttillainen, M., Koskela, P., and Koskiniemi, M. (2000). Human cytomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different urban areas during the first trimester: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol* 29, 587-591.
112. Nash, T., Hoffmann, S., Butch, S., Davenport, R., and Cooling, L. (2012). Safety of leukoreduced, cytomegalovirus (CMV)-untested components in CMV-negative allogeneic human progenitor cell transplant recipients. *Transfusion* 52, 2270-2272.
113. Nguyen, Q., Champlin, R., Giralt, S., Rolston, K., Raad, I., Jacobson, K., Ippoliti, C., Hecht, D., Tarrand, J., Luna, M., *et al.* (1999). Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 28, 618-623.

114. Nichols, W.G., Price, T.H., Gooley, T., Corey, L., and Boeckh, M. (2003). Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leukoreduced blood products. *Blood* 101, 4195-4200.
115. Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt, C.A., Landt, O., Ellerbrok, H., Pauli, G., and Siegert, W. (2000). Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 38, 2734-2737.
116. Novak, Z., Ross, S.A., Patro, R.K., Pati, S.K., Kumbla, R.A., Brice, S., and Boppana, S.B. (2008). Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. *J Clin Microbiol* 46, 882-886.
117. Ozawa, A., Sasao, Y., Iwashita, K., Miyahara, M., Sugai, J., Iizuka, M., Kawakubo, Y., Ohkido, M., Naruse, T., Anzai, T., *et al.* (1999). HLA-A33 and -B44 and susceptibility to postherpetic neuralgia (PHN). *Tissue Antigens* 53, 263-268.
118. Pamphilon, D.H., Rider, J.R., Barbara, J.A., and Williamson, L.M. (1999). Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfus Med* 9, 115-123.
119. Pass, R.F., Fowler, K.B., Boppana, S.B., Britt, W.J., and Stagno, S. (2006). Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 35, 216-220.
120. Polic, B., Jonjic, S., Pavic, I., Crnkovic, I., Zorica, I., Hengel, H., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1996). Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo. *J Gen Virol* 77 (Pt 2), 217-225.
121. Potena, L., Grigioni, F., Ortolani, P., Magnani, G., Marrozzini, C., Falchetti, E., Barbieri, A., Bacchi-Reggiani, L., Lazzarotto, T., Marzocchi, A., *et al.* (2003). Relevance of cytomegalovirus infection and coronary-artery remodeling in the first year after heart transplantation: a prospective three-dimensional intravascular ultrasound study. *Transplantation* 75, 839-843.
122. Preiksaitis, J.K., Brown, L., and McKenzie, M. (1988). The risk of cytomegalovirus infection in seronegative transfusion recipients not receiving exogenous immunosuppression. *J Infect Dis* 157, 523-529.
123. Preiksaitis, J.K., Sandhu, J., and Strautman, M. (2002). The risk of transfusion-acquired CMV infection in seronegative solid-organ transplant recipients receiving non-WBC-reduced blood components not screened for CMV antibody (1984 to 1996): experience at a single Canadian center. *Transfusion* 42, 396-402.

124. Price, P., Keane, N.M., Stone, S.F., Cheong, K.Y., and French, M.A. (2001). MHC haplotypes affect the expression of opportunistic infections in HIV patients. *Hum Immunol* 62, 157-164.
125. Prösch, S., Reinke, P., Volk, H.D., and Krüger, D.H. (2000a). Zytomegalieinfektionen bei Patienten nach Organtransplantationen Epidemiologie, Diagnostik, Therapie. *Internist (Berl)* 41, 1253-1260, 1262.
126. Prösch, S., Wendt, C.E., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D.H., Volk, H.D., and Docke, W.D. (2000b). A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 272, 357-365.
127. Retiere, C., Lesimple, B., Lepelletier, D., Bignon, J.D., Hallet, M.M., and Imbert-Marcille, B.M. (2003). Association of glycoprotein B and immediate early-1 genotypes with human leukocyte antigen alleles in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Transplantation* 75, 161-165.
128. Reusser, P. (1992). Klinik und Therapie der Infektion mit dem Zytomegalievirus. *Internist (Berl)* 33, 593-596.
129. Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L., and Strominger, J.L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386, 514-517.
130. Roback, J.D., Bray, R.A., and Hillyer, C.D. (2000). Longitudinal monitoring of WBC subsets in packed RBC units after filtration: implications for transfusion transmission of infections. *Transfusion* 40, 500-506.
131. Roback, J.D., Drew, W.L., Laycock, M.E., Todd, D., Hillyer, C.D., and Busch, M.P. (2003). CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. *Transfusion* 43, 314-321.
132. Roback, J.D., Hillyer, C.D., Drew, W.L., Laycock, M.E., Luka, J., Mocarski, E.S., Slobedman, B., Smith, J.W., Soderberg-Naucler, C., Todd, D.S., *et al.* (2001). Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors. *Transfusion* 41, 1249-1257.
133. Roback, J.D., Su, L., Zimring, J.C., and Hillyer, C.D. (2007). Transfusion-transmitted cytomegalovirus: lessons from a murine model. *Transfus Med Rev* 21, 26-36.
134. Ronghe, M.D., Foot, A.B., Cornish, J.M., Steward, C.G., Carrington, D., Goulden, N., Marks, D.I., and Oakhill, A. (2002). The impact of transfusion of

- leucodepleted platelet concentrates on cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 118, 1124-1127.
135. Ross, S.A., Novak, Z., Pati, S., Patro, R.K., Blumenthal, J., Danthuluri, V.R., Ahmed, A., Michaels, M.G., Sanchez, P.J., Bernstein, D.I., *et al.* (2011). Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 204, 1003-1007.
136. Rubin, R.H. (1990). Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infect Dis* 12 *Suppl* 7, S754-766.
137. Ruell, J., Barnes, C., Mutton, K., Foulkes, B., Chang, J., Cavet, J., Guiver, M., Menasce, L., Dougal, M., and Chopra, R. (2007). Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant* 40, 55-61.
138. Rutherford, R.M., Brutsche, M.H., Kearns, M., Bourke, M., Stevens, F., and Gilmartin, J.J. (2004). HLA-DR2 predicts susceptibility and disease chronicity in Irish sarcoidosis patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 21, 191-198.
139. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science* 230, 1350-1354.
140. Sauntharajah, Y., Nakamura, R., Nam, J.M., Robyn, J., Loberiza, F., Maciejewski, J.P., Simonis, T., Molldrem, J., Young, N.S., and Barrett, A.J. (2002). HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood* 100, 1570-1574.
141. Sayers, M.H. (1994). Transfusion-transmitted viral infections other than hepatitis and human immunodeficiency virus infection. Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, and human parvovirus B19. *Arch Pathol Lab Med* 118, 346-349.
142. Schäfer, P., Tenschert, W., Cremaschi, L., Gutensohn, K., and Laufs, R. (1998). Utility of major leukocyte subpopulations for monitoring secondary cytomegalovirus infections in renal-allograft recipients by PCR. *J Clin Microbiol* 36, 1008-1014.
143. Schrier, R.D., Freeman, W.R., Wiley, C.A., and McCutchan, J.A. (1994). CMV-specific immune responses and HLA phenotypes of AIDS patients who develop

- CMV retinitis. HNRC Group. HIV Neurobehavioral Research Center. *Adv Neuroimmunol* 4, 327-336.
144. Schrier, R.D., Freeman, W.R., Wiley, C.A., and McCutchan, J.A. (1995). Immune predispositions for cytomegalovirus retinitis in AIDS. The HNRC Group. *J Clin Invest* 95, 1741-1746.
145. Sindre, H., Tjoonnfjord, G.E., Rollag, H., Ranneberg-Nilsen, T., Veiby, O.P., Beck, S., Degre, M., and Hestdal, K. (1996). Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88, 4526-4533.
146. Singh, N., Wannstedt, C., Keyes, L., Wagener, M.M., Gayowski, T., and Cacciarelli, T.V. (2005). Indirect outcomes associated with cytomegalovirus (opportunistic infections, hepatitis C virus sequelae, and mortality) in liver-transplant recipients with the use of preemptive therapy for 13 years. *Transplantation* 79, 1428-1434.
147. Slobedman, B., and Mocarski, E.S. (1999). Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol* 73, 4806-4812.
148. Slobedman, B., Mocarski, E.S., Arvin, A.M., Mellins, E.D., and Abendroth, A. (2002). Latent cytomegalovirus down-regulates major histocompatibility complex class II expression on myeloid progenitors. *Blood* 100, 2867-2873.
149. Smith, K.L., Kulski, J.K., Cobain, T., and Dunstan, R.A. (1993). Detection of cytomegalovirus in blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion* 33, 497-503.
150. Smith, M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 424-430.
151. Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N., and Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119-126.
152. Soland, M.A., Keyes, L.R., Bayne, R., Moon, J., Porada, C.D., St Jeor, S., and Almeida-Porada, G. (2014). Perivascular Stromal Cells as a Potential Reservoir of Human Cytomegalovirus. *Am J Transplant*.
153. Stagno, S., and Cloud, G.A. (1994). Working parents: the impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2384-2389.

154. Stagno, S., Pass, R.F., Dworsky, M.E., Henderson, R.E., Moore, E.G., Walton, P.D., and Alford, C.A. (1982). Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med* 306, 945-949.
155. Stagno, S., Pass, R.F., Reynolds, D.W., Moore, M.A., Nahmias, A.J., and Alford, C.A. (1980a). Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 65, 251-257.
156. Stagno, S., Reynolds, D.W., Pass, R.F., and Alford, C.A. (1980b). Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 302, 1073-1076.
157. Stanberry, L.R., Rosenthal, S.L., Mills, L., Succop, P.A., Biro, F.M., Morrow, R.A., and Bernstein, D.I. (2004). Longitudinal risk of herpes simplex virus (HSV) type 1, HSV type 2, and cytomegalovirus infections among young adolescent girls. *Clin Infect Dis* 39, 1433-1438.
158. Stern, M., Passweg, J., Tiercy, J.M., Genitsch, A., Meyer-Monard, S., Heim, D., Tichelli, A., Gratwohl, A., and Nissen-Druey, C. (2006). Human leukocyte antigen DR15 is associated with reduced relapse rate and improved survival after human leukocyte antigen-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 1169-1175.
159. Stocchi, R., Ward, K.N., Fanin, R., Bacarani, M., and Apperley, J.F. (1999). Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* 84, 71-79.
160. Stowell, J.D., Forlin-Passoni, D., Din, E., Radford, K., Brown, D., White, A., Bate, S.L., Dollard, S.C., Bialek, S.R., Cannon, M.J., *et al.* (2012). Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *J Infect Dis* 205, 211-214.
161. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., and Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 72 ( Pt 9), 2059-2064.
162. Thiele, T., Krüger, W., Zimmermann, K., Ittermann, T., Wessel, A., Steinmetz, I., Dolken, G., and Greinacher, A. (2011). Transmission of cytomegalovirus (CMV) infection by leukoreduced blood products not tested for CMV antibodies: a single-center prospective study in high-risk patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (CME). *Transfusion* 51, 2620-2626.

163. Urushibara, N., Kwon, K.W., Takahashi, T.A., and Sekiguchi, S. (1995). Human cytomegalovirus DNA is not detectable with nested double polymerase chain reaction in healthy blood donors. *Vox Sang* 68, 9-14.
164. Vamvakas, E.C. (2005). Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev* 19, 181-199.
165. Varga, M., Rajczy, K., Telkes, G., Hidvegi, M., Peter, A., Rempert, A., Korbonits, M., Fazakas, J., Toronyi, E., Sarvary, E., *et al.* (2008). HLA-DQ3 is a probable risk factor for CMV infection in high-risk kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 23, 2673-2678.
166. Visconti, M.R., Pennington, J., Garner, S.F., Allain, J.P., and Williamson, L.M. (2004). Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR. *Blood* 103, 1137-1139.
167. Wada, K., Mizuno, S., Ohta, H., and Nishiyama, Y. (1997). Immune response to neutralizing epitope on human cytomegalovirus glycoprotein B in Japanese: correlation of serologic response with HLA-type. *Microbiol Immunol* 41, 841-845.
168. Wagner, B., Kropff, B., Kalbacher, H., Britt, W., Sundqvist, V.A., Ostberg, L., and Mach, M. (1992). A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol* 66, 5290-5297.
169. Wang, J.B., Adler, S.P., Hempfling, S., Burke, R.L., Duliege, A.M., Starr, S.E., and Plotkin, S.A. (1996). Mucosal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B occur following both natural infection and immunization with human cytomegalovirus vaccines. *J Infect Dis* 174, 387-392.
170. Weber, B., Nestler, U., Ernst, W., Rabenau, H., Braner, J., Birkenbach, A., Scheuermann, E.H., Schoeppe, W., and Doerr, H.W. (1994). Low correlation of human cytomegalovirus DNA amplification by polymerase chain reaction with cytomegalovirus disease in organ transplant recipients. *J Med Virol* 43, 187-193.
171. Wiertz, E., Hill, A., Tortorella, D., and Ploegh, H. (1997). Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. *Immunol Lett* 57, 213-216.
172. Winston, D.J., Ho, W.G., Howell, C.L., Miller, M.J., Mickey, R., Martin, W.J., Lin, C.H., and Gale, R.P. (1980). Cytomegalovirus infections associated with leukocyte transfusions. *Ann Intern Med* 93, 671-675.

173. Wu, X., He, J., Wu, D., Bao, X., Qiu, Q., Yuan, X., Han, Y., Sun, A., Chen, G., and Xu, Y. (2009). KIR and HLA-Cw genotypes of donor-recipient pairs influence the rate of CMV reactivation following non-T-cell deleted unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol* 84, 776-777.
174. Wu, X.J., Wang, Y., Zhu, Z.L., Xu, Y., He, G.S., Han, Y., Tang, X.W., Fu, Z.Z., Qiu, H.Y., Sun, A.N., *et al.* (2013). [The correlation of cytomegalovirus gB genotype with viral DNA load and treatment time in patients with CMV infection after hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 34, 109-112.
175. Wu, Y., Zou, S., Cable, R., Dorsey, K., Tang, Y., Hapip, C.A., Melmed, R., Trouern-Trend, J., Wang, J.H., Champion, M., *et al.* (2010). Direct assessment of cytomegalovirus transfusion-transmitted risks after universal leukoreduction. *Transfusion* 50, 776-786.
176. Yamada, S., Takatsuka, H., Takemoto, Y., Okamoto, T., Fujimori, Y., Tamura, S., Wada, H., Okada, M., Kanamaru, A., and Kakisita, E. (2000). Association of cytomegalovirus interstitial pneumonitis with HLA-type following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 25, 861-865.
177. Yamashita, Y., Shimokata, K., Mizuno, S., Yamaguchi, H., and Nishiyama, Y. (1993). Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus. *Virology* 193, 727-736.
178. Yeager, A.S., Grumet, F.C., Hafleigh, E.B., Arvin, A.M., Bradley, J.S., and Prober, C.G. (1981). Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* 98, 281-287.
179. Yuen, K.Y., Lo, S.K., Chiu, E.K., Wong, S.S., Lau, Y.L., Liang, R., Chan, T.K., and Ng, M.H. (1995). Monitoring of leukocyte cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by nested PCR. *J Clin Microbiol* 33, 2530-2534.
180. Zanghellini, F., Boppana, S.B., Emery, V.C., Griffiths, P.D., and Pass, R.F. (1999). Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 180, 702-707.
181. Zhang, L.J., Hanff, P., Rutherford, C., Churchill, W.H., and Crumpacker, C.S. (1995). Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis* 171, 1002-1006.
182. Zhuravskaya, T., Maciejewski, J.P., Netski, D.M., Bruening, E., Mackintosh, F.R., and St Jeor, S. (1997). Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after

- infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood* 90, 2482-2491.
183. Ziemann, M., and Hennig, H. (2014). Prevention of Transfusion-Transmitted Cytomegalovirus Infections: Which is the Optimal Strategy? *Transfus Med Hemother* 41, 40-44.
184. Ziemann, M., Krueger, S., Maier, A.B., Unmack, A., Goerg, S., and Hennig, H. (2007). High prevalence of cytomegalovirus DNA in plasma samples of blood donors in connection with seroconversion. *Transfusion* 47, 1972-1983.
185. Ziemann, M., Unmack, A., Steppat, D., Juhl, D., Gorg, S., and Hennig, H. (2010). The natural course of primary cytomegalovirus infection in blood donors. *Vox Sang* 99, 24-33.
186. Zipeto, D., Revello, M.G., Silini, E., Parea, M., Percivalle, E., Zavattoni, M., Milanesi, G., and Gerna, G. (1992). Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 30, 527-530.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD169	Laborstamm des CMV
AIDS	<u>A</u> cquired <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency <u>S</u> yndrome, Erworbenes Immundefektsyndrom
as-primer	<i>antisense-primer</i>
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
CMV	<u>C</u> ytomegalovirus, Cytomegalivirus
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid, Desoxyribunukleinsäure (DNS)
EBV	Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus Typ 4
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
gB	Glykoprotein B des CMV
gH	Glykoprotein H des CMV, UL-75
GvHD	<u>G</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>H</u> ost- <u>D</u> isease
HHV	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus
HHV-1	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>1</u> , Herpes Simplex Virus Typ 1
HHV-2	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>2</u> , Herpes Simplex Virus Typ 2
HHV-3	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>3</u> , Varizella Zoster Virus
HHV-4	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>4</u> , Epstein-Barr-Virus
HHV-5	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>5</u> , Cytomegalovirus
HHV-6	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>6</u> , Humanes B-lymphotropes Virus
HHV-7	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>7</u>
HHV-8	<u>H</u> umanes <u>H</u> erpes <u>v</u> irus Typ <u>8</u> , Kaposisarkom assoziiertes Herpesvirus
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> eucocyte <u>A</u> ntigen, Humanes Leukozytenantigen
HSV	<u>H</u> erpes <u>S</u> implex <u>V</u> irus
HSV-1	<u>H</u> erpes <u>S</u> implex <u>V</u> irus Typ <u>1</u> , Humanes Herpesvirus Typ 1
HSV-2	<u>H</u> erpes <u>S</u> implex <u>V</u> irus Typ <u>2</u> , Humanes Herpesvirus Typ 2
IE	<i>Immediate Early (Gene)</i> , früh exprimiertes CMV-Gen
kDa	<u>K</u> ilo- <u>D</u> alton
KMT	<u>K</u> nochen <u>m</u> ark <u>t</u> ransplantation
Mae III	Restriktionsendonuklease mit der Erkennungssequenz ↓GTNAC
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex, Haupthistokompatibilitätskomplex
OD <sub>260</sub>	<i>Optical Density (260 nm)</i> , Absorption bei 260 nm
OD <sub>280</sub>	<i>Optical Density (280 nm)</i> , Absorption bei 280 nm

PBMCs	<i><u>P</u>eripheral <u>B</u>lood <u>M</u>ononuclear <u>C</u>ells</i>
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction, Polymerase-Kettenreaktion</i>
pp150	Phosphoprotein mit 150 kDa, Tegumentprotein des CMV, UL-32
pp65	Phosphoprotein mit 65 kDa, Tegumentprotein des CMV, UL-83
pp67	Phosphoprotein mit 67 kDa, Tegumentprotein des CMV, UL-65
<i>s-primer</i>	<i><u>s</u>ense-primer</i>
SSP	<i><u>S</u>equence <u>S</u>pecific <u>P</u>rimers, PCR mit sequenzspezifischen primern</i>
Tab.	Tabelle
TEA	<i><u>T</u>ris-<u>E</u>DTA-<u>A</u>cetate-<u>P</u>uffer</i>
U <sub>L</sub>	<i><u>U</u>nique <u>L</u>ong <u>S</u>egment (Teil des CMV-Genoms)</i>
U <sub>S</sub>	<i><u>U</u>nique <u>S</u>hort <u>S</u>egment (Teil des CMV-Genoms)</i>
VZV	<i><u>V</u>arizella <u>Z</u>oster <u>V</u>irus, Humanes Herpesvirus Typ 3</i>

## Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Verwendete HGH-Primer mit Aminosäuresequenz und Angabe der PCR-Produktgröße

**Tab. 2:** Verwendete Primer in der Glykoprotein-B-*nested*-PCR

**Tab. 3:** Anzahl der Basenpaare der PCR-Produkte

**Tab. 4:** Schematische Vierfeldertafel\*

**Tab. 5:** Beispiel Vierfeldertafel für HLA-B7\* in Anlehnung an Tab. 4

**Tab. 6:** Anzahl der Blut- und Thrombozytenspender pro Altersgruppe (Einteilung der Altersgruppen: z.B. 20 - 24 = alle, die ab 1. Januar des beginnenden Jahres bis zum 31. Dezember des letzten Jahres geboren waren) absolut und prozentual, unterteilt in serologisch Anti-CMV-positiv, Anti-CMV-negativ und gesamt

**Tab. 7:** Anzahl der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender pro Altersgruppe (z.B.: 20 - 24 = alle, die ab 1. Januar des beginnenden Jahres bis zum 31. Dezember des letzten Jahres geboren waren), absolut und prozentual unterteilt in serologisch Anti-CMV-positiv, Anti-CMV-negativ und als Gesamtgruppe

**Tab. 8:** Ausschnitt aus der Probentabelle 9; PCR-Ergebnisse zu Abb. 14

**Tab. 9a-f:** Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender

**Tab. 10:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-A-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 11:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 12:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-B-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 13 a-b:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-B-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 14:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DRB1-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 15:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DRB1-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 16:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DQB-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörper-Status

**Tab. 17:** Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender mit bekanntem HLA-DQB-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 18:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 19:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 20:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-B-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 21 a-b:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-A-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 22:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-Cw-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 23:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-Cw-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 24:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DRB1-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 25:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DRB1-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 26:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DQB-Hauptgruppenmerkmal (*broad*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 27:** Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender mit bekanntem HLA-DQB-Untergruppenmerkmal (*split*) und bekanntem serologischen CMV-Antikörperstatus

**Tab. 28:** Allelfrequenzen HLA-A-Allele in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender

**Tab. 29:** Allelfrequenzen HLA-B-Allele in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender

**Tab. 30:** Allelfrequenzen HLA-DRB1-Allele in der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender

**Tab. 31:** Allelfrequenzen HLA-A-Allele in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspenders

**Tab. 32:** Allelfrequenzen HLA-B-Allele in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender

**Tab. 33:** Allelfrequenzen HLA-DRB1 in der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspender

**Tab. 34:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender

**Tab. 35:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten der Blut- und Thrombozytenspender

**Tab. 36a-b:** Tabellarische Übersicht der Studienlage zum CMV-DNA-Nachweis mit PCR bei Blutspendern im Vergleich zum Ergebnis der vorgestellten Arbeit

**Probentabelle A: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender**

**a: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender**

Nr.	Proben-Nr.	DNA-Konz. (ng/ $\mu$ l) vor Verdünnung	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
1	1	405	1,513	+ <sup>1)</sup>	+
2	3	165	1,723	+	+
3	4	165	1,636	+	+
4	5	100	1,951	+	+
5	7	55	1,89	+	+
6	8	410	1,736	+	+
7	9	105	1,602	(+) <sup>2)</sup>	(+)
8	10	165	1,586	(+)	- <sup>3)</sup>
9	12	80	1,974	(+)	-
10	13	70	1,605	+	(+)
11	14	40	1,588	(+)	(+)
12	15	225	2,02	(+)	-
13	16	935	1,597	+	(+)
14	17	220	1,843	+	+
15	18	145	1,538	-	-
16	19	10	1,819	+	+
17	22	45	2,063	+	+
18	23	165	1,833	+	+
19	24	120	1,772	+	+
20	25	585	1,802	+	+
21	26	130	1,764	+	(+)
22	27	290	1,917	+	(+)
23	29	100	1,553	+	+
24	31	295	1,776	(+)	-
25	34	345	1,54	+	(+)
26	37	270	2,088	+	+
27	38	375	1,684	+	+
28	40	355	1,713	-	-
29	42	100	1,586	+	+
30	43	205	1,855	(+)	(+)
31	44	285	1,62	+	+
32	47	550	1,632	-	-
33	48	540	1,73	+	+
34	49	95	1,519	+	+
35	50	175	1,854	+	+
36	51	110	1,936	+	+
37	52	260	1,842	+	+
38	54	200	1,848	+	+
39	55	110	1,564	+	+
40	56	140	1,674	+	+
41	57	80	1,691	+	+
42	59	105	1,737	+	+

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

**b: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender**

Nr.	Proben-Nr.	DNA-Konz. (ng/μl) vor Verdünnung	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
43	60	155	1,531	+	-
44	61	385	1,527	+	+
45	62	190	1,672	+	+
46	65	200	2,085	+	-
47	66	195	1,582	+	-
48	67	215	1,581	-	-
49	68	220	1,536	(+)	+
50	69	160	1,729	+	+
51	70	280	1,528	+	-
52	71	130	1,536	-	+
53	72	585	1,756	+	(+)
54	73	20	2,022	-	-
55	75	500	1,525	(+)	+
56	76	245	1,586	+	(+)
57	77	230	1,571	+	(+)
58	78	150	1,56	+	(+)
59	79	200	1,574	+	+
60	83	15	1,521	+	+
61	86	75	1,713	+	-
62	87	400	1,701	+	+
63	89	75	1,562	+	+
64	91	150	1,792	+	+
65	92	305	1,679	+	+
66	97	195	2,029	-	-
67	101	95	1,506	(+)	+
68	103	200	1,507	(+)	-
69	105	145	1,625	-	-
70	106	130	1,648	+	+
71	107	65	1,621	+	+
72	108	205	1,535	+	+
73	109	145	1,63	+	+
74	111	250	1,538	+	-
75	112	95	1,525	(+)	(+)
76	113	200	1,665	+	(+)
77	114	105	1,592	+	-
78	115	55	2,052	-	-
79	117	90	1,779	(+)	(+)
80	119	70	1,547	(+)	-
81	120	30	2,034	(+)	(+)
82	127	35	1,919	+	(+)
83	128	100	1,521	+	-
84	129	155	1,938	-	-
85	130	100	1,73	-	-
86	131	105	1,697	+	+
87	132	105	1,588	+	+
88	133	235	1,538	+	+
89	134	250	1,566	(+)	+
90	135	290	1,707	(+)	+
91	136	160	1,655	+	+

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

c: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender

Nr.	Proben-Nr.	DNA-Konz. (ng/μl) vor Verdünnung	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
92	137	90	1,511	+	+
93	138	90	1,554	+	+
94	139	220	1,714	+	+
95	140	105	1,703	+	+
96	141	115	1,677	+	+
97	143	100	1,674	+	+
98	144	265	1,664	+	+
99	145	180	1,721	+	+
100	146	220	1,886	+	+
101	147	20	1,801	+	+
102	148	115	1,601	+	+
103	149	170	1,621	+	+
104	150	290	1,752	+	+
105	151	170	1,691	+	+
106	152	165	1,687	+	+
107	153	140	1,661	+	+
108	154	175	1,627	+	+
109	155	115	1,707	+	+
111	156	120	1,707	+	+
112	157	120	1,596	+	+
112	158	190	1,682	+	+
113	159	170	1,633	+	+
114	160	240	1,729	+	+
115	161	100	1,715	+	+
116	162	150	1,692	+	+
117	163	205	1,71	+	+
118	164	230	1,728	+	+
119	165	205	1,65	+	+
120	167	115	1,705	+	+
121	168	80	1,592	+	+
122	170	45	1,531	+	+
123	172	715	1,731	+	+
124	173	70	1,652	+	+
125	174	145	1,748	+	+
126	175	45	1,582	+	+
127	176	40	1,588	+	-
128	178	170	1,542	+	-
129	179	75	1,615	+	+
130	180	130	1,632	+	+
131	181	360	1,597	+	+
132	182	250	2,091	+	+
133	183	355	1,791	+	+
134	184	235	1,654	+	+
135	185	245	1,989	-	-
136	186	215	1,851	+	+
137	187	400	1,809	+	+
138	188	600	1,526	+	+
139	189	165	1,723	+	+

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

**d: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender**

Nr.	Proben-Nr.	DNA-Konz. (ng/µl) vor Verdünnung	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
140	190	500	1,99	+	+
141	191	160	1,53	+	+
142	192	235	1,971	+	+
145	195	165	1,74	-	-
146	196	230	1,609	+	(+)
147	197	225	1,706	(+)	-
148	198	315	1,763	(+)	(+)
149	199	420	1,765	+	+
150	200	265	1,948	+	+
151	201	65	1,543	+	+
152	203	40	1,507	+	+
153	204	430	1,7	+	+
154	205	265	1,537	+	+
155	208	230	1,539	+	+
156	211	220	1,532	+	+
157	213	160	1,505	+	+
158	214	245	1,593	+	+
159	216	220	1,531	+	+
160	220	135	1,918	+	+
161	221	265	1,807	+	+
162	222	375	1,68	+	+
163	223	175	1,639	-	-
164	225	190	1,738	+	+
165	226	215	1,74	+	+
166	227	130	1,644	+	+
167	228	125	1,524	+	+
168	230	155	1,668	+	+
169	231	85	1,704	+	+
170	232	55	1,637	+	+
171	233	25	1,674	+	+
172	234	40	1,575	+	+
173	235	95	1,702	+	+
174	236	215	1,605	+	+
175	237	45	1,533	+	+
176	239	145	1,691	+	+
177	240	125	1,531	+	+
178	241	80	1,585	+	+
179	242	180	1,581	+	+
180	243	165	1,609	+	+
181	244	115	1,663	+	+
182	245	625	1,674	+	+
183	246	590	1,682	+	(+)
184	247	50	1,627	+	+
185	249	305	1,857	+	+
186	250	410	1,729	+	+
187	251	470	1,772	+	+
188	252	460	1,624	-	-

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

e: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender

Nr.	Proben-Nr.	DNA-Konz. (ng/µl) vor Verdünnung	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
189	253	525	1,753	+	+
190	254	285	1,831	+	+
191	255	560	1,579	+	+
192	257	245	1,911	+	+
196	261	450	1,934	+	+
197	262	430	1,836	+	+
198	263	505	1,92	+	+
199	264	635	1,541	+	+
200	268	850	1,749	+	+
201	269	450	1,843	+	+
202	270	405	1,776	+	+
203	271	330	1,762	+	+
204	272	170	1,607	+	+
205	273	490	1,646	+	+
206	274	570	1,694	+	+
207	275	580	1,658	+	+
208	276	150	1,492	+	+
209	277	310	1,615	+	+
210	278	665	1,677	+	+
211	279	610	1,906	+	+
212	280	535	1,658	(+)	-
213	281	370	1,639	+	+
214	282	320	1,622	+	+
215	283	200	1,51	-	-
216	284	590	1,664	+	-
217	285	310	1,64	+	+
218	286	540	1,673	+	+
219	287	420	1,671	+	+
220	289	295	1,605	+	+
221	290	725	1,667	+	(+)
222	291	710	1,623	+	(+)
223	292	350	1,621	(+)	-
224	293	400	1,632	(+)	-
225	294	520	1,71	(+)	-
226	295	655	1,695	-	-
227	296	345	1,599	-	-
228	297	675	1,644	-	-
229	298	425	1,67	+	(+)
230	299	655	1,577	+	(+)
231	301	320	1,6	+	+
232	302	200	1,518	+	+
233	304	375	1,582	+	+
234	305	325	1,557	+	+
235	307	200	1,544	+	+
236	308	280	1,557	+	+
237	309	220	1,537	+	+
238	310	395	1,689	+	+
239	311	65	1,581	+	+

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

f: Ergebnisse der *nested*-PCR mit den Proben der Blut- und Thrombozytenspender

Nr.	Proben-Nr.	DNA-Konz. (ng/μl) vor Verdünnung	Ratio	Ergebnis 1. PCR	Ergebnis 2. PCR
240	312	325	1,923	+	+
241	313	330	1,789	+	(+)
242	314	235	1,769	+	+
245	317	805	1,678	+	+
246	318	405	1,692	-	-
247	319	585	1,711	+	+
248	320	830	1,669	+	+
249	321	725	1,699	+	+
250	322	305	1,677	+	+
251	324	760	1,665	+	+
252	325	625	1,565	+	+
253	326	260	1,67	+	+
254	327	685	1,636	+	+
255	328	900	1,683	+	+
256	329	340	1,632	+	+
257	330	630	1,738	+	+
258	331	140	1,65	+	+
259	332	525	1,729	+	+
260	334	850	1,722	+	+
261	335	60	1,521	+	+
262	336	435	1,651	+	+
263	337	65	1,645	+	+
264	338	100	1,694	+	+
265	340	445	1,671	+	(+)
266	341	475	1,715	+	+
267	342	105	1,689	+	+
268	343	425	1,656	+	+
269	344	355	1,68	+	+
270	345	315	1,907	+	+
271	346	730	1,75	+	+
272	347	140	1,536	+	+
273	348	220	1,681	+	+
274	349	735	1,75	+	+
275	350	190	1,636	+	+
276	351	535	1,715	(+)	(+)
277	352	475	1,688	+	+
278	353	65	1,572	-	-
279	354	350	1,771	-	-
280	355	185	1,714	+	+
281	356	335	1,792	+	+
282	357	250	1,694	+	+
283	358	100	1,73	+	+
284	359	460	1,569	+	+
285	360	480	1,76	+	+
286	361	65	1,62	+	+
287	362	305	1,871	+	(+)
288	364	505	1,64	+	+
289	365	425	1,914	+	+
290	366	610	1,741	+	+

<sup>1)</sup> + PCR-Ergebnis mit deutlicher starker Bande in der Gelelektrophorese

<sup>2)</sup> (+) PCR-Ergebnis mit sichtbarer schwacher Bande in der Gelelektrophorese

<sup>3)</sup> - kein PCR-Ergebnis

## Abbildungsverzeichnis

**Abb.1:** Schematisches Bild eines Virus

**Abb.2:** Bioline HyperLadder II (Fa. Bioline)

**Abb. 3:** Fraktionen der Blutkomponenten nach Zentrifugation: A) Plasma, B) mononukleäre Zellen; *buffy coat*, C) Erythrozyten

**Abb. 4:** Negativ der Fotografie des Gels einer DRB1\*15/16 SSP mit einem Kit von Olerup

**Abb. 5:** Absolute Verteilung der Blut- und Thrombozytenspender auf die Altersgruppen insgesamt und unter Berücksichtigung der CMV-Serologie

**Abb. 6:** Prozentuale Verteilung der Blut- und Thrombozytenspender in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf mit Darstellung der Abweichungen der serologisch CMV-positiven Spender von der Gesamtgruppe. Die Balken zeigen die zunächst negative und im Verlauf positive Abweichung des Anteils der serologisch CMV-positiven Spender anteilig von der Gesamtgruppe der Spender; (graue Balken positive Abweichung/weiße Balken negative Abweichung)

**Abb. 8:** Absolute Verteilung der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender auf die Altersgruppen insgesamt und unter Berücksichtigung der CMV-Serologie

**Abb. 9:** Prozentuale Verteilung der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender in den verschiedenen Altersgruppen im Verlauf mit Darstellung der Abweichungen der serologisch CMV-positiven von der Gesamtgruppe. Die Balken zeigen die zunächst gering positive und im Verlauf negative und wieder positiv werdende Abweichung des Anteils der serologisch CMV-positiven anteilig von der Gesamtgruppe (graue Balken positive Abweichung/weiße Balken negative Abweichung)

Anmerkung: die Altersgruppen < 25 und > 69 Jahre sind aufgrund der kleinen Anteile nicht dargestellt

**Abb. 10:** Negativ der Fotografie des Gels zur nested-PCR mit Probe Nr. 15039 (CMV ca. 1.150.000 Kopien/ml) aus dem „Ringversuch Virusgenom-Nachweis PCR-/NAT-CMV; Polymerase Chain Reaction (PCR) und andere Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) zum Nachweis von Cytomegalievirus; Programm C, Gruppe 365, November 2002“

**Abb. 11:** Negativ der Fotografie des Gels aus einem Vorversuch zur *nested*-PCR mit der internen Kontrolle (HGH)

**Abb. 12:** Negativ der Fotografie des Gels zur *nested*-PCR mit der internen Kontrolle und der Positivkontrolle

**Abb. 13:** Negativ der Fotografie des Gels zur 2. PCR der *nested*-PCR mit Proben 216-240 der Blut-und Thrombozytenspender mit je 100 ng DNA pro PCR-Ansatz

**Abb. 14:** Negativ der Fotografie des Gels zur *nested*-PCR mit Proben 345-366 der Blut-und Thrombozytenspender mit je 300 ng DNA pro PCR-Ansatz

**Abb. 15:** Darstellung der HLA-A-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

**Abb. 16:** Darstellung der HLA-B-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

**Abb. 17:** Darstellung der HLA-DRB1-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der potentiellen Stammzell- und Knochenmarkspender im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

**Abb. 18:** Darstellung der HLA-A-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspenders im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

**Abb. 19:** Darstellung der HLA-A-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspenders im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

**Abb. 20:** Darstellung der HLA-DRB1-Allelfrequenzen der einzelnen Allele aus der Gruppe der Blut- und Thrombozytenspenders im Vergleich zu den Daten *n. Müller* (2001)

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere außer die von mir angegebenen Quellen oder Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Thomas Eiermann danke ich für das Überlassen des Themas dieser  
Dissertationsarbeit.

Herrn Dr. Thomas Binder danke ich für die Betreuung dieses wissenschaftlichen Projektes  
sowie die beständige und tatkräftige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel R. Zander (em.) und Prof. Dr. N. Kröger danke ich für das  
Überlassen von Proben und Daten von Patienten aus der Interdisziplinären Klinik und  
Poliklinik für Stammzelltransplantation.

Den MitarbeiterInnen des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
danke ich für das Sammeln der Blutproben der Blut- und Thrombozytenspender.

Ich danke nicht zuletzt den Laborassistentinnen des HLA-Labors, Frau Dittmer, Frau Alster  
Frau Bendtfeldt, Frau Schwarz, Frau Logan-Schwarz und allen den anderen fleißigen  
Helferinnen für die Unterstützung im Labor.

## **Lebenslauf Julia Marie Wikner, geb. Krizak**

*Nicht zur elektronischen Veröffentlichung freigegeben.*

## Eigene Veröffentlichungen

### *Originalarbeiten*

- 1) Binder TMC, Kelsch R, **Wikner JM**, Aly L, Brendel C, Alster I, Kühnl P, Finckh U, Eiermann TH (2014): A rare ancestral DRB1\*15:01\_DQB1\*02:01 haplotype and a putative crossing over event in the same Caucasian family. In preparation for *Human Immunology*.

### *Veröffentlichte Vorträge und Poster*

- 1) Binder TMC, **Krizak JM**, Brendel C, Finckh U, Kühnl P, Eiermann TH (2003): Evidence for an ancestral recombination between the HLA-DR and HLA-DQ loci. 17<sup>th</sup> European Histocompatibility Conference of the European Federation for Immunogenetics (EFI) / 11. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), 6. bis 10. Mai 2003, Baden-Baden, *Genes and Immunity* **4**, Suppl. 1, Poster 113.
- 2) Binder TMC, **Krizak JM**, Brendel C, Finckh U, Kühnl P, Eiermann TH (2003): Recombination between the HLA-DR and HLA-DQ loci within a family? 17<sup>th</sup> European Histocompatibility Conference of the European Federation for Immunogenetics (EFI) / 11. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), 6. bis 10. Mai 2003, Baden-Baden, *Genes and Immunity* **4**, Suppl. 1, Poster 073.
- 3) Binder TMC, **Krizak JM**, Brendel C, Finckh U, Mosebach M, Kühnl P, Eiermann TH (2003): Evidence for an ancestral recombination and a recent crossing over event between the HLA-DR and HLA-DQ loci in the same family. 29<sup>th</sup> Annual Meeting and Anniversary Celebration of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), October 28 - November 1, 2003, Miami, Florida, USA, *Human Immunology* **64** (Supplement), Poster 212.
- 4) **Krizak JM**, Kühnl P, Eiermann TH, Binder TMC (2008): Association between HLA and (anti) CMV antibody formation in potential stem cell donors. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 21. bis 24. September 2008, Dresden, Deutschland. *International Journal of Medical Microbiology*, Poster IIP20.

### ***Unveröffentlichte Vorträge und Poster***

- 1) Binder TMC & **Krizak JM** (20.09.2003): Familie W. und das HLA-System: Ein neuer HLA-Haplotyp. Vortrag anlässlich der Geburtstagsfeier eines Familienmitglieds der von uns im Rahmen einer Studie untersuchen Großfamilie.
  
- 2) **Krizak JM**, Kühnl P, Eiermann TH, Binder TMC (2006): HLA-DRB1-Typisierung und HCMV-Diagnostik bei gesunden Blutspendern. 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), 12. bis 14. Oktober 2006, Innsbruck, Österreich, Poster P25.
  
- 3) **Krizak JM**, Kühnl P, Eiermann TH, Binder TMC (2007): Assoziation zwischen HLA-Klasse I-Typ und (Anti-)HCMV-Antikörper-Bildung bei gesunden potenziellen Stammzellspendern. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), 18. bis 20. Oktober 2007, München, Deutschland, Vortrag A6.
  
- 4) Binder TMC & **Krizak JM** (2008): HLA - A potential risk factor for Cytomegalovirus infection in solid organ and stem cell recipients? (*HLA - Ein möglicher Risikofaktor für Cytomegalievirus-Infektionen bei Organ- und Stammzell-Empfängern?*) Erstes wissenschaftliches Symposium des Transplantations-Centers des UKE: *Basic Science in Transplantation*, am 14. und 15.11.2008, Prof. Dr. med. Nashan & Prof. Dr. med. Thaiss, Vortrag.