HIV-Nachweis

Thomas Klimkait
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Basel

Geschichte

Die HIV-Forschung ist von einer faszinierenden medizindiagnostischen Entwicklung geprägt: Bereits zwei Jahre nach der Entdeckung des neuen Retrovirus im Jahr 1983 war die Verbindung zum Krankheitsbild AIDS etabliert. Schon im Jahr 1985 gab die Zulassungsbehörde FDA einem ersten p24-Antikörper-ELISA, der das Blutspendewesen sicher machte, die Zulassung als Suchtest [1, 2]. Zusammen mit p24-Ag-HIV-Schnelltests, die sich durch hohe Testempfindlichkeit und geringe Kosten auszeichnen, haben sie insbesondere bei anonymen Beratungsstellen oder im chirurgischen Notfallbereich einen festen Platz in der Diagnostik gefunden. Als Bestätigungstest wurde die Western-Analyse Pflicht, in welcher HIV-Proteine mittels Antikörpern im Patientenblut dargestellt werden.

Längst kommen heute standardisierte, kommerzielle Testverfahren zum Einsatz, und in der Schweiz ist das Prozedere von Testung, Bestätigung und Wiederholung auf unabhängigem Material mitsamt (anonymer) Meldung bestens etabliert, wenngleich weltweit immer noch nicht einheitlich [3]. Besonders bei Primärinfekten, also während der ersten Wochen nach Infektion, sind antikörperbasierte Tests nicht geeignet [4] und werden daher prinzipiell mit p24-Antigentests kombiniert.

Suchteste

Diese Tests sind heute in ihrer vierten Generation verfügbar: Der Einbezug des p24-Ag-ELISA verkleinert die «diagnostische Lücke», also die

Glossar

b-DNA
«Branched DNA»; eine DNA Quantifizierungsmethode, die darauf beruht, dass das Signal für die Detektion einer DNA-Sequenz im Probenmaterial verstärkt wird (Signalverstärkung); bei der PCR hingegen wird eine in der Probe vorhandene DNA-Sequenz selbst vervielfacht (Inputverstärkung).

CCR5
«C-C-Motiv Chemokin-Rezeptor 5»; Membranrezeptor in Leukozyten für die zelluläre Signalisierungskaskade durch Chemokine wie MIP-1a, Rantes usw. Dient zugleich als bevorzugter zellulärer Rezeptor für CCR5-trope HIV-Isolate; diese früher als «makrophagentrope Isolate» bezeichneten Viren sind hauptverantwortlich für die primäre HIV-Infektion.

CRF
«Circulating recombinant HIV form» (z.B. CRF01-AE); diese Nomenklatur klassifiziert solche (neueren) Formen des HI-Virus, bei denen sich Teile eines Virussubtyps genetisch mit Teilen eines anderen gekreuzt haben und somit eine neue, rekombinante Form darstellen (01_AE), die sich weder durch die eine (A) noch die andere Ausgangsform (E) beschreiben lässt.

CXCR4
«C-X-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 4»; dieser von HIV als zweiter Corezeptor missbrauchte Leukozytenrezeptor spricht auf SDF-1 als seinen natürlichen Liganden an und bewirkt eine Stammzellaktivierung. CXCR4-trope HIV-Varianten (früher «T-Zell-trope Viren») tauchen überwiegend spät im HIV-Infektionsverlauf auf.

Delta32
Genetischer Defekt im CCR5-Gen mit einer Deletion ab Codonposition 32. Heterozygote und vor allem homozygote Träger dieses Allels zeichnen sich durch einen stark verlangsamten HIV-Infektions-Verlauf aus.

ELISA
Enzyme-linked Immunosorbent Assay; enzymgekoppelter Antikörper-Test, meist auf erregerspezifische Antikörper im Patientenblut.

FDA
Federal Drug Administration; US-amerikanische Zulassungsbehörde für Medikamente.

HAART
«Hoch aktive antiretrovirale Therapie»; Acronym für die HIV-Kombinationstherapie aus üblicherweise mindestens drei antiretroviralen Medikamenten. Dadurch kann oft eine komplette Suppression der Virusexpression (<50 Kopien/mL) erzielt werden.

HIV-Typ 0 «outlier»
Seltene Gruppe von HIV-1-Viren, die in ihrer RNA-Sequenz und folglich auch in ihren Proteinen grosse Unterschiede zu den gängigen Subtypen der Hauptgruppe «M» aufweist. Diese Unterschiede können in HIV-Tests und bei der Virus-Quantifizierung falschnegative Resultate verursachen.

HLA
«Human Leukocyte Antigen» – hochvariable Determinanten des menschlichen Haupthistokompatibilitätskomplexes; ihre Gene finden sich als Cluster auf Chromosom 6, und ihre Typisierung wird für eine mögliche Assoziation mit Krankheiten herangezogen.

p24-Ag
HIV-Strukturprotein-p24 als immunreaktiver Bestandteil (Antigen) des Virus; ist Teil der formgebenden Hülle um die virale RNA, wird von infizierten Zellen auch in löslicher Form freigesetzt.

RT-PCR
Von RNA ausgehende Spezialform der Polymerase-Kettenreaktion; z.B. wird virale RNA zunächst in DNA umgeschrieben und kann dadurch als Substrat für eine Standardreaktion der PCR eingesetzt werden. Mit dieser Methode werden RNA-Viren wie HIV im Plasma quantitativ bestimmt.

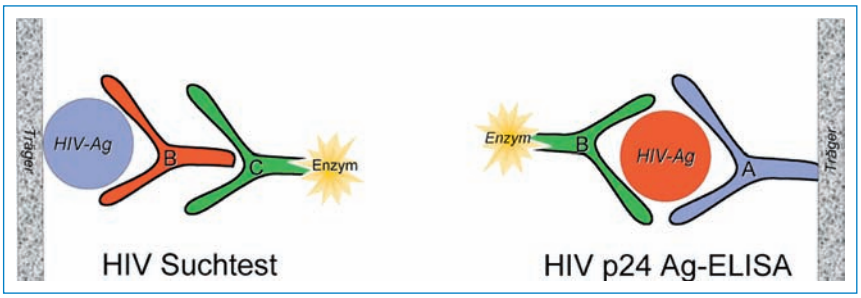

Abbildung 1
Prinzip des HIV-ELISA-Tests. Als Substrat (blau) dient beim Suchtest das p24-Protein selbst, beim Antigen-ELISA dagegen ein HIV-spezifischer Antikörper. Das gesuchte Patientenprotein (rot) ist entweder ein p24-Antikörper, der eine Immunantwort auf die HIV-Infektion (Suchtest) anzeigt, oder das virale p24-Protein im infizierten Patienten (Ag-ELISA). Zur Detektion wird ein enzymgekoppelter charakterisierter Antikörper (grün) eingesetzt, welcher entweder für humane Antikörper (Suchtest) oder für das p24-Antigen (Ag-ELISA) spezifisch ist.

Zeit bis zur Antikörperbildung, während einer Primärinfektion deutlich (Abb. 1). P24-Ag ist während der ersten vier Wochen nach Infektion bereits sicher nachweisbar, und danach gelingt häufig bereits auch ein Antikörpernachweis, der aber in seltenen Fällen auch über drei Monate negativ bleiben kann [5, 6]. Diese diagnostische Lücke definiert das Restrisiko durch einen zwangsläufig (falsch)negativen Befund. Materialabhängig liegt die Detektion heutiger Methoden bei 99,3–100%, die HIV-Spezifität bei 99,1–100 Prozent [7], wogegen falschpositive (besser: «reaktive») Ergebnisse eine Folge des Erfordernisses bleiben, dass eine grösstmögliche Sicherheit durch die unbedingte Erfassung *realpositiver* Proben erreicht wird. Primäres Ziel der Suchteste ist ja, mit höchster Zuverlässigkeit negatives Blut als sicher zu markieren. Das kann aber nur gelingen, wenn auch fragliche Proben der reaktiven Kategorie zugeordnet werden, bevor sie in einem zweiten Bestätigungsschritt präzise bestimmt werden.

Bestätigung einer Infektion

Zur Bestätigung einer reaktiven Blutprobe im Suchtest liefert eine unabhängige Testmethode dasselbe Resultat; gängig ist die Western-Analyse, in welcher mittels bekannter HIV-Proteine eine Antikörperreaktivität im Patientenserum identifiziert wird. Vom Testprinzip stellt allerdings dieser Antikörpertest nur bedingt ein «unabhängiges Verfahren» dar, und heute werden z.T. auch Nukleinsäure-basierte Methoden (RT-PCR) verwendet, z.B. in der Pädiatrie aufgrund interferierender mütterlicher Antikörper.

Grenzen

Falschpositiv/-negativ: Die Spezifität des Western-Bestätigungstests ist sehr hoch; somit gilt ein negativer Westernblot als sicherer Ausschluss einer HIV-Infektion. Die Beurteilung positiver Bandenmuster ist deutlich schwieriger: Eine grosse Screeningstudie mit über 5 Millionen Teilnehmern ergab eine Rate von insgesamt immerhin 4,7% falschpositiven Western-Befunden. Die PCR-Nachanalyse erbrachte für diese falschpositiven Befunde eine eindeutige Bestätigung für den negativen HIV-Infektionsstatus [8].

Therapiebegleitung

Die unumstrittene Methode für die Viruslastbestimmung im behandelten Patienten beruht heute auf einer Abschätzung der viralen RNA-Kopien im Patientenplasma oder in anderen Materialien. In DNA umgeschriebene Virus-RNA wird entweder nach Signalverstärkung (b-DNA-Test) oder Proben-Multiplikation durch PCR quantifiziert. Beide Systeme erreichen eine Empfindlichkeit von <40 Kopien/mL mit hoher Reaktionsspezifität und Sensitivität für verschiedene HIV-Subtypen [9,10].
Darüber hinaus macht ein neuartiger, preiswerter p24-basierter Quantifizierungstest Hoffnung auch für Länder in Afrika und Asien [11].

Grenzen

Eine Bestimmung der absoluten Empfindlichkeit und Spezifität ist aufgrund der hohen Variabilität von HIV nicht trivial und auf standardisierte Probenmaterialien begrenzt. Es gibt auch heute noch Berichte von falsch positiven Bestimmungen [12]. Die hohe HIV-Diversität in Form von globalen Virussubtypen und Rekombinanten ist im Moment ein potentielles Problem ungeklärter Dimension: Z.B. würde eine kontinuierlich tief positive Viruslast ja zunächst als klinisch wenig bedrohlich eingestuft. Erst ein damit nicht kompatibler rascher CD4-Zell-Abfall macht den behandelnden Arzt auf ein mögliches Quantifizierungsproblem aufmerksam, das wir z.B. für «exotische» Virusvarianten tatsächlich kennen (Rekombinanten CRF01-AE; HIV-1-Typ O usw.). Rein technisch liefert die PCR rund 1,9–3% falschpositive bzw. -negative Ergebnisse [13].

Therapieversagen/ Resistenzbestimmung

Genotypisierung und Phänotypisierung

Der herausragende Erfolg der seit 1995 etablierten retroviralen Kombinationstherapie lässt sich eindrücklich mit Mortalitätskurven über die Jahre belegen. Seit allerdings potente Therapiekonzepte (HAART) verfügbar sind, ist die Resistenz bei HIV eine neue, wachsende Bedrohung im klinischen Alltag geworden. Für alle HIV-Medikamente sind heute Resistenzen beschrieben, und selbst neue Therapeutika weisen bereits Versagerquoten auf, bevor sie den Markt erreichen. Da eine effiziente Kombinationstherapie zwingend auf das Funktionieren aller ihrer Elemente angewiesen ist,

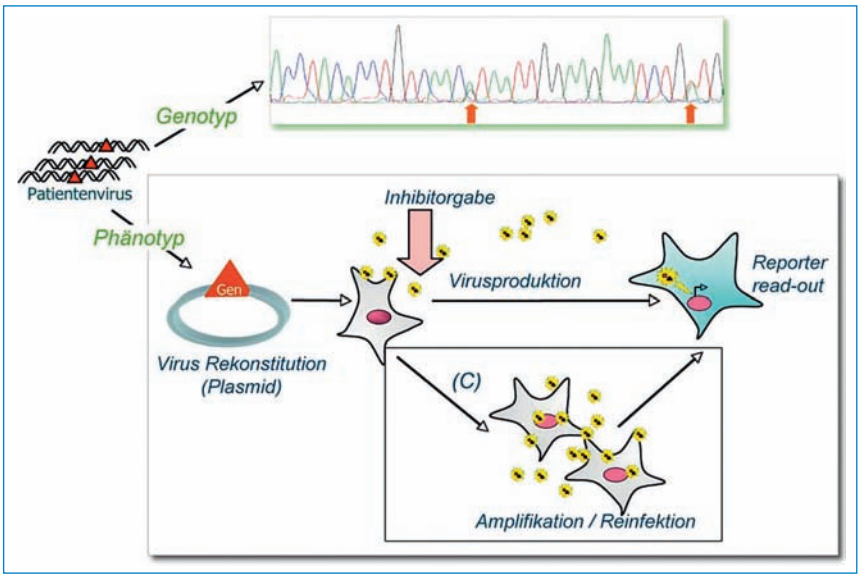

Abbildung 2
HIV-Resistenz im Patienten kann entweder genotypisch über Sequenzbestimmung des Erbmaterials im Viruspartikel (oberes Schema) oder funktionell (Phänotyp, unteres Schema) bestimmt werden. Bei letzterem wird das zu untersuchende Gen (rotes Dreieck) in ein Virus eingefügt und so in menschlichen Zellen unter Behandlung analysiert, bei sehr empfindlichen Systemen erst nach mehreren Vermehrungszyklen (Umweg in Box [C]). Ein Reportergen in den Zellen erlaubt das Auslesen der Bestimmung mittels Farbumschlag.

scheint es unabdingbar, dies mittels Resistenztests sicherzustellen. Dieses an sich logische Konzept ist ja in der Mikrobiologie hinlänglich belegt und in der Standardliteratur verankert; dennoch hatten mehrere Studien der vergangenen Jahre Mühe, denselben Nutzen bei HIV zu demonstrieren [14–18]. Eine der Ursachen dafür mag darin liegen, dass solche Resistenzstudien in einer Zeit erfolgten, als eine Reihe neuer Inhibitoren als therapeutische Alternativen den Markt erreichten, wodurch ein Mehrgewinn durch Testung wenig evident blieb.

Zur Resistenztestung bei HIV stehen sich prinzipiell zwei Konzepte gegenüber: die nukleinsäurebasierte Genotypisierung und die funktionelle Phänotypisierung (Abb. 2). Erstere identifiziert Mutationen im Zielgen der HIV-Therapie und interpretiert genetische Veränderungen mithilfe etablierter Algorithmen. Ausgereifte internationale Datenbanken liefern inzwischen ausgezeichnete Ergebnisse, und für viele Medikamente sind die wichtigsten therapiebedrohenden Mutationen gut beschrieben. Grenzen der Genotypisierung liegen allerdings in der Beurteilung neuer Mutationen und bei Medikamenten, für welche erst wenige Mutationen belegt sind, sowie in Situationen, in denen im Patienten zeitgleich mehrere Virusvarianten auftreten. Klare Vorteile sind die rasche Laborbearbeitung mit Standardausrüstung sowie relativ geringe Kosten (720 Franken).

Die alternative Phänotypisierung beurteilt in Zellkultur die Vermehrung des aus dem Patienten gewonnenen Virus in der Gegenwart jedes einzelnen Hemmstoffs separat, entweder während einer einzigen Infektionsrunde oder über eine definierte Anzahl Vermehrungszyklen hinweg. Als Vorteil braucht diese Phänotypisierung keine Vorinformation über Medikamente oder Mutation, da sie ja die «Therapie in vitro» vornimmt. Auch gelingt ihr eine empfindliche Trennung von Virusgemischen bzw. der Nachweis von Virusminderheiten am Anfang eines Therapieversagens. Demgegenüber steht der Nachteil erheblich höherer Kosten (rund 1500 Franken) und eines deutlich höheren Laboraufwands.

Spezialtests

Tropismustest

Die neueste HIV-Inhibitorklasse zielt auf die Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, CCR5 und CXCR4. Sie sind essentielle «Co-Rezeptoren» für die HIV-Infektion und werden für Andocken und Eindringen der HIV-Partikel benötigt. Mit dem CCR5-Hemmer Celsentri® wurde soeben der erste Hemmstoff dieser Klasse für die Klinik zugelassen, allerdings mit der Auflage, vor Therapiebeginn zu prüfen, ob das Virus im betroffenen Patienten tatsäch-lich CCR5 als Co-Rezeptor verwendet, also «CCR5-trop» ist. Dies kann entweder phänotypisch oder auf Sequenzebene getestet werden. Für einen ersten validierten Phänotypisierungstest aus den USA («Trofile»-Assay) ist der logistische Aufwand zurzeit noch enorm und die Dauer von mehr als vier Wochen problematisch. Ein neues schweizerisches Testsystem wird in Basel entwickelt. Die hochempfindliche Analyse beruht darauf, dass die tropismusbestimmende Virussequenz (im Envelop-Gen) gegenüber einer bekannten Referenz charakterisiert wird. Der Test dauert sechs Tage.

Genetische Prädisposition (Delta32, HLA-Antigene) und Bestimmung der therapeutischen Medikamentenkonzentration

Über die oben beschriebenen HIV-Nachweismethoden hinaus sind im Behandlungszusammenhang solche Tests wichtig geworden, die therapierelevante Patientenparameter analysieren. Vor allem HLA-Determinanten sowie genetische Aberrationen z.B. im Co-Rezeptor-Gen («Delta-32») können therapeutisch wichtig sein und werden zunehmend bestimmt.

Ausserdem können zur Beurteilung der Therapietreue/Compliance inzwischen Medikamentenspiegel im Plasma bestimmt werden [19].

Schlussbemerkung

15 Jahre nach der Entdeckung des Humanpathogens HIV sorgen heute hochsensitive Analysemethoden für die Sicherheit der Blutbanken, einen spezifischen Infektnachweis und optimale The-

rapiebegleitung. Ohne Zweifel wird dieses Wissen auch für weitere Viren, z.B. die Hepatitisviren, von grossem Nutzen sein. Wahrscheinlich wird es wiederum die erfolgreiche Therapie sein, welche auch dort den Problemkreis viraler Resistenzen aufzeigt, die Entwicklung neuer Hemmstoffklassen vorantreibt und durch solche neuen Anforderungen die moderne Labordiagnostik neu herausfordert.

Korrespondenz:
Dr. Thomas Klimkait
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Basel
Petersplatz 10
CH-4003 Basel
thomas.klimkait@unibas.ch

Literatur

1 http://aidshistory.nih.gov/home.html; http://www.cdc.gov/mmwr.
2 Montagnier L. Historical Essay, Science. 2002;298:1727–8.
3 Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents. Bethesda, Md, Department of Health and Human Services, 1999.
4 Busch MP, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. Transfusion. 1995;35:91–7.
5 Daar ES, et al. Transient high levels of viremia in patients with primary HIV type 1 infection. N Engl J Med. 1991;324:961–4.
6 Schacker TW, et al. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. Ann Intern Med. 1998;128:613–20.
7 Greenwald JL, et al. A rapid review of rapid HIV antibody tests. Current Infectious Disease Reports. 2006;8:125–31.
8 Kleinman S, et al. False-Positive HIV-1 Test Results in a Low-Risk Screening Setting of Voluntary Blood Donation. JAMA. 1998;280:1080–5.
9 Perrin L, et al. Multicenter Performance Evaluation of a New TaqMan PCR Assay for Monitoring Human Immunodeficiency Virus RNA Load. J Clin Microbiol. 2006;44:4371–5.
10 Espy MJ, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Reviews. 2006;19:165–256.
11 Brinkhof MWG, et al. Evaluation of p24-based antiretroviral treatment monitoring in pediatric HIV-1 infection: Prediction of the CD4+ T cell changes between consecutive visits.. Journal A.I.D.S 2006;41:557–62.
12 Owens DK, et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of HIV infection in adults: a meta-analysis with recommendations for clinical practice and study design. Ann Intern Med. 1996;124:803–15.
13 Rich JD, et al. Misdiagnosis of HIV Infection by HIV-1 Plasma Viral Load Testing: A Case Series.. Ann Intern Med. 1999;130:37–9.
14 Baxter JD, et al. Both baseline HIV-1 drug resistance and antiretroviral drug levels are associated with short-term virologic responses to salvage therapy. AIDS. 2002; 16:1131–8.
15 Meynard JL, et al. Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. AIDS. 2002; 16:727–36.
16 Durant J, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. Lancet. 1999;353:2195–9.
17 Cohen CJ, et al. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy (VIRA3001 Study Team). AIDS. 2002; 16:579–88.
18 Tural C, et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. AIDS. 2002;16:209–18.
19 Marzolini C et al. Nelfinavir plasma levels under twice daily and three-times daily regimens: high interpatient and low intrapatient variability. Ther Drug Monit. 2001;23:394–8.