

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

---

Epstein-Barr–Viruslastbestimmung mittels quantitativer PCR als  
Parameter zur Diagnose einer lymphoproliferativen Erkrankung  
nach Transplantation im Kindesalter

---

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**Aus der medizinischen Fakultät**

vorgelegt von  
Meike Holbe  
aus Einbeck

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Joachim Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Kirchner

Tag der mündlichen Prüfung 16. 11. 2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16. 11. 2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

<b><u>I Einleitung</u></b>	Seite
I.1 Das Epstein-Barr Virus	1
I.2 PTLD-Entstehung	3
I.3 Epidemiologie der PTLD	5
I.4 Diagnose einer PTLD	6
I.5 Therapie der PTLD	8
I.6 Fragestellung	10
<b><u>II Patienten, Material und Methoden</u></b>	
II.1 Patienten	11
II.2 Probenverarbeitung	14
<b><u>III Ergebnisse</u></b>	24
III.1 Serologie	
III.2 Vergleich zwischen Bam-HW-PCR-Ansatz und EBNA 1 (Bam-HI-K-) PCR-Ansatz	
III.3 Vergleich der Messergebnisse in Plasma und PBMCs	
III.4 EBV-Last bei klinisch unauffälligen nierentransplantierten Kindern	
III.5 Vergleich zwischen Kindern nach Nierentransplantation und gesunden Kindern (PBMC)	
III.6 Vergleich der Anzahl der EBV-Genomkopien bei klinisch unauffälligen Kindern unter Immunsuppression mit der bei an PTLD erkrankten Patienten	
III.7 EBV-Last im Plasma von Kindern nach Transplantation verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe	
III.8 Vergleich der Viruslast im Plasma von Kindern nach Nierentransplantation und PTLD-Patienten	
III.9 Verlauf der Viruslast bei PTLD-Patienten	
III.10 Auswirkung möglicher Faktoren auf die Anzahl der EBV-Genomkopien bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie	
III.11 IL10-Messung	
<b><u>IV Diskussion</u></b>	37
<b><u>V Zusammenfassung</u></b>	42
<b><u>VI Literatur</u></b>	44
<b><u>VII Anhang – Materialliste</u></b>	59
<b><u>Danksagung</u></b>	61
<b><u>Lebenslauf</u></b>	62

## Abkürzungsverzeichnis

CMV:	Cytomegalie-Virus
Ct:	Thresholdcycle
EA:	Early Antigen
EBNA:	Epstein-Barr spezifisches nukleäres Antigen
EBV:	Epstein-Barr-Virus
ELISA:	Enzym-linked-immunosorbent-assay
HHV5:	Humanes-Herpes-Virus 5
IFN $\alpha$ :	Interferon $\alpha$
IL10:	Interleukin 10
kbp:	kilobasenpaare
NTC:	non-template-control
OD-Wert:	Optische Dichte
PBL:	Lymphozyten des peripheren Blutes
PBMC:	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR:	Polymerase Kettenreaktion
PTLD:	Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (Posttransplant Lymphoproliferative Disease)
RQ-PCR:	Quantitative Echtzeit - Polymerase Kettenreaktion
TGF $\beta$ :	Tumorgrowthfactor $\beta$
UNG:	Uracil N-glycosylase
VCA:	Virus Capsid Antigen

## **I Einleitung**

### **I.1 Das Epstein-Barr Virus**

Das Epstein- Barr Virus (EBV) wurde erstmalig 1964 von M. Epstein, B. Achong und Y. Barr in Zelllinien von Burkitt- Lymphomen nachgewiesen. Sie beschrieben es als dem Herpesvirus ähnliches Partikel, das sich biologisch von den bisher bekannten Mitgliedern der Familie der Herpesviridae abgrenzen ließ.

Erhalten hatten sie das Lymphom- Probenmaterial von Denis Burkitt, der diese Entität des Non-Hodgkin- Lymphoms in den fünfziger Jahren während seiner Tätigkeit in Uganda als Erster beschrieben hatte (17;18). Er charakterisierte es als neuen, bisher ausschließlich in Äquatorialafrika beobachteten, kindlichen Tumor und postulierte auf Grund des endemischen Vorkommens eine infektiöse Ursache. Durch diese Entwicklung wurde das Epstein- Barr- Virus zum ersten bekannten humanen Tumorstoff. Bereits kurze Zeit nach dem Viruserstnachweis konnten seroepidemiologische Studien eine weltweite EBV- Verbreitung zeigen.

Später wurde es als Erreger der infektiösen Mononukleose, der fatalen Mononukleose und als Mitverursacher verschiedener maligner Erkrankungen identifiziert. Das humanpathogene Epstein- Barr Virus wurde als HHV5 in die Gruppe der Herpesviren eingeordnet.

EBV zeigt einen ausgeprägten B- Lymphotropismus und besitzt eine doppel-strängige DNA, die 172 kbp beinhaltet, welche für mehr als 80 Gene kodieren (74;139). Das EBV-Genom wird von 0,5 kbp terminalen direkten Wiederholungen („terminal repeats“) und 3 kbp internen direkten Wiederholungen („internal repeats“) in lange und kurze Sequenzdomains unterteilt, wobei verschiedene Virusisolate unterschiedliche Wiederholungsfrequenzen aufweisen. Wie auch andere Herpesviren setzt sich EBV aus dem die DNA enthaltenden Core, dem Kapsid, einem sich zwischen Kapsid und Envelope befindlichen Proteintegument und der mit Glykoprotein-Spikes versehenen Hülle, dem Envelope, zusammen (39;44;45;74).

Mehr als 90 % der erwachsenen Bevölkerung weltweit sind Träger des Epstein-Barr Virus. Unter den 14-jährigen sind 70 %, unter den 3-jährigen 50 % EBV- seropositiv (145). In den meisten Fällen verläuft die Erstinfektion mit EBV asymptomatisch oder als Infekt der oberen Luftwege. Seltener führt der Erstkontakt mit EBV zur infektiösen Mononukleose. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Krankheitssymptomen wird um so größer, je älter der Patient zum Zeitpunkt der Primärinfektion ist.

Zusätzlich lässt sich eine Assoziation verschiedener maligner Erkrankungen wie dem Burkitt-Lymphom (17;18;44;74), dem in Asien gehäuft beobachteten Nasopharynx-Karzinom (30), einem Teil der Morbus Hodgkin-Erkrankungen, Haarzell-leukoplakien und lymphoproliferativen

Erkrankungen bei mit HIV infizierten Personen sowie den lymphoproliferativen Erkrankungen post transplantationem (PTLD) mit EBV nachweisen(58;74).

In der überwiegenden Zahl der Fälle findet die Virusübertragung auf oralem Weg statt. Als Eintrittspforte dienen die Schleimhäute des Naso-Pharyngeal-Traktes. Über diesen Weg kommt es sowohl zu einem Virusbefall der Epithelzellen besonders der Parotis und der übrigen Speicheldrüsen, als auch zu einer EBV- Invasion in B-Lymphozyten. Von diesen infizierten Epithelien nehmen im Verlauf bei Virusträgern wiederholt sekundäre Virämien wie auch gelegentliche Virusausscheidungen über den Speichel ihren Ausgang. Während in den betroffenen Epithelzellen vorwiegend eine lytische Infektion stattfindet, wird in infizierten B-Zellen zumeist eine latente Infektion beobachtet.

Unter einer lytischen Infektion ist eine vollständige Virusreplikation zu verstehen, die der Vermehrung des Virus dient und die schließlich zu einer Zerstörung der betroffenen Zelle sowie zur weiteren Ausbreitung des Virus führt. Dagegen werden bei einer latenten Infektion nur bestimmte Regionen des Genoms repliziert. Sie dient zur Viruspersistenz in der entsprechenden Zelle.

Um eine Virusinternalisation in den B-Lymphozyten zu veranlassen, interagiert das virale Membranglykoprotein gp 350/220 mit dem B-Zell-Oberflächenantigen CD 21 (dem C3d Komplementrezeptor CR 2)(46;74;74). Die so erreichte Aufnahme des Virus führt zusätzlich zur persistierenden latenten Infektion der B-Zelle zur Zellaktivierung und durch das virale BCRF 1-Protein zu ihrer Proliferation. Das BCRF 1-Protein stellt ein Homologon zum von Th 2-Zellen im Rahmen der T-Zellaktivierung produzierten Interleukin 10 dar. Interleukin 10 und somit auch BCRF 1 bewirken eine erhöhte Proliferation infizierter Zellen sowie die Produktion von Interferon  $\gamma$ . Zusätzlich hemmen sie das T-Zellwachstum (122;152). Bei an infektiöser Mononukleose Erkrankten wird Interleukin 10 in erhöhter Konzentration nachgewiesen (46;95). Infizierte B-Zellen geben es in großer Menge ab (46;74).

Durch die starke Senkung der Apoptosesensibilität mittels viraler Proteine wird eine Immortalisierung der infizierten B-Zellen und eine lebenslange Viruspersistenz erreicht.

Bei immunkompetenten Menschen steht die EBV-Infektion zusammen mit Faktoren wie den Interleukinen 1, 4, 5, 6 sowie 10, die die B-Zellproliferation stimulieren, den inhibierenden Komponenten wie den Interferonen und TGF  $\beta$  in ausgeglichenem Verhältnis gegenüber (152). So sind im peripheren Blut aktuell an infektiöser Mononukleose erkrankter Patienten 30-45% der zirkulierenden T-Zellen gegen EBV gerichtet. Nach durchgemachter Infektion liegt die Rate der virustragenden B-Zellen weiterhin bei 1- 10 pro  $10^6$  Zellen (122). Sie bleibt über Jahre relativ konstant.

Fehlt hingegen eine suffiziente T-Zellimmunität, wird dieses Gleichgewicht durch den Ausfall proliferationshemmender Substanzen und die fehlende Lysierung infizierter Zellen gestört (10;103;152).

Bisher wurden zwei verschiedene EBV-Typen (Typ 1 und Typ 2) beschrieben. Trotz nur geringer genetischer Unterschiede – sie differieren im Bereich der EBNA 2-Region - weisen die beiden Virusuntergruppen in Bezug auf geo-graphische Verteilung, biologisches Verhalten und Gewebetropismus deutliche Unterschiede auf (50).

Während in den westlichen Industriestaaten Infektionen innerhalb der immun-kompetenten Bevölkerung überwiegend auf EBV-Typ 1 zurück zu führen sind, werden in Afrika beide bekannte EBV-Typen in ungefähr gleicher Häufigkeit vorgefunden. Auch bei immunkompromittierten Patienten in den Industriestaaten ist Typ 2 deutlich häufiger vertreten als in der Normalbevölkerung.

Das Typ 2-Virus gilt als weniger aggressiv und seine Proliferationsinduktionsfähigkeit als zu klein, um lymphoproliferative Erkrankungen zu verursachen, denn auch wenn es im peripheren Blut Immunsupprimierter häufig nachzuweisen ist, werden 90 % der PTLDs von Typ 1, die übrigen 10 % ohne nachgewiesene EBV-Beteiligung verursacht. (50;59;139)

Im Gegensatz zu Typ 1, der bei gesunden Virusträgern sowohl im Oropharynx als auch im peripheren Blut auffindbar ist, kommt Typ 2 hauptsächlich im Oropharynx und nur selten im peripheren Blut vor.

### I.2. PTLD Entstehung

Bei der weit überwiegenden Zahl der PTLDs handelt es sich um eine überschießende Proliferation von B-Lymphozyten. Bei erwachsenen Patienten kommen auch T-Zell-PTLDs vor (38;63;75;84). Bei ihnen ist in 80% aller PTLDs eine Assoziation mit EBV nachweisbar (21), während kindliche PTLD zu 100% EBV-assoziert sind.

Die Entstehung einer EBV-positiven B-lymphozytären PTLD wird derzeit folgendermaßen erklärt: kommt es z.B. auf Grund einer HIV-Infektion, eines angeborenen Defektes des Immunsystems oder iatrogen durch Immunsuppression nach Organ- bzw. Knochenmarkstransplantation, in seltenen Fällen auch bei immunsuppressiver Behandlung von rheumatischen Erkrankungen (118) oder Psoriasis (129), zu einer Verminderung der Anzahl oder der Aktivität von T-Zellen (4;143), die die Zahl der infizierten B-Zellen limitieren, wird eine unkontrollierte Proliferation virustragender B-Zellen ermöglicht. Ebenfalls zu diesem Prozess trägt vermutlich das bei Immunsupprimierten beobachtete reduzierte Vorkommen von Antikörpern gegen Latenz- Zyklus- Antigene (EBNA 1, 2, LP) bei (25).

Die proliferierenden Zellen exprimieren mindestens 9 EBV-Latenzenzyme (EBNA 1– 6, LMP 1, 2 A und 2 B), deren Genprodukte die Zellvermehrung fördern und den programmierten Zelltod verhindern (10;99;122;122;152). Zunächst entsteht eine polyklonale Zellvermehrung. Auf Grund der genetischen Instabilität dieser sich in kurzer Zeit mehrfach teilenden Zellen, ereignen sich gehäuft DNA Brüche, Mutationen oder Translocationen die eine Onkogenaktivierung (z.B. die von N- ras, p53, c- myc, BCL- 6) bewirken (26;79). Bei den auch beim Burkitt-Lymphom häufig beobachteten Translocationen t(8; 2), t(8; 14) und t(8; 22) kommt es zu einer Aktivierung des auf Chromosom 8q24 gelegenen c- myc- Onkogens durch dessen Verlagerung in Bereiche der Chromosome 2, 14 und 22, die der Kodierung der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline dienen. Hierdurch wird die Teilungsrate des betroffenen Klons weiter gesteigert, was einen Wachstumsvorteil gegenüber den übrigen Klonen zum Ergebnis hat und zu deren Verdrängung führt. Ein monoklonales Geschehen ist die sich hieraus ergebende Folge.

Das sehr heterogene Krankheitsbild von der polyklonalen B-lymphozytären Proliferation bis hin zum immunoblastischen Lymphom/ multiplem Myelom wird unter dem Begriff „Lymphoproliferative Erkrankungen post transplantationem“ oder „post transplant lymphoproliferative disorder (PTLD)“ zusammengefasst (113;114).

Bei der Unterteilung in verschiedene Untergruppen innerhalb dieses Oberbegriffs wird von den einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedlich verfahren. Innerhalb der verschiedenen Klassifikationen werden Faktoren wie klinischer Verlauf, Klonalität, genetische Veränderungen, Zuordnung der betroffenen Zellen zu Spender oder Empfänger (120) sowie EBV-Infektion in unterschiedlicher Weise gewichtet (15;69;79;113).

Die häufig verwendete Klassifikation des Society for Hematopathology Workshop von 1997 berücksichtigt vorwiegend die klinisch- pathologischen Aspekte (40;66). In dieser werden fünf verschiedene Entitäten der PTLD differenziert:

- 1) Diese Gruppe beinhaltet die gutartigste Variante: Ein selbstlimitierendes, polyklonales Erscheinungsbild mit Mononukleose- ähnlichen Symptomen.
- 2) Diese Form ähnelt initial der Ersten. Im Verlauf schreitet sie jedoch mit anhaltender, ausgedehnter, potentiell tödlicher Lymphoproliferation fort.
- 3) In diese Gruppe werden die monoklonalen B- und T-Zelllymphome eingeordnet.
- 4) Diese Gruppe umfasst die Plasmozytom- ähnliche Entität.
- 5) Hier werden das T-zellreiche, großzellige B-Zelllymphom und der Morbus Hodgkin zusammengefasst.



### I.3. Epidemiologie der PTLD

Die Inzidenz maligner Erkrankungen bei Organtransplantierten beträgt mit etwa 6 % angegeben, wobei PTLDs einen Prozentsatz von etwa 23% dieser Erkrankungen ausmachen. Dies entspricht einer Gesamthäufigkeit von PTLDs unter Transplantierten von 1,4 % (113). Die Mortalität von PTLDs wird zwischen 31% und 87% angegeben (9;14;33;96;110). Besonders hoch scheint die Sterblichkeit bei frühem Auftreten nach der Transplantation (78% bei < 6 Monaten (33)), bei monoklonaler Proliferation (80% (14)) sowie Lungen- bzw. Herz- Lungen-Transplantierten (87% (96)) zu sein.

Auch was die Inzidenz von PTLDs betrifft, zeigen sich deutliche Differenzen abhängig davon, welches Organ transplantiert wurde. So variieren die Angaben zwischen 0,2 – 5 % bei Nieren- (10;21;36;113), 1 – 13 % bei Leber- (10;19;36;113), 1,2 – 15 % bei Herz- (10;36;79;113), 1,6 - 10 % bei Lungen- (2;36) und 11 – 20 % bei Dünndarmtransplantierten (10;36;113). Für Knochenmarkstransplantierte werden Häufigkeiten abhängig von der Durchführung einer T-Zell-Depletion zwischen 0,4 und 25 % (10;36;83;113;136) – bei Verwendung von Nabelschnurblut von 2% nach zwei Jahren (7) angegeben.

Diese Varianz liegt z. T. in der Notwendigkeit unterschiedlich starker Immunsuppression begründet (144). So erhalten z.B. Herz- oder/ und Lungen-transplantierte wegen der schwerwiegenden Folgen im Falle einer Abstoßung eine stärkere immunsuppressive Therapie als z. B. Nierentransplantierte.

Weitere Faktoren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Einfluss auf die Erkrankungshäufigkeit haben, sind neben der Stärke auch die Art der Immunsuppression (27;113;144), der Serostatus vor der Transplantation, das Alter des Patienten sowie die Zeit nach Transplantation.

Eine Primärinfektion mit EBV nach der Transplantation stellt einen der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer PTLD dar (16;32;69;88;113;148). Eine Risikoerhöhung auf 30- 50% für Primärinfektionen wird berichtet (149). Inwieweit die Spender-Empfänger-Konstellation zusätzlich von Bedeutung ist, ist umstritten (43;67).

Das erhöhte Risiko im Rahmen einer EBV- Erstinfektion an einer PTLD zu erkranken bedeutet eine erhöhte Gefährdung für pädiatrische Transplantations-patienten, da in dieser Gruppe der Anteil seronegativer Patienten am höchsten ist (siehe I.1).

Unabhängig vom Serostatus hat vermutlich auch ein geringeres Alter per se einen Einfluss auf die Inzidenz der PTLD. Wird nämlich das Risiko primär infizierter Kinder dem primär infizierter Erwachsener bzw. das von Kindern mit endogener Reaktivierung dem von Erwachsenen mit endogener Reaktivierung gegenübergestellt, wird eine deutlich höhere Gefährdung der Kinder sichtbar (54;113;148)

Eine ebenfalls gesteigerte PTLD– Inzidenz ergibt sich für Patientenkollektive, in denen zur Therapie oder Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen Anti-T-Lymphozyten-Antikörper (OKT3) zum Einsatz kommen (8;87;89;108;144;149), die T-Zell depletiertes Knochenmark erhalten (59;108;149), die eine hohe Anzahl von Bluttransfusionen oder von Frischplasmapräparate verabreicht bekommen (98) oder eine zusätzliche Infektion mit CMV durchmachen (98;113).

Die Wahrscheinlichkeit eine PTLD zu entwickeln ist zudem im ersten Jahr- jedoch nicht innerhalb des ersten Monats- nach der Transplantation am größten (20;113;117;124;148).

Die PTLD-Inzidenz unter immunsuppressiver Therapie mit Cyclosporin A wird mit 2,2% unter Therapie mit Tacrolimus (FK506) mit 7,0% sowie mit 12,3 % nach erfolgter Umstellung von Cyclosporin A auf Tacrolimus angegeben (24). In einer anderen Studie wird das Erkrankungsrisiko unter Tacrolimus sogar auf 15%- im Vergleich zu 4- 11% im Gesamtpatientenkollektiv- beziffert.

### I.4 Diagnose einer PTLD

Derzeit erfolgt die Diagnose einer PTLD auf Grund des klinischen Bildes –bestätigt durch die histopathologische Begutachtung eines Biopsates.

Besonders zu Beginn gestaltet sich jedoch die Differenzierung zwischen einer PTLD und anderen fieberhaften Erkrankungen schwierig, da anfänglich wenig charakteristische Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, möglicherweise Lymphknotenschwellung sowie Dysfunktion des Spenderorgans (46) im Vordergrund stehen.

Die vorgenannte Lymphknotenschwellung kann abhängig von der Lokalisation Probleme bei der Auffindung bereiten. Häufige Lokalisation für Lymphoproliferation sind: der Gastrointestinaltrakt, was sich zumeist in Form von Diarrhöen und Blutungen zeigt, der obere Respirationstrakt und das zentrale Nervensystem, sowie das transplantierte Organ (9;21;23;113;122).

Zusätzlich erschwert die große Varianz der möglichen Manifestationsformen (112), in der auch atypische Verläufe, die z.B. die Pleura oder die glatte Muskulatur zum Ursprung haben (70;77;133;151), beinhaltet sind, die Diagnosefindung.

Problematisch ist insbesondere die sichere Abgrenzung einer PTLD von einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion; besonders da in einem Teil der Fälle Abstoßungsreaktion und PTLD parallel auftreten (48) und z.T. selbst bei der Beurteilung einer Biopsie eine Differenzierung schwer fällt (112). Allerdings ist gerade die Unterscheidung von PTLD und Abstoßung für das therapeutische Vorgehen von entscheidender Bedeutung (31). Eine PTLD erfordert eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie, wohingegen zur Behandlung einer Abstoßung eine Therapieintensivierung notwendig wird.

Ein bestehender klinischer Verdacht macht derzeit zumeist eine Biopsie zur Bestätigung der Diagnose erforderlich. Hierbei handelt es sich um einen nicht immer risikofreien invasiven Eingriff, für den die Indikation sorgfältig zu stellen ist, um auf der einen Seite die Belastungen für den Patienten so gering wie möglich zu halten, andererseits bestehende Erkrankungen nicht zu übersehen.

Zur Zeit wird häufig die zur Diagnosesicherung einer infektiösen Mononukleose gut geeignete (8;53) Bestimmung EBV-spezifischer Antikörper im Serum diagnostisch hinweisgebend eingesetzt. Bei immunkompetenten Personen ist durch den Nachweis verschiedener Immunglobulinklassen (IgA, IgM und IgG), die gegen unterschiedliche Virusantigene wie das Viruskapsid-Antigen (VCA), das frühe Antigen (EA) oder das Epstein-Barr spezifische nukleäre Antigen (EBNA 1) gerichtet sind, eine Differenzierung zwischen Seronegativität, akut durchgemachter Infektion, endogener Reaktivierung einer vorbestehenden Infektion sowie einer derzeit unauffälligen vorausgegangenen Infektion möglich.

Bei Transplantatempfängern hingegen sind die Ergebnisse der serologischen Untersuchung in vielen Fällen nicht zuverlässig (60;93;106), da sie durch die während oder kurz nach der Transplantation oft notwendigen Bluttransfusionen oder die Gabe humaner Immunglobulinpräparate verfälscht werden (73). Zusätzlich reagieren Patienten unter immunsuppressiver Therapie häufig verzögert oder nur unzureichend auf eine Primärinfektion bzw. eine endogene Reaktivierung von EBV (128).

In experimentellen Studien zeigen bei der Diagnosestellung einer PTLD Techniken wie *in-situ* Hybridisation (42;54;60;93;109), das *in-vitro* Auswachsen von B-Zellen (136), der Nachweis von IL-10 (12) und besonders der EBV-Nachweis mittels PCR im peripheren Blut (49;73;80;81;81;93;94;126;132;136;159) vielversprechende Ergebnisse.

Bei der Verwendung als Routinemethode ergeben sich jedoch Schwierigkeiten:

Für alle vier genannten Verfahren fehlen ausreichende, die Sensitivität und Spezifität betreffende Angaben. Vor allem für die PCR ist unklar ab welcher EBV-DNA-Konzentration eine PTLD zu diagnostizieren und bei welcher ein PTLD-Ausschluss möglich ist (52).

Es ist nicht entschieden, welches Probenmaterial zu verwenden ist, so werden in einigen Studien Virus-DNA-Konzentrationen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (105), im Gesamtblut (99), in peripheren Lymphozyten (71), im Serum (90), im Plasma (159) sowie in Organ- oder Tonsillenbiopsien (92) bestimmt.

Unklarheit besteht darüber, ob und wo es Grenzwerte für EBV-Genomkonzentrationen gibt, ab welchen von einem so hohen Risiko für die Entwicklung einer PTLD ausgegangen werden muss, dass man therapeutisch eingreift. Zusätzlich ist fraglich, ob dies dann nur für bereits symptomatische Patienten gilt oder ob der prädiktive Wert einer den Grenzwert über-

schreitenden Genomkonzentration so groß ist, dass man bereits prophylaktisch Maßnahmen ergreifen sollte (82).

Zusätzlich ist bei einigen der angewandten Methoden die Tauglichkeit für eine Anwendung in der Routinediagnostik wegen des nötigen technischen und auch zeitlichen Aufwandes fraglich.

### I.5 Therapie der PTLD

Derzeit existiert kein einheitliches Therapieschema zur Behandlung einer PTLD. Zwar finden sich in der Literatur einige vielversprechende Behandlungsmethoden, jedoch sind diese bis auf wenige Ausnahmen nur an kleinen Patientenkollektiven erprobt. Teilweise sind nur einzelne Falldarstellungen vorhanden.

Welche der möglichen Behandlungsformen im Einzelfall zum Einsatz kommt, richtet sich unter anderem danach, wie fortgeschritten die Erkrankung ist, welche Möglichkeiten dem behandelnden Zentrum zur Verfügung stehen und welche Aggressivität der Therapie der Allgemeinzustand des Patienten erlaubt.

Die Reduktion der immunsuppressiven Therapie als erste Maßnahme ist besonders bei frühen Stadien und polyklonalen Entitäten erfolgreich (9), sodass etwa 31% der PTLDs auf diesem Weg zu kontrollieren sind (113). Problematisch ist hierbei vorwiegend das sorgfältige Austarieren der Therapie, um die PTLD einerseits wirksam zu behandeln, andererseits hingegen keine Abstoßungsreaktion zu provozieren.

Handelt es sich jedoch um fortgeschrittene Stadien mit vorhandener Monoklonalität und Onkogenaktivierung sowie aggressiv- progrediente Formen der Erkrankung, sind die Erfolgsaussichten dieser Maßnahme nur sehr gering.

In diesen Fällen ist das Ansprechen der PTLD auf konventionelle Chemo-therapie in der Regel schlecht, auch wenn einige neuere Studien etwas verbesserte Ergebnisse aufweisen (97;113;130;137).

Die Überlebensrate der mit Radiotherapie behandelten Patienten stellt sich mit 31% etwas besser dar. Sie hat besonders bei ZNS- Läsionen ihr Einsatzgebiet (113).

Bei einem Teil der an PTLD Erkrankten ließen sich Behandlungserfolge durch chirurgisches Vorgehen erzielen (15;40). Wobei dies sicherlich nur lokalisierte, gut zugängliche Formen betrifft.

Der Nutzen einer unterstützenden oder prophylaktischen Gabe von Virostatika wie Aciclovir, Ganciclovir oder Foscarnet wird kontrovers diskutiert, da in einigen Studien ein Absinken der PTLD- Inzidenz unter prophylaktischer Gabe bzw. ein verbessertes Ansprechen bei supportiver Therapie mit Virostatika beschrieben wurde (11;35-37;96;101;113;123), wohingegen diese Beobachtungen in anderen Studien nicht bestätigt werden konnten (10;73;104;113).

Hinzu kommt, dass die genannten Virostatika ihren Ansatz an der lytischen Infektionsform haben und gegen die bei EBV- assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen vorherrschende latente Form der Infektion unwirksam sind (72;104;107;127).

Der Einsatz von Interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) wird wegen der *in-vitro* durch IFN  $\alpha$  hervorgerufenen Steigerung des lytischen Potentials von T-Zellen und der Verhinderung der B-Zellinfektion diskutiert. Fallberichte unterstützen diese Beobachtung (46;121;121). Bei Empfängern von Knochenmarktransplantaten erwies sich die IFN  $\alpha$ - Therapie jedoch als ineffektiv (113;136). Zusätzlich problematisch ist eine erforderliche Behandlungszeit von mehreren Monaten, während der ein erhöhtes Abstoßungsrisiko gegeben ist (113).

Positive Erfahrungen konnten auch beim Einsatz von murinen und gekoppelten B-Zell-Antikörpern gesammelt werden (41). Besonders die Anwendung von Rituximab (gekoppelter CD20-Antikörper) erbrachte vielversprechende Ergebnisse (7;10;47;51;84;87;102;113;163); wobei die Anwendbarkeit bei ZNS-Läsionen umstritten ist (62;141).

Die bisher größten Therapieerfolge ließen sich bei Knochenmarktransplantierten mit der Gabe EBV-spezifischer zytotoxischer Donor-T-Zellen erzielen. Die hierfür benötigten Zellen wurden aus dem Blut des entsprechenden Knochenmarkspenders gewonnen und sowohl therapeutisch bei nachgewiesener PTLD (34;65;137), als auch prophylaktisch bei hoher EBV-Genomkonzentration (61;68) eingesetzt. Ähnlich erfolgreich verliefen Studien, bei denen Organtransplantierten nach der Diagnose einer PTLD oder prophylaktisch bei hoher Viruslast EBV spezifische T-Lymphozyten verabreicht wurden, die ihnen z.T. vor der Transplantation entnommen und *in vitro* angezüchtet wurden (64;116;131;137;140).

Hierbei wurde weder ein häufigeres Auftreten von Graft-versus-Host-Erkrankungen noch vermehrte opportunistische Infekte beobachtet (36;64;83;113;137).

Langzeiterfahrungen zu den erwähnten Therapieansätzen stehen jedoch noch aus. Zudem sind bisher nur wenige Zentren in der Lage, die Therapie mit cytotoxischen T-Zellen durchzuführen und nicht in allen Fällen sind diese T-Zellen verfügbar (7).

Da die Therapie des Anfangsstadiums der PTLD durch Verringerung der Immunsuppression mit gutem Erfolg und relativ geringem Aufwand durchführbar ist, ist eine Diagnosestellung so frühzeitig wie möglich wünschenswert.

Diese sollte dabei möglichst wenig invasiv sein, um die ohnehin häufig hospitalisierten Patienten nicht zusätzlich zu belasten und die Funktion des transplantierten Organs nicht zu gefährden.

## I.6 Fragestellung

Aus dem oberhalb erläuterten Interesse, eine PTLD möglichst frühzeitig, zuverlässig und wenig invasiv zu diagnostizieren ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit:

- Besteht die Möglichkeit durch die Bestimmung eines detaillierten EBV-Status (einschließlich der EBV- Last- Bestimmung durch quantitative PCR) bei immunsupprimierten Kindern ein aktuelles Risiko für die Entwicklung oder das Bestehen einer PTLD erkennen zu können?
- Welches Probenmaterial ist hierbei das am besten geeignete?
- Ist dieses Verfahren zur Anwendung im klinischen Alltag tauglich?
- Welche Voraussetzungen müssen hierfür erfüllt sein?

### II Patienten, Material und Methoden

#### II.1 Patienten

Für die Untersuchungen zu unserer im vorangehenden Abschnitt erörterten Fragestellung stand Probenmaterial zur Verfügung, das 116 nierentransplantierten Kindern und Jugendlichen ohne Anzeichen einer PTLD, 10 pädiatrischen Patienten mit histologisch gesicherter PTLD, 13 nicht immunsupprimierten Kindern mit infektiöser Mononukleose sowie 20 gesunden Kindern entnommen wurde.

#### Nierentransplantierte Kinder und Jugendliche:

Bei dieser Gruppe handelt es sich um Patienten, die zwischen dem 01.11.1998 und dem 01.01.2000 in der nephrologischen Ambulanz der Medizinischen Hochschule Hannover betreut wurden. Die Daten von 96 der ursprünglich 116 Patienten flossen in die Studie ein.

Ausschlussgrund für die übrigen 20 waren: klinische Zeichen einer akuten Infektion zur Zeit der Blutentnahme (bei sechs Kindern), eine Transportdauer über 48 Stunden (bei 11 Patienten), eine zu geringe Materialmenge (bei zwei Patienten) und die Diagnosestellung einer PTLD (bei einem Kind).

Die 96 in der Studie verbliebenen Kinder und Jugendlichen (56 Jungen und 40 Mädchen) waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme von 3,8 bis 26,1 Jahre (im Median 13,9 Jahre) alt und hatten vor 1 – 181 Monaten (im Median 42 Monate) ein Nierentransplantat bekommen.

Bei 69 der 96 in die Studie eingeschlossenen Patienten war dies die erstmalige Transplantation. Eine Retransplantation war bei 11 der Kinder durchgeführt worden. Bei zwei Patienten handelte es sich um die dritte Transplantation und bei einem Kind war zusätzlich eine Leber transplantiert worden.

Zur Transplantation geführt hatten bei 29 Patienten (zumeist zystische) Nierendysplasien. Bei 20 Kindern handelte es sich bei der Grunderkrankung um entzündliche oder immunpathologische Nierenerkrankungen. Ein Stoffwechseldefekt hatte bei 14 Patienten, Erkrankungen der ableitenden Harnwege hatten bei 12 Patienten und bei weiteren 7 sonstige Ursachen diesen Eingriff erforderlich gemacht.

Die immunsuppressive Therapie bestand bei Blutentnahme bei 2 Patienten aus einer Monotherapie mit Tacrolimus (FK 506), bei 8 Patienten aus der Kombination von Tacrolimus und Decortin und bei weiteren 8 Patienten aus einer Trippeltherapie von Tacrolimus, Decortin und Azathioprin oder Mycophenolatmofetil. Eine Zweifachkombination aus Cyclosporin A und Decortin erhielten 31 Patienten; eine Kombination aus Cyclosporin A und Mycophenolatmofetil 2 Patienten. Eine Trippeltherapie aus Cyclosporin A mit Decortin und Azathioprin bzw.

Mycophenolatmofetil wurde bei der mit 32 Patienten größten Gruppe angewandt.

Bei 13 Patienten waren aus Gründen wie Wohnortwechsel keine Informationen über den Zeitpunkt der Transplantation, die Art der Grunderkrankung und die Immunsuppression verfügbar.

Geschlecht	56 Jungen	n=96
	40 Mädchen	
Alter	3,8 – 26,1 Jahre (Median 13,9)	
Zeit nach Transplantation	1 – 181 Monate (Median 42)	n=83
<u>Anzahl der Transplantationen</u>		
Ersttransplantation	69	
Zweittransplantation	11	
Dritttransplantation	2	
Transplantation weiterer Organe	1	
<u>Grunderkrankung</u>		
Nierendysplasie	29	
Entzündliche oder immunopathologische Nierenerkrankungen	20	
Stoffwechseldefekte	14	
Erkrankungen der ableitenden Harnwege	12	
Sonstige Grunderkrankungen	7	
<u>Immunsuppressive Therapie</u>		
<u>Cyclosporin A</u> + Decortin + Azathioprin oder Mycophenolatmophetil	32	
<u>Cyclosporin A</u> + Decortin	31	
<u>Cyclosporin A</u> + Mycophenolatmophetil	2	
<u>Tacrolimus</u> + Decortin + Azathioprin oder Mycophenolatmophetil	8	
<u>Tacrolimus</u> + Decortin	8	
<u>Tacrolimus</u> (Monotherapie)	2	

Tabelle 1: Geschlecht, Alter, Zeit nach Transplantation, Anzahl der Transplantationen, Grunderkrankungen sowie immunsuppressive Therapie der nierentranplantierten Kinder



### Pädiatrische Patienten mit histologisch gesicherter lymphoproliferativer Erkrankung post transplantationem (PTLD) :

Von diesen 10 Kindern (3 Jungen und 7 Mädchen) war bei 7 eine Leber-, bei 2 eine Herz- und bei einem eine Nierentransplantation durchgeführt worden. Sie waren zur Zeit der Blutentnahme zwischen 1 und 15 Jahren (Median 4 Jahre) alt.

Behandelt wurden 5 dieser Patienten im Universitätsklinikum in Brüssel, 2 in Essen, 2 in Hannover und ein Patient in der Kinderklinik München-Schwabing. Die Diagnose der PTLD wurde bei ihnen klinisch gestellt und histologisch gesichert. Vor Therapiebeginn erfolgten z.T. mehrfache Blutentnahmen, sodass 13 Proben bestehend aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (entnommen bei 9 Patienten) und 8 Plasmaproben (entnommen bei 5 Patienten) für die Untersuchung zur Verfügung standen. Bei 4 Patienten fanden Verlaufskontrollen beider Werte, bei 2 Patienten nur der PBMC- sowie bei einem nur der Plasmawerte statt.

### Nicht immunsupprimierte Kinder mit infektiöser Mononukleose (IM):

Bei diesen 13 Patienten (8 Jungen und 5 Mädchen im Alter von 8 bis 16 Jahren im Median 13,2 Jahren) mit klinischen Symptomen einer infektiösen Mononukleose und dem serologischen Nachweis einer EBV- Erstinfektion konnte von 3 Patienten sowohl Plasma als auch PBMC untersucht werden. Nur Plasma war von 4 Patienten, nur PBMCs waren von 6 Patienten zu bekommen. Von einigen Patienten standen mehrere Proben zur Verfügung, so dass sich eine Gesamtzahl von 9 Plasmaproben von 7 Patienten und von 10 PBMC-Proben von 9 Patienten ergibt.

### Gesunde Kontrolle:

Die Blutentnahme erfolgte bei diesen 4- 16 jährigen (Median 10,5 Jahre) 14 Jungen und 6 Mädchen im Rahmen einer Routineblutabnahme z.B. wegen eines elektiven Eingriffs. Keines dieser Kinder bzw. Jugendlichen wies zum Entnahmezeitpunkt Zeichen für eine aktuelle EBV-Infektion wie Fieber oder Adenopathie auf.

Alle an der Studie teilnehmenden Kinder und Jugendliche sowie deren Eltern waren über den Zweck der Blutentnahme informiert.

### II.2 Methoden

#### Probenvorbereitung

Pro Patient wurden jeweils 5- 10 ml EDTA-Blut entnommen und uns aus den jeweiligen Kliniken ungekühlt mit der Post bzw. aus der eigenen Klinik mit der Hauspost zugesandt. Aus diesen Proben wurden- wenn möglich- sowohl Plasma als auch PBMCs gewonnen. Dieser Schritt fand bei den PTLD-Patienten aus Brüssel wegen der zu erwartenden längeren Transportdauer bereits dort statt.

Zur Plasmagewinnung wurden die Proben bei 1000 x g über 10min zentrifugiert und im Mittel 3 ml Plasma abpipettiert. Das so gewonnene Plasma wurde in Portionen von je 1 ml Plasma aufgeteilt, in Eppendorfgefäße gefüllt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80° C eingelagert.

Durch Standard-Dichte-Zentrifugation (unter Einsatz von Ficoll- Separationslösung; s. Materialliste) wurden aus dem verbliebenen Restplasma und den zellulären Blutbestandteilen mononukleäre Zellen des peripheren Blutes isoliert. Im Anschluss wurde das etwa  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  PBMCs enthaltende Isolat zweimalig mit PBS-Puffer gespült, in Eppendorfgefäße überführt und bei -80° C aufbewahrt.

Die DNA-Extraktion erfolgte unter der Verwendung des QIAamp Blood Midi Kits aus 1 ml Plasma bzw. aus den PBMCs, die in je 1ml PBS-Puffer aufgeschwemmt wurden, auf eine vom Hersteller empfohlene Weise. Hierbei beruht das Prinzip der Methode darauf, dass dem Probenmaterial die vorgesehene Protease zur Zellenaturierung hinzugefügt und nach einer Inkubationszeit Ethanol als Lösungsmittel dazugegeben wird. Anschließend wird die Lösung auf den vorgesehenen Filter, der sich in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen befindet, pipettiert und zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen. Die im Filter verbliebene DNA wird nacheinander mit zwei unterschiedlichen Puffern gespült und schließlich durch einen Lösungspuffer aus dem Filter in ein frisches Zentrifugationsröhrchen ausgewaschen.

Das Eluationsvolumen betrug im Falle des Plasmas nur 200 µl, um trotz der im Plasma nur geringen DNA-Konzentration eine möglichst hohe Konzentration im Eluat zu erreichen. Bei dem eingesetzten Volumen von 1 ml Plasma bedeutet dies eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor fünf.

Zur Auswaschung der aus PBMCs gewonnenen DNA wurden 400 µl des vorgesehenen Lösungspuffers eingesetzt.

Folgend hierauf wurden 50 µl der so erhaltenen Lösung zur Feststellung der DNA-Konzentration und eventueller Verunreinigungen unter Einsatz eines Spectrophotometers

analysiert. Im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung wurde die DNA- Konzentration der PBMC- Proben unter Verwendung von destilliertem Wasser auf 50 µg/ml eingestellt.

### Bestimmung EBV-spezifischer Antikörper mittels ELISA

Um den Serostatus der Patienten in Bezug auf EBV ermitteln und zwischen EBV-Seronegativen, EBV-Seropositiven ohne Anzeichen für eine aktive Infektion, bzw. primären und endogen reaktivierten Infektionen unterscheiden zu können, wurden EBV spezifische Antikörper vom Typ IgG, IgM und IgA jeweils gerichtet gegen das early antigen (EA) sowie vom Typ IgG gegen Epstein-Barr-spezifisches nukleäres Antigen 1 (EBNA 1) mittels Enzym linked immunsorbent assay (ELISA) im Plasma bestimmt.

Hierbei wird das IgM gegen EA bei einer akuten Infektion als Erstes nachweisbar. Darauf folgen IgG gegen EA und als Zeichen der Epithelbeteiligung das IgA gegen EA. Im Verlauf sinkt dann die Konzentration dieser Antikörper im Regelfall unter die Nachweisgrenze ab.

Etwa zeitgleich mit dem Absinken der Konzentration der gegen das early antigen gerichteten Antikörper erreicht IgG gegen EBNA 1 detektierbare Mengen und bleibt für einen größeren Zeitraum nachweisbar. Seine Bestimmung dient als Hinweis auf eine länger zurückliegende Infektion.

Die von uns zur Messung der genannten Antikörper verwendeten Ansätze enthalten rekombinantes Antigen p72 zum Nachweis von Immunglobulinen gegen EBNA 1 bzw. p54 und p138 zur Ermittlung spezifischer Antikörper gegen EA. Die Untersuchungen erfolgten den Angaben des Herstellers entsprechend.

Zusätzlich wurden dem Zeitpunkt der Blutentnahme vorangehende serologische Routedaten zum Vergleich herangezogen und so eine Einteilung in die folgendermaßen definierten Gruppen vorgenommen:

- 1) EBV- seronegativ: Patienten, bei denen weder in den Voruntersuchungen noch in der von uns untersuchten Probe EBV-spezifische Antikörper nachzuweisen waren.
- 2) EBV- seropositiv mit länger zurückliegender Serokonversion: Bei diesen Patienten waren Antikörper vom Typ IgG gegen EBNA 1 messbar. IgG, IgM sowie IgA gegen EA waren hingegen nicht oder ausschließlich EA IgG war nachweisbar. In den Vorbefunden waren hier ebenfalls Zeichen einer stattgehabten Serokonversion sichtbar.
- 3) Primäre Infektion: Diese Patienten waren in vorangegangenen Routineuntersuchungen negativ für EBV-spezifische Antikörper, zeigten jetzt aber eine Serokonversion, wobei anti-EA IgM und/oder anti-EA IgG nachgewiesen wurden. Antikörper gegen EBNA 1 waren definitionsgemäß in dieser Gruppe nicht vorhanden bzw. unterhalb eines Schwellenwertes von 0,5.

- 4) Endogene Reaktivierung: In diese Gruppe sind Patienten einzuordnen, die langzeitpositiv für anti-EBNA1-IgG waren und bei denen zusätzlich erhöhte Konzentration von anti-EA-IgM (OD-Werte>0,5) bzw. von anti-EA-IgG (OD-Werte>1,0) gemessen wurden. Da unter immunsuppressiver Therapie trotz länger zurückliegender Serokonversion im Plasma einiger Patienten kein anti-EBNA1-IgG mehr feststellbar war, wurden in diese Gruppe auch Patienten gefasst, bei denen in Vorbefunden eine EBV-Infektion dokumentiert war und zusätzlich die von uns untersuchte Probe erhöhte Werte für anti-EA-IgM bzw. anti-EA-IgA aufwies.

### Epstein-Barr-Viruslastbestimmung im Plasma und in PBMCs unter Einsatz quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RQ-PCR; TaqMan-Technologie):

Bei diesem von uns angewandten Verfahren wird – anders als bei herkömmlichen PCR-Ansätzen - die Registrierung eines bei der DNA-Amplifizierung von einem fluoreszierenden Farbstoff freigesetzten Signals zur Quantifizierung der im Ansatz enthaltenen DNA-Konzentration verwendet. Dieses Vorgehen ersetzt den Nachweis mit Hilfe der Gelelektrophorese sowie anschließendem „Southern-Blotting“.

Das Prinzip dieser Methode beruht hierbei darauf, dass den Proben zusätzlich zu den Primern sowie den Desoxyribonukleinsäuretriphosphaten und der DNA-Polymerase ein als Sonde bezeichnetes sequenzspezifisches Oligonukleotid im Überschuss hinzugefügt wird. Diese Sonde enthält an ihrem 5' Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, der durch eine kovalente Bindung an den am 3' befestigten hemmenden Anteil (Quencher) blockiert wird. Als Reporterfarbstoffe verwendeten wir FAM (6-carboxy-fluorescein) und VIC. Als Quencher wurde TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) benutzt.

Während der DNA-Amplifizierung wird die Sonde durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgespalten und dabei der Reporter-Farbstoff von dem hemmenden Anteil getrennt.

Auf diese Weise wird die hemmende Wirkung des Quenchers aufgehoben und der Reporter sendet ein fluoreszierendes Signal mit dem Maximum bei einer Farbstoff-spezifischen Wellenlänge (FAM 518 nm) aus.

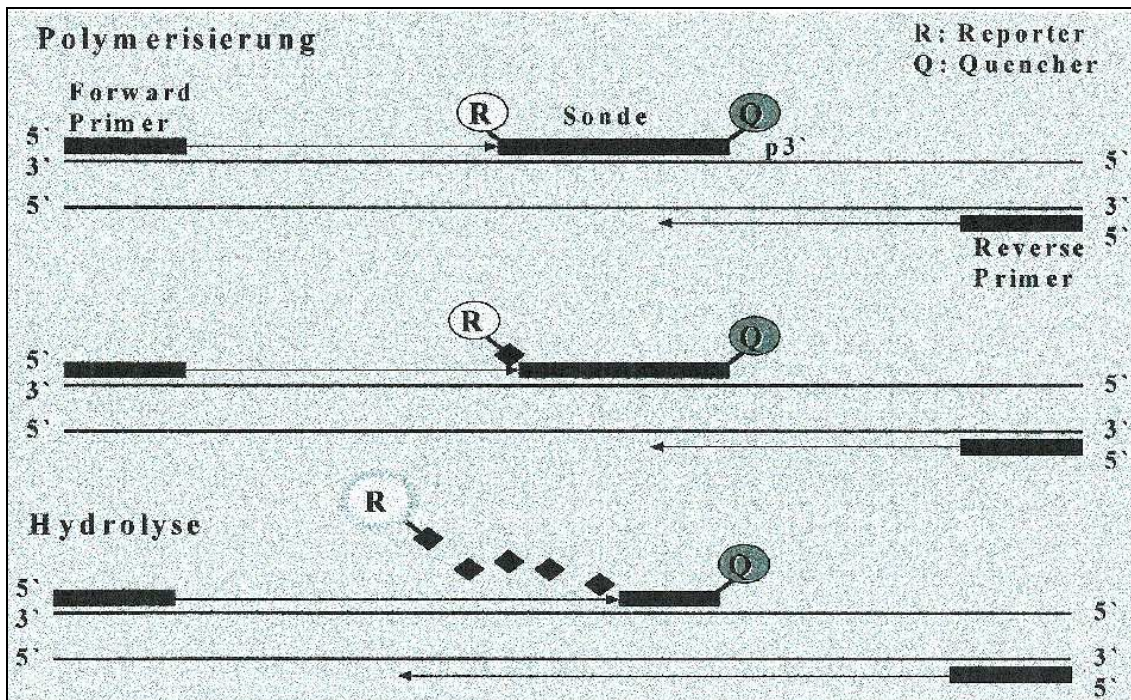


Abbildung 1. Biochemisches Prinzip der RQ-PCR/TaqMan-Technologie

Das so entstandene Signal wird mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System registriert und gegen das des ebenfalls im Ansatz enthaltenen passiven Referenzfarbstoff (z. B. Rox) abgeglichen.

Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz wird alle sieben Sekunden gemessen. Hierbei kommt es in der Phase der exponentiellen Reduplikation zum Überschreiten eines Schwellenwertes, was bei den Messungen festgehalten wird. Der Zyklus, in dem dies der Fall ist, wird als Thresholdcycle ( $C_t$ ) bezeichnet. Die Anzahl der zum Erreichen des Schwellenwertes nötigen Zyklen ist invers proportional zur vorliegenden Konzentration des zu bestimmenden DNA-Abschnitts.

Mit Hilfe der für die mitgeführten Standards, die eine festgelegte DNA-Konzentration enthalten, ermittelten  $C_t$ -Werte lässt sich nun eine Standardkurve erstellen. Auf dieser Kurve kann bei bekanntem  $C_t$  die vorliegende DNA-Konzentration abgelesen werden.

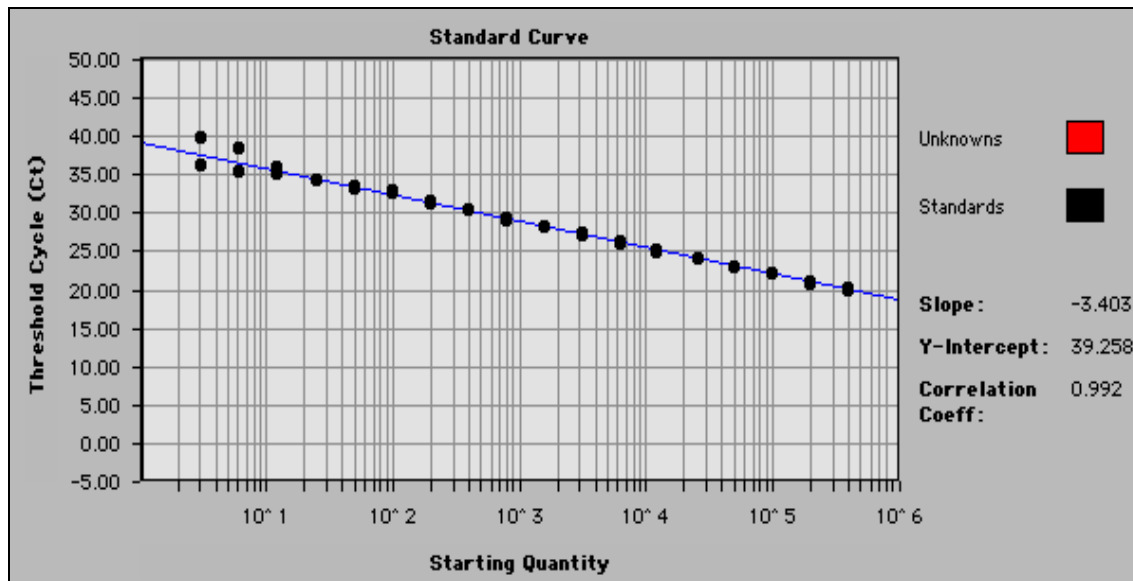


Abbildung 2. Verlauf der Bam HI-K-spezifischen Amplifikation der Namalwa-DNA

Zur Feststellung eventueller Verunreinigungen wurden 4 sogenannte Non Template Controls (NTC) verwendet, die anstelle des Probenmaterials destilliertes Wasser enthielten. Bei ihnen läßt sich nur bei einer Verunreinigung eine DNA-Amplifikation beobachten.

Um das Vorhandensein von amplifizierbarer DNA in den Ansätzen zu bestätigen, wurde für jede der Proben eine Positivkontrolle mitgeführt. Hierbei wurde eine konstante Region des menschlichen Genoms (die CRP-Region) mittels entsprechender Primer und Sonden amplifiziert und nachgewiesen.

Unter Verwendung dieser Methode führten wir die Messung der EBV-Genomlast für jede der Proben mit zwei verschiedenen Ansätzen durch, deren Primer und Sonden an zwei unterschiedliche Regionen des EBV-Genoms binden.

Bei der ersten der für die Bestimmung gewählten Regionen, handelt es sich um die BAM HI-W-Region, die für einen Promotor der latenten Genexpression kodiert, welcher die virusinduzierte Wachstumstransformation ruhender B-Zellen verursacht (78). Diese Region ist repetitiv mit zwischen einer und elf Wiederholungen in unterschiedlichen EBV- Laborstämmen und sehr konstant innerhalb des EBV-Genoms vorhanden (29).

Die zweite Region, die BAM HI-K-Region, kodiert für das Epstein-Barr spezifische nukleäre Antigen 1 (EBNA1). Hierbei waren die Primer und Sonden so gewählt, dass sie an einer in allen publizierten EBNA1-Regionen verschiedener Stämme enthaltenen Stelle ansetzen, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden (157).

Die Primer und Sonden wurden unter Zuhilfenahme der GenBank Sequence Database sowie unter Verwendung von Primer-Express-Softwareentworfen.

### Bam HI-W-Assay

Bei diesem Ansatz wurde die Bestimmung der  $\beta$ -Actin-Region als externe positive Kontrolle in einem zusätzlichen Reaktionsgefäß (Cup) der Titerplatte neben der Doppelbestimmung der Bam HI-W Region des EBV durchgeführt.

Bei jedem PCR-Lauf wurden 7 Standardproben aufsteigender Konzentration in Doppelbestimmung zur Erstellung der Standardkurve verwendet. Zusätzlich wurden 4 Negativkontrollen mitgeführt. Da eine Titerplatte 96 Cups umfasst, können folglich neben den 2x7 Standards und 4 NTCs 26 Proben pro Titerplatte bei Doppelbestimmung und externer positiver Kontrolle gemessen werden.

S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6
S7	S7	NTC	NTC	NTC	NTC	P1	P1	P1	P2	P2	P2
P3	P3	P3	P9	P9	P9	P15	P15	P15	P21	P21	P21
P4	P4	P4	P10	P10	P10	P16	P16	P16	P22	P22	P22
P5	P5	P5	P11	P11	P11	P17	P17	P17	P23	P23	P23
P6	P6	P6	P12	P12	P12	P18	P18	P18	P24	P24	P24
P7	P7	P7	P13	P13	P13	P19	P19	P19	P25	P25	P25
P8	P8	P8	P14	P14	P14	P20	P20	P20	P26	P26	P26

Abbildung 3. Pipettierschema bei Bam HI-W-Ansatz

Die Sonde zum Nachweis der Bam HI-W Region enthielt den Fluoreszenzfarbstoff Fam. Zunächst wurde die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte aus PBMCs bzw. Plasma isolierte DNA bei Raumtemperatur aufgetaut und die für die Anzahl der zu messenden Proben insgesamt benötigten Mengen an TaqManUniversal Master Mix, Primern und Sonden berechnet. Die entsprechenden Mengen wurden in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert, vermischt und in die für die einzelnen Proben notwendigen Portionen unterteilt.

Für die Zusammensetzung eines Einfachansatzes für die Bam HI-W- und  $\beta$ -Actin- Bestimmung siehe Anhang.

Alle beschriebenen Pipettierschritte fanden in der sterilen Werkbank unter Verwendung von 10 µl – 1ml umfassenden Eppendorf-Pipetten sowie dazugehöriger steriler Filterpipettenspitzen statt.

### EBNA 1 (=Bam HI-K) Assay

Hierbei handelt es sich im Gegensatz zum vorangehend geschilderten Bam HI-W-Assay um einen Duplex-PCR-Ansatz. Dies hat zur Folge, dass die CRP-Bestimmung nicht als externe, sondern als interne positive Kontrolle mitgeführt wird und somit in dem selben Reaktionsgefäß stattfindet, wie die EBNA 1-Messung.

Hierzu ist es notwendig, dass die beiden verwendeten Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen versehen sind, deren Fluoreszenzwellenlängen sich voneinander unterscheiden. So enthält die Sonde für die Bam HI-K- Region Vic, die für die CRP- Region Fam als Reporterfarbstoff.

Ebenso wie für den Bam HI-W-Assay wurden die Proben vorbereitend aufgetaut, die notwendigen Mengen an Mastermix, Primern, Sonden und Aqua ad injectabile berechnet, in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert, vermischt und die für die einzelnen Proben benötigte Menge entnommen.

Auch bei diesem Ansatz waren 7 Standards in Doppelbestimmung sowie 4 NTC zur Erstellung der Standardkurve bzw. als Negativkontrollen erforderlich.

Zum Einfachansatz zur EBNA 1 (= Bam HI-K) Bestimmung mit interner CRP-Kontrolle siehe Anhang.

Da bei der EBNA 1-Duplex-PCR die positive Kontrolle intern mitgeführt wurde, wurden nur zwei Reaktionsgefäße der Titerplatte für eine Probe benötigt. Das heißt, dass pro Titerplatte (umfasst 96 Reaktionsgefäße) neben den 2 x 7 Standards und 4 NTCs 39 Proben bei Doppelbestimmung gemessen werden konnten.



S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6
S7	S7	NTC	NTC	NTC	NTC	P1	P1	P2	P2	P3	P3
P4	P4	P10	P10	P16	P16	P22	P22	P28	P28	P34	P34
P5	P5	P11	P11	P17	P17	P23	P23	P29	P29	P35	P35
P6	P6	P12	P12	P18	P18	P24	P24	P30	P30	P36	P36
P7	P7	P13	P13	P19	P19	P25	P25	P31	P31	P37	P37
P8	P8	P14	P14	P20	P20	P26	P26	P32	P32	P38	P38
P9	P9	P15	P15	P21	P21	P27	P27	P33	P33	P39	P39

Abbildung 4. Pipettierschema für EBNA 1

Die Polymerase Kettenreaktion wurde mit Hilfe des ABI PRISM 7700 SDS durchgeführt, der sich in einem von Prä-PCR-Bereich getrennten Raum befand, um Kontaminationen soweit wie möglich zu vermeiden. Die Zyklusabfolgen waren bei beiden Ansätzen gleich. Die Geräteeinstellung differierte lediglich dahingehend, dass bei der EBNA 1–Bestimmung zwei verschiedene Reporter- Farbstoffe (Vic für die Bam HI-K-Region und Fam für die humane CRP-Region) zu messen waren, während bei der Bam HI-W-Bestimmung nur die Registrierung eines Farbstoffs (Fam) -abgesehen von den grundsätzlichen Kontrollabgleichen mit den passiven Referenzfarbstoffen - nötig war. Ablauf der Zyklen:

*-Inaktivierung einer möglichen Kontamination:* Zur Inaktivierung einer möglichen Kontamination mit Uracil N'-glycosylase (UNG) wurden die Ansätze für 2 Min. auf 50 °C erwärmt.

*-Aktivierung der Polymerase:* Zur Aktivierung der Ampli Taq Gold Polymerase und weiteren UNG- Inaktivierung fand eine Erhitzung auf 95 °C über 10 Min. statt.

*-40 Amplifikationszyklen bestehend aus:*

-> Doppelstrangtrennung: Durch Erhitzen auf 95 °C für 15 sec wurde nun eine DNA-Doppelstrangtrennung induziert.

-> Anlagerung und Amplifikation: Bei Abkühlung des Ansatzes auf 60 °C für 60 sec. lagerte sich die Sonde an die passende Sequenz zwischen den Primerbindungsstellen an und bei der DNA-Amplifikation wurde die Sonde durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgespalten sowie der Reporter-Farbstoff von dem Quencher- Anteil getrennt.

-> Registrierung der Intensität des fluoreszierenden Signals (erfolgt alle 7 Sekunden)

*-Abkühlung auf Raumtemperatur*

Die EBV-positive Burkitt-Lymphom- Zelllinie Namalwa (American Type Culture Collection [ATCC] CRL-1432) wurde als Standard zur EBV-Quantifizierung verwendet, da sie konstant 2 integrierte EBV-Kopien pro Zellgenom enthält.

Folglich war es möglich, die Anzahl der eingesetzten EBV-Genome durch die Menge der eingesetzten Namalwa DNA zu bestimmen. So enthalten näherungsweise 3,3 pg Namalwa DNA eine EBV-Genomkopie.

Für die Ermittlung der Standardkurve, auf der die Ct- Werte (diejenigen Zyklen in denen die Intensität des fluoreszierenden Signals den Schwellenwert überschreitet) gegen die Menge Namalwa-DNA aufgetragen ist, wurden bei jedem PCR-Lauf 7 Namalwa-Standards unterschiedlichen DNA-Gehalts (3 pg, 12 pg, 48 pg, 192 pg, 1536 pg, 6141 pg und 98300 pg) in Doppelbestimmung mitgeführt. Hierdurch wurde ermöglicht, anhand der Ct-Werte der Proben die Anzahl der enthaltenen EBV-Genom-Kopien abzulesen (siehe Abbildung 2.).

Die durch die Standardkurve den einzelnen Ct- Werten zugeordneten Werte (wurden von der Software berechnet) entsprachen pg Namalwa DNA. Um auf die Anzahl der enthaltenen EBV-Genomkopien zu schließen, musste nun der abgelesene Wert durch 3,3 dividiert werden (1 EBV-Genomkopie/3,3 pg Namalwa DNA).

Da 10 µl PBMC-DNA in der Konzentration von 50 µg/ml (= 500 ng) eingesetzt wurden, wurden durch die Division durch 3,3 die EBV-Genomkopien/500 ng berechnet. Dieses Ergebnis mit 2 multipliziert, ergab das Ergebnis in der gewünschten Einheit: EBV-Genomkopien/µg.

Auch zur Berechnung der Anzahl der EBV-Genomkopien im Plasma war es erforderlich, den durch Ablesen auf der Standardkurve erhaltenen Wert durch 3,3 zu dividieren, um pg Namalwa-DNA in EBV-Genomkopien umzurechnen. Da das Plasma bei der DNA-Isolierung um den Faktor 5 aufkonzentriert wurde, ergaben sich so EBV-Genomkopien/50 µl (bei Einsatz von 10 µl), was mit dem Faktor zwei multipliziert zu dem Ergebnis in der gewünschten Einheit von EBV-Genomkopien/100 µl führte.

### Interleukin 10 (IL 10)-Konzentrationsbestimmung im Plasma

Die IL 10-Konzentration in Patientenplasmaproben wurde mit Hilfe eines ELISAs den Angaben des Herstellers entsprechend bestimmt. Es fand eine Doppelbestimmung statt. Sowohl humanes als auch virales IL 10 flossen in die Messung ein.

### Statistische Analyse

Für den statistischen Vergleich der Viruslast verschiedener Patientengruppen wurde der Mann-Whitney U test verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert von  $< 0,05$  betrachtet. Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des Spearman-Rank-Tests durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe von SPSS 8.0 für Windows (SPSS Inc. Richmond, CA) .

## **III Ergebnisse**

### **III.1 Serologie**

Bei Betrachtung der Ergebnisse der EBV–Antikörperbestimmung im Plasma mittels ELISA (wie in Abschnitt II.2c beschrieben) im Kontext mit den vorausgegangenen Routinelaboruntersuchungen ergab sich folgende Verteilung der 96 nierentransplantierten Patienten auf die in Abschnitt II.2c definierten Gruppen:

3 Patienten waren EBV seronegativ, 9 Patienten hatten eine primäre Infektion, bei 64 Patienten war eine zurückliegende Infektion ohne Hinweis auf ein akutes Geschehen nachzuweisen. Die übrigen 20 Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Stadium der Reaktivierung einer früheren EBV-Infektion.

Aus der Kontrollgruppe der 20 gesunden Kinder und Jugendlichen waren bei 10 keine Antikörper gegen EBV nachweisbar, sie waren somit EBV-seronegativ. Die übrigen 10 zeigten das serologische Bild einer abgelaufenen Infektion ohne derzeitige Virusaktivität.

### **III.2 Vergleich zwischen Bam-HI-W-PCR-Ansatz und EBNA 1 (Bam-HI-K) PCR-Ansatz)**

Bei vergleichender Betrachtung der mittels Bam-HI-W-PCR-Ansatz einerseits und unter Verwendung des Bam-HI-K-Ansatzes auf der anderen Seite ermittelten EB-Viruslasten ergaben sich durch Anwendung des Spearman-Rank-Tests folgende Korrelationskoeffizienten:

- Für Namalwa-DNA unterschiedlicher Konzentration ließ sich ein Korrelationskoeffizient von 99,8% ermitteln.
- Ein Korrelationskoeffizient von 87,5 % lag beim Vergleich der Viruslasten vor, die unter Verwendung der beiden Assays in den PBMCs der 96 nierentransplantierten Kinder bestimmt worden waren (graphische Darstellung siehe Abbildung 5).
- Die im Plasma derselben Patientengruppe ermittelten Messwerte korrelierten miteinander mit einem Koeffizient von 80,1%.

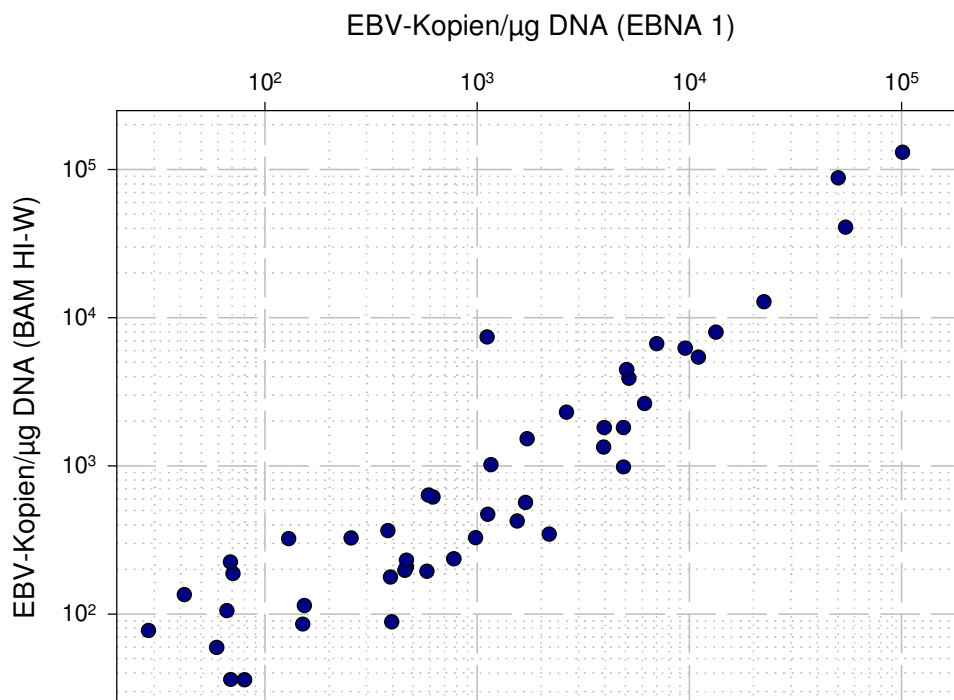


Abbildung 5. Verteilung der Messergebnisse der Anzahl der EBV- Kopien bestimmt mittels EBNA1 gegen BAM HI-W in PBMC der nierentransplantierten Patienten

### III.3 Vergleich der Messergebnisse in Plasma und PBMCs

Wurden die 96 Proben der Transplantierten nach der Viruslast in den PBMCs einerseits und der im Plasma andererseits geordnet und anschließend ein Vergleich gezogen, wie häufig den einzelnen Proben ein übereinstimmender Rang in beiden Listen zugeordnet wurde, so wie es der von uns verwendete Spearman-Rank-Test vorsieht, erhielt man für den Bam HI-W-Ansatz eine Übereinstimmung von 65,9 % (für eine vergleichende Darstellung nach Patientengruppen siehe Abbildung 6). Für den EBNA 1-Ansatz ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 69,7 % zwischen den PBMC - und den Plasma - Ergebnissen.

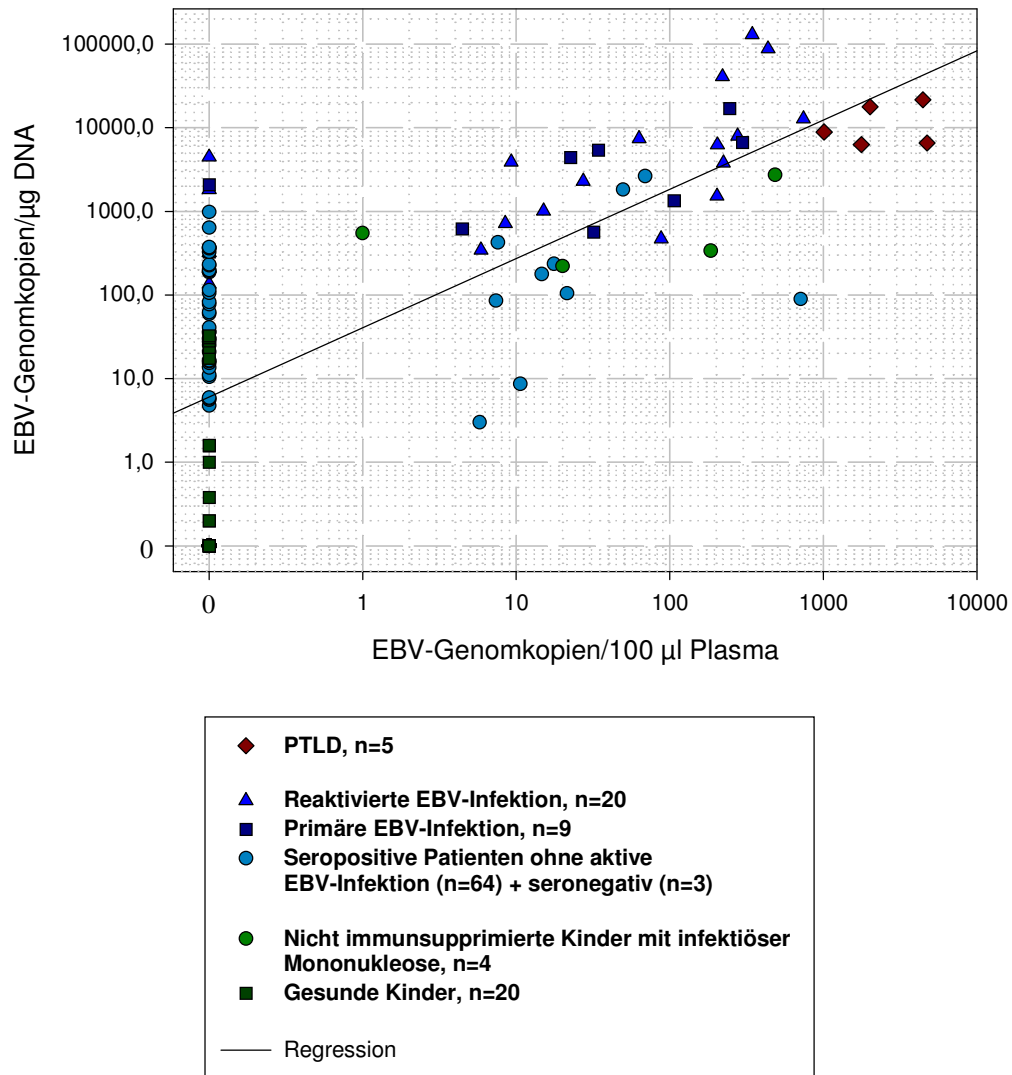


Abbildung 6. EBV-Genomkopien im Vergleich Plasma zu PBMC

#### III.4 EBV-Last bei klinisch unauffälligen nierentransplantierten Kindern

In Anbetracht der starken Korrelation zwischen den Ergebnissen von Bam HI-K und Bam HI-W-Ansatz wurden die weiteren Berechnungen nur noch für die Ergebnisse des Bam HI-W-Ansatzes dargelegt.

In der Gruppe der 96 nierentransplantierten Kinder und Jugendlichen lag die EBV-DNA-Konzentration in den PBMCs zwischen 0 und 129964 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA, im Median bei 104,5 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA. Der Gehalt an EBV-Genomkopien in 100  $\mu$ l Plasma schwankte bei diesen Patienten zwischen 0 und 740 Kopien. Der Median betrug 0 EBV-Genomkopien/100  $\mu$ l Plasma.

Die höchsten Viruslasten waren mit bis zu 129964 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA und bis zu 740 EBV-Genomkopien/100  $\mu$ l Plasma bei den Patienten nachzuweisen, die auf Grund der serologischen Daten und der Vorbefunde in die Gruppe mit endogener Reaktivierung der EBV-Infektion eingeordnet waren.

Mit bis zu 16979 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA und bis 595 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma ebenfalls hohe EBV – Konzentrationen wurden bei den Kindern gefunden, die nach den serologischen Daten eine Erstinfektion durchmachten (n = 9).

In beiden Gruppen waren in den PBMCs aller Patienten - mit wenigstens 135 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA bei endogener Reaktivierung und wenigstens 326 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA bei primärer Serokonversion Epstein–Barr-Viren detektierbar. Dahingegen konnten im Plasma von 2 Patienten mit Erstinfektion und von 5 Patienten mit Infektionsreaktivierung keine EB-Viren nachgewiesen werden.

Deutlich geringere EBV-DNA-Konzentrationen (mit im Median 25 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA und im Median 0 EBV-Genomkopien/100 $\mu$ l Plasma) fanden sich bei denjenigen mit stattgehabter Serokonversion ohne Anzeichen der aktuellen Virusaktivität (n = 9).

Bei den drei nach serologischen Daten und Vorbefunden EBV negativen Patienten war weder im Plasma noch in den mononukleären Blutzellen Virus-DNA nachweisbar. (Graphische Gegenüberstellung der einzelnen Patientengruppen der EBV- Konzentrationen in PBMCs siehe Abbildung 7, im Plasma siehe Abbildung 8)

#### III.5 Vergleich der Viruslasten in PBMCs zwischen Kindern nach Nierentransplantation und gesunden Kindern der Kontrollgruppe

Die Viruslast in PBMCs lag bei den immunsupprimierten Kindern ohne serologische Anzeichen für aktuelle Infektion - seronegativ oder nach stattgehabter Serokonversion - (n=67, Spannweite

0 - 2626, Median 20 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA) signifikant ( $p = 0,14$ ) oberhalb der bei gesunden Kontrollen ( $n=20$ ) festgestellten.

Dieser Unterschied trat bei der Gegenüberstellung der Messwerte der gesunden Kontrollgruppe ( $n=20$ , Spannweite 0 – 32 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA Median: 1 EBV-Genomkopie/ $\mu$ g PBMC-DNA) mit denen aller 96 Kinder nach Nierentransplantation ohne klinische Infektzeichen ( $n=96$ , Spannweite 0 – 129964 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA, Median: 104,5) noch deutlicher hervor ( $p < 0,001$ ).

#### III.6 Vergleich der Anzahl der EBV- Genomkopien bei klinisch unauffälligen Kindern unter Immunsuppression mit der bei an PTLD erkrankten Patienten

Wiederum signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Anzahlen von EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA als bei den 96 klinisch gesunden immunsupprimierten Kinder ergaben sich für die 9 PTLD-Patienten mit einer medianen Viruslast von 19588 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC DNA. (Spannweite 6255 – 171798 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA). Somit lagen die Anzahl der EBV-Genomkopien aller Kinder mit PTLD vor Behandlungsbeginn über einem Grenzwert von 5000 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA, wohingegen - bis auf 3 primär mit EBV-infizierte und 7 Kinder mit reaktiver Infektion - alle immunsupprimierten Kinder Werte unterhalb dieser Grenze aufwiesen (Graphischer Überblick siehe Abbildung 7).

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass eine Epstein-Barr-Viruslastmessung in mononukleären Zellen des peripheren Blutes mittels TaqMan PCR mit einer Sensitivität von 1 eine PTLD ermittelt und diese mit einer Spezifität von 0,896 von klinisch gesunden Immunsupprimierten unterscheidet (positiver Vorhersagewert: 0,565; negativer Vorhersagewert: 1)



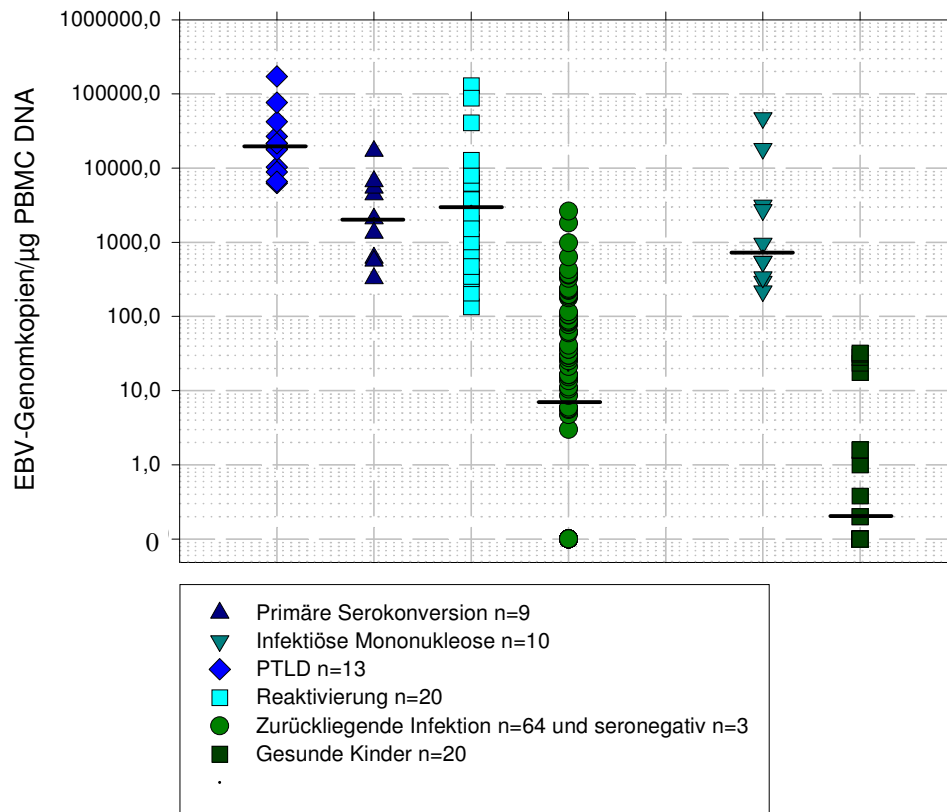


Abbildung 7. Verteilung der EBV-Konzentrationen der PBMCs in den unterschiedlichen Patientengruppen

#### III.7 EBV-Konzentration im Plasma von Kindern nach Transplantation verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe

Auch bei der Bestimmung der Anzahl der EBV-Genomkopien/100 µl Plasma wurden für die 96 nierentransplantierten Kinder signifikant ( $p = 0,005$ ) höhere Werte (Spannweite: 0 – 740 EBV-Genomkopien/100 µl Plasma) ermittelt als in der gesunden Kontrollgruppe, innerhalb der keine EBV-Genome im Plasma nachweisbar waren (siehe auch Abbildung 8).

#### III.8 Vergleich der Viruslast im Plasma von Kindern nach Nierentransplantation und PTLD- Patienten

Die höchsten EBV-DNA-Konzentrationen wurden im Plasma - ebenso wie in den mononukleären Zellen - bei Kindern mit PTLD gefunden. In dieser Gruppe wiesen alle Patienten vor Therapiebeginn Viruskonzentrationen von über 1000 EBV-Genomkopien/100 µl Plasma (Median: 3226 EBV-Genomkopien/100 µl Plasma, Spannweite: 1012 – 4747 EBV-Genomkopien/100 µl Plasma) auf (graphische Übersicht Abb. 8). Somit hoben sie sich deutlich mit einer Signifikanz vom  $p < 0,001$  von den 96 klinisch gesunden Immunsupprimierten (Median 0 EBV-Genomkopien/100 µl Plasma, Spannweite 0 – 740 EBV-Genomkopien/100 µl Plasma) .

Da bei keinem der von uns untersuchten Kinder und Jugendlichen, die nicht an einer PTLD erkrankt waren, eine EB-Viruslast oberhalb eines Wertes von 1000 EBV-Genomkopien/100 µl gemessen wurde, ergab sich für die Nachweisbarkeit einer PTLD durch dieses Verfahren eine Spezifität von 1,00. Auch die Sensitivität, der positive und der negative Vorhersagewert dieses Verfahrens betragen 1,00.

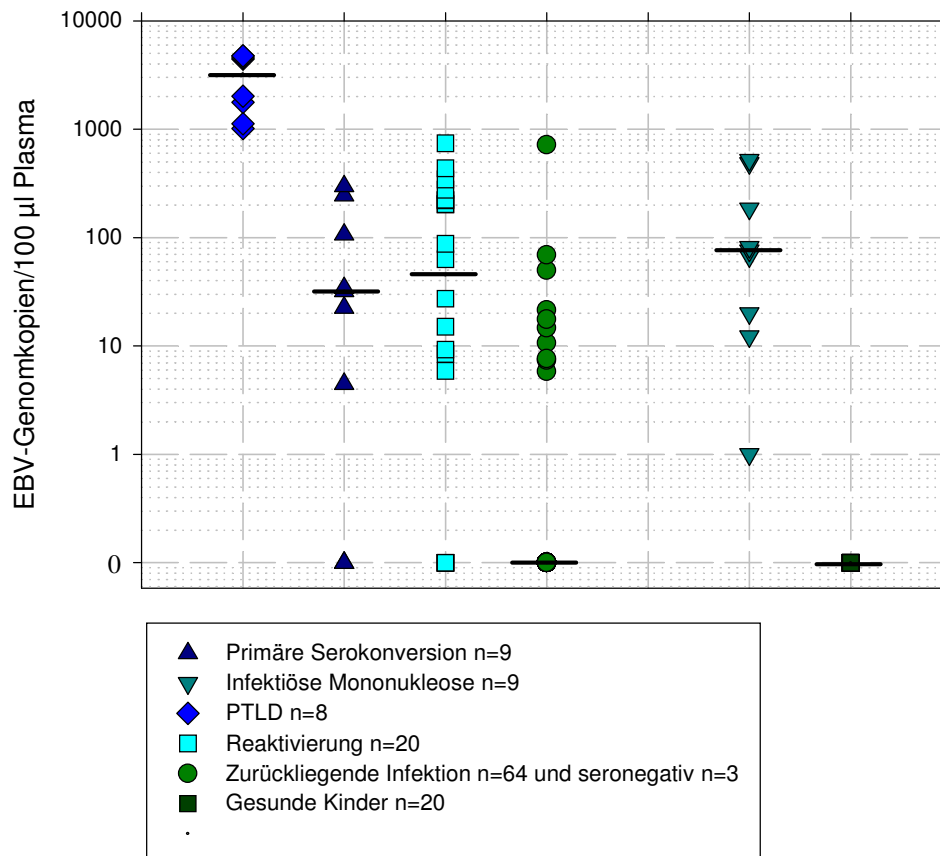


Abbildung 8. Verteilung der EBV-Konzentration im Plasma verschiedener Patientengruppen

### III.9 Verlaufskontrollen der Viruslast bei PTLD-Patienten

Nachdem zum Zeitpunkt der Diagnosestellung alle PTLD-Patienten Messergebnisse von über 5000 EBV-Genomkopien/ $\mu\text{g}$  PBMC-DNA und über 1000 EBV-Genomkopien/100  $\mu\text{l}$  Plasma aufgewiesen hatten, fielen die Werte derjenigen Patienten, bei denen Verlaufskontrollen (in PBMCs bei 5 Patienten, im Plasma bei 4 Patienten) durchgeführt werden konnten, während der Remission der Lymphoproliferation innerhalb von 7 Wochen in PBMC, innerhalb von 5 Wochen im Plasma auf Viruskonzentrationen, die den Messungen bei den Patienten nach Nierentransplantation ohne aktive Infektion vergleichbar waren (Darstellung der einzelnen Verläufe der Viruslast in PBMCs Abbildung 9, im Plasma Abbildung 10). Die Maßnahmen, die zum Erreichen dieser Remission ergriffen wurden, unterschieden sich. Entweder wurde eine alleinige Reduktion der immunsuppressiven Therapie oder eine zusätzliche Gabe von Aciclovir bzw. Gancyclovir durchgeführt. Auch für die Viruslast im Plasma war unter diesen Maßnahmen ein deutlicher Abfall im Median um den Faktor 1215 (Spannweite: Reduktion um den Faktor 21 – 4040) zu detektieren; in PBMCs gemessen sank die Viruslast im Median um den Faktor 35 (Spannweite: Reduktion um den Faktor 6,5 – 103).

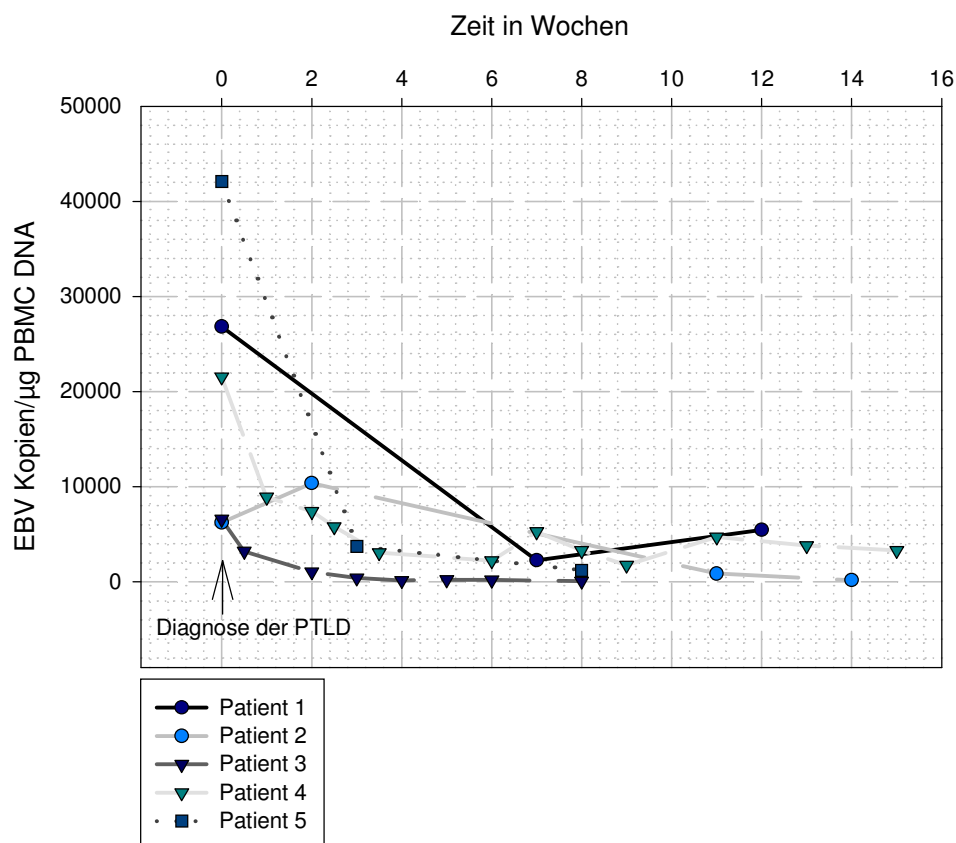


Abbildung 9. Verlauf der PBMC-Viruslast bei Patienten mit PTLD

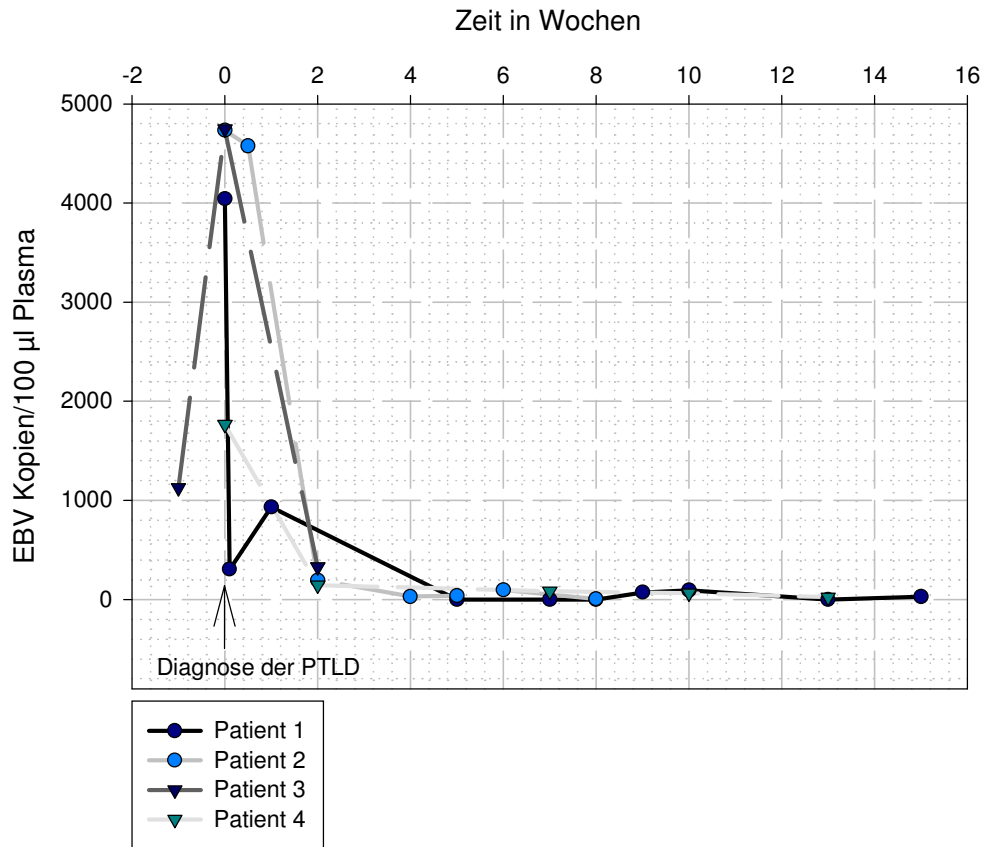


Abbildung 10. Verlauf der Plasmaviruslast bei Patienten mit PTLD

### III.10 Auswirkung möglicher Einflussfaktoren auf die Anzahl der EBV-Genomkopien bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie

#### a) Alter:

Beim Vergleich der Anzahl der EBV-Genomkopien/100 µg PBMC DNA in den Proben der 28 Kinder (< 12 Jahre) mit der bei den 68 Jugendlichen(=> 12 Jahre) gemessenen innerhalb der Gruppe der 96 klinisch unauffälligen Nierentransplantierten fiel in PBMCs der Kinder eine signifikant höhere Viruslast ( $p = 0,02$ ) als bei den Jugendlichen auf. Auch im Plasma zeigte sich diese Tendenz, der Unterschied war jedoch mit  $p = 0,05$  nicht signifikant.

b) Zeit nach Transplantation:

Weder bei den in den PBMCs noch bei den im Plasma ermittelten EBV-Konzentrationen zeigten sich Unterschiede zwischen den 34 Langzeittransplantierten ( $t \geq 5$  Jahre) und den 48 Patienten, die vor weniger als 5 Jahren eine Niere transplantiert bekamen ( $p = 0,51$  bei Betrachtung im Plasma,  $p = 0,32$  im Fall von PBMCs). Auch beim Vergleich der Ergebnisse der 16 Patienten, bei denen die Transplantation maximal ein Jahr zurücklag, mit den 66 Patienten, deren Transplantation zum Zeitpunkt der Blutentnahme länger als 1 Jahr zurücklag, ergaben sich weder im Plasma ( $p=0,381$ ) noch in PBMCs ( $p=0,0837$ ) signifikante Unterschiede.

c) Anzahl der Transplantationen:

Ebenso wenig Einfluss auf die Anzahl der EBV-Genomkopien in Plasma und PBMCs schien die Tatsache zu haben, ob dem Patienten zum ersten oder zum wiederholten Mal eine Niere transplantiert wurde. Die 14 Patienten nach wiederholten Transplantationen wiesen keine wesentlich von den 68 Patienten nach erstmaliger Transplantation abweichenden Viruslasten auf (Plasma:  $p=0,28$ , PBMCs:  $p=0,08$ ).

d) Art der Immunsuppression:

In den PBMC- Proben der mit Tacrolimus (FK506) behandelten 18 Patienten waren, verglichen mit den Messergebnissen bei Cyclosporin A-Behandlung (65 Patienten), signifikant niedrigere Virus-DNA-Konzentrationen zu detektieren ( $p=0,013$ ). Bei Betrachtung der Viruslast im Plasma fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede, wenn auch die gleiche Tendenz – höhere Viruslasten unter Cyclosporin A-Behandlung – erkennbar war.

Dahingegen ergaben sich keine sichtbaren Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der EBV-Genomkopien zwischen mit zweifach (Tacrolimus (FK 506) / Cyclosporin A + Decortin) und mit dreifach Kombination (Tacrolimus (FK 506) / Cyclosporin A + Decortin + Azathioprin / Mycophenolatmofetil) behandelten Patienten (Plasma  $p=0,116$ , PBMC:  $p=0,209$ ). Erhalten Patienten Mycophenolatmofetil zusätzlich zu Tacrolimus bzw. Cyclosporin A und eventuell Decortin (19 Kinder), waren bei diesen in PBMCs signifikant niedrigere Viruslasten nachweisbar als bei Patienten (23 Kinder), die zusätzlich mit Azathioprin behandelt wurden ( $p=0,019$ ). Auch bei Patienten (41 Patienten) ohne über Tacrolimus bzw. Cyclosporin A und z.T. Decortin hinausgehende immunsuppressive Therapie sind erkennbar höhere Virus-DNA-Konzentrationen nachweisbar als bei Patienten die Mycophenolatmofetil erhielten ( $p=0,014$ ). Der signifikante Unterschied zwischen der Anzahl von EBV-Genomkopien bei Patienten mit zusätzlicher Mycophenolatmofetiltherapie und der bei Patienten ohne Zusatztherapie ist auch

aus den Plasmawerten ersichtlich ( $p=0,036$ ), während die Messwerte im Plasma von Patienten unter Mycophenolatmofetil- Zusatztherapie nicht wesentlich von denen von Patienten unter Azathioprin- Zusatztherapie abweichen ( $p=0,178$ ). Zwischen den Viruslasten bei Kindern mit Azathioprin- Zusatztherapie und den bei Patienten ohne zusätzliche immunsuppressive Therapie bestand weder im Plasma ( $p=0,431$ ) noch in PBMCs ( $p=0,7$ ) eine erkennbare Differenz.

### III.11 IL-10–Messung

Unter den für diesen Ansatz aufgrund der hohen Fragilität des IL-10 schlechten Bedingungen von ca. 24 Stunden Transportzeit, zeigte sich keine Korrelation zwischen der Höhe der gemessenen Werte an humanem und viralem IL-10 und der EBV-Genomzahl im Plasma (Korrelationskoeffizient 3,5 %) und PBMCs (Korrelationskoeffizient: - 0,6 %) (graphische Gegenüberstellung siehe Abbildung 11). Ebenso wenig gab es einen erkennbaren Zusammenhang zwischen der Höhe der IL-10-Werte und dem serologischen Status (Korrelationskoeffizient: 17 %).

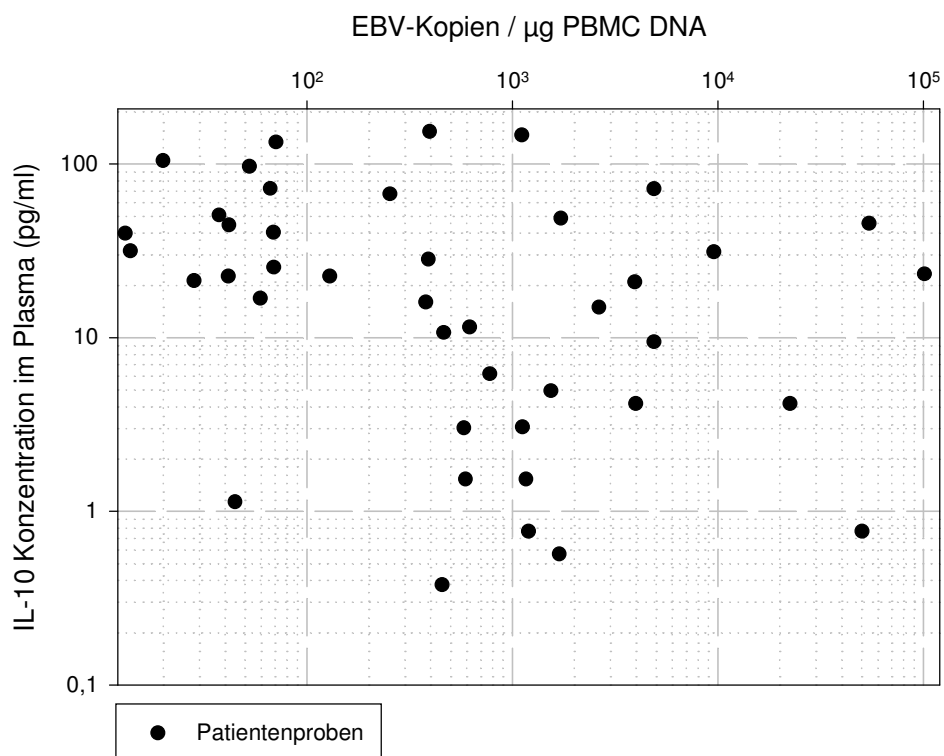


Abbildung 11. Verhältnis zwischen IL 10 - Konzentration und EBV - Konzentration in PBMCs

## **IV Diskussion**

Anhand der von uns ermittelten und im Abschnitt III Ergebnisse geschilderten Daten zeigt sich (20;55;58;91;95;147) eine gute Eignung der Epstein-Barr-Viruslastbestimmung mittels PCR als Parameter zur Risikoeinschätzung bei der PTLD-Entstehung bestätigen.

Hierbei erwiesen sich sowohl der Bam-HI-W- als auch der EBNA 1-Ansatz mit hoher Korrelation sowohl der Messergebnisse im Plasma (80,1%) als auch in den PBMCs (87,5%) nierentransplantierte Kinder und Jugendlicher als geeignete Methoden (III.2). Bei Bestimmung der beiden Regionen in der Namalwa-Zelllinie lag der Korrelationskoeffizient bei 99,8% (156).

Der Vorteil des EBNA 1-Ansatzes liegt in der größeren Zahl der bei einem Durchlauf zu messenden Proben (II.2f) sowie in dem singulären Vorkommen innerhalb des EBV-Genoms. In der praktischen Anwendung stellte sich jedoch das komplexere System der Duplex-PCR als störepfindlicher dar, so dass bei technischen Schwierigkeiten Messungen wiederholt werden mussten.

Im Gegensatz zu Angaben, die die Bam HI-W-Region zur quantitativen Bestimmung von EBV-Genomkopien für ungeeignet halten (76), da es sich um eine repetitive Sequenz handelt, wies die hier ermittelte hohe Korrelation zusammen mit der - aufgrund der hohen Konstanz der Region in unterschiedlichen EBV-Stämmen zu erwartenden - geringen Rate falsch negativer Ergebnisse auf eine gute Eignung des Bam HI-W- Ansatzes hin. Diese unerwartet hohe Korrelation zwischen den Messwerten unter Verwendung der repetitiven Bam HI-W-Region und der singulären EBNA 1-Region lässt eine konstantere Anzahl der Bam HI-W-Wiederholungen in Wildtypviren vermuten als die bei Laborstämmen beobachtete Varianz.

Ebenfalls eine deutliche Korrelation war zwischen der in PBMCs und in Plasma ermittelten Anzahlen von EBV- Genomkopien mit 65,9% erkennbar (III.3). Bei ausschließlicher Betrachtung von Proben mit Nachweis von EBV-Genomkopien im Plasma (Anzahl der EBV-Genomkopien im Plasma >0) ließ sich ein mit 72,0% noch höherer Korrelationskoeffizient ermitteln. Dies spricht für eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Probenmaterialien besonders im Bereich der hohen Viruslasten, die bei einer PTLD zu erwarten sind.

Jedoch war eine Differenzierung mittels des ausschließlich qualitativen Nachweises des Vorhandenseins von EBV-DNA im Plasma (8;49) zwischen einer PTLD und anderen Erkrankungen mit ähnlichem klinischen Bild nicht sicher möglich, da auch bei immunsupprimierten Patienten ohne PTLD Virus-DNA im Plasma nachweisbar war (III.4).

Die quantitative PCR unter Verwendung der TaqMan- Technologie ermöglichte hingegen mit hoher Sensitivität und Spezifität eine Differenzierung zwischen an PTLD Erkrankten und



Kindern nach Nierentransplantation ohne klinische Auffälligkeiten durch Bestimmung der EBV-Konzentration in Plasma und PBMCs.

In den 13 PBMC-Proben, die den 9 untersuchten PTLD-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung entnommen worden waren, lag die EBV-Genomkonzentration bei allen Patienten über dem empirisch festgelegten Grenzwert von 5000 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA.

Da keiner der PTLD-Patienten vor Therapiebeginn diesen Grenzwert unterschritt, ergaben sich für die Detektion einer PTLD mittels quantitativer EB-Viruslastbestimmung in PBMCs sowohl eine Sensitivität als auch ein negativer Vorhersagewert von 1,0.

Der positive Vorhersagewert war mit 56,5% ebenso wie auch die Spezivität mit 0,89 geringer, da auch in den PBMC-Proben von drei Patienten mit primärer EBV-Infektion und von sieben Patienten mit Reaktivierung der EBV-Infektion nach abgelaufener Serokonversion Epstein-Barr-Viruskonzentrationen oberhalb des Grenzwertes von 5000 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA gemessen wurden.

Im auf die Blutentnahme folgenden Jahr entwickelte keines der zehn transplantierten Kinder mit einer Viruslast in den PBMCs oberhalb des Grenzwertes die Symptome einer PTLD. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine wirksamere EBV-spezifische T-Zell-Kontrolle bei diesen Patienten, die einer weiteren Proliferation immortalisierter B-Zellen entgegenwirkte.

Eine Verlaufskontrolle der EBV-Last bei diesen Patienten war leider nicht möglich, sodass unklar bleibt, ob bei ihnen eine dauerhaft hohe Virusaktivität oder ein akutes Geschehen vorlag. Auffällig ist zudem, dass sich im Plasma dieser zehn Patienten keine erhöhte EBV-DNA-Menge fand.

In den Plasmaproben war die EBV-DNA-Konzentration ausschließlich bei Kindern mit nachgewiesener PTLD auf einen Wert oberhalb des empirisch festgelegten Grenzwertes von 1000 EBV Genomkopien/100  $\mu$ l Plasma erhöht. Mit im Höchstfall 740 EBV-Kopien/100  $\mu$ l Plasma bei einem nierentransplantierten Kind mit Reaktivierung einer vorbestehenden EBV-Infektion erwiesen sich die Epstein-Barr-Viruslasten in den übrigen Gruppen als deutlich geringer. Bei keinem der 20 Kinder in der gesunden Kontrollgruppe war EBV-DNA im Plasma nachzuweisen (ebenso bei (76;83;148;159)).

Folglich ermöglichte eine EBV-Genomzahl-Bestimmung im Plasma die Differenzierung einer PTLD mit einer Spezifität und einem positiven Vorhersagewert von 1,0.

Da die bei PTLD Patienten vor Therapiebeginn gemessenen Viruskonzentrationen in allen Fällen oberhalb des Grenzwertes lagen, ergaben sich auch eine Sensitivität und ein negativer Vorhersagewert von 1,0.

Somit spricht die hohe Sensitivität und v.a. die hohe Spezifität sowie die weniger aufwendige Probenverarbeitung (u.a. der Wegfall der für die Gewinnung der PBMCs notwendigen Dichtezentrifugation) für die Eignung von Plasma als Probenmaterial.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen die generelle Eignung der EBV-Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer (5;6;55;55;56;76;81;86;100;105;105;111;119;125;126;138;160;161) bzw. semiquantitativer PCR (73;94;94;105;124;132;134;135;154) zur Risikoabschätzung einer PTLD Entwicklung. Die bei Betrachtung der Literatur auffallenden großen Unterschiede zwischen den in den einzelnen Studien gemessenen EBV-DNA-Konzentrationen, das Fehlen eines in mehreren Studien nachvollziehbaren Grenzwertes, ab dem das Vorliegen einer PTLD wahrscheinlich wird, und unterschiedliche Angaben zu Sensitivität und Spezifität sind vermutlich zumindest teilweise auf folgende Faktoren zurückzuführen:

- verschiedene angewandte Techniken: quantitative (5;6;76;86;100;119) versus quantitativ-kompetitive (55;55;56;81;111;138;161) bzw. semiquantitative PCR, die keine absoluten mit anderen Ansätzen vergleichbaren Ergebnisse liefert
- Unterschiede bezüglich des verwendeten Probenmaterials: Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) (13;22;55;56;71;73;94;153), PBMCs (6;76;100;105;161), Vollblut (5;6;55;55;56;76;81;99;100;105;111;119;125;126;134;138;146;160;161), Plasma (49;85;90;119;159) sowie Serum (90;146)
- stark variierende Gruppengrößen mit häufig kleinen Fallzahlen
- Gruppen nach Transplantation unterschiedlicher Organe: Leber (8;13;56;81;99;100;142;153), Niere (22;86;105) bzw. Dünndarm (55;55)
- Unterschiedliche untersuchte Altersgruppen: Kinder (22) versus Erwachsene (1;13;56;99;153)
- Verschiedenes Vorgehen bei der Probenvorbereitung
- Unterschiedliche für den Nachweis verwendete Regionen des EBV-Genoms : z.B. Bam HI-W (49;73;159), EBNA 1 (132), EBER 1 (90;125)
- Verschiedene Fragestellungen: z.T. Querschnittsstudien, z.T. Verlaufs-beobachtungen bzw. Mischformen

Die von uns verwendete Technik der RQ-PCR (TaqMan-Technologie) zeichnet sich hierbei als ein sehr sensitives Verfahren aus, das schnell und mit großer Stabilität und Genauigkeit durchführbar ist.

Vorteile im Vergleich zu konventioneller PCR bietet die RQ-PCR-Technik durch den Wegfall üblicherweise notwendiger Arbeitsschritte. So spart die bei der DNA-Amplifizierung

stattfindende Messung des abgegebenen Fluoreszenzsignals mit anschließendem Ablesen der EBV-Genomkonzentration auf der Standardkurve die Quantifizierung durch Gelelektrophorese ein.

Die von uns durchgeführte statistische Betrachtung möglicher Einflussfaktoren auf die Höhe der EBV- Konzentration ergab zwar teilweise signifikante Unterschiede, jedoch sind die unter III.10 dargestellten Ergebnisse aufgrund der stark variierenden Gruppengrößen und der - besonders die immunsuppressive Therapie betreffend – teilweise sehr kleinen Gruppen vermutlich eher als Tendenzen zu verstehen.

Im Gegensatz zu dem in der Literatur (162) beschriebenen häufigen Auftreten lymphoproliferativer Erkrankungen post transplantationem unter Tacrolimus (FK 506) - Therapie, lagen die Viruslasten der mit Tacrolimus behandelten Patienten unterhalb derer unter Cyclosporintherapie.

Dieser Unterschied lässt sich einerseits auf die deutlich größere Gruppe der mit Cyclosporin behandelten Patienten sowie andererseits auf die - bei den von uns untersuchten Patienten - erfolgte Kombination der beiden Präparate mit anderen Medikamenten und auf die unterschiedlichen verabreichten Dosierungen zurückführen.

Der in der Literatur beschriebene protektive Effekt von Mycophenolatmofetil (11;28) konnte durch die signifikant niedrigen Viruslasten bei Patienten unter Mycophenolatmofetil bestätigt werden.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur wiesen die unter zwölfjährigen Kinder wesentlich höhere EBV-Lasten auf als die älteren Jugendlichen.

Interessant wäre weiterhin zu wissen, ob die Höhe der EBV-Genomkonzentration davon abhängig ist, welches Organ transplantiert wurde. Dies gilt besonders, da alle Kinder und Jugendlichen in der von uns untersuchten Gruppe der Transplantierten nierentransplantiert sind, wohingegen die PTLD- Patienten unterschiedliche Organe transplantiert bekommen hatten.

Die mit 17% auffallend geringe Korrelation zwischen den von uns bestimmten Konzentrationen von IL-10 und EBV- Genomkopien - trotz der in der Literatur (12) beschriebenen hohen Assoziation hoher IL 10-Werte mit dem Auftreten von PTLDs - ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die für dieses Verfahren sehr ungünstigen Versuchsbedingungen zurückzuführen. Dies lässt vermuten, dass eine Messung des sehr fragilen IL 10 nach einer Transportdauer von etwa 24h nicht mehr verwertbar ist.

Diese hohe Empfindlichkeit bedeutet Einschränkungen bzw. einen großen Aufwand für die praktische Nutzbarkeit dieses Verfahrens.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach den hier dargestellten Ergebnissen die Bestimmung der Epstein-Barr Virusgenomzahl mittels quantitativer PCR wichtige Hinweise auf das mögliche Vorliegen einer PTLD geben kann.

Das Vorgehen ist nicht invasiv und somit schonend für die ohnehin häufig hospitalisierten Patienten. Wünschenswert wäre, wenn die durch den Verdacht auf eine PTLD notwendigen Organpunktionen und die damit verbundenen Risiken durch vorherige Feststellung der EBV-Konzentration auf ein unvermeidbares Minimum reduziert werden könnten und eine frühzeitige Diagnosestellung die Heilungsaussichten bei PTLD verbesserter(155). Da auch EBV- negative PTLDs beschrieben werden (3;115;150), kann jedoch die EBV- Genomzahl sicher nicht als alleinstehendes Kriterium für die Diagnose einer PTLD verwendet werden und ist immer in Kombination mit dem klinischen Bild zu werten.

Zusätzlich ist die Entwicklung der Viruslast über einen längeren Zeitraum bisher nur an sehr kleinen Patientengruppen beschrieben. So wäre z.B. interessant zu wissen, ob und wie lange vor dem klinischen Ausbruch einer PTLD hohe EBV-DNA-Konzentrationen in den PBMCs und/oder dem Plasma des betroffenen Patienten nachzuweisen sind.

Ebenso ist unklar, bei einem wie großen Abfall der Viruslast nach erfolgreicher Therapie einer PTLD es möglich ist, die immunsuppressive Therapie wieder zu steigern, um einer möglichen Abstoßungsreaktion vorzubeugen ohne ein sofortiges Wiederauftreten der PTLD zu provozieren.

Auch wäre es interessant, mehr über den Langzeitverlauf der EBV-Last nach abgelaufener PTLD zu wissen. So beobachteten wir bei einem über ein Jahr beobachteten PTLD-Patienten etwa sechs Monate nach Diagnosestellung einen erneuten erheblichen Viruslastanstieg ohne das Wiederauftreten von Krankheitszeichen.

Ähnliche „Rebound“-Phänomene, allerdings mit nach durchschnittlich 3,5 Monaten etwas früher, werden auch in der Literatur beschrieben (56;126). Es bleibt folglich unklar, inwieweit die EB-Viruslast als zuverlässiger Parameter zur Beobachtung von PTLD-Patienten in Remission zu verwerthen ist (158). Somit wäre eine Standardisierung der Meßmethoden, einheitliche Diagnosekriterien für PTLDs, die übereinstimmende Einteilungen von PTLD- Stadien (114) sowie ein Zusammentragen und weiteres Sammeln von Daten über den Langzeitverlauf (55;57) der EBV-DNA-Konzentration unter immunsuppressiver Therapie wichtig für die Klärung dieser offenen Fragen.

## **V Zusammenfassung**

### V.1 Einleitung

PTLD ist eine EBV-induzierte, potentiell lebensbedrohliche, unkontrollierte Proliferation von Lymphozyten bei immunsupprimierten Patienten, deren frühzeitige diagnostische Abgrenzung bei initial häufig uncharakteristischen Symptomen für das therapeutische Vorgehen entscheidend ist.

Fraglich ist welches das zum EBV-Nachweis am besten geeignete Probenmaterial ist, welches Verfahren zuverlässig, genau und möglichst wenig aufwendig den EBV-Nachweis ermöglicht sowie wie sehr eine hohe EBV-Konzentration mit dem Vorliegen einer PTLD korreliert.

### V.2 Patienten, Material und Methoden

Zur Bestimmung der Anzahl der EBV-Genomkopien in Plasma und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei 96 Kindern und Jugendlichen nach Nierentransplantation, 10 pädiatrischen Patienten mit histologisch gesicherter PTLD, 13 Kindern mit infektiöser Mononukleose sowie bei 20 gesunden Kindern wurden zwei verschiedene Ansätze einer quantitativen Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (RQ-PCR/ TaqMan-PCR) angewandt. Einer dieser Ansätze verwendet die Bam HI-W-Region, der Zweite die EBNA 1-Region zum EBV-Nachweis. Mittels ELISA wurden der Serostatus gegenüber EBV sowie Interleukin 10 (IL 10) bestimmt.

### V.3 Ergebnisse

Mit einem Korrelationskoeffizient von 87,5% bei PBMCs sowie 80,1% bei Bestimmung im Plasma weisen die EBNA 1 bzw. Bam HI-W verwendenden PCR-Ansätze miteinander eine hohe Übereinstimmung auf. Die Ergebnisse in Plasma und PBMCs korrelieren mit einem Koeffizient von 69,7% (Bam HI-W). Die Anzahl der EBV-Genomkopien lag in der Gruppe der Kinder nach Nierentransplantation zwischen 0 und 129964 EBV-Genomkopien/ $\mu$ g PBMC-DNA im Median bei 104,5 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA bzw. zwischen 0 und 740 Kopien/100  $\mu$ l Plasma im Median 0 Kopien/100 $\mu$ l Plasma und war damit signifikant ( $p=0,014$ ) höher als bei gesunden Kindern der Kontrollgruppe. Vor Therapiebeginn wiesen die an PTLD erkrankten Kinder mit 6255 bis 171798 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA im Median 19588 Kopien/ $\mu$ g PBMC-DNA bzw. 1012 bis 4747 Kopien/100  $\mu$ l Plasma im Median 3226 Kopien/100  $\mu$ l Plasma signifikant ( $p<0,001$ ) höhere EBV-Konzentrationen in PBMC und Plasma auf als Kinder nach Nierentransplantation. Mit einer Sensitivität und einer Spezifität von eins ließen sich Kinder mit einer PTLD bezüglich ihrer EBV-Konzentration im Plasma bzw. mit einer Sensitivität von eins und einer Spezifität von

0.896 mittels der EBV-Konzentration in PBMCs abgrenzen. Unter Therapie sank die Anzahl der EBV-Genomkopien im Plasma innerhalb von 5 Wochen im Median um den Faktor 1215, in PBMCs innerhalb von 7 Wochen im Median um den Faktor 35. Zwischen hohen EBV-Konzentrationen im Plasma (Korrelationskoeffizient 3,5%) bzw. in PBMCs (Korrelationskoeffizient -0,6%) und IL 10-Konzentrationen zeigte sich unter für das fragile IL 10 ungünstigen Bedingungen kein Zusammenhang.

### V.4 Diskussion

Die RQ-PCR unter Verwendung beider gewählter Regionen des EBV-Genoms ist eine zuverlässige, mit vertretbarem Aufwand durchführbare Untersuchung, die mit hoher Sensitivität und Spezifität zu einer frühzeitigen Diagnosestellung einer PTLD beitragen kann. Aufgrund der hohen Spezifität und des geringen Arbeitsanfalls bei der Probenverarbeitung erscheint Plasma als Probenmaterial geeignet.

## VI Literatur

1. Allen, U., Hebert, D., Petric, M., Tellier, R., Tran, D., Superina, R., Stephens, D., West, L., Wasfy, S., and Nelson, S. Utility of Semiquantitative Polymerase Chain Reaction for Epstein-Barr Virus to Measure Virus Load in Pediatric Organ Transplant Recipients With and Without Posttransplant Lymphoproliferative Disease. *Clin.Infect.Dis.* 2001;33:145-50.
2. Angel, L. F., Cai, T. H., Sako, E. Y., and Levine, S. M. Posttransplant Lymphoproliferative Disorders in Lung Transplant Recipients: Clinical Experience at a Single Center. *Ann.Transplant.* 2000;5:26-30.
3. Axelrod, D. A., Holmes, R., Thomas, S. E., and Magee, J. C. Limitations of EBV-PCR Monitoring to Detect EBV Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Pediatr.Transplant.* 2003;7:223-7.
4. Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. Epstein-Barr Virus-Infected Resting Memory B Cells, Not Proliferating Lymphoblasts, Accumulate in the Peripheral Blood of Immunosuppressed Patients. *J.Exp.Med.* 1999;190:567-76.
5. Bai, X., Hosler, G., Rogers, B. B., Dawson, D. B., and Scheuermann, R. H. Quantitative Polymerase Chain Reaction for Human Herpesvirus Diagnosis and Measurement of Epstein-Barr Virus Burden in Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Clin.Chem.*1997.Oct. 1943;1843-9.
6. Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Simoncini, L., Sarasini, A., Comoli, P., Maccario, R., Fiocchi, R., and Gerna, G. High Levels of Epstein-Barr Virus DNA in Blood of Solid-Organ Transplant Recipients and Their Value in Predicting Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *J.Clin.Microbiol.*2000.Feb. 1938;613-9.
7. Barker, J. N., Martin, P. L., Coad, J. E., DeFor, T., Trigg, M. E., Kurtzberg, J., Weisdorf, D. J., and Wagner, J. Low Incidence of Epstein-Barr Virus-Associated Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders in 272 Unrelated-Donor Umbilical Cord Blood Transplant Recipients. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2001;7:395-9.
8. Barkholt, L. M., Dahl, H., Enbom, M., and Linde, A. Epstein-Barr Virus DNA in Serum After Liver Transplantation--Surveillance of Viral Activity During Treatment With Different Immunosuppressive Agents. *Transpl.Int.*1996. 1909;439-45.
9. Ben Ari, Z., Amlot, P., Lachmanan, S. R., Tur-Kaspa, R., Rolles, K., and Burroughs, A. K. Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder in Liver Recipients: Characteristics, Management, and Outcome. *Liver Transpl.Surg.* 1999;5:184-91.
10. Benkerrou, M., Jais, J. P., Leblond, V., Durandy, A., Sutton, L., Bordigoni, P., Garnier, J. L., Le Bidois, J., Le Deist, F., Blanche, S., and Fischer, A. Anti-B-Cell Monoclonal Antibody Treatment of Severe Posttransplant B-

---

Lymphoproliferative Disorder: Prognostic Factors and Long-Term Outcome. *Blood* 1998;92:3137-47.

11. Birkeland, S. A., Andersen, H. K., and Hamilton-Dutoit, S. J. Preventing Acute Rejection, Epstein-Barr Virus Infection, and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders After Kidney Transplantation: Use of Aciclovir and Mycophenolate Mofetil in a Steroid-Free Immunosuppressive Protocol. *Transplantation* 1999;67:1209-14.
12. Birkeland, S. A., Bendtzen, K., Moller, B., Hamilton-Dutoit, S., and Andersen, H. K. Interleukin-10 and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder After Kidney Transplantation. *Transplantation* 1999;67:876-81.
13. Bodeus, M., Smets, F., Reding, R., Sokal, E., Otte, J. B., Goubau, P., and Van Renterghem, L. Epstein-Barr Virus Infection in Sixty Pediatric Liver Graft Recipients: Diagnosis of Primary Infection and Virologic Follow-Up. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 1999.Aug. 1918;698-702.
14. Boubenider, S., Hiesse, C., Goupy, C., Kriaa, F., Marchand, S., and Charpentier, B. Incidence and Consequences of Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorders. *J.Nephrol.* 1997;10:136-45.
15. Boudova, L., Fakan, F., Michal, M., Dusek, J., Curik, R., Husek, K., Voska, L., Kolnik, P., Mukensnabl, P., Hes, O., and Jindra, P. [Lymphoproliferative Disease After Transplantation]. *Cesk.Patol.* 2002;38:24-32.
16. Boyle, G. J., Michaels, M. G., Webber, S. A., Knisely, A. S., Kurland, G., Cipriani, L. A., Griffith, B. P., and Fricker, F. J. Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders in Pediatric Thoracic Organ Recipients. *J.Pediatr.* 1997;131:309-13.
17. BURKITT, D. and O'CONNOR, G. T. Malignant Lymphoma in African Children. I. A Clinical Syndrome. *Cancer* 1961;14:258-69.:258-69.
18. BURKITT, D. and WRIGHT, D. H. A LYMPHOMA SYNDROME IN TROPICAL AFRICA WITH A NOTE ON HISTOLOGY, CYTOLOGY, AND HISTOCHEMISTRY. *Int.Rev.Exp.Pathol.* 1963;15:67-138.:67-138.
19. Cacciarelli, T. V., Green, M., Jaffe, R., Mazariegos, G. V., Jain, A., Fung, J. J., and Reyes, J. Management of Posttransplant Lymphoproliferative Disease in Pediatric Liver Transplant Recipients Receiving Primary Tacrolimus (FK506) Therapy. *Transplantation* 1998;66:1047-52.
20. Cacciarelli, T. V., Reyes, J., Mazariegos, G. V., Sigurdsson, L., Rowe, D. T., Fung, J. J., and Green, M. Natural History of Epstein-Barr Viral Load in Peripheral Blood of Pediatric Liver Transplant Recipients During Treatment for Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Transplant.Proc.* 1999.Feb.-Mar. 1931;488-9.
21. Caillard, S., Lachat, V., and Moulin, B. Posttransplant Lymphoproliferative Disorders in Renal Allograft Recipients: Report of 53 Cases of a French Multicenter Study. PTLTD French Working Group. *Transpl.Int.* 2000;13 Suppl 1:S388-S393.



22. Campe, H., Jaeger, G., Abou-Ajram, C., Nitschko, H., Griebel, M., Montoya, C., Klare, B., and Koszinowski, U. Serial Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Sera and Peripheral Blood Leukocyte Samples of Pediatric Renal Allograft Recipients With Persistent Mononucleosis-Like Symptoms Defines Patients at Risk to Develop Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Pediatr. Transplant.* 2003;7:46-52.
23. Cao, S., Cox, K., Esquivel, C. O., Berquist, W., Concepcion, W., Ojogho, O., Monge, H., Krams, S., Martinez, O., and So, S. Posttransplant Lymphoproliferative Disorders and Gastrointestinal Manifestations of Epstein-Barr Virus Infection in Children Following Liver Transplantation. *Transplantation* 1998;66:851-6.
24. Cao, S., Cox, K. L., Berquist, W., Hayashi, M., Concepcion, W., Hammes, G. B., Ojogho, O. K., So, S. K., Frerker, M., Castillo, R. O., Monge, H., and Esquivel, C. O. Long-Term Outcomes in Pediatric Liver Recipients: Comparison Between Cyclosporin A and Tacrolimus. *Pediatr. Transplant.* 1999;3:22-6.
25. Gen, H., Williams, P. A., McWilliams, H. P., Breinig, M. C., Ho, M., and McKnight, J. L. Evidence for Restricted Epstein-Barr Virus Latent Gene Expression and Anti-EBNA Antibody Response in Solid Organ Transplant Recipients With Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Blood* 1993;81:1393-403.
26. Cesarman, E., Chadburn, A., Liu, Y. F., Migliazza, A., Dalla-Favera, R., and Knowles, D. M. BCL-6 Gene Mutations in Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders Predict Response to Therapy and Clinical Outcome. *Blood* 1998;92:2294-302.
27. Chand, D. H., Southerland, S. M., and Cunningham, R. J., III. Tacrolimus: the Good, the Bad, and the Ugly. *Pediatr. Transplant.* 2001;5:32-6.
28. Chardot, C., Nicoluzzi, J. E., Janssen, M., Sokal, E., Lerut, J., Otte, J. B., and Reding, R. Use of Mycophenolate Mofetil As Rescue Therapy After Pediatric Liver Transplantation. *Transplantation* 2001;71:224-9.
29. Cheung, A. and Kieff, E. Long Internal Direct Repeat in Epstein-Barr Virus DNA. *J. Virol.* 1982;44:286-94.
30. Cheung, S. T., Huang, D. P., Hui, A. B., Lo, K. W., Ko, C. W., Tsang, Y. S., Wong, N., Whitney, B. M., and Lee, J. C. Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line (C666-1) Consistently Harboring Epstein-Barr Virus. *Int. J. Cancer* 1999. Sep. 24. 1983;121-6.
31. Claviez, A., Tiemann, M., Wagner, H. J., Dreger, P., and Suttorp, M. Epstein-Barr Virus-Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disease After Bone Marrow Transplantation Mimicking Graft-Versus-Host Disease. *Pediatr. Transplant.* 2000;4:151-5.
32. Cockfield, S. M. Identifying the Patient at Risk for Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Transpl. Infect. Dis.* 2001;3:70-8.
33. Collins, M. H., Montone, K. T., Leahey, A. M., Hodinka, R. L., Salhany, K. E., Kramer, D. L., Deng, C., and Tomaszewski, J. E. Post-Transplant Lymphoproliferative Disease in Children. *Pediatr. Transplant.* 2001;5:250-7.

- 
34. Comoli, P., Labirio, M., Basso, S., Baldanti, F., Grossi, P., Furione, M., Vigano, M., Fiocchi, R., Rossi, G., Ginevri, F., Gridelli, B., Moretta, A., Montagna, D., Locatelli, F., Gerna, G., and Maccario, R. Infusion of Autologous Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Cells for Prevention of EBV-Related Lymphoproliferative Disorder in Solid Organ Transplant Recipients With Evidence of Active Virus Replication. *Blood* 2002;99:2592-8.
  35. Darenkov, I. A., Marcarelli, M. A., Basadonna, G. P., Friedman, A. L., Lorber, K. M., Howe, J. G., Crouch, J., Bia, M. J., Kliger, A. S., and Lorber, M. I. Reduced Incidence of Epstein-Barr Virus-Associated Posttransplant Lymphoproliferative Disorder Using Preemptive Antiviral Therapy. *Transplantation* 1997;64:848-52.
  36. Davis, C. L. The Antiviral Prophylaxis of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Springer Semin.Immunopathol.*1998. 1920;437-53.
  37. Davis, C. L., Harrison, K. L., McVicar, J. P., Forg, P. J., Bronner, M. P., and Marsh, C. L. Antiviral Prophylaxis and the Epstein Barr Virus-Related Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Clin.Transplant.* 1995;9:53-9.
  38. Dockrell, D. H., Strickler, J. G., and Paya, C. V. Epstein-Barr Virus-Induced T Cell Lymphoma in Solid Organ Transplant Recipients. *Clin.Infect.Dis.* 1998;26:180-2.
  39. Dolyniuk, M., Wolff, E., and Kieff, E. Proteins of Epstein-Barr Virus. II. Electrophoretic Analysis of the Polypeptides of the Nucleocapsid and the Glucosamine- and Polysaccharide-Containing Components of Enveloped Virus. *J.Virol.* 1976;18:289-97.
  40. Dror, Y., Greenberg, M., Taylor, G., Superina, R., Hebert, D., West, L., Connolly, B., Sena, L., Allen, U., and Weitzman, S. Lymphoproliferative Disorders After Organ Transplantation in Children. *Transplantation* 1999;67:990-8.
  41. Durandy, A. Anti-B Cell and Anti-Cytokine Therapy for the Treatment of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder: Past, Present, and Future. *Transpl.Infect.Dis.* 2001;3:104-7.
  42. Egawa, H., Ohishi, T., Arai, T., Inomata, Y., Uemoto, S., Asonuma, K., Kinchi, T., Okajima, H., Matsui, A., Kawashima, N., Martinez, O. M., and Tanaka, K. Application of in Situ Hybridization Technique for Quantitative Assessment of Ongoing Symptomatic Epstein-Barr Virus Infection After Living Related Liver Transplantation. *Clin.Transplant.*1998.Apr 1912;116-22.
  43. Ellis, D., Jaffe, R., Green, M., Janosky, J. J., Lombardozzi-Lane, S., Shapiro, R., Scantlebury, V., Vivas, C., and Jordan, M. L. Epstein-Barr Virus-Related Disorders in Children Undergoing Renal Transplantation With Tacrolimus-Based Immunosuppression. *Transplantation* 1999;68:997-1003.
  44. EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G., and BARR, Y. M. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* 1964;15:702-3.:702-3.
-

- 
45. EPSTEIN, M. A., HENLE, G., ACHONG, B. G., and BARR, Y. M. MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J.Exp.Med.* 1965;121:761-70.:761-70.
  46. Faro, A. Interferon-Alpha and Its Effects on Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *Springer Semin.Immunopathol.* 1998;20:425-36.
  47. Faye, A., Quartier, P., Reguerre, Y., Lutz, P., Carret, A. S., Dehee, A., Rohrlisch, P., Peuchmaur, M., Matthieu-Boue, A., Fischer, A., and Vilmer, E. Chimaeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) in Post-Transplant B-Lymphoproliferative Disorder Following Stem Cell Transplantation in Children. *Br.J.Haematol.* 2001;115:112-8.
  48. Finn, L., Reyes, J., Bueno, J., and Yunis, E. Epstein-Barr Virus Infections in Children After Transplantation of the Small Intestine. *Am.J.Surg.Pathol.* 1998;22:299-309.
  49. Fontan, J., Bassignot, A., Mouglin, C., Cahn, J. Y., and Lab, M. Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Serum of Transplanted Patients: a New Diagnostic Guide for Lymphoproliferative Diseases [Letter]. *Leukemia* 1998.May. 1912;772.
  50. Frank, D., Cesarman, E., Liu, Y. F., Michler, R. E., and Knowles, D. M. Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders Frequently Contain Type A and Not Type B Epstein-Barr Virus. *Blood* 1995.Mar.1 1985;1396-403.
  51. Ganne, V., Siddiqi, N., Kamapath, B., Chang, C. C., Cohen, E. P., Bresnahan, B. A., and Hariharan, S. Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) Treatment for Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Clin.Transplant.* 2003;17:417-22.
  52. Gartner, B. C., Fischinger, J., Schafer, H., Einsele, H., Roemer, K., and Muller-Lantzsch, N. Epstein-Barr Viral Load As a Tool to Diagnose and Monitor Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Recent Results Cancer Res.* 2002;159:49-54.
  53. Gorgievski-Hrisoho, M., Hinderer, W., Nebel-Schickel, H., Horn, J., Vornhagen, R., Sonneborn, H. H., Wolf, H., and Siegl, G. Serodiagnosis of Infectious Mononucleosis by Using Recombinant Epstein-Barr Virus Antigens and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technology. *J.Clin.Microbiol.* 1990;28:2305-11.
  54. Green, M. Preemptive Therapy: Epstein-Barr Virus. *Transplant.Proc.*1996.Dec. 1928;5-6.
  55. Green, M., Bueno, J., Rowe, D., Mazariegos, G., Qu, L., Abu-Almagd, K., and Reyes, J. Predictive Negative Value of Persistent Low Epstein-Barr Virus Viral Load After Intestinal Transplantation in Children. *Transplantation* 2000;70:593-6.
  56. Green, M., Cacciarelli, T. V., Mazariegos, G. V., Sigurdsson, L., Qu, L., Rowe, D. T., and Reyes, J. Serial Measurement of Epstein-Barr Viral Load in Peripheral Blood in Pediatric Liver Transplant Recipients During Treatment for Posttransplant Lymphoproliferative Disease. *Transplantation* 1998;66:1641-4.
-

- 
57. Green, M., Michaels, M. G., Webber, S. A., Rowe, D., and Reyes, J. The Management of Epstein-Barr Virus Associated Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders in Pediatric Solid-Organ Transplant Recipients. *Pediatr. Transplant.* 1999;3:271-81.
  58. Green, M. and Webber, S. Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders. *Pediatr. Clin. North Am.* 2003;50:1471-91.
  59. Gross, T. G., Hinrichs, S. H., Davis, J. R., Mitchell, D., Bishop, M. R., and Wagner, J. E. Depletion of EBV-Infected Cells in Donor Marrow by Counterflow Elutriation. *Exp. Hematol.* 1998. May. 1998;26:395-9.
  60. Gulley, M. L. Molecular Diagnosis of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. *J. Mol. Diagn.* 2001;3:1-10.
  61. Gustafsson, A., Levitsky, V., Zou, J. Z., Frisan, T., Dalianis, T., Ljungman, P., Ringden, O., Winiarski, J., Ernberg, I., and Masucci, M. G. Epstein-Barr Virus (EBV) Load in Bone Marrow Transplant Recipients at Risk to Develop Posttransplant Lymphoproliferative Disease: Prophylactic Infusion of EBV-Specific Cytotoxic T Cells. *Blood* 2000. Feb. 1 1995;87:14-14.
  62. Hanel, M., Fiedler, F., and Thorns, C. Anti-CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) and Cidofovir As Successful Treatment of an EBV-Associated Lymphoma With CNS Involvement. *Onkologie.* 2001;24:491-4.
  63. Hanson, M. N., Morrison, V. A., Peterson, B. A., Stieglbauer, K. T., Kubic, V. L., McCormick, S. R., McGlennen, R. C., Manivel, J. C., Brunning, R. D., and Litz, C. E. Posttransplant T-Cell Lymphoproliferative Disorders--an Aggressive, Late Complication of Solid-Organ Transplantation. *Blood* 1996;88:3626-33.
  64. Haque, T., Amlot, P. L., Helling, N., Thomas, J. A., Sweny, P., Rolles, K., Burroughs, A. K., Prentice, H. G., and Crawford, D. H. Reconstitution of EBV-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplant Recipients. *J. Immunol.* 1998. Jun. 15. 1998;160:6204-9.
  65. Haque, T., Taylor, C., Wilkie, G. M., Murad, P., Amlot, P. L., Beath, S., McKiernan, P. J., and Crawford, D. H. Complete Regression of Posttransplant Lymphoproliferative Disease Using Partially HLA-Matched Epstein Barr Virus-Specific Cytotoxic T Cells. *Transplantation* 2001;72:1399-402.
  66. Harris, N. L., Ferry, J. A., and Swerdlow, S. H. Posttransplant Lymphoproliferative Disorders: Summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin. Diagn. Pathol.* 1997;14:8-14.
  67. Harwood, J. S., Gould, F. K., McMaster, A., Hamilton, J. R., Corris, P. A., Hasan, A., Gennery, A. R., and Dark, J. H. Significance of Epstein-Barr Virus Status and Post-Transplant Lymphoproliferative Disease in Pediatric Thoracic Transplantation. *Pediatr. Transplant.* 1999;3:100-3.
  68. Heslop, H. E. and Rooney, C. M. Adoptive Cellular Immunotherapy for EBV Lymphoproliferative Disease. *Immunol. Rev.* 1997. Jun. 1997;157:217-22.
-

- 
69. Ho, M., Jaffe, R., Miller, G., Breinig, M. K., Dummer, J. S., Makowka, L., Atchison, R. W., Karrer, F., Nalesnik, M. A., and Starzl, T. E. The Frequency of Epstein-Barr Virus Infection and Associated Lymphoproliferative Syndrome After Transplantation and Its Manifestations in Children. *Transplantation* 1988;45:719-27.
  70. Hoffmann, H., Schlette, E., Actor, J., and Medeiros, L. J. Pleural Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder Following Liver Transplantation. *Arch.Pathol.Lab Med.*2001.Mar. 125;419-23.
  71. Holmes, R. D., Orban-eller, K., Karrer, F. R., Rowe, D. T., Narkewicz, M. R., and Sokol, R. J. Response of Elevated Epstein-Barr Virus DNA Levels to Therapeutic Changes in Pediatric Liver Transplant Patients: 56-Month Follow Up and Outcome. *Transplantation* 2002;74:367-72.
  72. Hsieh, W. S., Lemas, M. V., and Ambinder, R. F. The Biology of Epstein-Barr Virus in Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Transpl.Infect.Dis.* 1999;1:204-12.
  73. Kenagy, D. N., Schlesinger, Y., Weck, K., Ritter, J. H., Gaudreault-Keener, M. M., and Storch, G. A. Epstein-Barr Virus DNA in Peripheral Blood Leukocytes of Patients With Posttransplant Lymphoproliferative Disease. *Transplantation* 1995;60:547-54.
  74. Khanna, R., Burrows, S. R., and Moss, D. J. Immune Regulation in Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Microbiol.Rev.* 1995;59:387-405.
  75. Kim, J. Y., Kim, C. W., Ahn, C., Bang, Y. J., and Lee, H. S. Rapidly Developing T-Cell Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder. *Am.J.Kidney Dis.* 1999;34:e3.
  76. Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T., and Morishima, T. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Load by Using a Real-Time PCR Assay. *J.Clin.Microbiol.* 1999;37:132-6.
  77. Kingma, D. W., Shad, A., Tsokos, M., Fest, T., Otsuki, T., Frekko, K., Werner, E., Werner, A., Magrath, I., Raffeld, M., and Jaffe, E. S. Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated Smooth-Muscle Tumor Arising in a Post-Transplant Patient Treated Successfully for Two PT-EBV-Associated Large-Cell Lymphomas. Case Report. *Am.J.Surg.Pathol.*1996.Dec. 1920;1511-9.
  78. Kirby, H., Rickinson, A., and Bell, A. The Activity of the Epstein-Barr Virus BamHI W Promoter in B Cells Is Dependent on the Binding of CREB/ATF Factors. *J.Gen.Virol.* 2000;81:1057-66.
  79. Knowles, D. M., Cesarman, E., Chadburn, A., Frizzera, G., Chen, J., Rose, E. A., and Michler, R. E. Correlative Morphologic and Molecular Genetic Analysis Demonstrates Three Distinct Categories of Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders. *Blood* 1995;85:552-65.
  80. Kogan-Liberman, D., Burroughs, M., Emre, S., Moscona, A., and Shneider, B. L. The Role of Quantitative Epstein-Barr Virus Polymerase Chain Reaction and
-

- Preemptive Immunosuppression Reduction in Pediatric Liver Transplantation: a Preliminary Experience. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2001;33:445-9.
81. Kogan, D. L., Burroughs, M., Emre, S., Fishbein, T., Moscona, A., Ramson, C., and Shneider, B. L. Prospective Longitudinal Analysis of Quantitative Epstein-Barr Virus Polymerase Chain Reaction in Pediatric Liver Transplant Recipients. *Transplantation* 1999;67:1068-70.
  82. Krieger, N. R., Martinez, O. M., Krams, S. M., Cox, K., So, S., and Esquivel, C. O. Significance of Detecting Epstein-Barr-Specific Sequences in the Peripheral Blood of Asymptomatic Pediatric Liver Transplant Recipients. *Liver Transpl.*2000.Jan. 1906;62-6.
  83. Kuehnle, I., Huls, M. H., Liu, Z., Semmelmann, M., Krance, R. A., Brenner, M. K., Rooney, C. M., and Heslop, H. E. CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) for Therapy of Epstein-Barr Virus Lymphoma After Hemopoietic Stem-Cell Transplantation. *Blood* 2000;95:1502-5.
  84. Leblond, V., Sutton, L., Dorent, R., Davi, F., Bitker, M. O., Gabarre, J., Charlotte, F., Ghossoub, J. J., Fourcade, C., Fischer, A., and . Lymphoproliferative Disorders After Organ Transplantation: a Report of 24 Cases Observed in a Single Center. *J.Clin.Oncol.* 1995;13:961-8.
  85. Lei, K. I., Chan, L. Y., Chan, W. Y., Johnson, P. J., and Lo, Y. M. Quantitative Analysis of Circulating Cell-Free Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Levels in Patients With EBV-Associated Lymphoid Malignancies. *Br.J.Haematol.* 2000;111:239-46.
  86. Leung, E., Shenton, B. K., Jackson, G., Gould, F. K., Yap, C., and Talbot, D. Use of Real-Time PCR to Measure Epstein-Barr Virus Genomes in Whole Blood. *J.Immunol.Methods* 2002;270:259-67.
  87. LeVasseur, R., Ganjoo, J., Green, M., Janosky, J., Reyes, J., Mazariegos, G., and Sindhi, R. Lymphocyte Subsets May Discern Treatment Effects in Children and Young Adults With Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder. *Pediatr.Transplant.* 2003;7:370-5.
  88. Levine, S. M., Angel, L., Anzueto, A., Susanto, I., Peters, J. I., Sako, E. Y., and Bryan, C. L. A Low Incidence of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in 109 Lung Transplant Recipients. *Chest* 1999;116:1273-7.
  89. Li, P. K., Tsang, K., Szeto, C. C., Wong, T. Y., To, K. F., Leung, C. B., Lui, S. F., Yu, S., and Lai, F. M. Effective Treatment of High-Grade Lymphoproliferative Disorder After Renal Transplantation Using Autologous Lymphocyte Activated Killer Cell Therapy. *Am.J.Kidney Dis.* 1998;32:813-9.
  90. Limaye, A. P., Huang, M. L., Atienza, E. E., Ferrenberg, J. M., and Corey, L. Detection of Epstein-Barr Virus DNA in Sera From Transplant Recipients With Lymphoproliferative Disorders. *J.Clin.Microbiol.* 1999;37:1113-6.
  91. Lo, Y. M., Chan, L. Y., Chan, A. T., Leung, S. F., Lo, K. W., Zhang, J., Lee, J. C., Hjelm, N. M., Johnson, P. J., and Huang, D. P. Quantitative and Temporal Correlation Between Circulating Cell-Free Epstein-Barr Virus DNA and Tumor Recurrence in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59:5452-5.

- 
92. Lones, M. A., Mishalani, S., Shintaku, I. P., Weiss, L. M., Nichols, W. S., and Said, J. W. Changes in Tonsils and Adenoids in Children With Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: Report of Three Cases With Early Involvement of Waldeyer's Ring. *Hum.Pathol.*1995.May. 1926;525-30.
  93. Lones, M. A., Shintaku, I. P., Weiss, L. M., Thung, S. N., Nichols, W. S., and Geller, S. A. Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Liver Allograft Biopsies: a Comparison of Three Methods for the Demonstration of Epstein-Barr Virus. *Hum.Pathol.* 1997;28:533-9.
  94. Lucas, K. G., Burton, R. L., Zimmerman, S. E., Wang, J., Cornetta, K. G., Robertson, K. A., Lee, C. H., and Emanuel, D. J. Semiquantitative Epstein-Barr Virus (EBV) Polymerase Chain Reaction for the Determination of Patients at Risk for EBV-Induced Lymphoproliferative Disease After Stem Cell Transplantation. *Blood* 1998.May.15. 1991;3654-61.
  95. Lucas, K. G., Filo, F., Heilman, D. K., Lee, C. H., and Emanuel, D. J. Semiquantitative Epstein-Barr Virus Polymerase Chain Reaction Analysis of Peripheral Blood From Organ Transplant Patients and Risk for the Development of Lymphoproliferative Disease. *Blood* 1998.Nov.15. 1992;3977-8.
  96. Malouf, M. A., Chhajed, P. N., Hopkins, P., Plit, M., Turner, J., and Glanville, A. R. Anti-Viral Prophylaxis Reduces the Incidence of Lymphoproliferative Disease in Lung Transplant Recipients. *J.Heart Lung Transplant.* 2002;21:547-54.
  97. Mamzer-Bruneel, M. F., Lome, C., Morelon, E., Levy, V., Bourquelot, P., Jacobs, F., Gessain, A., Mac, Intyre E., Brousse, N., Kreis, H., and Hermine, O. Durable Remission After Aggressive Chemotherapy for Very Late Post-Kidney Transplant Lymphoproliferation: A Report of 16 Cases Observed in a Single Center. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:3622-32.
  98. Manez, R., Breinig, M. K., Linden, P., Kusne, S., Torre-Cisneros, J., Wilson, J., Starzl, T. E., and Ho, M. Factors Associated With the Development of Post-Transplant Lymphoproliferative Disease (PTLD) in Epstein-Barr Virus (EBV)-Seronegative Adult Liver Transplant Recipients. *Transpl.Int.* 1994;7 Suppl 1:S235-S237.
  99. Martinez, O. M., Villanueva, J. C., Lawrence-Miyasaki, L., Quinn, M. B., Cox, K., and Krams, S. M. Viral and Immunologic Aspects of Epstein-Barr Virus Infection in Pediatric Liver Transplant Recipients. *Transplantation* 1995.Feb.27. 1959;519-24.
  100. Matsukura, T., Yokoi, A., Egawa, H., Kudo, T., Kawashima, M., Hirata, Y., Tanaka, H., Kagajo, K., Wada, H., and Tanaka, K. Significance of Serial Real-Time PCR Monitoring of EBV Genome Load in Living Donor Liver Transplantation. *Clin.Transplant.* 2002;16:107-12.
  101. McDiarmid, S. V., Jordan, S., Kim, G. S., Toyoda, M., Goss, J. A., Vargas, J. H., Martin, M. G., Bahar, R., Maxfield, A. L., Ament, M. E., Busuttill, R. W., and Lee, G. S. Prevention and Preemptive Therapy of Posttransplant Lymphoproliferative Disease in Pediatric Liver Recipients. *Transplantation* 1998;66:1604-11.
  102. McGuirk, J. P., Seropian, S., Howe, G., Smith, B., Stoddart, L., and Cooper, D. L. Use of Rituximab and Irradiated Donor-Derived Lymphocytes to Control Epstein-
-

- 
- Barr Virus-Associated Lymphoproliferation in Patients Undergoing Related Haplo-Identical Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;Dec. 1924;1253-8.
103. McKnight, J. L., Cen, H., Riddler, S. A., Breinig, M. C., Williams, P. A., Ho, M., and Joseph, P. S. EBV Gene Expression, EBNA Antibody Responses and EBV+ Peripheral Blood Lymphocytes in Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Leuk.Lymphoma* 1994;15:9-16.
  104. Mentzer, S. J., Perrine, S. P., and Faller, D. V. Epstein--Barr Virus Post-Transplant Lymphoproliferative Disease and Virus-Specific Therapy: Pharmacological Re-Activation of Viral Target Genes With Arginine Butyrate. *Transpl.Infect.Dis.* 2001;3:177-85.
  105. Merlino, C., Cavallo, R., Bergallo, M., Giacchino, F., Bollero, C., Negro, Ponzi A., and Cavallo, G. Epstein Barr Viral Load Monitoring by Quantitative PCR in Renal Transplant Patients. *New Microbiol.* 2003;26:141-9.
  106. Merlino, C., Cavallo, R., Bergallo, M., Giorgi, S., Forgnone, F., Re, D., Sinesi, F., Musso, T., and Negro, Ponzi A. Quantitative PCR in EBV-Infected Renal Transplant Patients. *New Microbiol.* 2001;24:223-9.
  107. Meru, N., Davison, S., Whitehead, L., Jung, A., Mutimer, D., Rooney, N., Kelly, D., and Niedobitek, G. Epstein-Barr Virus Infection in Paediatric Liver Transplant Recipients: Detection of the Virus in Post-Transplant Tonsillectomy Specimens. *Mol.Pathol.* 2001;54:264-9.
  108. Micallef, I. N., Chhanabhai, M., Gascoyne, R. D., Shepherd, J. D., Fung, H. C., Nantel, S. H., Toze, C. L., Klingemann, H. G., Sutherland, H. J., Hogge, D. E., Nevill, T. J., Le, A., and Barnett, M. J. Lymphoproliferative Disorders Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation: the Vancouver Experience. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:981-7.
  109. Montone, K. T., Friedman, H., Hodinka, R. L., Hicks, D. G., Kant, J. A., and Tomaszewski, J. E. In Situ Hybridization for Epstein-Barr Virus NotI Repeats in Posttransplant Lymphoproliferative Disorder. *Mod.Pathol.* 1992;5:292-302.
  110. Muti, G., Cantoni, S., Oreste, P., Klersy, C., Gini, G., Rossi, V., D'Avanzo, G., Comoli, P., Baldanti, F., Montillo, M., Nosari, A., and Morra, E. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: Improved Outcome After Clinico-Pathologically Tailored Treatment. *Haematologica* 2002;87:67-77.
  111. Mutimer, D., Kaur, N., Tang, H., Singhal, S., Shaw, J., Whitehead, L., Rickinson, A., and Niedobitek, G. Quantitation of Epstein-Barr Virus DNA in the Blood of Adult Liver Transplant Recipients. *Transplantation* 2000;69:954-9.
  112. Nalesnik, M. A. Posttransplantation Lymphoproliferative Disorders (PTLD): Current Perspectives. *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 1996;8:139-48.
  113. Nalesnik, M. A. Clinical and Pathological Features of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders (PTLD). *Springer Semin.Immunopathol.* 1998;20:325-42.
-



- 
114. Nalesnik, M. A. The Diverse Pathology of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: the Importance of a Standardized Approach. *Transpl.Infect.Dis.* 2001;3:88-96.
  115. Nalesnik, M. A. Clinicopathologic Characteristics of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *Recent Results Cancer Res.* 2002;159:9-18.
  116. Nalesnik, M. A., Rao, A. S., Furukawa, H., Pham, S., Zeevi, A., Fung, J. J., Klein, G., Gritsch, H. A., Elder, E., Whiteside, T. L., and Starzl, T. E. Autologous Lymphokine-Activated Killer Cell Therapy of Epstein-Barr Virus-Positive and -Negative Lymphoproliferative Disorders Arising in Organ Transplant Recipients. *Transplantation* 1997;63:1200-5.
  117. Nalesnik, M. A. and Starzl, T. E. Epstein-Barr Virus, Infectious Mononucleosis, and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Transplant.Sci.* 1994;4:61-79.
  118. Natkunam, Y., Elenitoba-Johnson, K. S., Kingma, D. W., and Kamel, O. W. Epstein-Barr Virus Strain Type and Latent Membrane Protein 1 Gene Deletions in Lymphomas in Patients With Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum.*1997.Jun. 1940;1152-6.
  119. Niesters, H. G., van Esser, J., Fries, E., Wolthers, K. C., Cornelissen, J., and Osterhaus, A. D. Development of a Real-Time Quantitative Assay for Detection of Epstein-Barr Virus. *J.Clin.Microbiol.*2000.Feb. 1938;712-5.
  120. Nuckols, J. D., Baron, P. W., Stenzel, T. T., Olatidoye, B. A., Tuttle-Newhall, J. E., Clavien, P. A., and Howell, D. N. The Pathology of Liver-Localized Post-Transplant Lymphoproliferative Disease: a Report of Three Cases and a Review of the Literature. *Am.J.Surg.Pathol.*2000.May. 1924;733-41.
  121. O'Brien, S., Bernert, R. A., Logan, J. L., and Lien, Y. H. Remission of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder After Interferon Alfa Therapy. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1997;8:1483-9.
  122. O'Reilly, R. J., Small, T. N., Papadopoulos, E., Lucas, K., Lacerda, J., and Koulova, L. Adoptive Immunotherapy for Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders Complicating Marrow Allografts. *Springer Semin.Immunopathol.* 1998;20:455-91.
  123. Oertel, S. H., Ruhnke, M. S., Anagnostopoulos, I., Kahl, A. A., Frewer, A. F., Bechstein, W. O., Hummel, M. W., and Riess, H. B. Treatment of Epstein-Barr Virus-Induced Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder With Foscarnet Alone in an Adult After Simultaneous Heart and Renal Transplantation. *Transplantation* 1999;67:765-7.
  124. Opelz, G. and Henderson, R. Incidence of Non-Hodgkin Lymphoma in Kidney and Heart Transplant Recipients. *Lancet* 18-12-1993;342:1514-6.
  125. Orentas, R. J. Determination of Epstein-Barr Virus (EBV) Load by RT-PCR and Cellular Dilution. *Mol.Cell Probes* 1998;12:427-30.

- 
126. Orii, T., Ohkohchi, N., Kikuchi, H., Koyamada, N., Chubachi, S., Satomi, S., Kimura, H., Hoshino, Y., and Morita, M. Usefulness of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction in Following Up Patients With Epstein-Barr Virus Infection After Liver Transplantation. *Clin.Transplant.* 2000;14:308-17.
  127. Oudejans, J. J., Jiwa, M., van Den Brule, A. J., Grasser, F. A., Horstman, A., Vos, W., Kluin, P. M., van, der, V, Walboomers, J. M., and Meijer, C. J. Detection of Heterogeneous Epstein-Barr Virus Gene Expression Patterns Within Individual Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorders. *Am.J.Pathol.*1995.Oct. 147;923-33.
  128. Pageaux, G. P., Bonnardet, A., Picot, M. C., Perrigault, P. F., Coste, V., Navarro, F., Fabre, J. M., Domergue, J., Descomps, B., Blanc, P., Michel, H., and Larrey, D. Prevalence of Monoclonal Immunoglobulins After Liver Transplantation: Relationship With Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Transplantation* 1998;65:397-400.
  129. Paul, C., Le Tourneau, A., Cayuela, J. M., Devidas, A., Robert, C., Molinie, V., and Dubertret, L. Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disease During Methotrexate Therapy for Psoriasis. *Arch.Dermatol.*1997.Jul. 133;867-71.
  130. Praghakaran, K., Wise, B., Chen, A., Schwarz, K., and Colombani, P. Rational Management of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder in Pediatric Recipients. *J.Pediatr.Surg.* 1999;34:112-5.
  131. Restrepo, A., Albrecht, F., Raez, L. E., Fernandez, H. F., Nassiri, M., Byrne, G., Jr., and Cassileth, P. A. Post-Liver Transplantation Lymphoproliferative Disorders With and Without Infusions of Donor Bone Marrow Cells. *Crit Rev.Oncog.* 1999;10:239-45.
  132. Riddler, S. A., Breinig, M. C., and McKnight, J. L. Increased Levels of Circulating Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected Lymphocytes and Decreased EBV Nuclear Antigen Antibody Responses Are Associated With the Development of Posttransplant Lymphoproliferative Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Blood* 1994;84:972-84.
  133. Rogatsch, H., Bonatti, H., Menet, A., Larcher, C., Feichtinger, H., and Dirnhofer, S. Epstein-Barr Virus-Associated Multicentric Leiomyosarcoma in an Adult Patient After Heart Transplantation: Case Report and Review of the Literature. *Am.J.Surg.Pathol.*2000.Apr 1924;614-21.
  134. Rogers, B. B., Conlin, C., Timmons, C. F., Dawson, D. B., Krisher, K., and Andrews, W. S. Epstein-Barr Virus PCR Correlated With Viral Histology and Serology in Pediatric Liver Transplant Patients. *Pediatr.Pathol.Lab Med.*1997.May.-Jun. 1917;391-400.
  135. Rogers, B. B., Sommerauer, J., Quan, A., Timmons, C. F., Dawson, D. B., Scheuermann, R. H., Krisher, K., and Atkins, C. Epstein-Barr Virus Polymerase Chain Reaction and Serology in Pediatric Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder: Three-Year Experience. *Pediatr.Dev.Pathol.*1998.Nov.-Dec. 2001;480-6.
-

- 
136. Rooney, C. M., Loftin, S. K., Holladay, M. S., Brenner, M. K., Krance, R. A., and Heslop, H. E. Early Identification of Epstein-Barr Virus-Associated Post-Transplantation Lymphoproliferative Disease. *Br.J.Haematol.* 1995.Jan. 1989;98-103.
  137. Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. Use of Gene-Modified Virus-Specific T Lymphocytes to Control Epstein-Barr-Virus-Related Lymphoproliferation. *Lancet* 1995.Jan.7. 345;9-13.
  138. Rowe, D. T., Qu, L., Reyes, J., Jabbour, N., Yunis, E., Putnam, P., Todo, S., and Green, M. Use of Quantitative Competitive PCR to Measure Epstein-Barr Virus Genome Load in the Peripheral Blood of Pediatric Transplant Patients With Lymphoproliferative Disorders. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35:1612-5.
  139. Rowe, M., Niedobitek, G., and Young, L. S. Epstein-Barr Virus Gene Expression in Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *Springer Semin.Immunopathol.* 1998;20:389-403.
  140. Savoldo, B., Goss, J., Liu, Z., Huls, M. H., Doster, S., Gee, A. P., Brenner, M. K., Heslop, H. E., and Rooney, C. M. Generation of Autologous Epstein-Barr Virus-Specific Cytotoxic T Cells for Adoptive Immunotherapy in Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation* 2001;72:1078-86.
  141. Serinet, M. O., Jacquemin, E., Habes, D., Debray, D., Fabre, M., and Bernard, O. Anti-CD20 Monoclonal Antibody (Rituximab) Treatment for Epstein-Barr Virus-Associated, B-Cell Lymphoproliferative Disease in Pediatric Liver Transplant Recipients. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2002;34:389-93.
  142. Smets, F., Bodeus, M., Goubau, P., Reding, R., Otte, J. B., Buts, J. P., and Sokal, E. M. Characteristics of Epstein-Barr Virus Primary Infection in Pediatric Liver Transplant Recipients. *J.Hepatol.* 2000.Jan. 1932;100-4.
  143. Smets, F., Latinne, D., Bazin, H., Reding, R., Otte, J. B., Buts, J. P., and Sokal, E. M. Ratio Between Epstein-Barr Viral Load and Anti-Epstein-Barr Virus Specific T-Cell Response As a Predictive Marker of Posttransplant Lymphoproliferative Disease. *Transplantation* 2002;73:1603-10.
  144. Sokal, E. M., Antunes, H., Beguin, C., Bodeus, M., Wallemacq, P., de Ville, de Goyet, Reding, R., Janssen, M., Buts, J. P., and Otte, J. B. Early Signs and Risk Factors for the Increased Incidence of Epstein-Barr Virus-Related Posttransplant Lymphoproliferative Diseases in Pediatric Liver Transplant Recipients Treated With Tacrolimus. *Transplantation* 1997;64:1438-42.
  145. Sokal, E. M., Caragiozoglou, T., Lamy, M., Reding, R., and Otte, J. B. Epstein-Barr Virus Serology and Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders in Pediatric Liver Transplant Recipients. *Transplantation* 1993;56:1394-8.
  146. Stevens, S. J., Verschuuren, E. A., Pronk, I., van Der, Bij W., Harmsen, M. C., The, T. H., Meijer, C. J., van Den Brule, A. J., and Middeldorp, J. M. Frequent Monitoring of Epstein-Barr Virus DNA Load in Unfractionated Whole Blood Is Essential for Early Detection of Posttransplant Lymphoproliferative Disease in High-Risk Patients. *Blood* 2001;97:1165-71.
-

- 
147. Stevens, S. J., Verschuuren, E. A., Verkuujlen, S. A., van Den Brule, A. J., Meijer, C. J., and Middeldorp, J. M. Role of Epstein-Barr Virus DNA Load Monitoring in Prevention and Early Detection of Post-Transplant Lymphoproliferative Disease. *Leuk.Lymphoma* 2002;43:831-40.
  148. Swerdlow, A. J., Higgins, C. D., Hunt, B. J., Thomas, J. A., Burke, M. M., Crawford, D. H., and Yacoub, M. H. Risk of Lymphoid Neoplasia After Cardiothoracic Transplantation. a Cohort Study of the Relation to Epstein-Barr Virus. *Transplantation* 2000;69:897-904.
  149. Swinnen, L. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders: Implications for Acquired Immunodeficiency Syndrome-Associated Malignancies. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr* 2001;:38-43.
  150. Terasawa, T., Ohashi, H., Tsushita, K., Utsumi, M., Mukai, E., Nakamura, S., and Shimoyama, M. Failure to Detect Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in Plasma by Real-Time PCR in a Case of EBV-Associated Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder Confined to the Central Nervous System. *Int.J.Hematol.* 2002;75:416-20.
  151. Timmons, C. F., Dawson, D. B., Richards, C. S., Andrews, W. S., and Katz, J. A. Epstein-Barr Virus-Associated Leiomyosarcomas in Liver Transplantation Recipients. Origin From Either Donor or Recipient Tissue. *Cancer* 1995.Oct.15. 1976;1481-9.
  152. Tosato, G., Teruya-Feldstein, J., Setsuda, J., Pike, S. E., Jones, K. D., and Jaffe, E. S. Post-Transplant Lymphoproliferative Disease (PTLD): Lymphokine Production and PTLD. *Springer Semin.Immunopathol.* 1998;20:405-23.
  153. Vajro, P., Lucariello, S., Migliaro, F., Sokal, E., Gridelli, B., Vegnente, A., Iorio, R., Smets, F., Quinto, I., and Scala, G. Predictive Value of Epstein-Barr Virus Genome Copy Number and BZLF1 Expression in Blood Lymphocytes of Transplant Recipients at Risk for Lymphoproliferative Disease. *J.Infect.Dis.* 2000;181:2050-4.
  154. Venard, V., Carret, A. S., Pascal, N., Rihn, B., Bordigoni, P., and Le Faou, A. A Convenient Semi-Quantitative Method for the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Reactivation [In Process Citation]. *Arch.Virol.*2000. 145;2211-6.
  155. Wagner, H. J., Cheng, Y. C., Huls, M. H., Gee, A. P., Kuehnle, I., Krance, R. A., Brenner, M. K., Rooney, C. M., and Heslop, H. E. Prompt Versus Preemptive Intervention for EBV Lymphoproliferative Disease. *Blood* 2004;103:3979-81.
  156. Wagner, H. J., Wessel, M., Jabs, W., Smets, F., Fischer, L., Offner, G., and Bucsky, P. Patients at Risk for Development of Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: Plasma Versus Peripheral Blood Mononuclear Cells As Material for Quantification of Epstein-Barr Viral Load by Using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Transplantation* 2001;72:1012-9.
  157. Wandinger, K., Jabs, W., Siekhaus, A., Bubel, S., Trillenberger, P., Wagner, H., Wessel, K., Kirchner, H., and Hennig, H. Association Between Clinical Disease Activity and Epstein-Barr Virus Reactivation in MS. *Neurology* 2000;55:178-84.
-

158. Wu, T. T., Swerdlow, S. H., Locker, J., Bahler, D., Randhawa, P., Yunis, E. J., Dickman, P. S., and Nalesnik, M. A. Recurrent Epstein-Barr Virus-Associated Lesions in Organ Transplant Recipients. *Hum.Pathol.* 1996;27:157-64.
159. Yamamoto, M., Kimura, H., Hironaka, T., Hirai, K., Hasegawa, S., Kuzushima, K., Shibata, M., and Morishima, T. Detection and Quantification of Virus DNA in Plasma of Patients With Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *J.Clin.Microbiol.* 1995;33:1765-8.
160. Yancoski, J., Danielian, S., Ibanez, J., Turconi, A., Cuarterolo, M., Zelazko, M., and Niesters Hubert, G. M. Quantification of Epstein-Barr Virus Load in Argentinean Transplant Recipients Using Real-Time PCR. *J.Clin.Virol.* 2004;31:58-65.
161. Yang, J., Tao, Q., Flinn, I. W., Murray, P. G., Post, L. E., Ma, H., Piantadosi, S., Caligiuri, M. A., and Ambinder, R. F. Characterization of Epstein-Barr Virus-Infected B Cells in Patients With Posttransplantation Lymphoproliferative Disease: Disappearance After Rituximab Therapy Does Not Predict Clinical Response. *Blood* 2000;96:4055-63.
162. Younes, B. S., McDiarmid, S. V., Martin, M. G., Vargas, J. H., Goss, J. A., Busuttil, R. W., and Ament, M. E. The Effect of Immunosuppression on Posttransplant Lymphoproliferative Disease in Pediatric Liver Transplant Patients. *Transplantation* 2000;70:94-9.
163. Zilz, N. D., Olson, L. J., and McGregor, C. G. Treatment of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder With Monoclonal CD20 Antibody (Rituximab) After Heart Transplantation. *J.Heart Lung Transplant.* 2001;20:770-2.

**Probenmaterial:**

5-10 ml EDTA Blut pro Patient

Standardzelle Namalwa; American Type Culture Collection [ATCC] CRL-1432

**Reagenzien:**

Ficoll Separationslösung für Standarddichtezentrifugation, Fa. Biochrom, Berlin

Spüllösung PBS-Puffer, pH 7,2

QIAamp DNA Blood Midi Kit, Fa. Quiagen, Hilden

Biotest Anti-EBV EBNA-IgG-Elisa, Fa. Biotest, Dreieich

Biotest Anti-EA-IgG-Elisa, Fa. Biotest, Dreieich

TaqMan Universal PCR Master Mix, Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA

IL10 Dianova, Fa. Immunotech, Hamburg

EBV-spezifische Primer und Proben aus GenBank Sequence Database (National Library of Medicine, National Institute of Health, Bethesda, MD; accession number V01555 für das EBV-Genom und M11880-M11882 für das humane CRP).

TaqMan  $\beta$ -Actin Detection Reagents, Applied Biosystems, Foster City, USA

**Geräte:**

Spectrophotometer Ultrospec 2000, Fa. PharmaciaBiotech, Freiburg

ABI PRISM 7700 SDS Sequenz Detection System, Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA

**Zusammensetzung eines Einfachansatzes zur Bam HI-W – Bestimmung:**

- 25  $\mu$ l 2x Universal Mastermix (PE Applied Biosystems)
- 1,5  $\mu$ l vorwärtsgerichteter Primer (10  $\mu$ M, Konzentration (c)=300 nM)  
(Sequenz: 5'-ACG TAA GCC AGA CAG CAG CC-3')
- 0,25  $\mu$ l rückwärtsgerichteter Primer (10  $\mu$ M, c=50nM)  
(Sequenz: 5'TTT GTG TGG ACT CCT GGC G-3')
- 1  $\mu$ l Sonde (10  $\mu$ M)  
(Sequenz: 5'-FAM- TCC TCC TGC AGC TAT TTC TGG TCG CAT CA-TAMRA-3')
- 12,25  $\mu$ l Aqua ad injectabile
- 10  $\mu$ l Probe / Standard /Aqua ad injectabile (bei den NTC's)

**Zusammensetzung eines Einfachansatzes zur  $\beta$ -Actin-Bestimmung:**

- 25  $\mu$ l 2x Universal Mastermix
- 5  $\mu$ l  $\beta$ -Actin forward primer (3 $\mu$ M)
- 5  $\mu$ l  $\beta$ -Actin reverse primer (3 $\mu$ M)
- 5  $\mu$ l  $\beta$ -Actin Sonde (2 $\mu$ M)

- 10 µl Template (50µg/ml)

**Zusammensetzung eines Einfachansatzes zur EBNA 1 Bestimmung:**

- 25µl 2x Universal Master Mix
- 1,5 µl EBNA 1-Vic Vorwärtsprimer (10µM, c = 300 nM)  
(Sequenz: 5'-CCG GTG TGT TCG TAT ATG GAG-3')
- 1,5 µl EBNA 1-Vic Rückwärtsprimer (10µM, c = 300 nM)  
(Sequenz: 5'- GGG AGA CGA CTC AAT GGT GTA-3')
- 1 µl EBNA 1 Sonde (10 µM)  
(Sequenz: 5'-Vic TGC CCT TGC TAT TCC ACA ATG TCG TCT T-TAMRA-3')
- 0,5 µl CRP-Fam Vorwärtsprimer (10 µM, c = 100 nM)  
(Sequenz: 5'-CTT GAC CAG CCT CTC TCA TGC-3')
- 0,5 µl CRP-Fam Rückwärtsprimer (10µM,c = 100 nM)  
(Sequenz: 5'-TGC AGT CTT AGA CCC CAC CC-3')
- 1µl CRP Sonde (10µM)  
(Sequenz: 5'-Fam-TTT GGC CAG ACA GGT AAG GGC CAC C-TAMRA-3')
- 9 µl Aqua ad injectabile

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Wagner und Herrn Prof. Dr. med. Bucky für die Bereitstellung des Themas, die freundliche engagierte Betreuung und viele gute Ratschläge bedanken.

Vielen Dank an N. Klapproth und K. Juhnke für die freundliche Anleitung und ausdauernde Hilfe in technischen Fragen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Fabian und Heidi Holbe für die Korrektur und hilfreiche Anregungen.



LEBENS LAUF

29. 07. 1976	Geburt in Einbeck Eltern: Karin Wessel (Personalsachbearbeiterin) Günter Wessel (Polizeikommissar) Geschwister: Sonja Wessel (Logopädin)
1983-1987	Besuch der Grundschule Kreiensen
1987-1989	Orientierungsstufe Greene
1989-1996	Roswitha-Gymnasium Bad Gandersheim In der Freizeit: Schwimmen, Wasserball und Turnen ab 1992: Übungsleiterin einer Kinderturngruppe und von Schwimmkursen
1996	Abitur und Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck
1998	Physikum und Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bucsky zu EBV assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation bei Kindern
1999	Erstes Staatsexamen Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Sertürner Krankenhauses Einbeck
2000	Frühjahr: Famulatur in der Kinderarztpraxis Dr. von der Lühe/Dr. Hussel in Lübeck Sommer: Famulatur in der Kinderchirurgie des UKSH/Lübeck Famulatur in der Psychiatrie des UKSH/Lübeck Hochzeit mit Fabian Holbe (Weiterbildungsassistent Allgemeinmedizin)
2001	Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des District General Hospitals Eastbourne (Südengland) Zweites Staatsexamen
2001-02	PJ in: 1. der Medizinischen Klinik II des UKSH/Lübeck 2. Abteilung für Chirurgie, Asklepios Klinik Bad Oldesloe 3. Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH/Lübeck Drittes Staatsexamen
Dezember 02- Mai 04 Seit Juni 04	Ärztin im Praktikum in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Klinikums Itzehoe Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Städtischen Krankenhauses Wismar

Publikationsliste:

Wagner HJ, **Wessel M**, Smets F, Jabs W, Schläger F, Fischer L, Offner G, Bucsky P.  
Poster: Post-Transplanted B-cell Lymphomas, Hôtel-Dieu, Lyon, 4.-5. May 2000

“Measurement of Epstein-Barr viral load in peripheral blood of transplanted patients by real time quantitative polymerase chain reaction (RQ PCR)”

Wagner HJ, Jabs W, Smets F, **Wessel M**, Fischer L, Offner G, Kirchner H, Bucsky P.  
Klin Padiatr. 2000 Jul-Aug;212(4):206-10.

“Real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR) for the monitoring of Epstein-Barr virus (EBV) load in peripheral blood mononuclear cells.”

Wagner HJ, **Wessel M**, Jabs W, Smets F, Fischer L, Offner G, Bucsky P.  
Transplantation. 2001 Sep 27;72(6):1012-9.

“Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction.“

Wagner HJ, Fischer L, Jabs WJ, **Holbe M**, Pethig K, Bucsky P.  
Transplantation. 2002 Sep 15;74(5):656-64.

“Longitudinal analysis of Epstein-Barr viral load in plasma and peripheral blood mononuclear cells of transplanted patients by real-time polymerase chain reaction.“