

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PRÄVALENZ VON PARVOVIRUS B19 UND APLASTISCHER ANÄMIE IM
FRÜHEN INTERVALL NACH ORGANTRANSPLANTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Würdinger

2017

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PRÄVALENZ VON PARVOVIRUS B19 UND APLASTISCHER ANÄMIE IM
FRÜHEN INTERVALL NACH ORGANTRANSPLANTATION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Würdinger

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Annelie Plentz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt
Tag der mündlichen Prüfung:	23.08.2017

*Meinen Eltern und
Großeltern*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	7
1.1 Parvovirus B19	7
1.1.1 Geschichte	7
1.1.2 Taxonomie.....	7
1.1.3 Molekularbiologie	8
1.1.4 Zielzellen und viraler Lebenszyklus	8
1.1.5 Krankheitsbilder	9
1.1.6 Übertragung, Infektionsverlauf und Persistenz im Organismus	12
1.1.7 Epidemiologie	13
1.1.8 Diagnostik	14
1.1.9 Therapie und Prophylaxe	14
1.2 Organtransplantation	15
1.2.1 Historische Entwicklung der Organtransplantation	15
1.2.2 Epidemiologie	17
1.2.3 Indikationen zur Transplantation	17
1.2.4 Immunologie, Abstoßung und Immunsuppression	18
1.2.5 Opportunistische Infektionen und andere Langzeitfolgen	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Patienten, Material und Methoden.....	26
2.1 Patienten	26
2.2 Material	26
2.2.1 Blutproben und Negativplasmen.....	26
2.2.2 Primer, Sonden und Plasmide	28
2.2.3 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterial	30

2.2.4	Geräte	31
2.2.5	Software	31
2.3	Methoden	32
2.3.1	Nukleinsäure-Isolierung	32
2.3.2	Real-time qPCR	33
2.3.3	ELISA	38
2.3.4	Western Blot.....	40
2.3.5	Datenbankanalyse	42
2.3.6	Aktenanalyse	43
2.3.7	Statistische Datenanalyse	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Untere Nachweisgrenze für B19V/gt1 im B19V-PCR-Assay	45
3.2	Parvovirus B19 bei adulten Organtransplantationen.....	46
3.2.1	Patientenkollektiv	46
3.2.2	Charakteristik der Proben.....	47
3.2.3	DNA-Prävalenz	48
3.2.4	Serostatus	52
3.2.5	Korrelation von DNAämie und Surrogatmarkern der aplastischen Anämie	53
3.3	Parvovirus B19 bei pädiatrischen Lebertransplantationen.....	56
3.3.1	Patientenkollektiv	56
3.3.2	Charakteristik der Proben.....	58
3.3.3	DNA-Prävalenz	59
3.3.4	Serostatus	61
3.3.5	Korrelation von DNAämie und Donor-Art.....	62
3.3.6	Korrelation von DNAämie und Immunsuppression	63

3.3.7	Korrelation von DNAämie und Surrogatmarkern der aplastischen Anämie	65
3.3.8	Klinik bei Fällen mit DNAämie	66
3.4	Gegenüberstellung der Kollektive: Erwachsene und Kinder	67
3.4.1	Vergleich der DNA-Prävalenz	67
3.4.2	Vergleich der Prävalenz aplastischer Anämien.....	68
4	Diskussion.....	70
4.1	Patientenkollektiv	70
4.2	DNA-Prävalenz	71
4.3	Serostatus.....	73
4.4	Einfluss der Immunsuppression auf Parvovirus B19-Infektionen bei den Kindern.....	74
4.5	Klinische Folgen einer Parvovirus B19-Infektion.....	75
4.6	Infektionsverlauf	77
	Zusammenfassung.....	80
	Abkürzungsverzeichnis.....	82
	Literaturverzeichnis	84
	Publikationen	92

1 Einleitung

1.1 Parvovirus B19

1.1.1 Geschichte

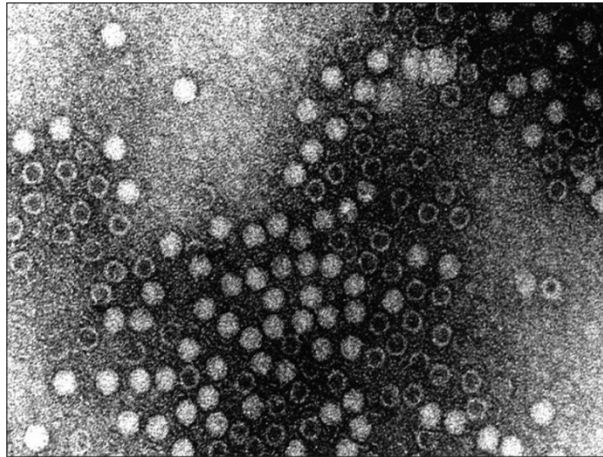
Parvovirus B19 wurde 1974 von Yvonne Cossart in London entdeckt. Sie stellte damals bei der Analyse eines Assays für Hepatitis B eine ungewöhnliche Reaktion im Serum eines Blutspenders fest (welches Position 19 in Platte B besetzte). Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Antigen-Antikörper-Präzipitationslinie erkannte sie Partikel, die sie als Parvovirus-ähnlich beschrieb. Mit denselben Methoden fand sie bei einem großen Teil gesunder Erwachsener Anti-B19V-Antikörper, was auf eine häufige, bereits in der Kindheit auftretende Infektion hinwies [2]. Eine erste Krankheit konnte schließlich 1981 durch John Pattison et al. mit dem Virus in Verbindung gebracht werden, als sie Anti-B19V-Antikörper oder das Virus selbst in Blutproben an Sichelzellanämie leidender Kinder mit transienter aplastischer Krise nachwies [3]. Drei Jahre später wurde der kausale Zusammenhang des Virus mit der häufigsten durch B19V verursachten Krankheit, dem Erythema infectiosum („Ringelröteln“), bei Ausbrüchen im Vereinigten Königreich erkannt [4]. Im Verlauf der darauffolgenden Jahre konnten weitere Erkrankungen dem Virus zugeordnet werden (siehe Tabelle 1). Inzwischen wurden drei humanpathogene Genotypen differenziert [1].

1.1.2 Taxonomie

Die Familie der Parvoviridae beinhaltet viele tierpathogene Viren, darunter das feline Panleukopenie-Virus, das canine Parvovirus, das Aleutian Mink Disease Virus und das porcine Parvovirus. Ebenfalls in diese Familie gehören adenoassoziierte Viren, welche auf eine Koinfektion mit Adeno- oder Herpesviren angewiesen sind. Sie scheinen den Menschen ohne klinische Manifestationen zu infizieren. Parvovirus B19 gehört zur Gattung der Erythroviren, die ebenfalls die ähnlichen simianen Viren enthält. Alle Vertreter dieser Gattung vermehren sich vorzugsweise in erythroiden Progenitorzellen [5].

1.1.3 Molekularbiologie

Parvoviren sind durch ihre Größe definiert: sie bestehen aus kleinen ikosaedrischen Kapsiden von etwa 25nm Durchmesser, die als Genom einzelsträngige DNA (entweder Plus- oder Minusstrang) enthalten. Abbildung 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von B19V-Partikeln und leeren Kapsiden. Das Genom umfasst fast 5600 Nukleotide. Die Replikation des Virus läuft über eine Zwischenstufe



20 nm × 200,000
Abbildung 1 Immunelektronenmikroskopische Aufnahme von B19V-Partikeln [1]

mit Doppelstrang-DNA ab. Das Virusgenom kodiert lediglich drei Proteine mit bekannter Funktion: die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 und das Nichtstrukturprotein NS1. VP1 und VP2, je 84 kD bzw. 58 kD groß, entstehen durch alternatives Splicing. VP1 unterscheidet sich von VP2 durch zusätzliche 226 Aminosäuren am Amino-Ende des Proteins. Das Virus-Kapsid mit 60 Kapsomeren enthält hauptsächlich VP2, VP1 kommt lediglich zu 5% vor. Die VP1-spezifische Region dieses Proteins liegt an der Kapsidoberfläche und enthält zahlreiche Epitope, die vom Immunsystem als Antigene erkannt werden. NS1 ist ein 77 kD großes Protein und notwendig für die Replikation. Es wirkt auf die Wirtszellen zytotoxisch. Das Fehlen einer Lipidhülle macht das Virus weitgehend resistent gegenüber Hitze und Lösungsmitteln [5].

1.1.4 Zielzellen und viraler Lebenszyklus

B19V zeigt einen ausgeprägten Tropismus für humane erythropoetische Vorläuferzellen, die die einzigen Wirtszellen des Virus darstellen. Verantwortlich für diesen Tropismus ist das neutrale Glykolipid Globosid (erythrozytäres P-Antigen), ein Zellrezeptor, der v.a. auf der Oberfläche von Erythrozyten und Erythrozytenvorläuferzellen, jedoch auch auf Megakaryozyten, Endothelzellen, Plazenta und fetalem Myokard zu finden ist [5]. Menschen mit der seltenen Blutgruppe p fehlt das P-Antigen auf der Erythrozytenoberfläche, sie sind daher resistent gegen B19V [6].

Nach Bindung an das P-Antigen folgt die Penetration und das Uncoating des Virus, die Translokation der DNA in den Zellkern, die DNA-Replikation und Transkription und schließlich die Zusammensetzung neuer Kapside, welche das Genom beinhalten. Für die Freisetzung der Viren durch Zelllyse ist das zytotoxische NS1-Protein verantwortlich. Mikroskopisch zeigt sich eine Infektion durch B19V durch das Auftreten von Riesen-Pronormoblasten [7] (siehe Abbildung 2B).

1.1.5 Krankheitsbilder

Obwohl immer wieder ein Zusammenhang zwischen B19V-Infektionen und zahlreichen Erkrankungen wie Myokarditis, Hepatitis oder Autoimmunerkrankungen angenommen wird, konnte hierfür bisher kein abschließender

Tabelle 1 Erkrankungen durch Parvovirus B19 nach [1].

Erkrankung	akut oder chronisch	Wirt
Erythema infectiosum	akut	gesunde Kinder
Arthropathie	akut/chronisch	gesunde Erwachsene
Transiente aplastische Krise	akut	Patienten mit erhöhter Erythropoese
Persistente Anämie	chronisch	immunkompromittierte Patienten
Hydrops fetalis und kongenitale Anämie	akut/chronisch	Fetus

Beweis erbracht werden [5]. Einen Überblick über die fünf Krankheitsbilder, die erwiesenermaßen durch Parvovirus B19 ausgelöst werden, gibt Tabelle 1. Bei immunkompetenten Individuen verläuft eine akute B19V-Infektion gewöhnlich mild und ist assoziiert mit einer transienten Anämie, einem Erythema infectiosum („Ringelröteln“, engl. „fifth disease“) und Arthritis. Die meisten Infektionen sind jedoch asymptomatisch [5].

Erythema infectiosum („Ringelröteln“, engl. „fifth disease“)

Die häufigste Manifestationsform einer B19V-Infektion ist das Erythema infectiosum, eine exanthematöse Kinderkrankheit. Charakteristisch ist ein „slapped cheek“-Exanthem (deutsch „Ohrfeige“), das in Abbildung 2 A zu sehen ist. Es beginnt an den Wangen, eine periorale Blässe ist dabei typisch. In den Folgetagen kommt typischerweise ein retikuläres, kokadenförmiges Exanthem am Stamm und den proximalen Extremitäten hinzu [7]. Bereits 1985 untersuchten Anderson et al. den Verlauf einer B19V-Infektion im experimentellen Setting. Dabei führte eine intranasale Inokulation bei gesunden Freiwilligen zum Auftreten eines Erythema infectiosum. Fieber und unspezifische grippeähnliche Symptome traten

bereits früh in der Phase der B19V-Virämie auf. Die Effloreszenzen und Arthropathie zeigten sich erst ca. zwei Wochen nach Infektion und standen in zeitlichem Zusammenhang mit der Bildung von Anti-B19V-Antikörpern. Vermutlich entstehen die Symptome durch Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen in der Haut und anderen Geweben. Serologisch zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine Serokonversion [8] (siehe Abbildung 3). Das Exanthem kann bei Erwachsenen weniger charakteristisch in Erscheinung treten [5].

Arthropathie

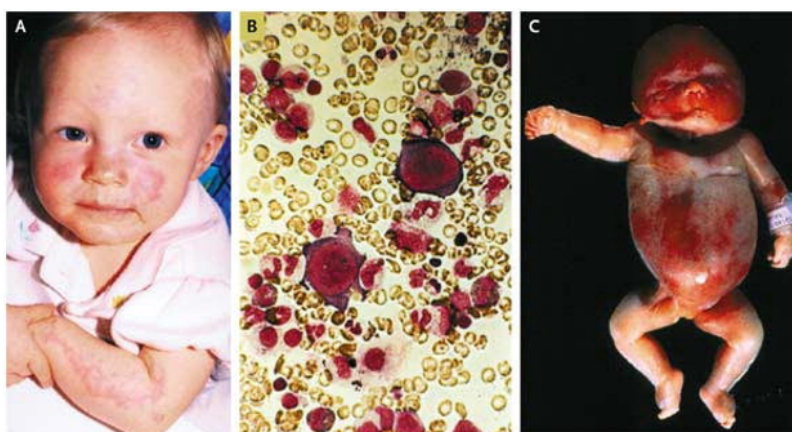


Abbildung 2 Klinische Manifestationen einer B19V-Infektion [1].
 A Erythema infectiosum B Knochenmarksausstrich bei transientser aplastischer Anämie mit Riesenzellen (Pronormoblasten) C Hydrops fetalis.

Im Gegensatz zum milden Verlauf bei Kindern in Form des Erythema infectiosum kann eine B19V-Infektion bei Erwachsenen, insbesondere bei Frauen mittleren Alters, zu einer klinisch signifikanten Arthropathie führen.

Dabei kommt es bei der Hälfte der Patienten nicht nur zu einer Arthralgie, sondern auch zu einer Arthritis [5,7]. Fast 15% neu auftretender Arthritiden können die Folge einer B19V-Infektion sein [9,10]. Eine symmetrische Beteiligung der kleinen Fingergelenke und gelegentlich auch der Knie-, Sprung- und Handgelenke kann den Verdacht auf eine Rheumatoide Arthritis (RA) lenken, zumal der Rheumafaktor positiv ausfallen kann. Dennoch dauert die Arthropathie selten länger als einige Wochen an und selbst über Monate und Jahre persistierende Symptome gehen nie mit einer Gelenkdestruktion einher. Es wird angenommen, dass die Pathogenese wie beim Erythema infectiosum auf der Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen beruht [5,7]. Es gibt keinen Nachweis für den Einfluss von B19V auf RA. Bei Patienten mit RA finden sich weder häufiger Anti-B19V-Antikörper noch schreitet eine B19V-Arthropathie zu einer RA voran. Zudem findet sich B19V ähnlich häufig in der Synovialis an RA erkrankter Patienten und gesunder Individuen [11–14].

Hydrops fetalis

Eine B19V-Erstinfektion während der Schwangerschaft mit anschließender transplazentärer Übertragung kann zum Abort oder Hydrops fetalis führen [15] (siehe Abbildung 2C). B19V infiziert in der frühen fetalen Entwicklung die Leber, wo die fetale Erythropoese stattfindet. Der Hydrops entsteht durch die folgende schwere Anämie und möglicherweise eine Myokarditis, die beide eine Herzinsuffizienz zur Folge haben [16]. Etwa 28% der Schwangeren sind seronegativ für Anti-B19V-IgG und damit empfänglich für eine B19V-Infektion [17]. Die meisten B19V-Infektionen während der Schwangerschaft führen jedoch nicht zum Abort. Im Fall einer maternalen Erstinfektion kommt es bei 33-51% der Fälle zu einer transplazentären Übertragung, das Risiko von fetalen Komplikationen beträgt dabei ca. 10% [18,19]. Eine Infektion während des zweiten Trimenons birgt das größte Risiko für einen Hydrops fetalis. B19V ist möglicherweise für 10-20% aller Fälle eines nichtimmunen Hydrops fetalis verantwortlich [20]. Für ca. 8% der intrauterinen Fruchttode wurden in einer Untersuchung aus dem Jahr 2000 B19V-Infektionen verantwortlich gemacht [21].

Transiente Aplastische Krise

Patienten mit hämolytischen Erkrankungen sind auf eine gesteigerte Produktion von Erythrozyten angewiesen. Eine akute B19V-Infektion kann jedoch zum Sistieren der Erythropoese führen, wodurch sich eine schwere Anämie bei diesen Patienten entwickeln kann [5]. Vermutlich ist die Erythropoese bei allen B19V-Infektionen vorübergehend unterdrückt – auch bei gesunden Probanden ist eine Retikulozytopenie nachweisbar – jedoch bleiben die Hämoglobinspiegel bei Gesunden wegen der langen Lebensdauer der Erythrozyten stabil [8]. Bei den bekannten Episoden anämischer Krisen bei hereditärer Sphärozytose und Sichelzellanämie ging man aufgrund des oft zeitgleichen Befalls mehrerer Personen in Familien früh von einer infektiösen Genese aus. Bei der Untersuchung von Seren einer jamaikanischen Kohorte mit Sichelzellanämie waren praktisch alle Fälle transientser aplastischer Krisen assoziiert mit einer kürzlichen B19V-Infektion [22,23]. Im Gegensatz zum Erythema infectiosum, welches erst mit der Bildung von Anti-B19V-Antikörpern auftritt, besteht beim Auftreten der transienten aplastischen Anämie zunächst nur eine Virämie. Mit Bildung von Anti-B19V-Antikörpern, die zur Neutralisation der Viren führen, erholt sich die Erythropoese wieder. Aufgrund der entstehenden lebenslangen Immunität gegen B19V ist auch die transiente aplastische Krise eine einmalig im Leben auftretende Erkrankung von Patienten mit chronisch-hämolytischen Grunderkrankungen. Auch wenn die Anämie selbstlimitierend verläuft, kann sie doch schwere Folgen wie

Herzinsuffizienz, zerebrovaskuläre Ereignisse und eine akute Sequestration der Milz nach sich ziehen [5]. Bei Patienten mit transientser aplastischer Krise finden sich im Knochenmarksausstrich (siehe Abbildung 2B) die für die Erkrankung pathognomonischen Riesen-Pronormoblasten, die durch den zytopathischen Effekt des Virus entstehen. Gleichzeitig fehlen reife Erythrozytenvorläuferzellen [7]. Auch die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen können während der aplastischen Krise abfallen [24]. Es gibt auch Berichte über das Auftreten von Thrombozytopenien und Panzytopenien bei gesunden Patienten mit akuter B19V-Infektion [25,26].

Persistierende Anämie

Im Gegensatz zu gesunden Individuen kann eine akute B19V-Infektion bei immunkompromittierten Patienten mit schweren Symptomen assoziiert sein. Durch das Fehlen neutralisierender Antikörper kann B19V dauerhaft persistieren und oft entwickelt sich eine Virämie mit sehr hohen Viruslasten mit $>10^{12}$ geq/ml. Ein Erythema infectiosum bleibt aufgrund meist fehlender Anti-B19V-Antikörper und damit nicht vorhandener Immunkomplexe aus. Als Folge der persistierenden B19V-Infektion kann sich eine PRCA (pure red-cell aplasia, Aplasie der roten Zellreihe) mit schwerer, transfusionsbedürftiger, chronischer Anämie entwickeln. Dabei fehlen Retikulozyten im peripheren Blut und es finden sich Riesen-Pronormoblasten im Knochenmark [5]. Die Immundefizienz, die zum Persistieren von B19V führt, kann kongenitaler [27], iatrogen oder infektiöser Ursache sein. In diesem Zusammenhang sind etliche Berichte über eine chronische Anämie bei Chemotherapie oder therapeutischer Immunsuppression nach Organtransplantation publiziert [28–32]. Des Weiteren wurde das Auftreten einer PRCA bei AIDS beschrieben [33,34].

1.1.6 Übertragung, Infektionsverlauf und Persistenz im Organismus

Die Transmission von B19V erfolgt in der Regel durch Tröpfchen- und Kontaktinfektion oder vertikal von der Mutter auf den Fetus, aber auch iatrogen über Blutprodukte [7] oder Gewebe transplanteder Organe [35–44].

Die Immunantwort auf eine B19V-Infektion besteht hauptsächlich aus der Produktion von Antikörpern. Zehn bis zwölf Tage nach Infektion kommt es zur Produktion von Anti-B19V-

IgM, welche gegen VP2 gerichtet sind und gewöhnlich für drei Monate persistieren. Etwa zwei Wochen nach Infektion treten zudem Anti-B19V-IgG auf, welche vorrangig gegen VP1 gerichtet - und somit neutralisierend - sind und lebenslang persistieren. Zu den typischen Hauteffloreszenzen und Arthralgien kommt es erst mit dem Auftreten von Antikörpern im Blut – pathophysiologisch handelt es sich hierbei um Immunkomplexablagerungen [7]. Den normalen Verlauf der Immunreaktion auf eine akute Infektion gesunder Personen zeigt Abbildung 3. Eine persistierende B19V-Infektion ist auf eine fehlerhafte Antikörperproduktion zurückzuführen und geht mit einem Fehlen bzw. niedrigen Titern nicht-neutralisierender Anti-B19V-IgM oder –IgG einher. Die neutralisierenden Antikörper richten sich gegen das aminoternale Ende von VP1. VP2 löst keine effektive Immunantwort aus [5].

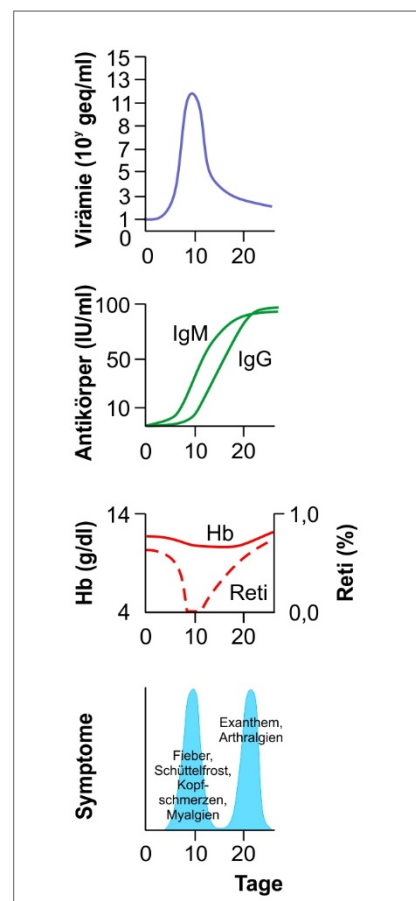


Abbildung 3 Verlauf einer akuten B19V-Infektion nach [1].

Es wurde gezeigt, dass nach einer akuten B19V-Infektion das Virus in Knochenmark [35], Myokard [35–37], Leber [38,39], Niere [40] und anderen Geweben [39,41–44] persistiert.

1.1.7 Epidemiologie

Die B19V-Infektion ist eine weltweit auftretende Virusinfektion, erkennbar an ähnlichen Anti-B19V-Antikörper-Titern in den USA, Europa und Asien. Lediglich einige isoliert lebende Volksstämme sind dem Virus nicht ausgesetzt [5].

Die Infektion findet üblicherweise in der Kindheit statt. Entsprechend steigt die Prävalenz von Anti-B19V-IgG mit dem Lebensalter und beträgt 2-15% bei Ein- bis Fünfjährigen, 15-60% bei Sechs- bis 19-Jährigen, 30-60% bei Erwachsenen und mehr als 85% im Senium [7]. Dies deckt sich weitgehend mit Zahlen aus Deutschland, welche zudem eine signifikant höhere Prävalenz bei Frauen, insbesondere in der Altersgruppe über 30 Jahren zeigten [17]. Etwa 28% aller Schwangeren sind seronegativ für Anti-B19V-IgG [17].

Die höchste Inzidenz von Neuinfektionen findet sich im Frühling. Kleinere Epidemien treten alle vier Jahre auf. Bei schwangeren Frauen wurde gezeigt, dass das Risiko für eine Infektion in Epidemie-Jahren von 1-2% auf >10% steigt [45] und mit dem Ausmaß des Kontakts zu Kindern korreliert [46].

1.1.8 Diagnostik

In der Diagnostik einer B19V-Infektion werden serologische Tests sowie der direkte DNA-Nachweis mittels PCR eingesetzt.

Serologische Nachweisverfahren sind der ELISA und der Western Blot, von denen B19V-Kits kommerziell erhältlich sind. IgM-Antikörper zeigen sich in den meisten Fällen mit dem klinischen Auftreten eines Erythema infectiosum und einige Tage nach Beginn einer transienten aplastischen Krise. Die IgM-Antikörper persistieren nach einer akuten Infektion für ca. drei Monate. IgG-Antikörper treten erst nach ca. zwei Wochen auf, sind lebenslang nachweisbar und bei einem Großteil der Bevölkerung vorhanden. Sie spielen daher keine Rolle in der Diagnostik einer akuten Infektion [5,7].

Die PCR ist insbesondere für die Diagnostik einer chronischen Infektion notwendig, da die Immunglobulinproduktion bei Immunsuppression nicht vorhanden oder minimal ist. Des Weiteren kann B19V-DNA bereits im frühen Verlauf einer transienten aplastischen Krise im Serum gefunden werden. Der Vorteil der PCR ist die hohe Sensitivität [5,7]. Bei der Interpretation der PCR-Ergebnisse hilft die quantitative Messung, da eine niedrige Virämie auch bei gesunden Individuen nach einer akuten Infektion über Monate bis Jahre bestehen kann [47,48].

1.1.9 Therapie und Prophylaxe

Die meisten Fälle von B19V-Infektionen bedürfen keiner spezifischen Therapie. Eine PRCA und die dabei zugrunde liegende persistierende B19V-Infektion kann auf eine Unterbrechung der therapeutischen Immunsuppression oder bei AIDS-Patienten auf den Beginn einer HAART-Therapie ansprechen und häufig mit einer fünf- bis zehntägigen Therapie mit hochdosierten intravenösen Immunglobulinen (IVIG) geheilt werden. Rezidivierende Anämien können wiederholte IVIG-Gaben erforderlich machen. Die IVIG-Therapie kann dabei ein Erythema infectiosum bzw. eine Arthropathie herbeiführen, da diese durch Immunkomplexe verursacht sind. Chronische Arthropathien werden

symptomatisch mit nicht-steroidalen Antiinflammativa behandelt [5]. Ein Hydrops fetalis kann sich spontan zurückbilden, wird jedoch in schweren Fällen mit intrauterinen Bluttransfusionen therapiert [45].

Derzeit gibt es keine spezifischen prophylaktischen Maßnahmen zur Vermeidung einer Infektion. Für seronegative schwangere Frauen stellen eigene kleine Kinder das höchste Infektionsrisiko dar. Ein generelles Beschäftigungsverbot für seronegative schwangere Frauen in Berufen mit hoher Exposition zu Kindern wie Kindergärtnerinnen scheint bei nur geringgradig höherem Risiko einer Infektion aktuell in Deutschland nicht gerechtfertigt [49]. Eine aktive Impfung gegen B19V ist nach wie vor nicht verfügbar. Allerdings gab es Bestrebungen in der Entwicklung einer solchen, bei denen zwischenzeitlich bereits bei gesunden Freiwilligen eine Immunantwort mit Bildung neutralisierender Antikörper verzeichnet werden konnte [50,51].

1.2 Organtransplantation

1.2.1 Historische Entwicklung der Organtransplantation

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Versuche von Auto- und Allotransplantationen von Nieren bei Hunden durchgeführt und damit bereits die chirurgisch-technischen Grundlagen der Transplantationschirurgie gelegt. Die erste Autotransplantation führte 1902 der österreichische Chirurg Emmerich Ullmann bei einem Hund durch [52]. Das gleiche gelang noch im selben Jahr dem Franzosen Alexis Carrel, welcher in den Folgejahren auch Allotransplantationen an Hunden durchführte [53,54]. Er erkannte bereits die Abstoßungsreaktion des Empfängers als das Hauptproblem der Transplantationsmedizin [55]. 1936 erfolgte die erste menschliche Nieren-Allotransplantation durch den Ukrainer Juri Voronoy, jedoch überlebte der Empfänger nur zwei Tage und die Niere nahm keine Funktion auf [56].

1954 gelang schließlich die erste langfristig erfolgreiche Nierentransplantation zwischen zwei eineiigen Zwillingen, den Herrick-Brüdern, durch Joseph Murray am Peter Bent Bingham Hospital in Boston [57]. Dort gelangen Ende der 1950er erstmalig Nierentransplantationen zwischen nicht genetisch identischen Personen durch den Einsatz von Ganzkörperbestrahlung, jedoch waren die Nebenwirkungen sehr schwerwiegend [58]. 1960 erfolgte die erste erfolgreiche Nierentransplantation unter pharmakologischer

Immunsuppression, in diesem Fall mit Methotrexat und Cyclophosphamid [59]. In den 1960er Jahren entwickelte sich die Nierentransplantation maßgeblich durch die Arbeiten von Thomas Starzl, welcher die Anwendung von Immunsuppressiva-Kombinationen, insbesondere Prednison und Azathioprin, etablierte, zunehmend zu einer Routinetherapie der terminalen Niereninsuffizienz [60,61].

Diese Erfolge öffneten den Weg für die Transplantation anderer Organe. So erfolgte 1963 die erste Lebertransplantation durch Thomas Starzl, jedoch verstarb der Patient noch intraoperativ aufgrund des hohen Blutverlustes [62]. 1967 gelang Christiaan Barnard die erste Herztransplantation in Kapstadt bei einem Patienten mit Kardiomyopathie, welcher danach 18 Tage überlebte [63].

Ein großer Durchbruch in der Transplantationsmedizin gelang Anfang der 1970er Jahre Jean-François Borel und Hartmann Stähelin durch die Entdeckung von Ciclosporin bei der Firma Sandoz in Basel [64]. Unter Verwendung von Ciclosporin in den Immunsuppressionsregimen kam es zu einem deutlichen Sprung im Transplantat- und Empfängerüberleben auf ein 1-Jahres-Transplantatüberleben von 89% bei Nierentransplantation und 70% bei Herz- und Lebertransplantation [65–67]. In der Zwischenzeit finden zunehmend neuere Immunsuppressiva Anwendung in der Transplantationsmedizin, darunter v.a. der im Vergleich zu Ciclosporin potentere Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus, der Antimetabolit Mycophenolat Mofetil, die mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus und zur Induktion Antikörper wie der Anti-Thymozyten-Antikörper Thymoglobulin und der Interleukin 2-Rezeptor-Antikörper Basiliximab.

Inzwischen sind Nieren-, Leber- und Herztransplantationen eine etablierte Therapie. Der chirurgische Fortschritt und die Entwicklung moderner Immunsuppressiva rückt andere Probleme in den Vordergrund, darunter die Langzeitfolgen der Immunsuppression wie opportunistische Infektionen, ein Großteil davon viral bedingt, und die Entwicklung von Malignomen. Ein weiteres Problem der Transplantationsmedizin stellt aktuell der Mangel an Spenderorganen dar. Beispielsweise fand sich im Jahr 2014 in Deutschland für weniger als 10% der Patienten auf der Warteliste ein Spenderorgan [68]. Dieser Tatsache begegnete man mit der Ausweitung der Spenderkriterien bei der Leichenspende wie der Verwendung von DCD (donation after cardiac death) [69]- und ECD (expanded criteria donor) [70,71]-Organen, welche durch die Fortschritte in der Transplantation möglich wurde, mit der Etablierung AB0-inkompatibler Lebendspenden [72,73] und bei der Lebertransplantation

mit der Entwicklung neuer Operationstechniken wie der Leberlebendspende [74] und der Splitleber-Transplantation [75].

1.2.2 Epidemiologie

In Deutschland wurden im Jahr 2014 insgesamt 3851 Organe transplantiert, davon 2128 Nierentransplantationen, 941 Lebertransplantationen und 304 Herztransplantationen. 82% der Organtransplantationen erfolgten nach postmortaler Spende, 18% nach Lebendspende [68]. Die Zahlen aus den USA sind vergleichbar. Dort fanden im selben Jahr 29,532 Transplantationen bei Erwachsenen statt, davon 17,814 Nierentransplantationen, 6729 Lebertransplantationen und 2679 Herztransplantationen – zudem 478 Lebertransplantationen bei Kindern [76–78].

Ein grundlegendes Problem der Transplantationsmedizin ist der Mangel an Spenderorganen. In Deutschland ist die Gesamtzahl der Organspender in den letzten fünf Jahren deutlich zurückgegangen. (1217 Spender im Jahr 2009 gegenüber 864 Spendern im Jahr 2014). Insgesamt 10.582 Menschen standen zum Stichtag am 31.12.2014 in Deutschland auf der Warteliste für ein Spenderorgan, davon wartete der Großteil auf eine Nierenspende [68].

1.2.3 Indikationen zur Transplantation

Im Jahr 2014 erfolgten die meisten Herztransplantationen in den USA aufgrund einer chronischen Herzinsuffizienz bei Kardiomyopathien, gefolgt von koronarer Herzerkrankung, kongenitalen Herzerkrankungen und valvulären Herzkrankheiten [77], was mit den Zahlen aus Deutschland identisch ist [68].

Lebertransplantationen wurden in den USA vorrangig aufgrund eines chronischen Leberversagens bei Zirrhose aufgrund einer chronischen Hepatitis C-Infektion, gefolgt von der äthyltoxischen Leberzirrhose, biliärer Zirrhose und Malignomen wie dem hepatozellulären Karzinom und dem intrahepatischen cholangiozellulären Karzinom. In weniger als 2% der Fälle war die Ursache ein akutes Leberversagen [78]. Ähnliche Zahlen finden sich auch in Deutschland [68]. Die Indikationen für eine Kinderlebertransplantation unterscheiden sich davon deutlich. Für fast die Hälfte der Lebertransplantationen bei Kindern waren cholestatische Erkrankungen – dabei in den meisten Fällen die extrahepatische Gallengangsatresie - die Ursache, deutlich seltener mit jeweils ca. 10% Malignome und akutes Leberversagen [78]. Entsprechend erfolgten in den letzten Jahren

etwa 1/4 der Transplantationen bei Kindern unter einem Jahr, insgesamt 2/3 bei Kindern unter sechs Jahren [79].

Nierentransplantierte Patienten litten am häufigsten an diabetischer Nephropathie, hypertensiver Nephropathie, Glomerulonephritis und polyzystischer Nierenerkrankung [68,76].

1.2.4 Immunologie, Abstoßung und Immunsuppression

Bereits seit Beginn der Organtransplantation erkannte man die Problematik der Abstoßung bei Allotransplantationen. 1958 entdeckte der Franzose Jean Dausset das erste humane Leukozyten-Antigen (HLA) und damit die Grundlage der Immunfunktion und der Abstoßungsreaktion [80]. Man unterscheidet HLA-Klasse I-Antigene, die auf allen Körperzellen zu finden sind. Hierzu zählen die Merkmalsgruppen HLA-A, HLA-B und HLA-C. HLA-Klasse II-Antigene befinden sich nur auf antigenpräsentierenden Zellen, darunter HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen sind möglichst wenige HLA-Mismatches zwischen Spender und Empfänger anzustreben. Nach wie vor hat trotz verbesserter Immunsuppression das HLA-Matching, d.h. die Anzahl der HLA-Übereinstimmungen zwischen Spender und Empfänger, einen Einfluss auf das Langzeitüberleben des Transplantats und des Empfängers. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Vorimmunisierung des Empfängers gegen HLA-Antigene durch Schwangerschaften, Transfusionen und vorherige Transplantationen mit der Bildung präformierter Antikörper. Diese stellen ein hohes Risiko für akute Abstoßungsreaktionen dar, was unter anderem zur Einführung des lymphozytären Crossmatch als Pflichttest vor Transplantation führte [81].

1.2.4.1 *Abstoßungsreaktion*

Man unterscheidet drei Formen der Abstoßungsreaktion: die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßungsreaktion. Die Symptome der Abstoßungsreaktion sind bei den verschiedenen Formen ähnlich und gehen mit einem Funktionsverlust des Organs einher. Am Beispiel der Niere sind dies ansteigende Serumkreatinin-Konzentrationen, entsprechend einem Abfall der GFR, Proteinurie, plötzliche Reduktion der Urinmenge oder selten Schmerzen im Bereich des Transplantats. Eine definitive Diagnose lässt sich erst durch eine Biopsie und Histologie stellen [82].

Die hyperakute Abstoßungsreaktion ist antikörpervermittelt und tritt innerhalb von Stunden bis Tagen nach Transplantation, typischerweise jedoch noch intraoperativ bei Reperfusion des Transplantates auf. Nach Reperfusion wird die Niere makroskopisch zyanotisch und hart, es lässt sich eine verzögerte oder fehlende Perfusion feststellen und der Patient leidet an einer Druckdolenz über dem Transplantat und Fieber. Die operative Entfernung des Transplantates ist meistens erforderlich. Sie setzt präformierte Donor-spezifische Antikörper (DSA) im Spenderblut voraus und ist seit Verwendung des Crossmatchings fast nicht mehr existent [82].

Die akute Abstoßung tritt gewöhnlicher Weise in den ersten Monaten nach Transplantation auf, ist jedoch auch später möglich. Man unterscheidet die akute zelluläre Abstoßung (ACR) und die akute antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion (AMR). Die ACR tritt später als eine Woche nach Transplantation auf und wird durch donorspezifische, zytotoxische T-Zellen (CD8-positive T-Zellen) vermittelt, die das Transplantat infiltrieren. Die Inzidenz innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation beträgt mittlerweile weniger als 10%, was auf den breiten Einsatz einer Induktionstherapie, insbesondere T-Zell-depletierender Antikörper, zurückzuführen ist. Die ACR kann effektiv mit Hochdosissteroidtherapie oder T-Zell-depletierenden Antikörpern behandelt werden. Die AMR wird durch DSA vermittelt, welche das Komplementsystem aktivieren. Die Therapie erfolgt mittels einer Kombination aus Glukokortikoiden, Plasmapherese und IVIG [82]. Die Schwere der ACR und der AMR wird anhand der Banff-Kriterien eingeteilt [83,84].

Die chronische Abstoßungsreaktion ist ebenfalls antikörpervermittelt und tritt zunehmend häufig auf. Sie führt im Fall der Nierentransplantation typischerweise zu einer Transplantat-Glomerulopathie, welche schwierig zu therapieren ist. Darüber hinaus kommt es zu interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie. Die Prognose ist schlecht [82].

1.2.4.2 *Immunsuppressiva*

Das Problem der Abstoßung nach Organtransplantation ist nach wie vor die gemeinsame Schwierigkeit bei allen transplantierten Organen. Erst durch die routinemäßige Anwendung von Immunsuppressiva in den 1960ern konnte ein längerfristiges Transplantat- und Empfängerüberleben erreicht werden. In den 1970er Jahren war durch die Entwicklung und routinemäßige Anwendung von Ciclosporin [64] ein weiterer Meilenstein der Transplantationsmedizin mit deutlich gesteigertem Langzeitüberleben zu verzeichnen, nachdem zuvor die Immunsuppression meist durch eine Kombination von Azathioprin und

Prednison erfolgte [60,61]. Heute gibt es eine Reihe verschiedener routinemäßig angewandter Immunsuppressiva, welche sich in Glukokortikoide, Calcineurin-Inhibitoren, Antimetaboliten, mTOR-Inhibitoren sowie depletierende und nicht depletierende Antikörper einteilen lassen.

Wirkstoffgruppen

Calcineurin-Inhibitoren

Zu den Calcineurin-Inhibitoren zählen Ciclosporin und Tacrolimus. Beide binden im Zytoplasma an sog. Immunophiline, Ciclosporin an Cyclophilin und Tacrolimus an FKBP12. Hierbei entsteht ein Komplex, welcher die Aktivität von Calcineurin hemmt, das folglich nicht mehr in der Lage ist NFAT (nuclear factor of activated T-cells) zu dephosphorylieren. Dieser transloziert dadurch nicht mehr in den Zellkern, was die Transkription von IL-2 und somit die Aktivierung von T-Zellen verhindert. Tacrolimus scheint potenter zu sein als Ciclosporin: Cochrane-Analysen haben Vorteile von Tacrolimus gegenüber Ciclosporin hinsichtlich des Abstoßungsrisikos und Transplantatverlustes gezeigt [85,86]. Beide Calcineurin-Inhibitoren besitzen ein ähnliches Nebenwirkungsprofil mit u.a. Nephrotoxizität, Neurotoxizität, Diabetes, Hypertension, Gingivahyperplasie, Tremor und Hyperlipidämie [87].

Antimetaboliten

Hierunter fallen die beiden Immunsuppressiva Azathioprin und Mycophenolat, welche eine Hemmung der Purinsynthese und somit eine Hemmung der Lymphozytenproliferation bewirken. Azathioprin, welches in der Transplantationsmedizin weitestgehend durch Mycophenolat ersetzt wurde und in diesem Zusammenhang nur noch historische Bedeutung besitzt, wird in 6-Mercaptopurin metabolisiert, welches mit der DNA-Synthese interferiert. Typische Nebenwirkungen sind eine Leukopenie und generell eine Knochenmarksdepression. Mycophenolat hemmt die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, ein wichtiges Enzym in der Purinsynthese. Häufigste Nebenwirkung sind Diarrhoen, Übelkeit und Bauchschmerzen, gefolgt von seiner myelotoxischen Wirkung mit Leukopenie und Anämie [87].

mTOR-Inhibitoren

Die beiden mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus sind neuere Immunsuppressiva, welche an FKBP12 binden. Der entstehende Komplex hemmt mTOR (mammalian target of rapamycin), eine Kinase, die den Zellzyklus kontrolliert und somit die Proliferation von T-

Zellen und B-Zellen steuert. Möglicherweise haben die Wirkstoffe einen antineoplastischen und arterioprotektiven Effekt. Häufigste Nebenwirkungen sind Hyperlipidämie, Thrombopenie und eine gestörte Wundheilung [87].

Depletierende und nicht-depletierende Antikörper

Antikörper werden zunehmend zur Induktionstherapie eingesetzt. Dabei werden T-Zell-depletierende und nicht-T-Zell-depletierende Antikörper unterschieden. Derzeit wird bei den nicht-depletierenden Antikörpern der IL-2-Rezeptor-Blocker Basiliximab eingesetzt, welcher die Funktion der T-Zellen beeinflusst, nicht jedoch die Anzahl der zirkulierenden T-Zellen im Blut. Die Nebenwirkungen sind gering. An depletierenden Antikörpern werden aktuell Thymoglobulin und ATG verwendet, welche die Anzahl der zirkulierenden CD3-positiven T-Zellen reduzieren. Das Risiko für Infektionen und Tumoren ist unter deren Anwendung erhöht, jedoch sind diese bei der Vermeidung zellulärer Abstoßungen IL-2-Rezeptor-Blockern überlegen [88].

Induktions- und Erhaltungstherapie

Man unterscheidet bei der Immunsuppression die Induktionsphase und die Erhaltungsphase. In der Induktionsphase empfehlen die aktuellen Leitlinien eine Therapie mit einer biologischen Substanz als Bestandteil des initialen Immunsuppressionsschemas. Erste Wahl ist hier ein IL2-Rezeptor-Blocker wie Basiliximab, bei Patienten mit hohem immunologischen Risiko lymphozytendepletierende Antikörper wie Thymoglobulin [88]. Bei Kindern wird routinemäßig ein IL-2-Rezeptor-Blocker eingesetzt, im Gegensatz zu Erwachsenen ist bei ihnen die Anwendung von T-Zell-depletierenden Antikörpern aufgrund des nicht absehbaren Einflusses auf das sich entwickelnde Immunsystem nicht üblich [89]. Die Erhaltungstherapie beginnt im Anschluss an die Induktionstherapie, besteht üblicherweise aus der Kombination von zwei oder drei immunsuppressiven Medikamenten und unterscheidet sich je nach transplantiertem Organ, immunologischem Risiko und zeitlichem Abstand zur Transplantation. So nimmt die erforderliche Intensität der Immunsuppression und damit die empfohlenen Zielspiegel der Immunsuppressiva in folgender Reihenfolge ab: Herz > Niere > Leber [88]. Die Intensität wird weiterhin im Verlauf des postoperativen Verlaufs schrittweise reduziert, da es mit der Zeit zu einer Adaptation des Empfänger-Immunsystems gegenüber dem Spenderorgan kommt [87]. Die Kombinationstherapie besteht üblicherweise aus einem Kortikosteroid wie Prednison oder Prednisolon, einem Calcineurin-Inhibitor und einem Antimetaboliten. Empfohlen wird

aktuell der Vorzug von Tacrolimus gegenüber Ciclosporin und der Einsatz von Mycophenolat als Antimetabolit [88]. Im Verlauf kann die Immunsuppression individualisiert werden um spezifische Nebenwirkungen zu reduzieren. So wurde in den letzten Jahren in den USA beim Großteil der Nieren-, Herz- und Leber-Transplantierten eine Kombination aus Tacrolimus und Mycophenolat angewandt, Ciclosporin kam nur noch sehr selten zum Einsatz. Die Induktion mit einem Antikörper erfolgte vor allem bei Nierentransplantation, wo in ca. 80% der Fälle eine Induktionstherapie stattfand. Demgegenüber erfolgte diese nur bei der Hälfte der Herz- und bei einem Drittel der Lebertransplantationen [76–78]. Bei den Kinderlebertransplantationen erfolgte ebenfalls in zwei Drittel keine Induktion. In 95% wurde hier Tacrolimus verwendet, in 40% kombiniert mit Mycophenolat [78].

1.2.5 Opportunistische Infektionen und andere Langzeitfolgen

Die potente Therapie mit modernen Immunsuppressiva führte zu einer deutlichen Regredienz akuter Abstoßungsreaktionen, bringt jedoch eine erhöhte Suszeptibilität für opportunistische Infektionen und Tumore, v.a. Lymphome und Hauttumore, mit sich.

Infektionen können dabei vom Donor bzw. Spenderorgan übertragen werden, vom Empfänger selbst ausgehen, nosokomial oder durch das Alltagsumfeld des Patienten übertragen werden. Vom Donor ausgehende Infektionen persistieren klassischerweise im Gewebe des transplantierten Organs oder sind aktive Infektionen, die zum Zeitpunkt der Organentnahme nicht erkannt wurden. Typisch sind dabei Infektionen durch Viren wie das Cytomegalievirus (CMV), Hepatitis B- und C-Viren (HBV, HCV) oder das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) oder Parasiten wie Toxoplasmen oder die Übertragung von Tuberkulose. Vom Empfänger ausgehende Infektionen sind latente Infektionen, welche unter Immunsuppression exazerbieren. Hierzu zählen neben dem Erregerspektrum, welches auch vom Donororgan ausgeht, zudem Pilzinfektionen. Aus diesem Grund erfolgt heute routinemäßig ein Screening von Spender und Empfänger für u.a. HIV, CMV, Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes simplex-Virus (HSV), Varizella zoster-Virus (VZV), Hepatitisviren, Tuberkulose und Toxoplasmen. Nosokomiale Infektionen können wie bei anderen operativen Eingriffen auch bei Transplantationen auftreten, laufen jedoch häufig aufgrund der Immunsuppression nicht mit dem typischen klinischen Bild ab und stellen eine größere Gefahr für den Patienten dar. Die vom Alltagsumfeld ausgehenden Infektionen beinhalten

Erreger, welche für einen immunkompetenten Menschen nicht pathogen sind, unter Immunsuppression jedoch zu schweren Erkrankungen führen können. Hierzu zählen z.B. *Pneumocystis jirovecii*- und *Cryptococcus neoformans*-Infektionen.

Das Risiko für Infektionen und das typische Erregerspektrum ändert sich über die Zeit nach Transplantation. In der frühen Posttransplantationsphase, d.h. im ersten Monat nach Transplantation, ist der volle Effekt der Immunsuppression noch nicht vorhanden und es stehen nosokomiale Infektionen wie Pneumonien, Wundinfekte oder Katheter-assoziierte Infekte im Vordergrund. Im ersten halben Jahr nach Transplantation ist die Intensität der Immunsuppression hoch und Virusinfektionen sind typisch. Bedeutend sind in erster Linie CMV, welches sowohl zu invasiven Infektionen als auch zu Transplantat-Schäden und -Abstoßungen führen kann, und EBV, das für die PTLD (post-transplantation lymphoproliferative disease) verantwortlich ist. Herpesvirusinfektionen und *Pneumocystis*-Pneumonien sind jedoch unter medikamentöser Prophylaxe inzwischen selten. In der späten Posttransplantationsphase, in der die Intensität der Immunsuppression reduziert wird, geht das Risiko für Virusinfektionen schließlich wieder zurück, jedoch besteht weiterhin ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen.

Es bestehen drei generelle Strategien zur Prophylaxe von Infektionen nach Transplantation: Vakzination, die prophylaktische Strategie und die präemptive Strategie. Die Standard- und Indikationsimpfungen sollten möglichst bereits vor Transplantation erfolgen, da die Immunisierung unter Immunsuppression weniger effektiv ist. Lebendimpfung ist unter Immunsuppression kontraindiziert. Die Entscheidung zur Prophylaxe oder präemptiven Therapie von CMV und anderen Herpesviren hängt vom transplantierten Organ, der verwendeten Immunsuppression und der Risikokonstellation ab. So ist beispielsweise das Risiko einer Virusreaktivierung am höchsten, wenn der Donor positiv und der Empfänger negativ, und somit immunologisch naiv für das Virus ist. Bei hoher Risikokonstellation oder der Anwendung T-Zell-depletierender Antikörper wird eher eine prophylaktische Strategie mit einem Virostatikum, im Falle von CMV Ganciclovir, über meist drei bis sechs Monate nach Transplantation verfolgt. Bei mittlerer Risikokonstellation, d.h. mindestens der Empfänger ist seropositiv, besitzt somit jedoch auch Antikörper, kann ein präemptives Vorgehen erfolgen. Dabei werden in regelmäßigen Abständen CMV-PCRs durchgeführt, sodass bereits vor dem Auftreten von Symptomen eine Reaktivierung erkannt und präemptiv therapiert werden kann. Die meisten Transplantationszentren führen routinemäßig eine *Pneumocystis*-Pneumonie-Prophylaxe mit Trimethoprim/Sulfamethoxazol für mindestens

drei Monate durch. Dabei werden verschiedenen andere opportunistische Infektion sowie gewöhnliche Harnwegs-, Atemwegs- und gastrointestinale Infekte miterfasst. Im Gegensatz zur Soor-Prophylaxe unter Glukokortikoidtherapie ist eine systemische Prophylaxe gegen Pilzinfektionen nur Hochrisikopatienten, wie z.B. bei langem Intensivaufenthalt oder bei Anwendung von Breitbandantibiotika, vorbehalten [90].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Immunsupprimierte Organempfänger haben insbesondere in den ersten sechs Monaten nach Transplantation ein erhöhtes Risiko für virale Infektionen, die entweder durch Reaktivierung latenter Infektionen des Empfängers selbst oder als Neuinfektion durch Transmission mit dem Donororgan oder Blutprodukten oder aus dem Umfeld des Patienten auftreten. Dies ist ein bekanntes und gut erforschtes Problem bei Herpes-Viren, insbesondere CMV, weshalb eine Donor- und Empfängerscreening für diese Viren und, im Falle von CMV, feste Strategien zur Prophylaxe einer Virusinfektion in der klinischen Routine verfolgt werden [90]. Zum aktuellen Zeitpunkt ist beides für B19V nicht der Fall, obwohl Berichte zu schweren Anämien nach B19V-Erstinfektionen unter Immunsuppression bekannt sind [28–32]. Es ist jedoch unklar, ob eine Reaktivierung latenter B19V-DNA zu einer persistierenden Infektion und Anämie bei Transplantatempfängern beitragen kann.

Die Ziele dieser retrospektiven, anonymisierten (Erwachsene) und pseudonymisierten (Kinder, mit Einverständniserklärung) Studie waren bei adulten und pädiatrischen Organempfängern zum einen die Prävalenz und Quantität von B19V-DNA sowie des Genotyps zu untersuchen und durch Bestimmung des B19V-Serostatus Rückschlüsse auf Reaktivierungen oder Neuinfektionen zu ziehen. Eine große Studie zur Prävalenz von B19V nach pädiatrischer Organtransplantation fehlt im Gegensatz zu Untersuchungen bei Erwachsenen bisher völlig. B19V-DNAämien wurden mit Hämoglobinspiegeln und Retikulozytenzahlen als Surrogatmarker für aplastische Anämien korreliert, um die klinische Relevanz von Reaktivierungen und Neuinfektionen vergleichen zu können. Wir nahmen an, dass aufgrund der hohen Durchseuchungsrate im Erwachsenenalter [17] eine B19V-Infektion unter Präsenz neutralisierender Antikörper relativ kontrolliert verläuft und möglicherweise nur geringe klinische Relevanz hat, während bei Kindern Primärinfektionen sehr wahrscheinlich sind. Ziel war es zu prüfen, ob es aufgrund dieser Tatsache zu

vermehrten B19V-Infektionen bei transplantierten Kindern kommt und diese klinisch relevanter sind als bei Erwachsenen. Im Kinderkollektiv, wurden die Fälle von B19V-DNAämie mit der verwendeten Immunsuppression korreliert und den Zeitpunkt des Auftretens auf bestimmte Ereignisse in der Krankengeschichte der Patienten hin analysiert.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

In dieser retrospektiven Studie wurden zwei Patientenkollektive untersucht:

Organtransplantierte Erwachsene

In dieses Kollektiv wurden alle erwachsenen Patienten aufgenommen, die zwischen 01.01.2009 und 31.12.2010 eine Nieren-, Leber- oder Herztransplantation am Universitätsklinikum Regensburg erhalten hatten. Vor Beginn der Messungen wurden alle Daten anonymisiert.

Lebertransplantierte Kinder

Dieses Kollektiv enthielt alle Kinder, die am Kinderuniversitätsklinikum Regensburg (KUNO) zwischen 01.01.2008 und 31.09.2012 eine Lebertransplantation erhalten hatten und sich in der Nachsorge des KUNO befanden. Der Einschluss in die retrospektive Studie erfolgte erst nach informierter Zustimmung mit Aufklärung der Kinder und Eltern über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken der Studie. Die Daten wurden vor Beginn der Messungen pseudonymisiert.

In beiden Kollektiven wurden asservierte Blutproben aus den ersten sechs Monaten nach Transplantation auf B19V-DNA untersucht. Nur Patienten, von denen mindestens eine Probe aus den ersten drei Monaten vorhanden war, wurden in die Studie aufgenommen.

Die Studie war zuvor durch die Ethik-Kommission des UKR bewilligt worden.

2.2 Material

2.2.1 Blutproben und Negativplasmen

Blutproben für die DNA-Prävalenz-Untersuchung mittels RT-qPCR

In beiden Patientenkollektiven wurden Blutproben aus den ersten sechs Monaten nach Transplantation auf B19V-DNA untersucht. Hierfür wurden asservierte Seren, EDTA-Plasmen oder EDTA-Vollblut verwendet, die seit der Zusendung bei -80°C oder -20°C gelagert wurden. Alle Proben waren zuvor für andere diagnostische Untersuchungen an das

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg geschickt worden.

Es wurde eine Probe pro Monat für insgesamt sechs Monate nach Transplantation auf B19V-DNA getestet. Dabei wurden die Intervalle als ein Vielfaches von 30 Tagen mit jeweils einer Zeitspanne von +/- 15 Tagen festgelegt. Die genauen Monatsintervalle sind in Tabelle 2 beschrieben. Bei der Probenauswahl wurden in der Mitte des Monats gelegene Proben bevorzugt. Die Intervalle von Monat 1 und Monat 6 wurden erweitert, um Lücken am Anfang und Ende des Untersuchungszeitraums schließen zu können.

Tabelle 2 Monatsintervalle nach Transplantation

Monat	Tage nach Transplantation
1	5-45
2	45-75
3	75-105
4	105-135
5	135-165
6	165-205

Wenn ein Patient mehrere Transplantationen in dem in den Einschlusskriterien definierten Zeitraum erhalten hatte, wurde der Untersuchungszeitraum wie folgt verändert: (1) wenn die folgende Transplantation innerhalb des Untersuchungszeitraums von sechs Monaten erfolgt war, wurde der Untersuchungszeitraum um so viele Monate verlängert, dass er die folgenden sechs Monate nach der letzten Transplantation abdeckte. (2) Wenn die nächste Transplantation nach dem Untersuchungsintervall erfolgt war, wurde für die andere Transplantation ein neues Intervall von sechs Monaten nach Transplantation untersucht. Dieser Zeitraum wurde statistisch als neuer Fall gewertet.

Bei Patienten mit positivem Nachweis von B19V-DNA wurde die für den Serostatus asservierte, prätransplantäre Probe zusätzlich auf B19V-DNA untersucht, um Neuinfektionen und Reaktivierungen von abklingenden Erstinfektionen, die vor Transplantation begonnen hatten, unterscheiden zu können.

Als Negativkontrollen für die PCR diente FFP, das aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg bezogen wurde.

Blutproben für die Analyse des Serostatus

Um den Serostatus der Patienten zu bewerten, wurden die Anti-B19V-IgG-Titer vor Transplantation bestimmt. Hierfür wurden ebenfalls asservierte, ursprünglich für andere diagnostische Untersuchungen an das Institut geschickte Proben (Seren, EDTA-Plasmen) verwendet. Dabei wurde möglichst auf Proben innerhalb von 30 Tagen vor der erfolgten

Transplantation zurückgegriffen. Falls nicht vorhanden, wurde auf frühere Proben oder Proben, die kurz nach Transplantation gewonnen wurden, zurückgegriffen.

Im Kollektiv der Kinder erfolgte bei allen prätransplantär seronegativen Patienten eine zusätzliche Bestimmung des Anti-B19V-IgG-Titers am Ende Untersuchungszeitraums, da im Kindesalter der Inzidenzgipfel der B19V-Neuinfektionen liegt. Zur Unterscheidung einer prä- und posttransplantären Serokonversion wurde zusätzlich der Serostatus im Monat 1 bestimmt. Bei allen seropositiven Säuglingen wurde zur Identifikation eines „mütterlichen Nestschutzes“, welcher innerhalb dieses Intervalls verloren ginge, auch der Serostatus am Ende des Zeitraums untersucht.

Bei allen Patienten mit positivem Nachweis von B19V-DNA wurden die erste und letzte PCR-positive Probe zur Analyse des Titerverlaufs zusätzlich auf Anti-B19V-IgG getestet. Wenn nur in einer Probe B19V-DNA nachgewiesen wurde, wurde für die serologische Untersuchung zusätzlich die nächste vorhandene Probe verwendet.

In speziellen Fragestellungen erfolgten Anti-B19V-IgM-ELISAs und Western Blots zur Bestimmung spezifischer Anti-B19V-IgM und Anti-B19V-IgG sowie der IgG-Avidität.

2.2.2 Primer, Sonden und Plasmide

Primer

Alle Primer wurden von Metabion - Planegg, Deutschland synthetisiert. Die Primer lagen in einer Konzentration von 8µM vor. Dafür wurde das Lyophilisat in 10mM Tris-Puffer gelöst, der wiederum aus UltraPure™ 1M Tris-HCl-Puffer und DEPC-Wasser hergestellt wurde.

Tabelle 3 Primer

Primer	Nukleotidsequenz	Nukleotidposition
PA-1 (forward) ¹	5'-TCCCTGGAATTAATGCAGATGC-3'	1892–1913 ³
PA-2 (reverse) ¹	5'-CACTGCTGCTGATACTGGTGTCT-3'	1972–1950 ³
VOX-1 (forward) ²	5'-AAGGTCCCCGGCCTGAA-3'	265–281
VOX-2 (reverse) ²	5'-ACAACATGCTGTTTCCACTGGA-3'	329–308

¹ PA-1 und PA-2 nach [91] und [29] für die Amplifizierung der NS1-Protein-codierenden Region der B19V-DNA.

² VOX-1 und VOX-2 nach [92] für die Amplifizierung der Sequenz VOX aus dem Rhodopsin-Gen der Grünalge *Volvox carteri*.

³ Nukleotidposition nach accession number M13178 (B19V/gt1).

Sonden

Die Sonden für die B19V-PCR wurden von Metabion – Planegg, Deutschland hergestellt, die Sonde für die VOX-PCR von Applied Biosystems – Foster City, Kalifornien, USA. Die Sonden lagen in einer Konzentration von 8µM vor. Dafür wurde das Lyophilisat in 10mM Tris-Puffer gelöst, der wiederum aus UltraPure™ 1M Tris--Puffer und DEPC-Wasser hergestellt wurde.

Tabelle 4 Sonden für die B19V-PCR nach [91] und [29] und für die VOX-PCR nach [92]

Sonde	Nukleotidsequenz	Nukleotidposition
P1 (B19V/gt1)	(FAM)-5'-ACCTCCAAACCACCCCAATTGTCACA-3'-(TAMRA)	1925–1950
P2 (B19V/gt2)	(FAM)-5'-ACCTCCAAACCGTCCCCATTGTGCGCA-3'- (TAMRA)*	1866–189
P3 (B19V/gt3)	(FAM)-5'-ATCTCCAAACCACCCCAATTGTCCCA-3'- (TAMRA)*	1817–1842
VOX	(VIC)-5'-TCCGGCGACGGCAGCAGC-3'-(TAMRA)	305–288

* Nukleotidunterschiede zu B19V/gt1 sind fett hervorgehoben.

Plasmide

B19V-Plasmide

Die verwendeten Plasmide entsprachen denen der bereits veröffentlichten PCR-Protokolle [29]. Jedes Plasmid wurde als Verdünnungsreihe von 10¹ geq/5µl bis 10⁴ geq/5µl und zusätzlich 3x10⁰ geq/5µl eingesetzt.

Tabelle 5 B19V-Plasmide

Plasmid	Genotyp	Hersteller
parvovirus B19 international standard 99/800	B19V/gt1	National Institute for Biological Standards and Control – Potters Bar, UK
pFastBac-NS1/gt2*	B19V/gt2	Laboreigene Entwicklung
pcDNA 2.1	B19V/gt3	A. Garbarg-Chenon (Laboratoire de Virologie, Hopital Armand Trousseau, UFR Saint-Antoine – Paris, Frankreich)

* Das Plasmid für B19V/gt2 wurde aus dem Stamm Genotyp 2/Berlin entwickelt [29].

VOX-Plasmid

Das VOX-Plasmid enthielt die Sequenz VOX aus dem Rhodopsin-Gen der Grünalge *Volvox carteri*, die mit keiner bekannten viralen Sequenz identisch ist [92].

2.2.3 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterial

Tabelle 6 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
GeneAmp® dNTPs (10mM)	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
Nuklease-freies DEPC-behandeltes Wasser	Roth – Karlsruhe, Deutschland
Puffer AE	Qiagen – Hilden, Deutschland
UltraPure™ 1M Tris-HCl, pH 8.0	Invitrogen – Carlsbad, Kalifornien, USA
Rheumafaktor-Absorbens	Siemens Healthcare – Erlangen, Deutschland
Aviditätsreagenz	Mikrogen – Neuried, Deutschland

Tabelle 7 Kit-Systeme

Kit	Hersteller
MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – High Performance	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
TaqMan® Gold with Buffer A Pack (AmpliAmp Gold DNA Polymerase, 10X TaqMan Puffer A, MgCl ₂ 25mM)	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
recomWell Parvovirus B19 IgG	Mikrogen – Neuried, Deutschland
recomWell Parvovirus B19 IgM	Mikrogen – Neuried, Deutschland
recomLine Parvovirus B19 IgG	Mikrogen – Neuried, Deutschland
recomLine Parvovirus B19 IgM	Mikrogen – Neuried, Deutschland

Tabelle 8 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
SafeSeal Tips Professional 1000 µl, steril	Biozym – Hessisch Oldendorf, Deutschland
SafeSeal Tips Premium 100 µl, steril	Biozym – Hessisch Oldendorf, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen 20 µl	Sarstedt - Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl blau	Sarstedt - Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze gelb, 200 µl	Sarstedt - Nümbrecht, Deutschland
Combitips Biopur® 1,25 ml	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
Combitips 1,25 ml	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
Combitips 12,5 ml	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
CELLSTAR® Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio-One – Kremsmünster, Österreich
MagNa Pure LC Sample Cartridges	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Processing Cartridges	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Reaction Tips (large)	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Tip Stands	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Reagent Tubs (large)	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Reagent Tubs 20 (medium)	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Tub Lids (large)	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Tub Lids (small/medium)	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MagNa Pure LC Tub Lid Seals	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz

MagNa Pure LC Waste Bag	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp Optical 8-Cap Strips	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
PP-Schraubverschluss Röhrchen 50ml steril	Greiner Bio-One – Kremsmünster, Österreich
SafeSeal Reagiergefäße 2 ml	Sarstedt - Nümbrecht, Deutschland
PP-Rundboden Röhrchen 4ml	Greiner Bio-One – Kremsmünster, Österreich
Inkubationsschalen	Mikrogen – Neuried, Deutschland

Für alle Pipettierarbeiten bei der Nukleinsäure-Isolierung und der PCR wurden sterile Pipettenspitzen mit Filter oder die Combitips Biopur® verwendet.

2.2.4 Geräte

Tabelle 9 Geräte

Gerät	Hersteller
Pipette Reference® (variabel), 100–1.000 µl	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
Pipette Reference® (variabel), 10–100 µl	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
Pipette Reference® (variabel), 0,5–10 µl	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
Handystep® Mehrfachdispenser	Brand – Wertheim, Deutschland
PIPETBOY acu	Integra Biosciences – Fernwald, Deutschland
Laminar-Flow-Bank	BDK Luft- und Reinraumtechnik – Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Vortex-Genie 2™	Bender & Hobein – Zürich, Schweiz
Zentrifuge 5430	Eppendorf – Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320R	Hettich – Tuttlingen, Deutschland
MagNa Pure LC	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
Step One™ Plus	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
Brutschrank B 6120	Heraeus – Hanau, Deutschland
Infinite F50	Tecan - Männedorf, Schweiz
Horizontalschüttler Promax 2020	Heidolph – Schwabach, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand – Wertheim, Deutschland

2.2.5 Software

Tabelle 10 Software

Software	Hersteller
Magna Pure V3.0	Roche Diagnostics - Rotkreuz, Schweiz
Step One™ Software V2.2.2	Applied Biosystems - Foster City, Kalifornien, USA
Magellan™ V7.0	Tecan - Männedorf, Schweiz
IBM SPSS Statistics 21	IBM – Armonk, New York, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Nukleinsäure-Isolierung

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels MagNA Pure LC mit der Software Magna Pure V3.0 unter Verwendung des MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – High Performance.

Testprinzip

Der MagNA Pure LC führt eine vollautomatische Nukleinsäure-Reinigung mittels der Magnetic-Bead-Technologie durch. Das Probenmaterial wird dabei zunächst mit Lyse-Puffer und Proteinase K versetzt, wodurch die Zellen lysiert und die Proteine verdaut werden. Im nächsten Schritt wird das Zelllysat mit Silika-beschichteten magnetischen Beads vermischt. Aufgrund der chaotropen Salze und der hohen Ionenstärke des Lyse-Puffers binden die freigesetzten Nukleinsäuren an die Silika-Oberfläche der magnetischen Glas-Beads. Anschließend werden die Beads mit den gebundenen Nukleinsäuren magnetisch vom Lysat getrennt und ungebundene Substanzen, z.B. Proteine, Zellmembranen und PCR-Inhibitoren wie Heparin oder Hämoglobin, werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Abschließend werden die Nukleinsäuren mit einem Elutionspuffer von den Beads eluiert.

Testdurchführung

Für die DNA-Extraktion wurden 200µl Serum, EDTA-Plasma oder EDTA-Vollblut eingesetzt. Falls weniger Probenmaterial vorhanden war, wurde es mit sterilem NaCl verdünnt und das resultierende Verdünnungsverhältnis bei der Ergebnisberechnung berücksichtigt. Die eingefrorenen Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, der Inhalt des Röhrchens für 5sec auf einem Vortex-Mixer gemischt und kurz abzentrifugiert. Vollblutproben und Proben, die Trübungen aufwiesen, wurden vor der Analyse für 2min bei 2000G zentrifugiert. Pro Isolierungsreihe wurde zur Qualitätskontrolle zusätzlich ein Negativplasma eingesetzt. In der Software wurden das Protokoll „Total NA HP 200“ mit einem Probenvolumen von 200µl und ein Elutionvolumen von 100µl sowie die Anzahl der zu isolierenden Proben eingestellt. Der MagNA Pure LC wurde nach den Angaben der Gerätesoftware mit Reagenzien und Verbrauchsmaterial bestückt. Die Proteinase K wurde zuvor aus dem Proteinase K-Lyophilisat und 6,7ml Proteinase K Buffer II hergestellt. Zu den Proben wurde als Inhibitionskontrolle ein Plasmid mit der Sequenz VOX aus dem Rhodopsin-Gen der Grünalge *Volvox carteri* gegeben. Dazu wurden bei der Nukleinsäure-

Isolierung zu jeder Probe 10µl einer VOX-Plasmid-Lösung mit einer Konzentration von 10^5 geq/5µl hinzugefügt. Dies geschah durch Zugabe dieser Lösung zum Lysepuffer in ein steriles Schraubverschluss-Röhrchen unter der Laminar-Flow-Bank: für eine Isolationsreihe von 16 Proben wurden 6380µl Lysepuffer mit 220µl VOX-Plasmid-Lösung 10^5 geq/5µl eingesetzt, für 24 Proben 9570µl Lysepuffer mit 330µl VOX-Plasmid-Lösung 10^5 geq/5µl und für 32 Proben 12760µl Lysepuffer mit 440µl VOX-Plasmid-Lösung 10^5 geq/5µl. Die Proben wurden unter der Laminar-Flow-Bank in das Sample Cartridge pipettiert. Als letzter Schritt der Vorbereitung wurden die MGP (magnetic glass particles) mit dem Vortex-Mixer gemischt, bis sich der Bodensatz vollständig aufgelöst hat, und in das entsprechende Reaktionsgefäß gegeben, bevor die automatische Nukleinsäure-Isolierung gestartet wurde. Nach der Isolierung wurden die Eluate (100µl) unter der Laminar-Flow-Bank in vorbereitete Safe Seal-Reagiergefäße pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung am selben Tag auf Eis gelagert. Für eine spätere Verwendung bei der Quantifizierung/Genotypisierung wurden die Reste der Eluate bei -20°C gelagert.

2.3.2 Real-time qPCR

Die Untersuchung der Blutproben auf B19V-DNA wurde mit einem in-house-real time-qPCR-Assay nach dem TaqMan®-Prinzip in Anlehnung an bereits veröffentlichte Protokolle [29,91] durchgeführt. Der Nachweis von B19V-DNA erfolgte durch Amplifizierung der NS1-Protein-codierenden Region des B19V-Genoms. Durch den Einsatz verschiedener Sonden war eine Bestimmung des Genotyps möglich. Die PCR wurde auf einem StepOne™ Plus Real-Time PCR-Cycler durchgeführt.

Testprinzip

Bei der PCR wird eine spezifische DNA-Sequenz, das sogenannte Target, mit Hilfe des hitzestabilen Enzyms Taq-DNA-Polymerase (aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus*) amplifiziert. Ein PCR-Zyklus besteht aus Denaturierungsphase, Annealingphase und Elongationsphase. In der Denaturierungsphase wird bei einer Temperatur $>90^{\circ}\text{C}$ die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, sodass DNA-Einzelstränge vorliegen. Die Annealingphase beginnt mit dem Absenken der Temperatur auf eine Zieltemperatur zwischen 50°C und 60° , wodurch forward- und reverse-Primer mit dem Target hybridisieren. In der Elongationsphase wird die Temperatur auf 72°C , das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase, angehoben und die Taq-Polymerase ergänzt

den Folgestrang der DNA beginnend vom Primer in 3'-Richtung, wodurch ein neuer Doppelstrang entsteht. Bei der hier angewendeten Two-Step-PCR finden Annealing und Elongation in einem gemeinsamen Schritt bei derselben Temperatur von 72°C statt. Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA, bis aufgrund der Akkumulation der Endprodukte (DNA und Pyrophosphat) und der Abnahme der Substratkonzentration ein Plateaueffekt erreicht wird. Bei der real-time quantitativen PCR (RT-qPCR) mittels Taqman[®]-Sonden erfolgt die Detektion der gebildeten DNA nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET): verschiedene Fluorochrome weisen charakteristische Anregungs- und Emissionswellenlängen auf. Bringt man ein Fluorochrom F1 in die Nähe eines anderen Fluorochroms F2, dessen Anregungsspektrum A2 dem Emissionsspektrum E1 entspricht, wird bei Anregung von F1 die Energie an F2 übertragen, statt als Licht der Wellenlänge E1 abgestrahlt zu werden. F2 strahlt seinerseits dann Licht der Wellenlänge E2 ab. Somit ist nur bei räumlicher Trennung der beiden Fluorochrome voneinander ein Signal der Wellenlänge E1 detektierbar. Man bezeichnet dabei F1 als Reporter und F2 als Quencher (Verwendeter Versuchsaufbau: Reporter FAM/VIC und Quencher TAMRA). Beim TaqMan[®]-Prinzip sitzen Reporter und Quencher jeweils entweder am 5'- oder 3'-Ende einer Oligonukleotid-Sonde, die mit dem Target hybridisiert. In der Elongationsphase wird der Reporter durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase freigesetzt und es wird Licht der Wellenlänge E1 abgestrahlt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt jeweils in der Elongationsphase des PCR-Zyklus. Dabei ist die Intensität des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Menge der bis dahin gebildeten PCR-Produkte. Die Zykluszahl, nach der erstmals ein Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert wird, wird als Threshold Cycle (C_T -Wert) bezeichnet. Der C_T -Wert ist indirekt proportional zum Logarithmus der in der Ausgangsprobe vorhandenen DNA-Konzentration. Durch parallele Amplifikation bekannter Template-Mengen kann aus Ausgangsmenge und C_T -Wert eine Standardkurve erstellt werden, mit der man umgekehrt von einem C_T -Wert auf die Template-Menge in der Ausgangsprobe rückschließen kann [93].

Testaufbau

In der B19V-DNA-PCR wurden je 5µl Eluat, Plasmid oder Negativ-Serum als Template in einem Gesamtvolumen von 30µl pro Reaktionsansatz verwendet. Alle Proben wurden in drei separaten Assays getestet: (1) qPCR für die gleichzeitige Amplifizierung von B19V/gt1, B19V/gt2 und B19V/gt3 mit Verwendung der Primer *PA-1* und *PA-2* sowie eines Mixes aus

den Sonden *P1*, *P2* und *P3* (Multiplex-PCR), (2) qPCR spezifisch für B19V/gt1 mit den Primern *PA-1* und *PA-2* sowie der Sonde *P1* und (3) qPCR als quantitative Amplifizierungskontrolle/Inhibitionskontrolle mit VOX-Plasmid unter Verwendung der Primer *VOX-1* und *VOX-2* und der Sonde *VOX*. Zusätzlich wurden Plasmide von B19V/gt1 in Assay (1) und (2) und von B19V/gt2 sowie B19V/gt3 in Assay (1) in einer Konzentration von 10^1 geq/5 μ l als Positivkontrolle und Negativseren als Negativkontrolle mitgeführt. Proben mit einem positiven Nachweis von B19V-DNA wurden wiederholt getestet. Dabei wurde jede in einem jeweils für B19V/gt1, B19V/gt2 und B19V/gt3 spezifischen Reaktionsansatz getestet. Es wurde für jeden Genotyp eine Plasmid-Standard-Verdünnungsreihe mit 3×10^0 geq/5 μ l, 10^1 geq/5 μ l, 10^2 geq/5 μ l und 10^4 geq/5 μ l amplifiziert (Doppelstrang-geq). Aus den C_T -Werten der einzelnen Verdünnungsstufen berechnete die Step One™ Software durch lineare Regressionsanalyse eine Standardkurve, sodass die Quantität in den Proben bestimmt werden konnte. Die Typisierung erfolgte anhand der quantitativen Auswertung der drei Tests.

Testdurchführung

Die Reagenzienmische für die Reaktionsansätze wurden in einem DNA-freien Raum jeweils ohne Template in einem 2ml-SafeSeal-Reagiergefäß nach der in Tabelle 11 und Tabelle 12 beschriebenen Zusammensetzung vorbereitet, auf dem Vortex-Mixer vermischt und kurz zentrifugiert. Für jede Probe wurde je ein Reaktionsansatz für den B19V-Multiplex-Assay, für den B19V/gt1-Assay und für den VOX-Assay hergestellt, indem je 25 μ l Reagenzien-Mix in die 96-Well-Platte pipettiert wurden. Für die Positivkontrollen von B19V/gt1 wurde zusätzlich je ein Reaktionsansatz für den B19V-Multiplex-Assay und den B19V/gt1-Assay angelegt, für die Positivkontrollen von B19V/gt2 und B19V/gt3 je ein Reaktionsansatz für den B19V-Multiplex-Assay. Ebenso wurde für die Negativkontrolle ein Reaktionsansatz für den B19V-Multiplex-Assay in die 96-Well-Platte pipettiert. Für die VOX-Kontrolle wurde ein weiterer Reaktionsansatz mit dem Reagenzienmix für den VOX-Assay angelegt.

Tabelle 11 Reaktionsansätze für den B19V-Multiplex-Assay und für den VOX-Assay

B19V-Multiplex-Assay		VOX-Assay	
<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>	<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>
DEPC-Wasser	9,48 µl	DEPC-Wasser	7,03 µl
Puffer A	3,00 µl	Master Mix	15,00 µl
MgCl ₂	7,20 µl	Primer VOX-1	1,20 µl
Nukleotide-Mix ¹	2,40 µl	Primer VOX-2	1,20 µl
Primer PA-1	1,14 µl	Sonde VOX-So	0,57 µl
Primer PA-2	1,14 µl	Template	5,00 µl
Sonden-Mix ²	0,39 µl	Gesamtmenge	30,00 µl
AmpliAq Gold DNA Polymerase	0,25 µl		
Template	5,00 µl		
Gesamtmenge	30,00 µl		

¹ Der Nukleotide-Mix wurde zuvor aus gleichen Mengen dATP, dTTP, dGTP und dCTP nach Herstelleranleitung hergestellt, sodass die Endkonzentration 2,5mM für jedes Nukleotid betrug.

² Der Sonden-Mix wurde zuvor aus gleichen Mengen von P1-, P2- und P3-Lösung hergestellt.

Tabelle 12 Reaktionsansätze für den B19V/gt1-, -gt2- und -gt3- Assay

B19V/gt1-Assay		B19V/gt2-Assay		B19V/gt3-Assay	
<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>	<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>	<u>Komponente</u>	<u>Menge</u>
DEPC-Wasser	9,74 µl	DEPC-Wasser	9,74 µl	DEPC-Wasser	9,74 µl
Puffer A	3,00 µl	Puffer A	3,00 µl	Puffer A	3,00 µl
MgCl ₂	7,20 µl	MgCl ₂	7,20 µl	MgCl ₂	7,20 µl
Nukleotide Mix ¹	2,40 µl	Nukleotide Mix ¹	2,40 µl	Nukleotide Mix ¹	2,40 µl
Primer PA-1	1,14 µl	Primer PA-1	1,14 µl	Primer PA-1	1,14 µl
Primer PA-2	1,14 µl	Primer PA-2	1,14 µl	Primer PA-2	1,14 µl
Sonde P1	0,13 µl	Sonde P2	0,13 µl	Sonde P3	0,13 µl
AmpliAq Gold DNA Polymerase	0,25 µl	AmpliAq Gold DNA Polymerase	0,25 µl	AmpliAq Gold DNA Polymerase	0,25 µl
Template	5,00 µl	Template	5,00 µl	Template	5,00 µl
Gesamtmenge	30,00 µl	Gesamtmenge	30,00 µl	Gesamtmenge	30,00 µl

* Der Nukleotide-Mix wurde zuvor aus gleichen Mengen dATP, dTTP, dGTP und dCTP nach Herstelleranleitung hergestellt, sodass die Endkonzentration 2,5mM für jedes Nukleotid betrug.

Unter der Laminar-Flow-Bank wurde pro Reaktionsansatz jeweils als Template 5µl Eluat (DNA) zum entsprechenden Reagenzienmix gegeben. Als Positivkontrollen wurden jeweils 5µl in der Konzentration 10¹ geq/5µl der B19V/gt1-Plasmid-Lösung zu je einem Reagenzienmix für den B19V-Multiplex-Assay und den B19V/gt1-Assay, der B19V/gt2-Plasmid-Lösung und der B19V/gt3-Plasmid-Lösung zu je einem Reagenzienmix für den

B19V-Multiplex-Assay gegeben. Pro 96-Well-Platte wurden 5µl Eluat des Negativplasmas zu einem Reagenzienmix für den B19V-Multiplex-Assay hinzugegeben. Die Wells wurden unmittelbar mit Optical 8-Cap Strips verschlossen, sobald eine Reihe pipettiert wurde. Nach der Zugabe des Templates wurde die 96-Well-Platte für 2 min bei 2000 G zentrifugiert und in den Step One™ Plus-Real Time PCR-Cycler eingelegt.

In der Software erfolgten folgende Target-Einstellungen für die B19V-Assays: Reporter FAM (Messkanal 520nm), Quencher TAMRA (Messkanal 580nm). Der VOX-Assay hatte folgende Target-Einstellung: Reporter VIC (Messkanal 550nm), Quencher TAMRA (Messkanal 580nm). Die Amplifizierung erfolgte nach dem bereits veröffentlichten Reaktionsprotokoll [91] mit folgendem Temperaturprofil: nach einer initialen Denaturierungsphase von 10min bei 95°C folgten 45 Zyklen mit jeweils einer Denaturierungsphase von 15sec bei 95°C und einer kombinierten Primer-Annealing-/Extensionsphase von 1min bei 60°C.

Folgende Validierungskriterien waren Voraussetzung zur Verwendung der Ergebnisse: (1) eine Konzentration der Amplifizierungs-/Inhibitionskontrolle in Form des VOX-Reaktionsansatzes (theoretisch 10^4 geq/5µl) größer der des VOX-Plasmid-Standards (10^3 geq/5µl), (2) ein negatives Ergebnis der Negativkontrolle und (3) ein positives Ergebnis der Positivkontrollen. Zur Interpretation der Ergebnisse der Proben wurde sowohl der C_T -Wert bzw. die Quantität als auch das Verhalten im Multicomponent-Plot herangezogen. Nur Reaktionen mit typischem Verlaufsmuster im Multicomponent-Plot wurden als positiv gewertet.

Positive Testergebnisse wurden in einem Folge-Assay verifiziert, dabei erfolgten zugleich die Quantifizierung und Genotypisierung. Dazu wurden pro Genotyp jeweils vier Reaktionsansätze mit dem Eluat der Proben sowie vier Reaktionsansätze mit dem Eluat des Negativplasmas amplifiziert. Für die Quantifizierung anhand einer Plasmid-Standardkurve wurde je Genotyp eine Plasmid-Verdünnungsreihe in den oben beschriebenen Konzentrationsstufen amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Reaktionsansatz mit B19V-Plasmid in der Konzentration 10^3 geq/5µl bestückt. Validierungskriterien in diesem Assay waren: (1) ein Messergebnis von 200-5000 geq/5µl der 10^3 geq/5µl-Kontrolle, (2) ein negatives Ergebnis der Negativkontrollen und (3) eine Linearität der Standardkurve (Korrelationskoeffizient $R^2 \geq 0,90$, PCR-Effizienz $\geq 85\%$). Bei der Quantifizierung wurde das Ergebnis in geq/Reaktionsansatz angegeben. Zur Umrechnung auf geq/ml wurde das

Ergebnis mit dem Faktor 200 multipliziert. Dieser Wert ergab sich aus mehreren Verdünnungen im Arbeitsablauf (Faktor 5 bei der Nukleinsäureisolierung, Faktor 20 bei der Herstellung des PCR-Reaktionsansatzes) sowie der Tatsache, dass das B19V-Genom als Einzelstrang vorliegt, die Methode aber an Doppelstrang-Plasmiden kalibriert worden war (Faktor 2).

Die untere Nachweisgrenze dieses Versuchsaufbaus wurde im Rahmen dieser Studie untersucht, indem in beiden Versuchsansätzen B19V-Plasmid-Verdünnungsreihen mit je zwei Ansätzen mit 10^2 Plasmid-geq/Ansatz, zwei Ansätzen mit 10^1 Plasmid-geq/Ansatz, 20 Ansätzen mit 3×10^0 Plasmid-geq/Ansatz und 20 Ansätzen mit 10^0 Plasmid-geq/Ansatz getestet wurden. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1 zu finden. Für B19V/gt2 und B19V/gt3 beträgt die untere Nachweisgrenze 3 Plasmid-geq/Ansatz bzw. 600 B19V-geq/ml oder 215 IU/ml.

Die obere Nachweisgrenze und der lineare Messbereich (in dem ein Korrelationskoeffizient $R^2 \geq 0,90$ gegeben ist) entsprachen denen früherer Publikationen [29,91]. Der daraus resultierende Quantifizierungsbereich (Konzentrationsbereich innerhalb der Nachweisgrenzen, in dem Linearität gegeben ist) für den B19V-DNA-PCR-Assay lag zwischen 600 geq/ml und 10^{11} geq/ml. Ein positiver Nachweis von B19V-DNA unter der Nachweisgrenze wurde als „schwach positiv“ gewertet.

2.3.3 ELISA

Die Proben (Seren, EDTA-Plasmen) wurden auf das Vorhandensein B19V-spezifischer IgG und IgM mittels ELISA untersucht. Die Untersuchungen wurden mit dem recomWell Parvovirus B19 IgG bzw. IgM Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

Testprinzip

Beim recomWell Parvovirus B19 IgG bzw. IgM Assay werden jeweils IgG und IgM gegen das VP1- und VP2-Protein des B19V-Kapsids nachgewiesen. Der Assay ist nach dem Prinzip eines indirekten ELISAs aufgebaut. Dabei sind die hochgereinigten B19V-Antigene in den Kavitäten der Mikrotiterplatten fixiert. Im ersten Schritt werden die verdünnten Serum- oder Plasmaproben in den Kavitäten inkubiert, wobei die spezifischen Antikörper an die Antigene binden. Nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. Im nächsten Schritt werden Anti-Human-Immunglobulin-Antikörper (gegen IgG bzw. IgM), die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, in den Kavitäten inkubiert. In einem weiteren

Waschschritt werden nicht gebundene Konjugat-Antikörper entfernt. Im letzten Schritt werden mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Die Menge des umgesetzten Färbesubstrats und damit die Intensität der Färbung sind direkt proportional zur Menge der gebundenen Anti-B19V-Antikörper. Die Intensität der Färbung wird mit einem Photometer gemessen und lässt eine Aussage über die Konzentration der Antikörper in der Probe zu.

Testdurchführung

Vor Testbeginn wurden alle Reagenzien des Kits und die Proben auf Raumtemperatur erwärmt. Die Proben und Kontroll-Reagenzien wurden mit einem *Vortex*-Mischer gemischt und kurz zentrifugiert. Zunächst wurde der gebrauchsfertige Waschpuffer aus 5ml Waschpuffer-Konzentrat und 45ml deionisiertem Wasser pro Mikrotiterplattenstreifen in einem sterilen Messzylinder hergestellt. Die gebrauchsfertige Konjugatlösung wurde aus 10 μ l Anti-Human-IgG- bzw. IgM-Peroxidase-Konjugat und 1ml Verdünnungspuffer pro Mikrotiterplattenstreifen in einem Schraubverschluss-Röhrchen hergestellt und gut vermischt. Im nächsten Schritt wurden die Proben und Kontrollen verdünnt: beim Nachweis von Anti-B19V-IgG wurde je 1ml Verdünnungspuffer vorgelegt, 10 μ l Probe oder Kontrolle zugegeben und gut vermischt. Beim Nachweis von Anti-B19V-IgM wurde mit den Kontrollen wie oben vorgegangen, die Proben wurden zusätzlich wie vom Hersteller empfohlen mit Rheumafaktor-Absorbens, welches aus dem Lyophilisat und 5ml Aqua dest. hergestellt wurde, behandelt: dazu wurden in einem Röhrchen 100 μ l Rheumafaktor-Absorbens, 100 μ l Verdünnungspuffer und 5 μ l Probe vermischt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert, mit weiteren 300 μ l Verdünnungspuffer versetzt und erneut vermischt. Aus diesen verdünnten Ansätzen wurden je 100 μ l in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Dabei wurden je ein Ansatz mit der Positiv-, ein Ansatz mit der Negativ- und zwei Ansätze mit der Cutoff-Kontrolle mitgeführt. Die Platte wurde abgeklebt und für 60min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Waschschritt, in welchem die Platte fünfmal mit 300 μ l Waschpuffer gewaschen wurde. Im nächsten Schritt wurden in jede Vertiefung 100 μ l gebrauchsfertiges Anti-Human-IgG- bzw. -IgM-Peroxidase-Konjugat pipettiert, die Platte abgeklebt und für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschritt wie oben beschrieben. Daraufhin wurde in die Kavitäten 100 μ l Substratlösung gegeben und die Platte für 30min bei Raumtemperatur, geschützt vor direkter Sonneneinstrahlung, inkubiert. Die Reaktion wurde im letzten Schritt mit 100 μ l Stopplösung abgebrochen. Die Messung der Extinktionen

erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Photometer Infinite F50 bei einer Messwellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 620nm, die Auswertung mit der Software Magellan™. Die vom Hersteller vorgegebenen Validitätskriterien wurden vor der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Die Extinktionen der Proben wurden anhand folgender Formel in U/ml umgerechnet: $U/ml \text{ Probe} = (\text{Extinktion Probe} / \text{Extinktion Cutoff}) \times 20$. Dabei wurde der Mittelwert der beiden Cutoff-Kontrollen verwendet. Qualitativ wurden die Ergebnisse folgendermaßen interpretiert: negatives Ergebnis <20 U/ml, grenzwertiges Ergebnis ≥ 20 bis ≤ 24 U/ml und positives Ergebnis >24 U/ml.

2.3.4 Western Blot

Die Western Blots wurden aus Seren und EDTA-Plasmen mit dem recomLine Parvovirus B19 IgG bzw. IgM Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

Testprinzip

Hierbei handelt es sich um einen Line-Immunoassay, mit dem spezifische IgG bzw. IgM gegen einzelne B19V-Epitope nachgewiesen werden können.

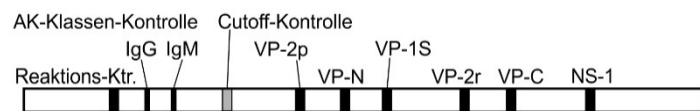


Abbildung 4 Aufbau des recomLine Parvovirus B19-Teststreifens (nach Herstellerangaben)

Folgende B19V-Antigene sind bereits auf den Nitrozellulosestreifen fixiert: Vp-2p (Hauptkapsidantigen (Konformationsepitope)), VP-N (N-terminale Hälfte der Strukturproteine VP-1 und VP-2), VP-1S (spezifisches Segment von VP-1), VP-2r (Hauptkapsidantigen (lineare Epitope)), VP-C (C-terminale Hälfte der Strukturproteine VP-1 und VP-2) und NS-1 (siehe Abbildung 4). Durch Inkubation der Teststreifen mit den Proben lagern sich spezifische Antikörper an diese Antigene an. Nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt und die Streifen mit Anti-Human-IgG- bzw. -IgM-Antikörper, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, inkubiert. In einem weiteren Waschschrift werden nicht gebundene Antikörper entfernt. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Farbreaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen, indem an der entsprechenden Stelle auf dem Streifen eine dunkle Bande erscheint. Daneben kann eine IgG-Aviditätsbestimmung durchgeführt werden. Hierzu wird ein weiterer IgG-Streifen mit der Probe inkubiert und vor Inkubation mit dem Konjugat mit der Aviditätslösung gewaschen. Dabei diffundieren niedrig-avide Antikörper ab, während

hoch-avide gebunden bleiben. Beurteilt wird die Avidität der Antikörper gegen VP-N und VP-1S, indem die Intensität der Banden mit der Intensität der Banden auf dem ersten IgG-Streifen verglichen wird. Die Analyse des Antigen-Reaktionsmusters und der Avidität der Antikörper erlaubt zusätzliche Aussagen über den Infektionsstatus.

Testdurchführung

Vor Testbeginn wurden alle Reagenzien und die Proben auf Raumtemperatur erwärmt, die Proben mit einem *Vortex*-Mixer gemischt und kurz zentrifugiert. Der gebrauchsfertige Waschpuffer A wurde aus 0,1g Magermilchpulver, 2ml Waschpuffer A-Konzentrat und 18ml deionisiertem Wasser pro Blotstreifen in einem sterilen Messzylinder hergestellt. Die Konjugat-Lösung wurde aus 20 μ l IgG- bzw. -IgM-Konjugat-Konzentrat und 2ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A pro Blotstreifen in einem Schraubverschluss-Röhrchen hergestellt. Im ersten Schritt der Testdurchführung wurden die Blotstreifen jeweils in eine Vertiefung der Inkubationsschale gelegt und 2ml gebrauchsfertiger Waschpuffer A pro Vertiefung vorgelegt. Zu jeder Vertiefung wurden 20 μ l Probe hinzugefügt. Es wurde sichergestellt, dass die Streifen vollständig in der Flüssigkeit untergetaucht sind. Die Schale wurde abgedeckt und für 60min bei einer Frequenz von 90/min auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Im anschließenden Waschvorgang wurden folgende Schritte insgesamt dreimal durchgeführt: die Flüssigkeit wurde mit der *Vakuumpumpe* abgesaugt, jede Vertiefung wurde mit 2ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A befüllt und die Inkubationsschale für 5min auf den Horizontalschüttler gestellt. Im nächsten Schritt wurden die für die Aviditätsbestimmung bestimmten Blotstreifen mit 2ml gebrauchsfertiger Aviditätslösung, die zuvor aus dem Aviditätsreagenz und 40ml gebrauchsfertigem Waschpuffer A hergestellt wurde, 3min inkubiert. Die anderen Streifen wurden zeitgleich in gebrauchsfertigem Waschpuffer A inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschvorgang wie oben beschrieben. Danach wurden je 2ml gebrauchsfertiger Waschpuffer A und 20 μ l gebrauchsfertige IgG- bzw. -IgM-Konjugat-Lösung in die Vertiefungen pipettiert und die Streifen weitere 45min abgedeckt auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang. Für die darauffolgende Substratreaktion wurde 1,5ml Substrat in jede Vertiefung gegeben und die Streifen erneut für 10min auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen. Vor Auswertung wurden die Streifen zwei Stunden getrocknet. Die vom Hersteller vorgegebenen Validitätskriterien wurden vor der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Die Intensität der Banden wurde im Bezug zur Cutoff-Kontrolle bewertet: keine Reaktion (-), sehr

schwache Intensität/geringer als Cutoff-Bande (+/-), schwache Intensität/entspricht Cutoff-Bande (+), starke Intensität/stärker als Cutoff-Bande (++) , sehr starke Intensität (+++). Zur Interpretation der Messergebnisse siehe Tabelle 13.

Tabelle 13 Auswertung der Banden im recomLine Parvovirus B19 IgG und IgM Assay nach Herstellerangaben

recomLine Parvovirus B19 IgG Assay*		
keine Reaktion oder andere Konstellation als unten		IgG negativ
VP-N oder VP-2r oder VP-C	mindestens +	IgG fraglich
VP-2p oder zwei Antigene (VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C)	mindestens +	IgG positiv
recomLine Parvovirus B19 IgM Assay		
keine Reaktion oder andere Konstellation als unten		IgM negativ
VP-N oder VP-1S oder VP-2r oder VP-C	mindestens +	IgM fraglich
VP-2p oder zwei Antigene (VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C)	mindestens +	IgM positiv

* Bei einem positiven Ergebnis für IgG spricht eine vorhandene NS-1-Reaktivität im IgG für eine mindestens 6 Wochen zurückliegende Infektion.

Die Avidität der IgG wurde durch Vergleich der Intensität der VP-N- und VP-1S-Banden des jeweiligen IgG- und Aviditätsstreifens beurteilt. Es wurden dafür nur Banden berücksichtigt, die auf dem IgG-Streifen mindestens so intensiv gefärbt waren wie die Cutoff-Kontrolle. Folgende Ergebnisse waren möglich: geringe Avidität, wenn die Intensität der Banden auf dem Aviditätsstreifen um deutlich mehr als 50% im Vergleich zum IgG-Streifen abnahm, intermediäre Avidität bei einer Abnahme um ca. 50%, hohe Avidität, wenn die Intensität nicht oder kaum abnahm. Hoch-avide Antikörper entwickeln sich zwischen vier und acht Wochen nach Infektion.

2.3.5 Datenbankanalyse

Als Surrogatmarker für das Vorhandensein einer aplastischen Anämie wurden die Hämoglobinspiegel und Retikulozytenzahlen im Verhältnis zum B19V-DNA-Status analysiert. Dafür wurden jeweils Werte aus dem Intervall +/- 7 Tage um den Tag der Einsendung der untersuchten Probe betrachtet und der zeitlich nächste Wert für die Analyse verwendet. Bei mehreren Werten im gleichen Abstand wurde der Median aus diesen Werten gebildet. Die verwendeten Referenzwerte für Anämie und Retikulozytopenie finden sich in Tabelle 14 und Tabelle 15.

Tabelle 14 Altersentsprechende Referenzwerte Hämoglobin des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des UKR

Alter		Hämoglobin [g/dl]	
von	bis	von	bis
0	- 1 T	17,7	- 26,5
2	- 7 T	16,2	- 25,5
8	- 30 T	10,1	- 24
31	- 59 T	9,2	- 18
60	- 365 T	9	- 14,6
366	- 730 T	9,1	- 15
2	- 9 J	9,2	- 15,5
10	- 11 J	10,7	- 16,5
12	- 13 J	10,8	- 16,2
14	- 17 J	11	- 15,9
18	- 120 J weiblich	11,2	- 15,7
18	- 120 J männlich	13,7	- 17,5

Tabelle 15 Altersentsprechende Referenzwerte Retikulozyten nach [94]

Alter	Retikulozyten [in ‰ der Erythrozyten]
0-14 Tage	33-73
14 Tage – 1 Jahr	15-25
1-3 Jahre	13-27
3-8 Jahre	15-29
8-12 Jahre	13-29
12 Jahre - Erwachsenenalter	11-35

2.3.6 Aktenanalyse

Die Krankenakten wurden im Kollektiv der lebertransplantierten Kinder auf die Grunderkrankung, die Art des Spenderorgans, die immunsuppressive Therapie (s. Tabelle 16), IVIG-Anwendungen und auf mit einer B19V-Infektion möglicherweise in Zusammenhang stehende klinische Zeichen, insbesondere Anämie, Arthralgien und Exantheme, hin analysiert.

Tabelle 16 Steroidreduktionsschemata nach Kinder-LTX am UKR

	Standard-Schema*	Hochdosis-Schema*
1.-6. Tag	15mg/m ² KOF/Tag	60mg/m ² KOF/Tag
ab 7. Tag	10mg/m ² KOF/Tag	30mg/m ² KOF/Tag
ab 14. Tag	7,5mg/m ² KOF/Tag	15mg/m ² KOF/Tag
ab 21. Tag	7,5mg/m ² KOF/Tag	12mg/m ² KOF/Tag
ab 28. Tag	4mg/m ² KOF/Tag	9mg/m ² KOF/Tag
ab 3. Monat	2,5mg/m ² KOF/Tag	6mg/m ² KOF/Tag
ab 4. Monat	1mg/m ² KOF/Tag	2-4mg/m ² KOF/Tag

* Minimal 1 mg/Tag.

2.3.7 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics 21 durchgeführt. Der Vergleich der Mittelwerte bei unabhängigen Stichproben erfolgte mittels t-Test oder alternativ Mann-Whitney-Test. Der Vergleich der Häufigkeiten von Variablen zwischen verschiedenen Kollektiven in unabhängigen Stichproben erfolgte mittels χ^2 -Test oder alternativ Fisher's Exact-Test, in abhängigen Stichproben mittels McNemar-Test. Die statistischen Testmethoden wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Durchführungsvoraussetzungen angewandt. Insbesondere die Voraussetzung der Normalverteilung für den t-Test wurde anhand von Histogramm, Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. Shapiro-Wilk-Test überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Untere Nachweisgrenze für B19V/gt1 im B19V-PCR-Assay

Vor Beginn der Versuchsreihen wurde zunächst die untere Nachweisgrenze für B19V/gt1 im B19V/gt1-Ansatz, welcher neben dem Multiplex-Assay verwendet wurde, getestet. Hierbei wurde untersucht, bei welcher Konzentration mindestens 95% aller Plasmid-Ansätze als positiv detektiert wurden. Das Ergebnis des Versuchs zeigt Abbildung 5. Dabei waren 2/2 Plasmidansätze mit der Konzentration 10^2 Plasmid-geq/Ansatz, 2/2 mit der Konzentration 10^1 Plasmid-geq/Ansatz, 20/20 mit der Konzentration 3×10^0 Plasmid-geq/Ansatz und 4/20 mit der Konzentration 10^0 Plasmid-geq/Ansatz positiv. Somit ließ sich in unserem Versuchsaufbau eine untere Nachweisgrenze von 3×10^0 Plasmid-geq/Ansatz bzw. 600 B19V-geq/ml oder 215 IU/ml für B19V/gt1 nachweisen.

3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	10^1 <i>pos.</i>	10^1 <i>pos.</i>
3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	3×10^0 <i>pos.</i>	10^2 <i>pos.</i>	10^2 <i>pos.</i>
10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>pos.</i>	10^0 <i>pos.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>pos.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	Neg-Ko. <i>neg.</i>	Neg-Ko. <i>neg.</i>
10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>pos.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	10^0 <i>neg.</i>	Neg-Ko. <i>neg.</i>	Neg-Ko. <i>neg.</i>

Abbildung 5 Versuchsaufbau zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für B19V/gt1

3.2 Parvovirus B19 bei adulten Organtransplantationen

3.2.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 266 Patienten nach adulter Organtransplantation aufgenommen (30 nach Herztransplantation, 89 nach Lebertransplantation und 147 nach Nierentransplantation). Bei 13 Patienten wurden Re-Transplantationen durchgeführt (bei einem herztransplantierten und zwölf lebertransplantierten Patienten), ein Patient erhielt eine simultane Leber- und Nierentransplantation, ein weiterer eine simultane Herz- und Nierentransplantation (jeweils statistisch als separate Fälle behandelt). Durch zwei Re-Transplantationen ergab sich bei einem lebertransplantierten Patienten ein verlängerter Beobachtungszeitraum von insgesamt sieben Monaten. Bei zwei lebertransplantierten Patienten wurden Re-Transplantationen später als sechs Monate nach der primären Transplantation durchgeführt, wodurch separate Beobachtungszeiträume entstanden (je zwei Fälle). Bei den übrigen Patienten veränderte sich dadurch der Beobachtungszeitraum

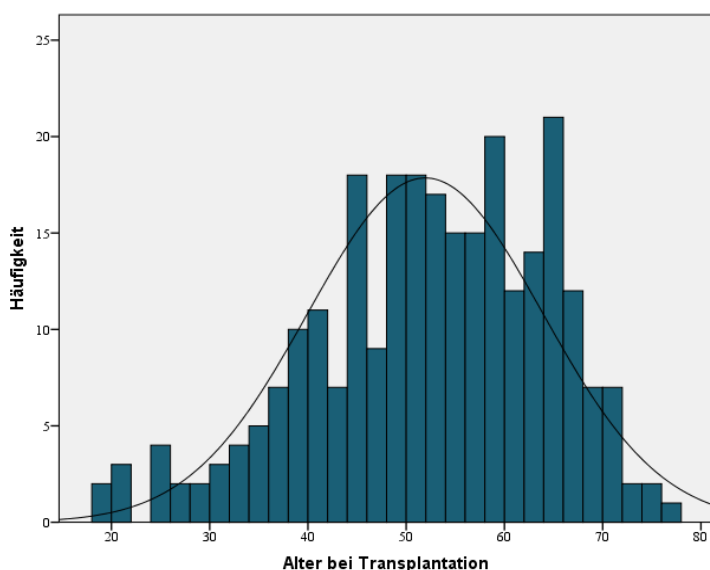


Abbildung 6 Altersverteilung im Erwachsenenkollektiv [Jahre]

Nierentransplantierte (54,9%).

Die Altersverteilung im Erwachsenenkollektiv zeigt Abbildung 6. Das mittlere Alter bei Transplantation betrug 52 Jahre mit einer Range von 19 bis 76 Jahren. 178 Patienten waren männlich (66,4%), 90 weiblich (33,6%). Die Zusammensetzung der Subgruppen kann Tabelle 17 entnommen werden.

nicht (bei acht Patienten wurde die Re-Transplantation innerhalb eines Monats nach der Ersttransplantation durchgeführt). Jeder Beobachtungszeitraum wurde statistisch als ein Patientenfall behandelt, sodass insgesamt 268 Fälle untersucht wurden, darunter 30 Herztransplantierte (11,2%), 91 Lebertransplantierte (33,9%) und 147

Tabelle 17 Erwachsenenkollektiv

	N	Alter [Jahre]							Geschlecht [N (%)]	
		M	SD	Min	Max	Mdn	1.QT	3.QT	m	w
HTX	30	49,6	11,5	20	67	51,5	45,0	58,0	23 (76,7)	7 (23,3)
LTX	91	51,3	11,4	19	73	53,0	45,0	59,0	57 (62,6)	34 (37,4)
NTX	147	52,8	12,4	19	76	53,0	44,0	64,0	98 (66,7)	49 (33,3)

N Anzahl, M Mittelwert, SD Standardabweichung, Min Minimum, Max Maximum, Mdn Median, 1.QT erste Quartile, 3.QT dritte Quartile, m männlich, w weiblich.

3.2.2 Charakteristik der Proben

3.2.2.1 Probenverteilung bei DNA-Prävalenz-Untersuchung mittels RT-qPCR

Insgesamt wurden 950 Proben nach Transplantation auf das Vorhandensein von B19V-DNA untersucht. Bei 268 Patientenfällen ergab sich damit eine durchschnittliche Probenanzahl von 3,5 Proben/Fall (bei HTX 3,1, bei LTX 3,7 und bei NTX 3,6 Proben/Fall).

949 Proben stammten aus dem geplanten Untersuchungszeitraum von 6 Monaten posttransplantär. Darüber hinaus wurde bei dem Patienten mit verlängertem Untersuchungszeitraum (LTX_23) eine Probe aus Monat 7 untersucht. Die Verteilung der Proben auf die Monate ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18 Zeitliche Verteilung der DNAämie nach TX im Erwachsenenkollektiv

Monat nach TX	Verfügbare Blutproben, Anzahl	Patienten mit Proben, %	DNA-positive Proben, Anzahl (%)	Initiale Detektion von B19V-DNA, Anzahl (% der DNAämischen Patienten)
1	261	97	7 (2,7)	7 (78)
2	224	84	3 (1,3)	1 ¹ (11)
3	189	71	4 (2,1)	1 ² (11)
4	94	35	1 (1,0)	0
5	80	30	1 (1,3)	0
6	101	38	1 (1,0)	0
7	1	33 ³	0 (0,0)	0

¹ Bei diesem Patienten war das Serum aus Monat 1 B19V-DNA-negativ.

² Erste Probe dieses Patienten.

³ Drei Patienten mit einem verlängerten Beobachtungszeitraum.

3.2.2.2 *Probenverteilung bei Analyse des Serostatus*

Für jeden Fall wurde eine vor Transplantation gewonnene Probe auf Anti-B19V-IgG getestet. Insgesamt wurden entsprechend der Fälle 268 Proben untersucht. Die Proben wurden so selektiert, dass der Zeitpunkt möglichst nah vor der Transplantation lag. Wenn dies nicht möglich war, wurde eine kurz nach Transplantation gewonnene Probe gewählt. Die Probengewinnung erfolgte im Median an Tag -4 (25. Perzentile: -69 Tage, 75. Perzentile: 4 Tage, Range -702 Tage bis 66 Tage). 151 Proben (56,3%) stammten aus dem Zeitraum vor Transplantation, 106 davon aus den letzten drei Monaten. 117 Proben (43,7%) mussten aus dem Zeitraum nach Transplantation herangezogen werden, davon jedoch 114 aus Monat 1.

3.2.2.3 *Probenmaterial*

Für die PCR-Untersuchungen nach Transplantation wurden 862 Serumproben (90,7%), 87 EDTA-Plasma-Proben (9,2%) und eine EDTA-Vollblut-Probe (0,1%) verwendet, für die serologischen Untersuchungen vor Transplantation 265 Serumproben (98,9%) und drei EDTA-Plasma-Proben (1,1%).

3.2.3 **DNA-Prävalenz**

Von den insgesamt 950 untersuchten Proben waren zwei positiv (0,2%) und 15 schwach positiv (1,6%) für B19V-DNA. Eine untersuchte Probe war wiederholt in der PCR inhibiert.

3.2.3.1 *Zeitliche Verteilung*

Die Verteilung der DNAämischen Proben ist in Tabelle 18 beschrieben. Es zeigt sich ein Unterschied der B19V-DNA-Prävalenz im zeitlichen Verlauf mit 14 DNA-positiven von insgesamt 674 Proben (2,1%) in den ersten drei Monaten nach Transplantation und drei von 275 Proben (1,1%) in den folgenden drei Monaten. Dieser Unterschied war im McNemar-Test höchst signifikant ($p < 0,001$).

3.2.3.2 *Organspezifische Unterschiede*

Insgesamt zeigten neun der 268 Fälle eine B19V-DNAämie (3,4%). Die genaue Unterteilung in die jeweiligen Subgruppen zeigt Tabelle 19. Die Analyse der DNA-Prävalenz in den verschiedenen Patientengruppen im Vergleich zum Rest mittels Fisher's Exact-Test ergab keine signifikanten Unterschiede, allerdings zeigte die Untersuchung der

nierentransplantierten Patienten mit einem p-Wert von 0,0833 ein Trend hinsichtlich einer niedrigeren DNA-Prävalenz.

Tabelle 19 Anzahl und Daten der Transplantatempfänger im Erwachsenenkollektiv und deren Ergebnisse der B19V-DNA-Detektion

Transplantat-Empfänger (Gruppe)	Patientenalter (Jahre), Range, Mittelwert	Patienten, Anzahl	Proben, Anzahl	Proben/Patient, Anzahl	DNAämische Patienten, Anzahl (%)	DNA-positive Proben, Anzahl (%)
Niere	19-76, 53	147*	522	3,6	2 (1,4)	6 (1,1)
Leber	19-73, 51	91*	334	3,7	5 (5,5)	7 (2,1)
Herz	20-67, 50	30*	94	3,1	2 (6,7)	4 (4,3)
Alle Patienten	19-76, 52	268*	950	3,5	9 (3,4)	17 (1,8)

* Zwei Patienten erhielten zwei Organe gleichzeitig: ein Patient eine Niere und eine Leber, ein Patient ein Herz und eine Niere.

Bei den herztransplantierten Patienten waren vier der 93 messbaren Proben (eine Probe inhibiert) DNAämisch (4,3%), bei den lebertransplantierten sieben von 334 Proben (2,1%) und bei den nierentransplantierten Patienten sechs von 522 Proben (1,1%). Im Vergleich der Häufigkeiten B19V-DNAämischer Proben in den verschiedenen Patientengruppen mittels χ^2 -Test bzw. Fisher's Exact-Test ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

3.2.3.3 Überblick über DNAämische Fälle

Von den 268 Patientenfällen wiesen neun mindestens einmal eine B19V-DNAämie auf (3,4%; 2 NTX, 5 LTX, 2 HTX). Bei diesen Patienten wurde nachträglich auch die Probe vor Transplantation bzw. alternativ möglichst bald nach Transplantation auf das Vorhandensein von B19V-DNA untersucht. Der Verlauf der positiven Patienten ist in Tabelle 20 dargestellt. Bei einem herztransplantierten Patienten wurde B19V/gt2 nachgewiesen, die übrigen DNAämischen Patienten zeigten B19V/gt1. Bei der Genotypisierung traten aufgrund der ähnlichen Nukleotidsequenz teilweise Mitreaktionen in den Assays für andere Genotypen auf. Dennoch war die Affinität der Sonden zum eigentlich vorliegenden Genotyp am höchsten, sodass eine definitive Zuordnung durch Vergleich der verschiedenen Assays bezüglich Reaktionsverhalten im Amplifikationsplot und im Multicomponentplot möglich war. Ein Beispiel einer solchen Mitreaktion und die Erläuterung der Interpretation zeigt Abbildung 7.

Tabelle 20 Charakterisierung der B19V-DNAämischen Patienten im Erwachsenenkollektiv

Patienten-ID, Geschlecht, Alter (Jahre)	Tag post-TX	DNA (geq/ml)	B19V/ gt	Anti-B19V-IgG	IgG-Quantität ¹	Hb (g/dl) ²	Reti (%o) ²
NTX_10_046, m, 48	7	<600		pos	++		
	14	<600	1	pos	++	13,3	15,6
	66	0				15,5	11,7
	90	<600		pos	++	16,2	nd
NTX_10_067, m, 67	0	<600		pos	++		
	27	<600	1	pos	++	11,4	nd
	66	<600				11,6	nd
	89	<600				12,3	nd
	144	<600		pos	++	13,7	nd
LTX_036, m, 54	-215	<600		pos	++		
	31	<600	1	pos	++	7,7	nd
	72	<600				7,8	nd
	79	<600				7,5	nd
	120	0		pos	++	nd	nd
LTX_046, m, 44	-29	<600		pos	++		
	32	0				7,8	nd
	60	<600	1	pos	+++	6,8	nd
LTX_050, m, 58	-15	0		pos	++		
	30	<600	1	pos	++	8,1	nd
	57	0		pos	++	7,6	nd
	84	0				7,1	nd
	127	0				7,9	9,8
LTX_081, m, 50	-493	0		pos	+++		
	31	<600	1	pos	++	7	nd
LTX_069, m, 61	-9	0		pos	++		
	29	<600	1	pos	+++	7,4	nd
	64	0		pos	+++	9,5	nd
	82	0				8,9	6
	126	0				8,3	nd
	160	0				8,4	nd
HTX_001, m, 52	-71	0		neg	--		
	25	600	1	neg	--	8,6	nd
	52	0		neg	--	9,2	19
	87	0				9,5	17,1

	124	0				8,5	nd
	144	0				9,5	nd
	176	0				12,4	nd
HTX_030, m, 56	-23	0		neg	--		
	84	1100	2	pos	++	9,5	14,7
	130	<600		pos		9,7	nd
	177	<600		pos	++	8,7	nd

¹ semiquantitative Darstellung: 24,1 bis 49,9 U/ml: +, 50,0 bis 199,9 U/ml: ++, >200 U/ml: +++.

² Die Werte von Hb und Reti entsprechen jeweils dem nächstmöglichen Wert zum entsprechenden Tag und entstammen maximal der Zeitspanne ± 3 Tage.

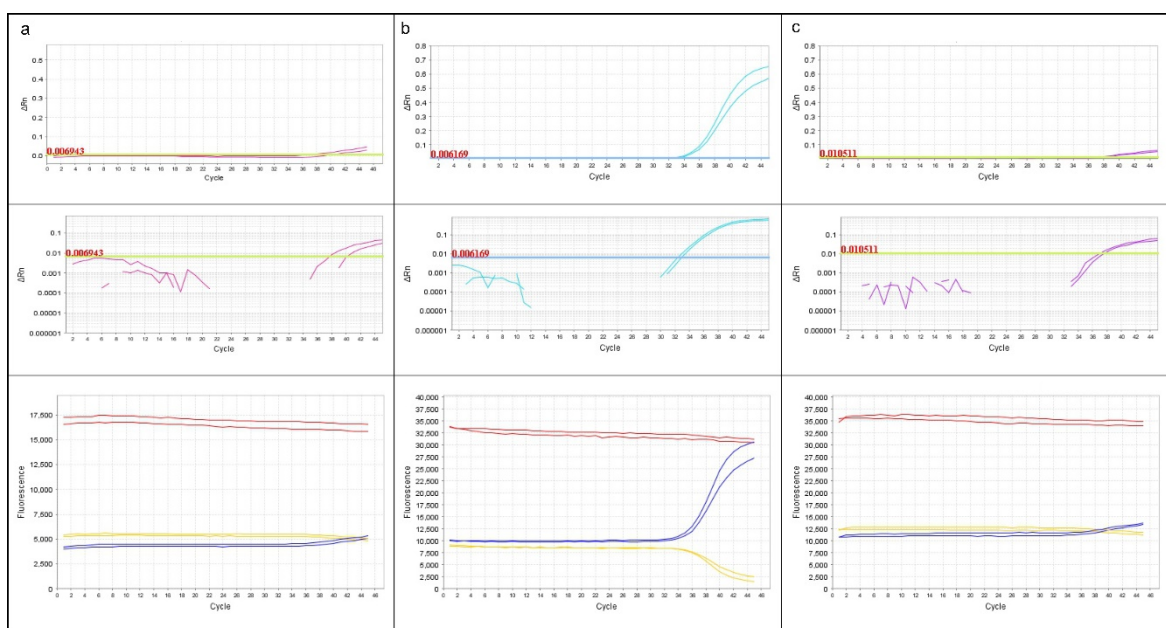


Abbildung 7 Mitreaktion der B19V/gt1- und B19V/gt3-Assays bei der Probe von Tag 84 von HTX_030 (B19V/gt2). In der Abbildung sind jeweils der Amplifikationsplot in linearer und logarithmischer Darstellung und der Multicomponentplot von a) B19V/gt1, b) B19V/gt2 und c) B19V/gt3 zu sehen. In diesem Fall wurde der Schwellenwert der Software in allen drei Assays überschritten, wenn auch im B19V/gt2-Assay der kleinste C_T -Wert vorlag. Entscheidend für die Interpretation war der Verlauf im Multicomponentplot, wo nur in b) der typische sigmoide Anstieg des Signals des Reporter-Farbstoffes FAM (blaue Linie) mit gegenläufigem Abfall des Quenchersignals des Farbstoffes TAMRA (gelbe Linie) deutlich wird.

3.2.4 Serostatus

3.2.4.1 Initialer Serostatus

Zur zeitlichen Verteilung der hierfür verwendeten Proben relativ zur Transplantation siehe Kapitel 3.2.2.2. Die Verteilung der Anti-B19V-IgG-Ergebnisse in Bezug auf Subgruppe und Zeitpunkt der Probe wird in Tabelle 21 genauer dargestellt. Die Seroprävalenz von Anti-B19V-IgG in den Proben vor und nach TX war fast identisch (79,5% vor und 82,9% nach TX positiv).

Tabelle 21 Verteilung des Anti-B19V-IgG-Status bzgl. zeitlichem Bezug zu TX und TX-Art im Erwachsenenkollektiv

Anti-B19V-IgG	Niere			Leber			Herz			Alle Patienten		
	vor TX	nach TX	Summe	vor TX	nach TX	Summe	vor TX	nach TX	Summe	vor TX	nach TX	Summe
positiv, n (%)	30 (73)	86 (81)	116 (79)	72 (86)	7 (100)	79 (87)	18 (69)	4 (100)	22 (73)	120 (80)	97 (83)	217 (81)
negativ, n (%)	11 (27)	20 (19)	31 (21)	12 (14)	0 (0)	12 (13)	8 (31)	0 (0)	8 (27)	31 (20)	20 (17)	51 (19)
Summe, N	41	106	147	84	7	91	26	4	30	151	117	268

Bei den seropositiven Proben lag der Mittelwert der Aktivität bei 138 U/ml (Standardabweichung: 82 U/ml), der Median bei 129 U/ml (25. Perzentile: 72 U/ml, 75. Perzentile: 192 U/ml), die Range betrug 24 bis 736 U/ml.

3.2.4.2 Serologischer Verlauf bei Fällen mit DNAämie

Initial seronegative DNAämischen Fälle wurden auf Serokonversion im Verlauf untersucht. Sieben der neun Patienten waren bereits vor Transplantation seropositiv, von den beiden initial seronegativen Patienten serokonvertierte einer im Verlauf. Der semiquantitativ dargestellte Verlauf der Anti-B19V-IgG-Titer der DNAämischen Fälle kann Tabelle 20 entnommen werden.

Bei Patient HTX_030 trat eine DNAämie mit Serokonversion in Monat 3 auf. Im weiteren Verlauf waren die Anti-B19V-IgG-Antikörper in den untersuchten sechs Monaten positiv. Der Antikörperverlauf wurde in diesem Fall mittels IgM-ELISAs und Western Blots genauer untersucht. An den Tagen -23 und 84 wurden Anti-B19V-IgM-ELISAs durchgeführt, welche jeweils negativ waren. Auch der IgM-Western Blot war an Tag 84 negativ. An Tag

84, 130 und 177 war der IgG-Western Blot jeweils positiv, wobei die IgG an Tag 84 eine hohe Avidität zeigten. An den anderen beiden Tagen war die Avidität nicht beurteilbar.

3.2.4.3 *Korrelation von DNAämie und Serostatus*

Von den 51 zu Beginn des Zeitraums seronegativen Fällen waren zwei positiv für B19V-DNA (3,9%), von den 217 seropositiven Fällen sieben (3,2%). Im Fisher's Exact-Test ergab sich hier kein signifikanter Unterschied.

3.2.5 **Korrelation von DNAämie und Surrogatmarkern der aplastischen Anämie**

3.2.5.1 *Korrelation mit Hämoglobinspiegeln und Anämieprävalenz*

Vergleich mit Hämoglobinspiegeln

Für 925 der 952 Proben im Kollektiv adulter Organtransplantierte waren zeitlich zusammenhängende Hämoglobinwerte vorhanden. Die inhibierte Probe wurde von der statistischen Analyse ausgeschlossen, sodass 924 Proben in diese eingingen.

Von diesen 924 Proben waren 905 negativ, zwei positiv und 17 schwach positiv für B19V-DNA. Der mittlere Hämoglobinspiegel in der Gruppe der DNA-positiven Proben lag bei 10,09 g/dl (Standardabweichung: 2,71 g/dl), in der Gruppe der B19V-DNA-negativen Proben bei 10,48 g/dl (Standardabweichung: 1,92 g/dl). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war im t-Test nicht signifikant.

Von den Fällen mit DNAämie waren 34 Proben vorhanden, davon waren zwei positiv, 17 schwach positiv und 15 negativ für B19V-DNA. Der mittlere Hämoglobinspiegel lag in der Gruppe der DNAämischen Proben bei 10,09 g/dl (Standardabweichung: 2,71 g/dl), in der Gruppe der negativen Proben bei 9,26 g/dl (Standardabweichung: 2,12 g/dl). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war im t-Test nicht signifikant.

Bei den Fällen mit DNAämie lag der mittlere Hämoglobinspiegel bei 9,72 g/dl (Standardabweichung: 2,47 g/dl), in der Gruppe der negativen Fälle bei 10,49 g/dl (Standardabweichung: 1,91 g/dl). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant, allerdings zeichnete sich mit einem p-Wert von 0,081 dennoch ein Trend ab.

Alle erwachsenen Patienten mit einer B19V-DNAämie in dieser Studie waren männlich. Da sich die Referenzwerte für Hämoglobin geschlechterspezifisch unterscheiden, wurde die obige Auswertung nur unter den männlichen Patienten wiederholt: der Vergleich aller

Proben zeigte einen mittleren Hämoglobinspiegel bei den DNAämischen Proben von 10,09 g/dl (Standardabweichung 2,71 g/dl) und bei den negativen Proben von 10,59 g/dl (Standardabweichung 1,99 g/dl). Der Unterschied war nicht signifikant.

Bei männlichen Fällen mit DNAämie zeigte sich bei den DNAämischen Proben einen Mittelwert von 10,09 g/dl (Standardabweichung 2,71 g/dl), bei den DNA-negativen Proben war der Mittelwert mit 9,26 g/dl (Standardabweichung 2,12 g/dl) sogar niedriger. Auch dieser Unterschied war im t-Test nicht signifikant.

Fälle mit DNAämie wiesen unter den männlichen Erwachsenen einen mittleren Hämoglobinspiegel von 9,72 g/dl (Standardabweichung 2,47 g/dl) auf, Patienten ohne DNAämie einen Mittelwert von 10,62 g/dl (Standardabweichung 1,97 g/dl). Dieser Unterschied war im t-Test signifikant ($p=0,011$).

Vergleich mit Anämieprävalenz

Für die Beurteilung der Anämieprävalenz wurden die Referenzwerte des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des UKR verwendet, die in Tabelle 14 abgebildet sind. Der untere Referenzwert für Hämoglobin lag bei Männern bei 13,7 g/dl und bei Frauen bei 11,2 g/dl.

Bei 17 der 19 DNA-positiven Proben (89,5%) und bei 761 der 905 B19V-DNA-negativen Proben (84,1%) war eine Anämie nachweisbar. Der Unterschied war jedoch im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

Bei den DNAämischen Fällen lag bei 17 der 19 DNA-positiven Proben (89,5%) und bei 14 der 15 negativen Proben (93,3%) eine Anämie vor. Der Unterschied war im Fisher's Exact-Test ebenfalls nicht signifikant.

Bei DNAämischen Patienten war bei 31 von 34 Proben eine Anämie nachzuweisen (91,2%), in der Gruppe der negativen Patienten bei 748 von 891 Proben (84,0%). Der Unterschied war im χ^2 -Test nicht signifikant.

Die Odds Ratio für das Vorliegen einer Anämie bei Proben mit B19V-DNAämie lag im Erwachsenenkollektiv bei 1,61.

3.2.5.2 *Korrelation mit Retikulozytenzahlen und Retikulozytopenieprävalenz*

Vergleich mit Retikulozytenzahlen

Für 395 der 952 Proben wurden zeitlich korrelierende Retikulozytenwerte gefunden, davon waren 385 negativ, zwei positiv und acht schwach positiv für B19V-DNA.

Der Mittelwert der Retikulozytenzahlen lag bei DNA-positiven Proben bei 60,42 ‰ (Standardabweichung: 41,84‰), bei negativen Proben sogar bei 53,67‰ (Standardabweichung: 39,54 ‰). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war im Mann-Whitney-Test nicht signifikant.

Von den Fällen mit DNAämie waren nur 17 Proben mit Retikulozytenwerten vorhanden, davon waren zwei positiv, acht schwach positiv und sieben negativ für B19V-DNA. Die Retikulozytenzahlen lagen im Mittel bei den DNA-positiven Proben bei 60,42 ‰ (Standardabweichung: 41,84 ‰), in der Gruppe der negativen Proben sogar niedriger bei 26,23‰ (Standardabweichung: 32,53 ‰). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war im Mann-Whitney-Test nicht signifikant.

Bei den Fällen mit DNAämie lagen die mittleren Retikulozytenzahlen bei 46,34 ‰ (Standardabweichung: 41,02 ‰), in der Gruppe der negativen Patienten bei 54,29 ‰ (Standardabweichung: 39,63 ‰). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war im Mann-Whitney-Test nicht signifikant.

Vergleich mit Retikulozytopenieprävalenz

Für die Beurteilung der Retikulozytopenieprävalenz wurden die Referenzwerte aus der Literatur verwendet, die in

Tabelle 15 aufgelistet sind. Demnach liegt bei Erwachsenen eine Retikulozytopenie bei Werten unter 11‰ vor.

Bei keiner der zehn DNA-positiven Proben war eine Retikulozytopenie nachzuweisen, in der Gruppe der negativen bei 51 von 385 Proben (13,2%). Der Unterschied zwischen den Gruppen war im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

Bei den DNAämischen Fällen lag bei keiner der zehn DNA-positiven Proben und bei zwei von sieben negativen Proben (28,6%) eine Retikulozytopenie vor. Der Unterschied war im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

Bei den DNAämischen Patienten war bei zwei von 17 Proben eine Retikulozytopenie nachzuweisen (11,8%), in der Gruppe der negativen Patienten bei 49 von 379 Proben (12,9%). Der Unterschied war im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

3.3 Parvovirus B19 bei pädiatrischen Lebertransplantationen

3.3.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 51 Kinder und Jugendliche nach Lebertransplantation aufgenommen. Bei sechs Patienten wurden Re-Transplantationen durchgeführt. Durch zwei Re-Transplantationen ergab sich bei einem Patienten ein verlängerter Beobachtungszeitraum von insgesamt 17 Monaten, bei zwei Patienten wurden Re-Transplantationen später als sechs Monate nach der primären Transplantation durchgeführt, wodurch separate Beobachtungszeiträume entstanden (ein Patient mit zwei Fällen, ein Patient mit drei Fällen). Bei den übrigen drei Patienten veränderte sich dadurch der Beobachtungszeitraum nicht (bei zwei Patienten wurde die Re-TX unmittelbar nach der Primär-TX durchgeführt, bei einem Patienten war kein späteres Probenmaterial vorhanden). Jeder Beobachtungszeitraum wurde statistisch als ein Fall behandelt, sodass insgesamt 54 Patientenfälle untersucht wurden.

Die Altersverteilung im Kinderkollektiv zeigt Abbildung 8. Das Alter bei Transplantation betrug im Median 2,00 Jahre (25. Perzentile: 0 Jahre, 75. Perzentile: 7,25 Jahre) bei einer Range von 0 bis 18 Jahren. 24 Patienten waren männlich (44,4%), 30 weiblich (55,6%). Von den 54 Fällen erhielten 19 eine Lebendspende (35,2%), 35 eine postmortale Spende (64,8%).

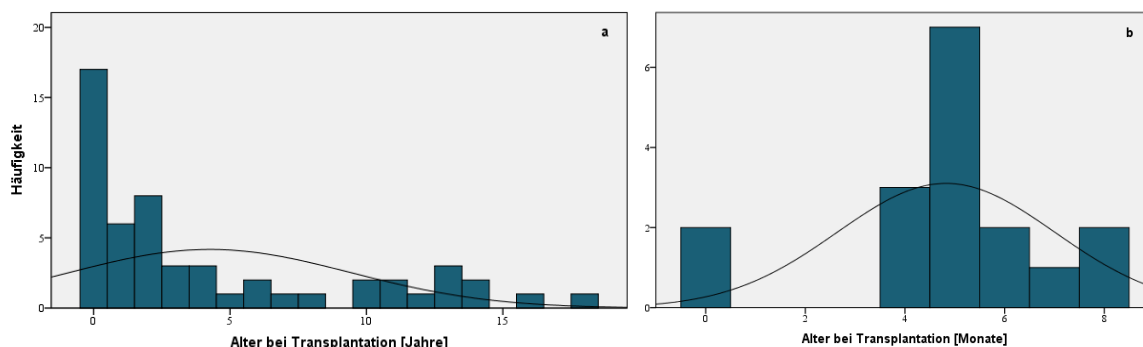


Abbildung 8 Altersverteilung im Kinderkollektiv a) in Jahren b) zusätzlich bei den Säuglingen in Monaten.

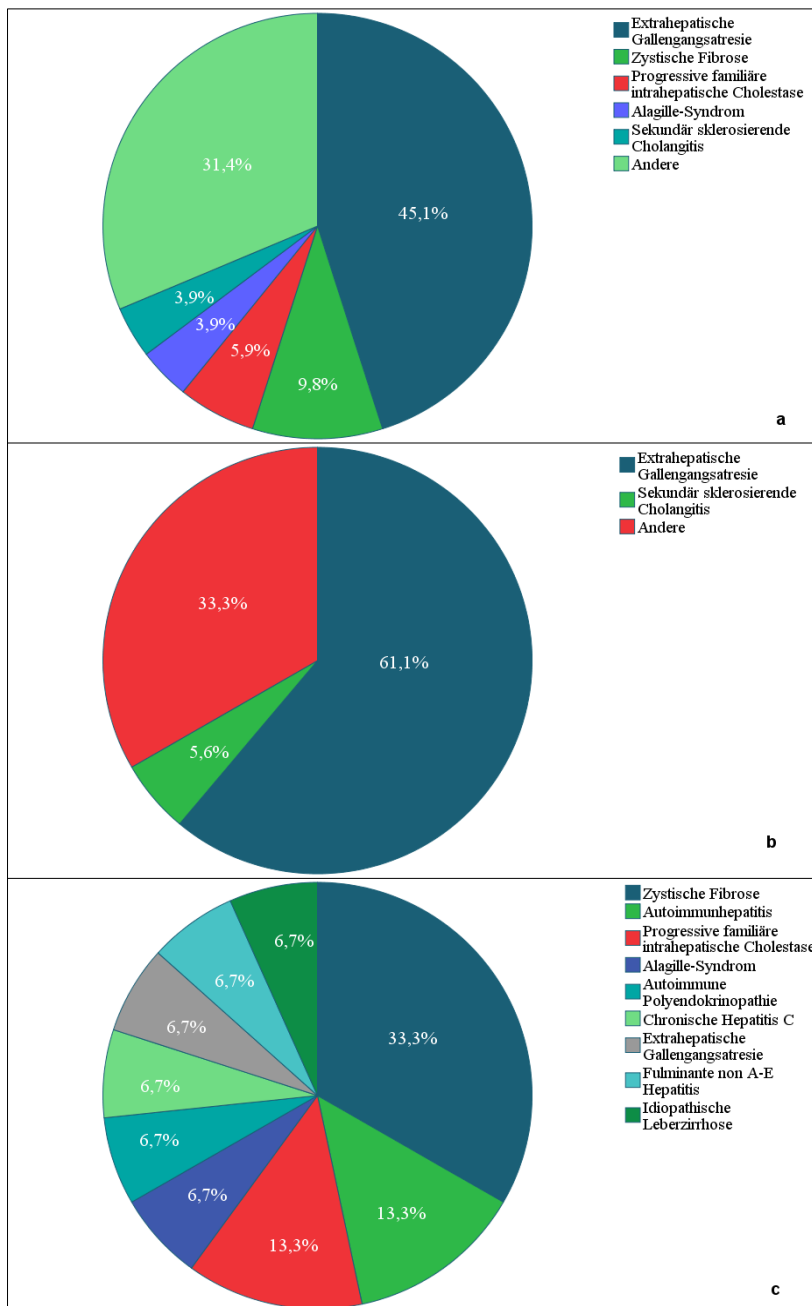


Abbildung 9 Grundkrankheiten
a) im gesamten Kinderkollektiv b) bis zum Kleinkindalter [0-5 Jahre] c) ab dem Schulkindalter [6-18 Jahre].

In Abbildung 9 sind die unterschiedlichen Grundkrankheiten der lebertransplantierten Kinder dargestellt. Insgesamt ist in fast der Hälfte der Fälle eine extrahepatische Gallengangsatresie ursächlich für die Transplantation, gefolgt von der zystischen Fibrose bei jedem zehnten Kind (siehe Abbildung 9a). Bei den Kindern bis zum Kleinkindalter ist mit fast 2/3 aller Krankheiten die extrahepatische Gallengangsatresie die vorherrschende Ursache für die Transplantation. Bis auf sekundär sklerosierende Cholangitiden und einen Fall mit HHV6-Sepsis sind

ansonsten ausschließlich seltene erbliche Lebererkrankungen in dieser Altersgruppe im Studienkollektiv zu finden (siehe Abbildung 9b).

Ab dem Schulkindalter zeigt sich eine Diversifizierung der zur Transplantation führenden Ursachen. Vorherrschend ist mit einem Drittel der Fälle nun die zystische Fibrose. Vermehrt sind in diesem Alter autoimmune Ursachen und andere Krankheiten mit langsamerem Progress zur Leberzirrhose zu finden (siehe Abbildung 9c).

Insgesamt wurde die Mehrzahl der Transplantationen in unserem Kollektiv im Kleinkindalter durchgeführt (36/51 bis zum Alter von fünf Jahren vs. 15/51 ab dem Alter von sechs Jahren).

3.3.2 Charakteristik der Proben

3.3.2.1 Probenverteilung bei DNA-Prävalenz-Untersuchung mittels RT-qPCR

Insgesamt wurden 160 Proben nach Transplantation auf das Vorhandensein von B19V-DNA untersucht. Bei 54 Fällen ergab sich eine durchschnittliche Probenzahl von 3,0 Proben/Fall. 157 Proben stammten aus dem geplanten Untersuchungszeitraum von sechs Monaten posttransplantär. Darüber hinaus wurde bei KLTX_19 aufgrund des verlängerten Untersuchungszeitraums je eine Probe aus Monat 8, 11 und 17 untersucht. Die Verteilung der Proben auf die Monate ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22 Zeitliche Verteilung der DNAämie nach TX im Kinderkollektiv

Monat nach TX	Verfügbare Blutproben, Anzahl	Patienten mit Proben, %	DNA-positive Proben, Anzahl (%)	Initiale Detektion von B19V-DNA, Anzahl (% der DNAämischen Patienten)
1	54	100	3 (5,6)	3 (60)
2	30	56	3 (10,0)	0
3	25	46	2 (8,0)	1* (20)
4	19	35	1 (5,3)	0
5	15	28	1 (6,7)	1* (20)
6	14	26	0 (0,0)	0
7	0	0**	0 (0,0)	0
8	1	50**	1 (100)	0
9	0	0**	0 (0,0)	0
10	0	0**	0 (0,0)	0
11	1	100**	1 (100)	0
17	1	100**	1 (100)	0

* Bei diesen Patienten waren die früheren Proben B19V-DNA-negativ.

** ein Patient mit einem verlängerten Beobachtungszeitraum von insgesamt neun Monaten, ein Patient von insgesamt 17 Monaten.

3.3.2.2 *Probenverteilung bei Analyse des Serostatus*

Für jeden Fall wurde eine vor Transplantation gewonnene Probe auf Anti-B19V-IgG getestet. Die Proben wurden so selektiert, dass der Zeitpunkt möglichst nah an der Transplantation lag, alternativ wurde eine kurz nach Transplantation gewonnene Probe gewählt. Die Probengewinnung erfolgte im Median an Tag -38 (25. Perzentile: Tag -150, 75. Perzentile: Tag -11, Range Tag -640 bis 1). 50 Proben (92,6%) stammten aus dem Zeitraum vor Transplantation, 33 davon aus den letzten drei Monaten. Vier Proben (7,4%) mussten von Tag 1 nach Transplantation herangezogen werden.

3.3.2.3 *Probenmaterial*

Für die PCR-Untersuchungen nach Transplantation wurden 149 Serumproben (93,1%), neun EDTA-Vollblut-Proben (5,6%) und zwei EDTA-Plasma-Proben (0,3%) verwendet, für die serologischen Untersuchungen vor Transplantation ausschließlich Serumproben.

3.3.3 DNA-Prävalenz

Von den 160 untersuchten Proben waren sechs positiv (3,8%) und sieben schwach positiv (4,4%) für B19V-DNA. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23 Anzahl und Daten der Transplantatempfänger im Kinderkollektiv und deren Ergebnisse der B19V-DNA-Detektion

Transplantat-Empfänger (Gruppe)	Patientenalter (Jahre), Range, Mittelwert	Patienten, Anzahl	Proben, Anzahl	Proben/Patient, Anzahl	DNAämische Patienten, Anzahl (%)	DNA-positive Proben, Anzahl (%)
Kinder (Leber)	0-18, 4	54*	160	3	5 (9,3)	13 (8,1)

* darunter insgesamt drei zusätzliche Patientenfälle durch mehrere Beobachtungszeiträume gleicher Patienten.

3.3.3.1 *Zeitliche Verteilung*

Die Verteilung der DNAämischen Proben ist in Tabelle 22 beschrieben. Es zeigt sich ein Unterschied der B19V-DNAämie-Pävalenz im zeitlichen Verlauf mit acht DNAämischen von insgesamt 109 Proben (7,3%) in den ersten drei Monaten nach Transplantation und zwei von 48 Proben (4,2%) in den folgenden drei Monaten. Dieser Unterschied war im McNemar-Test höchst signifikant ($p < 0,001$).

3.3.3.2 Überblick über virämische Fälle

Von den 54 Patientenfällen wiesen fünf mindestens einmal eine B19V-Virämie auf (9,3%). Bei allen virämischen Kindern wurde B19V/gt1 nachgewiesen. Bei diesen Patienten wurde nachträglich auch eine Probe vor Transplantation bzw. alternativ möglichst bald nach Transplantation auf das Vorhandensein von B19V-DNA untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass vier Patienten bereits prätransplantär eine Virämie hatten. Der detaillierte Verlauf dieser Patienten ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24 Charakterisierung der B19V-DNAämischen Patienten im Kinderkollektiv

Patienten-ID, Geschlecht, Alter (Jahre)	Tag post-TX	DNA (geq/ml)	Anti-B19V-IgG	IgG-Quantität ¹	Hb (g/dl) ²	Reti (‰) ²
KLTX_02, m, 13	-13	9200	pos	+++		
	34	<600	pos	+++	10,3	nd
	70	<600			10,5	nd
	98	<600			10,6	nd
	164	0	pos	+++	9,4	nd
KLTX_03, w, 11	-148	1700	pos	+++		
	30	680	pos	+++	7,9	nd
	59	<600	pos	+++	10,4	nd
	90	0			10,3	nd
	128	0			10,3	nd
	158	0			9,3	nd
	168	0			10,9	nd
KLTX_08, m, 10	0	1300	pos	+++		
	32	0			8,3	33
	59	0			nd	nd
	92	<600	pos	+++	10,1	nd
	118	0	pos	+++	nd	nd
	146	0			12,0	nd
	172	0			11,9	nd
KLTX_19, m, 3 (2. TX Tag 143)	-67	0	neg	--		
	29	0			10,7	21
	57	0			9,7	20
	86	0			8,7	21
	126	0			7,9	nd
	146	<600	neg	--	9,7	24
	174	0	gw	-/+	10,1	nd
	242	<600	neg	--	10,1	6

	347	440000	gw	-/+	9,4	nd
KLTX_28, w, 10	1	5100	pos	+++	9,5	14
	30	3200	pos	+++	10,1	23
	58	3600			9,3	24
	129	3000	pos	++	8,9	3

¹ semiquantitative Darstellung: 24,1 bis 49,9 U/ml: +, 50,0 bis 199,9 U/ml: ++, ≥ 200 U/ml: +++.

² Die Werte von Hb und Reti entsprechen jeweils dem nächstmöglichen Wert zum Tag der Virusdiagnostik und entstammen maximal der Zeitspanne ± 3 Tage.

3.3.4 Serostatus

3.3.4.1 Initialer Serostatus

17 Probanden waren prä-TX oder unmittelbar post-TX positiv (31,5%) und 37 negativ (68,5%) für Anti-B19V-IgG (siehe Tabelle 25). Bei den seropositiven Proben lag der Median bei 250 U/ml (25. Perzentile: 123 U/ml, 75. Perzentile: 250 U/ml), die Range betrug 29 bis 3620 U/ml.

Tabelle 25 Verteilung des Anti-B19V-IgG-Status bzgl. zeitlichem Bezug zu TX im Kinderkollektiv

Anti-B19V-IgG	Kinder		Summe
	vor TX	nach TX	
positiv, N (%)	15 (30)	2 (50)	17 (32)
negativ, N (%)	35 (70)	2 (50)	37 (68)
Summe, N	50	4	54

Da der IgG-Status durch transfundierte IVIG verfälscht werden kann, wurde bei jeder B19V-IgG-positiven Probe eine Aktenanalyse auf IVIG-Gaben bis drei Monate vor Probenentnahme durchgeführt. Standardmäßig wurden IVIG bei Anti-CMV-IgG-negativen Patienten und Patienten, die jünger als sechs Monate waren, an den Tagen 4, 14 und 28 nach Transplantation transfundiert. Von den vier nach Transplantation stammenden Proben wurde in keinem der Fälle IVIG bis drei Monate vorher gegeben.

3.3.4.2 Serokonversionen nach Transplantation

Bei den 37 vor Transplantation seronegativen Patienten wurde auch die letzte vorhandene Probe im Beobachtungszeitraum auf Anti-B19V-IgG untersucht. 16 Fälle zeigten weiterhin ein negatives Ergebnis für Anti-B19V-IgG, ein Fall ein grenzwertiges Ergebnis und 20 Fälle ein positives Ergebnis.

Bei den 21 serokonvertierten Fällen (20 positiv, eine grenzwertig) wurde in 19 Fällen im Zeitraum von drei Monaten vor der letzten Probe IVIG gegeben, in zwei Fällen nicht. In den

beiden Fällen, in denen keine IVIG-Gabe erfolgte, lag der Zeitpunkt, an dem die ursprünglichen Proben entnommen wurden, 187 und 327 Tage vor Transplantation.

3.3.4.3 *Serostatus früh posttransplantär*

Für den peritransplantären Serostatus wurde aufgrund der regelhaft verabreichten IVIG bei Transplantation nicht der initiale Status, sondern der in Monat 1 verwendet. Daraus ergeben sich folgende Anti-B19V-IgG-Ergebnisse: 16 der 54 Fälle (29,6%) waren zu Beginn des Untersuchungszeitraums seronegativ, 38 (70,4%) seropositiv.

3.3.4.4 *Serologischer Verlauf bei Säuglingen*

Bei Kindern, die bei Gewinnung der prätransplantären Probe jünger als ein Jahr waren, wurde der Serostatus auch am Ende des Untersuchungszeitraums untersucht, da es wahrscheinlich war, dass es sich bei initial nachgewiesenen Immunglobulinen um mütterliche Antikörper („Nestschutz“) handelte. Von diesen 20 Patienten waren fünf initial seropositiv. Diese waren null bis vier Monate alt. Zwei der fünf Patienten verloren ihr B19V-IgG im Verlauf des Zeitraums. Beide negativen Proben waren aus Monat 6. Die anderen drei Patienten blieben seropositiv, hier stammten die letzten Proben jedoch von Monat 1.

3.3.4.5 *Serologischer Verlauf bei Fällen mit DNAämie*

Initial seronegative DNAämische Fälle wurden auf Serokonversion im Verlauf untersucht. Vier der fünf Patienten waren bereits vor Transplantation seropositiv. In diesen Fällen zeigte sich im Verlauf kein Titeranstieg des IgG. Patient KLTX_19 war sowohl vor Transplantation als auch am Ende des Beobachtungszeitraums seronegativ (s. Tabelle 24).

3.3.5 **Korrelation von DNAämie und Donor-Art**

Von den 54 untersuchten Fällen erhielten 19 (35,2%) eine Lebendspende, 35 (64,8%) eine postmortale Spende. Alle fünf Patienten mit DNAämie erhielten eine postmortale Spende. Dennoch war dieser Unterschied nicht signifikant im Fisher's Exact Test.

3.3.6 Korrelation von DNAämie und Immunsuppression

Die Immunsuppression erfolgte in 94,4% der Fälle nach Induktion mit Basiliximab mit Prednisolon und Ciclosporin. Akute Abstoßungsreaktionen wurden mit einer Kortison-Stoßtherapie mittels hochdosiertem Prednisolon behandelt.

3.3.6.1 Korrelation mit Immunsuppressionsregime in der Erhaltungsphase

Die auf B19V-DNA getesteten Proben wurden mit der Immunsuppression korreliert. Die angewandten Schemata sind Tabelle 26 entnehmbar. Am häufigsten erfolgte die Zweifachkombination mit einem Kortikosteroid und einem Calcineurin-Inhibitor, gefolgt von einer Dreifachkombination mit zusätzlich Mycophenolat. In allen Fällen wurde eine Induktion mit Basiliximab durchgeführt. Die DNAämie-Prävalenz in Abhängigkeit von der Immunsuppression zeigt Tabelle 26.

Tabelle 26 Verteilung der DNAämie in den Proben nach Immunsuppressionsschema

Immunsuppressionsschema	N (% gesamt)	PCR-Ergebnis	
		negativ, N (%)	positiv N (%)
Prednisolon/CSA	90 (55,9%)	87 (96,7%)	3 (3,3%)
Prednisolon/Tacrolimus	33 (20,5%)	27 (81,8%)	6 (18,2%)
Prednisolon/Sirolimus	3 (1,9%)	3 (100,0%)	0 (0,0%)
Prednisolon/CSA/MMF	12 (7,5%)	12 (100,0%)	0 (0,0%)
Prednisolon/Tacrolimus/MMF	15 (9,3%)	10 (66,7%)	5 (33,3%)
Prednisolon/CSA/Everolimus	5 (3,1%)	5 (100,0%)	0 (0,0%)
Prednisolon/Tacrolimus/Sirolimus	2 (1,2%)	2 (100,0%)	0 (0,0%)
Prednisolon/Tacrolimus/Everolimus	1 (0,6%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)

Auffällig war ein häufigeres Auftreten einer DNAämie bei Immunsuppressionsschemata, die Tacrolimus beinhalten. Elf von 51 während Tacrolimus-Einnahme gewonnenen Proben (21,6%) waren DNA-positiv, dagegen nur drei von 107 unter Ciclosporin-Einnahme (2,8%). Dieser Unterschied war im Fisher's Exact-Test höchst signifikant (p-Wert 0,0003). Beim Vergleich unter den Zweifachkombinationsschemata waren bei den Proben mit Prednisolon/Tacrolimus 18,2% DNAämisch, bei den Proben mit Prednisolon/Ciclosporin drei von 90 (3,3%). Auch hier ergab sich im Fisher's Exact-Test ein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,011).

3.3.6.2 *Korrelation mit Kortison-Reduktionsschema*

In 44 Fällen (81,5%) erfolgte die Prednisolon-Gabe nach dem Standard-Reduktionsschema des KUNO, in zehn Fällen (18,5%) nach einem Hochdosis-Reduktionsschema. Die Dosierungen finden sich in Tabelle 16.

Von den 44 nach dem Standardschema behandelten Fällen waren vier Fälle mindestens einmal DNAämisch (9,1%), von den zehn nach Hochdosisschema behandelten Fällen einer (10%). Diese Differenz war im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

In Monat 1 zeigte sich in einer von zehn Proben (10%) beim Hochdosisschema eine DNAämie, dagegen nur in zwei von 44 Proben (4,5%) beim Standardschema. Dieser Unterschied war allerdings im Fisher's Exact-Test ebenfalls nicht signifikant.

3.3.6.3 *Korrelation mit Hochdosis-Kortison-Therapie bei akuten Abstoßungsreaktionen*

Akute Abstoßungsreaktionen wurden mit einer Prednisolon-Stoß-Therapie behandelt. Diese bestand aus einer sechstägigen Therapie mit hochdosiertem Prednisolon (Tag 1-3: 300mg/m² KOF/Tag, Tag 4-6: 150mg/m² KOF/Tag).

Für die Analyse, ob eine Kortison-Stoß-Therapie zum Zeitpunkt der Probe Einfluss hatte, wurde in einer Aktenrecherche untersucht, ob innerhalb der letzten sieben Tage vor Probengewinnung eine solche Therapie angewandt worden war. Bei Patient KLTX_28 fiel die Probe von Tag 1 in den Zeitraum, in dem er die Anfangsdosis des Hochdosis-Prednisolon-Schemas erhielt, also eine Dosis von 60mg/m² KOF/Tag. Ebenso war dies bei Patient KLTX_19 bei der Probe aus Monat 5 der Fall, da auch hier nach einer Re-Transplantation das Hochdosis-Prednisolon-Schema Anwendung fand. Bei beiden Proben wurde dies für die Statistik wie eine Prednisolon-Stoß-Therapie gewertet.

Bei den 161 untersuchten Proben wurde bei 16 (9,9%) eine Prednisolon-Stoß-Therapie angewandt. Von diesen 16 Proben waren vier (25%) DNAämisch, von den übrigen 145 Proben nur zehn (6,9%). Dieser Unterschied war im Fisher's Exact-Test signifikant (p-Wert 0,036).

3.3.7 Korrelation von DNAämie und Surrogatmarkern der aplastischen Anämie

3.3.7.1 Korrelation mit Anämieprävalenz

Für 159 Proben im Kollektiv lebertransplantiertes Kinder waren zeitlich korrelierende Hämoglobinwerte vorhanden, davon waren 145 negativ, sieben positiv und sieben schwach positiv für B19V-DNA. Für die Beurteilung der Anämieprävalenz wurden die Referenzwerte aus Tabelle 14 verwendet.

Bei zehn der 14 DNA-positiven Proben (71,4%) und bei 50 der 145 negativen Proben (34,5%) war eine Anämie, also ein Hb-Wert unterhalb der unteren Referenzgrenze, nachzuweisen. Der Unterschied war mit einem p-Wert von 0,006 im χ^2 -Test hoch signifikant.

Bei den DNAämischen Fällen lag bei zehn der 14 DNA-positiven Proben (71,4%) und bei sieben der 13 negativen Proben (53,8%) eine Anämie vor. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Bei den DNAämischen Patienten war bei 17 von 27 Proben eine Anämie nachzuweisen (63,0%), in der Gruppe der negativen Patienten bei 43 von 132 Proben (32,6%). Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,003 im χ^2 -Test hoch signifikant.

Die Odds Ratio für das Vorliegen einer Anämie bei Proben mit B19V-DNAämie lag im Kinderkollektiv bei 4,75.

3.3.7.2 Korrelation mit Retikulozytopenieprävalenz

Für 73 Proben waren zeitlich zusammenhängende Retikulozytenwerte vorhanden, davon waren 67 negativ, vier positiv und zwei schwach positiv für B19V-DNA. Für die Beurteilung der Retikulozytopenieprävalenz wurden die Referenzwerte aus Tabelle 15 herangezogen.

Bei zwei der sechs DNA-positiven Proben war eine Retikulozytopenie nachzuweisen (33,3%), in der Gruppe der negativen bei neun von 67 Proben (13,4%). Der Unterschied war jedoch im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

Die Analyse in der Gruppe DNAämischer Patienten wurde hier ebenfalls aufgrund einer zu geringen Probenzahl nicht durchgeführt.

Bei den Fällen mit Virämie war bei zwei von zehn Proben eine Retikulozytopenie nachzuweisen (20%), in der Gruppe der negativen Patienten bei neun von 63 Proben (14,3%). Der Unterschied war im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

3.3.8 Klinik bei Fällen mit DNAämie

Bei Patient KLTX_02, der bereits prä-TX virämisch war, wurden in den Monaten 4 und 5 folgende Symptome beschrieben, die mit einer B19V-Infektion in Verbindung stehen könnten: am Tag 137 trat ein kleinfleckiges pustulöses Exanthem am Körperstamm auf. Es wurde damals der V.a. eine HSV-Infektion gestellt. Zusätzlich wurden von Tag 129 bis Tag 148 sowie an Tag 164 Beinschmerzen v.a. am Fußrücken berichtet. In diesem Zeitraum fehlten allerdings Proben zur Untersuchung. Die letzte Probe stammte zuvor von Tag 98 und war schwach positiv für B19V-DNA, die nächste vorhandene Probe stammte von Tag 164 und war negativ für B19V-DNA.

Bei Patient KLTX_19 handelt es sich um einen dreijährigen, männlichen Leberempfänger, bei dem das erste positive B19V-DNA-Ergebnis ($<6 \times 10^2$ geq/ml) drei Tage nach einer Re-Transplantation (Tag 146) detektiert wurde. Bei dem Organ handelte es sich um eine postmortale Spende. Die letzte verfügbare Probe zuvor stammt von Tag 126 und war negativ für B19V-DNA. Er hatte für mehr als drei Jahre eine niedrige Virämie mit einer maximalen Viruslast von 10^5 geq/ml sieben Monate nach dem ersten Nachweis viraler DNA. Serologisch blieb der Patient negativ für Anti-B19V-IgG. Anti-B19V-IgM waren nach zwei Jahren nachweisbar. Am Tag der zweiten Transplantation (Tag 143) zeigte sich ein zum Erythema infectiosum passendes Exanthem an den Unterschenkeln, welche in den Akten als rundlich und zum Teil kokadenförmig beschrieben wurde. Einen Tag später traten zudem Juckreiz und slapped cheeks auf, im Akteneintrag als Schmetterlingserythem vermerkt. Die Symptome waren vollständig reversibel unter Therapie mit Antihistaminika. Deshalb und wegen einer zeitlich im Zusammenhang stehenden EK-Gabe, welches am selben Tag bei einem Hb von 7,3 g/dl gegeben wurde, ging man damals von einem Transfusionszwischenfall aus. Ein auslösendes Agens im Sinne eines Allergens wurde allerdings im EK nicht gefunden. Von einer B19V-Infektion ging man damals nicht aus, eine dahin gerichtete Diagnostik erfolgte nicht. Der Patient hatte keine schwere persistierende Anämie. Er erhielt an Tag 4, 14 und 28 nach der ersten TX routinemäßig IVIG, da ein high risk-CMV-Status vorlag (Donor Anti-CMV-IgG-positiv, Empfänger Anti-CMV-IgG-negativ). Den zeitlichen Verlauf der Infektion des Patienten zeigt Abbildung 10.

In den anderen drei Fällen konnte den Akten keine Klinik entnommen werden, die auf eine B19V-Infektion hingewiesen hätte.

3.4.2 Vergleich der Prävalenz aplastischer Anämien

Wegen der unterschiedlichen Referenzwerte wurden nicht Hämoglobin- bzw. Retikulozytenwerte verglichen, sondern nur die Prävalenz von Anämie bzw. Retikulozytopenie.

3.4.2.1 *Anämieprävalenz*

Anämie im Gesamtkollektiv

Vergleicht man zunächst alle Proben der Erwachsenen und Kinder unabhängig vom PCR-Status miteinander, so zeigt sich bei den Erwachsenen in 779 von 925 Proben eine Anämie (84,2%), bei den Kindern in 60 von 159 Proben (37,7%). Dies ergibt bereits hier einen höchst signifikanten Unterschied von 46,5% ($p < 0,001$ im χ^2 -Test). Auch in der Gruppe der lebertransplantierten Erwachsenen war in 269 von 330 Proben eine Anämie nachzuweisen (81,5%), sodass sich auch hier gegenüber den Kindern ein höchst signifikanter Unterschied von 43,8% ergibt ($p < 0,001$ im χ^2 -Test).

B19V-DNA-Prävalenz bei Anämie

Bei den lebertransplantierten Erwachsenen zeigte sich in sieben von 269 anämischen Proben eine B19V-DNAämie (2,6%), bei den Kindern zehn von 60 anämischen Proben (16,7%). Dieser Unterschied war im Fisher's Exact-Test höchst signifikant mit einem p-Wert $< 0,001$. Die Odds Ratio dafür, dass anämische Blutproben gleichzeitig B19V-DNA-positiv waren, betrug im Vergleich der Kinder mit den Erwachsenen 8,95.

Fälle mit DNAämie bei Anämie

Bei den lebertransplantierten Erwachsenen stammten 16 von 269 anämischen Proben von DNAämischen Patienten (5,9%), bei den Kindern 17 von 60 anämischen Proben (28,3%). Der Unterschied war im Fisher's Exact-Test höchst signifikant ($p < 0,001$). Die Odds Ratio dafür, dass anämische Blutproben von DNAämischen Patienten stammten, betrug im Vergleich der Kinder mit den Erwachsenen 9,54.

3.4.2.2 *Retikulozytopenieprävalenz*

Retikulozytopenie im Gesamtkollektiv

In der Gruppe der lebertransplantierten Erwachsenen war in 23 von 139 Proben eine Retikulozytopenie nachzuweisen (16,5%), bei den Kindern in elf von 73 Proben (15,1%). Dieser geringe Unterschied war nicht signifikant im χ^2 -Test.

B19V-DNA-Prävalenz bei Retikulozytopenie

Bei den lebertransplantierten Erwachsenen zeigte sich in keiner von 23 Proben mit Retikulozytopenie eine B19V-DNAämie, bei den Kindern in zwei von elf Proben (18,2%). Dieser Unterschied war im Fisher's Exact-Test jedoch nicht signifikant.

Fälle mit B19V-DNAämie bei Retikulozytopenie

Bei den lebertransplantierten Erwachsenen stammte keine von 23 retikulozytopenischen Proben von DNAämischen Patienten, bei den Kindern zwei von elf Proben (18,2%). Der Unterschied war im Fisher's Exact-Test nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Patientenkollektiv

Das Erwachsenenkollektiv dieser Studie bestand zu 11% aus herztransplantierten, zu 33% aus lebertransplantierten und zu 54% aus nierentransplantierten Patienten, eine Zusammensetzung, die auch der Gesamtheit der organtransplantierten Patienten in Deutschland und den USA entspricht. Die Zusammensetzung des Kollektivs mit einem mittleren Alter bei Transplantation von 52 Jahren und einer Geschlechterverteilung männlicher Patienten zu weiblichen Patienten von 2:1 war identisch zu den Zahlen aus den USA [68,76–78]. Die Organgruppen wichen bzgl. Alters- und Geschlechterverteilung kaum voneinander ab, lediglich bei den herztransplantierten Patienten waren drei Viertel der Patienten männlich, was auch in den publizierten Daten aus dem Jahr 2014 zu finden ist [77]. Aussagen über Grunderkrankung, Art der Organspende und Immunsuppression der Patienten können im Erwachsenenkollektiv aufgrund der Anonymisierung nicht getroffen werden.

Im Kinderkollektiv zeigte sich ein Häufigkeitsgipfel im Kleinkindalter: 39% der Empfänger waren ein bis fünf Jahre alt, 31% waren jünger als ein Jahr. Ähnliche Daten wurden in den USA veröffentlicht, dort waren im Jahr 2014 68% der lebertransplantierten Kinder jünger als sechs Jahre [78]. Ein Großteil der Transplantationen im Kindesalter erfolgt aufgrund konnataler cholestatischer Lebererkrankungen [78,79], welche eine Lebertransplantation oft bereits in den ersten Lebensjahren notwendig machen [95]. Ab dem Schulkindalter zeigten sich in unserem Kollektiv vorrangig die zystische Fibrose und Autoimmunerkrankungen ursächlich für die Lebertransplantation.

Die Geschlechterverteilung mit 44% männlichen und 56% weiblichen Patienten war mit den Zahlen aus den USA vergleichbar [78]. Die Immunsuppression erfolgte in allen Fällen mit Prednisolon und Induktion mit Basiliximab. In 56% erfolgte eine Kombination mit Ciclosporin und nur in 20% mit Tacrolimus, eine Triple-Therapie zusammen mit Mycophenolat nur in 17%. Insgesamt erfolgte somit zwar eine Induktionstherapie, die Erhaltungstherapie wurde jedoch weniger intensiv fortgesetzt als in den Vergleichsdaten aus den USA [78].

4.2 DNA-Prävalenz

Bei den Erwachsenen wurden bei insgesamt 3,4% der Transplantatempfänger B19V-DNAämien beobachtet. Damit lag die Prävalenz im Kollektiv der Studie im unteren Bereich der bisher veröffentlichten Daten zur Prävalenz von B19V-Infektionen bei Transplantatempfängern (1,8-58,7%) [96–100]. Die DNAämie entwickelte sich in allen Fällen innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation (vgl. Tabelle 18). Dieses zeitliche Auftreten wurde auch in anderen Studien beschrieben und impliziert eine kausale Relation zwischen Transplantation und B19V-DNAämie [96,100,101]. Aufgrund der intensiven Immunsuppression im ersten halben Jahr nach Transplantation entspricht dies auch dem typischen Zeitraum anderer viraler Infektionen [90]. Im Vergleich zu CMV, welches bei Risikokonstellation ohne prophylaktische Behandlung in 40-100% der Nierentransplantierten auftritt und in bis zu 67% der Fälle zu einer Erkrankung führt und damit das bedeutendste Pathogen nach Transplantation darstellt [102], ist die Prävalenz von B19V jedoch sehr niedrig. Es ist außerdem nicht klar, ob es sich bei der viralen DNA, welche in geringen Mengen im peripheren Blut der Patienten detektiert wurde, um infektiöse Viren handelt. Neben einer natürlichen Infektion aus dem Umfeld des Patienten könnten virale DNA oder Viren, die aus Geweben des Empfängers oder dem Spenderorgan freigesetzt bzw. reaktiviert wurden, zur Entwicklung einer DNAämie während der Zeit der therapeutischen Immunsuppression beitragen. Eine DNAämie wurde darüber hinaus bei vier von neun DNAämischen Patienten auch in der Blutprobe vor Transplantation detektiert, was in der Literatur bereits beschrieben ist [96,98]. In zwei Fällen stammte diese Probe von Tag 0 oder 7, sodass dies eine sehr frühe Infektion bzw. Freisetzung von DNA aus dem Spenderorgan darstellen könnte. Weiterhin könnte es sich ebenso wie in den anderen beiden Fällen um eine prolongierte, niedrige Virämie nach Primärinfektion handeln, da bekannt ist, dass B19V-DNA nach einer solchen für Monate bis Jahre im Blut nachweisbar sein kann [47,48].

Unter den Nieren-Empfängern zeigte sich eine deutlich niedrigere Rate an DNAämischen Patienten (1,4%) als bei den Herz- und Leber-Empfängern (insgesamt 5,8%), auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war. Im Gegensatz zu zahlreichen Berichten über die Persistenz viraler DNA in Leber, Herz, Knochenmark und anderen Geweben [38,39,41–44] gibt es nur wenige über die Prävalenz von B19V-DNA in Nierengewebe [40]. Da das Spenderorgan eine mögliche Quelle für eine DNAämie nach Transplantation ist, könnte die häufigere Persistenz von B19V-DNA in Leber und Herz die höhere Inzidenz einer DNAämie in diesen Patientengruppen erklären. Dennoch gibt es Berichte, in denen die transplantierte

Niere die vermutete Quelle einer B19V-Infektion des Empfängers war [103,104]. Die Tatsache, dass bei Nierentransplantation eine höhere Intensität der Immunsuppression als bei Lebertransplantation erforderlich ist [88], was theoretisch zu einer höheren Inzidenz von Virusinfektionen führen müsste, unterstützt die Theorie, dass Transplantatnieren eine seltenere Quelle für B19V-Infektionen darstellen als andere Organe.

Die DNA-Last war bei allen Erwachsenen sehr niedrig. Da bei den meisten Patienten DNA-Konzentrationen unter der unteren Nachweisgrenze vorlagen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine gewisse Anzahl weiterer DNAämischer Proben nicht detektiert wurde. Eine niedrige B19V-DNA-Last bei B19V-Reaktivierung nach Nierentransplantation ohne klinische Konsequenzen wurde auch in neueren Daten aus Frankreich beschrieben [105]. Da, wie in Kapitel 4.5 genauer beschrieben, niedrige DNA-Lasten keine klinischen Folgen haben, ist eine PCR mit einer niedrigeren unteren Nachweisgrenze für die klinische Routinediagnostik nicht erforderlich.

Die Genotyp-spezifische PCR zeigte B19V/gt1 als den häufigsten Genotyp bei den Erwachsenen mit einer Prävalenz von 88,9%. B19V/gt2 konnte nur bei einem anfänglich seronegativen Herzempfänger nachgewiesen werden (11,1%), der im Jahre 1954 geboren wurde. In dieser Altersgruppe findet sich B19V/gt2 relativ häufig, während er inzwischen aus der Zirkulation verschwunden und folglich bei jungen Personen nicht mehr nachweisbar ist [39]. Trotz aktueller Berichte über eine zunehmende Häufigkeit des sonst sehr seltenen B19V/gt3 in Europa [30,106] konnte dieser Genotyp im Kollektiv dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Bei den lebertransplantierten Kindern wurde bei 9,3% der Patienten eine B19V-DNAämie beobachtet, eine Prävalenz, die deutlich höher ist als bisher vermutet [107]. Bisher fehlten jedoch größere Studien nach pädiatrischen Transplantationen, weshalb die Prävalenz eher unterschätzt gewesen sein dürfte. Es zeigt sich eine fast dreimal höhere Prävalenz von B19V-DNA als bei den Erwachsenen. Die größere Anzahl DNAämischer Blutproben bei den Kindern war höchst signifikant.

Ähnlich dem Erwachsenenkollektiv entwickelte sich die DNAämie in vier von fünf Fällen innerhalb der ersten 3 Monate nach Transplantation (vgl. Tabelle 24). Jedoch war in diesen vier Fällen auch in der Blutprobe vor Transplantation B19V-DNA detektierbar, sodass ein Zusammenhang mit dem Spenderorgan auszuschließen ist. Vielmehr ist eine prolongierte, schwache Virämie nach vorheriger Primärinfektion anzunehmen. Weiterhin zeigte sich die höchste DNA-Last in diesen Fällen vor Transplantation, was ebenfalls für ein Abklingen der

Infektion spricht. Im Gegensatz dazu wies der Patient KLTX_19 (s. Absatz 4.6) eine DNAämie erstmalig um den Zeitraum der Re-Transplantation auf. Hier liegt somit ein Fall einer Primärinfektion unter Immunsuppression mit prolongierter DNAämie vor. Dieses Phänomen nach Erstinfektion ist unter Immunsuppression bereits mehrfach beschrieben und geht typischerweise mit einer PRCA einher [29,108,109]. Als Infektionsweg kommt hier neben einer natürlichen Infektion grundsätzlich auch eine Transmission durch das Spenderorgan oder Blutprodukte in Betracht.

Im Kollektiv der lebertransplantierten Kinder wurde in allen Fällen B19V/gt1, der in Deutschland fast ausschließlich vorkommende Genotyp [106] nachgewiesen.

Insgesamt zeigten sich bei den Kindern eine höhere DNAämie-Prävalenz und höhere Viruslasten als bei den Erwachsenen, was darauf hindeutet, dass es sich um reelle Virämien nach Primärinfektion handelt. Da bei den Erwachsenen nur in vier von neun Fällen bereits vor Transplantation eine DNAämie detektiert wurde, nur niedrige DNA-Lasten in den ersten Monaten nach Transplantation nachgewiesen wurden und der Großteil vor Transplantation seropositiv war, ist eine Primärinfektion bei Erwachsenen unwahrscheinlicher. Stattdessen könnte man die DNAämie im Gegensatz zu den Fällen im Kinderkollektiv a.e. als aus dem Spenderorgan freigesetzte DNA interpretieren. B19V-Infektionen nach Transplantation sind bei Kindern somit relevanter als bei Erwachsenen. Eine B19V-Infektion ist bei einem von zehn transplantierten Kindern nachzuweisen, sodass bei unklarer Anämie eine B19V-Infektion insbesondere bei Kindern differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden muss.

4.3 Serostatus

Die Detektion von Anti-B19V-IgG zeigt eine abgelaufene B19V-Infektion und bestehende Immunität an, sofern eine akute Infektion ausgeschlossen ist. In dieser Studie konnte bei Erwachsenen eine Seroprävalenz von 81% beobachtet werden, welche weitgehend derjenigen entspricht, die in anderen Studien in Deutschland beschrieben wurde [17,36]. Falsch positive Werte durch IVIG-Anwendungen können bei Proben nach Transplantation nicht ausgeschlossen werden, waren jedoch bei den Erwachsenen offensichtlich kein großer Einflussfaktor, da die IgG-Prävalenz in den Proben vor und nach Transplantation fast identisch war (79,5% vor vs. 82,9% nach TX).

Bei den Kindern gestaltete sich die Analyse des peritransplantären Serostatus schwieriger, da lange vor Transplantation liegende seronegative Proben aufgrund des hohen Infektionsrisikos nicht verwertbar sind und teilweise eine CMV-Prophylaxe mittels IVIG erfolgte. Initial waren 31,5% der Patienten vor Transplantation positiv für Anti-B19V-IgG, was der bei Kleinkindern beschriebenen Seroprävalenz entspricht [17]. Aufgrund der Störfaktoren wurde für die Auswertung der Serostatus am Anfang des Beobachtungszeitraums verwendet, da auch transfundierte Immunglobuline, deren mittlere Halbwertszeit in der Literatur mit 22-31 Tagen angegeben wird [110–112], mehrere Monate lang zum Immunstatus der Patienten beitragen. Somit waren unter Berücksichtigung transfundierter Immunglobuline 70,4% der Fälle zum Zeitpunkt der Transplantation seropositiv, vergleichbar mit dem Serostatus der transplantierten Erwachsenen.

In einem Fall war im weiteren Verlauf eine Serokonversion ohne nachgewiesene DNAämie festzustellen, die jedoch durch verabreichte IVIG erklärbar ist. Bei fünf Säuglingen (0-4 Monate) zeigte sich ein positiver Serostatus vor Transplantation, welcher als mütterlicher „Nestschutz“ durch transplazentare Übertragung mütterlicher Anti-B19V-IgG interpretiert werden kann. Dieser ist, entsprechend der allgemeinen Durchseuchungsrate bei 78% der Neugeborenen nachweisbar und persistiert bis zu einem Alter von fünf bis sieben Monaten [17].

4.4 Einfluss der Immunsuppression auf Parvovirus B19-Infektionen bei den Kindern

Die Immunsuppression wurde im Kinderkollektiv dieser Studie hauptsächlich mit Zweifachkombinationen von Prednisolon und CNIs (Ciclosporin oder Tacrolimus) durchgeführt. Deutlich seltener kamen Dreifachkombinationen mit zusätzlich Mycophenolat zum Einsatz. Nur bei sechs Patienten wurden neuere Immunsuppressiva wie die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus verwendet. In allen Fällen erfolgte die Induktion mit Basiliximab. Obwohl es sich mehrheitlich um prä-TX stattgehabte Infektionen handelte, und daher kein kausaler Zusammenhang zwischen initialer Infektion und der Tacrolimus-Therapie hergestellt werden kann, fällt ein höchst signifikant häufigeres Auftreten von post-TX auftretenden B19V-DNAämien bei Tacrolimus-basierten Immunsuppressionsregimen im Vergleich zur Anwendung von Ciclosporin auf. Es gibt einzelne Fallberichte zu einem Auftreten einer PRCA bei B19V-Infektion unter einem Tacrolimus-basiertem Regime, in

einem Fall kam es erst nach Umstellung der Therapie auf Ciclosporin zu einer Ausheilung der Infektion [113–115]. Außerdem wurden unter Tacrolimus auch BK-Virus-Infektionen gehäuft festgestellt [87]. Die potentere Wirkung von Tacrolimus im Vergleich zu Ciclosporin ist gut bekannt [85,86].

Hohe Prednisolon-Dosen ($\geq 60\text{mg/m}^2$ KOF/Tag) im Rahmen einer Kortison-Stoß-Therapie bei akuter Abstoßungsreaktion oder zu Beginn des Hochdosis-Reduktions-Schemas führten ebenfalls zu einer signifikant höheren Rate von B19V-Infektionen. Dies ist eine gut bekannte Tatsache. Beispielsweise wurde ein mit der kumulativen Methylprednisolon-Dosis linear steigendes Risiko für CMV-Erkrankungen nachgewiesen [116].

Es sollte daher insbesondere bei Patienten unter Immunsuppression mit Tacrolimus oder nach Hochdosis-Prednisolon-Administration bei Auftreten einer chronisch-persistierenden Anämie an eine infektiöse Genese durch B19V gedacht werden.

4.5 Klinische Folgen einer Parvovirus B19-Infektion

Bei einem Großteil der erwachsenen Patienten (84,2%) lagen die Hämoglobinspiegel unabhängig von einer B19V-DNAämie im anämischen Bereich, einer nach Transplantation häufigen, multifaktoriell bedingten Komplikation, welche unter anderem auf die perioperativen Blutverluste und die nephro- und myelotoxischen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva zurückzuführen sind [79,87].

Jedoch zeigten sich bei den DNAämischen Erwachsenen (alle männlich) signifikant niedrigere Hämoglobinwerte als bei den männlichen B19V-DNA-negativen Erwachsenen, im Mittel um 0,9 g/dl, welche aber nicht in einer höheren Anämieprävalenz resultierten. Klinisch ist dieser Unterschied in den Hämoglobinspiegeln somit kaum relevant. Die Retikulozytenzahlen waren bei den Erwachsenen weder in den DNAämischen noch in den negativen Proben regelmäßig erniedrigt. In zwei Fällen ohne Nachweis von Anti-B19V-IgG müsste es sich formal um Primärinfektionen handeln, die gewöhnlich mit hoher Viruslast und deutlicher Anämie einhergehen [28,29]. Die Patienten zeigten jedoch weder eine hohe DNAämie noch eine bedeutsame Anämie. Dass eine niedrige DNAämie, wie sie im Erwachsenenkollektiv nachweisbar war, nicht zu einer klinisch relevanten Anämie führt, wurde bereits in anderen Studien beschrieben [28,96,117]. Möglicherweise handelt es sich lediglich um freigesetzte Virus-DNA und keine Virionen. Es kann angenommen werden,

dass die B19V-Replikation bei diesen Patienten, bei denen es sich in den meisten Fällen um B19V-Reaktivierungen handelte, durch vorhandene Anti-B19V-IgG kontrolliert wurde.

Im Kinderkollektiv zeigte sich im Unterschied zu den Erwachsenen insgesamt signifikant seltener eine Anämie nach Organtransplantation (37,7%). Eine bei Kindern niedrigere Prävalenz (23,6%) von postoperativen Anämien im ersten Jahr nach Lebertransplantation als bei Erwachsenen (50-53%) ist beschrieben [118]. Die Gründe hierfür sind unklar.

Bei B19V-DNA-positiven Kindern war aber jeweils doppelt so häufig eine Anämie nachweisbar wie bei negativen Kindern – ein hoch signifikanter Unterschied. Dieses hohe Anämie-Risiko bei B19V-Infektionen nach Transplantation könnte auf höhere Viruslasten bei Primärinfektionen [28,29,105] zurückzuführen sein, welche typischerweise im Kindesalter auftreten [17]. Im Kinderkollektiv zeigten sich in dieser Studie deutlich häufiger Virämien als bei den Erwachsenen – mit zudem höheren Viruslasten. Diese scheinen einen signifikanten, wenn auch geringen Einfluss auf die Erythropoese zu haben. Schlussfolgernd bestätigt dies die Konsequenz einer persistierenden Anämie bei Primärinfektion unter Immunsuppression [28,29]. Weiterhin waren die Retikulozytenzahlen bei DNAämischen Patienten deutlich niedriger, auch wenn dieser Unterschied – möglicherweise aufgrund einer zu geringen Probenzahl – nicht signifikant war. Offensichtlich hat eine prolongierte Infektion, die bereits vor Transplantation begonnen hatte, einen größeren Einfluss auf die Erythropoese als eine Reaktivierung von B19V unter Immunsuppression. Insgesamt zeigten sich jedoch auch im Kinderkollektiv nur verhältnismäßig geringe Viruslasten, welche erwartungsgemäß nicht mit einer so ausgeprägten Anämie einhergingen, wie sie bei hohen Viruslasten von bis zu 10^{12} geq/ml der Fall ist.

Bei Kindern mit Anämie war umgekehrt eine signifikant höhere B19V-DNAämie-Prävalenz nachweisbar als bei anämischen Erwachsenen. Dieser Unterschied war höchst signifikant. 16,7% der anämischen Proben bei Kindern waren B19V-DNA-positiv. Sogar 28,3% der anämischen Proben stammten von Patienten mit mindestens einmaligem Nachweis einer B19V-DNAämie. Fast identische Zahlen mit einer serologischen B19V-Prävalenz von 19,2% bei anämischen Patienten nach pädiatrischen Organtransplantationen wurden 1993 bei einem kleineren Studienkollektiv festgestellt [119]. Die Odds Ratio, dass anämische Proben gleichzeitig B19V-DNA-positiv waren, war bei Kindern neunmal höher als bei Erwachsenen. Somit sind, im Gegensatz zu erwachsenen Lebertransplantierten, bei Kindern B19V-Infektionen ein Hauptrisikofaktor für postoperative Anämien, da sie in etwa einem Drittel der Fälle mit diesen im Zusammenhang stehen. Als Konsequenz dieser

Ergebnisse empfehlen wir, dass bei Anämie nach pädiatrischen Transplantationen differentialdiagnostisch eine B19V-Infektion mittels PCR abgeklärt werden sollte. Derzeit sind B19V-Infektionen immer noch eine auch bei pädiatrischen Patienten kaum wahrgenommene Differentialdiagnose im Fall einer Anämie nach Organtransplantation, da der Einfluss bei anämischen, transplantierten Erwachsenen gering ist.

4.6 Infektionsverlauf

Der Großteil der B19V-DNAämischen adulten Patienten (7/9; 77,8%) zeigte serologische Marker, die auf eine abgelaufene B19V-Infektion vor Transplantation hinweisen. In Kombination mit den niedrigen B19V-DNA-Lasten konnte eine akute B19V-Infektion in all diesen Fällen ausgeschlossen werden. Bei zwei Patienten war eine DNAämie bei positivem Anti-B19V-IgG-Status bereits vor Transplantation nachweisbar, was für eine bereits vor Transplantation abgelaufene Primärinfektion oder Reaktivierung mit persistierender DNAämie, wie sie bereits beschrieben wurde [47,48], spricht. In den anderen Fällen lässt die Konstellation eine Reaktivierung von B19V unter Anwesenheit neutralisierender Antikörper, die die Infektion kontrollierten, oder lediglich eine Freisetzung von DNA aus dem Spenderorgan bzw. Gewebe des Empfängers vermuten.

HTX_001 und HTX_030 wurden hingegen vor Transplantation negativ auf Anti-B19V-IgG getestet. Bei Patient HTX_001 wurde B19V-DNA das erste und einzige Mal an Tag 25 post-TX nachgewiesen. Da weder B19V-spezifische Antikörper noch B19V-DNA in irgendeiner anderen Probe dieses Patienten detektiert wurden, konnte eine akute B19V-Infektion ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass myokardiales Gewebe über lange Zeit, vielleicht lebenslang, latent B19V-Genom beherbergt [35–37]. Patient HTX_030 wurde an Tag -23 sowohl auf Anti-B19V-IgG als auch B19V-DNA negativ getestet. Virale DNA und B19V-spezifische IgG konnten in drei konsekutiven Proben, beginnend von Tag 84, detektiert werden. Leider waren keine Proben, die aus dem Zeitraum zwischen Tag -23 und Tag 84 stammten, für retrospektive Tests verfügbar. An Tag 84 hatte das Anti-B19V-IgG eine hohe Avidität und Anti-B19V-IgM war negativ. Die B19V-DNA-Last war mit <600 geq/ml definitiv niedriger als sie während einer akuten Infektion wäre, bei der Viruslasten bis 10^{12} geq/ml beobachtet werden können [120]. Es ist auffallend, dass bei diesem Patienten B19V/gt2 vorlag. Seit den 1970er Jahren galt B19V/gt2 als aus der Zirkulation in Europa verschwunden [39], kann jedoch in Geweben der älteren Bevölkerung nachgewiesen werden

[36,39]. Daher ist eine iatrogene B19V-Transmission über das Spenderorgan wohl wahrscheinlicher als eine natürliche Infektion vor Transplantation. Allerdings würde eine iatrogene Transmission eine akute Infektion bei dem immunsupprimierten Patienten mit sich bringen und eine persistierende hohe B19V-Virämie mit schwerer chronischer Anämie wäre zu erwarten [28,29,96,101,121,122]. Es wurde beschrieben, dass auch B19V/gt2 eine akute, produktive Infektion verursacht, welche mit einer lange andauernden Anämie bei Transplantat-Empfängern assoziiert ist [29,121]. Da hier eine niedrige B19V-DNAämie 25 Tage nach Transplantation erkennbar war, könnte sie einfach nur durch aus dem Gewebe des Spenderherzens freigesetzte virale DNA bedingt sein. Patient HTX_030, bei dem eine DNAämie ab Tag 84 nachweisbar war, zeigte einmalig eine Retikulozytopenie (0,7‰) an Tag 40, jedoch war der Hämoglobinspiegel nicht niedriger als zu anderen Zeitpunkten in den sechs Monaten. Es könnte spekuliert werden, dass der Patient eine IVIG-Therapie aus anderen Gründen erhalten hat, welche die akute B19V-Infektion zu kontrollieren half. Möglicherweise handelte es sich auch hier nicht um infektiöse Viren, sondern um aus dem Transplantat freigesetzte DNA. Für transfundierte IgG über eine IVIG-Gabe spricht auch die hohe Avidität der IgG, welche auf eine bereits mehrere Monate zurückliegende Infektion hinweist, während das IgM vor und nach Transplantation negativ war.

Achtzig Prozent (4/5) der Kinder mit nachgewiesener B19V-DNAämie zeigten bereits vor Transplantation Anti-B19V-IgG sowie eine B19V-DNAämie. In diesen Fällen muss somit eine Infektion vor Transplantation stattgefunden haben, was aufgrund des Alters der Patienten auf natürlichem Weg nicht unwahrscheinlich ist. Ein iatrogener Infektionsweg über Blutprodukte kann retrospektiv nicht sicher ausgeschlossen werden. Gemäß Daten aus den USA sind 40% der lebertransplantierten Kinder präoperativ bereits hospitalisiert, 22% davon auf einer Intensivstation [78]. Eine Transfusion von Anti-B19V-IgG durch IVIG-Gabe erfolgte nicht. In diesen Fällen ist von einer prolongierten Erstinfektion auszugehen. Es sind Fälle beschrieben, in denen nach Erstinfektion im Blut der Patienten monatelang B19V-DNA nachweisbar war [47,48]. Hierfür spricht auch die regrediente Viruslast im Verlauf des Beobachtungszeitraums. Interessanterweise klang trotz Immunsuppression in drei von vier dieser Fälle die Infektion im Beobachtungszeitraum vollständig ab bzw. war im Verlauf keine B19V-DNA mehr nachweisbar. Daraus kann gefolgert werden, dass die therapeutische Immunsuppression bei Patienten mit bereits vorhandenen Anti-B19V-IgG keinen relevanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Lediglich bei KLTX_28 konnte

B19V-DNA während des gesamten Zeitraums nachgewiesen werden, welcher vier Monate umfasste.

Bei KLTX_19 trat eine akute B19V-Infektion zum Zeitpunkt der Re-Transplantation unter Immunsuppression auf. Dennoch waren untypischerweise nur niedrige Viruslasten nachweisbar. Ob das Spenderorgan die Quelle der B19V-DNAämie war, bleibt unklar. Es ist bei natürlicher Infektion eine Inkubationszeit bis zum Auftreten des Exanthems von ca. zwei Wochen beschrieben [8], sodass dieser Transmissionsweg aufgrund der zeitlichen Korrelation fraglich ist. Das beschriebene Exanthem zum Zeitpunkt der zweiten Transplantation ist mit einem Erythema infectiosum vereinbar, welches typischerweise in zwei Phasen mit zunächst auftretenden slapped-cheeks und darauf folgendem makulopapulösen, girlandenförmigen Exanthem an Stamm und proximalen Extremitäten verläuft [7]. Allerdings trat bei diesem Patienten das typische Exanthem an den Unterschenkeln auf. Das Auftreten des Exanthems ist erstaunlich, da die Effloreszenzen, nach Abfall der initial hohen Viruslast, mit Beginn der Antikörperproduktion bei Primärinfektion auftreten und auf Immunkomplexe zurückzuführen sind [8]. Antikörper waren zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht nachweisbar. Auffällig war bei diesem Patienten weiterhin der lange Zeitraum von über drei Jahren, in dem eine DNAämie nachweisbar war, sowie der undulierende Verlauf der Viruslast. Fallberichte über eine persistierende Virämie bei immunsupprimierten Patienten beschrieben bisher deutlich höhere B19V-DNA-Lasten mit einhergehender schwerer Anämie [28,29,96,101,121,122]. Es ist unklar, warum bei diesem Patienten keine höhere Viruslast mit schwerer Anämie auftrat. Erst zwei Jahre nach Infektion waren bei dem Patienten serologisch Anti-B19V-IgM nachweisbar, Anti-B19V-IgG fehlten über den gesamten Zeitraum. Dies könnte auf die Immunsuppression zurückzuführen sein, die bekanntlich zu ausbleibender Antikörperproduktion führen kann [28,29].

Dass ein Großteil der Infektionen bei Kindern bereits vor Transplantation stattfand, erklärt auch die höhere Prävalenz einer B19V-DNAämie bei organtransplantierten Kindern gegenüber Erwachsenen. Die niedrige Inzidenz von B19V-Primärinfektionen (1,9%) post-TX während dieser Zeit war ähnlich niedrig wie bei organtransplantierten Erwachsenen (0,7%). Somit zeigt sich, dass zwar das absolute Risiko für B19V-Infektionen perioperativ höher ist, jedoch das Risiko einer Erstinfektion nach Transplantation, welche aufgrund des unter etablierter Immunsuppression schweren Verlaufes gefürchtet ist, durch die IVIG-Gaben zur CMV-Prophylaxe auf das transplantierte Erwachsener gesenkt werden kann. Ein

generelles B19V-Screening oder eine B19V-Prophylaxe mittels IVIG erscheint aufgrund der geringen Inzidenz symptomatischer Verläufe nicht erforderlich. Ein Großteil der Patienten erhält durch die routinemäßige IVIG-Gabe zur CMV-Prophylaxe ohnehin auch IgG gegen B19V. Jedoch sollte bei einer Anämie bei transplantierten Kindern immer eine B19V-Diagnostik mittels PCR erfolgen.

Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Parvovirus B19 bei akuten Infektionen immunsupprimierter Patienten, beispielsweise nach Organtransplantation, zu schweren Verläufen mit hohen Viruslasten und schweren, chronischen Anämien führen kann. Es ist jedoch unklar, inwiefern Reaktivierungen latenter B19V-DNA zu einer persistierenden Infektion und Anämie bei Transplantatempfängern beitragen kann. Zu B19V-Infektionen organtransplantierte Kinder gibt es bisher keine größeren Untersuchungen.

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurden organtransplantierte Erwachsene und Kinder mittels rt-qPCR, inkl. Genotypisierung, auf die Präsenz von B19V-DNA innerhalb der ersten sechs Monate nach Transplantation hin untersucht. Zudem erfolgte die Bestimmung des prä- und postoperativen B19V-Serostatus mittels ELISA. Die Ergebnisse wurden mit Hämoglobinspiegeln und Retikulozytenzahlen als Surrogatmarker für aplastische Anämien korreliert. Bei den Kindern erfolgte zudem eine Analyse klinischer Parameter und des Zusammenhangs mit der Immunsuppression.

Unsere Untersuchungen bestätigten, dass das höchste Risiko für eine B19V-DNAämie in den ersten drei Monaten nach Organtransplantation besteht. Bei den 268 erwachsenen Transplantatempfängern war die Prävalenz einer B19V-DNAämie mit 3,4% im Vergleich zu bisherigen Studienergebnissen eher niedrig, bei gleichzeitig sehr niedrigen Viruslasten. Bei Nierentransplantierten war die Prävalenz trotz intensiverer Immunsuppression am niedrigsten, was darauf hindeuten könnte, dass Nieren seltener zur Transmission von B19V-Infektionen führen als andere Organe. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um Reinfektionen, Reaktivierungen oder lediglich eine B19V-DNA-Freisetzung aus dem Transplantat. Dies resultierte nicht in einer höheren Anämieprävalenz.

Bei den lebertransplantierten Kindern zeigte sich mit 9,3% eine deutlich höhere B19V-Prävalenz als bei den Erwachsenen. Bei vier Patienten handelte es sich um prolongierte

Erstinfektionen mit Beginn vor Transplantation, bei einem um eine Primärinfektion unter Immunsuppression. Als Risikofaktoren waren Hochdosisprednisolon-Anwendungen und Tacrolimus-basierte Immunsuppressionsregime eruierbar. Die Viruslasten waren höher als bei den Erwachsenen, jedoch nicht in Größenbereichen, die bei Erstinfektionen unter Immunsuppression zu erwarten sind. Im Falle des Patienten mit Primärinfektion nach Transplantation zeigte sich ein untypischer Verlauf mit einer über drei Jahre persistierenden Virämie. Die Viruslasten waren jedoch überwiegend niedrig und der Patient litt nur an einer leichten Anämie. Anämien traten bei B19V-Infektion im Kindesalter insgesamt signifikant häufiger auf als bei nichtinfizierten Kindern. Bei knapp 30% der Anämien im Kindesalter war B19V nachweisbar. Schwere Verlaufsformen blieben jedoch aus. Es erfolgte bei einem Großteil der Kinder die Anwendung von IVIG zur CMV-Prophylaxe, was dazu führte, dass die Rate an seropositiven Patienten zum Zeitpunkt der Transplantation mit der bei Erwachsenen vergleichbar war. Dies hatte wahrscheinlich einen protektiven Effekt bezüglich Primärinfektionen nach Transplantation mit potentiell schweren Verläufen.

Aus diesen Erkenntnissen schlussfolgern wir, dass schwere aplastische Anämien nur bei Primärinfektionen, nicht jedoch bei B19V-Reaktivierungen auftreten. Leichte Anämieepisoden waren bei den Kindern jedoch, im Gegensatz zu Erwachsenen, in knapp 30% mit B19V assoziiert. Daher empfehlen wir bei Anämie organtransplantierter Kinder dringend eine B19V-Diagnostik mittels PCR, insbesondere bei Tacrolimus-basierter Immunsuppression oder nach Hochdosis-Glukokortikoid-Therapie. Ein generelles präoperatives B19V-Screening oder prophylaktische IVIG-Transfusionen scheinen jedoch aufgrund der geringen Inzidenz und der fehlenden klinischen Relevanz bei vornehmlich niedrigen Viruslasten nicht notwendig.

Abkürzungsverzeichnis

ACR	akute zelluläre Abstoßungsreaktion
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AMR	akute antikörpervermittelte Abstoßungsreaktion
B19V	Parvovirus B19
B19V/gt1, gt2, gt3	Parvovirus B19 Genotyp 1, Genotyp 2, Genotyp 3
CMV	Cytomegalievirus
CNI	Calcineurin-Inhibitor
DNA	desoxyribonucleic acid
DSA	Donor-spezifische Antikörper
EBV	Epstein-Barr-Virus
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EK	Erythrozyten-Konzentrat
FFP	fresh frozen plasma
geq	genome equivalent
HAART	highly active anti-retroviral therapy
Hb	Hämoglobin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSV	Herpes simplex-Virus
HTX	Herztransplantation
IVIg	intravenous immunoglobulin

LTX	Lebertransplantation
m	männlich
mTOR	mammalian target of rapamycin
N	Anzahl
NS1	nonstructural protein
NTX	Nierentransplantation
PCR	polymerase chain reaction
PRCA	pure red-cell aplasia, Aplasie der roten Zellreihe
qPCR	quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
Reti	Retikulozyten
Rt-qPCR	real-time quantitative PCR
TX	Transplantation
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
VP1	viral protein 1
VP2	viral protein 2
VZV	Varizella zoster-Virus
w	weiblich

Literaturverzeichnis

- [1] Servant-Delmas A, Lefrère J, Morinet F, Pillet S. Advances in human B19 erythrovirus biology. *J. Virol.* 2010;84(19):9658–65.
- [2] Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975;1(7898):72–3.
- [3] Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE et al. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1981;1(8221):664–5.
- [4] Anderson MJ, Lewis E, Kidd IM, Hall SM, Cohen BJ. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J Hyg (Lond)* 1984;93(1):85–93.
- [5] Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N. Engl. J. Med* 2004;350(6):586–97.
- [6] Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P et al. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med* 1994;330(17):1192–6.
- [7] Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):485–505.
- [8] Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM et al. Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 1985;152(2):257–65.
- [9] Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* 1985;1(8426):422–5.
- [10] White DG, Woolf AD, Mortimer PP, Cohen BJ, Blake DR, Bacon PA. Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1985;1(8426):419–21.
- [11] Nikkari S, Luukkainen R, Mottonen T, Meurman O, Hannonen P, Skurnik M et al. Does parvovirus B19 have a role in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 1994;53(2):106–11.
- [12] Speyer I, Breedveld FC, Dijkmans BA. Human parvovirus B19 infection is not followed by inflammatory joint disease during long term follow-up. A retrospective study of 54 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16(5):576–8.
- [13] Kerr JR, Cartron JP, Curran MD, Moore JE, Elliott JR, Mollan RA. A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995;34(9):809–13.
- [14] Soderlund M, Essen R von, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* 1997;349(9058):1063–5.
- [15] Levy R, Weissman A, Blomberg G, Hagay ZJ. Infection by parvovirus B 19 during pregnancy: a review. *Obstet Gynecol Surv* 1997;52(4):254–9.
- [16] Morey AL, Keeling JW, Porter HJ, Fleming KA. Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99(7):566–74.

- [17] Röhrer C, Gärtner B, Sauerbrei A, Böhm S, Hottenträger B, Raab U et al. Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol. Infect.* 2008;136(11):1564–75.
- [18] Chisaka H, Morita E, Yaegashi N, Sugamura K. Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia. *Rev Med Virol* 2003;13(6):347–59.
- [19] Norbeck O, Papadogiannakis N, Petersson K, Hirbod T, Broliden K, Tolfvenstam T. Revised clinical presentation of parvovirus B19-associated intrauterine fetal death. *Clin Infect Dis* 2002;35(9):1032–8.
- [20] Jordan JA. Identification of human parvovirus B19 infection in idiopathic nonimmune hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(1 Pt 1):37–42.
- [21] Skjöldebrand-Sparre L, Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Wahren B, Broliden K, Nyman M. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *BJOG* 2000;107(4):476–80.
- [22] Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE et al. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* 1981;2(8247):595–7.
- [23] Serjeant BE, Hambleton IR, Kerr S, Kilty CG, Serjeant GR. Haematological response to parvovirus B19 infection in homozygous sickle-cell disease. *Lancet* 2001;358(9295):1779–80.
- [24] Saunders PW, Reid MM, Cohen BJ. Human parvovirus induced cytopenias: a report of five cases. *Br J Haematol* 1986;63(2):407–10.
- [25] Osaki M, Matsubara K, Iwasaki T, Kurata T, Nigami H, Harigaya H et al. Severe aplastic anemia associated with human parvovirus B19 infection in a patient without underlying disease. *Ann Hematol* 1999;78(2):83–6.
- [26] Qian X. H., Zhang GC, Jiao XY, Zheng YJ, Cao YH, Xu DL et al. Aplastic anaemia associated with parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child* 2002;87(5):436–7.
- [27] Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, Jenkins DW, Nienhuis AW, Young NS. Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med* 1989;321(8):519–23.
- [28] Plentz A, Hahn J, Holler E, Jilg W, Modrow S. Long-term parvovirus B19 viraemia associated with pure red cell aplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Virol* 2004;31(1):16–9.
- [29] Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres A, Raab U et al. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J. Med. Virol* 2005;75(1):161–9.
- [30] Knoester M, dem Borne PA von, Vossen ACTM, Kroes ACM, Claas ECJ. Human parvovirus B19 genotype 3 associated with chronic anemia after stem cell transplantation, missed by routine PCR testing. *J. Clin. Virol.* 2012;54(4):368–70.
- [31] Kurtzman GJ, Cohen B, Meyers P, Amunullah A, Young NS. Persistent B19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1988;2(8621):1159–62.

- [32] Heegaard ED, Schmiegelow K. Serologic study on parvovirus b19 infection in childhood acute lymphoblastic leukemia during chemotherapy: clinical and hematologic implications. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24(5):368–73.
- [33] Frickhofen N, Abkowitz JL, Safford M, Berry JM, Antunez-de-Mayolo J, Astrow A et al. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med* 1990;113(12):926–33.
- [34] Abkowitz JL, Brown KE, Wood RW, Kovach NL, Green SW, Young NS. Clinical relevance of parvovirus B19 as a cause of anemia in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997;176(1):269–73.
- [35] Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R et al. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J. Med. Virol.* 2008;80(11):2005–11.
- [36] Kuethe F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K et al. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49(11):1660–6.
- [37] Schenk T, Enders M, Pollak S, Hahn R, Huzly D. High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(1):106–10.
- [38] Eis-Hübinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H, Pütz U. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J. Med. Virol.* 2001;65(2):395–401.
- [39] Norja P, Hokynar K, Aaltonen L, Chen R, Ranki A, Partio EK et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(19):7450–3.
- [40] Tanawattanacharoen S, Falk RJ, Jennette JC, Kopp JB. Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* 2000;35(6):1166–74.
- [41] Hokynar K, Brunstein J, Söderlund-Venermo M, Kiviluoto O, Partio EK, Konttinen Y et al. Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *J. Gen. Virol.* 2000;81(Pt 4):1017–25.
- [42] Bonvicini F, La Placa M, Manaresi E, Gallinella G, Gentilomi GA, Zerbini M et al. Parvovirus b19 DNA is commonly harboured in human skin. *Dermatology (Basel)* 2010;220(2):138–42.
- [43] Hokynar K, Norja P, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Tissue persistence and prevalence of B19 virus types 1–3. *Future Virology* 2007;2(4):377–88.
- [44] Söderlund-Venermo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. *Pathol. Biol.* 2002;50(5):307–16.
- [45] Jong EP de, Haan TR de, Kroes ACM, Beersma MFC, Oepkes D, Walther FJ. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *J Clin Virol* 2006;36(1):1–7.

- [46] Valeur-Jensen AK, Pedersen CB, Westergaard T, Jensen IP, Lebech M, Andersen PK et al. Risk factors for parvovirus B19 infection in pregnancy. *JAMA* 1999;281(12):1099–105.
- [47] Cassinotti P, Siegl G. Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(11):886–7.
- [48] Musiani M, Zerbini M, Gentilomi G, Plazzi M, Gallinella G, Venturoli S. Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J Infect Dis* 1995;172(5):1360–3.
- [49] Gartner B, Enders M, Luft-Duchow C, Bocharov G, Modorow S. Parvovirus B-19 infections in pregnant women in day care facilities: health economic analysis of prohibition to employ seronegative women. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2007;50(11):1369–78.
- [50] Ballou WR, Reed JL, Noble W, Young NS, Koenig S. Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J Infect Dis* 2003;187(4):675–8.
- [51] Bernstein DI, El Sahly HM, Keitel WA, Wolff M, Simone G, Segawa C et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* 2011;29(43):7357–63.
- [52] Nagy J. A note on the early history of renal transplantation: Emerich (Imre) Ullmann. *Am J Nephrol* 1999;19(2):346–9.
- [53] Carrel A. The operative technique for vascular anastomoses and transplantation of viscera. *Lyon Med.* 1902(98):859.
- [54] Carrel A, Guthrie CC. Functions of a transplanted kidney. *Science* 1905;22(563):473.
- [55] Shayan H. Organ transplantation: from myth to reality. *J Invest Surg* 2001;14(3):135–8.
- [56] Hamilton DN, Reid WA. Yu. Yu. Voronoy and the first human kidney allograft. *Surg Gynecol Obstet* 1984;159(3):289–94.
- [57] Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 1956;160(4):277–82.
- [58] Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Friedman EA, Dealy JB, Dammin GJ. Successful Homotransplantation of the Kidney between Nonidentical Twins. *N Engl J Med* 1960;262(25):1251–60.
- [59] Goodwin WE, Kaufman JJ, Mims MM, Turner RD, Glasscock R, Goldman R et al. Human renal transplantation. I. Clinical experiences with six cases of renal homotransplantation. *J Urol* 1963;89:13–24.
- [60] Starzl TE, Marchioro TL, Waddell WR. The reversal of rejection in human renal homografts with subsequent development of homograft tolerance. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:385–95.
- [61] Hill RB, Dahrling BE, Starzl TE, Rifkind D. Death after transplantation. *The American Journal of Medicine* 1967;42(3):327–34.
- [62] Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659–76.

- [63] Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J* 1967;41(48):1271–4.
- [64] Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976;6(4):468–75.
- [65] Rosenthal JT, Hakala TR, Iwatsuki S, Shaw BW JR, Starzl TE. Cadaveric renal transplantation under cyclosporine-steroid therapy. *Surg Gynecol Obstet* 1983;157(4):309–15.
- [66] Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med* 1981;305(5):266–9.
- [67] Griffith BP, Hardesty RL, Deeb GM, Starzl TE, Bahnson HT. Cardiac transplantation with cyclosporin A and prednisone. *Ann Surg* 1982;196(3):324–9.
- [68] Organspende und Transplantation in Deutschland: Jahresbericht 2014. Frankfurt am Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation; 2015.
- [69] Steinbrook R. Organ donation after cardiac death. *N Engl J Med* 2007;357(3):209–13.
- [70] Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003;3 Suppl 4:114–25.
- [71] Feng S, Lai JC. Expanded criteria donors. *Clin Liver Dis* 2014;18(3):633–49.
- [72] Lee C, Cheng C, Wang Y, Soong R, Wu T, Chou H et al. Adult Living Donor Liver Transplantation Across ABO-Incompatibility. *Medicine (Baltimore)* 2015;94(42):e1796.
- [73] Koo TY, Yang J. Current progress in ABO-incompatible kidney transplantation. *Kidney Res Clin Pract* 2015;34(3):170–9.
- [74] Chen C, Kabiling CS, Concejero AM. Why does living donor liver transplantation flourish in Asia? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10(12):746–51.
- [75] Abradelo M, Sanabria R, Caso O, Alvaro E, Moreno E, Jimenez C. Split liver transplantation: where? when? how? *Transplant Proc* 2012;44(6):1513–6.
- [76] Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS et al. Kidney. *Am J Transplant* 2016;16 Suppl 2:11–46.
- [77] Colvin M, Smith JM, Skeans MA, Edwards LB, Callahan ER, Snyder JJ et al. Heart. *Am J Transplant* 2016;16 Suppl 2:115–40.
- [78] Kim WR, Lake JR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Edwards EB et al. Liver. *American Journal of Transplantation* 2016;16.
- [79] Hackl C, Schlitt HJ, Melter M, Knoppke B, Loss M. Current developments in pediatric liver transplantation. *World J Hepatol* 2015;7(11):1509–20.
- [80] Dausset J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol* 1958;20(1-4):156–66.
- [81] Kelsch R. WD. Immunological Compatibility Testing in Kidney Transplantation - An Update. *Transplantationsmedizin*;2010(22. Jahrgang):111–6.
- [82] Goldberg RJ, Weng FL, Kandula P. Acute and Chronic Allograft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *Med Clin North Am* 2016;100(3):487–503.
- [83] Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft

- rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International* 1993;44(2):411–22.
- [84] Haas M. The Revised (2013) Banff Classification for Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts: Update, Difficulties, and Future Considerations. *Am J Transplant* 2016;16(5):1352–7.
- [85] Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, Malthaner R, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2006(4):CD005161.
- [86] Webster A, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2005(4):CD003961.
- [87] Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351(26):2715–29.
- [88] Beimler J., Morath C., Zeiler M. Modern immunosuppression after solid organ transplantation. *Internist* 2014(55):212–22.
- [89] Di Filippo S. Anti-IL-2 receptor antibody vs. polyclonal anti-lymphocyte antibody as induction therapy in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant* 2005;9(3):373–80.
- [90] Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007;357(25):2601–14.
- [91] Knöll A, Louwen F, Kochanowski B, Plentz A, Stüssel J, Beckenlehner K et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J. Med. Virol* 2002;67(2):259–66.
- [92] Plentz A, Jilg W, Kochanowski B, Ibach B, Knöll A. Detection of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid and correlation with clinical symptoms. *Infection* 2008;36(2):158–62.
- [93] Mülhardt C. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Mülhardt C, editor. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013, p. 81–114.
- [94] Thomas L. *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 6th ed. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges; 2005.
- [95] Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *The Lancet* 2009;374(9702):1704–13.
- [96] Park JB, Kim D, Woo S, Choi G, Chun JM, Jung GO et al. Clinical implications of quantitative real time-polymerase chain reaction of parvovirus B19 in kidney transplant recipients - a prospective study. *Transpl. Int.* 2009;22(4):455–62.
- [97] Bertoni E, Rosati A, Zanazzi M, Azzi A, Zakrewska K, Guidi S et al. Unusual incidence of aplastic anaemia due to B-19 parvovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):818–9.
- [98] Zolnourian ZR, Curran MD, Rima BK, Coyle PV, O'Neill HJ, Middleton D. Parvovirus B19 in kidney transplant patients. *Transplantation* 2000;69(10):2198–202.

- [99] Ki C, Kim I, Kim J, Lee N, Kim SH, Lee KW et al. Incidence and clinical significance of human parvovirus B19 infection in kidney transplant recipients. *Clin Transplant* 2005;19(6):751–5.
- [100] Cavallo R, Merlino C, Re D, Bollero C, Bergallo M, Lembo D et al. B19 virus infection in renal transplant recipients. *J. Clin. Virol* 2003;26(3):361–8.
- [101] Eid AJ, Brown RA, Patel R, Razonable RR. Parvovirus B19 infection after transplantation: a review of 98 cases. *Clin. Infect. Dis.* 2006;43(1):40–8.
- [102] Keyzer K de, van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician's update. *Am J Kidney Dis* 2011;58(1):118–26.
- [103] Yango A, Morrissey P, Gohh R, Wahbeh A. Donor-transmitted parvovirus infection in a kidney transplant recipient presenting as pancytopenia and allograft dysfunction. *Transpl Infect Dis* 2002;4(3):163–6.
- [104] Liefeldt L, Buhl M, Schweickert B, Engelmann E, Sezer O, Laschinski P et al. Eradication of parvovirus B19 infection after renal transplantation requires reduction of immunosuppression and high-dose immunoglobulin therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002;17(10):1840–2.
- [105] Porignaux R, Vuiblet V, Barbe C, Nguyen Y, Lavaud S, Toupance O et al. Frequent occurrence of parvovirus B19 DNAemia in the first year after kidney transplantation. *J Med Virol* 2013;85(6):1115–21.
- [106] Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(11):3735–8.
- [107] Broliden K. Parvovirus B19 infection in pediatric solid-organ and bone marrow transplantation. *Pediatr Transplant* 2001;5(5):320–30.
- [108] Kariyawasam HH, Gyi KM, Hodson ME, Cohen BJ. Anaemia in lung transplant patient caused by parvovirus B19. *Thorax* 2000;55(7):619–20.
- [109] Waldman M, Kopp JB. Parvovirus-B19-associated complications in renal transplant recipients. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007;3(10):540–50.
- [110] Thurmann PA, Sonnenburg C, Valentova K, Gregora E, Freischlager F, Lissner R. Pharmacokinetics of viral antibodies after administration of intravenous immunoglobulin in patients with chronic lymphocytic leukaemia or multiple myeloma. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57(3):235–41.
- [111] Wasserman RL, Church JA, Peter HH, Sleasman JW, Melamed I, Stein MR et al. Pharmacokinetics of a new 10% intravenous immunoglobulin in patients receiving replacement therapy for primary immunodeficiency. *Eur J Pharm Sci* 2009;37(3-4):272–8.
- [112] Maarschalk-Ellerbroek LJ, Hoepelman IM, Ellerbroek PM. Immunoglobulin treatment in primary antibody deficiency. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37(5):396–404.
- [113] Wong TY, Chan PK, Leung CB, Szeto C, Tam JS, Li PK. Parvovirus B19 infection causing red cell aplasia in renal transplantation on tacrolimus. *American Journal of Kidney Diseases* 1999;34(6):1132–6.

- [114] Shen Q, Xu H, Cao Q, Zhou L, Xu J, Fang X et al. Long-term remission of recurrent severe anemia as a result of parvovirus B19 infection in a pediatric renal transplant recipient. *Pediatr Transplant* 2011;15(4):E76-9.
- [115] Geetha D, Zachary JB, Baldado HM, Kronz JD, Kraus ES. Pure red cell aplasia caused by Parvovirus B19 infection in solid organ transplant recipients: a case report and review of literature. *Clin Transplant* 2000;14(6):586–91.
- [116] Cope AV, Sabin C, Burroughs A, Rolles K, Griffiths PD, Emery VC. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. *J Infect Dis* 1997;176(6):1484–90.
- [117] Carraturo A, Catalani V, Ottaviani D, Menichelli P, Rossini M, Terella D et al. Parvovirus B19 infection and severe anemia in renal transplant recipients. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:102829.
- [118] Liem RI, Anand R, Yin W, Alonso EM. Risk factors for chronic anemia in pediatric orthotopic liver transplantation: analysis of data from the SPLIT registry. *Pediatr Transplant* 2012;16(2):137–43.
- [119] Nour B, Green M, Michaels M, Reyes J, Tzakis A, Gartner JC et al. Parvovirus B19 infection in pediatric transplant patients. *Transplantation* 1993;56(4):835–8.
- [120] Bredl S, Plentz A, Wenzel JJ, Pfister H, Möst J, Modrow S. False-negative serology in patients with acute parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* 2011;51(2):115–20.
- [121] Grabarczyk P, Kalińska A, Kara M, Wiczorek R, Ejduk A, Sulkowska E et al. Identification and characterization of acute infection with parvovirus B19 genotype 2 in immunocompromised patients in Poland. *J. Med. Virol.* 2011;83(1):142–9.
- [122] Gosset C, Viglietti D, Hue K, Antoine C, Glotz D, Pillebout E. How many times can parvovirus B19-related anemia recur in solid organ transplant recipients? *Transpl Infect Dis* 2012;14(5):E64-70.

Publikationen

Plentz A, Würdinger M, Kudlich M, Modrow S. Low-level DNAemia of parvovirus B19 (genotypes 1-3) in adult transplant recipients is not associated with anaemia. *J Clin Virol.* 2013 Oct;58(2):443-8.

Würdinger M, Modrow S, Plentz A. Impact of Parvovirus B19 Viremia in Liver Transplanted Children on Anemia: A Retrospective Study. *Viruses* 2017, 9, 149.

Danksagung

Hiermit will ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die mich auf dem Weg zu meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. Annelie Plentz für die Überlassung des Themas am Institut für Mikrobiologie und Hygiene, das aufgebrauchte Vertrauen und die hervorragende Betreuung mit stetiger Unterstützung und wertvollen Ratschlägen.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt bedanken.

Dem gesamten Team der Virologischen Diagnostik gilt mein außerordentlicher Dank für die gute Einarbeitung in die Methodik und die ständige Hilfsbereitschaft, ohne die die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei den anderen Doktoranden, insbesondere Matthias Kudlich, für die kollegiale Atmosphäre und gegenseitige Unterstützung bei den oft abendlichen Laborarbeiten bedanken.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Bernhard Banas, Prof. Dr. Gabriele Kirchner, Prof. Dr. Christof Schmid und Prof. Dr. Michael Melter für die Bereitstellung der Patientenregister der Transplantationsabteilungen und Dr. Dirk Grothues und der Pflege der Klinik für Pädiatrie für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung. Zudem gilt mein Dank Ute Schewior-Dietl, Helga Friedrich und Markus Solleder für die Datenbankrecherchen des Instituts für Klinische Chemie und Labormedizin.

Den Dank an die kleinen Patienten und ihre Eltern für ihre vorbehaltlose Teilnahme an dieser Studie verbinde ich mit meinen besten Wünschen für die Zukunft.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die mich stets in meinem Studium unterstützt und mir somit diesen Weg ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Würdinger
Geburtsdatum: 07. November 1987
Geburtsort: Regensburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

10/2015 – dato Assistenzarzt Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie,
Universitätsspital Zürich (Prof. Dr. P.-A. Clavien)
10/2016 – 03/2017 Rotation Klinik für Traumatologie, Universitätsspital Zürich
(Prof. Dr. H.-P. Simmen, Prof. Dr. H.-C. Pape)

Praktisches Jahr

12/2014 – 04/2015 Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg
09/2014 – 12/2014 Departement Chirurgie, Kantonsspital Graubünden, Chur
05/2014 – 11/2014 Orthopädische Klinik für die Universität Regensburg, Asklepios-
Klinikum Bad Abbach

Ausbildung

06/2015 Approbation als Arzt
05/2015 Ärztliche Prüfung
10/2014 – 03/2015 Forschungssemester im Rahmen der Promotion, Institut für
Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg
04/2011 – 09/2015 Stipendiat im Max-Weber-Programm Bayern
10/2008 – 07/2015 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
07/2007 – 03/2008 Grundwehrdienst als Sanitäter der Luftwaffe
06/2007 Allgemeine Hochschulreife, Johann-Michael-Fischer-
Gymnasium, Burglengenfeld