

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Fickenscher)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERGLEICH ZWEIER QUANTITATIVER METHODEN
ZUR VIRUSLASTBESTIMMUNG
DES HUMANEN IMMUNDEFIZIENZVIRUS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANTJE CHRISTINA BRATTIG
aus Berlin

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rautenberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 2011

Zum Druck genehmigt: Kiel den, 8. März 2011

gez. Prof. Dr. med. Fickenscher

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Die Struktur des Humanen Immundefizienzvirus.....	1
1.3 Krankheitsverlauf und Klinik	3
1.4 Therapie	4
1.5 HIV-Untersuchungsablauf.....	6
Fragestellung.....	10
2. Patienten, Material und Methoden.....	11
2.1 Patienten und Patientenproben	11
2.2 Material.....	11
2.3 Methoden.....	12
3. Ergebnisse.....	17
3.1 Vorbemerkung	17
3.2 Tageskontrollen	17
3.3 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der beiden Verfahren	21
3.4 Vergleich der testspezifischen Leistungsparameter	22
3.4 Vorstellung von zwei Patientenverläufen	23
4. Diskussion	27
4.1 Bewertung der Testverfahren	27
4.2 Bedeutung für das klinische Monitoring.....	30
5. Zusammenfassung	34
6. Literaturverzeichnis	35
Lebenslauf.....	45
Danksagung	46

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.1:</i>	Struktur des HI-Virus.....	2
<i>Abbildung 3.1:</i>	Flussdiagramm der analysierten Patientenproben	17
<i>Abbildung 3.2:</i>	Darstellung der Tageskontrollen der schwach positiv Proben des <i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Verfahrens von Abbott	19
<i>Abbildung 3.3:</i>	Darstellung der Tageskontrollen der hoch positiv Proben des <i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Verfahrens von Abbott	19
<i>Abbildung 3.4:</i>	Darstellung der Tageskontrollen der schwach positiv Proben des <i>HIV-1 Monitor™ Tests</i> von Roche	20
<i>Abbildung 3.5:</i>	Darstellung der Tageskontrollen der hoch positiv Proben des <i>HIV-1 Monitor™ Tests</i> von Roche.....	20
<i>Abbildung 3.6:</i>	Vergleich der Viruslastbestimmung durch den Roche <i>HIV-1 Monitor™ Test</i> und durch das Abbott <i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Verfahren	21
<i>Abbildung 3.7:</i>	Verlauf der Viruslast des Patienten 1	24
<i>Abbildung 3.8:</i>	Verlauf der Viruslast des Patienten 2	25
<i>Abbildung 4.1:</i>	Vergleich zwischen den Literaturdaten zu den Korrelations- koeffizienten auf Linearität des <i>Cobas Amplicor HIV-1 Monitor™ Test</i> von Roche und des <i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Verfahrens von Abbott	28
<i>Abbildung 4.2:</i>	Darstellung diskordanter Ergebnisse.....	30
<i>Abbildung 4.3:</i>	Verteilung der HIV-Subtypen in Europa und in Deutschland.....	32

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.1:</i>	Übersicht über die Leistungsdaten der quantitativen HIV-Nachweisverfahren im Jahr 2003	8
<i>Tabelle 2.1:</i>	Übersicht über häufig verwendete statistische Fachbegriffe	16
<i>Tabelle 3.1:</i>	Angegebene Grenzwerte der unterschiedlichen Chargen der Tageskontrollen des Abbott <i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Verfahrens	18
<i>Tabelle 3.2:</i>	Angegebene Grenzwerte der unterschiedlichen Chargen der Tageskontrollen des Roche <i>HIV-1 Monitor™ Tests</i>	18
<i>Tabelle 3.3:</i>	Übersicht über Patienten-Serumproben mit gravierend unterschiedlichen Viruslastbestimmungen	22
<i>Tabelle 3.4:</i>	Qualitativer Vergleich der beiden Testverfahren	23
<i>Tabelle 4.1:</i>	Vergleich des <i>Cobas Amplicor HIV-1 Monitor™ Tests</i> von Roche mit dem <i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Verfahren von Abbott in der Literatur	28
<i>Tabelle 4.2:</i>	Verteilung der HIV-Subtypen 2008 bis 2009 in Kiel	32

Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin
ABC	Abacavir
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AZT	Azidothymidin (Zidovudin)
b-DNA	branched-DNA
CCR	Chemokin-Corezeptor
CD4, CD8	Cluster of Differentiation 4 bzw. 8
CDC	Centers for Disease Control
cDNA	Complementary DNA
CRF	Circulation recombinant forms
d4T	4-desoxy-Thymidin (Stavudin)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMP-266	Evavirenz (Sustiva)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
<i>env</i> -Gen	Envelope-Gen / Hüllprotein
<i>gag</i> -Gen	Gruppen-spezifisches-Antigen
gp41, gp120	Glykoproteine mit dem Molekulargewicht 41.000 bzw. 120.000
HAART	Hoch aktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes-Immundefizienzvirus
HTLV	Humanes-T-Zell-Leukämie-Virus
NAT	Nucleic Acid Amplification Technique
<i>nef</i> -Gen	Negativer Faktor Gen
NRTI	Nukleosidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NtRTI	Nukleotidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
p6, p7, p17, p24	Proteine mit dem Molekulargewicht 6.000, 7.000, 17.000 bzw. 24.000

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Protease-Inhibitoren
<i>pol</i> -Gen	Polymerase Gen
<i>rev</i> -Gen	Regulator of expression of viron proteins Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SIV	Simianes Immunodeficiency Syndrome
STIKO	Ständige Impfkommision
T-20	Enfuvirtide (Fuzeon)
<i>tat</i> -Gen	Transactivator of transcription Gen
TDF	Tenofovir-Disoproxil-Fumarat (Viread)
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
<i>vif</i> -Gen	Viral infectivity factor Gen
<i>vpr</i> -Gen	Virales Protein R Gen
<i>vpu</i> -Gen	Virales Protein U Gen

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Anfang der 80er-Jahre berichteten die Centers for Disease Control (CDC) über eine Häufung von Infektionen mit *Pneumocystis jirovecii* (ehemals *Pneumocystis carinii*) und von Kaposi Sarkomen bei ansonsten gesunden homosexuellen Männern in den USA (Centers for Disease Control, 1981/1982). Die meisten der Patienten wiesen eine unerklärliche Erniedrigung der Lymphozytenzahlen auf, wie sie sonst nur bei Patienten unter Immunsuppression vorkam. Dies legte zunächst die Vermutung nahe, dass diese Krankheiten in Zusammenhang mit einer erworbenen Immunschwäche stehen, die wahrscheinlich sexuell übertragen wird. Im Folgenden traten diese Krankheiten allerdings auch gehäuft bei heterosexuellen Männern und Jungen mit Hämophilie A, bei haitianischen Einwanderern und bei i.v.-Drogenabhängigen auf, was den Schluss nahe legte, dass die Immunschwäche auch durch Blut und Blutprodukte übertragen werden kann (Centers for Disease Control, 1982). Diese erworbene Immunschwäche wurde als Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS, bezeichnet, wobei zunächst unklar blieb, was der Auslöser der Krankheit ist.

In den Jahren 1983 und 1984 beschrieben verschiedene Forschungsgruppen ein Virus, das sich in T-Zellen vermehrt und zur Gruppe der Humanen T-Zell-Leukämieviren (HTLV) gehört. Dieses HTLV-Typ III (später Humanes Immundefizienzvirus, HIV) wurde als der wahrscheinliche Erreger des AIDS angesehen, da es sich bei vielen Patienten mit AIDS und Pre-AIDS und Probanden aus Risikogruppen nachweisen ließ, wohingegen es bei heterosexuellen Menschen, die keiner Risikogruppe angehörten, nicht nachzuweisen war (Barre-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1984; Broder et al. 1984).

1.2 Die Struktur des Humanen Immundefizienzvirus

Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) ist ein Retrovirus aus der Familie der Lentiviren. Als Retroviren bezeichnet man RNA-Viren, die durch das Enzym Reverse Transkriptase einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreiben können. Es gibt zwei genetisch unterschiedliche HIV-Typen, wobei HIV-1 der erfolgreichere der

beiden Typen ist und sich seit seiner Erstbeschreibung pandemisch ausgebreitet hat (Essex 1999). HIV-2 tritt nahezu ausschließlich endemisch in Westafrika auf.

HIV-1 wird in vier distinkte Gruppen aufgeteilt: M für „Majority“, O für „Outlier“ und N für „non-M/non-O“. 2009 wurde eine weitere bei Menschen vorkommende HIV-Gruppe bekannt, die eine enge genetische Verwandtschaft zu dem bei Gorillas auftretenden SIVgor besitzt und für die die Bezeichnung HIV-1 Gruppe P vorgeschlagen wurde (Plantier et al. 2009). Die Hauptuntergruppe M wird weiter unterteilt in die genetischen Subtypen A bis D, F bis H, J und K. Weiterhin existieren rekombinante Formen aus den verschiedenen Subtypen, die als „circulating recombinant forms“ (CRF) bezeichnet werden (Robertson et al. 2000). In Deutschland und Europa kommt vorwiegend HIV-1 Typ M und dabei überwiegend der Subtyp B vor. Der HIV-1 Typ O findet sich überwiegend in den Ländern Westafrikas, aber auch in Europa und den USA werden seit Mitte der 90er-Jahre Fälle dokumentiert (Gould et al. 1996; Hampl et al. 1995; Soriano et al. 1996).

Das HI-Virus besteht aus einem ca. 100 nm großen Viruspartikel, das von einer mit Glykoproteinen durchsetzten Lipiddoppelschicht umgeben wird. Die Lipiddoppelschicht wird im Verlauf der Virusausschleusung von der Zytoplasmamembran der Wirts-Zelle akquiriert und enthält die viralen Glykoproteine gp120 und gp41. Dabei bildet gp120 den externen und gp41 den transmembranösen Anteil. Die Matrix-

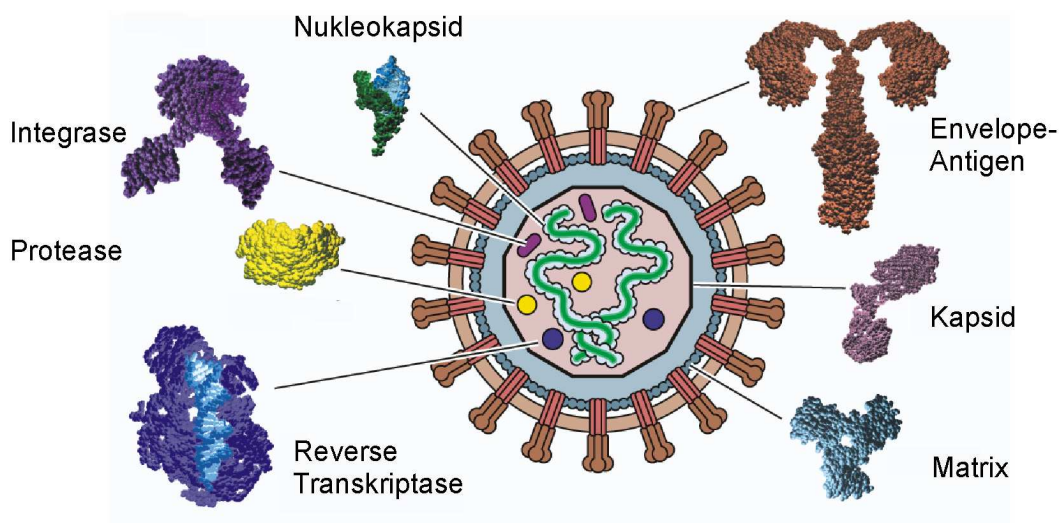


Abbildung 1.1: Struktur des HI-Virus, modifiziert nach Flint et al.

proteine p17 sind über Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Ein kleines Protein p6 verbindet das Kapsid mit der Hüllmembran. Das konische Nukleokapsid wird von dem Protein p24 gebildet und enthält zwei Kopien der HIV-RNA. Die RNA-Stränge sind jeweils mit dem Nukleokapsidprotein p7 und der Reversen Transkriptase komplexiert. Des Weiteren enthält das Kapsid noch andere Enzyme wie die Integrase und eine Protease.

Das HIV-Genom ist ca. 9 kB groß und besteht aus drei Genabschnitten, die in allen replizierenden Retroviren vorkommen, sowie aus sechs weiteren Genen. Zu den für die Replikation essentiellen Genen zählt man:

1. das *gag*-Gen, welches für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine (gruppenspezifische Antigene) kodiert,
2. das *pol*-Gen, welches für die Enzyme wie die Protease, Integrase und Reverse Transkriptase kodiert, und
3. das *env*-Gen, welches für die Glykoproteine der Virushülle („Envelope“) kodiert.

Aus dem *gag*-Gen und dem *pol*-Gen entsteht bei der Translation ein gemeinsames Vorläuferprotein, welches später durch die virale Protease in die endgültigen Proteine gespalten wird (Debouck et al. 1987).

Die weiteren Gene sind *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* und *nef*. Dabei sind *rev* (regulator of expression of virion proteins) und *tat* (transactivator of transcription) weitere essentielle Gene, die für Proteine kodieren, die für die Regulation der Transkription und Translation notwendig sind. Die restlichen Gene (*vif*, *vpu*, *vpr* und *nef*) werden als akzessorische Gene bezeichnet, da sie zumindest für die Virusreplikation *in vitro* nicht zwingend notwendig sind (Steffy, Wong-Staal 1991).

1.3 Krankheitsverlauf und Klinik

Der HIV-Krankheitsverlauf wird formal in drei verschiedene Stadien unterschieden:

1. Akute HIV-Infektion
2. Latenzphase
3. AIDS.

Weiterhin unterteilt man die Stadien nach klinischen Gesichtspunkten und nach Höhe der T-Helfer-Zellzahlen in die Kategorien A, B und C (Centers for Disease Control 1992).

Als AIDS-Erkrankte werden in Europa jene Patienten bezeichnet, die in die klinische Kategorie C fallen, d.h. an einer AIDS-definierenden Erkrankung leiden. In den USA zählt man außerdem noch alle Erkrankten mit einer CD4-Zellzahl kleiner 200/μl dazu. Wurde ein Patient im Verlauf seiner Erkrankung einmal in eine höhere Kategorie eingestuft, wird er auch nach Besserung nicht zurückgestuft, sondern bleibt immer in der höheren Kategorie, auch wenn die Symptome nach Therapie verschwinden oder die CD4-Zellzahl wieder ansteigt.

Die akute HIV-Infektion erfolgt ca. drei bis sechs Wochen nach der Übertragung von HI-Viren in den Organismus. Durch die massive Virusreplikation kommt es zu einer starken Immunantwort, die als akutes antiretrovirales Syndrom bezeichnet wird. Diese Immunantwort äußert sich in einem mononukleose- oder grippeähnlichen Bild und geht unter anderem mit Fieber, Hautauschlag, Lymphknotenschwellung, oralen Ulzera, Abgeschlagenheit und Pharyngitis einher (Vanhems, Beaulieu 1997). Sie dauert meist eine bis zwei Wochen, selten mehr als vier Wochen. Zu dieser Zeit sinkt die Anzahl der CD4-positiven Zellen, während die Anzahl der CD8-positiven Zellen als Teil der Immunantwort zunächst steigt (Borrow et al. 1994). Zum Ende der akuten Phase normalisieren sich die CD4- und CD8-positiven Zellen oder bleiben über einen längeren Zeitraum konstant erniedrigt bzw. erhöht. In der klinischen Latenzphase vermehrt sich das Virus vorwiegend im lymphatischen Gewebe, ohne dass eine wesentliche Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes des Patienten vorliegt. Diese Phase dauert je nach Viruslast und Therapie meist zehn Jahre oder länger.

1.4 Therapie

Die Behandlung der HIV-Erkrankung besteht aus zwei Therapiearmen: Der eine Arm schließt die Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten ein, während der zweite Therapiearm die gezielte antiretrovirale Therapie umfasst.

Der erste Arm dient der Impfprävention von Hepatitis B, Varizella-Zoster-Virus, Tetanus, Diphtherie, Influenza und Pneumokokken (STIKO 2005), jedoch nur wenn der aktuelle Immunstatus des Patienten dies zulässt. Weiterhin schließt dieser Arm

die umfassende Beratung über Infektionsquellen und die sofortige Behandlung auftretender (opportunistischer) Infektionskrankheiten ein, da der Patient mit der Zeit über allmählich abfallende CD4-positive Lymphozyten anfälliger für Infektionen wird (Centers for Disease Control 2002).

Die als Kombinationstherapie durchgeführte antiretrovirale Therapie (Hoch aktive antiretrovirale Therapie = HAART) wird seit Mitte der 90er-Jahre durchgeführt. Derzeit sind fünf Medikamentenklassen zur Therapie zugelassen (Cane 2009):

1. Nukleosidische- und Nukleotidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI/ Nukleodisanaloga und NtRTI/Nukleotidanaloga)
2. Non-Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)
3. Protease-Inhibitoren (PI)
4. Entry-Inhibitoren
5. Integrase-Inhibitoren.

Sowohl die NRTI als auch die NNRTI binden an die Reverse Transkriptase und verhindern so Umschreibung von RNA in DNA. Die nukleosidischen bzw. nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren binden als "falsche" Moleküle direkt an die Substratbindungsstelle und führen über eine kompetitive Hemmung zur Minderung der DNA-Synthesegeschwindigkeit. Im nachfolgenden Schritt ist durch Inkorporation des zumeist an dem Pentoserest modifizierten Nukleotids in das wachsende DNA-Molekül der Abbruch der DNA-Kette vorprogrammiert. NNRTI hingegen lagern sich außerhalb der Substratbindungsstelle an (allosterische Hemmung) und führen so zu einer Konformationsänderung der reversen Transkriptase, wodurch eine Enzymhemmung bedingt wird. In Kombination ergänzen sich die beiden Stoffgruppen in ihrer Wirkung.

Die Protease-Inhibitoren binden kompetitiv an die Substratbindungsstelle und hemmen auf diese Weise die virale Protease. Damit wird die Spaltung der *gag*- und *gag/pol*-Vorläuferproteine in die einzelnen funktionellen Komponenten der ausgereiften Viruspartikel verhindert.

Entry-Inhibitoren verhindern in einer frühen Phase des HIV-Replikationszyklus das Eindringen von HIV in die Wirtszelle. Aktuell sind zwei Entry-Inhibitoren zugelassen, weitere sind in der klinischen Erprobung. Enfuvirtide (T-20) bindet als Fusions-Inhibitor an die Fusionsdomäne des gp41. Damit wird der Prozess des *zippings* verhindert, in dessen Verlauf die Virus- und die Wirtszellmembran bis zur endgültigen

Membranfusion zueinander gebracht werden (Root, Steger 2004). Maraviroc bindet als Korezeptorantagonist an den Chemokinrezeptor CCR-5. Durch die Bindung wird eine Konformationsänderung des CCR-5 induziert, wodurch die weitere für den Fusionsprozess notwendige Bindung des HIV-CD4-Rezeptorkomplexes an CCR-5 verhindert wird (Jegede et al. 2008; Latinovic et al. 2004).

Die derzeit neueste Substanzklasse sind Integrase-Inhibitoren, die das virale Enzym Integrase hemmen, das für die Integration der Virus-RNA in die Wirts-DNA verantwortlich ist. Raltegravir, ein Diketon, führt als Chelat-Bildner von divalenten Kationen unmittelbar an der Integrase zu deren Arretierung in einer Intermediärform, so dass die Integration viraler DNA in chromosomale Wirts-DNA nicht mehr möglich ist (Pommier et al. 2005). In dieser Klasse ist Raltegravir bisher die einzige zugelassene Substanz (Hicks, Gulick 2009).

Jede HIV-Therapie ist eine Kombinationstherapie aus verschiedenen Präparaten. Für die Initialtherapie wird die Kombination aus zwei NRTI sowie einem NNRTI oder einem PI empfohlen (Yeni 2006). Das Therapiemonitoring erfolgt über die Nebenwirkungen, die Viruslast sowie die Zahl der CD4-positiven-T-Helferzellen.

Ziel einer HIV-Therapie ist die Absenkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze von 20-50 HIV-RNA-Kopien/ml, da die Viruslast ein wichtiges Kriterium für das outcome der Patienten darstellt (Mellors 1996). Ist das Therapieziel nach drei bis vier Monaten (in Ausnahmefällen nach sechs Monaten) nicht erreicht, so muss die antiretrovirale Therapie überprüft werden. Dies gilt auch, wenn die Viruslast nach einer Phase der Suppression wieder ansteigt (Deutsche AIDS-Gesellschaft 2008).

1.5 HIV-Untersuchungsablauf

Die HIV-Diagnose läuft in einem Stufenverfahren ab. Als Suchtest wird hierfür ein Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) verwendet. Dabei werden HIV-Antikörper und – je nach Testgeneration – auch das p24-Antigen nachgewiesen (Ly et al. 2001). Der Suchtest auf HIV-Antikörper ist auf eine sehr hohe Sensitivität angelegt (>99,5%) und besitzt dadurch eine relativ geringe Spezifität. Somit werden fast alle HIV-Infizierten auch zutreffend als infiziert erkannt, wobei jedoch eine hohe Rate falsch-positiver Ergebnisse in Kauf genommen werden muss. So gab es vor

allem in den ersten Testgenerationen viele falsch-positive Ergebnisse, ausgelöst durch Antikörper gegen HLA-Klasse-II-b-Antigene (Kühnl et al. 1985), die auch in einer Schwangerschaft auftreten können (Zacharias et al. 2004). Selbst kurz zurückliegende Grippeimpfungen produzierten temporär falsch-positive HIV-Ergebnisse (Mac Kenzie 1992). Die heute gebräuchliche Kombination des Nachweises von HIV-Antikörpern mit dem Nachweis des p24-Antigens (Combotest bzw. HIV-Test der 4. Generation) bewirkt einerseits, dass eine akute HIV-Infektion schon früher als sechs Wochen nach Infektion diagnostiziert werden kann, da mit dem p24-Antigen ein Virus-Produkt nachgewiesen wird. Andererseits erhöht sich die Spezifität des Testverfahrens durch die Kombination von zwei unabhängigen Markern (Brust et al. 2000).

Als Bestätigungstest dient der Westernblot oder Immunoblot. Der Westernblot ist als Festphasentest konzipiert, bei dem die viralen Antigene in nativer oder rekombinanter Form elektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Festphase dient in der Regel eine Nitrozellulosemembran. Die nicht antigen-besetzten Stellen auf dem Nitrozellulosestreifen werden mit Blockierungsagentien (meist Milchpulver) gesättigt, so dass bei der nachfolgenden Antikörperdetektion nur noch virale Antigene für die Immunreaktion zur Verfügung stehen. Es entsteht ein charakteristisches Bandenmuster. Ein Westernblot gilt in Deutschland als sicher positiv, sobald die Antikörper mit einem der verschiedenen *env*-Genprodukte und mindestens einem weiteren Genprodukt aus dem *pol*- oder *gag*-Bereich reagieren. Alle weiteren virusspezifischen Bandenmuster werden als fraglich angesehen und müssen weiter abgeklärt werden (DIN 58969 2000). Nach dieser Logik erfordert selbst ein negativer Bestätigungstest bei einem positiven Suchtest weitere Kontrollen, da der Bestätigungstest das p24-Antigen nicht mit erfasst, das in der Frühphase der Erkrankung nachweisbar wird. D.h. es sollte entweder ein weiterer Westernblot im Abstand von zwei bis drei Wochen durchgeführt werden oder bei einem hochgradigen Verdacht ein direkter Nachweis von HIV-RNA erfolgen.

Hersteller	Testverfahren	Untere Nachweisgrenze Kopien/ml	Linearer Bereich Kopien/ml
Roche	<i>Cobas Amplicor HIV-1 Monitor™</i> v1.5 (RT-PCR) UltraSensitiv-Verfahren	50	50-100.000
Abbott	<i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> (RT-PCR) 1,0 ml Probenvolumen	50	50-1.000.000
Bayer	<i>Quantiplex HIV-1 RNA</i> version 3.0 (bDNA)	50	100-500.000

Tabelle 1.1: Übersicht über die Leistungsdaten der quantitativen HIV-Nachweisverfahren im Jahr 2003

Zum direkten Nachweis von HIV-RNA im Rahmen eines HIV-Testes, bei Blutspenden sowie zur Messung der Viruslast unter Therapie wird eine PCR oder eine b-DNA-Bestimmung durchgeführt. Der direkte Nachweis von Virusnukleinsäuren wird als Nucleic Acid Amplification Technique (NAT) bezeichnet. In Deutschland ist die Polymerase-Ketten-Reaktion das derzeit am häufigsten verwendete Verfahren, da diese am sensitivsten ist.

Für die Untersuchung von Spenderblut bei Blutspenden wurde 2004 in Deutschland die Nucleic Acid Amplification Technique verbindlich eingeführt (Bundesärztekammer 2005). Vor Einführung dieses Verfahrens lag das theoretische Rest-Risiko einer HIV-Übertragung durch eine Bluttransfusion bei etwa 1:1 Million (Glück 1999) und ließ sich durch Einführung der NAT auf ca. 1:5,54 Millionen (Offergeld et al. 2005) bzw. nach alternativen Rechenmodellen auf etwa 1:4,3 Millionen (95% Vertrauensbereich 2,39 - 21,37 Millionen) senken (Hourfar et al. 2008).

Obwohl die PCR als sicherstes Verfahren anerkannt ist, können sporadische Übertragungen vorkommen, was an dem ersten Fall einer HIV-Subtyp-B-Übertragung durch ein Erythrozytenkonzentrat nach Einführung der NAT in Deutschland gezeigt wurde. Dabei war es 2007 am Kieler Universitätsklinikum bei einer Bluttransfusion im Rahmen einer Not-Operation zur Übertragung von HIV-positivem Blut auf einen HIV-negativen Empfänger gekommen. Das Spenderblut war bei der Erstuntersuchung in der Mini-Pool-Testung durch serologische Tests und durch den Roche CAP/CTM HIV-1 Test im 96-Pool als negativ befundet und somit

für die Blutspende freigegeben worden. Die im Rahmen des Rückverfolgungsverfahrens durchgeführten Untersuchungen hatten eine kritische Mutation in einer der Primer-Bindungsstellen detektiert, die durch das eingesetzte Roche-PCR-Verfahren dramatisch unterquantifiziert und damit für das initiale falsch-negative Testergebnis verantwortlich war (Schmidt et al. 2009). Die Freigabe des Spenderblutes durch den Blutspendedienst war somit schicksalhaft vorprogrammiert.

Fragestellung

Das Ziel dieser Studie ist der Vergleich des *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahrens von Abbott zum quantitativen Nachweis von HIV mit dem etablierten Verfahren des *HIV-1 Monitor™ Tests* von Roche. Dabei ist Folgendes zu klären:

1. Wie hoch ist die Übereinstimmung beider Tests?
2. Wie positionieren sich die Leistungsparameter des *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahrens von Abbott im Vergleich zum *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche?
3. Kann eine Umstellung des diagnostischen Verfahrens im Rahmen des Therapiemonitorings vom *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche auf das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott aus klinischer Sicht verantwortet werden?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und Patientenproben

Im Zeitraum von Mai 2003 bis September 2003 wurden 337 Proben von Patienten aus der Infektions-Ambulanz des Städtischen Krankenhauses Kiel untersucht, von denen 272 in die Auswertung gingen. Die Patienten befanden sich zum Teil in antiretroviraler Therapie, und die PCR-Diagnostik wurde zur Therapieüberwachung genutzt. Parallel zur klinischen Routineanalyse mit dem *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche wurden die Proben auch mit dem *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott untersucht.

2.2 Material

Fertigkits	Hersteller
<i>COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™</i> Specimen Preparation Kit	Roche Diagnostics
<i>COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™</i> Control Kit	Roche Diagnostics
<i>COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™</i> Amplification Kit	Roche Diagnostics
<i>COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™</i> Specific Detection Kit	Roche Diagnostics
<i>COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™</i> Generic Detection Kit	Roche Diagnostics
<i>COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™</i> Wash Buffer	Roche Diagnostics
<i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Amplifikations-/Detektionskit	Abbott
<i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Kontrollkit	Abbott
<i>LCx® HIV RNA Quantitativ</i> Kalibratorkit	Abbott
0,2 ml und 1,0 ml <i>QIAamp</i> Extraktionskit für virale Nukleinsäuren	Qiagen
<u>Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>
<i>LCx®</i> Inaktivierungsverdünnungsmittel	Abbott
<i>LCx®</i> Systemverdünnungsmittel	Abbott
<u>Geräte und Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
<i>COBAS AMPLICOR</i> Analyzer	Roche Diagnostics
<i>LCx®</i> Analysengerät	Abbott
<i>LCx®</i> Vakuumsystem	Abbott
<i>LCx®</i> Thermocycler	Abbott
20-1000µl Präzisionspipetten	Eppendorf

2.3 Methoden

2.3.1 PCR und RT-PCR – Theoretische Grundlagen

1984 entwickelte Mullis die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Abschnitten bestimmter Länge (Saiki et al. 1985). Voraussetzung für diese Methode ist die Kenntnis flankierender Nukleinsäuresequenzen, da sich die Primer an diese anlagern müssen. Das Verfahren besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung
2. Primeranlagerung
3. DNA-Synthese.

Im ersten Schritt wird die Lösung, welche die zu vervielfältigende DNA, die Primer, die Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) und die DNA-Polymerase enthält, kurzzeitig auf ca. 95°C erhitzt. Dadurch trennen sich die DNA-Stränge voneinander, und beim darauf folgenden Abkühlen auf ca. 54°C können sich die beiden Primer anlagern. Es werden unterschiedliche Primer für den 3'-5'-Strang und den 5'-3'-Strang verwendet. Diese lagern sich an den flankierenden Sequenzen oberhalb und unterhalb des Genabschnittes an, so dass die Polymerase jeweils in 3'-5'-Richtung arbeiten kann. Anschließend wird die Lösung auf ca. 72°C erwärmt, da dies die optimale Arbeits-Temperatur der Taq-Polymerase ist. Diese DNA-Polymerase wurde aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Die Polymerase verknüpft nun die Nukleotide miteinander, so dass ein durchgehender Strang entsteht. Dieser Vorgang dauert ca. 30 sec, danach sind die DNA-Stücke repliziert. Im Folgenden werden die Schritte mehrfach wiederholt, wobei auch die neu gebildeten Stücke als Matrizen dienen. Dadurch wird in kürzester Zeit eine hohe Vermehrungsrate erreicht (Storch 2007).

Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ist eine Sonderform der PCR, die es möglich macht, RNA zu vermehren. Dabei wird das über weite Bereiche thermostabile Enzym Tth-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* verwendet. Dieses Enzym besitzt sowohl die Fähigkeit zur DNA-Polymerisierung als auch die Fähigkeit zur reversen Transkription. Durch diese enzymatischen Eigenschaften kann der Prozess in einem geschlossenen System ablaufen (Myers, Gelfand 1991). Dabei werden zunächst die Primer an die RNA angelagert und anschließend durch die reverse Transkriptase zu einem cDNA-Strang verlängert (zur

RNA komplementärer DNA-Strang). Diese cDNA wird dann in der folgenden PCR als Matrize verwendet.

2.3.2 Grundsätzliches zur Arbeitsweise

Alle Arbeiten wurden in einem L2-Labor unter den dort geltenden Vorschriften durchgeführt. Kontaminationsprävention wurde durch die räumliche Trennung einzelner Arbeitsschritte erreicht. Des Weiteren wurden zu allen Testläufen negative und positive Proben mitgeführt.

2.3.3 COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, v. 1.5 von Roche Diagnostics

2.3.3.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung dient der Gewinnung der HIV-RNA aus den Viruspartikeln. Dazu wird bei dem Verfahren ein Extraktions-Kit mitgeliefert, welches auf der RNA-Ausfällung durch Alkohol beruht. Da die Proben mit dem Ultrasensitiv Verfahren untersucht werden, muss als erster Schritt das Plasma ultrazentrifugiert werden, um die Viruspartikel aufzukonzentrieren. Danach werden die Partikel durch eine chaotrope Substanz (Guanidin-Thiocyanat) in Lösung gebracht, und schließlich wird die HIV-RNA durch Alkohol ausgefällt.

2.3.3.2 PCR

Als Zielsequenz dient beim *HIV-1 Monitor™ Test* eine hochgradig konservierte Region von 155 Nukleotiden innerhalb des *gag*-Gens. Diese ermöglicht die Detektion von HIV-1 der Gruppe M.

Die RT-PCR läuft prinzipiell wie oben beschrieben ab, allerdings wird beim *HIV-1 Monitor™ Test* neben den o. g. dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) noch dUTP zugegeben, so dass die Amplifikate auch Uracil enthalten. Dies dient der Kontaminationsprävention, da durch Zugabe von AmpErase (Uracil-N-Glykosylase, UNG), einem Enzym, das desoxyuridinhaltige DNA-Stränge erkennt und zerstört, kontaminierende Amplifikate aus vorangegangenen PCR-Zyklen vor dem jeweils ersten Zyklus verdaut werden. Da die AmpErase ab 55°C inaktiv ist, zerstört sie keine neu gebildeten Sequenzen.

2.3.3.3 Detektion

Die verwendeten Primer sind an den 5'-Enden biotinyliert. Nach der Amplifikation werden zu dem Reaktionsgemisch Magnetpartikel zugegeben, die mit Oligonukleotidsonden beschichtet sind, welche an die biotin-markierten Amplifikate binden. Anschließend wird ein Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben, das über die Bildung eines stabilen Biotin-Avidin-Komplexes an die markierten Amplifikate bindet. Es folgen ein Waschschriff und die Zugabe einer Lösung aus Wasserstoffperoxid und 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Die an die Amplifikate gebundene Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von TMB, so dass ein Farbkomplex gebildet wird. Die Extinktion des Farbkomplexes wird im *Cobas Amplicor* Analyzer bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen, und so kann durch Vergleich mit dem Quantifizierungsstandard die Menge der in der Probe vorhandenen RNA-Kopien bestimmt werden.

2.3.4 **LCx® HIV RNA Quantitativ von Abbott**

2.3.4.1 Probenvorbereitung

Beim *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren dient die Probenvorbereitung einerseits der RNA-Gewinnung und andererseits auch der Entfernung infektiöser Stoffe und potentieller Amplifikations-Inhibitoren. Die RNA-Extraktion erfolgt mit Hilfe des *QIAamp® Extraktionskits* für virale Nukleinsäuren. Dabei wird die Plasmaprobe zunächst nach Zugabe eines Lysepuffers sowie einer Protease zentrifugiert. Anschließend wird die Lösung auf eine Silicagel-Säule aufgetragen, an welcher sich die RNA anlagert. Danach erfolgen Waschschriffe, um die Verunreinigungen zu entfernen. Schließlich wird die RNA mit Hilfe eines Elutionspuffers von der Säule eluiert.

2.3.4.2 PCR

Die Zielsequenz des *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahrens liegt in einer hochkonservierten Region des pol-Gens. Die Primer ermöglichen, dass nicht nur HIV-1 der Gruppe M erkannt werden, sondern auch HIV-1 der Gruppe O (Johanson et al. 2001). Die PCR läuft wie oben beschrieben ab.

2.3.4.3 Detektion

Die verwendeten Primer sind mit einem synthetischen Capture-Hapten-Molekül markiert. Am Ende der letzten Amplifikation binden spezifische Detektionssonden, die aus mit Antikörper beschichteten Mikropartikeln bestehen, an dieses Capture-Hapten-Molekül. Dann wird das Reaktionsgemisch auf eine Glasfibrermatrix gegeben, an die Mikropartikel irreversibel binden. Nach einem Waschvorgang wird die Glasfibrermatrix mit den gebundenen Partikeln mit alkalischer-Phosphatase-Konjugaten inkubiert, und 4-Methylumbelliferyl-Phosphat wird als Substrat hinzugegeben. Das Substrat wird umgesetzt, wobei ein Fluoreszenzsignal entsteht. Dieses Signal wird im LCx®-Analysengerät detektiert, und durch Vergleich mit dem internen Standard kann die Menge der RNA-Kopien in der Ausgangsprobe berechnet werden.

2.3.5 Generelles zur Auswertung

Beide Verfahren haben die Möglichkeit, mit verschiedenen Probenmengen unterschiedliche Nachweisbereiche zu umfassen. Je größer das initial eingesetzte Volumen ist, desto geringere Konzentrationen der HIV-RNA können detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils die sensitiveren Nachweismethoden mit dem größeren Probenvolumen angewendet. Im Rahmen des *HIV-1 Monitor™ Tests* von Roche benutzten wir das Ultrasensitiv-Verfahren mit 0,5 ml Probenvolumen. Beim *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott benutzten wir das Verfahren mit 1,0 ml Probenvolumen. Bei beiden Verfahren liegt laut Herstellerangaben die untere Nachweisgrenze bei 50 HIV-1-Kopien/ml.

Für die Datenauswertung wurde im Rahmen dieser Arbeit folgende Einstufung der Testergebnisse vorgenommen:

- Bei einer Konzentration ≥ 50 Kopien/ml wird das Testergebnis – auch oberhalb des linearen Detektionsbereiches – als "positiv" bewertet.
- Für die statistische Auswertung der Daten wurden im Rahmen dieser Studie Werte < 50 Kopien/ml als "negativ" bewertet.
- Unabhängig davon wurde jede Analyseprobe mit einem Ergebnis zwischen 0 und 50 Kopien/ml nach Möglichkeit einer Wiederholungsuntersuchung unterzogen.

2.3.6 Statistik

Die Daten wurden vor der statistischen Auswertung zur Dokumentation in Tabellen des Programms Microsoft® Excel 2002 eingegeben. Die statistische Auswertung der Daten und die grafische Darstellung erfolgten mit Hilfe der Programme Microsoft® Excel 2002, MedCalc (Mariakerke, Belgien) und SPSS 10.0 für Windows (SPSS Inc.).

		Merkmal		
		positiv	negativ	
Test	positiv	a richtig positiv	b falsch positiv	a+b
	negativ	c falsch negativ	d richtig negativ	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d = N
Sensitivität		$a / (a+c)$		
Spezifität		$d / (b+d)$		
Übereinstimmung beobachtet		$(a+d) / N$		
Übereinstimmung erwartet		$[(a+c)*(a+b)+(b+d)*(c+d)] / N^2$		
Kappa-Index	$\frac{\text{Übereinstimmung beobachtet} - \text{Übereinstimmung erwartet}}{1 - \text{Übereinstimmung erwartet}}$			
	<u>Kappa-Index</u>	<u>Übereinstimmung</u>		
	< 0,10	Keine		
	0,10 - 0,40	Schwach		
	>0,40 - 0,60	Deutlich		
	>0,60 - 0,80	Stark		
	>0,80 - 1,0	Fast vollständig		

Tabelle 2.1: Übersicht über häufig verwendete statistische Fachbegriffe

3. Ergebnisse

3.1 Vorbemerkung

Im Untersuchungszeitraum wurden insgesamt 337 Proben analysiert, von denen in die qualitative statistische Auswertung 272 Proben eingingen und von welchen wiederum 117 quantitativ untersucht wurden. In Abbildung 3.1 ist die Verteilung der analysierten Proben dargestellt.

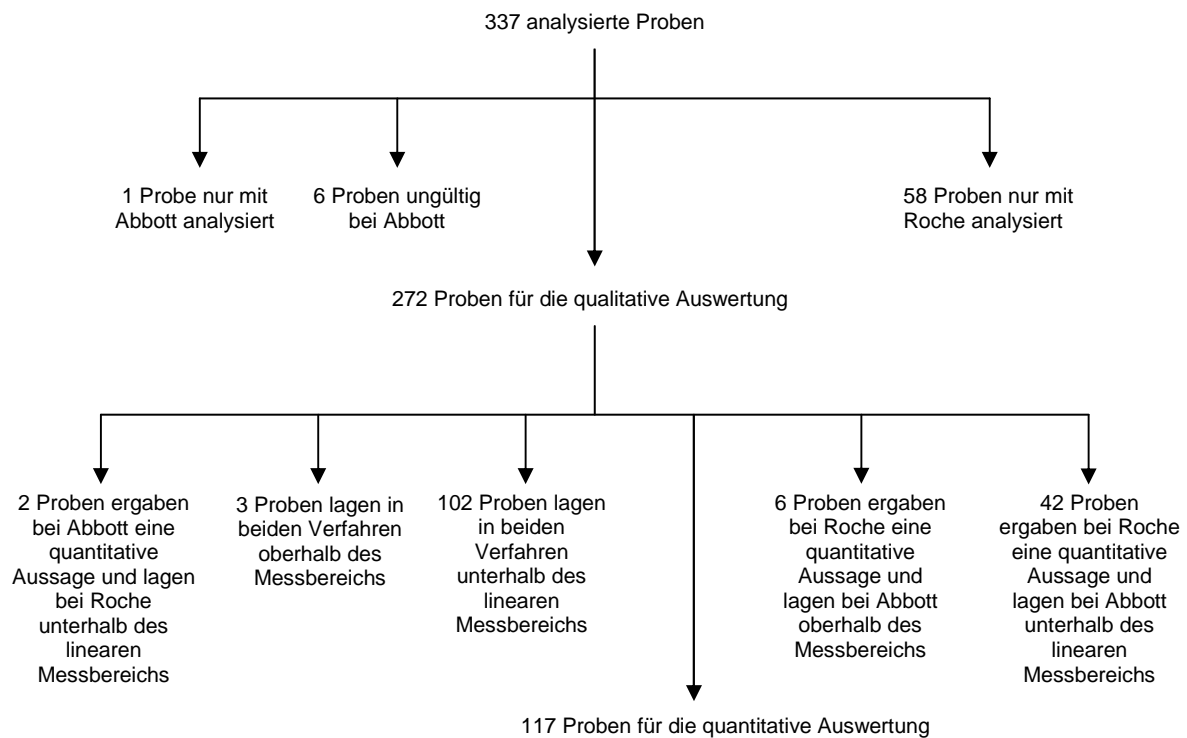


Abbildung 3.1: Flussdiagramm der analysierten Patientenproben

3.2 Tageskontrollen

Vor der technischen Freigabe eines Tests müssen die Herstellerangaben erfüllt sein, in denen die Grenzwerte für die

- Negativkontrolle
- Schwach positiv Kontrolle
- Hoch positiv Kontrolle

festgelegt sind. Unabhängig davon wurden die täglich erzielten Kontrollen protokolliert. Die Hersteller geben Grenzen für ihre Kontrollen an, die in den Tabellen 3.2 und 3.3 zu sehen sind.

Die Schwankungsbreite der durch den Hersteller erlaubten Werte umfasst jeweils ca. zwei lg-Stufen. Auf den folgenden Seiten sind in den Abbildungen 3.2 bis 3.5 die Verteilung der einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Chargen der Tageskontrollen als Box-and-Whisker-Plots dargestellt.

Hersteller	Zeitraum	Minimaler zugelassener Wert Kopien/ml	Maximaler zugelassener Wert Kopien/ml	minimaler zugelassener Wert lg Kopien/ml	maximaler zugelassener Wert lg Kopien/ml
Abbott, niedrig pos.	1	759	12.023	2,88	4,08
Abbott, hoch pos.	4	144.544	1.380.384	5,16	6,14
Abbott, niedrig pos.	2	339	29.512	2,53	4,47
Abbott, hoch pos.	5	45.709	2.187.763	4,66	6,34
Abbott, niedrig pos.	3	1.000	15.849	3	4,2
Abbott, hoch pos.	6	218.776	2.089.297	5,34	6,32

Tabelle 3.1: Angegebene Grenzwerte der unterschiedlichen Chargen der Tageskontrollen des Abbott LCx® HIV RNA Quantitativ Verfahrens in den Untersuchungszeiträumen 23.05. bis 27.06.03 (=1,4), 25.07. bis 08.09.03 (=2,5) und 09.09. bis 29.09.03 (=3,6)

Hersteller	Zeitraum	Minimaler zugelassener Wert Kopien/ml	Maximaler zugelassener Wert Kopien/ml	minimaler zugelassener Wert lg Kopien/ml	maximaler zugelassener Wert lg Kopien/ml
Roche, niedrig pos.	1	89	6.500	1,898	4,041
Roche, hoch pos.	3	800	100.000	2,903	5
Roche, niedrig pos.	2	79	11.000	1,949	3,813
Roche, hoch pos.	4	1.300	100.000	3,114	5

Tabelle 3.2: Angegebene Grenzwerte der unterschiedlichen Chargen der Tageskontrollen des Roche HIV-1 Monitor™ Tests in den Untersuchungszeiträumen 11.06. bis 20.08.03 (=1,3) und 22.08. bis 07.09.03 (=2,4)

Aufgrund der Besonderheiten des PCR-Verfahrens sind auf der linken Seite die Nominalwerte, auf der rechten Seite jeweils die logarithmierten Werte dargestellt.

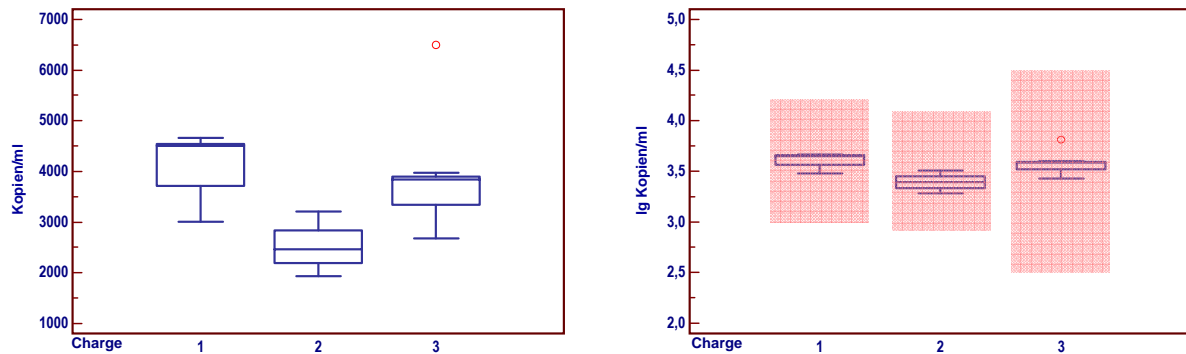


Abbildung 3.2: Darstellung der Tageskontrollen der schwach positiv Proben des LCx® HIV RNA Quantitativ Verfahrens von Abbott in den Untersuchungszeiträumen 23.05. bis 27.06.03 (=1), 25.07. bis 08.09.03 (=2) und 09.09. bis 29.09.03 (=3)

In der linken Abbildung sind die Werte numerisch auf der y-Achse aufgetragen, in der rechten Abbildung als logarithmierte Werte. Rosa hinterlegt sind die vom Hersteller angegebenen Bereiche, in denen die Ergebnisse liegen müssen, damit der Test freigegeben werden darf.

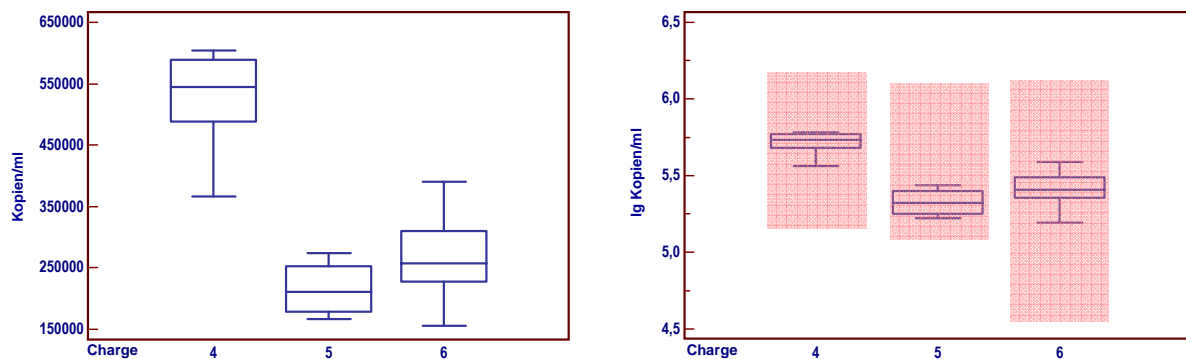


Abbildung 3.3: Darstellung der Tageskontrollen der hoch positiv Proben des LCx® HIV RNA Quantitativ Verfahrens von Abbott in den Untersuchungszeiträumen 23.05. bis 27.06.03 (=4), 25.07. bis 08.09.03 (=5) und 09.09. bis 29.09.03 (=6)

In der linken Abbildung sind die Werte numerisch auf der y-Achse aufgetragen, in der rechten Abbildung als logarithmierte Werte. Rosa hinterlegt sind die vom Hersteller angegebenen Bereiche, in denen die Ergebnisse liegen müssen, damit der Test freigegeben werden darf.

In den Abbildungen zeigen sich einzelne Ausreißer, die sich jedoch in den vom Hersteller angegebenen Grenzen positionieren. Die Negativkontrollen waren durchgehend alle negativ und werden hier nicht grafisch dargestellt.

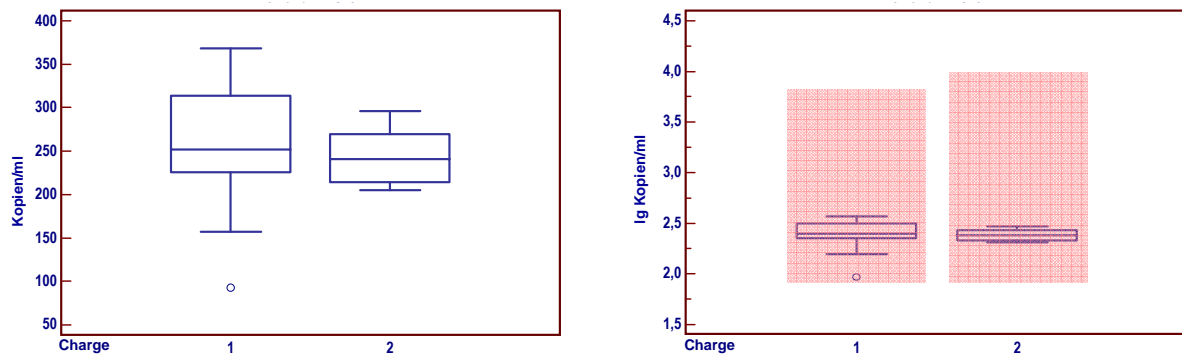


Abbildung 3.4: Darstellung der Tageskontrollen der schwach positiv Proben des HIV-1 Monitor™ Tests von Roche in den Untersuchungszeiträumen 11.06. bis 20.08.03 (=1) und 22.08. bis 07.09.03 (=2)

In der linken Abbildung sind die Werte numerisch auf der y-Achse aufgetragen, in der rechten Abbildung als logarithmierte Werte. Rosa hinterlegt sind die vom Hersteller angegebenen Bereiche, in denen die Ergebnisse liegen müssen, damit der Test freigegeben werden darf.

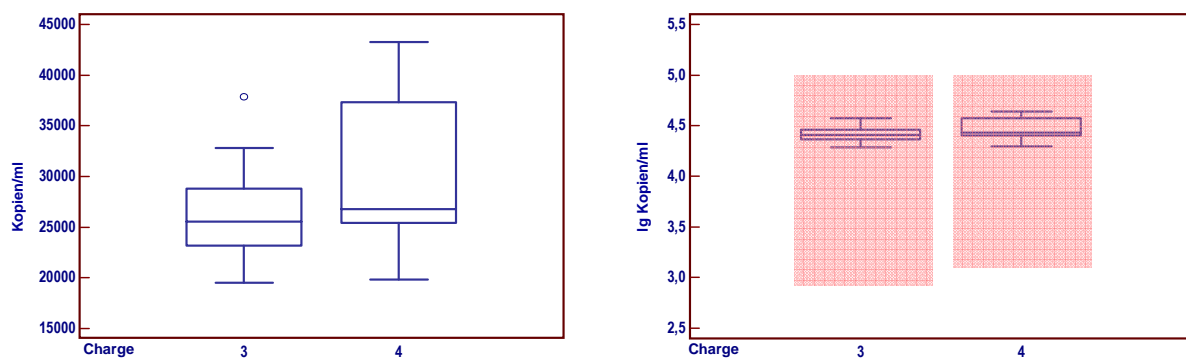


Abbildung 3.5: Darstellung der Tageskontrollen der hoch positiv Proben des HIV-1 Monitor™ Tests von Roche in den Untersuchungszeiträumen 11.06. bis 20.08.03 (=3) und 22.08. bis 07.09.03 (=4)

In der linken Abbildung sind die Werte numerisch auf der y-Achse aufgetragen, in der rechten Abbildung als logarithmierte Werte. Rosa hinterlegt sind die vom Hersteller angegebenen Bereiche, in denen die Ergebnisse liegen müssen, damit der Test freigegeben werden darf.

3.3 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der beiden Verfahren

Zur grafischen Darstellung der quantitativen Bestimmung der beiden Testsysteme wurde eine doppelt-logarithmische Grafik eingesetzt (siehe Abbildung 3.6). Als unabhängiges Merkmal wurden hierbei die Testergebnisse des *HIV-1 Monitor™* Tests von Roche gegen die Ergebnisse des *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahrens von Abbott aufgetragen.

Für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurden in dieser Arbeit alle quantitativen Werte verwendet, obwohl laut Herstellerangaben erst ab 50 Kopien/ml der lineare Bereich beider Verfahren beginnt. Die grafische Darstellung zeigt eine Regressionsgerade mit einer Steigung von $m = 0,9741$. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt 0,971.

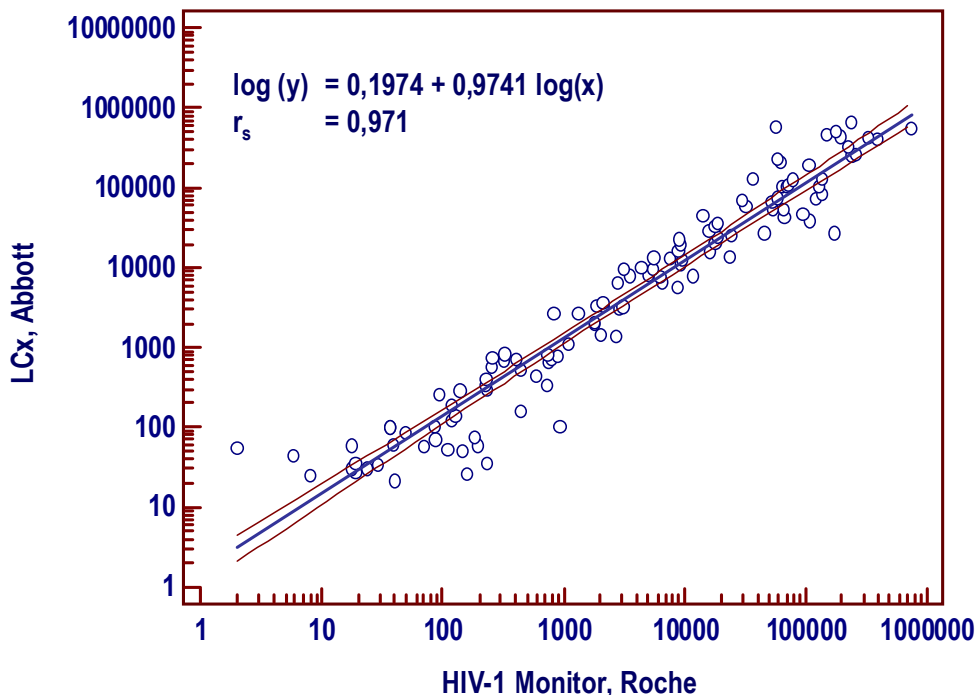


Abbildung 3.6: Vergleich der Viruslastbestimmung durch den Roche *HIV-1 Monitor™* Test und durch das Abbott *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren

Die einzelnen Wertepaare sind als Kreise dargestellt, die mittlere Linie zeigt die Regressionsgerade, die beiden äußeren Linien zeigen das 95%-Intervall für die Regressionsgerade.

Probe	Viruslast Roche, Kopien/ml	Viruslast Abbott, Kopien/ml	Faktor Roche/Abbott
1	2	55	0,04
2	57.500	577.360	0,10
3	6	44	0,14
4	160	26	6,15
5	175.000	27.283	6,41
6	236	35	6,74
7	945	104	9,09

Tabelle 3.3: Übersicht über Patienten-Serumproben mit gravierend unterschiedlichen Viruslastbestimmungen

Bei der quantitativen Betrachtung fielen sieben Werte auf, die sich mindestens um den Faktor vier (entsprechend zwei PCR-Zyklen) voneinander unterschieden. Diese Werte sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Die Unterschiede zeigen sich sowohl im hohen als auch im niedrigen Viruslastbereich und sind vom Hersteller unabhängig.

3.4 Vergleich der testspezifischen Leistungsparameter

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahrens von Abbott wurden die Ergebnisse mit dem *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche als Standard-Verfahren verglichen. Daraus ergibt sich, dass die Spezifität und Sensitivität nur relative Werte in Bezug auf den *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche sind, da das Verfahren nicht den Gold-Standard darstellt.

Tabelle 3.4 zeigt die erzielten Ergebnisse sowie die Vier-Felder-Tafel. Bei einer Übereinstimmung von 96% (261 von 272 Proben) ergibt sich ein Kappa-Index von 0,917, der eine *fast vollständige Übereinstimmung* der beiden Verfahren zeigt. Damit können die Tests als qualitativ gleichwertig betrachtet werden.

		Roche		
		positiv	negativ	
Abbott	positiv	150	4	154
	negativ	7	111	118
		157	115	272

Sensitivität	relativ zum Roche HIV-1 Monitor™ Test	0,955
Spezifität	relativ zum Roche HIV-1 Monitor™ Test	0,956

Übereinstimmung beobachtet	0,960
Übereinstimmung erwartet	0,510

Kappa-Index	0,917
--------------------	-------

Tabelle 3.4: Qualitativer Vergleich der beiden Testverfahren

3.4 Vorstellung von zwei Patientenverläufen

Wie oben beschrieben ist für die Therapieüberwachung u.a. ein regelmäßiges Monitoring der Viruslast der Patienten notwendig. Deshalb sollen hier beispielhaft zwei Patienten vorgestellt werden, von denen konsekutive Seren zur Bestimmung der Viruslast vorlagen.

3.4.1 Patient 1, männlich, geb. 1944

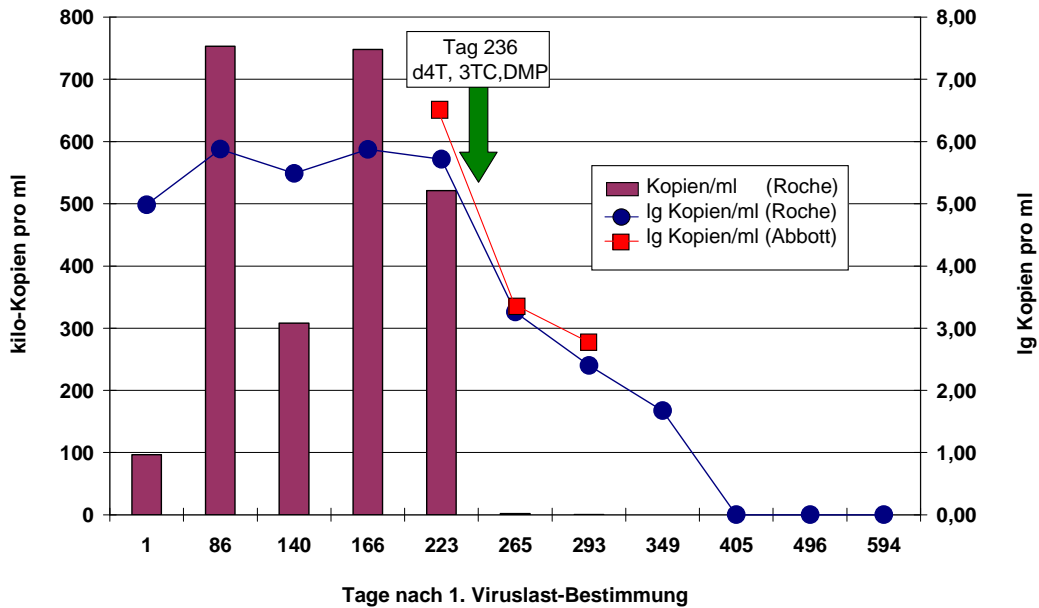


Abbildung 3.7: Verlauf der Viruslast des Patienten 1 unter der Therapie mit Zerit®, Epivir® und Efavirenz® (Details siehe Begleittext)
Zu beachten sind die beiden unabhängig voneinander verlaufenden Ordinaten

Bei dem Patienten 1 erfolgten innerhalb des Untersuchungszeitraums von Juni bis August 2003 drei gemeinsame Kontrollen. In der Abbildung 3.7 ist der zeitliche Verlauf der Viruslast dargestellt. Beide Testverfahren zeigten bei der Bestimmung der Viruslast nahezu gleiche Werte, die mit einer Abnahme um mehr als zwei Ig-Stufen verbunden war. Im Verlauf der Therapie sank die Viruslast unter die Nachweisgrenze, womit ein vollständiger Therapieerfolg zu konstatieren ist.

Die Erstdiagnose einer HIV-Infektion war bei diesem Patienten im Oktober 2002 gestellt worden. Im Juni 2003 wurde eine antiretrovirale Therapie begonnen, die zunächst aus Zerit® (Stavudin, d4T, ein NRTI), Epivir® (Lamivudin, 3TC, ein NRTI) sowie Efavirenz® (Sustiva, DMP-266, ein NNRTI) bestand und zu einem deutlichen Abfall der Viruslast führte. Aufgrund von Nebenwirkungen wurde im August 2003 Zerit® gegen Viread® (Tenofovir-Disoproxil-Fumarat, TDF, ein NtRTI) ausgetauscht, was aber nicht zu einem erneuten Anstieg der Viruslast führte. Der Patient wird bis heute mit dieser Kombination behandelt.

3.4.2 Patient 2, männlich, geb. 1960

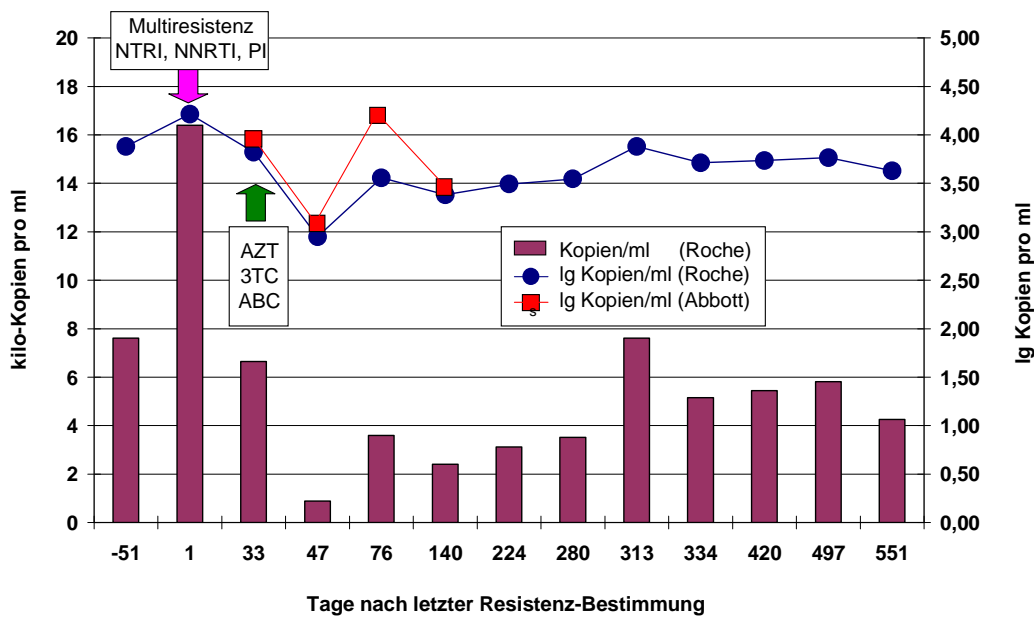


Abbildung 3.8: Verlauf der Viruslast des Patienten 2 nach Resistenztestung und Therapieumstellung auf Trizivir®
Zu beachten sind die beiden unabhängig voneinander verlaufenden Ordinaten

Bei dem Patienten 2 erfolgten innerhalb des Untersuchungszeitraumes vier Kontrollen über den Zeitraum Mai bis August 2003. Die Viruslast schwankte während dieser Zeit um $10^{3,5}$ Kopien/ml. Die Abbildung 3.8 zeigt den zeitlichen Verlauf der Kontrollen innerhalb des untersuchten Zeitraumes, dabei sieht man einen weitgehend parallelen Verlauf der beiden Kurven.

Die Erstdiagnose einer HIV-Infektion wurde bei diesem Patienten 1995 gestellt. Seitdem wurde er mit verschiedenen antiretroviralen Therapie-Regimen behandelt. Im Januar 2003 erfolgte eine Resistenzbestimmung, in deren Rahmen Resistenzen gegen alle damals verfügbaren NRTI, NNRTI und PI nachgewiesen wurden. Der Patient wies Mutationen gegen Thymidinanaloga auf, die mit einer Kreuzresistenz gegenüber allen zu dieser Zeit verfügbaren Nucleosidanaloga verbunden waren. Trotzdem wurde im Februar 2003 ein Therapieversuch mit Trizivir® (Kombinationspräparat aus den drei NRTI Zidovudin/AZT, Lamivudin/3TC und Abacavir/ABC) begonnen. Darunter zeigte sich initial eine durch beide Testsysteme dokumentierte Reduktion der Viruslast um eine Ig-Stufe. Die Nachhaltigkeit dieser Therapie konnte aber in den Folgeuntersuchungen nicht belegt werden.

Das Versagen dieser Therapie ist vermutlich auf mehrfach vorkommende Thymidin-Analoga-Mutationen zurückzuführen, die eine mehr als 100-fach verminderte Empfindlichkeit gegenüber Zidovudin verursacht. Weiterhin liegt bei diesem Patienten eine Mutation im *M184V*-Gen vor, durch welche mit einer mehr als fünf-fachen Reduktion der Empfindlichkeit gegenüber Abacavir sowie einer Resistenz gegen Lamivudin zu rechnen ist. Andererseits bedingt diese Mutation eine 40-60%ige Reduktion der Replikationsfähigkeit des HI-Virus sowie eine gewisse Resensitivierung gegenüber Zidovudin (Wolf, Braun 2009), wodurch die Viruslast bei diesem Patienten im Verlauf nicht wesentlich anstieg. Da zu diesem Zeitpunkt Therapiealternativen fehlten, der Patient sich immunologisch nicht verschlechterte und die Viruslast nicht anstieg, wurde die Therapie so weitergeführt.

4. Diskussion

Sowohl im Rahmen der HIV-Therapie als auch beim Screening von Blutspendern sind Verfahren zum Nachweis von HIV erforderlich, die möglichst viele Typen und Subtypen des HI-Virus erkennen. An die Testverfahren werden höchste Ansprüche bezüglich Reproduzierbarkeit und Linearität gestellt, um die Therapie optimal steuern zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei PCR-Verfahren zum Nachweis von HIV-RNA miteinander verglichen. Beide Verfahren sind reverse Transkriptase-PCRs, die sich in der Wahl ihrer Primer unterscheiden. Der *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche verwendet als Zielsequenz eine konservierte Region innerhalb des *gag*-Gens, mit Hilfe derer HIV-1 der Gruppe M detektiert wird. Das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott hingegen verwendet als Zielsequenz eine konservierte Region des *pol*-Gens, die neben der Detektion von HIV-1 der Gruppe M auch noch die Detektion der Gruppe O ermöglicht und somit das Spektrum der HIV-Diagnostik erweitert.

4.1 Bewertung der Testverfahren

Bei allen Tageskontrollen wurden die vom Hersteller angegebenen Kriterien für die Positiv- und Negativ-Kontrollen erfüllt (siehe Abbildungen 3.2 bis 3.5). In den Tageskontrollen des *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahrens gab es einen Wert, der außerhalb des 95%-Intervalls der Box-and-Whisker-Plots lag, sich jedoch in dem vom Hersteller angegebenen erlaubten Ergebnisbereich bewegte. Laut Herstellerangaben dürfen die Chargenkontrollen knapp eine bis knapp zwei Ig-Stufen umfassen. Im Vergleich der beiden Testverfahren auf Linearität ergibt die Regressionsanalyse eine Steigung von $m = 0,9741$, was einer nahezu linearen Übereinstimmung der beiden Testverfahren entspricht und weitestgehend einen 1:1 Datenvergleich ermöglicht.

Bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergibt sich ein Wert von $r_s = 0,971$, womit die Stärke des linearen Zusammenhanges unterstrichen wird. Darüber hinaus zeigt die Viruslastbestimmung durch beide Testverfahren nahezu numerische Übereinstimmung, so dass damit ein direkter Vergleich der Daten möglich ist. Die Unterschiede in der Viruslasthöhe der sieben Proben, die sich

um den Faktor vier oder höher in den verschiedenen Testverfahren voneinander unterscheiden, sind am ehesten auf diskrete Punktmutationen zurückzuführen, die eine feste Bindung des Primers an die Bindungsstelle beeinträchtigen.

Erstautor, Jahr	Probenanzahl	Korrelationskoeffizient auf Linearität	Kommentar
Johanson, 2001	149 Proben	0,864	HIV-1 Proben Für Proben mit weniger als 400 Kopien/ml wurde das Ultrasensitiv Verfahren von Roche angewendet.
Swanson, 2001	273 Proben	0,949	Überwiegend Gruppe M mit allen Subtypen, zwei Proben von Gruppe O
Berger, 2001	174 Proben	0,949	HIV-1 Proben, von 39 Proben Verdünnungsserien
Troonen, 2002	198 Proben	0,930	Nur Typ B HIV-1
De Mendoza, 2002	101 Proben	0,965	HIV-1 Proben
Plantier, 2003	133 M-Typen	0,958	M-Gruppe
Katsoulidou, 2004	148 Proben	0,960	HIV-1 Proben
Swanson, 2005	97 Proben	0,689	Ausgesuchte Subtypen aus Kamerun, Brasilien und Südafrika
Eigene Arbeit, 2003	117 Proben	0,971	Prospektive Studie mit Daten aus der Infektionsambulanz Kiel

Tabelle 4.1: Vergleich des *Cobas Amplicor HIV-1 Monitor*TM Tests von Roche mit dem *LCx*[®] *HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott in der Literatur

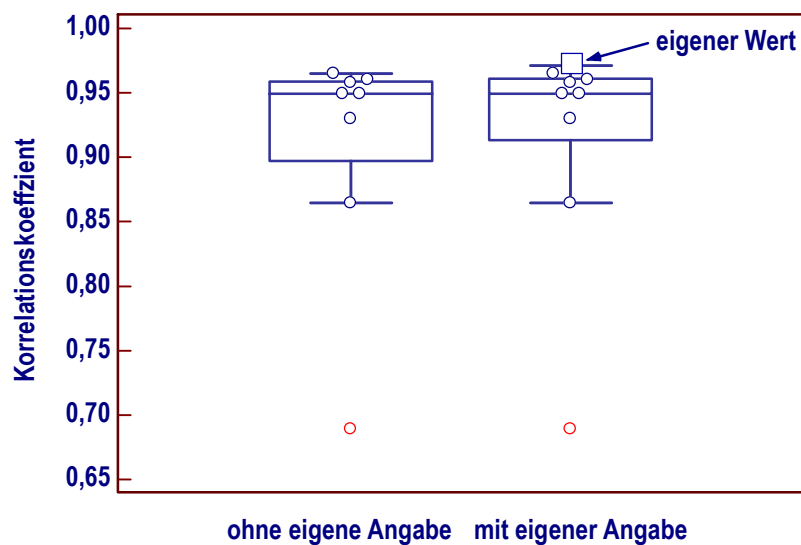


Abbildung 4.1: Vergleich zwischen den Literaturdaten zu den Korrelationskoeffizienten auf Linearität des *Cobas Amplicor HIV-1 Monitor*TM Test von Roche und des *LCx*[®] *HIV RNA Quantitativ* Verfahrens von Abbott

Nach Recherche im Internet über pubmed fanden sich über die Stichworte „HIV“, „LCx“ und „Amplicor“ sowie über Querverweise in der Literatur insgesamt acht Arbeiten, die sich mit dem Vergleich der beiden Verfahren beschäftigen und die in Tabelle 4.1 aufgelistet werden.

Im Gegensatz zu den Daten aus der Literatur erfolgte in der vorliegenden Arbeit keine Aufschlüsselung der Subtypen. Da die Proben jedoch aus der Infektionsambulanz des Städtischen Krankenhauses Kiel stammen, ist zum betreffenden Untersuchungszeitraum von einem Überwiegen des HIV-1 M-Typen auszugehen. Der Korrelationskoeffizient in der vorliegenden Arbeit entspricht denen der oben genannten Arbeiten, die sich nur mit HIV-1 beschäftigen.

Deutlich weicht der Korrelationskoeffizient der Arbeit von Swanson et al. (2005) von allen anderen Korrelationskoeffizienten ab. Hierfür können jedoch treffliche Argumente herangezogen werden: Im Rahmen dieser Studie wurden 97 Seren mittels vier unabhängiger Testverfahren überprüft, von denen eines das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott und eines der *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche war. Aufgrund der Probenauswahl war in dem Kollektiv der Anteil der B-Typen niedrig (17 von 97), während der Rekombinantenanteil hoch war (23 von 97), so dass eine große genetische Variabilität zwischen den Proben vorlag. Das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren stufte 97 der insgesamt 97 Proben positiv auf HIV ein, während der *HIV-1 Monitor™ Test* 92 von 97 Proben (28 von 29 HIV-1 Typ C, 20 von 22 CRF02_AG und 0 von 2 HIV-1 Gruppe O) als HIV-positiv erkannte. Ohne dass hierfür valide Sequenzierungsdaten vorliegen, ist dieser Umstand aus unserer Sicht am ehesten auf Mutationen in der Primerbindungsstelle in dem exotischen Probenkollektiv zurückzuführen.

Im Rahmen der statistischen Auswertung erfolgte die Darstellung der Werte als Vier-Felder-Tafel mit der Berechnung des Kappa-Index. Der Kappa-Index als Maß für die Übereinstimmung weist einen Wert von 0,917 auf, was nach der Nomenklatur als *fast vollständige Übereinstimmung* eingestuft werden muss. In der Vier-Felder-Tafel ist zu sehen, dass von den 272 qualitativen Werten 261 übereinstimmende Werte haben, die restlichen elf sich jedoch statistisch signifikant unterscheiden. Die Abbildung 4.2 zeigt die grafische Darstellung der elf Werte, wobei zur besseren grafischen

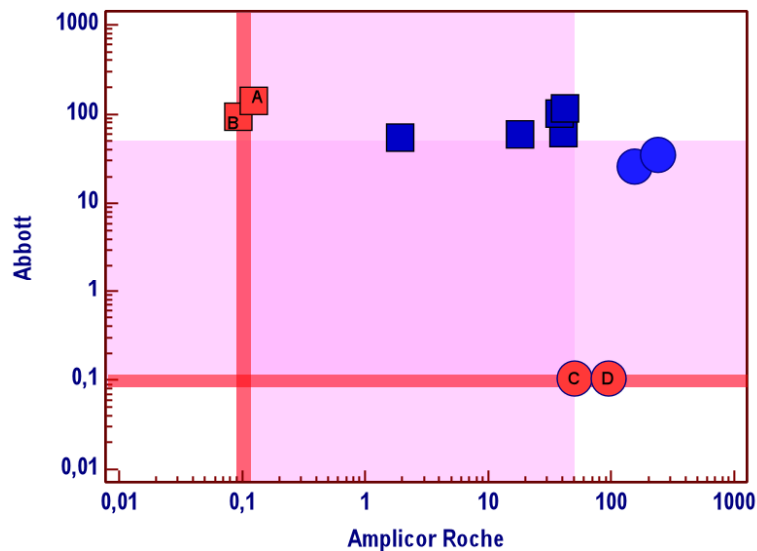


Abbildung 4.2: Darstellung diskordanter Ergebnisse (Tabelle 3.4, Seite 23)

Als Quadrat sind diejenigen dargestellt, die im *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott mehr als 50 Kopien/ml und im *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche weniger als 50 Kopien/ml ergaben. Als Kreis sind diejenigen Ergebnisse dargestellt, die im *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche mehr als 50 Kopien/ml und im *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott weniger als 50 Kopien/ml ergaben. Mit Buchstaben bezeichnet sind die klinisch signifikanten Werte dargestellt. Da die Werte logarithmisch dargestellt sind, wurde der Wert „Null“ mit 0,1 gleichgesetzt.

Darstellung der logarithmischen Werte der Wert Null mit 0,1 gleichgesetzt wurde. Auf den roten 0,1-Horizontalen und 0,1-Vertikalen liegen die mit A/B und C/D bezeichneten Werte, die klinische Bedeutung haben, da hier diskrepante Werte zwischen den beiden Testverfahren bestehen. Sie kommen dadurch zustande, dass ein Verfahren keine Viruslast nachweist und das andere Verfahren eine Viruslast zeigt. Hierbei liegt die Fehlerrate bei jedem Hersteller gemessen an dem anderen Hersteller unter 1%.

Die sieben anderen Ausreißer unterscheiden sich nur durch die Höhe der Viruslast und sind somit zwar statistisch signifikant, da im Rahmen der Definition einer 50 Kopien/ml-Grenze das eine Verfahren ein negatives Ergebnis, das andere jedoch einen positiven Wert ergibt. Allerdings ist dies nicht klinisch relevant, da jedes positive Ergebnis unabhängig von dessen Höhe als kontrollbedürftig zu werten ist.

4.2 Bedeutung für das klinische Monitoring

Für das klinische Monitoring sind wie oben erwähnt die möglichst verlässliche Detektion der Viruslast, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die Detektion eines möglichst breiten Spektrums von Subtypen notwendig. Im Vergleich zwischen

dem *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott und dem *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche zeigt sich, dass die beiden Verfahren statistisch *fast vollständig* übereinstimmen. Bei der Auswertung fallen elf Werte auf, die sich in den beiden Verfahren statistisch signifikant (im Sinne von positiv und negativ im Rahmen der 50 Kopien/ml-Grenze) unterscheiden. Vier Werte differieren auch klinisch relevant, da sie in dem einen Verfahren den Wert Null und in dem anderen Verfahren einen Wert größer Null ergeben. Da es aber jeweils zwei Proben pro Verfahren waren, lässt sich hier kein Vorteil für das eine oder andere Verfahren finden.

Der Anteil der aus Hochprävalenz-Ländern zugewanderten HIV-Infizierten ist in den 90er-Jahren deutlich angestiegen und seitdem weitgehend konstant geblieben (Robert-Koch-Institut 2009). Innerhalb dieser Gruppe hat der Anteil der HIV-infizierten Frauen in den letzten Jahren zugenommen. Diese Gruppe stellt derzeit bei allen in Deutschland an AIDS erkrankten Frauen den größten Anteil dar, und in dieser Gruppe haben Frauen aus dem Subsahara-Afrika wiederum den größten Anteil. Da in Afrika andere HIV-Genotypen als in Europa vorherrschen, ist es aufgrund der Migration wünschenswert, dass die derzeit verwendeten Testverfahren neben der Gruppe M noch weitere Gruppen erkennen.

Insbesondere in Anbetracht der potentiellen HIV-Übertragung durch Blutspenden sollte hierbei eine maximale Sensitivität zum Nachweis der HIV-Typen, -Subtypen und rekombinanten Formen bestehen (Rox et al. 2004; Brand et al. 2004). Die Tabelle 4.2 zeigt die Verteilung der in Kiel analysierten Typen der HIV-Infektion von 2008 bis 2009. Es wurden in diesem Zeitraum Proben von 93 Patienten sequenziert, wobei es sich überwiegend um Erstsequenzierungen handelte.

Das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott weist den Vorteil auf, auch den HIV-O-Typ zu erfassen, obwohl dieser in Deutschland und insbesondere in Schleswig-Holstein eher keine Rolle spielt, wie aus Abbildung 4.3 und Tabelle 4.2 hervorgeht.

Subtyp	Anzahl	%	95% Vertrauensintervall
A	3	2,9	0,75-8,89
B	78	75,7	66,10-83,39
C	3	2,9	0,75-8,89
D	2	1,9	0,33-7,52
F	1	1,0	0,05-6,06
G	1	1,0	0,05-6,06
CRF gesamt	15	14,6	8,65-23,20
CRF 01_AE	6	5,8	2,39-12,75
CRF 02_AG	6	5,8	2,39-12,75
CRF 06_CPX	1	1,0	0,05-6,06
CRF 11_CPX	2	1,9	0,33-7,52
gesamt	103	100,0	

Tabelle 4.2.: Verteilung der HIV-Subtypen 2008 bis 2009 in Kiel

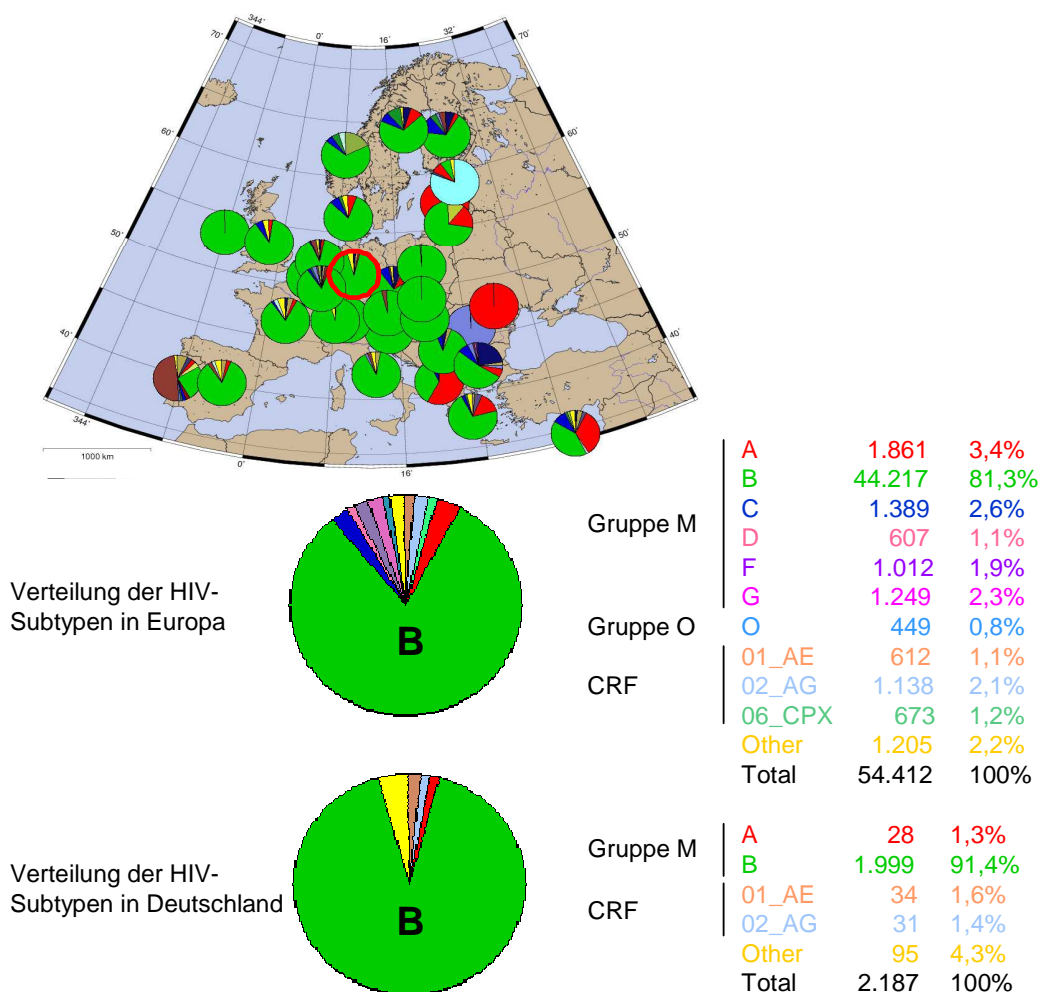


Abbildung 4.3: Verteilung der HIV-Subtypen in Europa und in Deutschland (modifiziert nach HIV-Database des Los Alamos National Laboratory <http://hiv-web.lanl.gov>), Abfrage vom 19.01.2010

Insbesondere mit Blick auf den 2009 publizierten Fall der ersten Übertragung von HIV nach der behördlich vorgeschriebenen Einführung des NAT im Jahr 2004 im Rahmen einer Bluttransfusion in Kiel (Schmidt et al. 2009) ist zum Schutz von Patienten eine genaue Erfassung von vielen HIV-(Sub-)Typen wichtig. In diesem betreffenden Fall wurde das Spenderblut im Rahmen der Erstuntersuchung in der Mini-Pool-Testung durch serologische Tests und durch den Roche CAP/CTM HIV-1 Test im 96-Pool als negativ befundet und somit für die Blutspende freigegeben. Nachdem die HIV-Übertragung offenkundig geworden war, konnte im Verlauf der Recherchen unter Einsatz diverser zugelassener PCR-Verfahren und HIV-Gensequenzanalysen die Ursache dieses Unglücksfalles geklärt werden: Die betreffende HIV-1 Subtyp B-Variante des Spenders war aufgrund einer Mutation in einer der Primer-Bindungsstellen des *gag*-Genbereiches durch das eingesetzte Roche-PCR-Verfahren dramatisch unterquantifiziert worden und führte so zu einem initialen falsch-negativen Testergebnis, so dass die Freigabe des Spenderblutes durch den Blutspendedienst erfolgte.

Dieser Fall zeigt, dass es wichtig ist, über ein Verfahren zu verfügen, das möglichst viele Subtypen erkennt. Dies ist dadurch realisierbar, dass eine möglichst hoch konservierte Region als Zielregion des Primers gewählt wird und dass verschiedene Primer und damit Zielregionen miteinander kombiniert werden.

In Anbetracht der Ergebnisse ist eine Umstellung von dem *HIV-1 MonitorTM Test* von Roche auf das *LCx[®] HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott prinzipiell möglich, da die Verfahren übereinstimmende Werte erbringen. Bei Neuanschaffung eines Gerätes ist das *LCx[®] HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott dem *HIV-1 MonitorTM Test* von Roche vorzuziehen, da es mehr Subtypen erkennt, die zwar aktuell in Deutschland nicht vorherrschend sind, aber für künftige Entwicklungen nicht vernachlässigt werden sollten.

5. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung des HI-Virus in den 80er-Jahren spielt die Diagnostik der Infektion sowohl im Zusammenhang mit dem Therapiemonitoring als auch im Rahmen von Bluttransfusionen eine große Rolle.

Im Jahr 2003 wurden innerhalb von fünf Monaten über 300 Patientenproben eingesendet und für die vorliegende Arbeit einem Vergleich durch zwei quantitative Testverfahren zum Nachweis der HIV-Viruslast unterzogen, von denen das eine die *gag*-Region (*HIV-1 Monitor™ Test*, Firma Roche) und das andere die *pol*-Region (*LCx® HIV RNA Quantitativ*, Firma Abbott) des HIV-Genoms als Zielregion hat. Dabei sollte zum einen die Frage zum Ausmaß der Übereinstimmung beantwortet, zum anderen eine Beschreibung der Leistungsparameter vorgenommen werden. Letztlich sollte durch diese Untersuchung Klärung herbeigeführt werden, ob die Umstellung der klinischen Routinediagnostik, deren Ergebnisse unter anderem für das Therapiemonitoring verwendet werden, auch klinisch vertretbar ist.

Es konnten 272 Proben aus der Infektionsambulanz des Städtischen Krankenhauses Kiel mit beiden Verfahren direkt miteinander verglichen werden. Für das hier untersuchte Patientenkollektiv ließ sich zeigen, dass die Verfahren in ihrer diagnostischen Leistungsfähigkeit als gleichwertig zu betrachten sind. Es zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 96% (Kappa-Index = 0,917, 95% Vertrauensintervall 0,870 - 0,965), womit eine *fast vollständige Übereinstimmung* der Ergebnisse vorliegt. Für elf von 272 Proben gab es diskordante Ergebnisse. Dabei ergaben jeweils je Hersteller zwei Proben diskrepante qualitative Ergebnisse, die von höchster klinischer Bedeutung waren, da die Proben jeweils bei einem Hersteller als "positiv" und bei dem anderen als "negativ" bewertet wurden.

Es lag ein starker linearer Zusammenhang zwischen den quantitativ erhobenen Werten vor, so dass die Ergebnisse beider Verfahren direkt miteinander verglichen werden können und eine Umstellung von dem *HIV-1 Monitor™ Test* von Roche auf das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren von Abbott auch klinisch vertretbar ist. Dadurch dass das *LCx® HIV RNA Quantitativ* Verfahren die HI-Viren der O-Gruppe erkennt, weist es für das Transfusionswesen einen unbestreitbaren Vorteil gegenüber dem Alternativprodukt auf.

6. Literaturverzeichnis

Abbott (2002):

LCx® Pobe System HIV RNA Quantitativ

Arbeitsanleitung zum Testsystem, Stand 12/2002

Barre-Sinoussi, F. , Cerman, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouziox, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983):

Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).

Science 220 (4599), 868-871

Berger, A., Rabenau, H.F., Stief, A., Troonen, H., Doerr, H.W. (2001):

Evaluation of the new *LCx® HIV RNA quantitative* assay: comparison with the *Cobas Amplicor HIV Monitor™* assay.

Med. Microbiol. Immunol. 190 (3), 129-134

Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Oldstone, M.B. (1994):

Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.

J. Virol. 68 (9), 6103-6110

Brand, D., Beby-Defaux, A., Macé, M., Brunet, S., Moreau, A., Godet, C., Jais, X., Cazein, F., Semaille, C., Barin, F. (2004):

First identification of HIV-1 groups M and O dual infections in Europe.

AIDS 18 (18), 2425-2428

Broder, S., Gallo, R.C. (1984):

A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS.

N. Engl. J. Med. 311 (20), 1292-1297

Brust, S., Duttmann, H., Feldner, J., Gurtler, L., Thorstensson, R., Simon, F. (2000):

Shortening of the diagnostic window with a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test.

J. Virol. Methods. 90 (2), 153-165

Bundesärztekammer (2005):

Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Novelle 2005)

Bundesanzeiger, Jahrgang 57, November 2005, Nummer 209a

Cane, P.A. (2009):

New developments in HIV drug resistance.

J. Antimicrob. Chemother. 64, S1, i37-40

Centers for Disease Control (1981):

Pneumocystis Pneumonia – Los Angeles.

MMWR 30, 250-252

Centers for Disease Control (1982):

A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and range Counties, California.

MMWR 31, 305-307

Centers for Disease Control (1982):

Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A.

MMWR 31, 365-367

Centers for Disease Control (1992):

1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS among Adolescents and Adults.

MMWR 41, RR-17

Centers for Disease Control (2002):

Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among HIV-Infected Persons.

MMWR 51, 1-46

Debouck, C., Gorniak, J.G., Strickler, J.E., Meek, T.D., Metcalf, B.W., Rosenberg, M. (1987):

Human immunodeficiency virus protease expressed in Escherichia coli exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (24), 8903-8906

Deutsche AIDS-Gesellschaft (2008):

Leitlinie zur antiretroviralen Therapie im Erwachsenenalter.

Stand September 2008

Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) (2000):

DIN-Norm 58969-41, DIN-Taschenbuch 222: Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Diagnostische Verfahren.

4. Auflage, Stand 2000. Berlin, Wien, Zürich. Beuth-Verlag

Essex, M. (1999):

Human immunodeficiency viruses in the developing world.

Adv. Virus. Res. 53, 71-88

Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R.:

Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses.

2. Auflage, Stand 2003, American Society for Microbiology

Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Olseke, J., Safai, B., et al. (1984):

Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS.

Science 224 (4648), 500-503

Glück, D. (1999):

Risiko der HIV-, HCV- und HBV-Übertragung durch Blutpräparate. Aktuelle Daten 1997 und 1998 aus der Studie zur Epidemiologie von HIV- und Hepatitisinfektionen bei Blutspendern in Deutschland.

Infusionsther. Transfusionsmed. 26 (6), 335-338

Gould, K., Britvan, L., Dryjanski, J. (1996):

HIV-1 group O infection in the USA.

Lancet 348 (9028), 680-681

HAMPL, H., Sawitzky, D., Stöffler-Meilicke, M., Groh, A., Schmitt, M., Eberle, J., Gürtler, L. (1995):

First case of HIV-1 subtype 0 infection in Germany.

Infection 23 (6), 369-370

Hicks, C., Gulick, R.M. (2009):

Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor.

Clin. Infect. Dis. 48 (7), 931-939

Hourfar, M.K., Jork, C., Schottstedt, V., Weber-Schehl, M., Brixner, V., Busch, M.P., Geusendam, G., Gubbe, K., Mahnhardt, C., Mayr-Wohlfart, U., Pichl, L., Roth, W.K., Schmidt, M., Seifried, E., Wright, D.J. (2008):

Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus.

Transfusion 48 (8),1558-1566

Jegade, O., Babu, J., Di Santo, R., McColl, D.J., Weber, J., Quiñones-Mateu, M. (2008):

HIV type 1 integrase inhibitors: from basic research to clinical implications.

AIDS Rev. 10 (3),172-189

Johanson, J., Abravaya, K., Caminiti, W., Erickson, D., Flanders, R., Leckie, G., Marshall, E., Mullen, C., Ohhashi, Y., Perry, R., Ricci, J., Salituro, J., Smith, A., Tang, N., Vi, M., Robinson, J. (2001):

A new ultrasensitive assay for quantitation of HIV-1 RNA in plasma.

J. Virol. Methods 95 (1-2), 81-92

Katsoulidou, A., Papachristou, E., Petrodaskalaki, M., Sypsa, V., Anastassopoulou, C.G., Gargalianos, P., Karafoulidou, A., Lazanas, M., Kordossis, T., Andoniadou, A., Hatzakis, A. (2004):

Comparison of three current viral load assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma.

J. Virol. Methods 121 (1), 93-99

Kühnl, P., Seidl, S., Holzberger G. (1985):

HLA DR4 antibodies cause positive HTLV-III antibody ELISA results.

Lancet 1 (8439), 1222-1223.

Latinovic, O., Kuruppu, J., Davis, C., Le, N., Heredia, A. (2009):

Pharmacotherapy of HIV-1 Infection Focus on CCR5 Antagonist Maraviroc.

Clin. Med. Ther. 1, 1497-1510

Los Alamos National Laboratory (2009):

HIV-Database

<http://hiv-web.lanl.gov>, Abfrage von 19.01.2010

Ly, T.D., Laperche, S., Courouce, A.M. (2001):

Early detection of human immunodeficiency virus infection using third- and fourth-generation screening assays.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20 (2), 104-110

Mac Kenzie W.R., Davis J.P., Peterson D.E., Hibbard A.J., Becker G., Zarvan B.S. (1992):

Multiple false-positive serologic tests for HIV, HTLV-1, and hepatitis C following influenza vaccination, 1991.

JAMA 268 (8),1015-1017

Mellors, J.W., Rinaldo, C.R. Jr, Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., Kingsley, L.A. (1996):

Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.

Science 272 (5265), 1167-1170

De Mendoza, C., Alcamí, J., Sainz, M., Folgueira, D., Soriano, V. (2002):

Evaluation of the Abbott LCx quantitative assay for measurement of human immunodeficiency virus RNA in plasma.

J. Clin. Microbiol. 40 (4), 1518-1521

Myers, T.W., Gelfand, D.H. (1991):

Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase.

Biochemistry 30 (31), 7661-7666

Offergeld, R., Faensen, D., Ritter, S., Hamouda, O. (2005):

Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing.

Euro. Surveill. 10 (2), 8-11

Plantier, J.C., Gueudin, M., Damond, F., Braun, J., Maucière, P., Simon, F. (2003):

Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains.

J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 33 (1), 1-7

Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F. (2009):

A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.

Nat. Med. 15 (8), 871-872

Pommier, Y., Johnson, A., Marchand, C. (2005):

Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS.

Nat. Rev. Drug. Discov. 4 (3), 236-248

Robert-Koch-Institut (2009):

HIV/AIDS-Folien

http://www.rki.de/nn_196014/DE/Content/InfAZ/H/HIVAIDS/Epidemiologie/Daten__und__Berichte/HIV-AIDS-Folien,templateld=raw,property=publicationFile.pdf/HIV-AIDS-Folien.pdf

Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., Learn, G.H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P.M., Wolinsky, S., Korber, B. (2000):

HIV-1 nomenclature proposal.

Science 288 (5463), 55-56

Roche Diagnostics

Cobas Amplicor HIV-1 MonitorTM Test, Version 1.5

Arbeitsanleitung des Testsystems, Stand 05/1999

Root, M.J., Steger, H.K. (2004):

HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition.

Curr. Pharm. Des. 10 (15), 1805-1825

Rox, J.M., Eis-Hübinger, A.M., Müller, J, Vogel, M., Kaiser, R., Hanfland, P., Däumer, M. (2004):

First human immunodeficiency virus-1 group O infection in a European blood donor.

Vox Sang. 87 (1), 44-45

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985):

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science 230 (4732), 1350-1354

Schmidt, M., Korn, K., Nübling, C.M., Chudy, M., Kress, J., Horst, H.A., Geusendam, G., Hennig, H., Sireis, W., Rabenau, H.F., Doerr, H.W., Berger, A., Hourfar, M.K., Gubbe, K., Karl, A., Fickenscher, H., Tischer, B.K., Babel, R., Seifried, E., Gürtler, L. (2009):

First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany.

Transfusion 49 (9), 1836-1844

Soriano, V., Gutiérrez, M., García-Lerma, G., Aguilera, O., Mas, A., Bravo, R., Pérez-Labad, M.L., Baquero, M., González-Lahoz, J. (1996):

First case of HIV-1 group O infection in Spain.

Vox Sang. 71 (1), 66

Steffy, K., Wong-Staal, F. (1991):

Genetic regulation of human immunodeficiency virus.

Microbiol. Rev. 55 (2), 193-205

STIKO (2005):

Hinweise zu Impfungen für Patienten mit Immundefizienz.

Epidem. Bull. 39, 353-364

Storch, G.A. (2007):

Diagnostic Virology

In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Editors): Fields Virology 5th Edition, 2007

Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York

p. 565-604

Swanson, P., de Mendoza, C., Joshi, Y., Golden, A., Hodinka, R.L., Soriano, V., Devare, S.G., Hackett, J. Jr. (2005):

Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: *LCx® HIV RNA Quantitative*, *Amplicor HIV-1 Monitor™ v1.5*, *Versant® HIV-1 RNA 3.0*, and *NucliSens® HIV-1 QT*.
J. Clin. Microbiol. 43 (8), 3860-3868

Swanson, P., Soriano, V., Devare, S.G., Hackett, J. Jr. (2001):

Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: *LCx® HIV RNA quantitative*, *Amplicor HIV-1 Monitor™ version 1.5*, and *Quantiplex™ HIV-1 RNA version 3.0*.
J. Clin. Microbiol. 39 (3), 862-870

Troonen, H., Grey, H., Michel, G. (2002):

Multicenter study of the *LCx® HIV RNA quantitative* assay - a new competitive reverse transcriptase-PCR which targets pol genomic region of HIV-1 for the measurement of type B, non-type B and group O HIV-1 RNA.
Clin. Chem. Lab. Med. 40 (7), 698-704

Vanhems, P., Beaulieu, R. (1997):

Primary infection by type 1 human immunodeficiency virus: diagnosis and prognosis.
Postgrad. Med. J. 73 (861), 403-408

Wolf, E., Braun P. (2009):

Resistenzen

In: Hoffmann C., Rockstroh J. (Hrsg.): HIV 2009 (<http://www.hivbuch.de>, Online-Version), Medizin Fokus Verlag, Hamburg
p. 321-350

Yeni P. (2006):

Update on HAART in HIV.

J. Hepatol. 4, S1, S100-103

Zacharias, N.M., Athanassaki, I.D., Sangi-Haghpeykar, H., Gardner, M.O. (2004):
High false-positive rate of human immunodeficiency virus rapid serum screening in a predominantly hispanic prenatal population.
J. Perinatol. 24 (12), 743-747

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Antje Christina Brattig, geb. Dietrich
Geburtstag: 16.09.1978
Geburtsort: Berlin
Adresse: Franckestraße 16, 24118 Kiel

Schulbildung:

1984 bis 1990 Gustav-Dreyer-Grundschule, Berlin-Hermsdorf
1990 bis 1997 Georg-Herwegh-Gymnasium, Berlin-Hermsdorf
30. Mai 1997 Abitur

Hochschulausbildung:

10/1997 – 09/1999 Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität zu Greifswald
09/1999 Vordiplom in Humanbiologie
10/1999 – 09/2001 Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität zu Greifswald
12.09.2001 Physikum
10/2001 – 03/2002 Auslandssemester im Rahmen des Erasmus-Programms als Studentin an der Universidad Miguel Hernandez de Elche, Spanien
04/2002 – 05/2006 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
25.03.2003 1. Staatsexamen
15.03.2005 2. Staatsexamen
11.05.2006 3. Staatsexamen
12.05.2006 Approbation

Arbeitserfahrung:

Seit 06.06.2006 Assistenzärztin in der 1. Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Kiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Professor Dr. med. P. Rautenberg für die Überlassung des Themas, die unendliche Geduld und die sehr gute Betreuung bei der Abfassung der Arbeit.

Ich danke dem ehemaligen Direktor des Instituts für Infektionsmedizin Herrn Professor Dr. med. U. Ullmann und dem jetzigen Direktor des Instituts für Infektionsmedizin Herrn Dr. med. H. Fickenscher für die Überlassung der Daten.

Stellvertretend für alle Technischen Assistentinnen des PCR-Labors möchte ich Frau U. Petko für die freundliche Einweisung in die Arbeitsschritte danken.

Ich danke der Infektionsambulanz des Städtischen Krankenhauses Kiel für die Möglichkeit der Einsichtnahme in die Therapieakten der Beispielpatienten.

Ich danke meinen Eltern Brigitte und Helge Dietrich, ohne sie wäre ich nicht bis an diesen Punkt gekommen.

Ich danke meinem Mann Christoph, der mich stets unterstützt und ermutigt hat.

Und ich danke meinen Freunden, die mich immer wieder motiviert haben.