

INHALT

HIV – DIAGNOSTIK UND THERAPIE

- ▶ Antiretrovirale Therapie: Sind Medikamenten-sparende Kombinationen möglich?
Dr. med. Arne Kroidl S. 2
- ▶ PrEP und HIV-Selbsttest: eine heikle Mischung?
Dr. med. Andreas Osterman S. 5
- ▶ Lücken beim Nachweis von HIV-1-RNA
Prof. Dr. med. Josef Eberle S. 9
- ▶ Diagnostisches Quiz: falsch-negative HIV-Suchtest-Ergebnisse?
Dr. med. Maximilian Münchhoff S. 15

DER KLINISCHE FALL

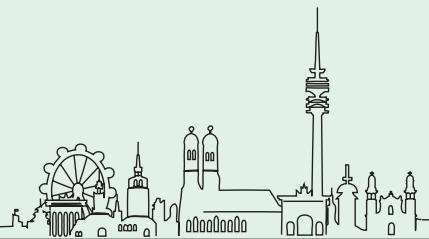
- ▶ Patient mit HIV-assoziiertem Burkitt-Lymphom
PD Dr. med. Clara Lehmann S. 11

IN EIGENER SACHE

- ▶ Aufbau und Pflege der Stammsammlung – ein Arbeitsbericht
Prof. Dr. med. Josef Eberle S. 12

FÜR SIE GELESEN

- ▶ Ein neues Verfahren erlaubt die detaillierte Quantifizierung des Reservoirs latenter HIV-1-Proviren
Dr. phil. nat. Christian F. Schölz S. 14



Für den Inhalt der Artikel sind die Autoren allein verantwortlich.

Ziel dieses Bulletins ist es, Ärzte, Gesundheitsbehörden und Patienten über aktuelle wissenschaftliche und klinische Themen aus dem Bereich der Retroviren zu informieren. Zweimal im Jahr wird in kurzer Form der aktuelle Forschungsstand zu verschiedenen Themen wiedergegeben. Für Verbesserungsvorschläge und Anregungen sind wir sehr dankbar.

Die Redaktion



EDITORIAL

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,
sehr geehrte Damen und Herren,

ich freue mich, Ihnen die erste Ausgabe des »Retroviren Bulletins« des Jahres 2019 aus München vorzustellen.

Ein Schwerpunkt der aktuellen Ausgabe liegt im Bereich der HIV-Diagnostik, im Speziellen auf den seit Herbst 2018 zugelassenen, frei verkäuflichen HIV-Selbsttests. **Dr. Andreas Osterman** beleuchtet wichtige Aspekte bei der Verwendung dieser Selbsttests und insbesondere, welche Voraussetzungen für ein korrektes Testergebnis zu beachten sind. Bei einer HIV-Infektion unter PrEP kann es zu einer Verzögerung oder sogar zum Ausbleiben der Serokonversion kommen – hier können negative HIV-Selbsttests eine trügerische Sicherheit vermitteln.

Dr. Maximilian Münchhoff lädt Sie zu einem diagnostischen Quiz ein, basierend auf einem spannenden, aktuellen klinischen Fall: Falsch-negative HIV-Suchergebnisse – wie kommen Sie dem richtigen Ergebnis auf die Spur?

Prof. Josef Eberle beschreibt gravierende Probleme eines HIV-Kartuschen-PCR-Tests bei der Erkennung und Quantifizierung einzelner HIV-Proben, stellt die molekulare Detektivarbeit bei der Ursachenforschung dar und erläutert, für welche diagnostischen Fragestellungen ein solches, ohne Zweifel zeitsparendes Testverfahren sinnvoll eingesetzt werden kann. Zudem gibt **Prof. Josef Eberle** eine Übersicht zur aktuellen HIV-1- und HIV-2-Stammsammlung des NRZ und schildert in seinem Arbeitsbericht den stetigen Aufbau und die Pflege dieser Isolat-Sammlung.

Dr. Arne Kroidl stellt neue Entwicklungen bei antiretroviralen Therapie-Regimen vor und vergleicht neue, Medikamenten-reduzierte Zweifachkombinationen mit früheren Dreierkombinationen. Inwieweit sich die Lebensqualität und Gesundheit HIV-infizierter Menschen durch die fortschreitende Reduktion der medikamentösen Langzeit-Toxizität verbessern lässt, wird sich in Verlaufsbeobachtungen zeigen.

Den »Klinischen Fall« hat **Dr. Clara Lehmann**: Sie beschreibt anschaulich den Krankheitsverlauf eines Patienten mit HIV-assoziiertem Burkitt-Lymphom und zeigt auf, dass inzwischen HIV-infizierte Menschen mit Lymphomen nach den gleichen onkologischen Standards behandelt werden können wie HIV-negative Patienten.

In »Für Sie gelesen« stellt **Dr. Christian Schölz** ein vor kurzem in »Nature« veröffentlichtes PCR-Verfahren vor, welches sowohl die Quantifizierung, als auch die Differenzierung intakter und defekter HIV-1-Proviren in latent infizierten Patientenzellen erlaubt. In den kommenden Jahren wird sich zeigen, inwieweit diese Methodik die Verlaufsbeobachtung der HIV-Reservoirgröße und insbesondere auch den Erfolg von Eradikationsansätzen unterstützen wird.

Mit allen guten Wünschen,
Ihr Professor Oliver T. Keppler

Antiretrovirale Therapie: Sind Medikamenten-sparende Kombinationen möglich?

Moderne antiretrovirale Therapien (ART) sind im Vergleich zu den frühen antiretroviralen Kombinationen effektiver, haben ein wesentlich geringeres Nebenwirkungsprofil und deutlich bessere Einnahmemodalitäten. Weiterhin muss jedoch von einer lebenslangen Therapie ausgegangen werden und es können Langzeitnebenwirkungen auftreten. Medikamenten-sparende, antiretrovirale Kombinationen, die Toxizitäten sowie Therapiekosten vermindern, werden seit Jahren untersucht. Vor kurzem wurden Ergebnisse aus den GEMINI-Studien [1] veröffentlicht, welche die Wirksamkeit sowie die Vorteile im Nebenwirkungsprofil für eine Zwei-Medikamenten-Therapie im Vergleich zur Einnahme von drei antiretroviralen Substanzen aufzeigte.

Antiretrovirale Therapie – wo kommen wir her?

Der Beginn einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) 1996 stellte den wesentlichen Einschnitt in der Therapie HIV-erkrankter Menschen dar. Erstmals konnte durch eine Kombinationstherapie, bestehend aus drei antiretroviralen Medikamenten, eine dauerhafte Virusunterdrückung und eine Immunrekonstitution der CD4-positiven T-Helferzellen erzielt und somit AIDS-assoziierte Erkrankungen sowie die Sterblichkeit verhindert werden. Zuvor hatten bereits Ergebnisse aus der europäisch-australischen DELTA-Studie und der amerikanischen ACTG-175-Studie gezeigt, dass die Therapie mit zwei nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) effektiver war als mit einem NRTI. Mit der Einführung der Protease-Inhibitoren (PI) und wenig später der nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) war schließlich die Grundlage für eine erfolgreiche HAART, basierend auf der Kombination von drei antiretroviralen Substanzen, gegeben (2 NRTI + 1 PI oder NNRTI) und das Paradigma der Tripple-ART gesetzt. Der initialen Begeisterung folgte bald Ernüchterung, begründet durch zum Teil fürchterliche Nebenwirkungen (gastrointestinale Beschwerden, Lebertoxizität, metabolische Veränderungen, Lipodystrophie-Syndrom), hohe Tablettenanzahl und täglich mehrfache Einnahmezeitpunkte, welche Patienten wie Behandler vor massive Herausforderungen stellte. Im Ergebnis entwickelten sich aufgrund unregelmäßiger Tabletteneinnahme, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, ungünstiger pharmakokinetischer Eigenschaften und niedriger Resistenzbarrieren der frühen antiretroviralen Medikamente bei vielen Patienten therapieresistente Viren. Ende der 1990er und während der frühen 2000er Jahre wurden in vielen HIV-Therapiezentren

verzweifelte Behandlungsstrategien angewendet (Mega-HAART, Doppelt-PI-Therapien, strukturierte Therapiepausen), um die Viruslast in Patienten mit multiresistenten HIV doch wieder unter die Nachweisgrenze zu drücken.

Seitdem hat sich viel verändert (**Abb. 1**). Für alle antiretroviralen Substanzgruppen liegen inzwischen modernere Medikamente vor, welche hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils, der antiviralen Potenz und pharmakokinetischen Charakteristika deutlich verbesserte Eigenschaften mit höheren Resistenzbarrieren und einfacheren Einnahmemodalitäten aufweisen. Zudem steht mit der Einführung der Integrase-Inhibitoren (INI) 2006 eine weitere Substanzgruppe zur Verfügung, welche eine sehr gute Verträglichkeit, Dosierbarkeit und Resistenzeigenschaften mit sich bringt. Mehrere antiretrovirale Substanzen werden inzwischen in einer Formulierung kombiniert, und die einmalig tägliche Dosierung in einer Tablette ist heutzutage eine bevorzugte Therapierealität.

Die Lebensqualität für HIV-infizierte Menschen und die Haltbarkeit von effektiven Therapien hat sich deutlich verbessert, und es gibt Hinweise, dass die Lebenserwartung von HIV-infizierten Menschen sich an die der allgemeinen Bevölkerung angleicht [2]. Andererseits gibt es jedoch auch Hinweise, dass die Morbidität und Mortalität bei HIV-Infizierten trotz erfolgreicher therapeutischer Virusunterdrückung weiterhin erhöht ist, auch wenn die Gründe hierfür im Vergleich zur prä-HAART-Ära sich verändert haben. Die HIV-Erkrankung wird inzwischen auch als eine inflammatorische Krankheit angesehen, in der im Rahmen von immunologischen Dysfunktionen und einem erhöhten Entzündungsniveau ein höheres Risiko für kardiovaskuläre und Tumorerkrankungen besteht. Hinzu kommt ein rascheres Altern des Immunsystems (Immunosenescence) und schließlich eine

mögliche Langzeittoxizität aufgrund der lebenslang einzunehmenden antiretroviralen Therapie [3, 4]. Medikamenten-reduzierte antiretrovirale Therapiekombinationen, die sowohl akkumulierende Toxizitäten als auch Therapiekosten vermindern würden, sind daher eine wichtige Strategie, welche aufgrund der besser wirksamen, modernen antiretroviralen Medikamente möglich scheinen – und somit das Paradigma der Tripple-ART durchbrechen [5].

Die GEMINI-1- und GEMINI-2-Studien

Vor kurzem wurden die Ergebnisse von zwei identischen, randomisierten, doppelt-verblindeten Phase-III-Studien (GEMINI-1 und GEMINI-2) in »The Lancet« vorgestellt [1]. In diesen Studien wurde über einen Zeitraum von 48 Wochen das antiretrovirale Therapieansprechen einer Medikamenten-reduzierten Zweifach-Kombination – mit dem NRTI Lamivudine und dem INI Dolutegravir (2DR, 2 *Drugs Regimen*) – gegenüber einer Dreifach-Standardtherapie – mit den NRTIs Emtricitabine und Tenofovir in Kombination mit Dolutegravir (3DR, 3 *Drugs Regimen*) – untersucht. Das Ergebnis zeigte eine Nicht-Unterlegenheit, also ein vergleichbares Therapieansprechen zwischen beiden Studienarmen. Eine Unterdrückung der HI-Viruslast unter 50 Kopien/ml wurde in über 90% der Patienten aus beiden Therapiearmen gesehen (**Abb. 2**), und das traf auch dann zu, wenn die Viruslast vor der Therapie sehr hoch war (>100.000 Kopien/ml). Es zeigte sich allerdings, dass Patienten mit niedrigen CD4-Helferzellen (<200 Zellen/ μ l) in der *Intention-to-Treat*-Analyse schlechter abschnitten hinsichtlich des virologischen Therapieerfolgs, wobei das weniger an einem virologischen Versagen lag, vielmehr wurde häufiger die Therapie abgebrochen oder umgestellt. Daher ist dieses Ergebnis mit Vorsicht zu bewerten. In beiden Therapiearmen wurde weiterhin ein

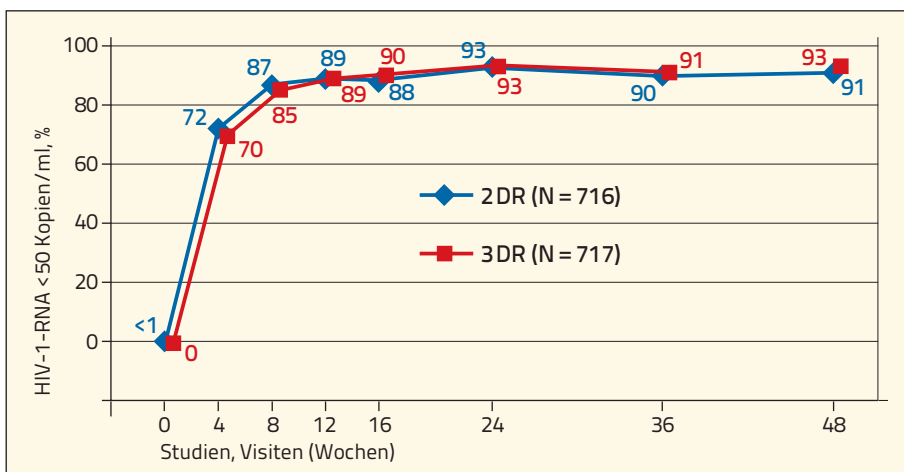
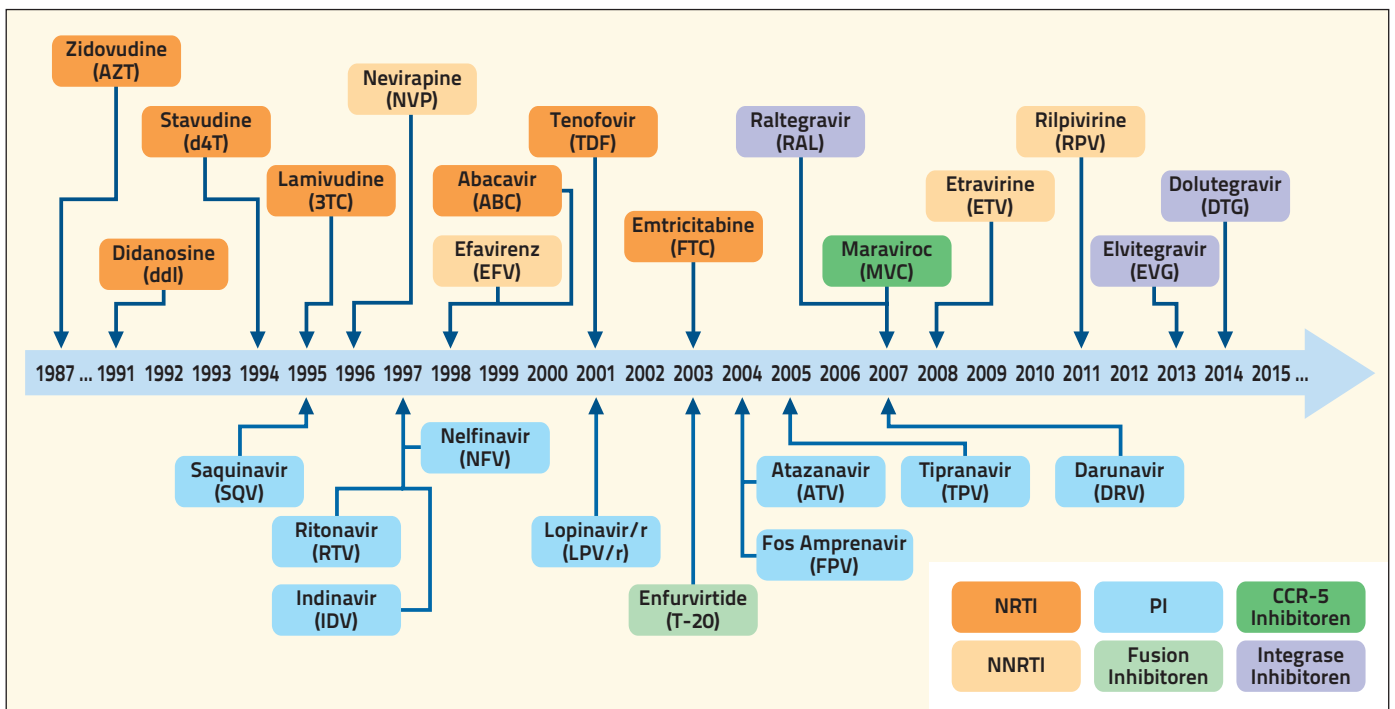


Abb. 1: Antiretrovirale Substanzen zum Zeitpunkt der europäischen Zulassung für unterschiedliche antiretrovirale Substanzklassen. NRTI = nukleosidische/nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren; NNRTI = nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren; PI = Protease Inhibitoren

Abb. 2: Patienten (%) mit einer Viruslast < 50 Kopien/ml über 48 Wochen einer antiretroviralen Therapie mit zwei Medikamenten (2DR) oder drei Medikamenten (3DR) aus den GEMINI-1- und GEMINI-2-Studien [Cahn et al, Lancet 2019].

vergleichbar sehr rascher Abfall der Viruslast gesehen (Abb. 2), welcher typisch für INI-basierte Therapien ist, jedoch auch auf eine hohe therapeutische Potenz mit nur zwei antiretroviralen Substanzen hinweist. In insgesamt 10 Patienten wurde ein Anstieg der Viruslast gesehen (sechs aus dem 2DR- und vier aus dem 3DR-Therapiearm), welches als ein virologisches Versagen gewertet wurde, jedoch wurde in keinem der Fälle eine NRTI- und INI-assoziierte Resistenzmutation nachgewiesen. Obwohl in einer vorherigen Pilotstudie mit der gleichen Zweifachtherapie in einem Patienten mit einem virologischen Therapieversagen Lamivudin- und Dolutegravir-assoziierte Resistenzen nachgewiesen wurden [6], kann insgesamt von einer hohen Resistenzbarriere dieses 2DR-Regimes über 48 Wochen ausgegangen werden.

Ein wesentliches Ergebnis aus den GEMINI-Studien ist, dass im 2DR-Arm im Vergleich zum 3DR-Arm insgesamt weniger Therapie-assoziierte Nebenwirkungen auftraten, wobei das vorwiegend Fälle mit

leichter Übelkeit betraf, welches häufig vorübergehend ist. Allerdings hatten Patienten aus dem 2DR-Arm weniger Veränderungen in Blutwerten, die einen erhöhten Knochenstoffwechsel anzeigen, weniger häufig erhöhte Kreatininwerte und zum Teil ein besseres Profil der Blutfettwerte (niedriger Cholesterin-/HDL-Cholesterin-Quotient). Diese Veränderungen können mit einer Langzeittoxizität assoziiert werden und zeigen somit einen Vorteil für eine Medikamenten-reduzierte Therapie. Allerdings treten diese Veränderungen typischerweise unter einer Tenofovir-haltigen Therapie auf. Es kann spekuliert werden, ob unter einer z.B. Abacavir/Lamivudin-basierten Dreifachtherapie ein ähnlicher Vorteil für eine Zweifachtherapie gesehen worden wäre.

Medikamenten-reduzierte antiretrovirale Therapiekonzepte

Die vielversprechenden Ergebnisse aus den GEMINI-Studien sind derzeit nur für einen relativ kurzen Zeitraum von einem Jahr be-

legt, allerdings werden die GEMINI-Studien noch weitergeführt und 96-Wochen-Daten werden erhoben. Die Ergebnisse zeigen, dass Medikamenten-reduzierte Kombinationen mit modernen antiretroviralen Substanzen möglich sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Zweifachtherapie mit Lamivudin, in Kombination mit den Ritonavir-geboosteten Protease-Inhibitoren Darunavir [7] und Lopinavir [8], für 48 Wochen gezeigt. Ein Überblick über neuere Studien mit Medikamenten-reduzierten antiretroviralen Kombinationen ist in Tabelle 1 (S. 4) dargestellt. Nicht alle Studien zeigten erfolgreiche Ergebnisse. Aus den Studien mit erfolgreichen Medikamenten-reduzierten Kombinationen zeigt sich jedoch auch, dass mindestens eine zweite antiretrovirale Substanz nötig ist, da in randomisierten, kontrollierten Studien mit Protease-Inhibitor-Monotherapie (Darunavir [9], Lopinavir [10, 11]) oder Integrase-Inhibitor-Monotherapie (Dolutegravir [12-14]) die therapeutische HIV-Suppression unterlegen war. Das traf sowohl für Patienten zu, die erstmals

Tabelle 1: Neuere vergleichende antiretrovirale Therapiestudie mit 2-Medikamenten-Kombinationen (2DR, »2 Drugs Regimen«).

Studie	Jahr	Anzahl Patienten	ART Regime	Verlaufsbeobachtung	Ergebnis
MODERN [16]	2016	797	MVC + DRV/r versus FTC/TDF + DRV/r	48 Wochen	Virologisches Ansprechen unterlegen (77,3% versus 86,8%)
ACTG A5142 [17]	2008	250	EFV + LPV/r versus 2 NRTI + EFV versus 2 NRTI + LPV/r	96 Wochen	Vergleichbares virologisches Ansprechen (83% versus 89% versus 77%), aber mehr Resistenzen im 2DR-Arm
NEATO11/ ANRS143 [18]	2014	805	RAL + DRV/r versus FTC/TDF + DRV/r	96 Wochen	Vergleichbares virologisches Ansprechen (81% versus 85%), aber mehr Patienten mit niedriger CD4-Zellzahl und hoher Viruslast hatten ein Therapieversagen
ANDES [7]	2018	145	3TC + DRV/r versus 2 NRTI + DRV/r	48 Wochen	Vergleichbares virologisches Ansprechen (93% versus 94%)
GARDEL [8]	2014	426	3TC + LPV/r versus 2 NRTI + LPV/r	48 Wochen	Vergleichbares virologisches Ansprechen (88,3% versus 83,7%) auch bei Patienten mit hoher Viruslast
GEMINI-1 u. GEMINI-2 [1]	2018	714 u. 719	3TC + DTG versus FTC/TDF + DTG	48 Wochen	Vergleichbares virologisches Ansprechen (91% versus 93%) auch bei Patienten mit hoher Viruslast

MVC = Maraviroc; DRV/r = Ritonavir geboostetes Darunavir; LPV/r = Ritonavir geboostetes Lopinavir; 3TC = Lamivudin; FTC/TDF = Emtricitabin/Tenofovir; RAL = Raltegravir; DTG = Dolutegravir; grün = 2-Drugs-Regimes; blau = 3-Drugs-Regimes; NRTI = nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

eine ART begannen oder im Rahmen einer Therapievereinfachung von einer Dreier- auf eine Monotherapie wechselten. Als zweite antiretrovirale Substanz wurde in den erfolgreichen Studien jeweils der NRTI Lamivudin gewählt, der ein gutes Nebenwirkungsprofil besitzt. Ein weiterer Effekt könnte auch sein, dass – selbst wenn Lamivudin nicht mehr wirksam ist – durch die Selektion der Lamivudin-spezifischen Resistenzmutation M184V die virale Fitness unter einem erhaltenen Selektionsdruck vermindert ist und dann eine funktionelle Monotherapie mit Dolutegravir, Darunavir oder Lopinavir für eine Virusunterdrückung [15] ausreicht.

Einschränkend sollte jedoch erwähnt werden, dass 2DR-Kombinationen bisher kaum in Patienten aus Afrika oder Südostasien untersucht wurden. Eine Kostenreduktion im Rahmen von Medikamentenreduzierten Kombinationen wäre in diesen Ländern besonders relevant für die dortigen Gesundheitssysteme. Allerdings sollte vor Beginn einer 2DR-Kombination vorab die Wirksamkeit durch eine Resistenztest-Analyse bekannt sein, die teuer und in der Regel in diesen Ländern nicht verfügbar ist. Weiterhin liegt dort häufiger eine Hepatitis-

B-Virus(HBV)-Koinfektion vor, welche durch die alleinige Gabe des HBV-wirksamen Lamivudin nicht ausreichend therapiert wäre.

Zusammenfassung

Medikamenten-reduzierte Zweifachkombinationen mit modernen antiretroviralen Substanzen sind bei vergleichbarer antiviraler Effektivität im Vergleich zu Dreierkombinationen möglich und könnten durch eine Reduktion von Langzeittoxizitäten die Lebensqualität von HIV-infizierten Menschen verbessern und Therapiekosten vermindern. Noch sind diese Zweifachkombinationen in den nationalen und internationalen HIV-Richtlinien nicht empfohlen, und es ist sicherlich ratsam, Ergebnisse aus längeren Verlaufsbeobachtungen abzuwarten.

Quellen

- 1 Cahn P, Madero JS, Arribas JR, Antinori A, Ortiz R, Clarke AE, et al. Dolutegravir plus lamivudine versus dolutegravir plus tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (GEMINI-1 and GEMINI-2): week 48 results from two multicentre, double-blind, randomised, non-inferiority, phase 3 trials. Lancet 2019; 393(10167):143-155.
- 2 May MT, Gompels M, Delpech V, Porter K, Orkin C, Kegg S, et al. Impact on life expectancy of HIV-1 positive individuals of CD4+ cell count and viral load response to antiretroviral therapy. AIDS 2014; 28(8):1193-1202.
- 3 de Coninck Z, Hussain-Alkhateeb L, Bratt G, Ekstrom AM, Gisslen M, Petzold M, et al. Non-AIDS Mortality Is Higher Among Successfully Treated People Living with HIV Compared with Matched HIV-Negative Control Persons: A 15-Year Follow-Up Cohort Study in Sweden. AIDS Patient Care STDS 2018; 32(8):297-305.

Dr. med. Arne Kroidl

Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Klinikum der Universität München (LMU)

Leopoldstraße 5 · 80802 München

akroidl@lrz.uni-muenchen.de



- 4 Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* 2011; 62:141-155.
- 5 Kroidl A, Eberle J. A two-drug regimen for anti-retroviral therapy. *Lancet* 2019; 393(10167):106-108.
- 6 Taiwo BO, Zheng L, Stefanescu A, Nyaku A, Bezins B, Wallis CL, et al. ACTG A5353: A Pilot Study of Dolutegravir Plus Lamivudine for Initial Treatment of Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)-infected Participants With HIV-1 RNA <500000 Copies/mL. *Clin Infect Dis* 2018; 66(11):1689-1697.
- 7 Figueroa MJ, Sued OG, Gun AM, Belloso W, Cecchini DM, Lopardo G, et al. DRV/R/3TC FDC for HIV-1 treatment naive patients: week 48 results of the ANDES STUDY. In: Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA; 2018.
- 8 Cahn P, Andrade-Villanueva J, Arribas JR, Gatell JM, Lama JR, Norton M, et al. Dual therapy with lopinavir and ritonavir plus lamivudine versus triple therapy with lopinavir and ritonavir plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-therapy-naive adults with HIV-1 infection: 48 week results of the randomised, open label, non-inferiority GARDEL trial. *Lancet Infect Dis* 2014; 14(7):572-580.
- 9 Girard PM, Antinori A, Arribas JR, Ripamonti D, Bicer C, Netzle-Sveine B, et al. Week 96 efficacy and safety of darunavir/ritonavir monotherapy vs. darunavir/ritonavir with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in the PROTEA trial. *HIV Med* 2017; 18(1):5-12.
- 10 Delfraissy JF, Flandre P, Delaugerre C, Ghosn J, Horban A, Girard PM, et al. Lopinavir/ritonavir monotherapy or plus zidovudine and lamivudine in antiretroviral-naive HIV-infected patients. *AIDS* 2008; 22(3):385-393.
- 11 Meynard JL, Moinot L, Landman R, Morand-Joubert L, Besseghir A, Kolta S, et al. Week 96 efficacy of lopinavir/ritonavir monotherapy in virologically suppressed patients with HIV: a randomized non-inferiority trial (ANRS 140 DREAM). *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(6):1672-1676.
- 12 Wijting I, Rokx C, Boucher C, van Kampen J, Pas S, de Vries-Sluijs T, et al. Dolutegravir as maintenance monotherapy for HIV (DOMONO): a phase 2, randomised non-inferiority trial. *Lancet HIV* 2017; 4(12):e547-e554.
- 13 Blanco JL, Marcelin AG, Katlama C, Martinez E. Dolutegravir resistance mutations: lessons from monotherapy studies. *Curr Opin Infect Dis* 2018; 31(3):237-245.
- 14 Hocqueloux L, Allavena C, Prazuck T, Bernard L, S. S, Esnault JL, et al. Dolutegravir monotherapy versus dolutegravir/abacavir/lamivudine for HIV-1-infected virologically suppressed patients: Results from the randomized non-inferiority MONCAY trial. In: 22nd International AIDS Conference. Amsterdam, Netherlands; July 23-27, 2018.
- 15 Gagliardini R, Cicullo A, Borghetti A, Maggiolo F, Bartolozzi D, Borghi V, et al. Impact of the M184V Resistance Mutation on Virological Efficacy and Durability of Lamivudine-Based Dual Antiretroviral Regimens as Maintenance Therapy in Individuals With Suppressed HIV-1 RNA: A Cohort Study. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5(6):ofy113.
- 16 Stellbrink HJ, Le Fevre E, Carr A, Saag MS, Mukwaya G, Nozza S, et al. Once-daily maraviroc versus tenofovir/emtricitabine each combined with darunavir/ritonavir for initial HIV-1 treatment. *AIDS* 2016; 30(8):1229-1238.
- 17 Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, Peeples L, Powderly WG, Klingman KL, et al. Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008; 358(20):2095-2106.
- 18 Raffi F, Babiker AG, Richert L, Molina JM, George EC, Antinori A, et al. Ritonavir-boosted darunavir combined with raltegravir or tenofovir-emtricitabine in antiretroviral-naive adults infected with HIV-1: 96 week results from the NEAT001/ANRS143 randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2014; 384(9958):1942-1951.

HIV – DIAGNOSTIK UND THERAPIE

PrEP und HIV-Selbsttest: eine heikle Mischung?

Mit dem Beschluss des Deutschen Bundesrats vom 21. September 2018 wurde die rechtliche Voraussetzung geschaffen, auch in Deutschland einen HIV-Selbsttest frei zu verkaufen [1]. So können seit Herbst letzten Jahres in Apotheken und Drogerien sowie im Internet verschiedene HIV-Selbsttests von Laien erworben werden. Dieser Punkt beinhaltet auch schon die größten Vorteile dieser »neuen« Testmöglichkeit. Die Untersuchung auf das Vorliegen einer HIV-Infektion kann so absolut anonym und vor allem allein, zu Hause – im geschützten und unbeobachteten Umfeld – durchgeführt werden. Zudem wird der Test durch den Vertrieb im Internet ubiquitär verfügbar, was ein entscheidender Vorteil in ländlichen Gebieten Deutschlands ist. Diese Faktoren sollen insgesamt dazu führen, dass die Schwelle zur Testung nach einem HIV-Risikokontakt niedriger wird und so HIV-Infektionen früher erkannt und behandelt werden.




HIV-Selbsttest gewährleistet absolute Privatsphäre

Ein wesentlicher Punkt, der die HIV-Selbsttests von anderen Testsystemen unterscheidet, ist das »Selbst«. Dies bedeutet nicht nur, wie oben erwähnt, dass der Test in absoluter Privatsphäre erfolgen kann – ohne einer assistierenden bzw. durchführenden Person offenbaren zu müssen, dass ein HIV-Risikokontakt stattgefunden hat – sondern auch, dass der Test selbstständig von Laien durchgeführt werden kann. Detaillierte und anschaulich bebilderte Packungsbeilagen, Videoanleitungen auf verschiedenen Homepages sollen es gänzlich

Labor-unerfahrenen Laien ermöglichen, die einfachen Methoden der HIV-Selbsttests fehlerfrei umzusetzen. Dabei ist neben der richtigen Durchführung des Tests nach Anleitung vor allem die korrekte Interpretation des Ergebnisses unter Umständen eine Herausforderung für den Anwender. Es ist nachzuvollziehen, dass unter der emotionalen Belastung, die ein solcher HIV-Selbsttest bedeutet, bei jedem Schritt Fehler auftreten können. So geben einige Hersteller an, wie erfolgreich ihr Test bei der Erstdurchführung durch unerfahrene Laien abgeschnitten hat bzw. wie hoch die Rate nicht interpretierbarer oder falsch interpretierter Tests war (**Tabelle 1, S. 6**).

Der Hersteller des Autotests VIH® gibt beispielsweise in seiner Packungsbeilage an, dass ca. 1% der Tests ungültig waren, zusätzlich aber ein weiteres Prozent der verbleibenden validen Ergebnisse durch eine fehlerhafte Laien-Interpretation verloren gehen. Ob diese Fehlinterpretationen zu fälschlicherweise positiver oder negativer Interpretation geführt haben, wird nicht weiter spezifiziert. Dennoch werden Sensitivität und Spezifität des Autotests VIH® vom Hersteller mit 100% und 99,8% angegeben. Diese Zahlen stammen somit sicher aus einer professionellen Labor-Studie und lenken im Marketing der Tests geschickt von Fehlerraten bei der Benutzung durch

Tabelle1: Übersicht der Charakteristika von in Deutschland erhältlichen HIV-Selbsttests: Autotest VIH®, INSTI®-HIV-Selbsttest, Exacto®-HIV-Selbsttest

			
Name des Tests	Autotest VIH®	INSTI®-HIV-Selbsttest	Exacto®-HIV-Selbsttest
Hersteller	AAZ-LMB, France	bioLytical Laboratories, Canada	Biosynex Group, France
Testprinzip	Immunochromatographie (lateral flow)	Immunofiltration (flow through)	Immunochromatographie (lateral flow)
Testgeneration	2. Generation	2. Generation	3. Generation
Antigene	gp 36, gp41	gp 36, gp41, gp 120	gp 36, gp41
Kontrolle	Protein A	Protein A	keine Angaben
Sensitivität	100 %	100 %	99,99 %
Spezifität	99,8 %	99,8 %	99,90 %
Ergebnisse	0,8 % ungültig, 99,2 % interpretierbar, 98,1 % korrekt interpretiert	keine Angaben	97,8 % korrekt u. interpretierbar, 98 % richtig ausgewertet
Probenvolumen	2,5 µl	50 µl	5 µl
Ablesezeitfenster	15 bis 20 Minuten nach Testende	nach Testende bis maximal 60 Minuten danach	10 bis 20 Minuten nach Testende
Anmerkung zu PrEP	»Nicht zur Anwendung im Kontext einer therapeutischen Überwachung bei Patienten bestimmt, die eine antiretrovirale Therapie erhalten.«	»Nicht geeignet für Anwender, die eine antiretrovirale Therapie (ART) erhalten.«	»Bei Personen, die Prä-Expositions-Prophylaxe (PrEP) nutzen, kann es bei Verwendung des EXACTO®-HIV-Tests zu falsch-negativen Ergebnissen kommen.«
Weblinks	http://www.autotest-vih.eu	http://www.instihivtest.com	http://www.hivtest-exacto.de

Laien ab. Auf diese Problematik der tatsächlichen falsch-positiven bzw. falsch-negativen Rate wird auch später in diesem Artikel nochmals eingegangen.

Weitere interessante Aspekte bei der Durchführung von HIV-Selbsttests

Nach diesem kurzen Ausflug in die Leistungsdaten der HIV-Selbsttests gibt es noch weitere interessante Aspekte bei der Durchführung von HIV-Selbsttests zu entdecken. Im Folgenden soll beispielhaft auf drei gängige

HIV-Selbsttests eingegangen werden, die auch auf der Homepage der Deutschen Aidshilfe aufgeführt sind [2, 3]: Alle drei Tests tragen ein CE-Zeichen und sind europaweit zugelassen, dennoch gibt es methodische Unterschiede und Besonderheiten zu verzeichnen (siehe auch die Weblinks in Tabelle 1 für nähere Informationen). Interessant ist, dass zwei der Tests nach dem Immunochromatographie-Prinzip (*lateral flow*) entwickelt wurden.

Beim **Autotest VIH®** [4] wurde ein Teststreifen in eine Kapillare verpackt, der

Exacto®-HIV-Selbsttest [5] imponiert optisch als »klassische Schnelltest-Kassette«. Abweichend davon findet beim **INSTI®-HIV-Selbsttest** [6] als Testmethode eine sogenannte Immunofiltration (*flow through*) Anwendung. Das Alleinstellungsmerkmal dieses Tests ist es, dass man sofort nach Testende ohne Verzögerung innerhalb einer Stunde das Ergebnis ablesen kann. Der INSTI®-HIV-Selbsttest wird daher vom Hersteller als »der Welt schnellster HIV-Selbsttest« beworben. Die anderen beiden Immunochromatographie-Tests

schreiben dem Benutzer Wartezeiten von 10 bzw. 15 bis 20 Minuten vor, innerhalb derer das Ergebnis abgelesen werden muss. Diese zeitliche Begrenzung könnte durchaus ein einschränkender Faktor in der Laienanwendung sein: Zum einen gilt es, das Ergebnis nicht zu früh abzulesen und möglicherweise ein falsch-negatives Ergebnis zu erhalten, auf der anderen Seite führt ein zu spät abgelesener Test gegebenenfalls auch zu einem falsch-positiven Ergebnis.

Ein weiterer signifikanter Unterschied zwischen den Testsystemen ist die benötigte Blutmenge. Im Prinzip arbeiten alle drei Testsysteme zwar mit »einem Tropfen Blut«, dieser kann bei Verwendung der Autotest-VIH®-»Kapillare« nur 2,5 µl groß sein, muss beim INSTI®-HIV-Selbsttest jedoch ein Volumen von ca. 50 µl haben, um eine ausreichende Menge Blut aus der Fingerbeere des Patienten in das entsprechende Testfläschchen tropfen zu können. Dennoch liegt die benötigte Blutmenge mit dem »einem Tropfen« deutlich unter der für den sogenannten HIV-Heimtest benötigten Menge von 15 Tropfen Blut. Bei einem HIV-Einsendetest, wie dem S.A.M.-Heimtest [7], erfolgt die Probenentnahme aus der Fingerbeere durch den Patienten selbst. Anschließend wird die Blutprobe an ein professionelles HIV-Testlabor verschickt und das Ergebnis dem Patienten wenige Tage später mitgeteilt.

Der Exacto®-HIV-Selbsttest ist der einzige dieser drei Tests, bei dem es sich um einen HIV-Test der 3. Generation handelt. Die beiden übrigen Tests wurden als 2.-Generation-Tests entwickelt. Somit ist der Exacto®-HIV-Selbsttest durch die unterschiedliche Anordnung der Antigene auf dem Testfeld in der Lage, neben IgG-Antikörpern zusätzlich gebundene IgM-Antikörper detektieren zu können. Es ist anzunehmen, dass dieser möglicherweise vorhandene Vorteil einer höheren Sensitivität durch die bereits erläuterte generelle Problematik der Laien-Anwendung nicht weiter ins Gewicht fällt. Die mögliche Verkürzung des diagnostischen Fensters ist aufgrund des bei allen Tests empfohlenen Testzeitpunktes – 12 Wochen nach dem letzten HIV-Risikokontakt – bei HIV-Selbsttests nicht relevant. Keiner der gängigen HIV-Selbsttests ist als 4.-Generation-Test konzipiert und somit in der Lage, neben den Antikörpern auch HIV-Antigen nachzuweisen. Diese HIV-Labortests der 4. Generation werden üblicherweise im professionellen Testumfeld (Ärzte, Gesundheitsämter etc.) verwendet.

In den Packungsbeilagen der hier erwähnten HIV-Selbsttests sind **zwei entscheidende Voraussetzungen** für ein korrektes Testergebnis ausgewiesen:

1. Eine HIV-Infektion kann nur sicher erkannt werden, wenn die Infektion vor mindestens drei Monaten erfolgt ist. Dies ist das übliche Zeitfenster, das bei Tests der 2. und 3. Generation abgewartet werden muss, um eine Antikörperantwort sicher nachweisen zu können. Nur durch die Hinzunahme einer sensitiven p24-Antigen-detektierenden Testkomponente kann diese diagnostische Lücke auf sechs Wochen verkürzt werden. Eine logische Schwachstelle der HIV-Selbsttests tritt somit bei Patienten auf, bei denen die Antikörperantwort nicht in der erwarteten Form abläuft. Ein möglicher Grund für eine verzögerte Serokonversion ist die Einnahme einer antiretroviralen Therapie. Typischerweise wird dieser Effekt bei früher Therapie einer frischen Infektion beobachtet und wurde in größeren Studien beschrieben (**Lesen Sie hierzu Dr. Münchhoffs diagnostisches Quiz auf Seite 15!**). Somit ist als
2. Voraussetzung für den Erhalt eines korrekten Testergebnisses zu beachten, einen HIV-Selbsttest nicht unter antiretroviraler Therapie zu verwenden. Bemerkenswert ist jedoch die vom Hersteller des Exacto®-HIV-Selbsttest als einschränkender Faktor explizit genannte Präexpositionsprophylaxe (PrEP).

Erkenntnisse aus der »The Partners PrEP Study«

Inwieweit eine Kombination dieser »Neuerungen« in der HIV-Diagnostik (Selbsttest) und -Therapie (PrEP) eine »heikle Mischung« darstellen könnte, bleibt in der Praxis abzuwarten. Es gibt jedoch bereits erste Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigt haben. Zwei Publikationen aus der »The Partners PrEP Study« beschreiben die zwei großen Gefahren, die bei der gleichzeitigen Anwendung von HIV-PrEP und HIV-Selbsttest zu erwarten sind:

Die Publikation von Donnell et al. [8] befasst sich mit der Gefahr falsch-negativer Ergebnisse und somit der Veränderungen der Sensitivität. Ndase et al. [9] untersuchen die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse und somit die Veränderungen der Spezifität.

Die »The Partners PrEP Study« wurde als randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Multicenter-Studie in Kenia und Uganda durchgeführt, bei der 4.747 HIV-diskordante, heterosexuelle Frauen und Männer auf drei Studienarme randomisiert wurden (Emtricitabine/Tenofovir (FTC/TDF); TDF-Monotherapie; Placebo). Die Probanden wurden monatlich in einem

Zeitraum von bis zu 36 Monaten auf eine HIV-1-Infektion untersucht. Beide Studien verwendeten *on site* zwei verschiedene HIV-Schnelltests (Determine HIV 1/2 (Abbott) plus Unigold (Trinity Biotech) oder Bioline (Standard Diagnostics) oder STAT-PAK (Chembio Diagnostic Systems)). Es wurden verschiedene 3.- und 4.-Generation-Labortests sowie Westernblot- und PCR-Untersuchungen durchgeführt, um retrospektiv die gewonnenen monatlichen Proben weiter zu charakterisieren.

Donnell et al. zeigen in **Abbildung 1** (S. 8) anschaulich, wie es unter PrEP zu einer verzögerten Serokonversion bei Verwendung von HIV-Schnelltests kommen kann und untermauern Ihre Messungen auch statistisch: Ein Großteil der HIV-positiven Proben (insgesamt 129 während der gesamten Studie) wurden sowohl im Placebo-, als auch in den PrEP-Armen bereits in der frühestmöglichen Probe nach Infektion erkannt (51 % im Placebo-Arm, 36 % im PrEP-Arm). Wurde der Zeitraum der Testung nach HIV-Infektion auf 100 Tage erweitert (entspricht etwa der empfohlenen Wartezeit von drei Monaten nach letzter Exposition bei HIV-Selbsttests), konnten im Placebo-Arm zusätzliche 44 % und in den PrEP-Armen weitere 47 % der Proben durch HIV-Selbsttests als positiv erkannt werden. Vergleicht man nun die Anzahl der erst später als 100 Tage nach HIV-Infektion im Selbsttest erstmals serokonvertierten Proben im Placebo-Arm (6 %) mit der entsprechenden Gruppe aus den PrEP-Armen (17 %), stellen die Autoren ein signifikant ($p=0,044$) erhöhtes Risiko für eine verzögerte Serokonversion bei gleichzeitiger Verwendung von HIV-PrEP und -Selbsttest fest (Odds ratio = 3,49). Wurden zusätzlich Proben ohne nachweisbaren TDF-Spiegel aus dem PrEP-Arm ausgeschlossen, erhöhte sich dieses detektierte Risiko weiter (Odds ratio = 7,18) und war hochsignifikant ($p=0,002$). Diese verzögerte Serokonversion ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es unter PrEP zu einer verminderten Virusreplikation kommt. Hierdurch steht weniger HIV-Antigen zur Entwicklung einer Immunantwort zur Verfügung. Im Gegensatz zu den geringeren Viruslasten konnte in dieser Studie aber nicht festgestellt werden, dass bei Ausbildung eines Antikörpertiters dieser auch in der Höhe reduziert ist. Zudem hat die andauernde PrEP-Gabe bei Durchbruchinfektionen nicht zu einer erhöhten Rate resistenter Viren geführt. Um falsch-negative HIV-Selbsttestergebnisse unter PrEP-Einnahme zu vermeiden, ist es deshalb wichtig, weiterhin an den empfohlenen vierteljährlichen HIV-Labortestungen festzuhalten, um eine ausreichend hohe Sensitivität der Untersuchung gewährleisten zu können.

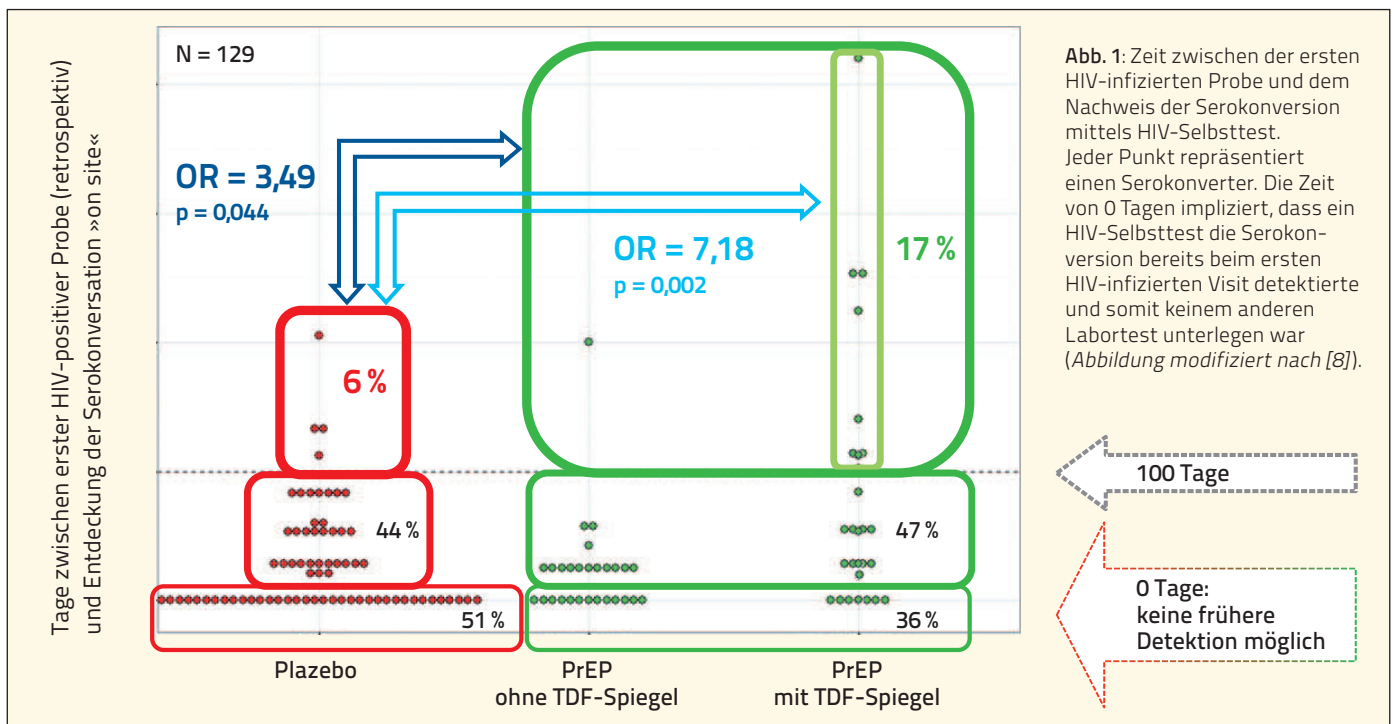


Abb. 1: Zeit zwischen der ersten HIV-infizierten Probe und dem Nachweis der Serokonversion mittels HIV-Selbsttest. Jeder Punkt repräsentiert einen Serokonverter. Die Zeit von 0 Tagen impliziert, dass ein HIV-Selbsttest die Serokonversion bereits beim ersten HIV-infizierten Visit detektierte und somit keinem anderen Labortest unterlegen war (Abbildung modifiziert nach [8]).

Am gleichen Studienkollektiv wurde unter Verwendung derselben HIV-Selbsttests vor Ort (stets zwei verschiedene HIV-Selbsttests gleichzeitig) in der Publikation von Ndase et al. die Richtigkeit der HIV-Selbsttestergebnisse anhand weiterer Labortests (3./4.-Generation-HIV-Labortest, Westernblot, PCR) überprüft. Es zeigte sich, dass von den insgesamt 99.009 Studien-Visits 99 als sogenannte richtig-positive Visits gewertet werden konnten, da mindestens ein HIV-Selbsttest positiv war und dies durch zusätzliche Labortests bestätigt werden konnte. Im Gesamtkollektiv standen im Gegensatz dazu 155 falsch-positive Visits, bei denen positive HIV-Selbsttestresultate nicht durch Labortests bestätigt werden konnten. Dies entspricht einer falsch-positiven Rate (FPR) von 0,15%. Bei der isolierten Auswertung der PrEP-Arme in dieser Studie zeigte sich, dass hier sogar 69,2% aller positiven Selbsttest-Visits im PrEP-Arm falsch-positiv waren (FPR=0,16). Dieser Unterschied zeigt zusammenfassend ein Problem auf, dass in der Literatur als »falsch-positiv-Paradoxon« bezeichnet wird. Dieses tritt auf, wenn in einer Population die monatliche Inzidenz einer Erkrankung geringer ist als die FPR des durchgeführten Tests. Somit ist es – auf diese Studie übertragen – von vornherein wahrscheinlicher, dass ein positives HIV-Selbsttestergebnis bei PrEP-Patienten ein falsch-positives Resultat darstellt, als dass die im Vergleich dazu seltenere HIV-Durchbruchinfektion richtig-positiv detektiert wird (monatliche HIV-Inzidenz im PrEP-Arm < 0,1% vs. FPR der verwendeten HIV-Selbsttest = 0,16%).

Insgesamt kann festgehalten werden,

dass die Einnahme einer PrEP die Sensitivität eines HIV-Selbsttests vermindern kann. Die hierfür ursächliche, verzögerte Serokonversion unter antiretroviraler Therapie würde in der Praxis zu einem verspäteten Wechsel auf eine angepasste HAART führen. Möglicherweise schwerwiegender als die postulierte Entwicklung von Resistenzen in diesem Zeitraum wäre im Fall eines falsch-negativen Ergebnisses jedoch das Risiko, dass Infizierte das Virus bei ungeschütztem Geschlechtsverkehr oder intravenösem Drogengebrauch unbewusst auf weitere Personen übertragen könnten.

»Positives Ergebnis heißt nicht immer HIV-Infektion!«

Wenn diese Aussage klar an betroffene Laien bei der Durchführung eines HIV-Selbsttests kommuniziert werden kann, dürfte selbst ein auftretendes »falsch-positiv-Paradoxon« keine wesentliche Gefahr für Anwender in Deutschland darstellen. Daher ist neben der Aufklärung der Patienten das deutschlandweit ausgebaute Netzwerk an Anlaufstellen für Beratung und die Verfügbarkeit von spezifischeren HIV-Labortests zur Bestätigung bzw. dem Ausschluss einer HIV-Infektion die wichtigste Voraussetzung

zur Erhöhung der Patientensicherheit.

Es bleibt abzuwarten, wie sich der Markt, die Akzeptanz und Durchführung von HIV-Selbsttests bei Laien in Deutschland entwickelt, um einschätzen zu können, ob die in diesem Artikel aufgezeigte, möglicherweise »heikle Mischung« bei gleichzeitiger Einnahme einer PrEP überhaupt eine wesentliche Rolle spielt.

Quellen

- 1 <http://www.pei.de>
- 2 <http://www.aidshilfe.de>
- 3 Unitaid, World Health Organization. Market and technology landscape: HIV rapid diagnostic tests for self-testing, 4th edition. Geneva: Unitaid; 2018.
- 4 <http://www.autotest-vih.eu>
- 5 <http://www.hivtest-exacto.de>
- 6 <http://www.instihivtest.com>
- 7 <http://www.samtest.de>
- 8 Donnell D et al.; AIDS. 2017 Sep 10; 31(14); The effect of oral preexposure prophylaxis on the progression of HIV-1 seroconversion.
- 9 Ndase P et al.; PLoS One. 2015 Apr 17;10(4); Frequency of false positive rapid HIV serologic tests in African men and women receiving PrEP for HIV prevention: implications for programmatic roll-out of biomedical interventions.

Dr. med Andreas Osterman

Klinische Virologie, NRZ für Retroviren
am Max von Pettenkofer-Institut
der Universität München (LMU)

Pettenkoferstraße 9a · 81539 München

osterman@mvp.lmu.de



Lücken beim Nachweis von HIV-1-RNA

Der Nachweis von HIV-1-RNA hat eine zentrale Rolle für die HIV-Diagnostik und die Therapie-Überwachung erlangt. In den 1990er Jahren ging die Entwicklung von langfristig wirksamen antiviralen Therapiemöglichkeiten Hand in Hand mit zunehmend empfindlicheren Nachweisverfahren für virale Nukleinsäuren (NAT), und diese wurden so zu einem zentralen Pfeiler der Therapiesteuerung. Um die Sicherheit von Blutkomponenten für die Blutersatztherapie zu erhöhen, wurden die Spenden ab 2004 zusätzlich zur serologischen Testung auf HIV-Antikörper und HIV-p24-Antigenen auch auf HIV-RNA untersucht. Mit der Verbreitung der NATs für die Infektionsdiagnostik insgesamt gab es einen nicht vorhersehbaren technologischen Entwicklungsschub, der zu guten Lösungen für die anfängliche Kontaminationsanfälligkeit führte und eine zuverlässige Bestimmung der HIV-RNA erlaubte.

Viruslastmessung als Wahlmöglichkeit

So war es nur konsequent, auch für die HIV-Bestätigungsdiagnostik die Viruslastmessung als Wahlmöglichkeit zuzulassen (2015, DVV; [1]). Bei einem deutlich positiven Ergebnis (HIV-1-RNA > 1000 Kopien/ml Plasma) ist damit eine HIV-1-Infektion bestätigt. Falls allerdings ein geringerer Wert oder ein negatives Ergebnis gemessen wird, muss zur weiteren Abklärung ein immunologisches Verfahren (Immunoblot) eingesetzt werden.

Die weitere technische Entwicklung führte in der jüngeren Vergangenheit zur Entwicklung von NATs, bei denen keine aufwändige Laborausstattung oder intensive Schulung des Nutzers nötig ist. Diese einfachen Testverfahren nähern sich den Point-of-Care-Test (POCT) WHO-Standards »ASSURED« (*affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and deliverable to end user*) und verkürzen im Einzelfall dramatisch die Zeit bis zum Erhalt des Ergebnisses einer Untersuchung. So können diese Kartuschen-PCR-Tests für bestimmte Fragestellungen sehr hilfreich sein und das weitere medizinische Vorgehen entscheidend beeinflussen.

Beispiel: Angenommen, ein Mitarbeiter des medizinischen Dienstes hat sich mit einer Blutabnahmekanüle bei einem therapierten HIV-Patienten gestochen. Die Einnahme der ART in den letzten Wochen ist unsicher. Der Patient ist nicht ansprechbar. Vorher war der Patient über längere Zeit gut eingestellt und die HI-Viruslast war konstant nicht nachweisbar.

Post-Expositions-Prophylaxe (PEP) – JA oder NEIN?

Hier kann man mit einer Kartuschen-PCR in unter zwei Stunden ein Ergebnis erhalten, das die Entscheidung über den Start einer PEP stark beeinflusst.

Die Kartuschen-PCRs erlauben eine Abarbeitung im Random-Access-Modus, was für schnelle Entscheidungen ein großer Vorteil vor einer regelmäßigen Abarbeitung im Batch-Verfahren sein kann. Da von diesem Ergebnis aber sehr weitreichende Entscheidungen abhängen, muss die Frage erlaubt sein, wie zuverlässig diese Tests funktionieren.

Negatives PCR-Ergebnis trotz deutlicher Viruslast

Im Herbst 2017 erhielten wir über den Hersteller eines HIV-Kartuschen-PCR-Systems (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) eine Probe aus Baden-Württemberg, die beim Testanwender trotz hoher Viruslast in einem Standard-PCR-System (> 10⁵ Kopien/ml) ein negatives Ergebnis mittels Xpert-HIV-1-Viral-load erbrachte. Bei der Resistenzsequenzierung wurde eine Infektion mit HIV-1 Subtyp C festgestellt. Aufgrund früherer Erfahrungen mit der Analyse von Fällen mit fehlerhaften Ergebnissen durch PCR-Tests für HIV, die als Zielregion einen Abschnitt im LTR nutzten (Roche cobas TaqScreen MPX und einem Blutbanktest [2]) lagen bereits geeignete Primer für die Amplifikation eines großen Abschnitts des LTR vor. Für eine Feinanalyse der Fehlbestimmung ist allerdings die genaue Kenntnis der Lage von Primern und Sonde unverzichtbar. Diese Information wurde von Cepheid vertraulich zur Verfügung gestellt.

Während der Bearbeitung des Falles zeigte die Reanalyse zweier älterer Blutspenderproben mit einer HIV-1-Subtyp-B-Infektion, bei denen andere Monotarget-LTR-PCRs ebenfalls negativ waren, dass auch diese Proben den Xpert-HIV-1-Test unterlaufen. Zeitnah wurde uns auch aus einem Labor in Rheinland-Pfalz von einem weiteren Fall eines falsch-negativen Ergebnisses berichtet. Eine Analyse des LTR-Bereichs wurde dort in Kooperation mit

unserem Labor mittels NGS durchgeführt. Hierbei handelte es sich ebenfalls um eine Infektion mit HIV-1 Subtyp B.

Die **Abbildung 1** (S. 10) zeigt das Basen-Alignment dieser vier unabhängigen Proben im HIV-1-LTR, die alle mit dem Monotarget-PCR-System von Cepheid nicht detektiert werden konnten. Zum Vergleich wurden im Alignment unproblematische Sequenzen für HIV-1 Subtyp B und C mitgeführt.

Aus der Analyse kann man sehen, dass im relativ konservierten LTR-Bereich bei einigen Sequenzen Deletionen auftreten oder Insertionen einzelner Basen. Durch den Verschiebung der nachfolgenden Sequenz ist somit eine stabile Bindung eines Primers oder der Detektionssonde über diesem Sequenzbereich nicht in allen Fällen gewährleistet. Eine Untersuchung aus dem Paul Ehrlich-Institut [3] an Blutspenderproben mittels verschiedener Monotarget-PCRs im Vergleich dokumentiert ebenfalls zwei Sequenzen (Fälle 4 und 5 in der angegebenen Publikation), die ein weitgehend identisches Basenmotiv zu der Probe aus Rheinland-Pfalz aufweisen und mit großer Wahrscheinlichkeit auch im Cepheid-Test problematisch gewesen wären.

Diskussion

Die Häufigkeit für das Vorkommen dieser aberranten Sequenzen ist schwierig abzuschätzen, da auch in großen Datenbanken (z.B. Los-Alamos-National-Laboratory HIV Sequence database) für diesen Bereich des HIV-Genoms nur eine deutlich geringere Anzahl von Sequenzen vorliegt als zum Beispiel für das gag- oder pol-Gen. Die obere Fehlerhäufigkeit könnte aber bei Berücksichtigung aller relevanten Abschnitte (3'-Primer, Sonde und 5'-Primer) im unteren Prozentbereich liegen.

In einer Vergleichsstudie zwischen dem Xpert, dem Aptima-HIV-Dx (Hologic) und dem M2000rt (Abbott) wurden sol-

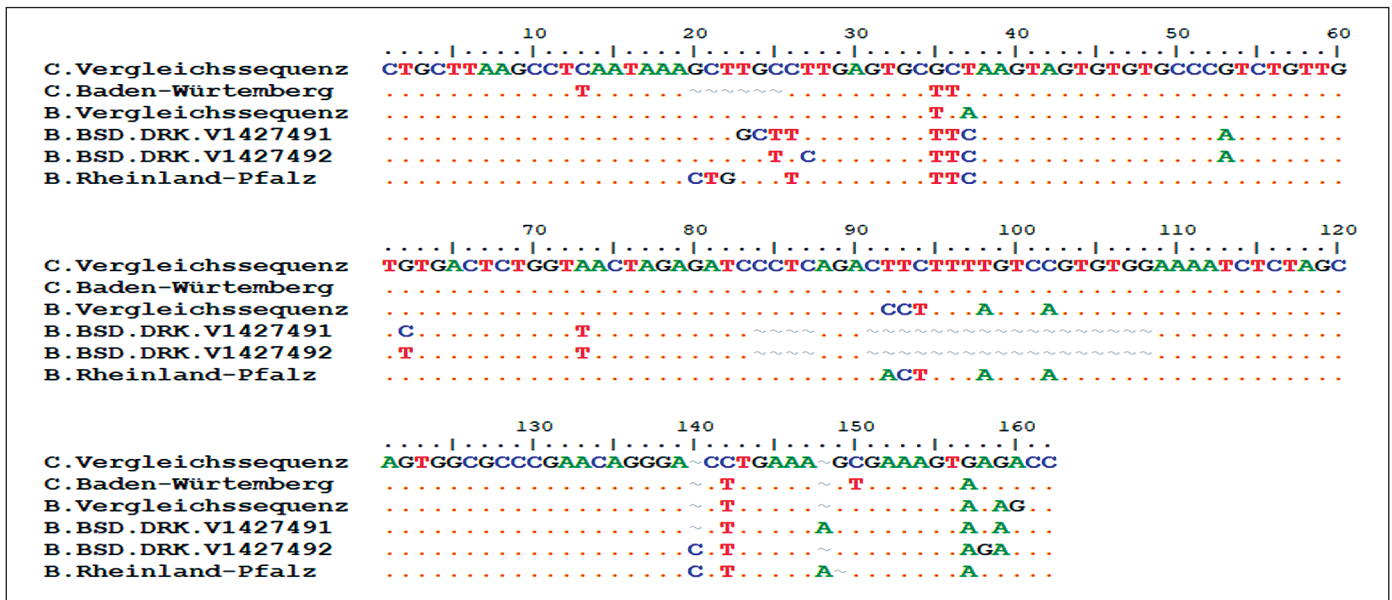


Abb. 1: Sequenz-Alignment von vier unabhängigen Proben im HIV-1-LTR, die mit dem Monotarget-PCR-System von Cepheid nicht detektiert werden konnten.

che extreme Unterquantifizierungen nicht beobachtet. In dieser israelischen Studie mit immerhin 404 Plasmen gab es keine wesentlichen Ausreißer [4]. Eine andere Vergleichsstudie aus Malawi von einem italienischen Team [5] konnte bei 274 Vergleichsproben eine hohe Übereinstimmung bestätigen. Die größten Unterschiede in der Viruslast zwischen dem Xpert-HIV-1-viral-load-Test und dem Abbott-Real-Time-HIV-1-Test lagen unter 2 Logstufen. Eine weitere südafrikanische Arbeitsgruppe testete 145 Proben parallel mit Xpert und mit TaqMan-v2 (Roche). Anschließend wurde mit M2000rt nachgetestet, ohne größere Diskrepanzen zu finden [6]. Hier könnte allerdings die Reihenfolge der Testung die Aufdeckung einer Unterquantifizierung verhindern, da Cepheid-Xpert und TaqMan-v2 beide im LTR amplifizieren und negative Proben nicht in die Testung mit dem M2000rt eingeflossen sind.

Angesichts der Berichte zur hohen Zuverlässigkeit des Xpert-HIV-1-viral-load-Tests ist es überraschend, dass in einer relativ kurzen Zeitspanne und bei einer überschaubaren Anzahl von Anwendern wir neben den vier hier analysierten Proben von mehreren weiteren Fälle erfahren haben, in denen eine erhebliche Unterquantifizierung (mehr als 100-fach) bis zum kompletten Ausfall des Virusnachweises durch

den Xpert-HIV-1-viral-load-Test beobachtet wurde. So gibt es eine fünfte Probe in Berlin (persönliche Mitteilung von Martin Obermeier, Berlin), die bisher noch nicht sequenziert werden konnte, sowie drei weitere Fälle in Niedersachsen (alle Subtyp B; persönliche Mitteilung von Rolf Kaiser, Köln).

Ausblick

Die Fa. Cepheid hat schon Mitte 2017 in der Packungsbeilage darauf hingewiesen, dass es für diesen Test eine Einschränkung des Einsatzbereichs gibt. Er darf nicht für die diagnostische Sicherung der HIV-Infektion und auch nicht für die Blutspendertesting eingesetzt werden. Idealerweise sollte er nur bei Patienten zur Therapiesteuerung genutzt werden, bei denen vor Therapiebeginn eine hohe Viruslast mit demselben Test gemessen wurde.

Bei zeitkritischen Fragestellungen, z.B. im Bereich der Organspendertesting oder bei der Entscheidung für oder gegen eine PEP, wäre der Einsatz einer schnell verfügbaren Kartuschen-PCR aber durchaus hilfreich und sollte im Zweifelsfall auch genutzt werden. Aufgrund der hier dokumentierten Analysen empfehlen wir jedoch eine zeitnahe Nachtestung mit einem zuverlässigeren Verfahren, wie das auch bei uns und in Berlin schon so praktiziert wird.

Wie schnell eine verbesserte Version des Xpert-HIV-1-viral-load-Tests auf den Markt kommen wird, ist unklar. Der Hersteller stellt einen Dual-Target-Test bis 2020/21 in Aussicht. Das Problem ist aber sicher erkannt worden und wird bei den Testentwicklern bearbeitet.

Quellen

- 1 H.F. Rabenau, N. Bannert, A. Berger, et al. Nachweis einer Infektion mit Humanem Immundefizienzvirus (HIV): Serologisches Screening mit nachfolgender Bestätigungsdiagnostik durch Antikörper-basierte Testsysteme und/oder durch HIV-Nukleinsäure-Nachweis. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 8 · 2015:877-886.
- 2 K. Hourfar, J. Eberle, M. Müller, et al. Human immunodeficiency virus 1 dual-target nucleic acid technology improves blood safety: 5 years of experience of the German Red Cross blood donor service Baden-Württemberg-Hessen. Transfusion 2018; 9999:1-8.
- 3 M. Chudy, M. Weber-Schehl, L. Pichl, et al. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets. Transfusion 2012; 52:431-439.
- 4 O. Mor, Y. Gozlan, M. Wax, et al. Evaluation of the RealTime HIV-1, Xpert HIV-1, and Aptima HIV-1 Quant Dx Assays in Comparison to the NucliSens EasyQ HIV-1 v2.0 Assay for Quantification of HIV-1 Viral Load. J Clin Microbiol 53:3458-3465. doi:10.1128/JCM.01806-15.
- 5 S. Ceffa, R. Luhanga, M. Andreotti et al. Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 realtime molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection. Journal of Virological Methods 2016;229:35-39.
- 6 N. Gous, L. Scott, L. Berrie und W. Stevens. Options to Expand HIV Viral Load Testing in South Africa: Evaluation of the GeneXpert® HIV-1 Viral Load Assay. PLoS ONE 11(12): e0168244. doi:10.1371/journal.pone.0168244.

Prof. Dr. med. Josef Eberle

Klinische Virologie, NRZ für Retroviren
am Max von Pettenkofer-Institut
der Universität München (LMU)

Pettenkoferstraße 9a · 81539 München

eberle@mvp.lmu.de



Patient mit HIV-assoziiertem Burkitt-Lymphom

Kasuistik: Bei einem 35-jährigen Mann wurde in einem auswärtigen Krankenhaus die Diagnose einer Lungentuberkulose gestellt. Die Diagnose basierte auf einer Computertomographie des Thorax, die eine typische knötchenförmige Infiltration der rechten Lunge zeigte, und auf einer positiver Kultur für *Mycobacterium tuberculosis* aus der broncho-alveolären Lavage. Daraufhin wurde der Patient sechs Wochen lang mit einer Vierfach-Medikamenten-Kombination aus Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol behandelt, gefolgt von einem Zwei-Medikamenten-Programm aus Isoniazid und Rifampicin.

Weiterer Krankheitsverlauf

Sieben Wochen nach Einleitung der Lungentuberkulose-Therapie entwickelte der Patient eine Dyspnoe. Im Röntgen-Thorax zeigte sich eine Brusttrübung und eine vollständige Infiltration der rechten Lunge, so dass eine Pleurabiopsie durchgeführt wurde. Die pathologischen Befunde erbrachten den Nachweis eines Burkitt-Lymphoms und der Patient wurde in die Uniklinik Köln verlegt. Hier wurde zusätzlich eine HIV-Infektion im fortgeschrittenen Stadium festgestellt: CD4-Zellzahl 160 Zellen/ μ l, 11% der gesamten Lymphozyten, CD4/CD8-Verhältnis 0,2, HIV-RNA 370.000 Kopien/ml.

Die weiteren serologischen Untersuchungen auf Cytomegalievirus, Toxoplasma gondii, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C und Syphilis erbrachten negative Ergebnisse. Im Staging zeigte sich ein mediastinaler und pleuraler Befall durch das Burkitt-Lymphom (Ann Arbor Stadium IIIB). Es wurde daraufhin eine intensive Kurzzeit-Chemotherapie eingeleitet, die den Empfehlungen der deutschen multizentrischen Studiengruppe zur Behandlung der adulten lymphatischen Leukämie (ALL) entsprach [Hoelzer D., Ludwig W.D., Thiel E., et al. Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 1996; **87**: 495-508].

Aufgrund von Bedenken hinsichtlich der kumulativen Toxizität wurde jedoch der erste Zyklus ohne Methotrexat durchgeführt. Nach dem zweiten Therapiezyklus (Block B) wurde mit der antiretroviralen Therapie (ART) begonnen, die aus Emtricitabin/Tenofovir und Raltegravir bestand. Aufgrund von potentiellen Wechselwirkungen mit der ART wurde das Rifampicin auf Rifabutin umgestellt. Während der ersten beiden Zyklen der intensiven Chemotherapie befiel den Patienten starke Übelkeit, er erlitt eine Mukositis und Fieber in Aplasie. Solche Begleiterscheinungen werden jedoch bei dieser Art von Chemotherapieprotokoll erwartet. Während der folgenden Behandlungszyklen zeigte der Patient dann

keine weiteren schweren Nebenwirkungen. Die Tuberkulosetherapie wurde durchgehend fortgeführt.

Nach sechs Monaten zeigte sich erfreulicherweise in der radiologischen Verlaufskontrolle (Computertomographie) eine vollständige Remission der Burkitt-Lymphom-Manifestation sowie der Tuberkuloseinfiltration. Die CD4-Zellzahl betrug 290 Zellen/ μ l und die HIV-RNA lag unter der Nachweisgrenze (< 20 Kopien/ml). Da keine weiteren Symptome einer Tuberkulose beobachtet wurden, konnte die Tuberkulosetherapie nach inzwischen 11 Monaten Dauer beendet werden.

Fünf Jahre nach Beendigung der Chemotherapie blieb der Patient in kompletter Remission und hat seine Vollzeitarbeit wieder aufgenommen. Die CD4-Zellzahl betrug 230 Zellen/ μ l und die HIV-RNA lag noch immer unterhalb der Nachweisgrenze (< 50 Kopien/ml).

Diskussion

Die Behandlung der Koinfektion mit HIV und Tuberkulose verursacht zusätzliche Schwierigkeiten, wie zum Beispiel hohe Tablettenbelastung, Adhärenzprobleme, paradoxe Reaktionen, kumulative Toxizitäts- und Medikamentenwechselwirkungen. Das antiretrovirale Therapieregime muss daher möglichst wenige Wechselwirkungen aufweisen (z.B. Raltegravir). Glücklicherweise hat sich die Prognose des HIV-assoziierten Burkitt-Lymphoms in den letzten Jahren deutlich verbessert. Dabei stellen niedrige Helferzellzahlen keine Kontraindikation für eine aggressive Therapie dar.

Eine sehr intensive Chemotherapie bei HIV-infizierten Patienten mit Burkitt-Lymphom ist auch bei Vorliegen weiterer opportunistischer Infektionen wie Tuberkulose möglich. Schließlich können oder sollten HIV-infizierte Patienten mit Lymphomen mittlerweile genau nach den gleichen onkologischen Standards behandelt werden wie HIV-negative Patienten.

Hinweis

Teile der Kasuistik wurden veröffentlicht unter: Lehmann C. et al. HIV Med. 2005 Jan; 6 (1): 51-3.

PD Dr. med. Clara Lehmann
Leitung der Infektionsambulanz
Innere Medizin I, Uniklinik Köln
Kerpenerstraße 62 · 50937 Köln
clara.lehmann@uk-koeln.de



Aufbau und Pflege der Stammsammlung – ein Arbeitsbericht

Die aktuelle Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums für Retroviren verfügt über definierte Virusstämme. Jedes Aliquot ist Hitze-inaktiviert (60 °C, 60 Minuten) und enthält ca. 1 ml Proben-Volumen. Die Materialien werden dauerhaft bei minus 80 °C gelagert. Der Versand erfolgt auf Trockeneis und wird von uns organisiert. Die anfordernde Stelle erhält vorab eine E-Mail mit dem voraussichtlichen Liefertermin und anschließend eine separate Rechnung (inkl. der anfallenden Transportkosten). Der aus Frankfurt übernommene Bestand verfügte über folgende Virusstämme:

- 9 Stämme aus der HIV-1-Gruppe M
- 2 Stämme aus der HIV-1-Gruppe O
- 2 Stämme aus der HIV-2-Gruppe A
- 1 Stamm aus der HIV-2-Gruppe B

Zur Erweiterung des Angebots wurde primär eine Aufstockung hinsichtlich der seltenen HIV-2-Isolate ins Auge gefasst.

Wie bekommt man neue HIV-2-Stämme?

In Deutschland spielt HIV-2 noch eine sehr geringe Rolle. Die Prävalenz ist ca. 1.000-mal geringer als für HIV-1 und damit ist die Patientendichte sehr gering. Dieser Umstand erklärt, warum es immer noch keinen quantitativen CE-zertifizierten HIV-2-Nukleinsäurenachweis (NAT) gibt und die komplette HIV-2-Diagnostik inklusive Viruslastmessung und ggf. Resistenz- und Kozeptoranalyse nur an sehr wenigen Zentren durchgeführt werden kann. Als eines dieser Zentren bekommen wir regelmäßig diagnostische Anfragen aus dem gesamten Bundesgebiet und teilweise aus Österreich. Ein nicht geringes Hindernis für die Gewinnung eines neuen HIV-2-Stammes liegt auch in der geringen Virämie über lange Phasen der HIV-2-Infektion. Etwa die Hälfte

der Patienten mit HIV-2 hat auch unbehandelt keine nachweisbare Viruslast. Eine Virusanzucht während dieser Phasen ist wenig erfolgversprechend. Aber auch unter erfolgreicher Therapie sind die Chancen für eine Anzucht schlecht. Es bleiben demnach nur virämische Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und solche mit resistenten Viren bei fehlgeschlagener Therapie. Am Anfang steht somit die Identifikation geeigneter Patienten. Im Laufe des letzten Jahres konnten wir einige wenige passende Fälle eingrenzen, von denen wir über Laborärzte Testanfragen bekamen. Wir haben dann unmittelbar mit dem behandelnden Arzt Kontakt aufgenommen. Bei Einverständnis des Patienten und Kooperation des Behandlers erhielten wir beim nächsten Praxistermin des Patienten ca. 20 ml ungekühltes EDTA-Blut auf schnellstem Weg zugestellt.

übertragen. Wenn sich stabil ansteigende Werte für p24-Antigen in der Primärkultur oder in der permanenten T-Lymphozytenkultur entwickelten, wurde ein Zellaliquot als Sicherung in flüssigem Stickstoff weggefroren. Im Erfolgsfall hat man nach vier bis sechs Wochen einen neuen HIV-Stamm stabil in permanenter Kultur. Hier zeigt sich bei Adaptation an die Zellen und schneller Virusreplikation (nach weiteren zwei bis drei Monaten) mitunter ein dramatischer cytopathogener Effekt mit Bildung großer sekundärer Synzytien (**Abb. 1 a und b**).

Herstellung der Stammaliquots

Diese Kultur wurde im Folgenden expandiert, so dass eine größere Zellzahl in einem größeren Volumen möglichst viele Viren gleichzeitig produziert. Der Vermehrungsprozess wurde durch regelmäßige Viruslastmessungen im Zellüberstand überwacht, und bei zufriedenstellender Produktion konnte der Zellkulturüberstand geerntet werden. Mit einer ersten Zentrifugation wurden restliche Zellen entfernt und anschließend der zellfreie Überstand ultrazentrifugiert. Das resultierende pelletierte Material wurde dann in ca. 10 ml NaCl resuspendiert, homogenisiert und für mindestens 60 Minuten bei 60 °C thermisch inaktiviert. Eine Stichprobe davon wurde unmittelbar wieder in empfängliche Zellen eingepflegt und für 4 Wochen kultiviert, um den Inaktivierungsprozess zu kontrollieren. Der Rest wurde im 10-fachen Volumen inaktivierten fötalen Kälberserums verdünnt, auf 1 ml aliquotiert und bei minus 80 °C weggefroren. Nach Abschluss der Inaktivierungskontrolle wurden von dieser Produktionscharge Aliquots im eigenen Labor auf die Viruskonzentration vermessen und auch in andere Zentren versandt (Virologische Institute der Universitäten Frankfurt und Erlangen), um einen Abgleich zwischen den unterschiedlichen HIV-2-NATs zu erhalten.

Virusisolierung

Bei Probeneingang wurden die Blutlymphozyten aus dem Patientenblut isoliert und CD8-Zellen abgereichert. Die gewonnene Zellfraktion wurde anschließend mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und unter IL-2-Zugabe in Kultur genommen. Parallel wurde am Ansatztag auch von einer nicht-infizierten, gesunden Person (Spender) EDTA-Blut gewonnen, periphere Lymphozyten/Monocyten (PBMCs) isoliert, diese mit PHA stimuliert und mit IL-2 kultiviert. Am nächsten Tag wurde PHA ausgewaschen und eine kleine Portion der Spenderzellen zum Patientenansatz zugefüttert. Diese Kultur wurde anschließend zweimal wöchentlich beobachtet und bei Bedarf wurden Spenderzellen zugesetzt. Nach einer Woche erstmalig – und dann weiter im wöchentlichen Turnus – wurde Kulturüberstand auf HIV-p24-Antigen getestet und bei positivem Signal eine erste Portion des Zellkulturüberstands auf permanente T-Lymphozytenkulturen (HUT-78)

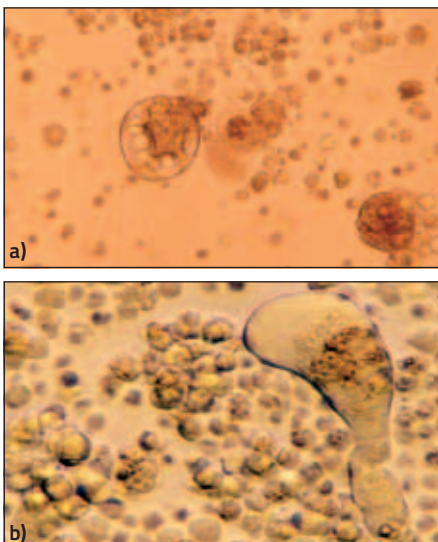


Abb.1: Fotos: Vincent Eberle.

a) Neben nicht-infizierten HUT-78-Zellen sind sekundäre Synzytien mit Dutzenden von Zellkernen zu sehen. Um diese Zellhaufen bildet die Zellmembran Blasen.

b) Im weiteren Verlauf dringt immer mehr Flüssigkeit in diese Blasen ein und die Zellkerne scheinen zu kondensieren. Zuletzt bilden sie dunkle, granulierte Brocken.

Tabelle 1: Stammsammlung des NRZ für Retroviren in München

Virus	Gruppe/ Subtyp	Sequenzvalidiert	GenBank Accession	Zellexpansion	Roche [§] cp/ml	Abbott [§] cp/ml	Tropismus
HIV-1 92UG029	M/A	ja (env)	DQ067920 (pol) AF205862 (env) FJ542333 (gag)	CEM M7	98.200	95.965	X4*
HIV-1 2044	M/B	indirekt (Pubmed PMID: 8970955)	nicht verfügbar	PBMC	126.000	129.370	X4*
HIV-1 92BR021	M/B	ja (env)	AY669715 (env)	PBMC	97.600	146.184	R5*
HIV-1 NH8966	M/C	nein	nicht verfügbar	PBMC	75.800	110.668	R5*
HIV-1 IN22	M/C	ja (env)	AF286232 (complete genome)	PBMC	87.900	80.985	R5*
HIV-1 Eli	M/D	ja (env)	K03454 (complete genome)	PBMC	170.000	151.231	X4*
HIV-1 92UG021	M/D	ja (env)	AF009396 (pol) AY669753 (env) FJ542344 (gag)	PBMC	64.200	66.403	X4*
HIV-1 93BR020	M/F	ja (env, pol)	AF005494 (complete genome)	PBMC	177.000	166.309	X4*
HIV-1 RU570	M/G	ja (env)	DQ234256 (pol) U08368 (env)	PBMC	63.500	111.422	R5*
HIV-1 13740	O	nein	nicht verfügbar	PBMC	84.100	402.508	R5**
HIV-1 2549-95	O	indirekt (Phylo- genetik pol FFM u. env GenBank)	AF009032 (env) AF009020 (gag)	CEM M7	132.000	100.121.105	R5**
Virus	Gruppe			Zellen	Frankfurt a.M. [°]	Erlangen [°]	München [°]
HIV-2 Rod10	A	ja (pol)	X05291 (complete genome)	CEM M7	544.000 cp/ml (23,67 Ct)	170.000 cp/ml (22,1 Ct)	646.000 cp/ml (23,7 Ct)
HIV-2 CBL-20	A	ja (pol)	AY965906 (pol)	PBMC#	469.000 cp/ml (23,88 Ct)	58.000 cp/ml (23,8 Ct)	88.400 cp/ml (26,37 Ct)
HIV-2 EHO	B	ja (pol)	U27200 (complete genome)	CEM M7	2.171.000 cp/ml (21,85 Ct)	160.000 cp/ml (22,2 Ct)	85.000 cp/ml (26,42 Ct)
HIV-2 ATU	A	ja (pol,env)	(pending)	HUT 78	8.200.000.000 cp/ml (14,75 Ct [§])	1.200.000.000 cp/ml (16,9 Ct [§])	2.240.000.000 cp/ml (19,83 Ct [§])
HIV-2 AMA	A	ja (pol)	(pending)	HUT 78	1.720.000.000 cp/ml (16,97 Ct [§])	175.000.000 cp/ml (19,8 Ct [§])	95.200.000 cp/ml (24,16 Ct [§])
HIV-2 SPE	A	ja (pol)	(pending)	HUT 78	5.500.000.000 cp/ml (15,3 Ct [§])	570.000.000 cp/ml (18,0 Ct [§])	1.220.000.000 cp/ml (20,66 Ct [§])

* = Geno2pheno [coreceptor] 2,5; ▶ <https://coreceptor.geno2pheno.org/>; Einstellung: German Treatment Guidelines;

** = Rupp et al., JAIDS 53(3):412-3 (2010); # = 4-Donor-Pool; § = COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan HIV-1-Test v.2.0 / Abbott RealTime HIV-1; ° = Inhouse-PCR; Umrechnungsfaktor cp/ml zu IU/ml = Erlangen 1,1 und München 3,4; § = Ct bei der Testung einer 1:100-Verdünnung

Charakterisierung

Bereits aus der ersten Probe des Patienten wurde eine Sequenzierung der für die Therapie relevanten Stellen (Protease, Reverse Transkriptase, Integrase und Hüllgenbereich für die Korezeptoranalyse) durchgeführt.

Aktueller Stand der Stammsammlung

Zu den aus Frankfurt stammenden Isolaten konnten auf diese Weise im vergangenen Jahr drei weitere HIV-2-Isolate für die Stammsammlung hinzugewonnen werden. Alle drei gehören der HIV-2-Gruppe A an. Ein Isolat aus Baden-Württemberg (HIV-2-ATU) ist gegen alle nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe (NRTIs) und Protease-Inhibitoren (PI) hochgradig resistent. Es weist einen klaren CxCR4-Tropismus auf. Ein weiteres Isolat stammt aus Berlin (HIV-2-AMA). Hier bestehen noch keine Resistenzen. Das dritte aus Nordrhein-Westfalen (HIV-2-SPE) stammt ebenfalls von einem noch Therapie-naiven Patienten.

Der aktuelle Bestand der Stammsammlung ist in der **Tabelle 1** aufgeführt und auf der Internetseite des Instituts abrufbar:

▶ <http://www.mvp.uni-muenchen.de/nationales-referenzzentrum-fuer-retroviren/hiv-stammsammlung/>

Eine komplette Sequenzierung der neu gewonnenen Stämme ist im Gang. Zudem werden dieses Jahr noch ein weiterer HIV-2-Stamm und auch mindestens ein weiterer HIV-1-/Gruppe-O-Stamm in die Sammlung integriert. Für zusätzliche Isolate sind solche mit besonderen Eigenschaften (seltenen Varianten, besondere Resistenzen etc.) interessant. Die Materialien können für die

HIV-Forschung, zur Testentwicklung und -Validierung eine wichtige Hilfestellung sein.

Danksagung

Wir danken Dr. phil. Eva Wolf (MVZ Karlsplatz, München), Dr. med. Maria Procaccianti (Karlsruhe), Dr. med. Stefan Neifer (Zentrum für Infektiologie, Berlin) und Dipl. Biol. Patrick Braun (Praxis Dr. Knechten, Aachen) für die Bereitstellung der Patientenmaterialien sowie Prof. Dr. med. vet. Annemarie Berger (Uni Frankfurt) und Dr. med. Klaus Korn (Uni Erlangen) für die Austestung der Stämme.

Prof. Dr. med. Josef Eberle

Klinische Virologie, NRZ für Retroviren
am Max von Pettenkofer-Institut
der Universität München (LMU)

Pettenkoferstraße 9a · 81539 München

eberle@mvp.lmu.de



Ein neues Verfahren erlaubt die detaillierte Quantifizierung des Reservoirs latenter HIV-1-Proviren

Im Rahmen einer HIV-1-Infektion entstehen stabile Reservoirs infizierter latenter Zellen, welche der klassischen, antiretroviralen Therapie entgehen und somit eines der Hauptprobleme bei der medikamentösen Behandlung von HIV darstellen [1, 2]. Hierbei lässt eine große Anzahl an Studien vermuten, dass der Großteil der latenten Zellen aus sogenannten ruhenden CD4-T-Zellen besteht. Um neuartige Strategien zur Eliminierung dieser Zell-Subpopulation zu testen, aber auch um mögliche Behandlungserfolge diagnostisch messen zu können, ist eine Quantifikation dieses Reservoirs unabdingbar. Bisher wurden hierfür zellbasierte *viral outgrowth*-Tests durchgeführt, die auf einer Reaktivierung der latenten Proviren basieren. Die Problematik dieser Tests ist zum einen die unvollständige Reaktivierung der Reservoir-Zellen innerhalb des Testzeitraums und zum anderen die Verwendung von Standard-PCR-Sonden, welche keinerlei Unterscheidung zwischen defekten und intakten Viren zulassen. Die Relevanz einer derartigen Unterscheidung wird durch mehrere Studien verdeutlicht, die zeigen konnten, dass nur etwa zwei bis drei Prozent aller neu gebildeten Viren intakt sind und somit zur Infektion weiterer Zellen führen können [3, 4].

Eine Gruppe Wissenschaftler verschiedener Universitäten unter Leitung von Robert F. Siliciano hat sich nun dieser Thematik angenommen und einen Test entwickelt, der sowohl die Quantifizierung als auch die Differenzierung intakter und defekter Proviren erlaubt [5]. In ihrer Studie *A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses*, erschienen in der Fachzeitschrift »Nature«, verwendeten die Forscher *near full genome sequencing* (nFGS), um die Häufigkeit von Mutationen innerhalb des viralen Genoms zu bestimmen. Hierbei zeigte sich – in Einklang mit den zuvor erwähnten Studien [3, 4] –, dass nur etwa 2,4% der Proviren in Patienten intakt sind (Abb. 1A), während der Großteil der Viren gravierende Defekte in Form von Deletionen und/oder G → A-Hypermuationen aufwies und damit zu einer Verkürzung von viralen Genen oder dem frühzeitigen Abbruch von Leserahmen führt. Interessanterweise beeinflussten die detektierten Mutationen in 97% der Fälle die Aktivität des Transkriptions-Aktivators Tat, welcher für die Transkription der proviralen DNA erforderlich ist (Abb. 1B).

Neben der Genom-weiten Identifizierung von Defekten konnten die Wissenschaftler mit Hilfe der Daten zwei Bereiche innerhalb des Verpackungssignals psi (ψ) und des *envelope*-Gens (*env*) bestimmen, die eine gezielte Bestimmung defekter bzw. intakter Proviren mittels klassischer PCR erlauben. Auf diese Weise ist es möglich, bei über 90% der mit bisherigen Standardverfahren messbaren Viren eindeutige Defekte nachzuweisen.

Durch die Anwendung der sogenannten *digital-droplet-PCR* (ddPCR) wird dabei eine absolute Quantifizierung erreicht [6, 7]. Die Nukleinsäureproben werden hierfür in

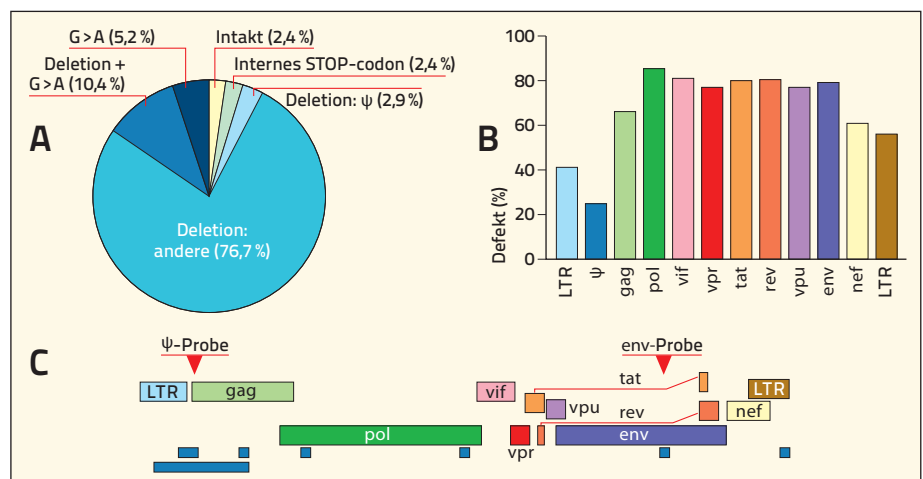


Abb. 1: DNA-basierte Messung von HIV-Proviren (abgewandelt aus Bruner et. al., Nature, 2019 [5]).
A) nFGS-basierte Messung von Proviren in CD4-T-Zellen von Patienten unter ART. Mehr als 97% der identifizierten Proviren weisen gravierende Defekte durch Deletionen und Hypermuationen auf.
B) Fraktion defekter Proviren mit Defekten in den jeweiligen Genen oder Elementen. Als Defekt gelten mutierte START-codons, interne STOP-codons, Verschiebungen im Leserahmen (*frameshifts*), Insertionen oder Deletionen. *Splicing*-Defekte sind nicht dargestellt, erhöhen aber leicht die Anzahl defekter Proviren, insbesondere im nef-Lokus.
C) Schematische Darstellung des HIV-Genoms. Blau markiert sind bisher verwendete Bereiche für Nachweis-PCRs wie z.B. Alu-PCR. Die roten Pfeile markieren die Bereiche der neu-designten PCR-Sonden für das IPDA-Verfahren.

Wasser-Öl-Emulsions-Tröpfchen in Nanoliter-Größe überführt, in denen die PCR-Amplifikation stattfindet. Durch die massive Probenaufteilung wird eine absolute Bestimmung der Ziel-DNA-Kopien pro Eingangsprobe ermöglicht, ohne dass Standardkurven erzeugt werden müssen. In den Tröpfchen (*Droplets*) vorhandene intakte Proviren können somit durch gleichzeitigen Nachweis der ψ - und *env*-Region quantitativ nachgewiesen werden (Abb. 1C)

Das neue Verfahren, welches *intact proviral DNA assay*, kurz IPDA, getauft wurde, konnte erfolgreich auf Testproben sowie verschiedene Probenmaterialien infizierter Spender angewendet werden und zeigte

eine deutliche Performance-Steigerung im Vergleich zu den bisher verwendeten PCR-basierten Methoden. Die Wissenschaftler weisen allerdings daraufhin, dass der Test insbesondere für die begleitende Diagnostik von unter Behandlung stehender Patienten entwickelt wurde und somit keine Unterscheidung zwischen integrierten Proviren und nicht-integrierten, linearen oder zirkulären Formen unterscheiden kann, wie es zum Beispiel mit Hilfe von Alu-PCRs möglich ist. Allerdings sind diese speziellen, nicht-integrierten Formen relativ selten in Patienten unter Langzeit-ART-Behandlung [3].

Mit Hilfe des IPDA konnten die beteiligten Wissenschaftler nachweisen, dass so-

wohl bei Zellen von Patienten unter ART, als auch bei *elite controllers* nur geringe Mengen intakter Proviren nachweisbar waren, während sich in Zellkulturen intakte Formen durchsetzen. Zudem wurde die Abnahme des Reservoirs während der Behandlung mit ART untersucht. Hierbei konnten bei den meisten Patienten Reservoir-Halbwertszeiten von etwa 44 Monaten festgestellt werden, allerdings waren auch deutlich langsamere Verläufe von 100 bis 300 Monaten bis hin zu keiner Veränderung messbar.

Insgesamt erlaubt das IPDA-Verfahren eine deutliche Verbesserung der bisherigen HIV-Diagnostik durch die hiermit ermöglichte Quantifizierung des Reservoirs latenter HIV-1-Proviren. Die Autoren gehen davon aus, dass der hier vorgestellte, neu entwickelte diagnostische Test auf intakte Proviren die HIV-Forschung insbesondere im Hinblick auf potentielle Wirkstoffe deutlich forciert.

Quellen

- 1 Chun, T. W., Moir, S. & Fauci, A. S. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nat Immunol* 16, 584–589 (2015).
- 2 Chun, T. W. et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13193–7 (1997).
- 3 Bruner, K. M. et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat. Med.* (2016). doi:10.1038/nm.4156.
- 4 Imamichi, H. et al. Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-

infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2016). doi:10.1073/pnas.1609057113.

5 Bruner, K. M. et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature* (2019). doi:10.1038/s41586-019-0898-8.

6 Sykes, P. J. et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* (1992).

7 Hindson, B. J. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* (2011). doi:10.1021/ac202028g.

Dr. phil. nat. Christian F. Schölz

Gruppenleiter » Proteomics of Virus-Host interaction«, Klinische Virologie, NRZ am Max von Pettenkofer-Institut der Universität München (LMU)

Feodor-Lynen-Str. 23 · 81377 München

schoelz@mvp.lmu.de



HIV – DIAGNOSTIK UND THERAPIE

Diagnostisches Quiz: falsch-negative HIV-Suchtest-Ergebnisse?

Krankheitsverlauf

Ein über 55-jähriger Mann stellte sich im Oktober 2018 bei seiner Hausärztin mit atypischer Pneumonie vor. Bei gegebenem HIV-Expositionsrisiko aufgrund der sexuellen Orientierung des Patienten hatte die Ärztin den Verdacht einer HIV-Infektion und veranlasste eine HIV-Testung – mit positivem Ergebnis. Daraufhin wurde der Patient in eine HIV-Spezialambulanz überwiesen. Die durchgeführte Diagnostik bestätigte eine HIV-Infektion mit einer Viruslast von $6,5 \times 10^6$ Kopien/ml und einer extrem niedrigen CD4-Zellzahl von 5 Zellen/ μ l. Des Weiteren wurde eine *Pneumocystis jirovecii* Pneumonie (PJP) diagnostiziert und spezifisch therapiert. Der Patient wurde unmittelbar antiretroviral behandelt. Soweit also stellt sich eine nicht ungewöhnliche klinische Konstellation dar, die typisch ist für sogenannte *HIV late presenter*, bei denen die Diagnose HIV-Infektion erst bei klinischer Manifestation im Stadium AIDS gestellt wird.

Vorgeschichte

Interessant an diesem Fall ist jedoch die Vorgeschichte: Der Patient ließ sich über die letzten Jahre regelmäßig im lokalen Ge-

sundheitsamt auf HIV testen, zuletzt im Juni 2018 – mit durchgehend negativen Ergebnissen. Der dort verwendete Test ist die aktuellste Version der zur Verfügung stehenden HIV-Suchtests, ein sogenannter 4.-Generation-Test (Nachweis von p24-Antigen und Antikörpern gegen gp41) der Firma Abbott. Aufgrund dieser potentiell falsch-negativen Suchtestergebnisse wurde im Februar 2019 bei dem Patienten eine Serumprobe genommen und an das Landesgesundheitsamt geschickt, um erneut eine Testung durchzuführen. Auch diese Probe ergab dort im 4.-Generation-Test ein negatives Ergebnis. Ein alternativ verwendeter 3.-Generation-Test (Murex, Diasorin) ergab ein positives Ergebnis, wobei der Westernblot (Fujirebio Immunoblot) negativ ausfiel.

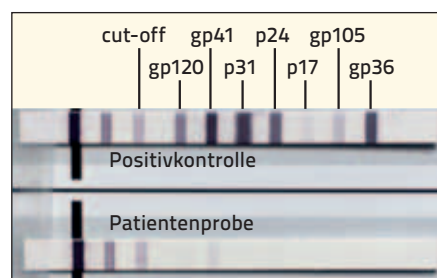


Abb. 1: Westernblot-Ergebnis zur Probe vom Februar 2019 (Fujirebio Inno-LIA). Negatives Ergebnis mit einer schwachen Bande für gp41 unterhalb der *cut-off*-Intensität.

Untersuchungsergebnisse

Aufgrund der diskrepanten Ergebnisse wurde die Probe an das NRZ für Retroviren zur weiteren Abklärung geschickt. Auch in unserem Labor ergab der Abbott-Suchtest ein negatives (*signal/cutoff* = 0,54), ein anderer 4.-Generation-Test (Murex XL, Diasorin) ein positives Ergebnis (*signal/cutoff* = 21). Der Westernblot fiel auch bei uns negativ aus, mit lediglich einer schwachen Bande für gp41-Antikörper unterhalb der *cut-off*-Intensität (Abb. 1).

Fragestellung

Was könnte bei diesem Patienten vorliegen?

Falsch-negative Test-Ergebnisse für den Abbott-Suchtest und für Westernblot? Möglicherweise eine seltene Virusvariante, die nicht detektiert wird? Ein humoraler Immundefekt des Patienten mit sehr niedrigen Antikörpertitern?

Sie haben einen Joker: Es gibt noch Material von einer Rückstellprobe des Patienten vom Juni 2018 (nur 100 μ l Serum!).

Welche Untersuchung(en) veranlassen Sie?

Die Lösung zu diesem Fall finden Sie auf Seite 16!

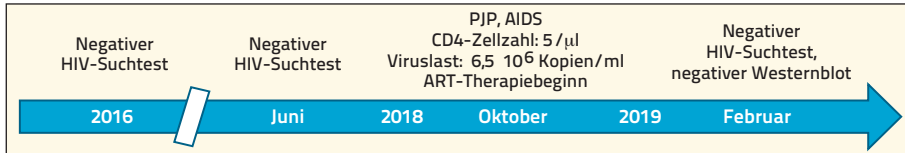


Abb. 2: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Tests beim Patienten.

Das weitere Vorgehen im geschilderten Fall (S. 15)

Älterer Patient im Stadium AIDS mit negativen HIV-Suchtest- und Westernblot-Ergebnissen: Um festzustellen, ob bei dem Patienten im Juni 2018 tatsächlich bereits eine HIV-Infektion vorlag, untersuchten wir die Rückstellprobe vom Juni 2018 mittels PCR. Das Ergebnis war negativ! Aufgrund des geringen Probenvolumens wurde das Serum 1:20 verdünnt und in die PCR (*Abbott RealTime-HIV-1-Viral-Load-Assay*) eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Vorverdünnung beträgt die Nachweisgrenze des Verfahrens 640 Kopien/ml. Eine bereits bestehende HIV-Infektion zu diesem Zeitpunkt ist somit weitgehend ausgeschlossen.

Bei der klinischen Präsentation des Patienten im Oktober 2018 handelte es sich somit um eine fulminante Primärinfektion mit massivem CD4-T-Zell-Verlust und daraus resultierendem Auftreten einer opportunistischen Infektion (PJP). Diese Konstellation ist ungewöhnlich, wurde jedoch schon mehrfach beschrieben. Insbesondere die PJP wurde im Rahmen einer fulminanten akuten HIV-Infektion bereits mehrfach beobachtet [1].

Vermutlich aufgrund des frühen Therapiebeginns im Stadium der Primärinfektion kam es beim Patienten zu einer inkompletten Serokonversion bzw. zu keiner Serokonversion, wodurch sich die aktuellen negativen serologischen HIV-Suchtest- und Westernblot-Ergebnisse erklären lassen. Eine ausbleibende Serokonversion bzw. Seroreversion beobachtet man häufig bei vertikal HIV-infizierten Kindern mit frühem Therapiebeginn [2]. Auch bei Erwachsenen beobachtet man eine ausbleibende Serokonversion bei Therapiebeginn in frühen Stadien der HIV-Infektion, insbesondere, wenn die Therapie bereits sehr früh, also

im Fiebig-Stadium I–II, eingeleitet wird [3].

Bei diesem Fall kam es zur Kombination zweier außergewöhnlicher Ereignisse: Extrem rapider Krankheitsverlauf und ausbleibende Serokonversion. Möglicherweise wurde das Ausbleiben der Serokonversion durch den sehr schlechten Immunstatus mit mangelnder CD4-Helferzell-Antwort begünstigt. Zum Ausschluss eines allgemeinen humoralen Immundefektes bestimmten wir die Durchseuchungstiter gegen Masern, Mumps, Röteln, CMV, EBV, HSV und VZV aus der Probe vom Februar 2019. Interessanterweise lagen für all diese Erreger sehr hohe IgG-Titer vor, vermutlich auch im Rahmen der Immunaktivierung und Immunrestitution unter der Therapie. Ein allgemeiner humoraler Immundefekt bei dem Patienten ist somit jedoch weitgehend ausgeschlossen. Bezüglich des rapiden Krankheitsverlaufes ist möglicherweise das fortgeschrittene Alter des Patienten ein Risikofaktor. Um zu untersuchen, ob es sich um ein besonders »aggressives« Virus handelt, werden wir es bei dem Patienten isolieren und *in vitro* weiter untersuchen. Die bisherige Sequenzierung ergab das Vorliegen von HIV-1 Subtyp B.

Quellen

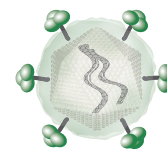
- Vento S, Di Perri G, Garofano T, Concia E, Bassetti D. *Pneumocystis carinii* pneumonia during primary HIV-1 infection. *Lancet*. 1993; 342(8862): 24–5.
- Eberle J, Notheis G, Blattmann C, Jung J, Buchholz B, Korn K, et al. Seroreversion in vertically HIV-1-infected children treated early and efficiently: rule or exception? *Aids*. 2010; 24(17): 2760–1.
- de Souza MS, Pinyakorn S, Akapirat S, Pattanaichaiwit S, Fletcher JL, Chomchey N, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy During Acute HIV-1 Infection Leads to a High Rate of Nonreactive HIV Serology. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2016; 63(4): 555–61.

Dr. med. Maximilian Münchhoff

Klinische Virologie, NRZ für Retroviren am Max von Pettenkofer-Institut der Universität München (LMU)

Pettenkoferstraße 9a · 80336 München

muenchhoff@mvp.lmu.de



NRZ Retroviren München



IMPRESSUM

Herausgeber:

Nationales Referenzzentrum für Retroviren
Max von Pettenkofer-Institut
Ludwig-Maximilians-Universität München

Leitung:

Prof. Dr. med. Oliver T. Keppler
FA für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie

Koordinator Diagnostik:

Prof. Dr. med. Josef Eberle

Koordinatoren Öffentlichkeitsarbeit:

Prof. Dr. med. Oliver T. Keppler
Prof. Dr. med. Josef Eberle

Koordinator Retroviren Bulletin:

Dr. rer. nat. Natascha Grzimek-Koschewa

Kontakt:

Max von Pettenkofer-Institut · Hauptgebäude
Pettenkoferstr. 9a · 80336 München

Tel.: + 49 89 / 21 80 - 7 28 35

E-Mail: nrzretroviren@mvp.lmu.de

» <http://www.mvp.uni-muenchen.de/nationales-referenzzentrum-fuer-retroviren/>

Grafische Gestaltung:

www.grafikstudio-hoffmann.de

Druck: www.stoba-druck.de

THEMEN DER NÄCHSTEN AUSGABE*

- ▶ HIV in der Pädiatrie
- ▶ HIV und Droplet-Digital-PCR (ddPCR)
- ▶ Nach Berlin nun Londoner und Düsseldorfer Patient: Ausnahmefälle der HIV-Heilung

* Änderungen vorbehalten

WIR DANKEN



dem Robert Koch-Institut, dem Bundesministerium für Gesundheit (BMG) und dem Förderverein Infektionsmedizin München e.V., die die Arbeit des NRZ fördern,

sowie folgenden Firmen für ihre freundliche Unterstützung:



Roche Diagnostics Deutschland GmbH



Abbott GmbH & Co. KG



Gilead Sciences GmbH



EUROIMMUN Medizinische Labor-diagnostika AG



Cepheid GmbH



DiaSorin Deutschland GmbH