Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der
Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Kirchner

Typspezifischer Nachweis von Herpes simplex-Virus-DNA in Blutbestandteilen

Dissertation
zur Erlangung der Dokterwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Claudia Mosel
aus Reutlingen

Lübeck 2008

1. Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hennig

2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Jürgen Grabbe

Tag der mündlichen Prüfung : 12.02.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den : 12.02.2008

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung....6

1.1 Allgemeines zu Herpesviren....6

1.2 Aufbau der Herpesviren....7

1.3 Taxonomie....8

1.3.1 α-Herpesviren....8

1.3.2 β-Herpesviren....8

1.3.3 γ-Herpesviren....8

1.4 Herpes simplex-Virus....9

1.4.1 Genom....9

1.4.2 HSV-Infektion....10

1.4.3 Infektionszyklus....11

1.4.4 Latenz und Reaktivierung....12

1.4.5 Klink der HSV-Infektion....13

1.4.6 Immunologische Aspekte....14

1.4.7 Diagnostik....15

1.4.8 Therapie....16

1.4.9 Polymerasekettenreaktion....17

1.5 Zielsetzung....20

2 Material....21

2.1 Verbrauchsmaterialien....21

2.2 Geräte und Zubehör....22

2.3 Testkits....23

2.4 Computerprogramme....23

2.5 Proben....24

2.5.1 Patientenproben....24

2.5.2 Kontrollproben 24

2.6 DNA25

2.6.1 DNA zur Methodenentwicklung....25

2.6.2 DNA-Standard....25
2.6.3 Humane DNA....25
2.7 Primer und Sonden....25

3 Methoden....26

3.1 Probengewinnung....26

3.1.1 Abstriche....26
3.1.2 Blutentnahme und Plasmaseparation....26
3.1.3 PBMC-Isolation....27
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflußzytometrie....27
3.2 Nukleinsäureisolation....28

3.2.1 Abstriche....28
3.2.2 Ringversuchsproben....29
3.2.3 PBMC´s....30
3.2.4 Plasma....31
3.3 TaqMan-PCR....32

3.3.1 Oligonukleotidauswahl....32
3.3.2 PCR-Optimierung....33
3.3.3 NTC und IPC....34
3.3.4 HSV-Typspezifität....34
3.3.5 Nachweisgrenze....34
3.3.6 Temperaturprofile des Thermocyclers....35
3.3.7 Auswertung der PCR-Ergebnisse....35

4 Ergebnisse....36

4.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung....36

4.1.1 Oligonukleotidauswahl....36
4.1.2 PCR-Optimierung....37
4.1.3 Interne Positivkontrolle....47
4.1.4 Typspezifität....49
4.1.5 Nachweisgrenzen....50
4.2 Untersuchungsergebnisse....52

5 Diskussion....55

6 Zusammenfassung....63

7 Anhang.....64

7.1 Datenbogen zur HSV-Studie.....64

8 Abkürzungen.....65

9 Literatur.....66

10 Danksagung.....71

11 Lebenslauf.....72

12 Erklärung nach §8 Abs.1 Nr.10 der Promotionsordnung.....73

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst etwa einhundert verschiedene Viren, deren Wirtsspektrum im Tierreich weltweit sowohl Vertebraten als auch Nonvertebraten beinhaltet. Der Mensch kann durch acht Vertreter dieser Familie infiziert werden. Diese humanpathogenen Viren finden einzig im Menschen ihr Erregerreservoir und rufen Krankheitsbilder hervor, die zum Teil schon im Altertum beschrieben und mit „Herpes“ bezeichnet wurden [23]. Der Name leitet sich von dem griechischen Wort „herpein“ ab, welches „kriechen“ bedeutet, und eine Beschreibung der kriechenden Ausbreitung der Herpesinfektion darstellt [23, 36].

Neben der morphologischen Einheit ihrer Virionen weisen *Herpesviridae* einige signifikante und wichtige Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften, sowie einige entscheidende Unterschiede auf [30, 33]. Die Genome aller Viren dieser Familie kodieren unter anderem für zahlreiche Enzyme, die in den Nukleinsäurestoffwechsel der Wirtszelle eingreifen, wie die DNA-Polymerase und die Thymidinkinase. Die Neusynthese viraler DNA und die Morphogenese der Virionen erfolgen stets im Zellkern [23, 30]. In der Regel geht die Produktion infektiöser Partikel mit der Zerstörung der Wirtszelle einher, was als lytische Infektion bezeichnet wird.

Herpesviren sind außerdem in der Lage, nach einer Primärinfektion lebenslang im Wirt zu persistieren [30, 33]. In diesem Zustand, der als Latenz bezeichnet wird, ist die Produktion infektiöser Partikel unterbunden und die betroffenen Zellen überleben [23, 33]. Von Virus zu Virus unterscheiden sich die Orte der Latenz, das Herpes simplex-Virus (HSV) persistiert zum Beispiel in sensorischen Neuronen, das Epstein-Barr-Virus (EBV) in B-Lymphozyten [30, 36].

Ein weiterer Unterschied betrifft die Symptome der Infektionen, sowie die Häufigkeit der rekurrierenden Erkrankungen, welche die Viren ausgehend vom Ort der Latenz verursachen können [23, 36, 40].

1.2 Aufbau der Herpesviren

Die primäre Hüllmembran erhalten die Virionen nach ihrem Zusammenbau im Zellkern an der inneren Kernmembran der Wirtszelle [23]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Hülle zeigen ein typisches trilaminäres Aussehen. In die Hülle integriert sind zahlreiche Glykoproteine, Lipide und Polyamine. Herpes simplex-Viren besitzen acht dieser so genannten *Spikes*, welche verschiedenste Funktionen erfüllen [30]. Die Hülle umgibt eine amorphe Proteinmatrix, die als *Tegument* bezeichnet wird, ein Begriff, der 1974 von Roizman und Furlong geprägt wurde [30]. Die Breite dieser Schicht, verleiht dem Viruspartikel eine variable Größe von 120 bis 300nm. In das *Tegument* eingebettet findet sich das ikosaedrische, etwa 100 bis 110nm durchmessende Kapsid. Es stellt eine zweite Umhüllung dar, in deren Innern die lineare doppelsträngige DNA (dsDNA) um eine Proteinstruktur, das so genannte *Core,* angeordnet ist.

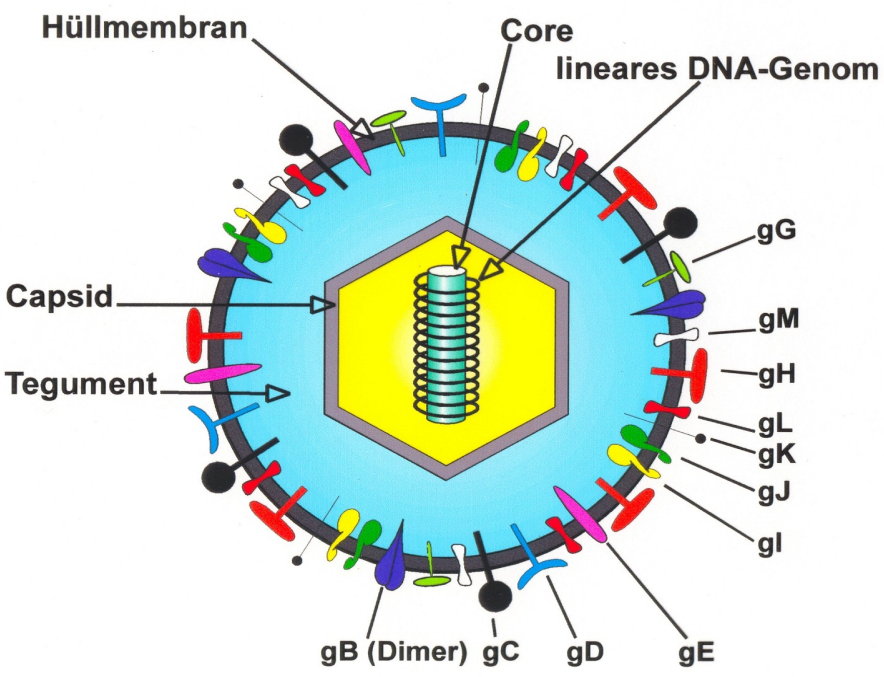

Abbildung 1.1 Aufbau des Herpes simplex-Virus

Aufbau des Herpes simplex-Viruspartikels. Bei den mit gB bis gM bezeichneten Strukturen handelt es sich um virale Glykoproteine sowie nichtglykosylierte Polypeptide, welche in die virale Hüllmembran als Spikes integriert sind. Sie sind für die Infektiosität des Virus von Bedeutung und erfüllen unterschiedliche Aufgaben bei der Adsorption an und der Penetration in die Wirtszelle. Die Funktionen der anderen Strukturen sind im Text beschrieben. (Modifiziert nach Modrow und Falke 1997 [23]).

1.3 Taxonomie

Auf der Basis der biologischen Eigenschaften unterteilte die Herpesvirus-Studiengruppe des *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) die Mitglieder der Familie *Herpesviridae* in drei Subfamilien [30, 37]. Diese Einteilung beruht nicht auf objektiven Kriterien, sondern auf Beobachtungen hinsichtlich der, Pathogenität und der Vermehrungseigenschaften der Viren sowie der als Wirtszellen dienenden Zelltypen.

1.3.1 α-Herpesviren

Den α-Herpesviren gehören die Herpes simplex-Viren und das Varizella Zoster-Virus (VZV) an. Diese zeichnen sich durch ein variables Wirtsspektrum, relativ kurze Replikationszyklen, rapide Ausbreitung in der Kultur sowie eine effiziente Zerstörung der infizierten Zellen aus. Kennzeichnend ist ebenfalls die Fähigkeit, latente Infektionen bevorzugt in sensorischen Ganglien hervorzurufen [30].

1.3.2 β-Herpesviren

Die β-Herpesviren, zu denen das Humane Cytomegalovirus ((H)CMV) zählt, besitzen ein eingeschränktes Wirtspektrum. Kennzeichen ist eine deutliche Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie). Orte der Latenz sind bei CMV hämatopoetische Stammzellen, Monozyten und Endothelzellen. Der Reproduktionszyklus ist lang, die Ausbreitung in der Kultur erfolgt daher nur langsam [23, 36].

1.3.3 γ-Herpesviren

Zu den γ-Herpesviren zählen die Lymphocryptoviren wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Humane Herpesvirus 8 (HHV8). Das experimentelle Wirtsspektrum der Mitglieder dieser Subfamilie ist streng limitiert. Die Dauer des Replikationszyklus ist variabel. Ort der Viruslatenz ist das lymphatische Gewebe. EBV infiziert zum Beispiel B-Lymphozyten [30]. Die Eigenschaft dieser Bevorzugung des lymphatischen Gewebes wird als Lymphotropismus bezeichnet.

1.4 Herpes simplex-Virus

Seit 1968 ist durch die Arbeit von Nahmias und Dowdle bekannt, dass zwei Typen der Herpes simplex-Viren existieren. Das Herpes simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) verursacht vor allem orolabiale Läsionen, wohingegen der Prädilektionsort des Herpes simplex-Virus Typ 2 (HSV-2) der Genitalbereich ist. Beide Viren können die meisten Zellkulturen von Vertebraten infizieren. In vivo werden sie einzig beim Menschen gefunden [28]. HSV ist ubiquitär verbreitet, es kommt sowohl in Industrienationen als auch bei isoliert lebenden Völkern vor. Schätzungsweise leidet über ein Drittel der Weltbevölkerung unter rekurrierenden Herpes simplex-Virusinfektionen. Die Seroprävalenz der HSV-1-Infektion im Erwachsenenalter liegt je nach sozioökonomischem Grad bei 70-95% [9, 12, 23, 28, 33, 47]. Bei der Ausbreitung des Virus spielen neben klinisch Kranken auch asymptomatische seropositive Personen als Infektionsquelle eine Rolle [28]. Die Anzahl dieser asymptomatischen Virusträger ist nicht gering, nur bei 20-40% der seropositiv getesteten Personen wurden rezidivierende Krankheitsbilder festgestellt [37].

1.4.1 Genom

Eine lineare, doppelsträngige DNA (dsDNA), mit einer Länge von 120.000 bis 230.000 Basenpaaren (bp) bildet das Genom der Herpesviren [30]. Beim Herpes simplex-Virus setzt es sich aus etwa 152.000bp zusammen [23, 40]. Im Genom finden sich einmalig vorkommende kurze und lange Sequenzabschnitte (*unique; U_L, U_S)*, welche von sich wiederholenden (*repeat)* Abschnitten umgeben sind. Diese sich wiederholenden langen und kurzen Abschnitte finden sich an den Enden der DNA (*terminal repeat; TR_L, TR_S)* sowie zwischen den einmaligen Sequenzen (*internal repeat; IR_L, IR_S)*, wie in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Diese Organisation des HSV-Genoms ist bei beiden Virustypen identisch.

Abbildung 1.2 Organisation des HSV-Genoms

Das Genom beginnt mit einer TR_L-Region (terminal repeat long) und endet mit einer TR_S-Region (terminal repeat short). Dazwischen befinden sich einmalige lange (U_L) und kurze (U_S) sowie sich wiederholende lange (IR_L) und kurze (IR_S) Regionen.

1.4.2 HSV-Infektion

Als Primärinfektion bezeichnet man eine erfolgreiche Erstinfektion nach Exposition entweder mit HSV-1 oder HSV-2, wenn zuvor noch kein Kontakt zu HSV bestand. Das Zustandekommen einer solchen Infektion setzt engen zwischenmenschlichen Kontakt voraus, da die Viruspartikel nur eine sehr geringe Umweltresistenz aufweisen [37]. In der Regel handelt es sich um direkte Infektionen, dass heißt über virushaltige Sekrete wie Speichel oder Genitalsekrete, die Schleimhäute oder geschädigte Haut benetzen. Indirekte Schmierinfektionen kommen selten vor. Nach der Primärinfektion kommt es zur Ausbildung der Latenz in den Neuronen der Spinalganglien. Bei orofacialen Infektionen handelt es sich in der Regel um das *Ganglion trigeminale*, bei *Herpes genitalis* um das *Ganglion sacrale*.

Durch eine Vielzahl interindividuell verschiedener äußerer und innerer Stimuli, die bezogen auf das Individuum sehr spezifisch und hoch reproduzierbar sind, kann eine Reaktivierung der latenten HSV-Infektion erfolgen. Kommt es hierbei zu einer asymptomatischen Virusvermehrung, spricht man von einer Rekurrenz. Gelangt das Virus durch anterograden, axonalen Transport vom Latenzort in die Peripherie und verursacht dort eine klinisch manifeste periphere Infektion, handelt es sich um eine Rekrudeszenz [36]. Diese verläuft im Vergleich zur Primärinfektion häufig deutlich milder.

Eine Reinfektion stellt eine exogene oder endogene Neuinfektion, mit einem anderen Stamm desselben Virustyps dar, gegen den bereits Antikörper vorliegen [28].

1.4.3 Infektionszyklus

Eine erfolgreiche HSV-Infektion wird initiiert durch Kontakt infektiöser Viruspartikel mit Schleimhaut oder abradierter Haut, wo das Virus an die Oberfläche suszeptibler Zellen binden kann. Hierbei sind zahlreiche Glykoproteine der Virushülle beteiligt [30]. Durch irreversible Fusion von Virushülle und Zytoplasmamembran penetriert das Virus in die Zelle [28]. An den Kernporen entlassen die Viruspartikel das Nukleokapsid in den Zellkern, woraufhin die Transkription der HSV-Gene zur Produktion neuer Viren beginnt [28].

Die Synthese viraler Genprodukte erfolgt in Form einer exakt regulierten Kaskade, die zu einer irreversiblen Unterdrückung der zellulären Proteinsynthese führt, was mit dem Zelltod gleichzusetzen ist [40]. Bestandteile des *Teguments* wie der so genannte *Alpha-trans-inducing-factor* (alpha-TIF = $V_{mw}65$) initiieren in dieser Infektionsphase die Synthese sehr früher (*immediate early* = IE) Proteine und bewirken gleichzeitig eine weitgehende Unterdrückung der zelleigenen Proteinsynthese. Dabei wird die Transkription von der zellulären RNA-Polymerase II übernommen. Die IE-Proteine stimulieren die Expression früher (*early* = E) Proteine. Bei diesen handelt es sich um Enzyme, welche unter anderem für den Nukleinsäurestoffwechsel in den infizierten Zellen und die Genomreplikation essentiell sind. Hierzu zählen die HSV-Thymidinkinase, die alkalische Exonuklease und die virale DNA-Polymerase.

Im Verlauf der Replikation viraler DNA im Zellkern werden auch späte (*late*, L) Virusproteine produziert. Sie stellen Strukturproteine dar, welche für den Aufbau von Nachkommenviren benötigt werden. Die neu gebildeten Viruspartikel werden an der Zelloberfläche ausgeschleust [28, 36, 40]. Nach dieser ersten Replikation am Ort der Infektion, die meist im epithelialen Gewebe als lokalisierte mukokutane Infektion abläuft, wird ein intaktes Virion oder ein Kapsid in sensorische Nervenendigungen aufgenommen und über ein Neuron retrograd zu dem korrespondierenden Ganglion, dem Ort der Latenz, transportiert.

1.4.4 Latenz und Reaktivierung

Latenz ist definiert als das Vorhandensein von viralem Genom im Gewebe, ohne Produktion von infektiösen Viruspartikeln und ohne Untergang der Wirtszelle [40]. Das Virus behält dabei die Fähigkeit die Replikation wieder aufzunehmen und eine rezidivierende Erkrankung zu verursachen. Bei der Erstinfektion, vermehrt sich das Virus in Epithelzellen und Keratinozyten am Ort der peripheren Infektion. Unabhängig davon, ob sich daraus eine sichtbare Haut- bzw. Schleimhautläsion entwickelt, werden neu gebildete Virionen von den freien Nervenendigungen aufgenommen und gelangen über axonalen Transport in die sensorischen Ganglien [28]. Die virale lineare dsDNA geht nach Freilassung in die Wirtszelle in eine zirkuläre Form, Episom, über, ohne in das Wirtsgenom integriert zu werden [28, 30, 40]. In dieser Form persistiert das Virus im Wirt, bis ein Stimulus die Reaktivierung in Gang setzt.

Diese Prozesse sind Ausdruck einer im Laufe der Evolution außerordentlich fein abgestimmten Virus-Wirt-Wechselbeziehung, bei der der Wirt den Vorteil des Überlebens davonträgt, das Virus den Vorteil, sich eine lebenslange potentielle Infektionsquelle zu erhalten [36]. Die Fähigkeit zum axonalen Transport bewahrt die sensorischen Ganglienzellen bei Reaktivierung des Virus vor der irreversiblen Zerstörung, denn die Virusvermehrung erfolgt in den Epidermiszellen des mukokutanen Gewebes [40]. Nur diese gehen bei Bildung der typischen Effloreszenzen unter, während die neuronalen Zellen geschützt sind.

1.4.5 Klink der HSV-Infektion

Herpes simplex-Virusinfektionen manifestieren sich in der Regel im orofazialen oder anogenitalen Bereich. Dabei wird *Herpes labialis* meist durch das HSV-1 und *Herpes genitalis* meist durch HSV-2 hervorgerufen. In der Mehrzahl der Fälle verläuft die Primärinfektion des *Herpes labialis* inapparent. Bei einem symptomatischen Verlauf kann es nach einer Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen bis zum Vollbild einer schweren, hochfieberhaften *Gingivostomatitis aphthosa* mit ulzerösen und vesikulären Läsionen, Ödemen, sowie lokalisierter Lymphadenopathie kommen. Der Zeitraum klinischer Krankheitserscheinungen variiert von zwei bis drei Wochen. Die Rekrudeszenz bei *Herpes labialis* kündigt sich meist durch ein Prodromalstadium aus Schmerz und Brennen an. Etwa sechs Stunden später erscheinen Bläschen an der Epidermis. Diese befinden sich bei der Mehrzahl der Patienten am Rand des Lippenrots und gehen innerhalb von etwa drei Tagen in Krusten über. Nach acht bis zehn Tagen kommt es zur narbenlosen Heilung.

Bei einer *Herpes genitalis*-Primärinfektion finden sich in der Anogenitalregion typische herpetiforme Bläschen, die von lokalisierter inguinaler Lymphadenopathie begleitet sein können. Die Abheilung erfolgt narbenlos innerhalb von acht bis zehn Tagen. Bei Frauen verläuft eine *Herpes genitalis*-Infektion oft schwerer als beim Mann und ist häufiger mit Komplikationen verbunden, was auf die anatomischen Gegebenheiten zurückzuführen ist. Im klinischen Verlauf unterscheiden sich Primärinfektion und Rekrudeszenz des *Herpes genitalis* ebenfalls darin, dass letztere meist eine geringere Ausdehnung der Haut- und Schleimhautläsionen zur Folge hat und von kürzerer Dauer ist [(28)].

1.4.6 Immunologische Aspekte

Beim Immunkompetenten wird eine HSV-Primärinfektion zunächst durch unspezifische humorale und zellvermittelte Faktoren limitiert [17]. Es folgt die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort mit Bildung zytotoxischer T-Zellen und spezifischer IgM- und IgG-Antikörper gegen das Virus, welche sich zum Beispiel typspezifisch gegen die Hüllglykoproteine gG-1 und gG-2 richten [49]. Die Geschwindigkeit der Ausbildung und die Intensität der Antikörperantwort hat Einfluss auf die Schwere der Erstinfektion. Durch eine adäquate Immunantwort können extrazelluläre Viruspartikel schnell neutralisiert werden. Sobald die erste Zelle infiziert ist, spielen Antikörper eine untergeordnete Rolle, denn HSV kann sich effektiv von Zelle zu Zelle ausbreiten, ohne das extrazelluläre Milieu zu betreten. Daher kann HSV aus der Latenz heraus trotz hoher Antikörpertiter reaktiviert werden [49].

Anders als bei VZV, bei dem mangelnde Immunkompetenz die hauptsächliche Grundlage für die Rekrudeszenz darstellt, stehen bei HSV Ursachen im Vordergrund, die auf eine Irritation der latent infizierten Neurone zurückzuführen sind. Beobachtungen an Immunsupprimierten und Neugeborenen lassen allerdings vermuten, dass neben den hormonellen und psychischen Faktoren auch das Immunsystem eine Rolle spielt [36]. Auf welche Weise die Immunmechanismen des Wirtes den Verlauf der reaktivierten HSV-Infektion beeinflussen, ist noch nicht vollständig geklärt [28].

1.4.7 Diagnostik

In der Regel bedürfen typische mukokutane Herpesläsionen keiner Laboruntersuchung, sondern werden klinisch diagnostiziert. Virologische oder serologische Abklärungen sind dagegen angezeigt, wenn bei uncharakteristischen Exanthemen, Enzephalitiden unklarer Genese oder disseminierten viszeralen Erkrankungen von einer Gefährdung des Patienten auszugehen ist. Besonders bedroht sind die Feten Schwangerer, Neugeborene oder Immunsupprimierte [(28)].

Die Diagnostik ist bis heute nicht ganz unproblematisch, da sich sowohl beide HSV-Typen als auch VZV morphologisch und serologisch sehr ähneln. Jedes der verschiedenen Verfahren, die zum Virusnachweis zur Verfügung stehen, weist Vor- und Nachteile auf. Die meisten Methoden werden heute in unterschiedlichen Bereichen eingesetzt. Der Erregernachweis ist beispielsweise mittels Elektronenmikroskop möglich. Es zeigt typische Herpesviruspartikel, allerdings ohne Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen beiden HSV-Typen und VZV [(28)]. Das Virus kann dabei während der Infektion und gelegentlich im Prodromalstadium aus Effloreszenzen und makroskopisch intaktem Gewebe im Bereich der entstehenden Läsionen isoliert werden, nicht dagegen in den erkrankungsfreien Intervallen.

Die Virusanzucht in der Zellkultur wird bis heute zur Diagnostik bei peripheren HSV-Infektionen herangezogen, ist aber arbeitsaufwendig und zeitintensiv. Verfahren zum Antigennachweis aus peripheren Läsionen wie die direkte Immunfluoreszenz sind möglich, setzen aber das Vorhandensein intakter virusinfizierter Zellen im Abstrichmaterial voraus. Antikörpernachweismethoden, welche ebenfalls recht aufwendig sind, bergen das Problem der Kreuzreaktion zwischen HSV und VZV. Es bedarf daher einer sorgfältigen Interpretation der Befunde im Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild [(28)].

HSV-1 und HSV-2 besitzen sehr enge antigene Verwandtschaft, eine Typisierung kann mit Hilfe monoklonarer Antikörper und Affinitätschromatographie oder mittels Untersuchungstechniken wie Immunoblot erfolgen. Besonders bewährt haben sich für die Typisierung der indirekte und direkte Immunfluoreszenz-Test (IFT) und der *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA).

Mittels ELISA werden Antikörper gegen nicht-zellassoziierte virale Antigene nachgewiesen, wobei sich neben zellhaltigen Abstrichmaterialien auch Vesikelflüssigkeit und andere Körperflüssigkeiten wie Liquor als

Untersuchungsmaterial eignen.

Die bedeutendste Methode zum HSV-Nachweis ist seit den 1990er Jahren die Polymerasekettenreaktion (PCR), welche sehr geringe Mengen viraler Nukleinsäuren nachweisen kann. Sie setzte sich zunächst vor allem in der Diagnostik der Herpesenzephalitis zur schnellen und spezifischen Detektion von HSV-DNA aus dem Liquor durch [19]. Zunächst wurden PCR-Techniken mit anschließender Gelelektrophorese eingesetzt. Die Typisierung der Viren erfolgte häufig mittels monoklonaler Antikörper oder Western-Blot-Techniken. Schon Ende der 1990er Jahre wurden typspezifische PCR-Methoden für den HSV-Nachweis entwickelt. Diese basieren bis heute meist auf *Primern*, die zur Amplifikation der Glykoproteine D von HSV-1 bzw. G von HSV-2 führten [14, 18, 22, 24, 31, 41, 46, 48]. In den letzten Jahren hat sich ein Verfahren durchgesetzt, bei dem Amplifikation und Nachweis simultan in einem geschlossenen System erfolgen, die *Taq*Man-PCR.

1.4.8 Therapie

Für die Therapie der HSV-Infektionen eignen sich verschiedene Chemotherapeutika, die in der Regel in die virale Proteinsynthese eingreifen. Beispielsweise fungieren einige als Thymidinanaloga, die die virale Thymidinkinase in ihrer Funktion behindern. Die virale Genexpression wird dadurch gestört, ohne dem Wirt zu schaden. Resistenzen gegen diese Virustatika, wie zum Beispiel eine Mutation der Thymidinkinase, welche vor allem bei HSV-2-Stämmen zu finden ist, erschweren die Therapie. Da es bisher noch nicht möglich ist, die Virusreplikation zu stoppen, die Latenzetablierung zu verhindern oder die Rezidivhäufigkeit zu reduzieren, handelt es sich bei der Behandlung der HSV-Infektionen zumeist um eine symptomatische Therapie ohne kurativen Ansatz [28].

1.4.9 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine 1985 von Karry Mullis entwickelte in vitro-Technik zur Amplifikation spezifischer, durch Oligonukleotid-*Primer* definierter DNA-Zielsequenzen [23]. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird die Matrize, auch als *Template* bezeichnet, repliziert. Unter optimalen Reaktionsbedingungen wird durch sich wiederholende Zyklen eine nahezu exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht. Die PCR erfolgt mit einem bestimmten periodischen Temperaturprofil.

Im ersten Schritt wird bei 95°C die DNA reversibel in Einzelstränge aufgetrennt. Hierdurch wird die Anlagerung der *Primer*, *Annealing* oder Hybridisierung genannt, im zweiten Schritt ermöglicht. Die Hybridisierungstemperatur liegt bei etwa 60°C. Durch das *Annealing* rahmen die beiden *Primer* als *Forward* und *Reverse Primer* die Zielsequenz ein. Als dritter Schritt folgt die Extension. In 5´-3´-Richtung, ausgehend von dem jeweiligen *Primer*, synthetisiert eine DNA-Polymerase mittels freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) entlang des Einzelstranges einen komplementären Strang. Eingesetzt wird oft die von dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus (Taq)* stammende DNA-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt, welche aber auch bei 95°C stabil bleibt, sofern diese Temperatur nur über kurze Zeitspannen besteht. Damit entfällt die Zugabe des Enzyms vor jedem neuen Extensionsschritt. Zur Reduktion auf zwei PCR-Schritte, werden bei aktuellen Methoden *Annealing* und Extension zusammengefasst, indem sie gleichzeitig bei derselben Temperatur ablaufen. Durch den Einsatz von *Thermocyclern*, welche die Temperatur während der PCR automatisch regulieren, konnte das Verfahren weiter vereinfacht werden.

Im Anschluss an eine konventionelle PCR müssen ihre Produkte, die Amplifikate, noch nachgewiesen werden, beispielsweise durch Färbung im Agarosegel. Im Gegensatz dazu bietet die so genannte *Taq*Man-PCR-Technologie die Möglichkeit der simultanen Durchführung von Amplifikation und indirektem Amplifikatnachweis in einem Reaktionsgefäß. Dies gelingt durch den Einsatz einer fluorogenen Sonde, einem Oligonukleotid, welches am 5´-Ende mit einem fluoreszierenden *Reporter*-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) versehen ist und dessen 3´-Ende einen *Quencher*-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt. Eingesetzt werden als *Quencher* TAMRA und als *Reporter* zum Beispiel VIC oder FAM. Die Sonde hybridisiert an der Zielsequenz zwischen den beiden *Primern*. Die räumliche Nähe von *Reporter*- und

Quencher-Farbstoff verhindert, dass es bei Anregung des Oligonukleotids bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz des *Reporters* kommt. Diese Unterdrückung ist Folge des so genannten Fluoreszenz-Energietransfers (FET). Während der Extensionsphase der PCR wird die Sonde durch 5´-3´-Exonukleaseaktivität der Polymerase von dem *Template* verdrängt und geschnitten. Durch diese Hydrolyse wird der FET unterbrochen und eine Zunahme des *Reporter*-Fluoreszenzsignals wird messbar. Dieser Vorgang erfolgt nur an stabil gebundenen Sonden. Dadurch erhält das Signal Sequenzspezifität, welche höher als bei konventionellen Verfahren ist. Von Zyklus zu Zyklus steigt die Fluoreszenz direkt proportional zur Amplifikatmenge an.

Nachweissystem ist z.B. das ABI PRISM 7700 SDS, welches neben dem integrierten *Thermocycler* und einer Laserlichtquelle eine CCD-Kamera besitzt, die den Anstieg des *Reporter*-Signals während des *Annealing*-Extensionsschrittes der PCR aufzeichnet. Die empfangenen Fluoreszenzsignale werden mittels Computer und spezieller *Software* ausgewertet. Um störende Einflüsse auf das *Reporter*-Signal auszugleichen, wird dem PCR-Ansatz ein weiterer fluoreszierender passiver Referenzfarbstoff zugesetzt, in der Regel ROX. Mit Hilfe des von ihm ausgehenden Referenz*s*ignals wird das Fluoreszenzsignal des *Reporters* zu einem normalisierten *Reporter-S*ignal (R_n-Wert) ausgeglichen, indem der Quotient aus *Reporter*-Signal und Referenzsignal gebildet wird.

Hierdurch können Einflüsse wie Volumenschwankungen durch Pipettierfehler ausgeglichen werden. Auch nicht unmittelbar PCR-abhängige Störungen, wie die Autofluoreszenz der Sonde, werden berücksichtigt, indem der ΔR_n-Wert berechnet wird. Zu diesem Zweck wird die Differenz aus dem R_n-Wert und dem Hintergrundsignal der ersten PCR-Zyklen gebildet. Der ΔR_n-Wert steigt bei positiver Reaktion mit jedem Zyklus an.

Als Schwellenzyklus C_T (*threshold cycle*) wird der Zyklus bezeichnet, in dem der ΔR_n-Wert erstmals die Grundlinie passiert, und damit eine positive Reaktion anzeigt.

Die schematische Darstellung der ersten Zyklen einer Polymerasekettenreaktion in Abbildung 3.1 zeigt, wie die Zielsequenz, welche durch den *Forward* und *Reverse Primer* definiert ist, amplifiziert wird.

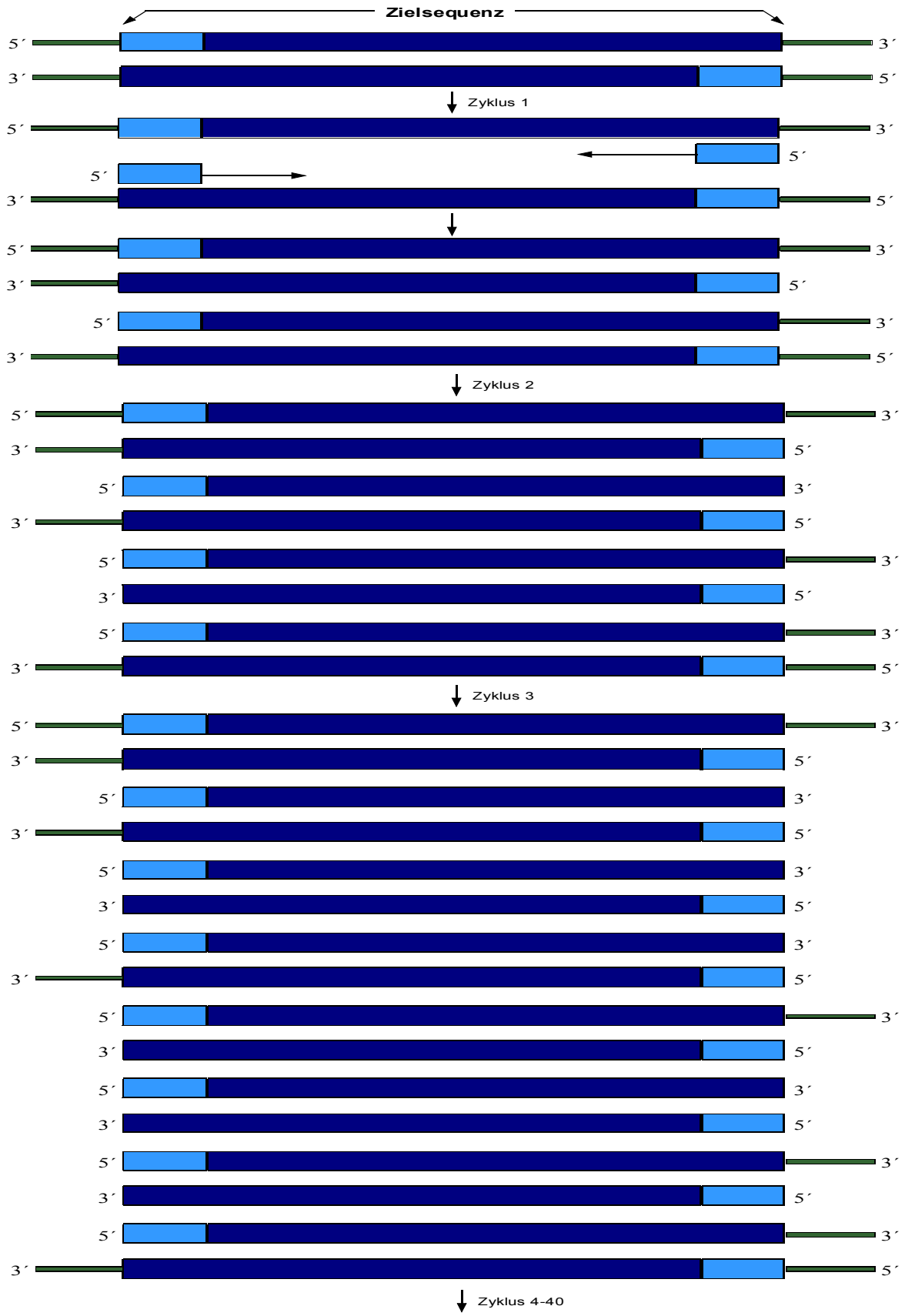

Abbildung 1.3 Polymerasekettenreaktion

In der Abbildung sind die ersten drei Zyklen einer PCR dargestellt. Die durch die Primer definierte Zielsequenz wird vervielfältigt, ab dem vierten Zyklus erfolgt die Vervielfältigung nahezu exponentiell.

1.5 Zielsetzung

Die Herpes simplex-Viren zählen zu den neurotropen α-Herpesviren, deren Latenzort das Nervensystem darstellt, von wo aus sie über axonalen Transport zur Peripherie gelangen und dort Effloreszenzen hervorrufen können. Wegen dieser Eigenschaft des axonalen Transportes, galt als gesichert, dass es bei Rekrudeszenzen eines *Herpes labialis* oder *genitalis* nicht zu einer Virämie kommt. In der Vergangenheit sind jedoch Arbeiten erschienen, die eine Virämie von HSV beschreiben, und dem Virus sogar lymphotrope Eigenschaften zuordnen [3, 7, 42, 44]. So wurde z.B. der Nachweis von HSV-DNA in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC´s) bei sonst gesunden Personen mit rekurrierendem *Herpes labialis* [3] und in Zusammenhang mit Morbus Behcet [42], *Pemphigus vulgaris* [44] und Immunsuppression nach Knochenmarktransplantation beschrieben [7].

Erstes Ziel unserer Studie war die Entwicklung einer *Taq*Man-PCR-Methode, mit der das Genom des Herpes simplex-Virus möglichst typspezifisch nachgewiesen werden kann. In darauf folgenden Untersuchungen sollten die Theorien zum Lymphotropismus des Virus überprüft werden. Hierfür wurden Effloreszenzabstriche, PBMC´s sowie Plasmaproben von Patienten mit der klinischen Diagnose *Herpes labialis* oder *Herpes genitalis* gewonnen. Die Untersuchungen der Proben sollten darüber Aufschluss geben, ob zu irgendeinem Zeitpunkt der HSV-Infektion virale DNA in Blutbestandteilen zu finden ist. Im positiven Fall sollte erarbeitet werden, welche Faktoren für dieses Vorhandensein von HSV-DNA verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden Fragebögen über die Gesundheitssituation der Patienten sowie deren Herpesinfektion entworfen. Anhand der Ergebnisse sollten auch mögliche Konsequenzen eines Nachweises von HSV-DNA im Blut beurteilt werden.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Aceton	(Merck KG , Darmstadt, Deutschland)
Antikörper CD45	(Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
Calibration beads	(*Fluorospheres*, Beckmann Coulter, Fullerton, USA)
Cellstar® Greiner bio-one 15ml Reagenzgefäße	(Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
DPBS-Puffer BioWittaker™	(Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgien)
Ethanol absolut	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
EDTA-Monovetten (9ml,1.6mg EDTA/ml Vollblut)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
MicroAmp® Optical Caps	(PE Applied Biosystems, Foster City, USA)
MicroAmp® Optical Tubes (0.2ml)	(PE Applied Biosystems, Foster City, USA)
MicroAmp® Optical 96-Wellreaction Plate	(PE Applied Biosystems, Foster City, USA)
Mikro-Schraubröhre (1.5ml)	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Nuclease-free Water	(Promega Corporation, Madison, USA)
PS 5ml FACS-Röhrchen	(Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
PCR Arbeitstray	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen 10µl *Safe-seal-Tips*, 100µl *Safe-seal-Tips*, 1000µl MβP	Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch-Oldendorf, Deutschland) (*Molecular Bio Products*, San Diego, USA)
2-Propanol	(Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
Vacutainer® CPT™ *Cell Preparation Tube with Sodium Citrate*	(Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Sterile Scheren	
Ventri Transsystem sterile Tupfer	(HAIN DIAGNOSTIKA GmbH, Nehren, Deutschland)

2.2 Geräte und Zubehör

ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System*	(PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland)
Biologische Sicherheits-werkbank Heraeus Lamin Air HA 2472 GS	(W.C. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer EPICS XL MCL©	(Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)
Eppendorf Zentrifuge 5416	(Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf *reference fix* Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	(Eppendorf-Netheler- Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Thermomixer Comfort 5355	(Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)
Gefrierwand “Viessmann” KW1	(Hauschild GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland)
Horizontalzentrifuge Hettich Rotixa/P	(Andreas Hettich GmbH,Tuttlingen, Deutschland)
Julabo-Schüttelwasserbad SW 20	(Jubalo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland)
Kühlschrank-/ Gefrierschrank	(Siemens Elektrogeräte GmbH)
NucliSens® Extractor	(bioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland)
Power Macintosh 7200/120	(PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland)
Power Macintosh G3	(PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland)
Vortexer Reax 2000 (200-2400U/min)	(Heidolph, Kehlheim, Deutschland)

2.3 Testkits

NucliSens® Automated Isolation Reagents	(bioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland)
QIAamp® DNA Mini Kit	(QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	(QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
Puregene™ DNA Isolation Kit	(Gentra Systems, Minneapolis, USA)
*Taq*Man™ *β-actin Control Reagents*	(PE Applied Biosystems, Foster City, USA)
*Taq*Man™ *PCR Core Reagents*	(PE Applied Biosystems, Branchburg, USA)
*Taq*Man™ *Universal PCR Master Mix*	(PE Applied Biosystems, Branchburg, USA)

2.4 Computerprogramme

OMIGA 2.0	(Oxford Molecular Ltd., Oxford, Großbritannien)
Primer Express™ Version 1.0	(PE Applied Biosystems, Foster City, USA)
SPSS 9.0 für *Windows*	(SPSS GmbH, München, Deutschland)
Software für EPICS XL MCL System II Version 3.0	(Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)

2.5 Proben

2.5.1 Patientenproben

Zunächst wurde ein Fragebogen entwickelt, der wichtige Informationen über die Versuchspersonen in Bezug auf diese Studie erfassen sollte, s. S. 64. Neben Geschlecht und Alter sowie der Zugehörigkeit zu den Gruppen Dauerblutspender, Zahnarztpatient, Patientin der Frauenklinik der Universität Köln oder sonstige Probanden enthielt der Bogen auch Fragen über den Gesundheitszustand der Versuchsperson. Das Alter der Effloreszenzen und die Manifestationsform zum Zeitpunkt der Probennahme, zum Beispiel Rötung, Bläschen, Krusten oder andersartige Läsionen, wurden erfragt. Von besonderem Interesse war, ob es sich um eine Erstinfektion oder um eine Rekrudeszenz handelte. Berücksichtigt wurde auch, ob die Effloreszenzen bereits behandelt wurden und, wenn ja, mit welchem Medikament. Es wurde ebenfalls erfragt, ob neben der Herpesinfektion noch zusätzliche Infektionskrankheiten oder Immunsuppressionen bestanden. Alle Patienten wurden über die geplanten Experimente aufgeklärt und willigten ein, an dieser Studie teilzunehmen.

Die Probenmaterialien zur Untersuchung eines *Herpes labialis* wurden von einem Personenkollektiv gewonnen, welches sich aus neun Dauerblutspendern des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Lübeck, 15 Patienten der Zahnarztpraxis Dr. med. Heike Hennig in 23923 Herrnburg sowie fünf weiteren Probanden zusammensetzte (n= 29). Alle Personen waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung, bis auf die vorhandenen Herpesläsionen, gesund. Das *Herpes genitalis*-Patientenkollektiv bestand aus 16 Patientinnen der gynäkologisch-infektiologischen Spezialsprechstunde der Frauenklinik der Universität Köln, sowie einem männlichen Probanden (n = 17). Ein Teil der Patientinnen war immunsupprimiert oder litt unter weiteren Erkrankungen.

2.5.2 Kontrollproben

Für HSV-negative Kontrollblutproben stellten sich vier freiwillige gesunde Probanden zur Verfügung, bei denen bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme nie Effloreszenzen eines *Herpes labialis* oder *genitalis* aufgefallen waren.

2.6 DNA

2.6.1 DNA zur Methodenentwicklung

Für die Entwicklung einer typspezifischen PCR wurden folgende HSV-DNA-Proben aus Ringversuchsprogrammen des Instituts für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e.V. (Düsseldorf, Deutschland) eingesetzt:

Herpes simplex-Virus Typ 1, Probe 13012

Herpes simplex-Virus Typ 2, Probe 14012

2.6.2 DNA-Standard

Die Nachweisgrenze der PCR wurde mittels standardisierter DNA bestimmt. Diese wurde von ABI *Advanced Biotechnologie Inc*. (Columbia, Maryland, USA) bezogen:

Herpes simplex-Virus Type 1 (HSV- 1), Quantitated Viral DNA Control

Lot No. 4346-021699; DNA Copy No. 1 x 10^4 DNA copies/µl, Unit Size 250µl

Herpes simplex-Virus Type 2 (HSV- 2), Quantitated Viral DNA Control

Lot No. 4347-021699; DNA Copy No. 1 x 10^4 DNA copies/µl, Unit Size 250µl

2.6.3 Humane DNA

Als interne Positivkontrolle (IPC) wurde humane DNA eingesetzt, welche in dem *Taq*Man *β-actin Control Reagents-Kit* enthalten ist.

2.7 *Primer* und Sonden

Die Synthese der Oligonukleotide für die HSV-PCR inklusive der internen Kontrolle wurde externen Syntheselaboratorien in Auftrag gegeben. Die Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) und die *Taq*Man-Sonden von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) hergestellt. Unter Abschnitt 4.1 sind die Sequenzen der Oligonukleotide nachzulesen.

3 Methoden

3.1 Probengewinnung

3.1.1 Abstriche

Mit einem sterilen Tupfer wurden Effloreszenzabstriche gewonnen, indem vorhandene Bläschen unter leichtem Druck eröffnet oder Teile der Kruste abgetragen wurden. Vor der Aufbewahrung wurden die Abstriche an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und der Wattekopf des Watteträgers mit einer sterilen Schere abgeschnitten. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei < -20°C in einem sterilen Reagenzgefäß.

3.1.2 Blutentnahme und Plasmaseparation

Die Blutentnahme periphervenösen Blutes erfolgte jeweils in acht 9ml EDTA-Monovetten. Um die Ausbeute der Zellen nicht zu verringern, schlossen sich die weiteren Verarbeitungsschritte baldmöglichst an, in jedem Falle innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme. Vier Monovetten wurden für die Plasmaseparation in der Horizontalzentrifuge mit 1.650 x g 20 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder in sterilen Reagenzgefäßen bei < -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.1.3 PBMC-Isolation

Das gewonnene periphervenöse Blut aus vier weiteren EDTA-Monovetten wurde in *Vacutainer® CPT*™-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur in einer Horizontalzentrifuge 20 Minuten lang mit 1.650 x g zentrifugiert. Durch diese Zentrifugation trennte sich jeweils eine PBMC-Schicht vom Vollblut. Diese wurde vorsichtig abpipettiert und anschließend verschiedenen Waschschritten unterzogen. Hierzu wurden die PBMC´s mit 10ml PBS-Puffer versetzt und erneut zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte in der Horizontalzentrifuge bei Raumtemperatur mit 600 x g für 10 Minuten. Der dabei entstandene Überstand wurde dekantiert, das verbleibende Pellet in 1,5ml PBS-Puffer aufgelöst, in ein Reagenzgefäß gegeben und etwa 30 Sekunden bei maximaler Einstellung mittels Vortexer resuspendiert. Mittels Durchflußzytometrie wurde aus 100µl dieser Lösung die Zellzahl bestimmt, während der verbleibende Zellanteil durch eine dritte Zentrifugation bei Raumtemperatur in einer Zentrifuge mit 6.172 x g für zwei Minuten vom Waschpuffer abzentrifugiert wurde. Nach diesem Schritt schloss sich die DNA-Isolation entweder sofort an oder nach möglichst kurzer Lagerungsphase bei < -20°C.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflußzytometrie

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden in 1,5ml-Reagenzgefäßen zunächst 20µl CD45-Antikörper vorgelegt, und 100µl Zellsuspension zugegeben. Es folgten ein kurzes Mischen mit dem Vortexer zur optimalen Anlagerung der Antikörper an die Zellen und anschließend eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Abschließend wurden noch 100µl *Calibration beads* zugesetzt und erneut gemischt. Die Zählung der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometer. Die Vollblutproben der Kontrollgruppe und der Patienten enthielten hochgerechnet zwischen 1,35Mio und 5,4Mio PBMC´s pro ml periphervenösen Blutes.

3.2 Nukleinsäureisolation

3.2.1 Abstriche

Die DNA-Isolation erfolgte mittels *QIAamp® DNA Mini Kit* anhand des Protokolls für bukkale Abstriche. Den Watteträgern, welche Abstrichmaterial der Hautläsionen enthielten, wurden bei Raumtemperatur jeweils in einem 2ml-Reagenzgefäß 400µl PBS-Puffer zugesetzt. Nacheinander wurden 20µl Protease und 400µl AL-Puffer zugegeben. Die Reagenzien wurden daraufhin sofort 15 Sekunden im Vortexer vermischt. Es schloss sich eine 10-minütige Inkubation bei 56°C im Thermomixer an. Um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen, wurde jedes Reagenzgefäß kurz anzentrifugiert. Der Lösung wurden anschließend jeweils 400µl Ethanol absolut zufügt, woraufhin eine erneute Mischung für 15 Sekunden folgte und mittels Zentrifuge Tropfen von der Deckelinnenseite entfernt wurden.

Für jede Probe wurde eine *QIAamp*®-Säule in ein Sammelröhrchen platziert. Jeweils 700µl der Mischungen aus Abstrichmaterial, Protease, Puffer und Ethanol wurden aus den Reagenzgefäßen auf eine dieser Säulen pipettiert und anschließend für eine Minute bei 6.583 x g zentrifugiert. Noch vorhandene Reste der Mischungen wurden jeweils auf dieselbe Säule gegeben und einer erneuten Zentrifugation wie zuvor unterzogen. Anschließend wurden den *QIAamp*®-Säulen 500µl Waschpuffer AW1 zugesetzt. Es folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 6.583 x g, die dabei ausgewaschene Lösung wurde verworfen. Für den nächsten Waschvorgang wurden 500µl Waschpuffer AW2 zugefügt. Mittels dreiminütiger Zentrifugation bei 23.143 x g wurde erneut die Waschflüssigkeit abzentrifugiert und verworfen. Im letzten Schritt wurden auf die Säulen jeweils 100µl Elutionspuffer (AE-Puffer) pipettiert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur und nach einer letzten einminütigen Zentrifugation bei 6.583 x g blieben jeweils etwa 100µl DNA-Lösung im Sammelröhrchen zurück.

3.2.2 Ringversuchsproben

Die DNA aus den Ringversuchsproben wurde mittels *QIAamp® DNA Mini Kit* anhand des Protokolls für Blut und Körperflüssigkeiten isoliert. Zunächst wurden die lyophilisierten Proben bei Raumtemperatur in 600µl PBS-Puffer aufgelöst. Für jede Probe wurden in ein Reagenzgefäß 20µl Protease vorgelegt, jeweils 200µl der gelösten Probe zugegeben und nacheinander mit 200µl AL-Puffer versetzt. Um eine gute Durchmischung der Reagenzien zu erreichen, wurden die verschlossenen Reagenzgefäße sofort 15 Sekunden lang mittels Vortexer geschüttelt. Es schloss sich eine 10-minütige Inkubation bei 56°C im Thermomixer an. Um Tropfen von der Deckelinnenseite zu entfernen, wurden die Reagenzgefäße danach kurz anzentrifugiert. In jede Probe wurden 200µl Ethanol absolut gegeben, die verschlossenen Reagenzgefäße im Vortexer 15 Sekunden geschüttelt und anschließend erneut anzentrifugiert.

Für jede Probe wurde eine *QIAamp*®-Säule in ein Sammelröhrchen platziert und die Mischung aus Zellen, Protease, Puffer und Ethanol hineinpipettiert. Es folgte die erste Zentrifugation bei 23.143 x g für eine Minute. Die Säulen wurden anschließend in frische Sammelröhrchen gestellt und 500µl Waschpuffer AW1 zugefügt, welcher durch erneute Zentrifugation wie zuvor die Säulen passierte. Für den nächsten Waschvorgang wurden die Säulen in neue Sammelröhrchen platziert und 500µl Waschpuffer AW2 zufügt. Die folgende Zentrifugation dauerte drei Minuten bei 23.143 x g. Abschließend wurden jeweils 50µl AE-Puffer auf die Säulen gegeben und nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden durch eine letzte Zentrifugation bei 6.583 x g für eine Minute 50µl DNA-Lösung in dem Sammelröhrchen aufgefangen.

3.2.3 PBMC´s

Die DNA aus PBMC´s wurde mit dem *Puregene DNA Isolation Kit* isoliert. Zunächst wurde das mittels *Vacutainer® CPT™ System* gewonnene Zellpellet bei Raumtemperatur in 20µl Aqua dest. aufgelöst und sofort gut im Vortexer gemischt. Es wurden 300µl Lösung zur Zelllyse dazugeben und mittels Pipette in eine homogene Mischung überführt. Daraufhin wurden 100µl einer Lösung zur Proteintrennung zugefügt und mit dem Vortexer für mindestens 20 Sekunden gemischt. Es folgte die erste einminütige Zentrifugation bei 23.143 x g. Über dem PBMC-Pellet bildete sich dabei ein Überstand, welcher die DNA enthielt. Dieser Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und mit 300µl absolutem Isopropanol versetzt.

Durch andauerndes vorsichtiges Schwenken wurde eine gute Durchmischung erreicht, bevor die zweite Zentrifugation wie zuvor erfolgte. Hierbei entstand ein DNA-Pellet. Der darüber befindliche Überstand wurde abgegossen, und 300µl 70%igen Ethanols wurden zugegeben. Erneutes Schwenken führte zur Mischung, der sich die dritte Zentrifugation für eine Minute bei 23.143 x g anschloss. Der Ethanolüberstand wurde vorsichtig abgegossen. Nach einer Wartezeit von etwa 15 Minuten, in der die Reagenzgefäße vollständig trockneten, wurden 50µl Aqua dest. zu den DNA-Pellets gegeben. Durch erneutes kurzes Mischen im Vortexer auf mittlerer Stufe wurde eine homogene Mischung erreicht. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 65°C im Thermomixer folgte ein letztes Mischen für etwa fünf Sekunden mittels Vortexer.

3.2.4 Plasma

Zur DNA-Isolierung mittels *NucliSens® Extractor* mussten die Plasmaproben, welche zuvor bei < -20°C lagerten, zunächst auf Raumtemperatur erwärmt werden. Um vorhandene Kristalle aufzulösen, wurde der ebenfalls tiefgefrorene Lysepuffer etwa 15 Minuten lang bei 60°C im Wärmebad erwärmt. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Kartuschen, welche zusammengesetzt und beschriftet werden mussten. Nach der Erwärmung des Lysepuffers folgte die erste Zentrifugation desselben in der Horizontalzentrifuge für zwei Minuten bei 15.000 x g. Anschließend wurden 2ml der Plasmaproben in den Puffer geben. Um eine homogene Mischung zu erreichen, wurden die Reagenzgefäße mehrfach geschwenkt.

Nach einer 30-minütigen Inkubation im Wärmebad bei 60°C und horizontalem Schütteln schloss sich die zweite Zentrifugation, ebenfalls in der Horizontalzentrifuge, für zwei Minuten bei 15.000 x g an. Den Proben wurden daraufhin jeweils 50µl Silikasuspension zugesetzt. Durch mehrmaliges Schwenken der Reagenzgefäße in Abständen von zwei Minuten wurden die Reagenzien gut vermischt. Nach etwa 10 Minuten wurde diese Mischung in die Kartuschen umgefüllt. Diese wurden in den *NucliSens® Extractor* gesetzt, und nach einer Überprüfung aller Stationen konnte der Lauf entsprechend der Einstellungen für Plasma und Serum (*Standard Sample-High Eluation Extraction = 11ml Eluhigh*) gestartet werden.

3.3 *Taq*Man-PCR

3.3.1 Oligonukleotidauswahl

Anhand der veröffentlichten Gensequenzen, die die *GenBank* des *National Centre for Biotechnology Information* (Bethesda, USA) verwaltet, wurden zunächst 12 mögliche HSV-1-Sequenzen sowie zwei HSV-2-Sequenzen mittels *OMIGA 2.0 Software* verglichen. Die Auswahl der geeigneten typspezifischen *Primer*- und Sonden-Kombinationen wurde anschließend mittels *Primer Express Software* durchgeführt. Hierbei wurde auf die optimale Länge und den Gehalt an Guanin und Cytosin geachtet. Des Weiteren wurden die jeweiligen *Forward* und *Reverse Primer* so gewählt, dass ihre Schmelztemperaturen (T_m) annähernd gleich waren. Die Schmelztemperaturen der Sonden wurden entsprechend der PCR-Technologie um 9 bis 14°C höher gewählt als die der *Primer*. Unter Verwendung des *Basic Logical Alignment Search Tools (blast)*, welches im Internet zu finden ist (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), wurden die ermittelten HSV-Sequenzen mit in dieser Datenbank verfügbaren Sequenzen verglichen. Der Nachweis anderer bekannter Sequenzen konnte ausgeschlossen werden. Die optimalen Oligonukleotide wurden den oben aufgeführten Laboratorien zur Synthese in Auftrag gegeben.

3.3.2 PCR-Optimierung

Die Optimierung der HSV-PCR erfolgte ausgehend von einem vorgegebenen Standardprotokoll für die quantitative *Taq*Man-PCR zum Nachweis von DNA. Es gab die Konzentrationen der Reagenzien für eine 50µl Reaktionslösung und die Temperaturen der verschiedenen PCR-Schritte für die ersten Experimente vor. Die aufgeführten Komponenten wurden zu einem *MasterMix* für die entsprechende Anzahl an Reaktionsgefäßen zusammengefasst. Dabei wurde der *MasterMix* zum Ausgleich möglicher späterer Pipettierfehler so berechnet, dass jeweils für zwei Reagenzgefäße mehr Material zur Verfügung stand. Des Weiteren wurden pro Lauf jeweils zwei Reaktionsgefäße als Ohne-*Template*-Kontrollen (*no-template control* = NTC) abpipettiert, bevor die DNA zugefügt wurde.

Beginnend mit der Ermittlung der optimalen Temperatur für den *Annealing*-Extensionsschritt für die *Prime*r-Sonden-Kombinationen beider HSV-Typen wurde das Standardprotokoll modifiziert. In mehreren Versuchsanordnungen wurden die Temperaturen von 59°C bis 65°C verglichen. Unverändert blieben die Temperaturen des einmaligen zweiminütigen UNG-Verdaus bei 50°C, die 10-minütige Inkubation bei 95°C zur Zerstörung von *Carryover*-Molekülen sowie die Temperatur der DNA-Denaturierung (15 Sekunden bei 95°C in jedem Zyklus). Für beide HSV-Typen konnte die gleiche *Annealing*-Extensionstemperatur ermittelt werden, was uns ermöglichte, in sehr großen Versuchsanordnungen beide Genome gleichzeitig nachzuweisen. Außerdem konnten Versuche zum Nachweis der Typspezifität durchgeführt werden, deren Ergebnisse unabhängig von der *Annealing*-Extensionstemperatur bewertet werden konnten.

Anschließend wurden die idealen Sonden- und Magnesiumchlorid-Konzentrationen schachbrettartig titriert. Getestet wurden Konzentrationen von 3,5mM bis 8,5mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), sowie von 100nM bis 400nM Sonden. Zuletzt wurden mittels *Primer*-Matrix die optimalen Konzentrationen für *Forward* und *Reverse Primer* ermittelt. Das Kriterium, welches die jeweils bessere Temperatur oder Konzentration anzeigte, war der niedrigste C_T-Wert bei möglichst hohem ΔR_n-Wert.

Durch den Einsatz des maschinell hergestellten *Taq*Man *Universal MasterMix*, welcher die hitzestabile Ampli*Taq* Gold DNA-Polymerase, den passiven Referenzfarbstoff ROX, die Nukleosidtriphosphate und AmpErase (Uracil-N-Glycosylase = UNG) in definierten Konzentrationen enthielt, konnten mögliche Pipettierfehler reduziert werden.

3.3.3 NTC und IPC

Für den Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse wurden eine Ohne-*Template*-Kontrolle (*no-template control* = NTC) und eine interne Positivkontrolle *(internal positive control* = IPC) eingefügt. Als IPC wurde das humane *β-actin*-Gen gewählt, welches während der PCR durch eine eigene *Primer*-Sonden-Kombination ohne die Amplifikation der HSV-Sequenz zu stören vervielfältigt und mittels eines zweiten Reporterfluoreszenzfarbstoffs nachgewiesen wurde. Es zeigte sich, dass in den Abstrich- und Plasmaproben nicht ausreichend humane DNA vorhanden war, um als IPC zu dienen. Daher musste für den Nachweis von HSV-DNA aus Plasma- und Abstrichproben humane DNA zugefügt werden, um eine IPC zu gewährleisten.

3.3.4 HSV-Typspezifität

Um die Typspezifität der Methode zu überprüfen, wurden Versuche durchgeführt, bei denen in einem Reaktionsansatz die DNA beider HSV-Typen sowohl mit den dazugehörigen Reagenzien, als auch mit den Reagenzien zum Nachweis des anderen HSV-Typs versetzt wurde.

3.3.5 Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der 95%-Nachweisgrenze der *Taq*Man-HSV-PCR, wurden für beide HSV-Typen halblogarithmische Verdünnungsreihen mittels quantifizierter HSV-DNA der Firma *Advanced Biotechnology Inc.* erstellt und getestet. Ausgehend von 10^3 Genomäquivalenten (geq)/µl ergaben sich Verdünnungsstufen von $10^{2,5}$, 10^2, $10^{1,5}$, 10^1 und $10^{0,5}$ geq/µl.

3.3.6 Temperaturprofile des *Thermocyclers*

Da für beide HSV-Typen das gleiche Temperaturoptimum für den *Annealing*-Extensionsschritt ermittelt wurde, entsprachen sich auch die Temperaturprofile beider PCR-Methoden. Zu Beginn jeder PCR erfolgte eine einmalige zweiminütige Inkubation bei 50°C gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 95°C. Diese Inkubationen dienten dem Schutz vor *Carryover*-Kontamination. Bei 50°C wurden *Carryover*-Moleküle zunächst durch eine Uracil N-Glykosylase (UNG) glykosyliert, bei 95°C erfolgten anschließend die Zerstörung dieser abasischen Moleküle und die Inaktivierung der UNG. Während der 10-minütigen Inkubation bei 95°C kam es des Weiteren zur Denaturierung des *Templates* und zur Aktivierung der DNA-Polymerase. Es schlossen sich 40 Zyklen an, die jeweils aus zwei Schritten bestanden. Der erste Schritt diente jeweils der Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge, er fand 15 Sekunden bei 95°C statt. Der zweite Schritt, der *Annealings*-Extensionsschritt dauerte jeweils eine Minute bei 63°C.

3.3.7 Auswertung der PCR-Ergebnisse

Bei der Auswertung der PCR-Ergebnisse wurden alle Reaktionen mit einem C_T-Wert kleiner als 40 als positiv gewertet. Reaktionen mit C_T-Werten gleich 40 galten als negativ. Für die Auswertung musste zunächst der Grenzwert berechnet werden. Dieser entsprach der 10-fachen Standardabweichung des Hintergrundfluoreszenzsignals, das während der Zyklen drei bis 30 gemessen wurde. Im Falle stark positiver Reaktionen mit C_T-Werten unter 30 wurde die Grundlinie verschoben bis zu dem Zyklus vor dem ersten sichtbaren exponentiellen Anstieg der PCR-Kinetik.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Methodenentwicklung

4.1.1 Oligonukleotidauswahl

Tabelle 4.1 Oligonukleotidsequenzen

Oligonukleotid	Sequenz 5´ => 3´	T_m	GC-Gehalt
HSV-1-FP	CGC AAG CCC CCA AAC C	60°C	69%
HSV-1-S	VIC – AGC GCA TCA AGA CCA CCT CCT CCA TCG A – TAMRA	74°C	57%
HSV-1-RP	CAA CAT ATC GTT GAC ATG GCG C	62°C	50%
HSV-2-FP	CGC AAG CCC CGG AAT G	61°C	69%
HSV-2-S	VIC – TCG ATC GAG TTC GCC CGG CTG – TAMRA	70°C	67%
HSV-2-RP	TTC CAG AGA GTC AGC TCG TGG	59°C	57%

In der Tabelle sind die Sequenzen der eingesetzten Sonden (S), Forward Primer (FP) und Reverse Primer (RP), sowie der GC-Gehalt (in %) und die Schmelztemperatur (T_m in °C) aufgeführt. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, VIC = Reporter-Farbstoff, TAMRA = Quencher-Farbstoff.

4.1.2 PCR-Optimierung

Temperaturoptimierung

Die PCR-Optimierung begann mit Experimenten auf der Grundlage des Standardprotokolls für die quantitative *Taq*Man-PCR für den Nachweis von DNA, welches wie oben beschrieben modifiziert wurde. Es zeigte sich, dass Versuche mit höheren Zykluszahlen keine besseren Ergebnisse erzielten, so dass 40 Zyklen beibehalten wurden. Die ersten Experimente galten der Ermittlung der idealen Temperaturen des jeweiligen *Annealings*-Extensionsschrittes. In Abbildung 4.1 sind die getesteten Temperaturen aufgezeigt. Für beide Virustypnachweise fand sich das Temperaturoptimum bei 63°C.

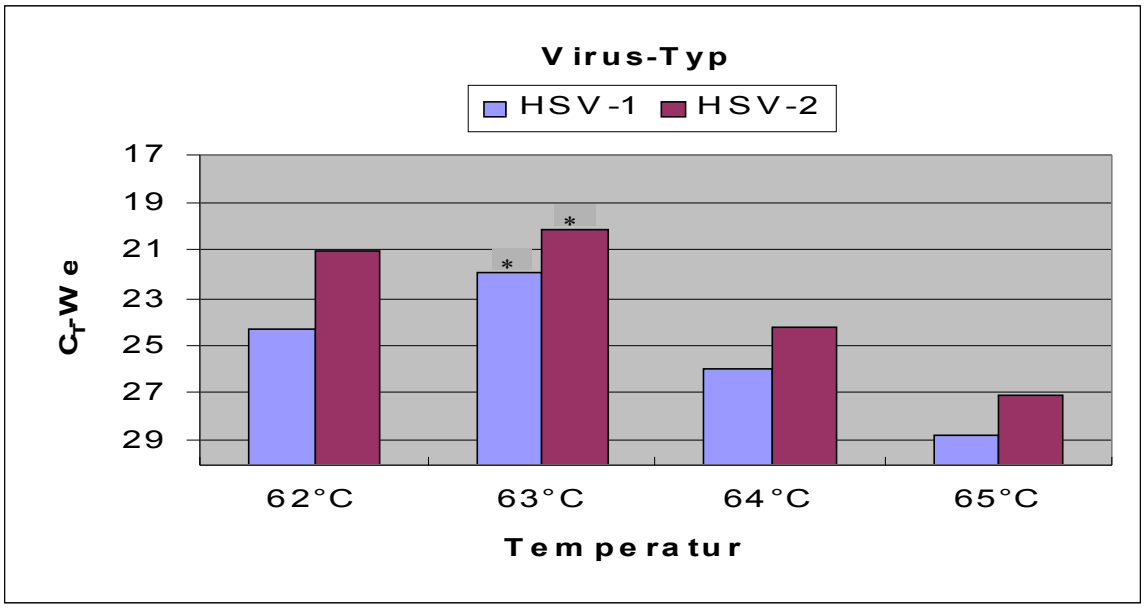

Abbildung 4.1 Temperaturoptimierung beider Virusnachweismethoden

Die Abbildung zeigt, dass für beide Virusnachweismethoden das Temperaturoptimum bei 63°C liegt (*), da hier die PCR-Kinetik jeweils am frühesten den Schwellenwert erreichte, sichtbar am kleinsten C_T-Wert.

Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen

Der Temperaturoptimierung schloss sich die schachbrettartige Titration der Sonden- und Magnesiumchlorid-Konzentrationen an. Die besten Ergebnisse wurden bei Sonden-Konzentrationen von 350nM für die HSV-1-PCR und 200nM für die HSV-2-PCR erzielt. Die optimalen Magnesiumchlorid-Konzentrationen lagen für HSV-1 bei 8mM und für HSV-2 bei 7,5mM. Die Abbildung 4.2 veranschaulicht die Ergebnisse der HSV-1-PCR.

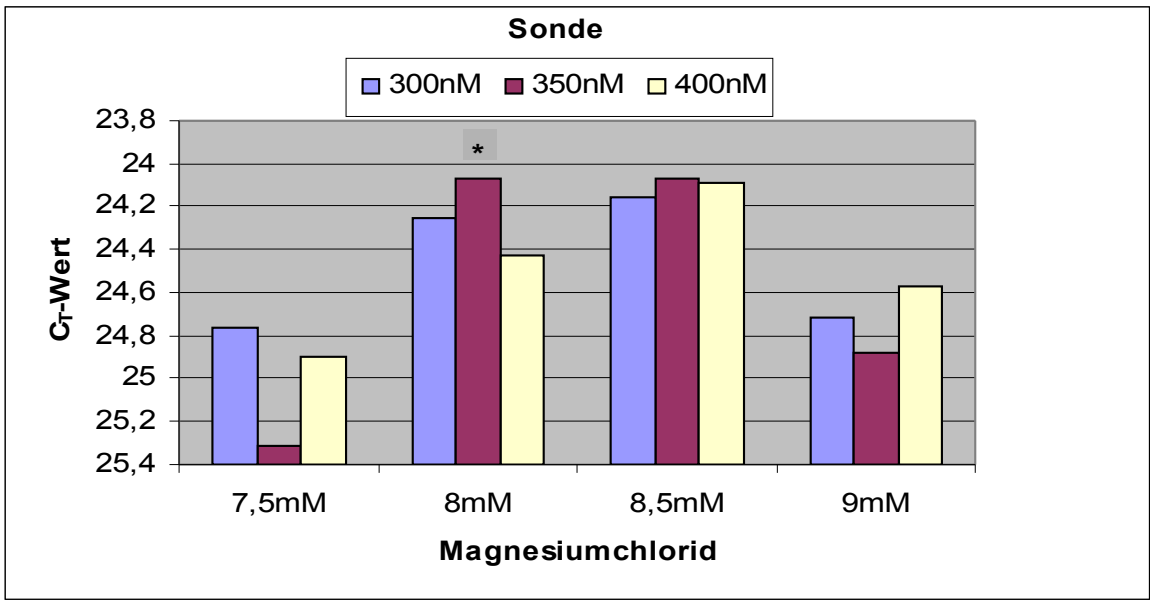

Abbildung 4.2 Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentration HSV-1-PCR

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der schachbrettartigen Titration der Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen für den HSV-1-Nachweis. Die beste Kinetik wurde bei einer Magnesiumchlorid-Konzentration von 8mM und einer Sonden-Konzentration von 350nM erzielt (*).

Die Ermittlung der Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentration für den HSV-2-Nachweis gestaltete sich schwieriger. In sechs Versuchen wurde letztendlich die optimale Kombination ermittelt. Die Abbildungen 4.3 bis 4.14 zeigen die Ergebnisse der Titrationen.

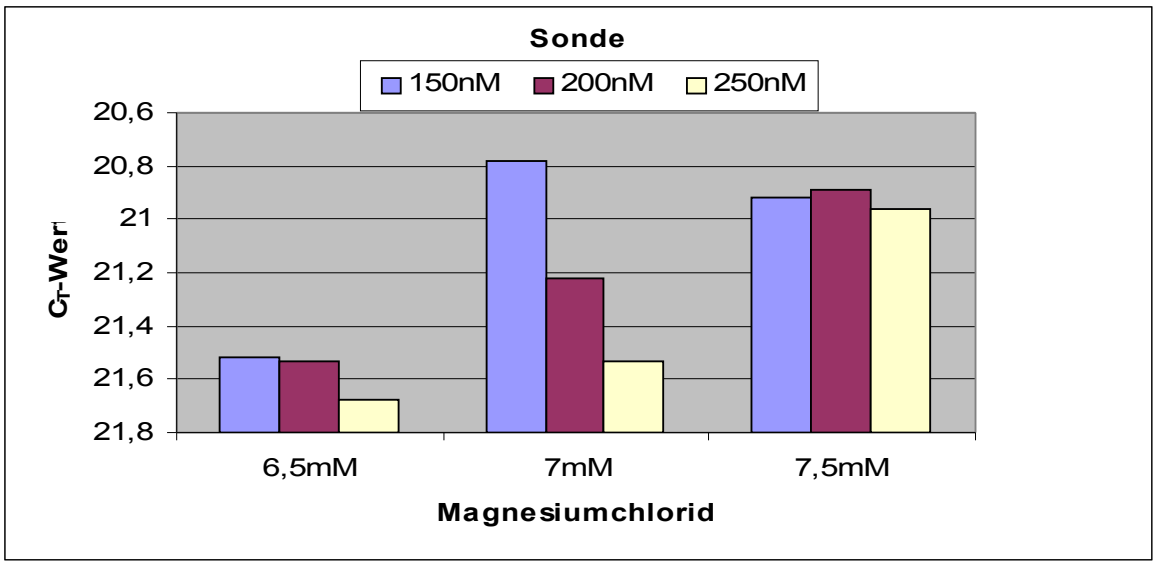

Abbildung 4.3 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 1, C_T-Werte

Die Abbildung zeigt die C_T-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

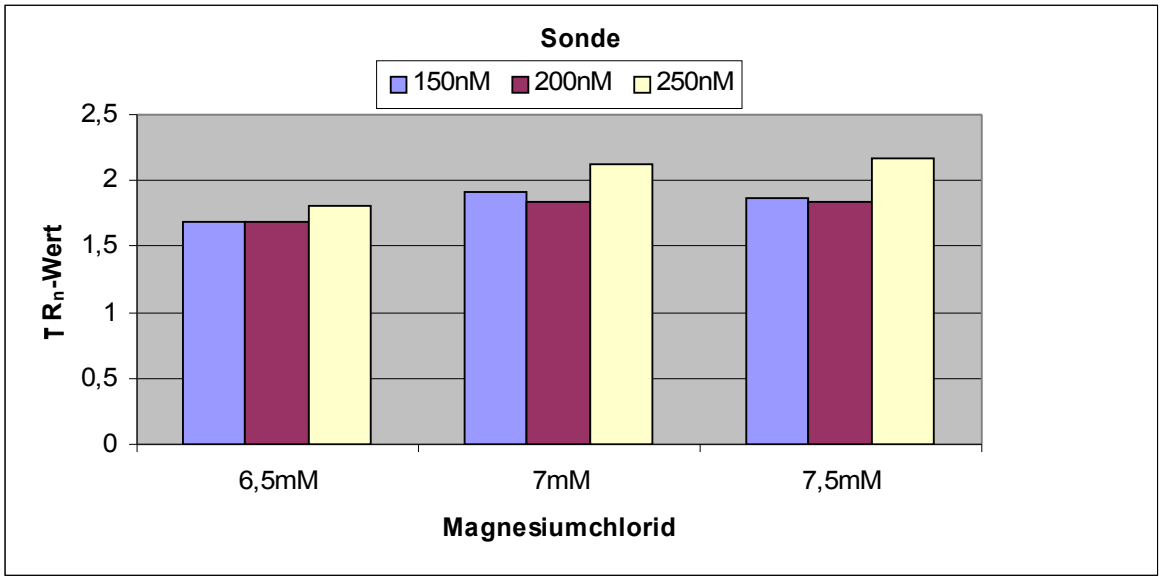

Abbildung 4.4 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 1, ΔR_n-Werte

Die Abbildung zeigt die ΔR_n-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen die Ergebnisse des ersten Versuchs. Es zeigte sich, dass höhere Magnesiumchlorid-Konzentrationen bessere C_T- und ΔR_n-Werte erzielten. Die beste Sonden-Konzentration lag in diesem Versuch bei 150nM. Die folgende Titration wurde daher um diesen Wert herum durchgeführt, siehe Abbildung 4.5 und 4.6.

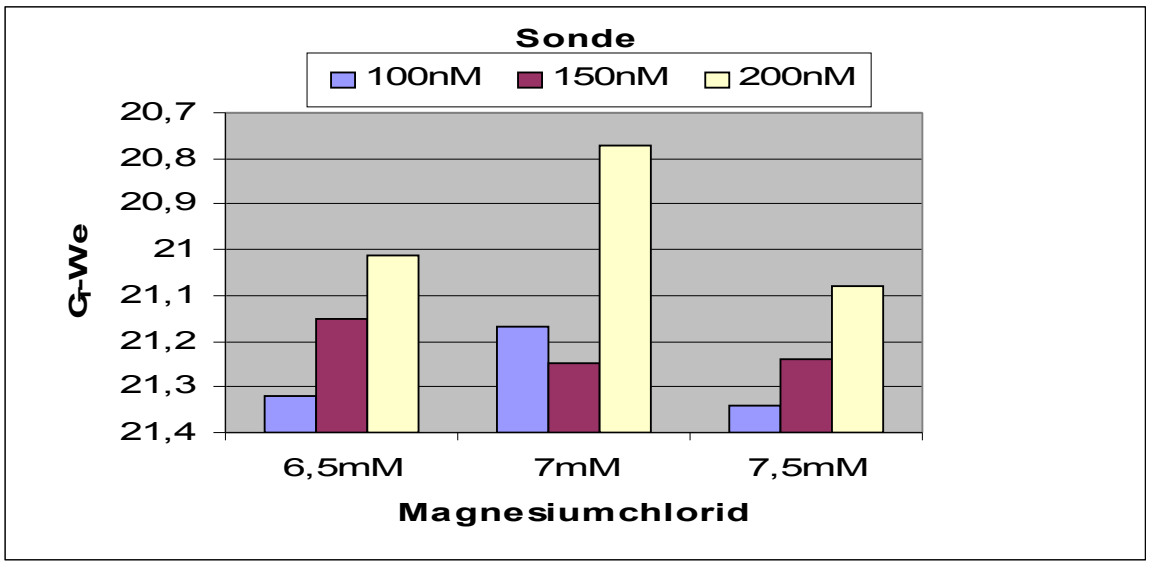

Abbildung 4.5 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 2, C_T-Werte

Die Abbildung zeigt die C_T-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

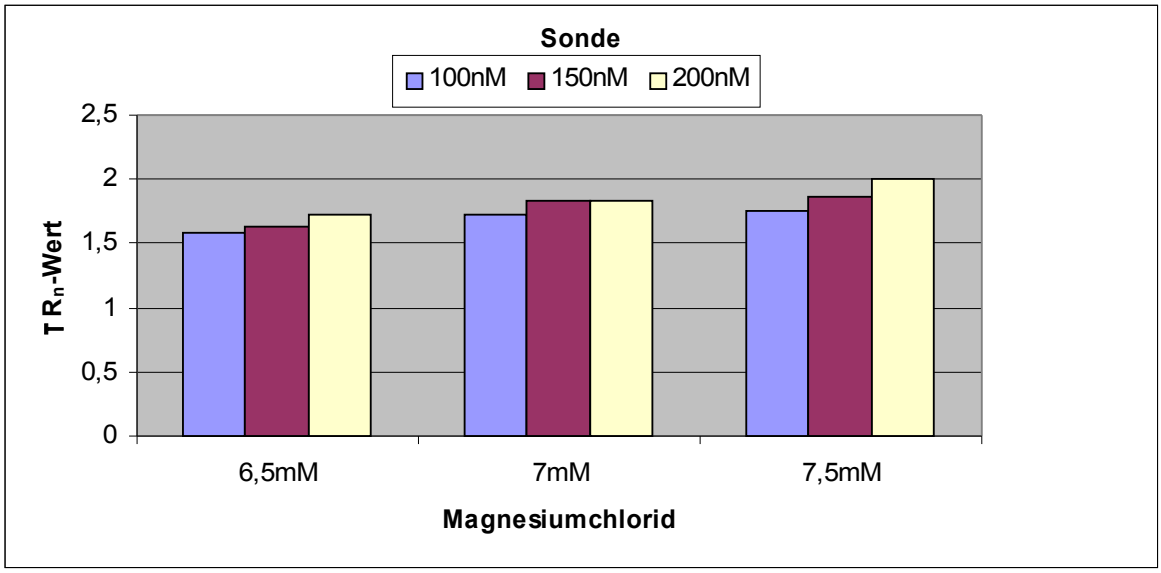

Abbildung 4.6 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 2, ΔR_n-Werte

Die Abbildung zeigt die ΔR_n-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

Im zweiten Versuch erzielte eine Sonden-Konzentration von 200nM bei jeder Magnesiumchlorid-Konzentration den besten C_T-Wert, siehe Abbildung 4.5. Die ΔR_n-Werte stiegen mit zunehmender Konzentration an Magnesiumchlorid, siehe Abbildung 4.6. Es folgte daher eine Titration der Konzentrationen um die beste Kombination von 200nM Sonde und 7mM Magnesiumchlorid herum, siehe Abbildung 4.7 und 4.8.

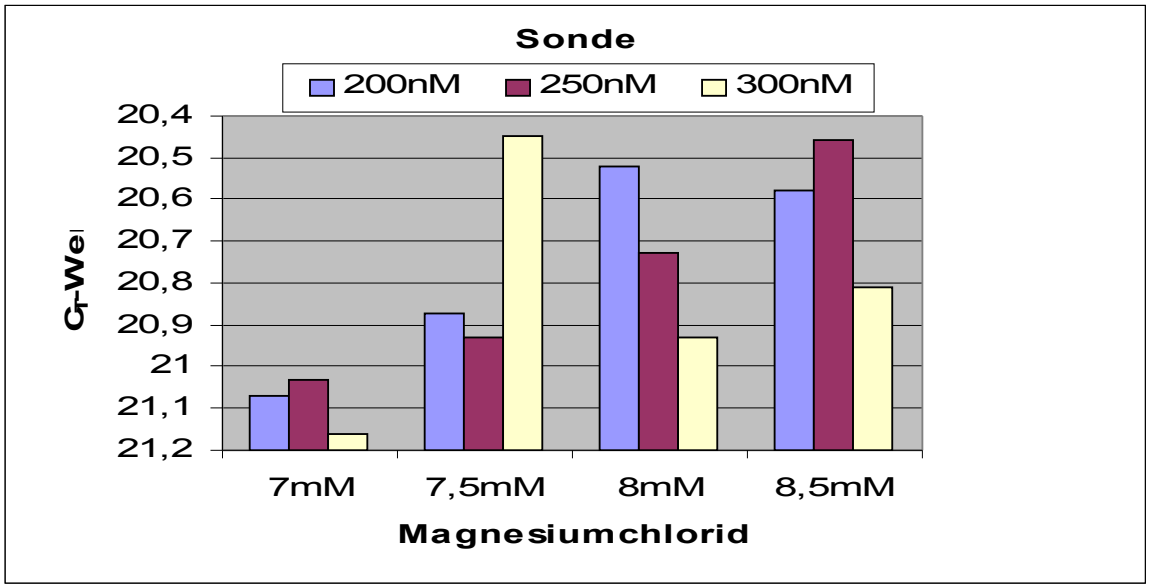

Abbildung 4.7 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 3, C_T-Werte

Die Abbildung zeigt die C_T-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

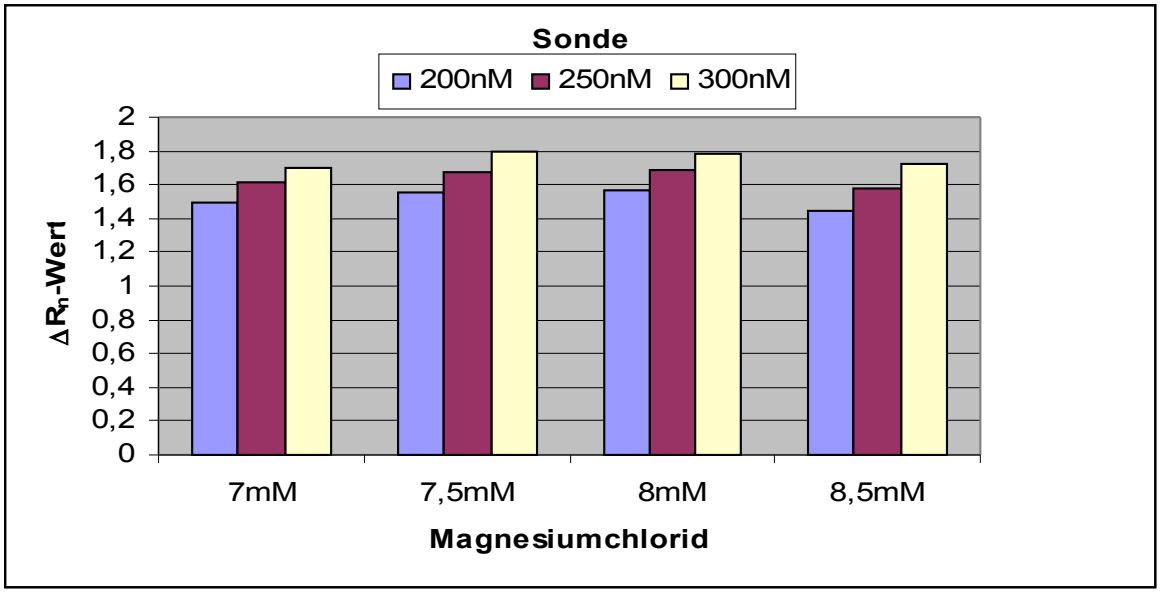

Abbildung 4.8 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 3, ΔR_n-Werte

Die Abbildung zeigt die ΔR_n-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen, dass eine weitere Erhöhung der Magnesiumchlorid-Konzentration einen negativen Einfluss auf den ΔR_n-Wert hat. Die besten Ergebnisse wurden bei 7,5mM erzielt. In diesem Versuch erzielten verschiedene Sonden-Konzentrationen ähnlich gute Werte, so dass weitere Versuchen folgen mussten (Abb. 4.10 bis 4.14).

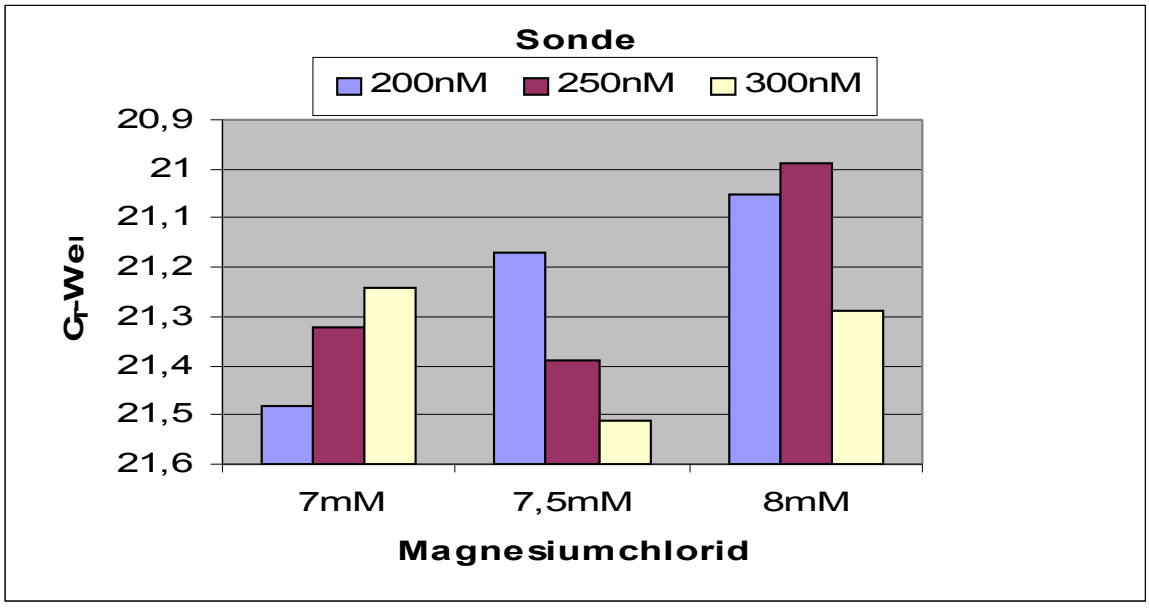

Abbildung 4.9 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 4, C_T-Werte

Die Abbildung zeigt die C_T-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

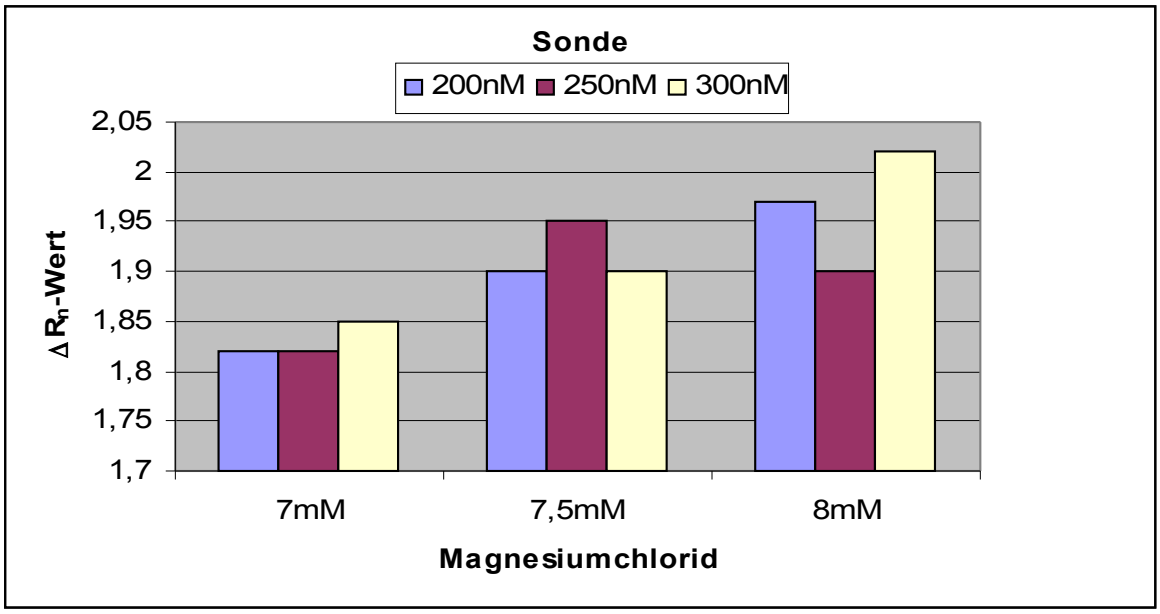

Abbildung 4.10 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 4, ΔR_n-Werte

Die Abbildung zeigt die ΔR_n-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

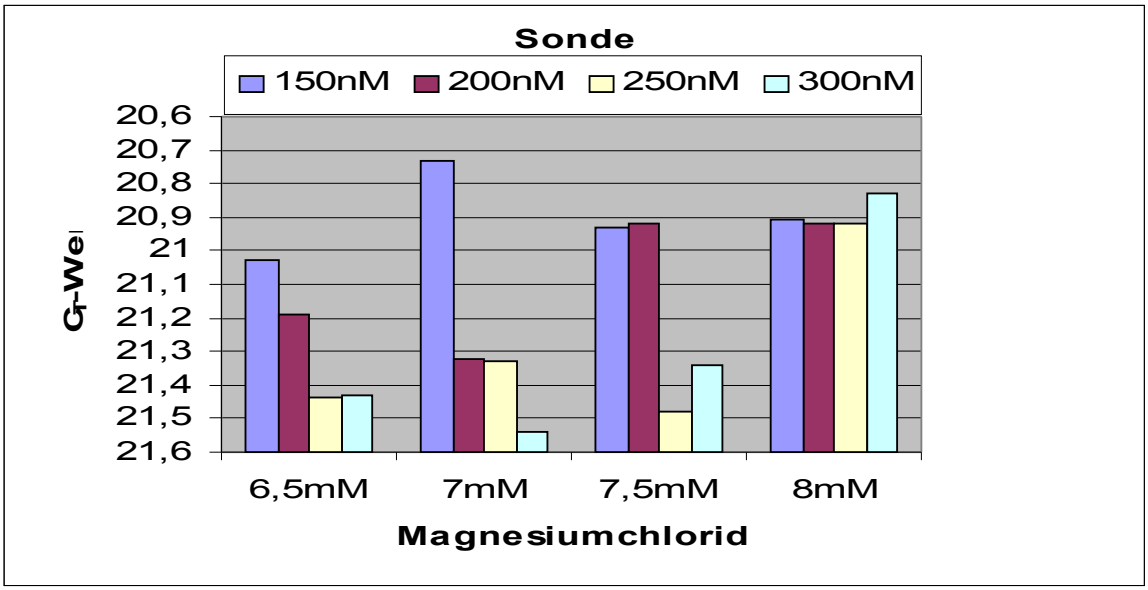

Abbildung 4.11 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 5, C_T-Werte

Die Abbildung zeigt die C_T-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

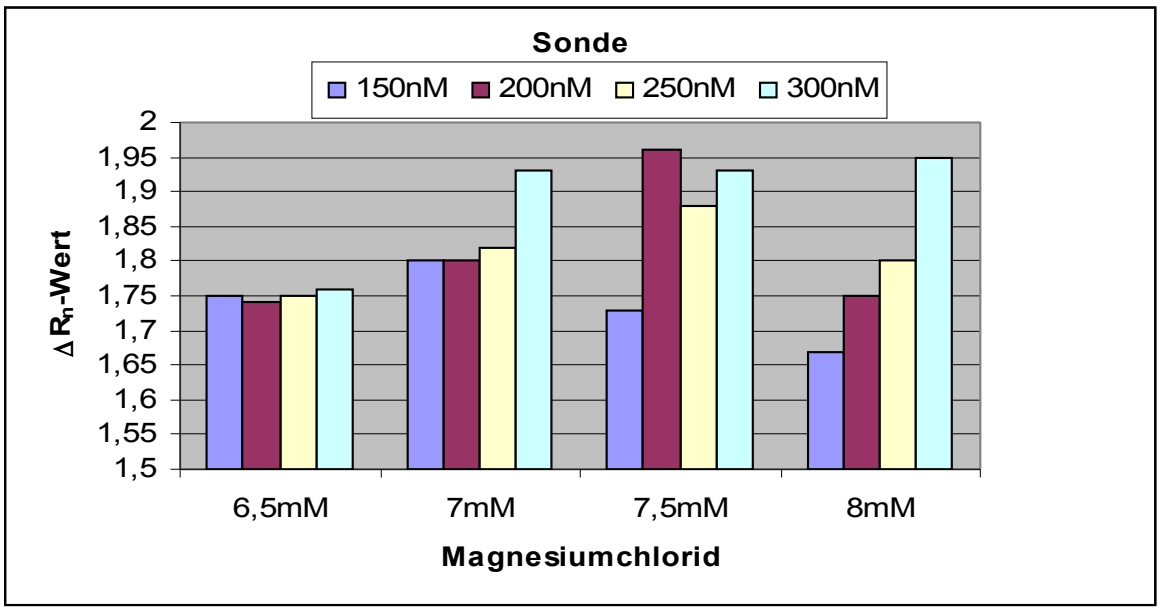

Abbildung 4.12 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 5, ΔR_n-Werte

Die Abbildung zeigt die ΔR_n-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

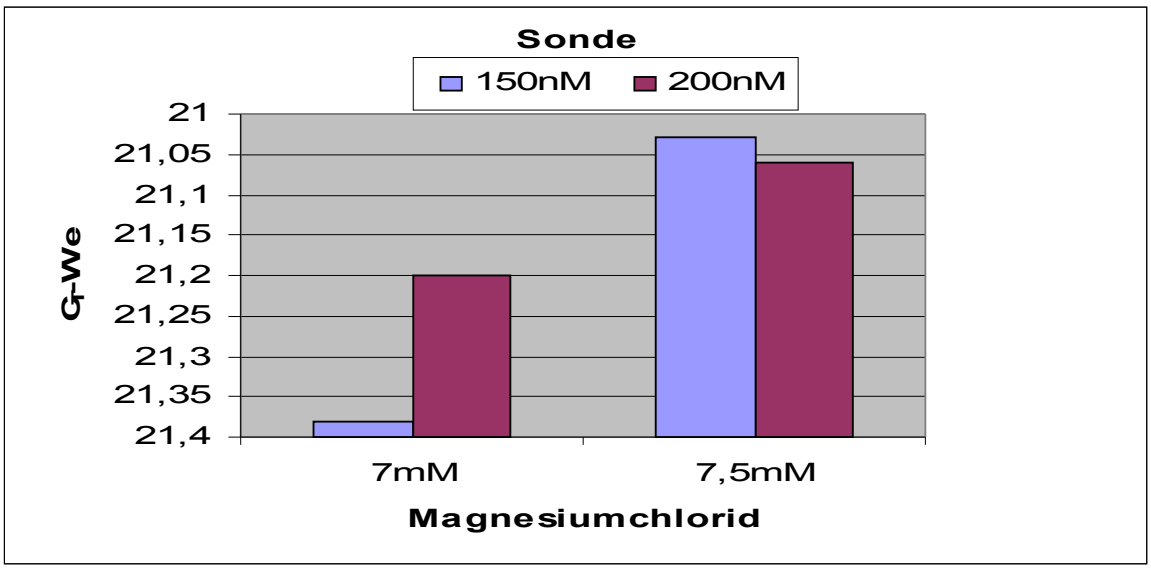

Abbildung 4.13 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 6, C_T-Werte

Die Abbildung zeigt die C_T-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

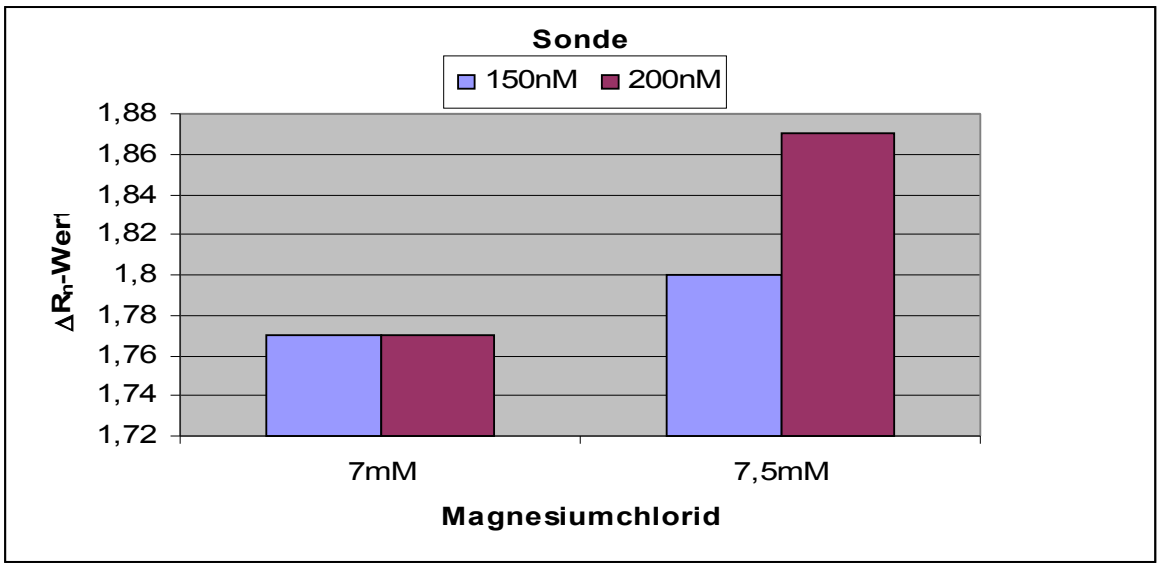

Abbildung 4.14 Magnesiumchlorid- und Sondenkonzentration HSV-2-PCR Versuch 6, ΔR_n-Werte

Die Abbildung zeigt die ΔR_n-Werte, welche bei verschiedenen Kombinationen von Magnesiumchlorid- und Sonden-Konzentrationen in diesem Versuch erzielt wurden.

Beim Vergleich aller Versuche zeigte sich, dass bei einer Magnesium-Konzentration von 7,5mM in fünf der sechs Versuche die Sonden-Konzentration von 200nM die besten Ergebnisse erzielte. Nur der dritte Versuch zeigte abweichende Ergebnisse. Bei anderen Magnesium-Konzentrationen gab es keine derartige Konstanz der Ergebnisse, so dass als optimale Kombination die Konzentrationen 7,5mM Magnesiumchlorid und 200nM Sonde gewertet wurden.

***Primer*-Matrix**

Als nächster Schritt erfolgte die schachbrettartige Titration der *Primer*-Matrix, bei der auch asymmetrische Konzentrationen von *Forward* und *Reverse Primer* gegenüber gestellt wurden. Hierbei wurden als Optimum die Konzentrationen von 750nM *Forward Primer* und 500nM *Reverse Primer* für die HSV-1-PCR ermittelt (Abbildung 4.15).

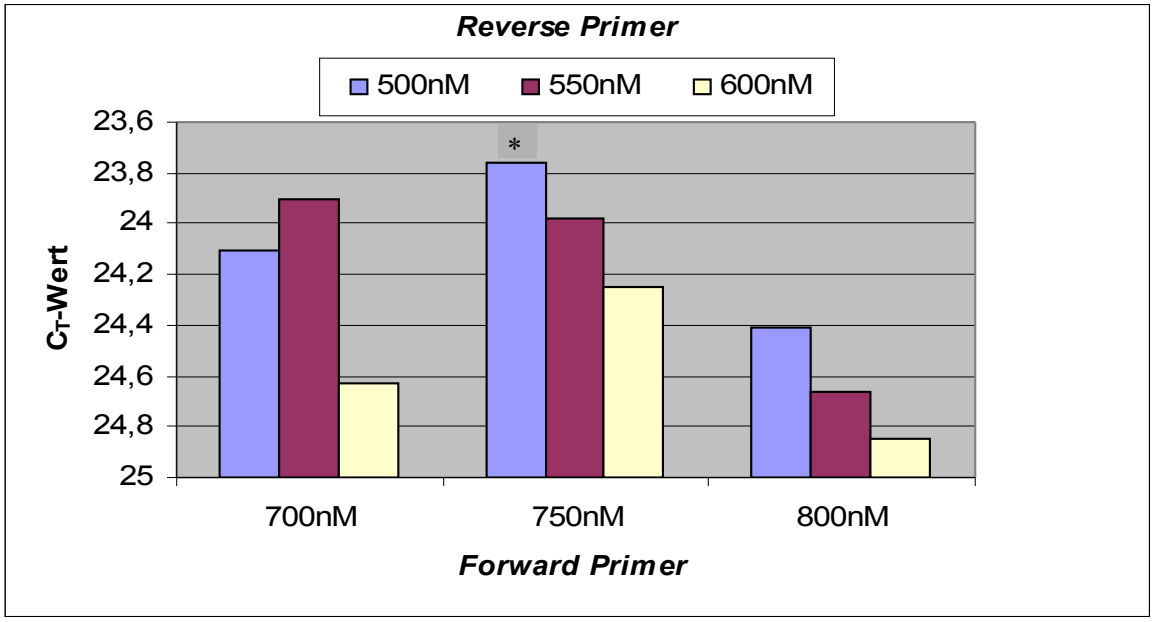

Abbildung 4.15 HSV-1-*Primer*-Matrix

Die Abbildung zeigt die Versuchsanordnung, bei der die optimalen Konzentrationen an Forward und Reverse Primer erzielt wurden, diese liegen bei 750nM Forward Primer und 500nM Reverse Primer, abzulesen am niedrigsten C_T-Wert (*).

Die Primer-Matrix für den HSV-2-Nachweis ergab als optimale Konzentrationen 800nM *Forward Primer* und 250nM *Reverse Primer*. Bei den Titrationen zeigte sich die optimale Konzentration des *Forward Primers* deutlicher als die des *Reverse Primers.* Mit drei unterschiedlichen Konzentrationen des *Reverse Primers* wurden sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Es folgten weitere Titrationen, bei denen die optimale Konzentration des *Forward Primers* beibehalten wurde, während verschiedene Konzentrationen des *Reverse Primers* eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der HSV-2 Primer-Matrix sind in den Abbildungen 4.16 und 4.17 veranschaulicht.

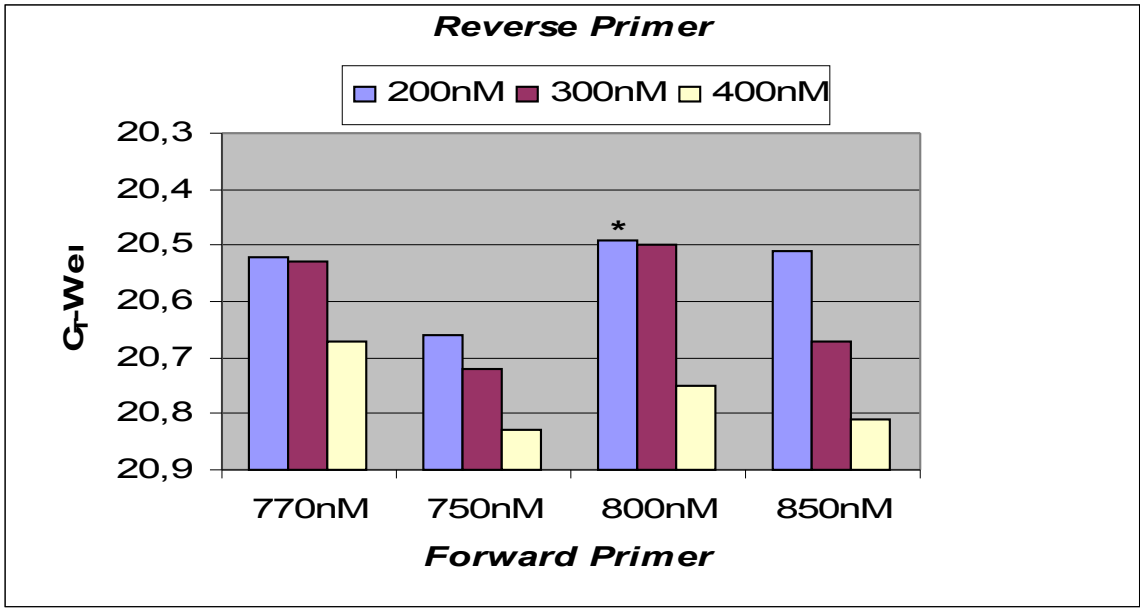

Abbildung 4.16 HSV-2-*Primer*-Matrix

Die Abbildung zeigt die Versuchsanordnung, bei der als optimale Konzentration des Forward Primer 800nM ermittelt wurde, abzulesen am niedrigsten C_T-Wert (*).

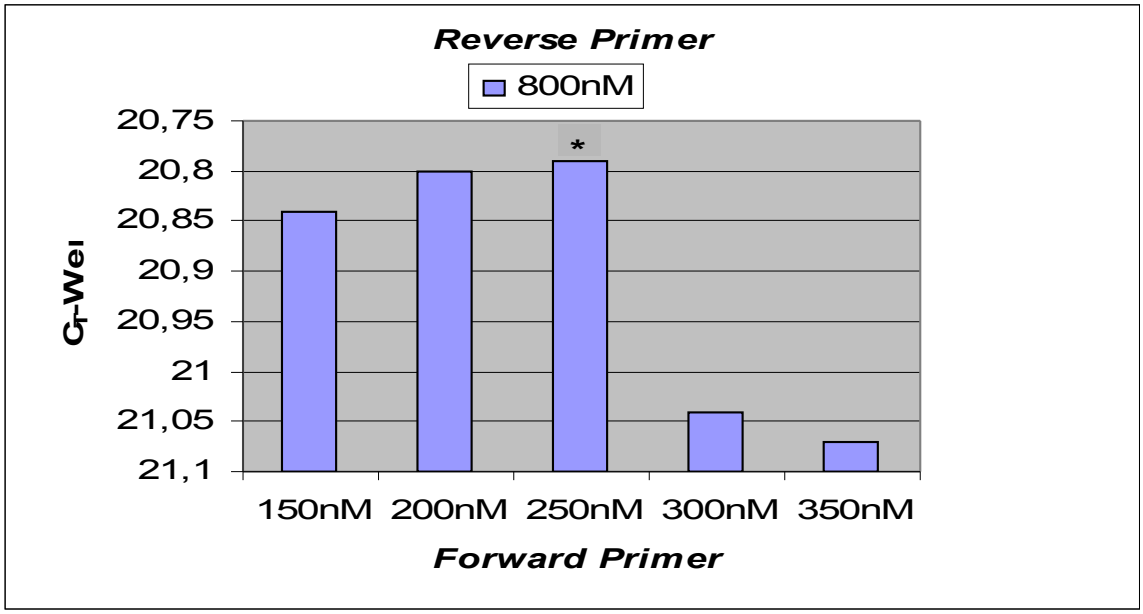

Abbildung 4.17 *Reverse Primer*-Konzentration HSV-2

Die Abbildung zeigt den Versuch, in dem die optimale Konzentration des Reverse Primers ermittelt wurde. Der niedrigste C_T-Wert fand sich bei einer Konzentration von 250nM (*).

4.1.3 Interne Positivkontrolle

Nachdem die optimalen Konzentrationen aller Reagenzien gefunden waren, wurde noch eine interne Positivkontrolle beigefügt. Zu diesem Zweck wurde dem *MasterMix* eine weitere *Primer*-Sonden-Kombination zum Nachweis des humanen *β-actin*-Gens zugesetzt. Nach Abschluss der Optimierung ergaben sich für den HSV-Nachweis die in Tabelle 4.2 und 4.3 aufgezeigten Zusammensetzungen der Reagenzien. Für den Nachweis von HSV-DNA aus Plasma oder Abstrichmaterial musste noch 1µl humane DNA zugesetzt werden, um eine zuverlässige interne Positivkontrolle sicherzustellen. Das Probenmaterial für den Nachweis viraler DNA aus PBMC´s enthielt genug humane DNA, so dass auf den Zusatz humaner DNA verzichtet werden konnte.

Tabelle 4.2 Reagenzien-Mix der HSV-1-PCR

HSV-1-PCR	**in 50µl**
Universal MasterMix	25µl
Magnesiumchlorid (25mM, in 50µl 3mM)	6µl
Forward Primer (151µM, in 50µl 750nM)	0,25µl
Reverse Primer (100µM, in 50µl 500nM)	0,25µl
Sonde (70µM, in 50µl 350nM)	0,25µl
β-actin-Forward Primer (5µM, in 50µl 25nM)	25nM = 0,125µl
β-actin-Reverse Primer (5µM, in 50µl 25nM)	25nM = 0,25µl
β-actin-Sonde (20µM, in 50µl 50nM)	50nM = 0,25µl
Template	15µl
Humane DNA bzw. Aqua dest. *	1µl
Aqua dest.	1,625µl
Gesamtsumme	**50µl**

Die Tabelle zeigt den Reagenzien-Mix, welcher für die HSV-1-PCR eingesetzt wurde.

** Für den Nachweis viraler DNA aus Abstrichmaterial oder Plasma wurde humane DNA zugesetzt, für den Nachweis aus PBMC´s Aqua dest.*

Tabelle 4.3 Reagenzien-Mix der HSV-2-PCR

HSV-2-PCR	**in 50µl**
Universal MasterMix	25µl
Magnesiumchlorid (25mM, in 50µl 2,5mM)	5µl
Forward Primer (160µM, in 50µl 800nM)	0,25µl
Reverse Primer (50µM, in 50µl 250nmM)	0,25µl
Sonde (112µM, in 50µl 200nM)	0,25µl
β-actin-Forward Primer (5µM, in 50µl 25nM)	0,25µl
β-actin-Reverse Primer (5µM, in 50µl 25nM)	0,25µl
β-actin-Sonde (20µM, in 50µl 50nM)	50nM = 0,125µl
Template	15µl
Humane DNA bzw. Aqua dest. *	1µl
Aqua dest.	2,625µl
Gesamtsumme	**50µl**

Die Tabelle zeigt den Reagenzien-Mix, welcher für die HSV-2-PCR eingesetzt wurde.

** Für den Nachweis viraler DNA aus Abstrichmaterial oder Plasma wurde humane DNA zugesetzt, für den Nachweis aus PBMC´s Aqua dest.*

4.1.4 Typspezifität

Zur Überprüfung der Typspezifität der HSV-PCR wurden Versuche durchgeführt, bei denen HSV-1-DNA sowohl mit der zugehörigen, als auch mit der typfremden PCR getestet wurde. Ebenso wurde mit HSV-2-DNA verfahren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 zu sehen. Sie zeigt, dass sowohl HSV-1-DNA als auch HSV-2-DNA ausschließlich mit der zugehörigen *Primer*-Sonden-Kombination amplifiziert werden.

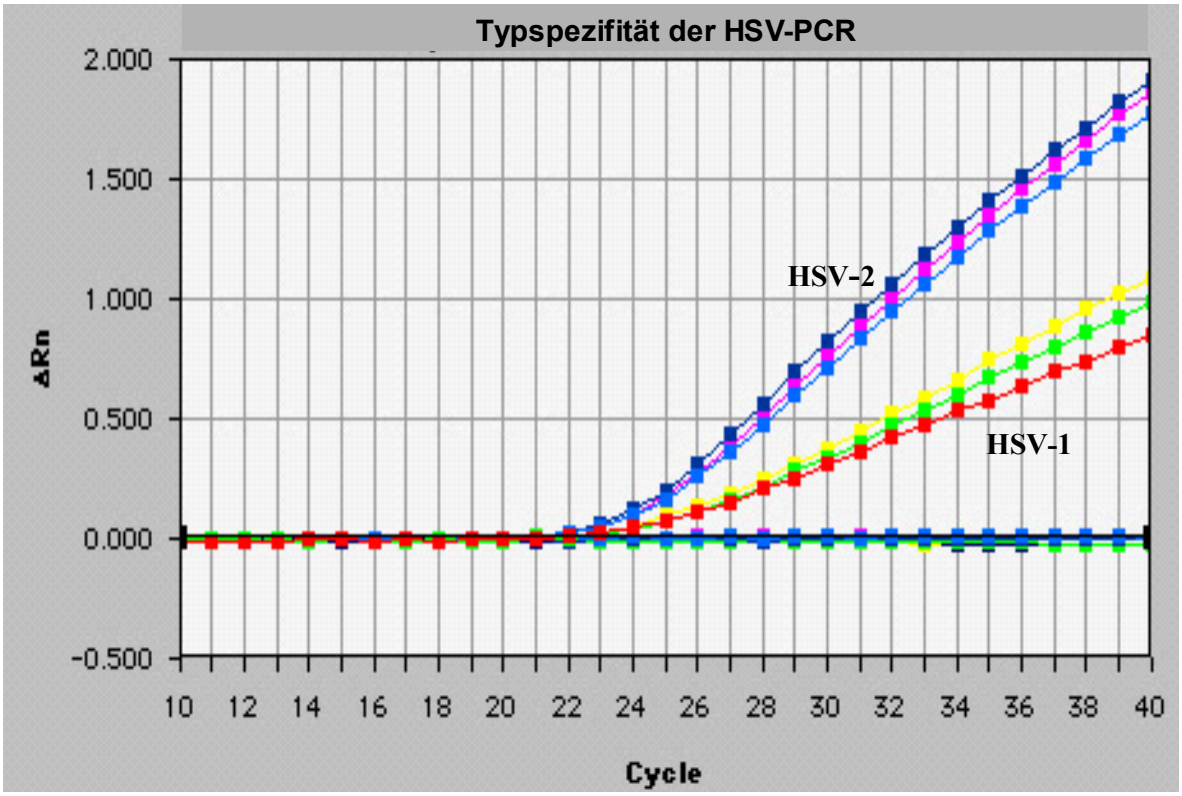

Abbildung 4.18 Typspezifität

Die obere PCR-Kinetik zeigt den Nachweis von HSV-2-DNA mit der zugehörigen Primer-Sonden-Kombination, die mit HSV-1 markierte PCR-Kinetik zeigt den Nachweis von HSV-1-DNA mit der entsprechenden Primer-Sonden-Kombination. Nicht amplifiziert wurden HSV-1- und HSV-2-DNA mit den typfremden Primer-Sonden-Kombinationen; die zugehörigen Kurven befinden sich im Bereich der Grundlinie.

4.1.5 Nachweisgrenzen

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden für beide HSV-Typen halblogarithmische Verdünnungsreihen ausgehend von 10^3 Genomäquivalenten (geq) HSV-DNA/µl erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde je 1µl in 20-facher Wiederholung in mehreren unabhängigen PCR-Ansätzen getestet. Die Tabellen 4.4 und 4.5 zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsreihen.

Tabelle 4.4 Nachweis der HSV-1-DNA

geq/PCR	Anzahl der Proben	Positive Ergebnisse	Probit Analyse
1000	**20**	**20**	**1,000**
316	**20**	**20**	**1,000**
100	**19***	**19**	**1,000**
31,6	**20**	**19**	**0,968**
10	**20**	**17**	**0,793**
3,16	**20**	**16**	**0,687**
1	**20**	**10**	**0,649**

**Bei der Testung der Verdünnungsstufe 100 geq musste eine Probe wegen negativer β-actin-Reaktion aus der Berechnung ausgeschlossen werden.*

Tabelle 4.5 Nachweis der HSV-2-DNA

geq/PCR	Anzahl der Proben	Positive Ergebnisse	Probit Analyse
1000	**20**	**20**	**1,000**
316	**20**	**20**	**1,000**
100	**20**	**20**	**1,000**
31,6	**20**	**20**	**0,9997**
10	**20**	**17**	**0,865**
3,16	**20**	**14**	**0,638**
1	**20**	**10**	**0,546**

Es schloss sich eine Probit-Analyse der gewonnenen Ergebnisse an, welche der Berechnung der 95%-Nachweisgrenze der jeweiligen PCR diente. Für HSV-1 lag diese bei 27,22 geq/PCR, für HSV-2 bei 14,96 geq/PCR. Die Tabellen 4.6 und 4.7 zeigen neben der 95%-Nachweisgrenze auch jeweils die Werte der 90%- und 99%-Nachweisgrenze sowie die zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle für die HSV-1- und HSV-2-PCR.

Tabelle 4.6 Nachweisgrenze und 95%-Konfidenzintervall der HSV-1-PCR

	Nachweisgrenze	**95%-Konfidenzintervall**	
	geq/PCR	**Untergrenze**	**Obergrenze**
90%	19,664	11,953	62,289
95%	27,215	17,029	93,054
99%	41,379	25,652	151,662

Tabelle 4.7 Nachweisgrenze und 95%-Konfidenzintervall der HSV-2-PCR

	Nachweisgrenze	**95%-Konfidenzintervall**	
	geq/PCR	**Untergrenze**	**Obergrenze**
90%	11,639	7,461	48,089
95%	14,957	9,507	66,862
99%	21,180	13,110	102,313

Somit war die Sensitivität des Nachweises von HSV-2-DNA etwas höher als die des HSV-1-DNA-Nachweises.

4.2 Untersuchungsergebnisse

Nach Abschluss der PCR-Optimierung, wurden Effloreszenzabstriche, Plasmaproben und PBMC´s von 46 Personen mit der klinischen Diagnose *Herpes labialis* oder *Herpes genitalis* auf die Anwesenheit von HSV-DNA untersucht.

Das Kollektiv der *Herpes labialis*-Patienten bestand aus 29 sonst gesunden Personen. Zwei Patienten gaben an, eine Erstinfektion durchzumachen. In beiden Fällen konnte HSV-1-DNA in den Abstrichen nachgewiesen werden. Zwei weitere Personen machten keine Angaben darüber, ob es sich um eine Primärinfektion oder eine Rekrudeszenz handelte. In ihren Effloreszenzabstrichen wurde jeweils HSV-1-DNA nachgewiesen. Die restlichen 25 Personen litten laut eigener Angaben unter einer rekurrierenden Infektion. Von diesen zeigten drei Probanden fast abgeheilte Effloreszenzen, aus denen kein Abstrichmaterial gewonnen werden konnte. Bei vier weiteren Personen fand sich in den Läsionen keine HSV-DNA. Diese sieben Probanden wurden aus der Studie ausgeschlossen, nachdem auch ihre Plasmaproben und PBMC´s keine virale DNA aufwiesen und daher die Diagnose einer Herpes simplex-Virusinfektion nicht bewiesen werden konnte.

Die Abstriche der verbleibenden 18 Personen wurden wiederholt deutlich positiv für HSV-1-DNA getestet. Nach Ausschluss der sieben Personen, welche keine positiven Proben aufwiesen, umfasste das Kollektiv der *Herpes labialis* Patienten 22 Personen mit gesicherter Herpes simplex-Virusinfektion. Sämtliche Proben dieser Patienten wurden sowohl auf HSV-1 als auch auf HSV-2 getestet. HSV-2-DNA wurde hierbei nie nachgewiesen. Die Untersuchungen an den Plasmaproben und PBMC´s aller *Herpes labialis*-Patienten zeigten keine Amplifikation von HSV-DNA.

16 Patientinnen der gynäkologisch-infektiologischen Spezialsprechstunde der Frauenklinik der Universität Köln und ein männlicher Proband litten unter der klinischen Diagnose *Herpes genitalis*. Bei 15 dieser 17 Personen konnte HSV-DNA in den Abstrichen nachgewiesen werden, so dass die Diagnose einer Herpes simplex-Virusinfektion gesichert werden konnte. Die Proben von zwei Patientinnen wiesen weder im Abstrichmaterial noch in den PBMC´s oder im Plasma HSV-DNA auf, so dass sie aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Bei 10 der 15 Patienten mit gesichertem HSV bedingten *Herpes genitalis* handelte es sich nach eigenen Angaben um eine Erstinfektion. In vier Fällen war ein rekurrierender *Herpes genitalis* bekannt. Eine Patientin konnte keine genauen Angaben darüber machen, ob des sich bei ihren Effloreszenzen um eine

Erstinfektion oder eine Rekrudeszenz handelte. In den Abstrichmaterialien dieser 15 Personen konnte HSV-DNA nachgewiesen werden. Die vier Rekrudeszenzen waren durch HSV-2 verursacht, von den 10 Patientinnen mit Erstinfektion litten sieben an einer HSV-1-Infektion, drei an einer HSV-2-Infektion. Die Patientin, welche keine genauen Angaben machte, litt unter einer HSV-2-Infektion. In unserem Kollektiv waren somit acht Fälle durch HSV-2 und sieben Fälle durch HSV-1 bedingt.

Bei sieben *Herpes genitalis*-Patientinnen konnte auch im Plasma HSV-DNA nachgewiesen werden. Es handelte sich bei vier Patientinnen um HSV-2-DNA, bei drei weiteren um HSV-1-DNA. Sechs dieser Patientinnen litten unter einer Primärinfektion, bei der siebten Patientin handelte es sich um die Person, welche keine Angaben zur Infektionsform machte.

In den Tabellen 4.8 und 4.9 sind die Ergebnisse der PCR der *Herpes genitalis*-Patienten dargestellt. Die Tabelle 4.10 zeigt die Angaben der Patienten zu den Effloreszenzen und ihrem allgemeinen Gesundheitszustand. Aufgeführt sind Alter, Form und ggf. eingeleitete Therapie der Herpeseffloreszenzen, bestehende Zweitinfektionen, immunsupprimierende Faktoren und sonstiges.

Tabelle 4.8 HSV-DNA-Nachweis bei *Herpes genitalis*-Patienten

Herpes genitalis **n = 15**	**Abstriche**	**HSV-1-DNA**	**Abstriche**	**HSV-2-DNA**
	+	**-**	**+**	**-**
	7	**8**	**8**	**7**
Plasma +	**3** (42,86%)	0	**4** (50%)	0
Plasma –	**4** (57,14%)	**8** (100%)	**4** (50%)	**7** (100%)
PBMC´s +	0	0	0	0
PBMC´s -	**7** (100%)	**8** (100%)	**8** (100%)	**7** (100%)

Tabelle 4.9 Untersuchungsergebnisse bei *Herpes genitalis*-Patienten

Patient	HSV-1	HSV-2	Erstinfektion	Rekrudeszenz	HSV-DNA in Plasma
HG-01	-	+	X		+
HG-02	+	-	X		+
HG-03	-	+	?	?	+
HG-05	+	-	X		-
HG-06	+	-	X		+
HG-08	-	+	X		+
HG-09	-	+	X		+
HG-10	-	+		X	-
HG-11	-	+		X	-
HG-12	-	+		X	-
HG-13	+	-	X		+
HG-14	+	-	X		-
HG-15	+	-	X		-
HG-16	+	-	X		-
HG-17	-	+		X	-

Tabelle 4.10 Gesundheitszustand der *Herpes genitalis*-Patienten

Patient	Form der Effloreszenz	Alter der Effloreszenz	Zweit-Infektion	Immunsuppression	Therapie	Sonstiges
HG-01	R, B, K	14d	Tonsillitis	Chemotherapie	Aciclovir, Antibiotika	
HG-02	R, B, K, ausgedehnt	2d			Aciclovir	Unacid
HG-03	U	2d	HIV, TBC			
HG-05	R, B, U, Ö	3d	B-Symptomatik			
HG-06	R, B, K	2d				
HG-08	B	1d		Chemotherapie		
HG-09	R, B	3d				
HG-10	K	7d	HIV	Antiretrovirale Therapie		
HG-11	B, K	Tage	HPV			
HG-12	R, K	7d				
HG-13	R, B	5d		Antibiotika		
HG-14	o.A.	o.A.				Topsyn-Salbe
HG-15	R, B, U	o.A.				
HG-16	R, B	o.A.				
HG-17	B	4d	Pharyngitis			

HG = Herpes genitalis-Patient, R = Rötung, B = Bläschen, K = Kruste, U = Ulcera, Ö = Ödem, o.A. = ohne Angabe.

5 Diskussion

Die ubiquitär vorkommenden Herpes simplex-Viren können neben dem häufig beobachteten *Herpes labialis* und *Herpes genitalis* auch ganz bedrohliche Infektionen des zentralen Nervensystems oder fulminant verlaufende disseminierte Erkrankungen verursachen. Gefährdet sind vor allem Feten und Neugeborene sowie Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immunschwächen. Häufig liegen uncharakteristische Prodromalstadien vor, welche die Diagnosestellung erschweren. Da der Krankheitsausgang von früher antiviraler Therapie abhängt, ist eine präzise und schnelle Diagnostik von entscheidender Bedeutung [5, 24, 34].

Vor der Einführung der PCR basierte die Diagnostik auf Virusisolation, serologischen Methoden wie Immunfluoreszenz-Antigen-Detektion mittels monoklonaler Antikörper, DNA-Hybridisierung und zytologischen Testverfahren zum Teil in Verbindung mit dem klinischen Erscheinungsbild [19, 22, 24, 35, 50]. Die PCR-Technologie führte zu einer starken Vereinfachung der Diagnostik, da sie signifikant schnellere, sensitivere und spezifischere Ergebnisse erzielte [41]. Sie hat sich inzwischen als Verfahren der Wahl zum Nachweis von HSV-DNA durchgesetzt. Die konventionelle PCR mit Gelelektrophorese und Post-PCR-Schritten, birgt die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch Kontamination mit PCR-Produkten aus früheren Reaktionen [1, 15, 18, 19, 21, 24, 50]. Bei der heute gebräuchlichen *Taq*Man-PCR wird durch simultane Amplifikation und indirekten Nachweis in einem geschlossenen System sowie die Reduzierung von Arbeitsschritten die Kontaminationsrate minimiert.

Im Rahmen unserer Studie gelang uns, durch den Einsatz spezifischer *Primer*, deren Zielsequenzen jeweils aus dem Glykoprotein B-Gen (U_L-27) von HSV-1 und -2 stammten, die Entwicklung einer typspezifischen *Taq*Man-PCR zum Nachweis von HSV-DNA. In der Literatur finden sich PCR-Methoden zum HSV-Nachweis, bei denen auf eine Typisierung verzichtet wurde oder diese in Post-PCR-Schritten erfolgte [1, 10, 19, 22, 25, 34, 47, 50]. Andere Arbeitsgruppen entwickelten konventionelle PCR-Techniken und *Taq*Man-PCR-Methoden, welche ebenfalls mittels Einsatz spezifischer *Primer* die Virustypen unterscheiden konnten [8, 11, 14, 18, 21, 22, 24, 31, 32, 41, 46, 47, 48, 52]. Als Zielsequenz wurden in diesen Arbeiten verschiedene Glykoproteingene (B, D, G oder J) des HSV, Bereiche aus dem Polymerasegen oder andere Abschnitte der U_S- oder U_L-Regionen ausgewählt.

Mittels konventioneller PCR wurde in einigen Arbeiten bei Versuchen im Vergleich zu VZV, CMV, EBV, HHV-6, verschiedenen Bakterien oder humaner DNA eine

nahezu 100%ige Spezifität für HSV erreicht [15, 19, 20, 21]. Weitere Arbeitsgruppen verglichen die Spezifität ihrer neu entwickelten Methode mit älteren PCR-Techniken oder anderen Nachweisverfahren, wie z.B. van Doornum et. al., welche ihre *Taq*Man-PCR einer Virusisolation gegenüberstellten [46]. Für verschiedene, in der Literatur beschriebene, *Taq*Man-PCR-Methoden wurden Spezifitäten von 98% bis 100% ermittelt [10, 35]. Hierbei bezieht sich die Spezifität in einigen Studien wie bei unserer Methoden auch auf den HSV-Typ [11, 14, 32, 41, 46, 48].

Zum Beweis der Typspezifität unserer Methode, führten wir Versuche durch, bei denen wir jeweils die DNA eines HSV-Typs sowohl mit den dazugehörigen Reagenzien, als auch mit den Reagenzien zum Nachweis des anderen HSV-Typs ansetzten. Wir erhielten reproduzierbar keine Amplifikation des jeweils anderen HSV-Typs bei Nachweis des erwünschten Virustyps. Somit lag die Typspezifität unserer Methode bei 100%.

Die Typspezifität einer Nachweismethode ist vor allem im klinischen Alltag von Wichtigkeit da beispielsweise Resistenzen gegen einige Virustatika, vor allem bei HSV-2 Stämmen auftreten. Des Weiteren werden Schweregrad der klinischen Manifestationen, die Häufigkeit der Rekrudeszenzen und die Komplikationen der Herpesinfektion durch den Virustyp bestimmt. Bei der Herpesenzephalitis beispielsweise sind neurologisch beteiligte Infektionen durch HSV-1 häufig milder und verlaufen im Sinne einer Meningitis, durch HSV-2 bedingte Infektionen manifestieren sich oft als Enzephalitis mit Krampanfällen [22]. Vor allem bei Neugeborenen sind HSV-2-Infektionen mit ZNS-Beteiligung schädigender [16, 19]. Lewenson-Fuchs et. al. zeigten, dass die meisten der Todesfälle nach Herpesenzephalitis durch HSV-2 bedingt waren, wobei nur etwa 5 bis 10% der Herpesenzephalitiden durch HSV-2 bedingt sind [18]. Um diese rechtzeitig zu erkennen ist eine typspezifische Nachweismethode wie die durch uns entwickelte *Taq*Man-PCR von besonderer Bedeutung [22, 24, 48]. Durch weitere Optimierungen dieser Methode könnte eine Quantifizierung der PCR-Ergebnisse erreicht werden, mit deren Hilfe in der klinischen Diagnostik auch prognostische Aussagen getroffen werden könnten, wie es für HIV und HCV schon beschrieben ist [1, 35].

Um die Sensitivität unserer Methode zu erhöhen, setzten wir in 50µl-Reaktionslösungen 15µl *Template* ein, statt 10µl, wie viele Arbeitsgruppen [11, 14, 18, 32, 41, 52]. Die Sensitivität der *Taq*Man-HSV-PCR ermittelten wir anhand von Verdünnungsreihen kommerziell erhältlicher Standards für HSV-1- und HSV-2-DNA. Sie ist vergleichbar mit den Angaben der Literatur. Mit einem

durchschnittlichen C_T-Wert von 38,85 für HSV-1 und 36,66 für HSV-2 konnten wir 10 Genomäquivalente (geq) nachweisen. Die Errechnung der 95%-Nachweisgrenze mittels Probit Analyse ergab für HSV-1 etwa 27 geq/PCR und für HSV-2 14 geq/PCR. In der Studie von Harel et. al. wurden C_T-Werte zwischen 36 und 38 für den Nachweis von 10 geq beschrieben [14]. Viele andere Arbeitsgruppen gaben ebenfalls an, 10 geq sicher nachzuweisen, ohne Angabe von C_T-Werten [14, 19, 22, 31, 32, 35, 48]. Die Nachweisgrenze der Light-Cycler PCR von Espy et. al. lag bei 20 geq [10]. Stránská et. al. beschrieben sogar eine Sensitivität von 6 geq pro Reaktion mit einem C_T-Wert von unter 36,7 [41]. Van Doornum et. al. und Madhaven et. al. beschrieben Nachweisgrenzen von weniger als 10 geq, diese wurde mittels Zählung unter dem Elektronenmikroskop erreicht [20, 46]. Die Angaben aus der Literatur zeigen, dass derzeit der Nachweis von 10 geq Standard ist. Der Nachweis von weniger als 10 geq mittels PCR dagegen ist als unzuverlässig zu bewerten und kann durch ein hohes Risiko der Detektion von geringgradiger Kontamination zu falsch positiven Ergebnisses führen [18, 48]. Leider gibt es noch keinen WHO-Standard für HSV-1- und HSV-2-DNA, so dass sich Abweichungen in den quantitativen Ergebnissen zwischen unterschiedlichen Laboratorien nicht vermeiden lassen.

Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse, führten wir eine interne Kontrolle in unsere Methode ein. Hierfür wurde in jeden Ansatz zum Nachweis von HSV-DNA aus Plasma oder Abstrichen 1µl humane DNA zugesetzt, welche mittels zusätzlicher *Primer*-Sonden-Kombination neben der HSV-DNA amplifiziert wurde. Zielsequenz war das humane *β-actin*-Gen. Die Sensitivität unserer HSV-PCR wurde durch die Koamplifikation nicht beeinträchtigt. Auch die Angaben aus der Literatur zeigten, dass ein Zusatz von 250ng bis 3µg humaner DNA die PCR nicht negativ beeinflusste [19].

Mit Hilfe der *Taq*Man-PCR untersuchten wir verschiedene Probenmaterialien von 46 Personen mit herpetiformen Läsionen im Orofacial- oder Anogenitalbereich. Bei 37 Patienten konnten wir im Abstrichmaterial HSV-DNA nachweisen. Sämtliche 22 *Herpes labialis*-Infektionen waren durch HSV-1 bedingt, ebenso sieben der 15 *Herpes genitalis*-Fälle (46,67%). Diese sieben *Herpes genitalis*-Patienten machten eine Erstinfektion durch. Nur drei *Herpes genitalis*-Primärinfektionen waren in unserer Studie durch HSV-2 bedingt. Angaben aus der Literatur zeigen, dass die Zahl der HSV-1 bedingten *Herpes genitalis*-Infektionen zunimmt [6, 11, 15, 29]. Die Ursache hierfür könnten verbesserte sozioökologische Bedingungen sein, die zur

abnehmenden Seroprävalenz im Jugendalter führen. Eine HSV-1-Erstinfektion wäre so in späterem Alter möglich und könnte auch im genitalen Bereich stattfinden [6, 29].

Kimura et. al. wiesen bei 70% der *Herpes genitalis*-Erstinfektionen HSV-1-DNA nach [15]. Auch Filén et. al. beobachteten, dass es sich bei mehr als der Hälfte der *Herpes genitalis*-Primärinfektionen ihrer Patienten um HSV-1-Infektionen handelte. Rekurrierende und atypische Infektionen waren in ihrer Studie meist durch HSV-2 bedingt [11]. Wutzler et. al. schreiben, dass Erstinfektionen des *Herpes genitalis* sowohl durch HSV-1 als auch durch HSV-2 verursacht werden können, die Mehrheit der rekurrierenden Fälle aber durch HSV-2 bedingt sei [53]. In unserer Studie waren rekurrierende *Herpes genitalis*-Infektionen ausschließlich HSV-2-Infektionen. Wenn es im Rahmen der *Herpes genitalis*-Infektion unserer Patienten zu ausgeprägten Befunden oder Begleiterscheinungen wie Fieber kam, handelte es sich um HSV-1-Erstinfektionen. Dieses Ergebnis korreliert mit der Meinung, dass Infektionen durch das für die betroffene Region eigentlich untypische Virus häufig schwerer verlaufen als diejenigen, welche durch das Virus verursacht werden, das als typisch für die betroffene anatomische Region gilt [21]. Außerdem ist die Symptomatik bei Erstinfektion wahrscheinlich ausgeprägter als bei der Rekrudeszenz.

Bei orofacialen Infektionen lagen in unserer Studie ausschließlich HSV-1-Infektionen vor. Bis auf zwei Personen litten alle Patienten unter einer *Herpes labialis*-Rekrudeszenz, welche ohne wesentliche Allgemeinsymptome abliefen. Die beiden Angaben einer Erstinfektion sind als fraglich zu bewerten, da diese meist als Gingivostomatitis herpetica oder auch asymptomatisch verläuft. Wir konnten demnach nur milde *Herpes labialis*-Verläufe nach HSV-1-Infektion feststellen.

Neben den Abstrichmaterialien untersuchten wir Plasmaproben und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC´s) der Patienten auf die Anwesenheit von HSV-DNA, um zu überprüfen, ob zu irgendeinem Zeitpunkt der Infektion eine Virämie vorliegt. Schon Youssef et. al. meinten, dass eine HSV-Virämie wesentlich häufiger vorkomme als angenommen und die Detektion viraler DNA im Plasma ein nützliches diagnostisches Mittel sein könnte [50]. Im Rahmen unserer Studie wiesen wir im Plasma von sieben der 15 (46,67%) *Herpes genitalis*-Patienten HSV-DNA nach. In sechs dieser Fälle handelte es sich um eine Erstinfektion. Die siebte Patientin konnte eine Rekrudeszenz nicht sicher ausschließen, uns erscheint diese im Vergleich zu den anderen Befunden eher unwahrscheinlich.

Die Plasmaproben der Patienten mit rekurrierendem *Herpes genitalis* und aller Probanden mit *Herpes labialis* sowie diejenigen des gesunden Kontrollkollektivs waren HSV-DNA-negativ. Dass wir bei Rekrudeszenz keine Virämie nachweisen konnten, führten wir darauf zurück, dass HSV als neurotropes Virus über axonalen Transport zur Peripherie gelangt und extrazelluläre Viren, welche möglicherweise mit dem Blut in Kontakt treten, durch die spezifische Immunabwehr eliminiert werden.

Auch Harel et. al. wiesen bei 34,4% ihrer immunkompetenten, gesunden Kinder mit Herpes simplex-Erstinfektionen HSV-1-DNA im Plasma nach [14]. Youssef et. al. und Betzold et. al. dagegen fanden im Plasma von Patienten mit rekurrierenden Herpesinfektionen HSV-DNA [1, 50]. In der Studie von Betzold et. al. handelte es sich hierbei um einen Patienten, der unter rekurrierenden ausgeprägten Gingivostomatiden mit herpetiformen oralen Aphten litt [1]. Youssef et. al. erhielten bei 70% der Patienten mit rekurrierendem *Herpes labialis* positive Ergebnisse für HSV-DNA [50]. Diese Patienten hatten ausnahmslos systemische Manifestationen. Bei Herpesinfektion ohne Begleitsymptome konnten sie keine virale DNA nachweisen. Beide Studien lassen vermuten, dass eine Virämie bei Rekrudeszenz zu ausgeprägten Befunden führt, eine gewöhnliche Rekrudeszenz in der Regel aber ohne Virämie abläuft. So verhielt es sich auch bei den Patienten unserer Studie, welche nur milde Verläufe einer Rekrudeszenz ohne Virämie zeigten.

Ob eine verminderte Immunkompetenz für die Virämie bei Rekrudeszenz verantwortlich ist, können wir weder bestätigen noch ausschließen. In unserer Studie wurde beispielsweise im Falle einer gleichzeitigen HIV-Infektion keine HSV-DNA bei Rekrudeszenz nachgewiesen. Allerdings litt diese Patientin noch nicht unter dem Vollbild AIDS, stand unter antiretroviraler Therapie und die Effloreszenzen lagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits seit sieben Tagen vor.

Um der Frage nachzugehen, ob HSV nur frei zirkuliert oder ob es auch an Blutzellen gebunden ist, untersuchten wir neben dem Plasma auch die PBMC´s der Patienten. Anlass zu diesen Untersuchungen waren vor allem die Beobachtungen vierer Arbeitsgruppen, welche HSV-DNA im Plasma und in den PBMC´s ihrer Patienten nachwiesen [3, 7, 42, 44]. Studd et. al. beschäftigten sich mit dem möglichen Einfluss von HSV-1 auf die Pathogenese des Morbus Behcet [42]. In diesem Zusammenhang wurde mittels PCR in PBMC´s von 16 der 32 untersuchten Morbus Behcet-Patienten HSV-1-DNA nachgewiesen, 17,6% dieser

Personen litten unter rekurrierendem *Herpes labialis.* Brice et. al. untersuchten 34 ansonsten gesunde Erwachsene, in der akuten Phase eines rekurrierendem *Herpes labialis*. Bei sieben Patienten wiesen sie HSV-DNA in den PBMC´s nach. Warum nur in der akuten Phase HSV-DNA in den PBMC´s nachzuweisen war, führten sie darauf zurück, dass die Virämie ein vorübergehendes Phänomen während der akuten Infektion sei, welches nur bei einer Minderheit der Patienten anzutreffen sei [(3)].

Cantin et. al. wiesen bei 35 der 40 getesteten Personen verschiedene HSV-1-DNA-Sequenzen in Blut- und Knochenmarkzellen nach, obwohl sich zum Zeitpunkt der Probengewinnung alle Probanden im Konvaleszenzstadium der HSV-Infektion befanden. Anlass zu ihrer Studie war die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen einer HSV-1-Infektion und der *Graft versus Host Disease* bestehen könnte. Im Rahmen ihrer Untersuchungen wurden Tests mit Knochenmarkzellen unternommen, die zeigten, dass diese nach Infektion eine HSV-Replikation nur teilweise zuließen. Die überlebenden Zellen schienen das Virusgenom in einem Stadium zu beherbergen, in dem keine Replikation erfolgte, vergleichbar der klassischen neuronalen Latenz. Dies und die Tatsache, dass auch Patienten ohne klinische Erscheinungen HSV-DNA aufwiesen ließ sie vermuten, dass die hämatopoetischen Zellen einen zusätzlichen Latenzort für HSV darstellen könnten [(7)].

Tufano et. al. untersuchten den Zusammenhang zwischen *Pemphigus vulgaris* und HSV-Infektionen. Sie wiesen in den PBMC´s von 50% ihrer *Pemphigus*-Patienten HSV-DNA nach und stellten die These auf, dass ein verantwortlicher Mechanismus für die Entwicklung des *Pemphigus* eine nichtspezifische Aktivierung des Immunsystems durch die virale Infektion sein könnte. Bei genetisch prädisponierten Personen könnte so durch die infektionsbedingte gesteigerte Produktion humoraler und zellulärer Faktoren die Entwicklung der Autoimmunerkrankung unterstützt werden [(44)].

Im Rahmen unserer Studie konnte keine HSV-DNA in PBMC´s nachgewiesen werden, weder bei Patienten, welche unter *Herpes labialis* noch unter *Herpes genitalis* litten. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom Virustyp und davon, ob es sich bei der akuten Infektion um eine Erstinfektion oder um eine Rekrudeszenz handelte. Weder bei ansonsten gesunden Patienten noch bei Immunsupprimierten lag HSV-DNA in den PBMC´s vor. In der Literatur herrscht zu diesem Thema weiterhin Uneinigkeit. Viele Arbeitsgruppen erhielten wie wir ausschließlich

negative Ergebnisse. Andere konnten HSV-DNA in PBMC´s nachweisen.

Zhang et. al. wiesen bei 39% der getesteten Patienten mit *Rheumatoider Arthritis*, bei 39% der getesteten Patienten mit reaktivierten *Arthritiden* und sogar bei 31% der gesunden Kontrollpersonen HSV-DNA in Lymphozyten nach [51]. Bei derart ausgeprägten positiven Ergebnissen sollte hinterfragt werden, ob die Methode tatsächlich spezifisch und geeignet war oder, ob nicht Kontaminationen oder andere Faktoren die Sensitivität beeinflussten und zu so auffallenden Ergebnissen führten. Ähnlich verhält es sich auch bei den Ergebnissen von Naraqi et. al., welche schon 1976 im *blood buffy coat* von vier Erwachsenen mit ausgeprägter Rekrudeszenz und systemischen Begleitsymptomen angeblich HSV-1-DNA nachwiesen [26]. Takahash et. al. fanden in PBMC´s eines Morbus Meniere-Patienten während einer akuten Herpesinfektion HSV-1-DNA, während alle einhundert ansonsten gesunden Kontrollpersonen negative Ergebnisse zeigten [43]. Diamond et. al. detektierten in den PBMC´s von 60% und im Plasma von 67% der getesteten, akut infizierten Neugeborenen HSV-DNA [29].

Die Arbeitsgruppen Nomura et al. sowie Halperin et al. konnten wie wir nur negative Ergebnisse erzielen. Dabei wurden von Halperin et al. Patienten untersucht, welche unter akuten Gingivostomatitiden litten, die Patienten von Nomura et. al. befanden sich im Stadium der Konvaleszenz [13, 27]. Roubalova et. al. fanden während ihrer Untersuchungen an Knochenmarkempfängern und -spendern ausschließlich in den PBMC´s eines Patienten, welcher eine generalisierte HSV-Infektion mit begleitender Hepatosplenomegalie und Hepatitis durchmachte, HSV-DNA. Patienten mit lokaler Infektion zeigten ausnahmslos negative Ergebnisse [32]. In späteren Untersuchungen an dem positiv getesteten Patienten war keine HSV-DNA mehr in den PBMC´s nachzuweisen.

Laut Brice et. al. handelt es sich bei der Anwesenheit von HSV-DNA im Blut um ein transientes Phänomen, welches auf die Zeit der akuten Infektion beschränkt ist und nur bei einer Minderheit der Patienten beobachtet werden kann [3]. Obwohl jeder unserer Patienten eine akute Infektion durchmachte, konnten wir keine HSV-DNA in den PBMC´s nachweisen, selbst wenn ausgeprägte Läsionen oder positive Plasmabefunde vorlagen.

Der Nachweis von HSV-DNA im Plasma bei ansonsten gesunden Erwachsenen hat auch ohne Nachweis von HSV-DNA in PBMC´s eine Bedeutung für die Transfusionsmedizin. Erstinfektionen laufen häufig asymptomatischen ab. Eine dabei auftretende unbemerkte Virämie bei Blutspendern könnte zur Übertragung

des Virus mittels Blutprodukten führen. Dieser Übertragungsweg ist für HSV noch nicht bewiesen. Er konnte aber in früheren Studien für andere Herpesviren wie CMV und HHV-6 demonstriert werden und ist auch für HSV sehr wahrscheinlich [50]. Damit wäre eine Virämie beim Empfänger durch die übertragenen Viren möglich. Da der Virämie eine potentielle Rolle bei der Entwicklung fulminanter disseminierter Erkrankungen zugesprochen wird, könnten ernste Folgen für den Empfänger eintreten [3, 4, 7, 14, 42, 50]. Ein solches Ereignis scheint aber extrem selten zu sein, da es in der Literatur noch keinen Bericht über eine transfusionsassoziierte HSV-Infektion gibt. Deshalb wird die sehr aufwändige Testung von Blutspenden auf HSV-DNA gegenwärtig nicht diskutiert. Dagegen könnte man diskutieren, ob Blutspender mit einem akuten *Herpes labialis* oder *Herpes genitalis* zeitlich begrenzt von der Blutspende zurückgestellt werden sollten. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass von Spendern mit einer Rekrudeszenz sehr wahrscheinlich kein Infektionsrisiko über die Bluttransfusion ausgeht. Bei einer HSV-Neuinfektion eines Blutspenders muss allerdings mit einer Infektionsübertragung durch Blutprodukte gerechnet werden, die im Zweifelsfall durch Spenderrückstellung zu vermeiden wäre.

6 Zusammenfassung

Die ubiquitär verbreiteten Herpes simplex-Viren Typ 1 und Typ 2 können neben *Herpes labialis* und *Herpes genitalis* fulminant verlaufende disseminierte Erkrankungen verursachen. Nach einer Primärinfektion persistieren sie lebenslang in sensorischen Ganglien des Wirtes. Bei Rekrudeszenzen gelangt das Virus über axonalen Transport ohne Blutkontakt in die Peripherie. Ziel unserer Arbeit war es, nachzuweisen, ob während der akuten Infektion eine Virämie auftreten kann.

Zunächst entwickelten wir eine typspezifische HSV-*Taq*Man-PCR. Mit Hilfe von Oligonukleotid-*Primern*, deren Zielsequenz jeweils aus dem Glykoprotein B-Gen (U_L27) beider Virustypen stammten, erreichten wir eine nahezu 100%ige Spezifität. Unter Einsatz dieser Methode wiesen wir bei 37 Patienten mit herpetiformen Läsionen eine Herpes simplex-Virusinfektion nach. Untersucht wurden neben Effloreszenzabstrichen Plasmaproben und PBMC´s, um Aussagen über eine mögliche Virämie treffen zu können. Unsere Ergebnisse unterstreichen die Aussagen einiger Autoren, dass eine Virämie bei Primärinfektion auftreten kann, da wir im Plasma von sechs Patienten mit *Herpes-genitalis*-Primärinfektion HSV-DNA nachweisen konnten. Patienten mit bekannter Rekrudeszenz zeigten ausnahmslos negative Ergebnisse, was wir auf den Neurotropismus von HSV zurückführten. 90,9% der *Herpes labialis*-Patienten litten unter Rekrudeszenzen, was die ausnahmslos negativen Ergebnisse für HSV-DNA aus Plasma in dieser Gruppe erklären kann.

In der Literatur vorbeschriebene lymphotrope Eigenschaften von HSV können wir nicht bestätigen, da die PCR aus sämtlichen PBMC-Proben, auch bei positivem Plasmabefund, keine Amplifikation von HSV-DNA zeigte.

Zusammenfassend stellten wir fest, dass im Rahmen einer HSV-Primärinfektion eine Virämie stattfinden kann, wodurch eine HSV-Übertragung durch Blutprodukte möglich wird. Im Falle der HSV-Neuinfektion eines Blutspenders wäre die Infektionsübertragung durch Blutprodukte durch zeitliche Zurückstellung des Spenders von der Blutspende zu vermeiden

7 Anhang

7.1 Datenbogen zur HSV-Studie

Patientendaten : **Datum :**

Patienteninitialen : _____

Spendernummer : _____

Geschlecht : _____

Geburtsjahr : _____

Effloreszenzen :

Herpes labialis	O	*Herpes genitalis*	O
Rötung	O		
Bläschen	O		
Kruste	O		
Erstinfektion	O	Rekrurrenz	O

Bestehen weitere Infektionskrankheiten ?

Ja O nein O

Wenn ja, welche _____

_____

Besteht eine immunsuppressive Therapie ?

Ja O nein O

Wenn ja, welche _____

_____

Wurden die bestehenden Effloreszenzen bereits behandelt ?

Ja O nein O

Wenn ja, wie _____

_____

8 Abkürzungen

A	Adenosion
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C_T-Wert	*treshold cycle* = Schwellenzyklus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	*enzyme-liked-immuno assay* = enzymgekoppelter immunologischer Test
FAM	6-Carboxyfluorescein
G	Guanin
geq	Genomäquivalenten
HSV-1/-2	Herpes simplex-Virus Typ 1 und Typ 2
IPC	*internal positive control* = interne Positivkontrolle
IR_L-Sequenz	*internal repeat long* = lange, sich wiederholende Sequenzen innerhalb des HSV-Genoms
IR_S-Sequenz	*internal repeat short* = kurze, sich wiederholende Sequenzen innerhalb des HSV-Genoms
NTC	*no-template control* = ohne *Template* Kontrolle
PBMC´s	*peripheral blood mononuclear cells* = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	*polymerase chain reaction* = Polymerasekettenreaktion
R_n	normalisiertes Reportersignal
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
Taq	*Thermus aquaticus*
TR_L-Sequenzen	*terminal repeat long* = sich wiederholende lange Sequenzen an den Enden des HSV-Genoms
TR_S-Sequenzen	*terminal repeat short* = sich wiederholende kurze Sequenzen an den Enden des HSV-Genoms
T_m	*melting temperature* = Schmelztemperatur
U_L-Sequenz	*unique long* = einmalig vorkommende lange Sequenz
U_S-Sequenz	*unique short* = einmalig vorkommende kurze Sequenz
UNG	Uracil-N-Glycosylase
VIC	Fluoreszein-Derivat

9 Literatur

(1) Bezold G., Gottlöber P., Leiter U., Kerscher M., Krähn G., Peter R.U.: Quantitation of Herpes simplex DNA in blood during Aciclovir therapy with competitive PCR ELISA. *Clinical and Laboratory Investigations Dermatology 201, 296–299 (2000)*

(2) Bloom D. C.: HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol. 23,187-198 (2004)*

(3) Brice S.L., Stockert S.S., Jester J.D., Huff J.C., Bunker J.D., Weston W.L.: Detection of herpes simplex virus DNA in the peripheral blood during acute recurrent herpes labialis. *J Am Acad Dermatol. 26 (4), 594-598 (1992)*

(4) Brice S.L., Leahy M.A., Ong L., Krecji S., Stockert S.S., Huff J.C., Weston W.L.: Examination of non-involved skin, previously involved skin, and peripheral blood for herpes simplex virus DNA in patients with recurrent herpes-associated erythema multiforme. *J Cutan Pathol. 21 (5), 408-412 (1994)*

(5) Brown Z.: Preventing herpes simplex virus transmission to the neonate. *Herpes. 11 Suppl. 3, 175A-86A (2004)*

(6) Buxbaum S., Geers M., Gross G., Schofer H., Rabenau H. F., Doerr H.W.: Epidemiology of herpes simplex-Virus types 1 and 2 in Germany - what has changed? *Med Microbiol Immunol (Berl). 192, 177-181 (2003)*

(7) Cantin E., Chen J., Gaidulis L., Valo Z., Mc Laughlin-Taylor E.: Detection of herpes simplex virus DNA sequences in human blood and bone marrow cells. *J Med Virol. 42 (3),279-286 (1994)*

(8) Diamond C., Mohan K., Hobson A., Frenkel L., Corey L.: Viraemia in neonatal Herpes simplex-Virus infections. *Pediatr Infect Dis J, Vol. 18 (6), 487-489 (1999)*

(9) Doerr H. W., Rabenau H. : DermatotropeHerpesviren. *Chemotherapie Journal 1, 1-11 (1996)*

(10) Espy M.J., Uhl J.R., Mitchell P.S., Thorvilson J.N., Svien K.A., Wold A.D., Smith T.F.: Diagnosis of Herpes simplex-Virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology Vol. 38, No. 2, 795–799 (2000)*

(11) Filén F., Strand A., Allard A., Blomberg J., Herrmann B.: Duplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of Herpes simplex-Virus Type 1 and Herpes simplex-Virus Type 2 in genital and cutaneous lesions. *Sexual Transmitted Diseases, Vol.31, No. 6, 331-336 (2004)*

(12) Haarr L., Skulstad S. : The herpes simplex-virus type 1 particle – structure and molecular functions. *APMIS 102, 321-346 (1994)*

(13) Halperin S. A., Shehab Z., Thacker D., Hendley J.O.: Absence of viremia in primary herpetic gingivostomatitis. *Pediatr Infect Dis. 2 (6), 452-453 (1983)*

(14) Harel L., Smetana Z., Prais D., Book M., Alkin M., Supaev E., Mendelson E., Amir J.: Presence of Viraemia in patiens with primary herpetic gingivostomatis. *CID 39, 636-640 (2004)*

(15) Kimura H., Futamura M., Kito H., Ando T., Goto M., Kuzushima K., Shibata M., Morishima T.: Detection of viral DNA in Neonatal Herpes Simplex Virus Infections: Frequent and Prolonged Presence in Serum and Cerebrospinal Fluid. *The Journal of Infectious Diseases 164, 289-293 (1991)*

(16) Kimura H., Ito Y., Futamura M., Ando Y., Yabuta Y., Hoshino Y., Nishiyama Y., Morishima T.: Quantitation of viral load in neonatal herpes simplex virus infection and comparison between type 1 and type 2. *J Med Virol. 67, 349-353 (2002)*

(17) Kuo Y.-C., Liu W.-T., Lin C.-Y.: Herpes simplex-Virus type 1 genes in human mononuclear cells and affecting cell-mediates immunity. *Journal of Medical Virology 41, 138-145 (1993)*

(18) Lewenson-Fuchs I., Österwall P., Forsgren M., Malm G.: Detection of Herpes simplex-Virus DNA in dried blood spots making a retrospective diagnosis possible. *Journal of Clinical Virology 26, 39-48 (2003)*

(19) Lucotte G., Bathelier C., Lespiaux V., Bali C., Champenois T.: Detection and genotyping of Herpes simplex-Virus types 1 and 2 by polymerase chain reaktion. *Molecular and Cellular Probes 9, 287-290 (1995)*

(20) Madhaven H.N., Priya K., Anand A.R. and Lily Therese K.: Detection of herpes simplex virus genome using polymerase chain reaction in clinical samples. Comparision of PCR with standard laboratory methods for detection of HSV. *Journal of Clinical Virology 14, 145-151 (1999)*

(21) Madhaven H.N., Priya K., Bagyalakshmi R.: Phenotypic and genotypic methods for detection of herpes simplex virus serotypes. *Journal of Virological Methods 108, 97-102 (2003)*

(22) Malm G., Forsgren M.: Neonatal Herpes simplex-Virus infections: HSV DNA in cerebrospinal fluid and serum. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 81, 24-29 (1999)*

(23) Modrow S., Falke D.: Herpesviren. *Spektrum Lehrbuch – Molekulare Virologie 1. Auflage, 411-461 (1997)*

(24) Monteyne Ph., Laterre E.C., Sindic C.J.M.: Encephalitis in immunocompetent patients due to Herpes simplex-Virus type 1 or 2: Determination by polymerase chain reaction and detection of intrathecal virus-specific oligoclonal antibobies. *Acta neurol. Belg. 97, 233-239 (1997)*

(25) Morrow R.A., Friedrich D., Krantz E., Wald A.: Development and use of a type-specific antibody avidity test based on herpes simplex virus type 2 glycoprotein G. *Sex Transm Dis., 31 (8), 508-515 (2004)*

(26) Naraqi S., Jackson G.G., Jonasson O.M.: Viremia with herpes simplex type 1 in

adults. Four nonfatal cases, one with features of chicken pox. *Ann Intern Med. 85 (2), 165-169 (1976)*

(27) Nomura Y., Kitteringham N., Shiba K., Goseki M., Kimura A., Mineshita S.: Use of the highly sensitive PCR method to detect the Herpes simplex virus type 1 genome and its expression in samples from Behcet disease patients, *J Med Dent Sci. 45 (1), 51-58 (1998)*

(28) Porstman T.: Herpes simplex-Virus. *Diagnostische Bibliothek 8 9-12 und 9 1-12 (1992)*

(29) Roest R.W., Carman W.F., Maertzdorf J., Scoular A., Harvey J., Kant M., Van der Meijden W.I., Verjans G.M.G.M., Osterhaus A.D.M.E.: Genotypic analysis of sequential genital herps simplex virus type 1 (HSV-1) isolates of patients with recurrent HSV-1 associated genital herpes. *Journal of Medical Virology 73, 601-604 (2004)*

(30) Roizman B.: Herpesviridae, a brief introduction. *Virology Chapter 64, Second Edition, 1787-1793 (1990)*

(31) Roubalová K., Suchánková A., Vítek A., Sajdová J.: Presence of Herpes simplex-Virus in peripheral leukocytes of patients who developed active HSV infection after bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Virology 17, 37-42 (2000)*

(32) Ryncarz A.J., Goddard J., Wald A., Huang M.L. Roizman B. Corey L.: Development of a high-throughput quantitative assay for detecting Herpes simplex-Virus DNA in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology Vol. 37, No. 6,1941–1947 (1999)*

(33) Sanders V. J., Felisan S., Waddell A., Tourtellotte W. W. : Detection of herpesviridae in postmortum multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *Journal of Neuro Virology 2, 249-258 (1996)*

(34) Schalasta G., Arents A., Schmid M., Braun R.W., Enders G.: Fast and type-specific analysis of Herpes simplex-Virus types 1 and 2 by rapid PCR and fluorescence melting-curve-analysis. *Infection Vol. 28, No. 2, 85-91 (2000)*

(35) Schmutzhard J., Riedel H.M., Wirgart B.Z., Grillner L.: Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varizella zoster virus in skin lesions. Comparision of real-time pcr, nested pcr and virus isolation. *Journal of Clinical Virology 29, 120-126 (2004)*

(36) Schneweis K. E.: Die Herpes simplex-Virusinfektion. *Klinische Virologie Kapitel 18, 236-254*

(37) Scott D. A., Coulter W.A., Lamey P.-J.: Oral shedding of herpes simplex-Virus type 1: a review. *Journal of oral Pathology and Medicine 26, 441-447 (1997)*

(38) Stanberry L.R., Floyd-Reising S.A., Connelly B.L., Alter S.J., Gilchrist M.J., Rubio C., Myers M.G.: Herpes simplex viremia: report of eight pediatric cases and

review of the literature.; *Clin Infect Dis. 18 (3), 401-407 (1994)*

(39) Steiner I., Kennedy P. G. E. : Herpes simplex-virus latency in the nervous system – a new model. *Neuropathology and Applied Neurobiology 17, 433-440 (1991)*

(40) Steiner I., Kennedy P. G. E.: Herpes simplex-Virus latent infection in the nervous system. *Journal of NeuroVirology 1, 19-29 (1995)*

(41) Stránská R., Schuurman R., De Vos M., Van Loon A.M.: Routine use of highly automated and internally controlled real-time PCR assay for diagnosis of Herpes simplex and Varicella zoster Virus infections. *Journal of Clinical Virology 30, 39-44 (2004)*

(42) Studd M., Mc Cance D.J., Lehner T.: Detection of HSV-1 DNA in patients with Behcet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol. 34 (1), 39-43 (1991)*

(43) Takahash K., Aono T., Shichinohe M., Tamura M., Iwata Y., Yamanishi K., Shigeta S.: Herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells of some patients with Meniere's disease. *Microbiol Immunol. 45 (9), 635-638 (2001)*

(44) Tufano M.A., Baroni A., Buommino E., Ruocco E., Lombardi M.L., Ruocco V.: Detection of herpesvirus DNA in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with pemphigus by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol. 141 (6),1033-1039 (1999)*

(45) Twagira M., Hadzic N., Smith M., Ramaswamy M., Verma A., Dhawan A., Knisely A.S., Mieli-Vergani G., Geretti A.M.: Disseminated neonatal herpes simplex virus (HSV) type 2 infection diagnosed by HSV DNA detection in blood and successfully managed by liver transplantation, *Eur J Pediatr. 163 (3), 166-169 (2004)*

(46) Van Doornum G.J.J., Guldemeester J., Osterhaus A.D.M.E., Niesters H.G.M.: Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. *Journal of Clinical Microbiology Vol. 41, No. 2, 576-580 (2003*)

(47) Waldhuber M.G., Denham I., Wadey C., Leong-Shaw W. and Cross G.F.: Detection of herpes simplex virus in genital specimens by type-specific polymerase chain reaction. *International Journal of STD & AIDS 10, 89-92 (1999)*

(48) Weidmann M., Meyer-König U., Hufert F.T.: Rapid Detection of Herpes simplex-Virus and Varizella zoster-Virus infections by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology 41, 1565-1568 (2003)*

(49) York I. A., Johnson D. C.: Inhibition of humoral and cellular immune recognition by HSV. *Viroceptors, Virokines and Related Immune Modulators Encoded by DNA Viruses Chapter 7, 88-110 (1994)*

(50) Youssef R., Shaker O., Sobeih S., Mashaly H. and Mostafa W.Z.: Detection of Herpes simplex virus DNA in Serum and oral secretions during acute recurrent

herpes labialis. *The Journal of Dermatology 29, 404-410 (2002)*

(51) Zhang L., Nikkari S., Skurnik M., Ziegler T., Luukkainen R., Mottonen T., Toivanen P.: Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum. 36, 1080-1086 (1993)*

(52) Zhang Y., Kimura T., Fujiki K., Sakuma H., Murakami A. and Kanai A.: Multiplex Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus type 1, type 2, Cytomegalovirus an Varizella-zoster virus in ocular infections. *Japanese Journal of Ophthalmology 47, 260-264 (2003)*

(53) Wutzler P., Doerr H.W., Färber I., eichhorn U., Helbig B., Sauerbrei A., Brandstädt A. And Rabenau H.F. : Seroprevalence of Herpes simplex-Virus Type 1 and Type 2 in Selected German Populations – Relevance for the Incidence of Genital Herpes. *Journal of Medical Virology 61, 201-207 (2000)*

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Kirchner, Leiter des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin, für die Anregung zu diesem Thema und für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hennig, der mir durch seine langjährige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente, durch Ratschläge und Hilfestellungen sowie durch seine Geduld und seine konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung der Ergebnisse eine große Hilfe war.

Des Weiteren danke ich dem Team der Frauenklinik der Universität Köln und Frau Dr. med. Heike Hennig für die Mithilfe bei der Probengewinnung sowie dem Team des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin für die Hilfe beim Erlernen der wissenschaftlichen Arbeitstechniken.

Weiterhin danke ich meiner Kommilitonin Frau Dr. med. Ines Puchta, die mir jederzeit mit Anregungen zur Seite stand.

Abschließend möchte ich den Patientinnen und Patienten danken, die mir ermöglichten, mit dem von ihnen gewonnenen Probenmaterial die Experimente dieser Arbeit durchzuführen.

11 Lebenslauf

12.09.1976	Geboren in Reutlingen als Tochter des Diplomphysikers Dr. rer. nat. Heinrich Lesiecki und der Verwaltungs-angestellten Edeltrude Lesiecki, geborene Runzer
1983 – 1987	Besuch der Grundschule in Braunschweig / Lehndorf
1987 – 1989	Besuch der Orientierungsstufe in Braunschweig / Lehndorf
1989 – 1996	Besuch des Gymnasiums Martino-Katharineum in Braunschweig
07.06.1996	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/1996	Beginn des Studiums an der Universität zu Lübeck
23.09.1999	Ärztliche Vorprüfung
01/2000	Beginn des experimentellen Teils zur Dissertation
22.03.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27.08.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2002-02/2003	Praktisches Jahr an der Klinik für Orthopädie der Universität zu Lübeck
02/2003-04/2003	Praktisches Jahr am *Concord Repatriation General Hospital* der *University of Sydney*
04/2003-06/2003	Praktisches Jahr an der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Westküstenklinikums Heide
06/2003-09/2003	Praktisches Jahr an der Klinik für Innere Medizin des Westküstenklinikums Heide
24.11.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 02/2004	Ärztin im Praktikum bzw. Assistenzärztin in der Allgemein- und Abdominalchirurgie des Kreiskrankenhaus Hamelns
16.08.2006	Eheschließung mit Dr. med. Andreas Mosel, Abdominalchirurg des Kreiskrankenhaus Hamelns

12 Erklärung nach §8 Abs.1 Nr.10 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Universität zu Lübeck zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Typspezifischer Nachweis von Herpes simplex-Virus-DNA in Blutbestandteilen" in dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin unter Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Holger Hennig ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die oben aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hameln, 12. Februar 2008

gez. Claudia Mosel