

Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin und dem
Robert-Koch-Institut, Berlin

DISSERTATION

Nachweis von p24-Antigen bei HIV-Infektion Typ 1 in Bezug zu
Viruslast, CD4-Zellzahl, aidsdefinierenden Erkrankungen und Tod

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Andreas Müller
aus Malsch

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. H. Zeichhardt
 2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Hofmann
 3. Prof. Dr. H. Rabenau

Datum der Promotion: 20.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das humane Immundefizienz-Virus	4
1.2 Stadieneinteilung und Klinik der HIV-Infektion	8
1.3 Epidemiologie	10
1.4 Monitoring	11
1.4.1 p24-Antigen (p24-Ag)	12
1.4.2 Viruslast	12
1.4.3 CD4-Zellen	13
1.5 Aufgabenstellung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Untersuchtes Patientenkollektiv	15
2.2 Einzelverläufe	16
2.3 Methoden	17
2.3.1 p24-Ag	17
2.3.2 NASBA	18
2.3.3 CD4-Zellen	18
2.4 Statistik	19
3. ERGEBNISSE	21
3.1 Nachweis von p24-Ag	21
3.2 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen sd p24-Ag und Viruslast (VL)	21
3.3 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen sd p24-Ag und CD4-Zellzahl	22
3.4 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen nsd p24-Ag und VL	23
3.5 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen nsd p24-Ag und CD4-Zellzahl	24
3.6 Veränderung von sd p24-Ag und CD4-Zellzahl zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen im Krankheitsverlauf	25
3.7 Veränderung von sd p24-Ag und VL zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen im Krankheitsverlauf	26

3.8	Prüfung eines Zusammenhang zwischen permanent niedrigen / nicht permanent niedrigen sd p24-Ag-Werten und der Entwicklung der CD4-Zellzahl	27
3.9	Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Art der Therapie und absoluter Höhe von sd p24-Ag	27
3.10	Prüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten aidsdefinierender Erkrankungen und Entwicklung von sd p24-Ag	28
3.11	Tendenz der sd p24-Ag-Werte 3, 6, 9 und 12 Monate vor dem Tod des Patienten	29
3.12	Fazit	31
3.13	Einzelverläufe	32
3.13.1	Einzelverlaufsbeobachtungen von Patienten mit langen Beobachtungszeiträumen unter antiretroviraler Therapie	32
3.13.1.1	Patient 003	32
3.13.1.2	Patient 298	34
3.13.1.3	Patient 148	36
3.13.1.4	Patient 549	38
3.13.1.5	Fazit	40
3.13.2	Einzelverläufe bei Patienten mit langen Beobachtungszeiträumen ohne Therapie	42
3.13.2.1	Patient 594	42
3.13.2.2	Patient 564	44
3.13.2.3	Patient 062	46
3.13.2.4	Patient 541	48
3.13.2.5	Fazit	49
3.13.3	Einzelverläufe von Patienten, die im Verlauf der HIV-Infektion verstarben	50
3.13.3.1	Patient 053	50
3.13.3.2	Patient 056	51
3.13.3.3	Patient 058	52
3.13.3.4	Patient 040	53
3.13.3.5	Fazit	53

4. DISKUSSION	54
4.1 Nachweis von p24-Ag	55
4.2 Zusammenhang zwischen p24-Ag und CD4-Zellzahl	55
4.3 Zusammenhang zwischen p24-Ag und Viruslast	56
4.4 Zusammenhang zwischen Art der Therapie (1-, 2-, 3- oder Mehrfachtherapie) und absoluter Höhe von sd p24-Ag	57
4.5 Zusammenhang zwischen der ersten auftretenden aidsdefinierenden Erkrankung bei einem Patienten und fallenden oder steigenden sd p24-Ag-Werten	60
4.6 Aussagekraft der sd p24-Ag-Werte vor dem Tod eines Patienten	61
4.7 Kosten und Nutzen der verschiedenen Methoden zum Monitoring	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATUR	67
7. DANKSAGUNG	77
8. ERKLÄRUNG	78
9. LEBENSLAUF	79

ANHANG

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	Antikörper
b-DNA	branched-DNA
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
nsd	nicht säuredissoziiert
NRTI	nukleosidale und nukleotidische Reverser Transkriptase Inhibitor
NNRTI	nicht-nukleosidartiger Reverse Transkriptase Inhibitor
PI	Proteinase-Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
sd	säuredissoziiert
Tab.	Tabelle
VL	Viruslast

Antiretrovirale Medikamente:

Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren				
Abkürzung	Wirkstoff	Freiname	Handelsname	Substanzklasse
AZT	Azidothymidin	Zidovudin	Retrovir®	NRTI
d4T	Didehydro-Dideoxythymidin	Stavudin	Zerit®	NRTI
ddI	Dideoxyinosin	Didanosin	Videx®	NRTI
ddC	Dideoxycytidin	Zalcitabin	Hivid®	NRTI
3TC	Dideoxy-Thiacytidin	Lamivudin	Epivir®	NRTI
CBV	AZT+3TC		Combivir®	NRTI
FTC		Emtricitabin	Emtriva®	NRTI
	3TC+ABC		Krivexa®	NRTI
TZV	AZT+3TC+ABC		Trizivir®	NRTI
	FTC+TDF		Truvada®	NRTI
TDF		Tenovir	Viread®	NRTI
ABC		Abacavir	Ziagen®	NRTI
Non-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)				
NVP		Nevirapin	Viramune®	NNRTI
EFV		Efavirenz	Sustiva®	NNRTI
DLV		Delavirin	Rescriptor®	NNRTI
Protease-Inhibitoren (PI)				
SQV		Saquinavir	Invirase®/ Fortovase®	PI
RTV		Ritonavir	Norvir®	PI
TPV		Tipranavir	Aptivus®	PI
APV		Amprenavir	Agenerase®	PI
IDV		Indinavir	Crixivan®	PI
LPV		Lopinavir/Ritonavir	Kaletra®	PI
ATV		Atazanavir	Reyataz®	PI
FPV		Fosamprenavir	Telzir®	PI
NFV		Nelfinavir	Viracept®	PI
Fusionsinhibitoren				
T-20		Enfuvirtide	Fuzeon®	

1. EINLEITUNG

Ungewöhnliche Todesfälle als Folge von Störungen des Immunsystems bei jungen, homosexuellen Männern führten dazu, dass im Jahre 1981 die erworbene Immunschwächekrankheit erstmals als klinische Einheit erkannt wurde [15, 16, 91, 139] und im Jahr darauf mit der Abkürzung AIDS, für Acquired Immune Deficiency Syndrome, bezeichnet wurde [17]. Im Jahre 1983 konnte das krankheitsursächliche Humane Immunschwächevirus (HIV) in der Zellkultur vermehrt und identifiziert werden [7, 42]. 1986 wurde seitens des International Committee of Taxonomy of Viruses die einheitliche Bezeichnung HIV für das zuvor als HTLV-III bzw. LAV-I bezeichnete Retrovirus empfohlen. 1986 wurde ein neuer HIV-Subtyp (HIV-2) bei aus West-Afrika stammenden AIDS-Patienten entdeckt, der sich entwicklungsgeschichtlich von HIV-1 unterscheidet [22].

HIV gehört zu den Lentiviren (*lat. lantus = langsam*), einer Untergruppe der Retrovirusfamilie (s. 1.1). Lentiviren waren hauptsächlich als Seuchenerreger bei Pferden (Equines Infektiöses Anaemievirus), Schafen (Maedi-Visna-Virus) und Ziegen (Caprines Arthritis Enzephalitis-Virus) bekannt. Eine Infektion mit diesen Viren führt - ebenso wie eine HIV-Infektion - nach monate- bis jahrelanger Inkubationszeit zu einem chronisch-progredienten Krankheitsgeschehen, jedoch stehen hierbei die primären Krankheitssymptome im Vordergrund, welche direkt durch den Zell- und Organotropismus der Lentiviren sowie durch die Abwehrreaktion des Wirtes hervorgerufen werden [105]. Im Gegensatz hierzu werden die klinisch erfassbaren Symptome der HIV-Infektion durch sekundäre Krankheitserreger ausgelöst, die sich aufgrund des Immundefekts im Organismus ausbreiten und pathogen werden können [85]. Am engsten ist das HI-Virus mit SIV (simian immunodeficiency virus) verwandt, welches eine asymptomatische Infektion verursacht, aber auch verschiedene Krankheitserscheinungen mit chronischen Verlaufsformen bei Affen und Menschenaffen verursachen kann [88]. Im Mittelpunkt der Krankheitsursachen beim Menschen steht die Induktion einer T-Helferzelldefizienz. Sowohl über deren genaue Mechanismen als auch über das Verständnis der Immunantwort gegen HIV und ihrer Bedeutung für den Krankheitsverlauf gibt es noch keine endgültige Klarheit [88].

HIV wird hauptsächlich über kontaminierte Körperflüssigkeiten übertragen, vorwiegend beim Geschlechtsverkehr (hetero- und homosexuell), Nadeltausch bei i. v.-Drogenabhängigen und bei Verabreichung kontaminierter Blutprodukte. Die Übertragung zwischen Mutter und Kind

geschieht diaplazentar, peripartal sowie postnatal über kontaminierte Muttermilch [89, 157]. Aktuell besteht die These, dass das Virus über Schleimhautepithelzellen des Darms oder des Genitaltrakts zunächst monozytäre (v.a. dendritische) Zellen infiziert [41], über die das Virus dann in die regionalen Lymphknoten transportiert wird [71] und so wenige Tage später in den systemischen Lymphknoten nachzuweisen ist [145].

Für die Replikation von HIV haben Zellen, die das **CD4**-Molekül exprimieren, eine herausragende Bedeutung. CD4 befindet sich auf der Oberfläche von ca. 60% aller T-Lymphozyten, von T-Zellvorläuferzellen in Knochenmark und Thymus, auf Monozyten und Makrophagen, Eosinophilen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des ZNS. Neben CD4 gilt das CD24-Oberflächenantigen als ein weiterer Faktor, der das Eindringen des Virus in die Zielzellen ermöglicht. Die phagozytierenden bzw. Antigen-präsentierenden Zellen werden durch HIV nicht abgetötet, nehmen jedoch eventuell Reservoir- und Verbreitungsfunktionen ein [43]. Im aktivierten Zustand zirkulieren nur wenige CD4-rezeptortragende T-Lymphozyten im Blut. Sie können aber mit infizierten Makrophagen und dendritischen Zellen in Kontakt treten [37, 166]. Die Expression von CD4 auf der Zelloberfläche reicht jedoch für einen erfolgreichen Viruseintritt nicht aus. Das Vorhandensein von Chemokinrezeptoren als Korezeptoren, die in der Cytoplasmamembran verankert sind, ist erforderlich: Lymphotrope HIV-Isolate benutzen den Chemokinrezeptor CXCR4 als Kofaktor für den Eintritt in die CD4⁺-positive Zielzelle, makrophagotrope Virusvarianten benötigen außer CD4 den Chemokinrezeptor CCR5. Einige HIV-Stämme können hingegen Zellen infizieren, bei denen sich keine CD4-Rezeptoren auf der Oberfläche nachweisen lassen [93].

Der Verlauf einer HIV-Infektion ist interindividuell sehr unterschiedlich, jedoch gibt es durchschnittliche oder typische Verläufe.

Normalerweise gehört zur Verlaufsbeobachtung einer HIV-Infektion routinemäßig die Bestimmung der CD-4-positiven T-Lymphozytenzahl und der HIV-Viruslast. Diese Parameter werden zur Festlegung des Krankheitsstadiums und zur Beobachtung des Fortschreitens einer Erkrankung benötigt sowie zur Entscheidung, ob mit einer Therapie begonnen wird bzw. ob eine antiretrovirale Therapie bei einem Patienten anspricht oder verändert werden muss. Diese Untersuchungen sind aufgrund der relativ hohen Kosten nur in Ländern möglich, die über ausreichende, v.a. finanzielle, aber auch apparative Ressourcen verfügen. Weltweit sind

geschätzt knapp 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Der Hauptanteil der Infizierten lebt dabei in Entwicklungsländern mit geringem Bruttoinlandsprodukt. Durch internationalen Druck haben die multinationalen pharmazeutischen Firmen, die die antiretroviralen Medikamente herstellen, deren Preise seit 2001 für die Länder in Afrika um bis zu 90 % gesenkt [31]. Darüber hinaus stehen nun auch Generika zu noch niedrigeren Preisen zur Verfügung. Aufgrund der Preissenkung der antiretroviralen Medikamente für Entwicklungsländer besteht nun auch hier die prinzipielle Möglichkeit einer adäquaten medikamentösen Behandlung infizierter Personen. Außerdem werden die Entwicklungsländer durch entsprechende Projekte der WHO unterstützt, so z. B. „3 by 5“, ein Projekt, das die adäquate Behandlung von 3 Mio. infizierten Menschen bis zum Jahr 2005 erreichen sollte – die erreichte Zahl belief sich allerdings nur auf 1,3 Mio. - oder das nun laufende Projekt „Towards Universal Access By 2010“, ein Programm, welches den uneingeschränkten Zugang aller Menschen zur HIV-Prävention, Behandlung, Schutz und Unterstützung erreichen soll. Trotz aller Prävention steigt die Zahl der HIV-Infektionen und auch die der AIDS-Erkrankungen weiter an, dabei sind die stärksten Zuwachsraten in jüngster Zeit in Ostasien, Osteuropa und Zentralasien zu verzeichnen [154]. Um auch in Fällen geringer Ressourcen die Therapie möglichst effizient zu gestalten, wäre es wünschenswert, Verfahren zur Bestimmung der kritischen Verlaufparameter anzuwenden, die kostengünstig sowie zuverlässig sind und die mit relativ geringem technischen Aufwand durchgeführt werden können. Die Durchführung einer Viruslastbestimmung durch Verfahren wie die Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder branched chain DNA-Assay (bDNA) ist technisch sehr anspruchsvoll und teuer. Sie erfordern eine Standardisierung und Qualitätskontrolle, Sauberkeit bzw. kontaminationsfreies Arbeiten, hochqualifiziertes, trainiertes und geschultes Personal und teure technische Geräte, die in Entwicklungsländern meist nicht flächendeckend zur Verfügung stehen. So wird derzeit in ressourcenarmen Ländern meist aufgrund von einfachen immunologischen oder klinischen Kriterien (CD4-Zellzahl oder die Diagnose einer opportunistischen Infektion) über die Einleitung einer antiretroviralen Therapie entschieden.

Ein im Vergleich kostengünstiges und leichter durchführbares Testverfahren ist die Untersuchung des viruseigenen p24-Antigens (s. 1.4.1). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv von 743 HIV-infizierten Personen ausgewählt, wobei sowohl behandelte als auch unbehandelte Patienten eingeschlossen waren, um zu prüfen, ob mit der p24-Antigen-Bestimmung ein prinzipiell geeignetes Verfahren zum Monitoring der HIV-Infektion zur Verfügung steht.

1.1 Das humane Immundefizienz-Virus

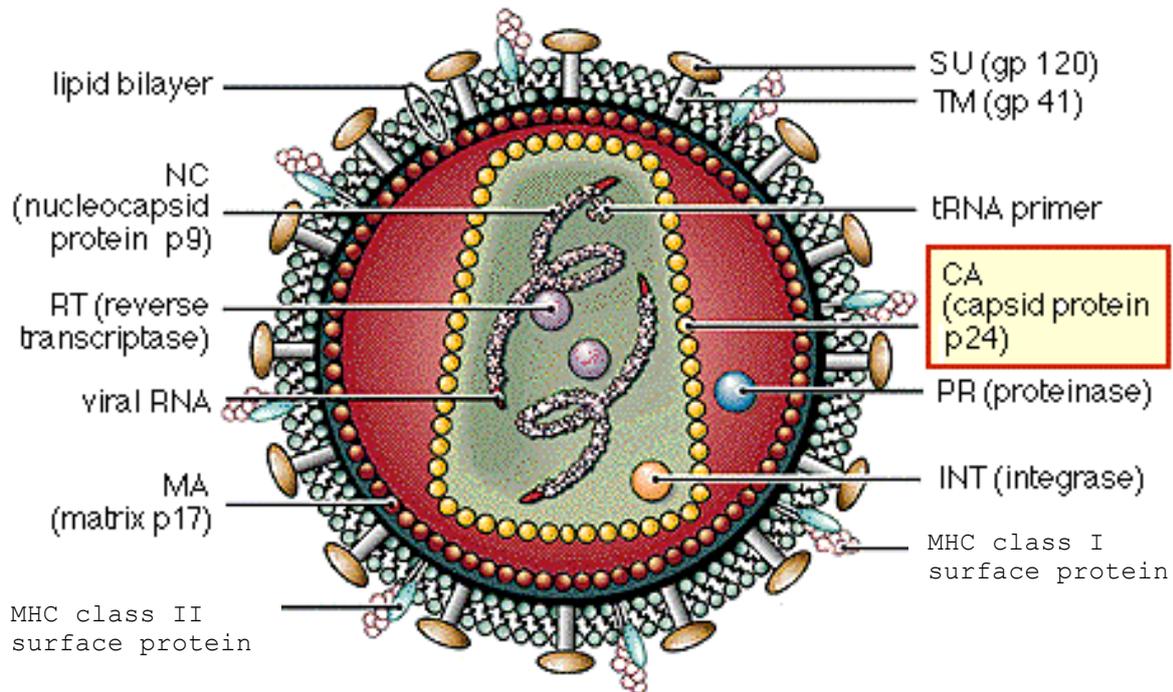


Abb. 1a: HIV-1-Strukturmodell (nach Gelderblom, 1991). SU=äußeres Oberflächenglykoprotein; TM=Transmembranprotein

HIV gehört zur Familie der **Retroviridae**, welche prinzipiell gleich aufgebaut sind [23]. Sie sind RNA-haltige Viren und besitzen das für die Namensgebung charakteristische Enzym Reverse Transkriptase (RT). Als erstes pathogenes humanes Retrovirus wurde 1978 HTLV-I (human T-cell lymphotropic virus Typ I) beschrieben, das die Adulte T-Zell-Leukämie (ATL) bzw. die Tropische Spastische Paraparese (TSP) verursacht. Letztere tritt endemisch in verschiedenen geografischen Regionen auf, insbesondere in Japan, West-Afrika und der Karibik [153]. Ein weiteres humanes Retrovirus (HTLV-II) wurde mit einigen Fällen von Haarzellleukämie assoziiert. 1983 wurde das Retrovirus HIV-1 isoliert [7, 42, 100] und 1986 HIV-2 [22].

Das Genom von HIV-1 besteht aus den drei Strukturgenen *gag* (group specific antigen), *pol* (polymerase) und *env* (envelope) sowie den Genen für mindestens sechs kleinere, regulatorische Proteine (s. Abb. 1b). Die Strukturproteine und die Enzyme werden als Vorläuferproteine translatiert, die in der Folge proteolytisch in die eigentlichen funktionellen Virusproteine

aufgespalten werden [164]. So kodiert das *env*-Gen für das als gp 160 bezeichnete Vorläuferprotein, aus welchem durch zelluläre Proteasen die beiden Glykoproteine gp 120 (SU) und gp 41 (TM) entstehen [4, 126]. Diese lagern sich als Trimere zusammen und bilden die für die HIV-Hülle typischen „Enterhaken“ (knobs, spikes). Etwa 72 solcher Spikes, welche aus dem externen Anteil gp120 und dem Transmembranprotein gp41 bestehen, sind in die von der infizierten Wirtszelle stammende Lipiddoppelmembran eingebaut (s. Abb. 1a) [46]. In dieser Hülle finden sich auch weitere Membranbestandteile der Wirtszelle, wie z. B. Proteine des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC). Aus dem Vorläuferprotein p55 entsteht gag-Genkodiert das Matrixprotein MA (p17), das Kapsid-Protein CA (p24), das Nukleokapsid-Protein NC sowie das p6-Protein. Das Matrixprotein p17 ist an die Innenseite der Lipidhülle angelagert. Es dient zur Erhaltung der Struktur und Integrität des Viruspartikels.

Die Hülle des konischen, inneren Kerns, das Kapsid (core), ist aus **p24**-Protein-Einheiten aufgebaut und durch p6-Moleküle mit Matrixproteinen verbunden (core-envelope-link, CEL). Dieser Kern beherbergt zwei identische Stränge der viralen Erbinformation in Form von Ribonukleinsäure (**RNA**) mit positiver Polarität, die mit dem Nukleokapsid-Protein eng assoziiert ist. An diesen RNA-Molekülen befindet sich bereits die reverse Transkriptase, die ebenso wie die Integrase und die Protease durch das *pol*-Gen kodiert wird, und die für die Umschreibung des viralen RNA-Genoms in Desoxyribonukleinsäure (DNA) notwendig ist [44, 46, 165].

Die viralen Enzyme werden ebenfalls als Vorläuferprotein (p 160) translatiert und durch die virale Protease in die funktionellen Enzyme prozessiert. Bei dem Vorläuferprotein p 160 handelt sich um ein Fusionsprotein zwischen den gag-Proteinen und den daran anschließenden pol-Domänen. Es entsteht durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters während der Translation in einer uridinreichen Region der mRNA sowohl der gag- wie auch der gag/pol-Proteine. In etwa fünf Prozent der Translationsereignisse erfolgt hier ein ribosomaler Leserasterschub von -1, der zur Folge hat, dass das Stoppcodon des gag-Polyproteins überlesen wird und so ein gag/pol-Fusionsprotein entsteht [97].

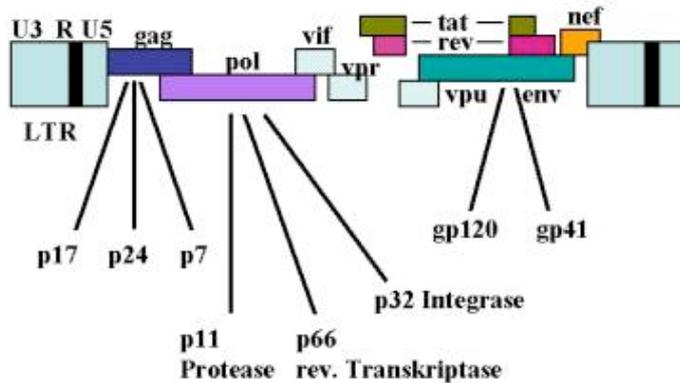


Abb. 1b: Aufbau eines HIV-Genoms (Provirus) (5'LTR-gag-pol-env-LTR3'), wobei LTR (long terminal repeat)-Regionen diejenigen Teile des viralen Genoms sind, die bei der Integration beidseitig mit der zellulären DNA verbunden werden (modifiziert nach Frankel et al. 1998). Weitere Erläuterungen siehe Text.

Das Humane Immundefizienz-Virus gelangt in die Zelle, indem es zunächst mit dem äußeren Oberflächenglykoprotein gp 120 an den CD4-Rezeptor der Zelle sowie an die jeweiligen Chemokinrezeptoren – CXCR4 auf T-Lymphozyten oder CCR5 auf Makrophagen – adsorbiert (s. 1.). Strukturelle Umlagerungen im Komplex der Virusoberflächenproteine gp120 und gp41 aktivieren die Fusionsfähigkeit des transmembranen gp41. Hierdurch kommt es zur Verschmelzung der Hüllmembran des Virus mit der Zytoplasmamembran der Zelle [97].

Der HIV-Replikationszyklus findet in etwa zehn Schritten statt. Die Transkription bildet den ersten Schritt. Sie erfolgt vor allem in aktivierten, infizierten CD4-Lymphozyten und geht von der integrierten proviralen doppelsträngigen DNA aus. In Zusammenarbeit mit viralen und zellulären Faktoren wird retrovirale RNA transkribiert [51, 61]. Durch Spleissvorgänge am Primärtranskript werden die mRNA-Moleküle für die essentiellen, regulatorischen Proteine (tat und rev) sowie die akzessorischen Proteine (nef, vpu, vpr und vif) exprimiert (s. Abb. 1b) [35, 52, 77]. Die vom HIV-1-Promoter gesteuerte retrovirale Transkription wird vom tat-Protein reguliert, der erste Schritt wird verstärkt. Der Transport viraler mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma wird mit Hilfe vom rev-Protein vollzogen. Rev reguliert somit post-transkriptionell die Expression viraler Strukturproteine [141]. Das nef-Protein ist wichtig bei der Replikation in primären Lymphozyten und Makrophagen [96]. Die Translation der gag und gag-pol

Polyproteine aus viraler mRNA im Zytoplasma erfolgt im nächsten Schritt. Env gp160, das Glykoprotein-Vorläuferprotein wird im endoplasmatischen Retikulum translatiert und im Golgi-Apparat durch zelluläre Proteasen in die Hüllproteine gp 120 und gp 41 gespalten. Im vierten Schritt erfolgt die Verbindung von gag-, gag-pol-Polyproteinen, vif, vpr, nef und genomischer RNA an der Zellmembran. Das vpu-Protein löst nachfolgend die Verbindung zwischen dem env-Glykoprotein und dem im endoplasmatischen Retikulum kotranslatierten CD4-Rezeptor. Das env-Glykoprotein wird zur Zelloberfläche transportiert. Eine Bindung mit dem CD4-Rezeptor wird durch das nef-Protein verhindert. Schließlich kommt es zur Ausschleusung infektiöser Erreger; es kommt extrazellulär zur Proteolyse des gag und gag-pol Polyproteins in MA, CA, NC, p6 PR, RT und IN durch die retrovirale Protease. Eine neue Zielzelle kann im nächsten Schritt durch das so entstandene reife Virion infiziert werden. Es kommt zu einer Anlagerung an die Zielzellen über eine hoch affinitive Bindung zwischen dem gp120 Hüllprotein und dem zellulären CD4-Rezeptor. Die viralen Hüllproteine ändern ihre Konformation, wobei gp41 eine Fusion von Virushülle und Zielzelle bewirkt [45, 85, 165]. Nach der Penetration des Virus durch die Zellmembran wird aktiv ein Komplex aus MA, RT, IN, vpr und genomischer RNA in den Zellkern transportiert. Im folgenden Schritt erfolgt die reverse Transkription des Virusgenoms von einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA, welche mit Hilfe der virusgenomassoziierten Reversen Transkriptase (RT) mit einer zellulären tRNA als Primer durchgeführt wird. Währenddessen wird die retrovirale RNA durch die RNase H-Aktivität der RT verdaut. Im letzten Schritt wird die doppelsträngige virale DNA katalysiert und von der Integrase IN in das zelluläre Genom integriert.

1.2 Stadieneinteilung und Klinik der HIV-Infektion

Die Stadieneinteilung der HIV-Infektion erfolgt nach festgelegten Kriterien der Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA, 1993 [18]:

Tabelle 1: CDC-Stadieneinteilung der HIV-Infektion:

	Klinische Kategorien		
	A	B	C
CD4-Zellzahlen (1/ μ l)	Asymptomatisch oder akute HIV-Krankheit oder Lymphadenopathiesyndrom	Symptomatisch, aber nicht A oder C, AIDS-related Complex (ARC)	Aidsdefinierende Erkrankungen
≥ 500	A1	B1	C1
200-499	A2	B2	C2
< 200	A3	B3	C3

Als **akute HIV-Krankheit** oder akutes retrovirales Syndrom wird die Zeitspanne von der Infektion bis zur Serokonversion, also bis zum messbaren Auftreten von Anti-HIV-Antikörpern im Blut bezeichnet. Sie erfolgt ca. 4-8 Wochen nach der Infektion. Die akute HIV-Krankheit kann in Form eines grippeähnlichen Krankheitsbildes mit hohem Fieber und Lymphknotenschwellungen oder makulösem Exanthem auftreten und bildet sich spontan wieder zurück. Es entwickeln jedoch nicht alle Infizierte Symptome. Parallel dazu findet in den infizierten CD4-Zellen eine starke Virusvermehrung statt und es kommt zu einem vorübergehenden Abfall der T-Helferzellen im Blut.

Es folgt eine lange Latenzzeit bis zum Auftreten klinischer Symptome, welche ohne Behandlung durchschnittlich ca. 9 Jahre beträgt (**asymptomatisches Stadium**) [161]. Hier kann häufig ein nur niedriger Virustiter gemessen werden. Die CD4-Zellzahl sinkt im Verlauf der Erkrankung kontinuierlich ab. Obwohl HIV-spezifische zytotoxische T-Zellen virusinfizierte Zellen eliminieren, findet im lymphatischen Gewebe eine kontinuierliche Virusvermehrung statt [34, 112].

Im späteren Stadium der HIV-Infektion kommt es dann zum Auftreten klinischer Symptome: **Lymphadenopathiesyndrom**, AIDS-related Complex (ARC), AIDS-definierende Erkrankungen. Das **Lymphadenopathiesyndrom** ist definiert als eine Vergrößerung von

Lymphknoten an mindestens zwei extrainguinalen Regionen ohne Allgemeinsymptome, die länger als drei Monate besteht. Zum **ARC** gehören unter anderem ein Gewichtsverlust von mehr als 10% des Körpergewichts, ungeklärte Durchfälle länger als 7 Tage, Nachtschweiß. **Aidsdefinierende Erkrankungen** umfassen eine Vielzahl von Erkrankungen. In 80% der Fälle manifestieren sie sich als so genannte opportunistische Infektionen, z. B. Pneumocystis carinii-Pneumonie, Toxoplasmose, Candida-Ösophagitis. Es gibt auch neurologische Manifestationen (z. B. HIV-Enzephalopathie) und Malignome (z. B. Kaposi-Sarkom), die zu den aidsdefinierenden Erkrankungen zählen. In dieser Phase kommt es zu einer Abnahme HIV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und zu einer Zunahme von T-Suppressor-Zellen als Hinweis auf einen Zusammenbruch der zellulären Immunantwort. Auch die Konzentration von Anti-HIV-Antikörpern, insbesondere von anti-p24-Antikörpern (anti-p24-Ak), geht zurück. Der Virustiter im Blut steigt an und die CD4-Zellzahl sinkt, wodurch das Risiko aidsdefinierender Erkrankungen steigt. Final kommt es zur Ausbildung eines HIV-Kachexie-Syndroms und zum Tode.

Die Therapien bei der HIV-Infektion sind sehr vielfältig und individuell und haben sich im Laufe der Zeit deutlich verbessert. Während man bis 1996 fast ausschließlich Monotherapien einsetzte, zeigten die Ergebnisse der Studien ACTG 175 [57] und DELTA [30] die Überlegenheit von Kombinationstherapien. Seither kam es zu einem Rückgang an aidsdefinierenden Erkrankungen sowie Todesfällen [19, 110]. In der Behandlung der HIV-Infektion stehen derzeit Medikamente aus vier Wirkstoffklassen zur Verfügung: Nukleosid- und Nukleotidanaloga (NRTIs oder "Nukes"), Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Proteaseinhibitoren (PI) und seit Mai 2003 Fusionshemmer mit dem Prototyp T-20. Die Zahl der zugelassenen Einzelsubstanzen und Kombinationspräparate ist damit auf weit über 20 angewachsen.

Die Indikationsstellung für die antiretrovirale Therapie ruht auf drei Säulen: auf klinischer Symptomatik, CD4-Zellzahlen und Viruslast (VL). Es besteht keine Einigkeit darüber, wann man mit einer antiretroviralen Therapie anfangen sollte. Einig sind sich die internationalen Empfehlungen immerhin dahingehend, dass alle symptomatischen Patienten und Patienten mit weniger als 200 CD4-Zellen/ μ l behandelt werden müssen. Bei asymptomatischen Patienten mit einer CD4-Zellzahl zwischen 200 und 350/ μ l legen alle Richtlinien mehr oder weniger nachdrücklich einen Therapiebeginn nahe, obwohl das unmittelbare Erkrankungsrisiko noch

gering ist. In Deutschland, Europa und den USA wird bei einer hohen VL (über 50.000 bzw. 55.000 Kopien/ml) auch oberhalb von 350 CD4-Zellen/ μ l eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) empfohlen. Die gängigen Primärtherapien bestehen aus jeweils zwei Nukleosidanaloga, kombiniert mit entweder einem PI, einem NNRTI oder einem dritten Nukleosidanalogen [63].

1.3 Epidemiologie und sozioökonomische Auswirkungen

Nach aktuellen Schätzungen von UNAIDS/WHO (Stand: Dezember 2007) sind weltweit 33,2 Millionen (Mio.) Menschen mit HIV infiziert. Die Zahl der Neuinfektionen wurde im Jahr 2007 auf 2,5 Mio., die der Todesfälle auf 2,1 Mio. (davon geschätzte 330.000 Kinder unter 15 Jahren) geschätzt. In Afrika ist die HIV-Infektion bzw. AIDS die häufigste Todesursache.

Von den weltweit ca. 33,2 (30,6-36,1) Mio. HIV-Infizierten leben alleine in Afrika südlich der Sahara rund 22,5 (20,9-24,3) Mio. rund 4,0 (3,5-5,1) Mio. in Süd- und Südost-Asien. Es folgen Lateinamerika (ca. 1,6 (1,-1,9) Mio.), Ost-Europa mit Zentralasien (ca. 1,6 (1,2-2,1) Mio.), Nord-Amerika (ca. 1,3 Mio. (480.000-1,9 Mio.)), Ost-Asien und die pazifischen Inseln (ca. 800.000 (620.000-960.000)), West- und Zentral-Europa (ca. 760.000 (600.000-1,1 Mio.)), Nord-Afrika und der Mittlere Osten (ca. 380.000 (270.000-500.000)), die karibischen Inseln (ca. 230.000 (210.000-270.000)), Australien und Neuseeland (ca. 75.000 (53.000-120.000)) [154].

In Deutschland lebten Ende 2007 ca. 69.452 Menschen mit einer HIV-Infektion (laut eingegangenen Meldungen über positive HIV-Antikörpertests im RKI). Die Zahl der mit einer HIV-Infektion Lebenden ist aufgrund der therapiebedingten Verminderung der Sterberate jährlich um etwa 1000 bis 1300 Personen gestiegen. Während sich in den 90er Jahren die Zahl der Neuinfektionen auf jährlich etwa 2000 Menschen stabilisiert hatte, zeigt sich in den letzten Jahren eine wieder ansteigende Tendenz (2752 gemeldete Neuinfektionen im Jahr 2007). Die Zahl der AIDS-Fälle ist auf etwa 600-700 pro Jahr gesunken (2007 wurden 647 Fälle gemeldet), in der ersten Hälfte der 90er Jahre starben noch jährlich etwa 2000 Patienten an AIDS [125].

Die sozialen und ökonomischen Auswirkungen der HIV-Epidemie sind gravierend. Menschen, die in Armut leben, werden durch HIV/AIDS noch weiter verarmen. Sie haben ein höheres

Risiko, sich mit HIV zu infizieren, das aufgrund mangelnder Schulbildung bis in die nächste Generation weiterwirkt. In den stark betroffenen Ländern gehen durch Krankheit und Tod viele Ressourcen verloren. Gesellschaften werden in ihrer Stabilität bedroht, und die Armut nimmt zu [143]. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation ist AIDS weltweit die Haupttodesursache von Menschen in der Altersgruppe zwischen 15 und 59 Jahren, und macht somit die in den letzten Jahrzehnten hart erkämpfte Erhöhung der durchschnittlichen Lebenserwartung in sämtlichen Entwicklungsländern wieder rückgängig: In manchen afrikanischen Entwicklungsländern ist die durchschnittliche Lebenserwartung durch die AIDS-Epidemie schon um zehn bis zwanzig Jahre gesunken [155]. So finden sich unter den Opfern der Epidemie nicht nur Säuglinge und alte Menschen, sondern zunehmend Personen, deren Beitrag für das Wirtschaftswachstum der Entwicklungsländer unentbehrlich ist, wie z.B. Manager, technisch qualifizierte Arbeiter, Bauern, Beamte, Lehrer, Wissenschaftler, Handwerker oder Ingenieure. Der Verlust solcher Arbeitskräfte und des Humankapitals wirkt sich negativ auf die Volkswirtschaft aus. Laut volkswirtschaftlichen Berechnungen müssen Entwicklungsländer mit Infektionsraten von über 20 Prozent der Erwachsenenbevölkerung mit einer Minderung des Bruttoinlandsprodukts von jährlich mindestens zwei bis vier Prozent rechnen. Die Weltbank sieht daher in der AIDS-Epidemie die derzeit größte Bedrohung für afrikanische Entwicklungsländer [1]. Laut einer Umfrage der Südafrikanischen Koalition gegen HIV/AIDS verzeichnen bereits 40 Prozent der südafrikanischen Produzenten Profitverluste wegen der weit verbreiteten Krankheit. Dies liegt darin begründet, dass in vielen Betrieben hohe Infektionsraten zu einem Verlust an Personal und so auch zu höheren Ausbildungs- bzw. Krankenversicherungskosten führen. Einige dieser Betriebe haben deshalb schon damit begonnen, zwei oder drei Arbeiter für jeden Arbeitsplatz auszubilden; sie müssen schließlich davon ausgehen, dass früher oder später AIDS zu einem Dienstausschluss einiger dieser Arbeiter führen wird. [33]

1.4 Monitoring

Die Verlaufsbeobachtung der HIV-Infektion durch Laborparameter ist von großer Bedeutung, um den Zustand des Patienten, die Schwere der Erkrankung und möglicherweise notwendige Therapieänderungen besser einschätzen zu können.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit relevanten Parameter besprochen.

1.4.1 p24-Antigen (p24-Ag)

Der p24-Ag-Test detektiert das virale Kapsidprotein p24. Es ist früh nach der Infektion und während der akuten HIV-Infektion nachweisbar und ist assoziiert mit hohen Leveln der Virämie, während derer der Patient hoch infektiös ist [2, 27, 50, 73, 76, 113, 159, 160]. Im Serum kann es in freier Form oder gebunden an anti-p24-Ak nachgewiesen werden. Sobald HIV-Antikörper detektiert werden können (insbesondere anti-p24-Ak), gelingt der Nachweis von p24-Ag meist nicht mehr. Nach allgemeiner Auffassung entstehen in diesem Fall Antigen-Antikörper-Komplexe, die sich dem Test entziehen [2, 108, 159]. Durch eine Säurebehandlung des Serums können die Antigen-Antikörper-Komplexe jedoch gelöst werden, wodurch p24-Ag wieder bestimmt werden kann [8, 108]. Entsprechend dem angewandten Nachweis wird der Marker im Folgenden als **säuredissoziiertes p24-Ag (sd p24-Ag)** oder als **nicht-säuredissoziiertes p24-Ag (nsd p24-Ag)** bezeichnet. Trotzdem kann das p24-Ag bei vielen asymptomatischen Patienten auch mit Hilfe des modifizierten Testverfahrens nicht nachgewiesen werden, da die Antigentiter im Blut zu niedrig sind [56]. Im Endstadium der Erkrankung kann p24-Ag wiederum ohne Säuredissoziation der Antigen-Antikörperkomplexe bestimmt werden, da die Konzentrationen des freien p24-Ag dann offenbar vielfach höher liegen als die Antikörpertiter [3, 6, 13, 49, 50, 53, 58, 59, 113, 115]. Das p24-Ag wurde bis zur Einführung der Genomnachweise als ein nützlicher Laborparameter zur Diagnose [27, 36, 67, 69, 80, 95, 107, 111, 119, 123], Prognose [3, 21, 54, 60, 82, 101, 116, 120, 128] und zum Monitoring einer antiretroviralen Therapie eingesetzt [9, 12, 86, 94, 142, 147].

1.4.2 Viruslast

Die Viruslast gibt die Virusmenge im Blut an (gemessen in Kopien/ml). Sie ist neben der CD4-Zellzahl zu dem wichtigsten Surrogatmarker der HIV-Infektion geworden [47, 66, 90, 92]. Die Bestimmung der Viruslast wird eingesetzt zur Frage eines medikamentösen Therapiebeginns, zur Erfolgskontrolle bei antiretroviraler Behandlung und dient als prognostischer Faktor – je höher die Viruslast, desto größer ist das Risiko, dass es zu einer Krankheitsprogression bzw. aidsdefinierenden Erkrankung kommt [90, 92]. Es werden im Wesentlichen drei

Bestimmungsmethoden verwendet: 1. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), 2. branched-DNA (b-DNA) und 3. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). Alle drei Methoden können gleichwertig zur Viruslastbestimmung einer HIV-1-Infektion benutzt werden. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Nachweisgrenzen sowie auch hinsichtlich des linearen Bereichs, innerhalb dessen eine Messung zuverlässig bzw. reproduzierbar ist. Zur Verlaufs- bzw. Therapiebeurteilung bei einem Patienten sollte daher immer dasselbe Verfahren angewendet werden [25, 62, 104, 118, 122, 138]. In der vorliegenden Studie wurde das NASBA-Verfahren angewandt (s. Kap. 2.3.2).

1.4.3 CD4-Zellen

CD4-Zellen zählen zu den wichtigsten Surrogatmarkern in der HIV-Medizin. Die CD4-Zellzahl ist am besten geeignet, das Risiko des Patienten vorherzusagen, eine aidsdefinierende Erkrankung zu entwickeln. Allerdings unterliegt dieser Parameter physiologischen Schwankungen, die je größer werden, je höher der Messwert für die CD4-Zellzahl ist. So zeigten Hoover et al. 1992, dass das 95% Konfidenzintervall bei einem gemessenen Wert von 500 Zellen/ μ l zwischen 297 und 841 Zellen/ μ l lag [65]. Dennoch ist der prädiktive Wert der CD4-Zellzahl hinsichtlich der Entwicklung einer aidsdefinierenden Erkrankung am höchsten: so liegt z. B. das Risiko, innerhalb der nächsten 24 Monate an einer opportunistischen Infektion zu erkranken oder zu sterben, für Patienten mit einer CD4-Zellzahl von über 500 Zellen/ μ l bei weniger als 5%, bei Patienten mit einer CD4-Zellzahl von unter 50 Zellen/ μ l liegt dieses Risiko bei über 70% [148].

1.5 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung von möglicherweise signifikanten Zusammenhängen zwischen Messwerten für p24-Ag (sd/nsd), CD4-Zellzahl und der Viruslast sowie eine Betrachtung dieser Messwerte im Hinblick auf die Art der Therapie und den Krankheitsverlauf. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Prüfung eines Zusammenhangs von sd p24-Ag und nsd p24-Ag mit CD4-Zellzahl sowie Viruslast in zeitlicher Korrelation und unter Berücksichtigung „permanent“ und „nicht permanent“ niedriger sd p24-Ag-Werte ($</> 20$ pg/ml)
- Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Art der Therapie (1-, 2-, 3- oder Mehrfachtherapie) und absoluter Höhe von sd p24-Ag
- Prüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung und Abfall oder Anstieg von sd p24-Ag vor/nach dem Auftreten der Erkrankung
- Prüfung der Tendenz der sd p24-Ag-Werte vor dem Tod eines Patienten (Anstieg/Abfall)
- Prüfung der Kosten und Nutzen einer Untersuchung von p24-Ag, insbesondere für Länder mit geringen Ressourcen

Durch Prüfung dieser Einzelfragen sollte insbesondere die Wertigkeit des p24-Ag als Verlaufparameter untersucht werden, um dessen Anwendbarkeit für spezielle Einsatzbereiche zu beurteilen, z. B. als Parameter zur Verlaufsbeobachtung bei hohem Probenaufkommen und knappen wirtschaftlichen Ressourcen, was besonders in Entwicklungsländern eine Rolle spielt. Die Untersuchung wurde unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, dass im Vergleich zu den teuren, apparativ aufwendigen Virusgenomnachweistests der p24-Ag-Nachweis als alternative, kostengünstige und leicht durchführbare Methode einsetzbar ist. Aufgrund der Komplexität der Einzelfragen und der Betrachtung unterschiedlicher Subpopulationen wurden die Daten zur Vervollständigung und besseren Nachvollziehbarkeit am Ende der vorliegenden Arbeit angefügt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchtetes Patientenkollektiv

Es wurden retrospektiv Daten von 743 HIV-1-infizierten Patienten, davon 136 Frauen, erfasst, die in der HIV-Tagesklinik des Universitätsklinikums Rudolf-Virchow (jetzt Charité, Campus Virchow) bis zum 08.01.98 in medizinischer Betreuung waren (s. Anhang, Tabelle A). Es wurden alle Patienten erfasst, bei denen zumindest p24-Ag und die CD4-Zellzahl bestimmt worden waren. Bei der Bestimmung von p24-Ag waren sowohl einfache Bestimmungen (nsd p24-Ag) als auch Bestimmungen von sd p24-Ag durchgeführt worden. Die ersten Bestimmungen von p24-Ag reichten bis zum 14.01.1990 zurück. Messungen der Viruslast (mittels NASBA-Verfahren – s. Kap. 2.3.2) wurden seit 30.08.1990 vereinzelt durchgeführt, routinemäßig erst seit ca. Ende 1995. Da Art und Ausmaß der durchgeführten Laboruntersuchungen sowie deren jeweilige Zeitpunkte sehr stark variierten, handelte es sich um ein sehr heterogenes Datenmaterial. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über das Patientenkollektiv hinsichtlich der im Auswertungszeitraum erhobenen Messwerte für die CD4-Zellzahl. Dabei wurde jeweils die erste durchgeführte Messung im Verlauf berücksichtigt.

Tabelle 2: Übersicht über das untersuchte Patientenkollektiv hinsichtlich der CD4-Zellzahl: es wurde jeweils der erste erhobene Messwert jedes Patienten berücksichtigt. Die Einteilung der CD4-Zellzahlen in die drei unterschiedlichen Bereiche folgt der Stadieneinteilung der CDC.

<u>CD4-Zellzahlen</u>	<u>Patientenanzahl</u> <u>N=743</u>
≥ 500 Zellen/μl	92
200-499 Zellen/μl	249
< 200 Zellen/μl	394
Keine Messung der CD4-Zellzahl	8

Die Patienten erhielten zum Teil keine medikamentöse Therapie und zum Teil sehr individuelle Therapien, eine genauere Auflistung erfolgt im Ergebnisteil (s. Kap. 3.9). Da die Erkrankung bei den Patienten erwartungsgemäß sehr unterschiedlich verlaufen war, wurde als einschneidendes klinisches Ereignis das Auftreten von aidsdefinierenden Erkrankungen erfasst. Viruslast und

CD4-Zellen wurden im Labor des Rudolf-Virchow-Klinikums (jetzt Charité, Campus Virchow) unter der Leitung von Prof. Dr. Suttorp, Abteilung Infektiologie und Pulmologie, gemessen, p24-Ag im Robert-Koch-Institut, Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. Pauli.

Das Alter der Patienten lag bei der ersten CD4-Zellzahl-Messung zwischen 17 und 68 Jahren (s. Tabelle 3 und Anhang, Tabelle A). 197 Patienten waren bereits zum Zeitpunkt der Auswertung (1998) verstorben.

Tabelle 3: Altersverteilung der Patienten

Altersklasse [Jahre]	Anzahl von Patienten [N=743]	Anteil von Patienten [%]
< 20	6	0,8
≥ 20 < 30	149	20,1
≥ 30 < 40	337	45,4
≥ 40 < 50	159	21,4
≥ 50 < 60	79	10,6
≥ 60 < 70	10	1,3
unbekannt	3	0,4

2.2 Einzelverläufe

Zu den Fragestellungen (s. Kap. 1.5) wurden zur Illustration der unterschiedlichen, individuellen Krankheitsverläufe exemplarisch Patienten ausgewählt, die über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren beobachtet worden waren. In diese Einzelverlaufsdiagramme von insgesamt 12 Patienten wurden die jeweils verfügbaren Messwerte eingetragen, aufgetretene besondere Ereignisse (Diagnosezeitpunkt einer aidsdefinierenden Erkrankung und Tod) sowie Daten bezüglich der durchgeführten medikamentösen Therapie.

2.3 Methoden

2.3.1 p24-Ag

In der vorliegenden Studie war p24-Ag mit dem ICD-Prep (ICD = immune complex dissociated; Säurebehandlung zur Dissoziation der Immunkomplexe) und dem HIV-1-p24-Antigenassay der Firma Beckman Coulter (Krefeld) bestimmt worden [38]. Jede Probe wurde sowohl mit als auch ohne vorherige Säurebehandlung untersucht.

Bei dem verwendeten Enzymimmunoassay dienen monoklonale Anti-p24-Ak von der Maus als Primärantikörper, die an das in der untersuchten Probe vorliegende p24-Ag binden. Als Sekundärantikörper werden biotinylierte Human-Anti-HIV1-p24-IgG verwendet. Nach Komplexbildung des biotinylierten Sekundärantikörpers mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin entsteht durch die Enzymreaktion aus einem Chromogensubstrat (Tetramethylbenzidin) ein blauer Farbstoff. Die Absorption des Farbstoffs wird mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Die Intensität des gebildeten Farbstoffs ist ein direktes Maß für die Menge des im Serum vorhandenen HIV-1-p24-Ag. Zur Kalibration wird gereinigtes, humanes p24-Ag verwendet, somit kann eine Quantifizierung erfolgen. Die untere Nachweisgrenze lag bei 5 pg/ml, das obere Detektionslimit testbedingt bei 250 pg/ml.

Positive Ergebnisse wurden im HIV-1-p24-Antigen-Neutralisationstest bestätigt. Hierbei wird die Probe mit gereinigtem Human-Anti-HIV-p24-IgG (Neutralisationsreagenz) vor dem Einsatz der Probe in den Test inkubiert. Parallel dazu wird dieselbe Probe mit Humanglobulin (negative Neutralisationskontrolle) inkubiert. Es folgen die weiteren Reaktionsschritte wie oben beschrieben. Falls eine Probe HIV-1-p24-Ag enthält, wird dieses durch die p24-Antikörper komplexiert und steht für die noch folgende Reaktion im Test nicht mehr zur Verfügung. Wird die Farbentwicklung dieser Probe in Gegenwart des Neutralisationsreagenzes im Vergleich zur negativen Neutralisationskontrolle um 40% oder mehr verringert ist die Anwesenheit von p24-Ag bestätigt. Im umgekehrten Fall wird die Reaktion im 1. Test als falsch positiv gewertet.

2.3.2 NASBA

Bei dieser Amplifikationsmethode (NASBA; NucliSens® QT, Organon Teknika, Boxtel, NL - jetzt: bioMerieux, Durham, NC, USA) [39] handelt es sich um eine bei 41°C ablaufende isothermische Reaktion. Es werden drei Enzyme verwendet: eine RNA-Polymerase, eine RNA- oder DNA-abhängige Reverse Transkriptase (RT) und RNase H. Diese imitieren in vitro den Lebenszyklus eines Retrovirus. Ferner sind zwei Primer nötig, von denen einer - zusätzlich zu den zur Ziel-RNA komplementären Nucleotiden - die Sequenz eines RNA-Polymerase-Promotors trägt (Primer 1). Nach Bindung des Primers 1 an die Ziel-RNA und Verlängerung durch die RT (als RNA-abhängige DNA-Polymerase) entstehen RNA-DNA-Hybride. Nach selektivem Verdau der RNA durch RNase H bleiben cDNA-Einzelstrangkopien zurück. Nach Bindung des Gegenprimers (Primer 2) an die DNA und Verlängerung durch die RT (als DNA-abhängige DNA-Polymerase) entstehen cDNA-Doppelstränge, die jeweils auch die Promotor-Sequenz für die RNA-Polymerase tragen. Durch diesen ersten Reaktionsschritt wird die für die (DNA-abhängige) RNA-Polymerase benötigte DNA-Matrize generiert. Die RNA-Polymerase kann von diesen Matrizen jeweils mehrere tausend RNA-Moleküle synthetisieren. Sensitivität und Spezifität der NASBA sind mit der PCR vergleichbar. Aufgrund des kontinuierlichen Reaktionsablaufs liegen in der Probe zuletzt sowohl einzelsträngige RNA-Moleküle, RNA-DNA-Hybride als auch doppelsträngige DNA-Moleküle vor. Die Detektion erfolgt durch die Hybridisierung spezifischer Sonden an die Ziel-RNA, die ein elektrochemolumineszendes Signal erzeugen. Durch gleichzeitiges Mitführen dreier Standard-RNAs wird der Test kalibriert, so dass eine Quantifizierung der RNA erfolgen kann. Die untere Nachweisgrenze änderte sich im Juni 1997 von 1000 auf 400 und im Dezember 1997 von 400 auf 80 Kopien/ml. Die Datenerhebung erfolgte im Zentrallabor des Rudolf-Virchow-Klinikums (jetzt: Charité, Campus Virchow).

2.3.3 CD4-Zellen

Die Bestimmung der CD4-Zellzahl erfolgt aus dem Blut mittels Durchflusszytometrie (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg). Die CD4-Zellen werden mit Hilfe von Antikörpern mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert und anschließend detektiert [106]. Die Datenerhebung erfolgte im Infektiologielabor des Rudolf-Virchow-Klinikums (jetzt: Charité, Campus Virchow).

2.4 Statistik

Für die Auswertung der Fragestellungen wurden verschiedene statistische Testverfahren angewendet.

- Spearman'scher Rang-Korrelationskoeffizient R: Maß für die Güte des Zusammenhanges abhängiger, beliebig verteilter, stetiger Stichproben. R kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Je größer der Betrag von R ist, desto stärker ist der Zusammenhang zwischen den untersuchten Größen. Bis $\pm 0,5$: schwacher Zusammenhang; bis $0,75$: deutlicher Zusammenhang; bis $0,99$ straffer Zusammenhang. Positive Werte bedeuten direkten proportionalen Zusammenhang [129].
- Wilcoxon-Test für Paardifferenzen: gibt Auskunft darüber, ob sich zwei Variablen in ihrer zentralen Tendenz statistisch signifikant unterscheiden [130].
- Varianzanalyse von Kruskal und Wallis (H-Test): überprüft, ob sich die Stichproben einer diskreten Variable mit mehr als zwei Kategorien hinsichtlich des Meridians unterscheiden (z. B. Vergleich von verschiedenen Therapien und sd p24-Ag – s. Kap. 3.9) [131]
- Post-hoc-Test von Tukey und Kramer: hiermit können die für paarweise Vergleiche kritischen Rangsummendifferenzen bestimmt werden, die abhängig von der Stichprobengröße sind und deshalb für jeden Vergleich individuell zu berechnen sind [132].
- Chi-Quadrat-Test: überprüft, ob sich die Stichproben hinsichtlich des untersuchten Merkmals unterscheiden oder nicht [133].

Ergebnis eines jeden Tests ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p . Je kleiner p , desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein postulierter Zusammenhang oder Unterschied zwischen Stichproben tatsächlich existiert. Die für einen Test aufgestellte Nullhypothese wird üblicherweise abgelehnt, wenn p kleiner als $0,05$ ist. Dann besteht statistische Signifikanz.

Gebräuchliche, in dieser Arbeit verwendete Signifikanzniveaus sind $p < 0,05$ (schwach signifikant), $p < 0,01$ (stark signifikant) und $p < 0,001$ (hoch signifikant).

3. ERGEBNISSE

Zu jedem der folgenden Unterpunkte ist die Anzahl der Patienten aufgeführt, deren Daten für den jeweiligen Vergleich herangezogen werden konnten. Dabei wurden jeweils die Messergebnisse verwendet, die bei der erstmaligen gemeinsamen Bestimmung der jeweils zu vergleichenden Parameter aufgetreten waren.

3.1 Nachweis von p24-Ag

Von den insgesamt 743 Patienten konnte zum Zeitpunkt der Erstmessung bei 293 Patienten (39,4%) weder sd noch nsd p24-Ag nachgewiesen werden; bei 322 (43,3%) war sd p24-Ag, nicht jedoch nsd p24-Ag nachweisbar; bei 126 Patienten (17%) war sowohl sd als auch nsd p24-Ag detektierbar, und bei zwei Patienten (0,3%) lag nsd p24-Ag im messbaren Bereich i. G. zu sd p24-Ag. (s. Anhang, Tabelle B1).

3.2 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen sd p24-Ag und Viruslast (VL)

Aus der Grundgesamtheit wurden bei 380 Patienten diese Parameter bestimmt (s. Anhang, Tabelle B2). Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Messwerten des sd p24-Ag und der Viruslast (Spearman $R=0,36$; $p<0,00001$). Mit zunehmenden sd p24-Ag-Werten nimmt im Mittel die Viruslast also zu (s. Abbildung 2).

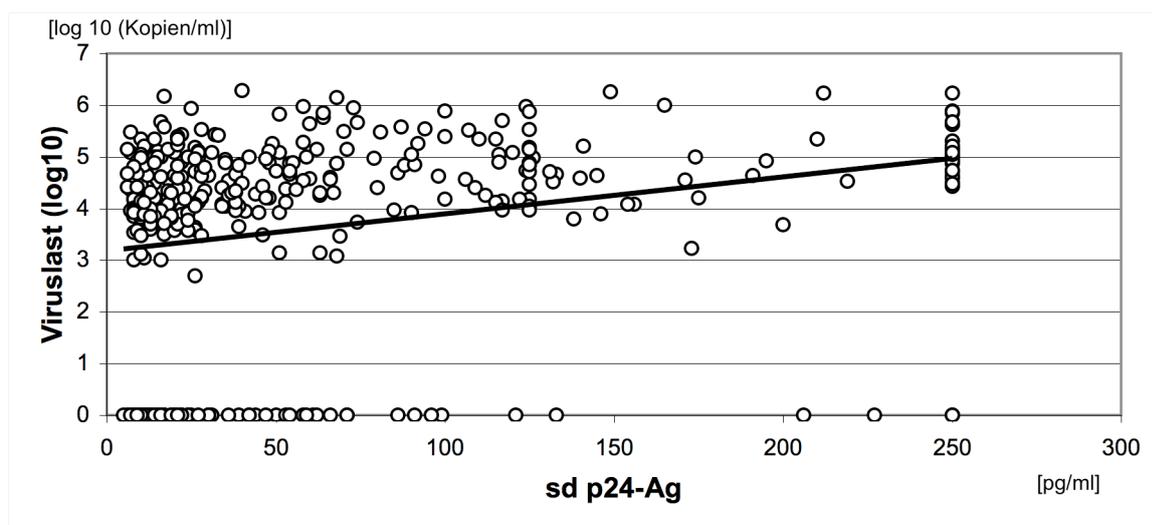


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen sd p24-Ag und Viruslast (n=380; Spearman $R: 0,36$; $p<0,00001$)

3.3 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen sd p24-Ag und CD4-Zellzahl

Die Daten von 496 Patienten konnten ausgewertet werden (s. Anhang, Tabelle B3). Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Messwerten des sd p24-Ag und der CD4-Zellen (Spearman $R = -0,13$; $p = 0,0052$). Mit zunehmenden sd p24-Ag-Werten nimmt die Anzahl der CD4-Zellen im Mittel ab (s. Abbildung 3).

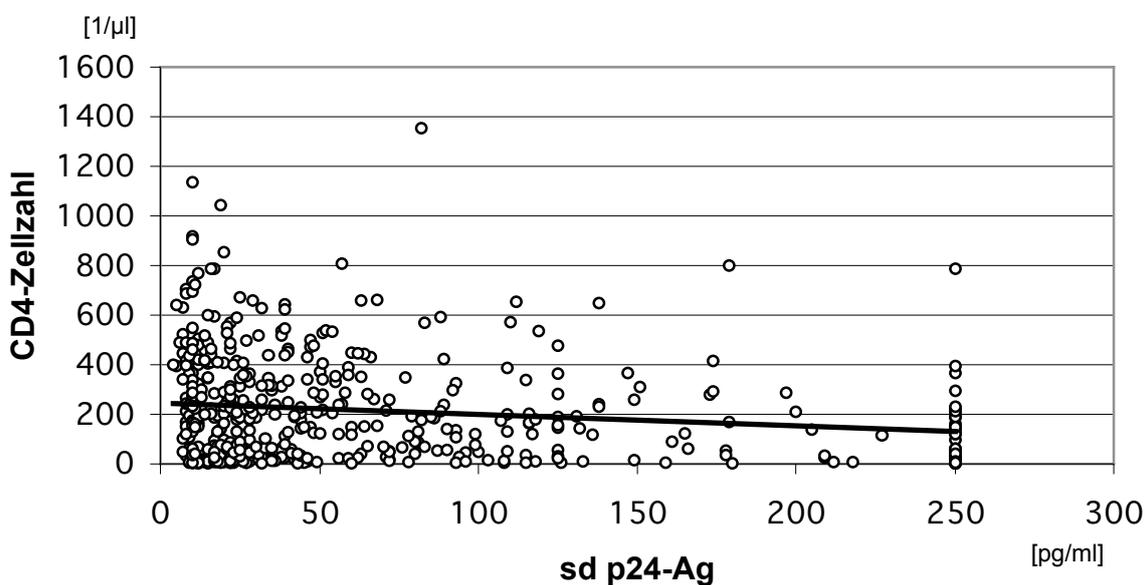


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen sd p24-Ag und CD4 Zellzahl (n=496; Spearman $R = -0,13$; $p = 0,0052$)

3.4 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen nsd p24-Ag und VL

Daten von 160 Patienten konnten ausgewertet werden (s. Anhang, Tabelle B4). Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Messwerten des nsd p24-Ag und der Viruslast (Spearman $R=0,37$; $p<0,00001$). Mit zunehmenden VL-Werten nimmt im Mittel auch nsd p24-Ag zu (s. Abbildung 4).

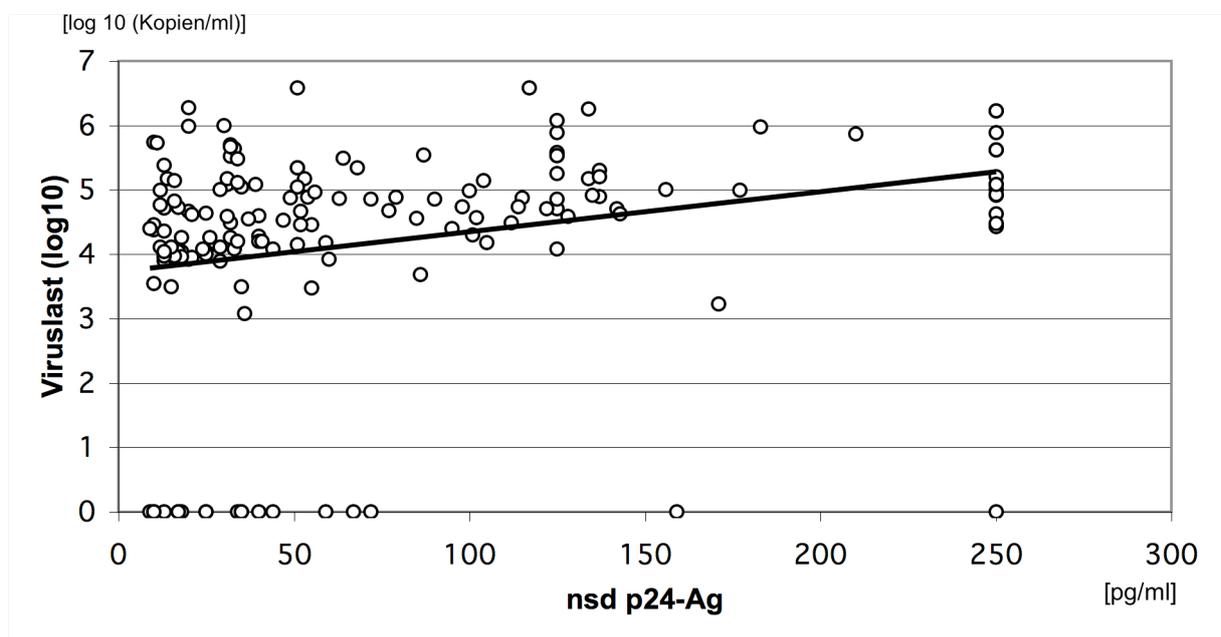


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen nsd p24-Ag und Viruslast (n=160; Spearman $R: 0,37$; $p<0,00001$)

3.5 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen nsd p24-Ag und CD4-Zellzahl

Daten von 211 Patienten gingen in die Auswertung ein (s. Anhang, Tabelle B5). Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Messwerten des nsd p24-Ag und den CD4-Zellen (Spearman $R = -0,18$; $p = 0,026$). Mit zunehmenden nsd p24-Ag-Werten nehmen im Mittel die CD4-Zellzahlen ab (s. Abbildung 5).

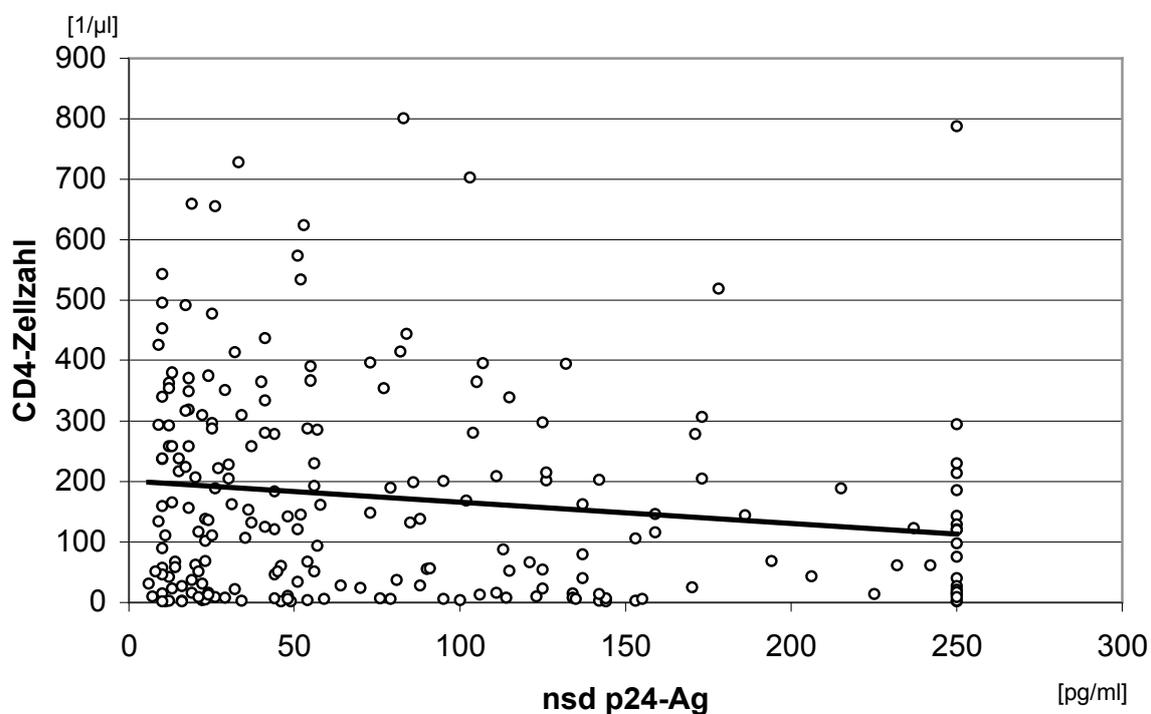


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen nsd p24-Ag und CD4 Zellzahl (n=211; Spearman $R = -0,18$; $p = 0,026$)

3.6 Veränderung von sd p24-Ag und CD4-Zellzahl zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen im Krankheitsverlauf

Es wurden die Patienten selektiert, bei denen bei der Erst- und Zweitmessung sowohl p24-Ag als auch CD4-Zellzahl bestimmt wurden. Bei 403 Patienten konnten die Messwerte von p24 und CD4-Zellzahl an zwei aufeinander folgenden Untersuchungsterminen ausgewertet werden (s. Anhang, Tabelle B6 und Tab. 4). Aus den vorliegenden Daten ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Höhe der Messwerte der ersten und zweiten Messung nachzuweisen (Wilcoxon-Test; für beide Parameter $p > 0,05$). Entsprechend war auch die Richtung der jeweiligen Werteentwicklung (Anstieg oder Abfall) nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test; $p > 0,05$).

Die zeitlichen Abstände zwischen den beiden, für jeden Patienten ausgewerteten Messungen lagen zwischen 2 und 1252 Tagen. Um den möglichen Einfluss dieser sehr unterschiedlichen Zeitspannen zu reduzieren, wurde aus der untersuchten Gruppe von 403 Patienten ein Kollektiv von 105 Patienten ausgewählt, bei denen zwischen beiden Messungen eine Zeitspanne von 2 bis 4 Monaten lag. Auch hier ist kein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der Parameter sd p24 und CD4-Zellzahl zwischen den beiden Zeiträumen nachzuweisen (Chi-Quadrat-Test; $p = 0,50092$).

Tabelle 4: Veränderung von sd p24-Ag und CD4-Zellzahl im Verlauf der ersten beiden Messungen bzw. 2-4 Monate nach der 1. Messung (↑: Anstieg, ↓: Abfall, ↔: keine Wertveränderung)

sd p24	CD4	Anzahl der Patienten (2-1252Tage, n=403)	Anzahl der Patienten (2-4 Monate, n=105)
↑	↑	92	19
↑	↓	96	28
↑	↔	2	1
↓	↑	76	19
↓	↓	92	29
↓	↔	2	1
↔	↔	3	0
↔	↑	20	4
↔	↓	20	4

3.7 Veränderung von sd p24-Ag und VL zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen im Krankheitsverlauf

Es wurden die Patienten selektiert, bei denen bei der Erst- und Zweitmessung sowohl p24-Ag als auch die VL bestimmt wurden. Die Datenauswertung zu dieser Fragestellung konnte von 157 Patienten erfolgen (s. Anhang, Tabelle B7). Aus den vorliegenden Daten ist kein Unterschied zwischen der Höhe der Messwerte der ersten und zweiten Messung hinsichtlich des sd p24-Ag nachzuweisen (Wilcoxon-Test; $p = 0,97$). Allerdings besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen erster und zweiter Messung hinsichtlich der VL (Wilcoxon-Test; $p = 0,0078$). Der Mittelwert der VL geht von durchschnittlich $3,4 \pm 2,0 \log_{10}$ (Kopien/ml) bei der ersten Messung auf durchschnittlich $2,9 \pm 2,1 \log_{10}$ bei der zweiten Messung zurück. Die Entwicklung der Messwerte beider Parameter zeigt allerdings keine statistische Signifikanz (Chi-Quadrat-Test; $p > 0,05$).

Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Messungen lag zwischen 11 und 527 Tagen. Um den möglichen Einfluss dieser sehr unterschiedlichen Zeitspannen zu reduzieren, wurde aus der untersuchten Gruppe von 157 Patienten ein Kollektiv von 105 Patienten ausgewählt, bei denen zwischen beiden Messungen eine Zeitspanne von maximal 90 Tagen lag. Auch hier ist kein Unterschied zwischen der Höhe der Messwerte der ersten und zweiten Messung hinsichtlich des sd p24-Ag nachzuweisen (Wilcoxon-Test, $p = 0,68$). Allerdings besteht in dieser Subpopulation ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen erster und zweiter Messung hinsichtlich der VL (Wilcoxon-Test, $p = 0,016$). Der Mittelwert der VL geht von durchschnittlich $3,6 \pm 1,9 \log_{10}$ bei der ersten Messung auf durchschnittlich $3,2 \pm 2,1 \log_{10}$ (Kopien/ml) bei der zweiten Messung zurück. Es zeigt sich auch hier hinsichtlich der Entwicklung beider Parameter im Zusammenhang zwischen beiden Messzeitpunkten keine statistische Signifikanz (Chi-Quadrat-Test; $p > 0,05$).

3.8 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen „permanent niedrigen“ / „nicht permanent niedrigen“ sd p24-Ag-Werten und der Entwicklung der CD4-Zellzahl

Es wurden diejenigen Patienten ausgewählt, bei denen innerhalb von drei Monaten insgesamt zwei aufeinander folgende Messungen sowohl für sd p24-Ag als auch für die CD4-Zellzahl vorlagen.

254 Datensätze konnten ausgewertet werden (s. Anhang, Tabelle B8). Als "permanent niedrig" wurden dabei Werte von sd p24-Ag mit 20 oder weniger pg/ml definiert.

Bei den Fällen, die einen permanent niedrigen sd p24-Ag-Wert aufweisen, wurde in 56% der Fälle (22 von 39) ein Abfall der Helferzellen dokumentiert, bei den Fällen mit nicht permanent niedrigen sd p24-Ag-Werten (> 20 pg/ml) dagegen in nur 45% der Fälle ein Abfall der Helferzellen bestimmt (97 von 215). Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant (Chi-Quadrat-Test, $p=0,19$).

3.9 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Art der Therapie und absoluter Höhe von sd p24-Ag

Für jeden Patienten wurde die jeweils erste Therapie bestimmt, in deren zeitlicher Folge eine sd p24-Ag-Messung dokumentiert war (s. Tabelle 5). Bei 241 Fällen konnte eine Auswertung der Daten erfolgen (s. Anhang, Tabelle B9). Die verwendeten antiretroviralen Substanzen sind für jeden Patienten in Tabelle B9 (Anhang) aufgeführt.

Tabelle 5: Durchgeführte Therapien bei 241 Patienten

Therapieart	Anzahl der Patienten
Monotherapie	167
2-fach-Therapie	51
3-fach-Therapie	19
Polytherapie	4

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Therapiearten ist statistisch signifikant (H-Test, $p=0,0010$). So ist bei 3-fach- (20 ± 18 pg/ml) und Polytherapien (22 ± 18 pg/ml) der sd p24-Ag-Wert im Mittel deutlich niedriger als bei Mono- (59 ± 65 pg/ml) und 2-fach-Therapien (59 ± 64 pg/ml). Der Post-hoc-Test zeigt, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen Mono- und 3-fach- (Rangsummendifferenz 65,4) sowie 2- und 3-fach-Therapie (Rangsummendifferenz 58,6) auf dem 5%-Niveau statistisch signifikant sind (s. Abbildung 6).

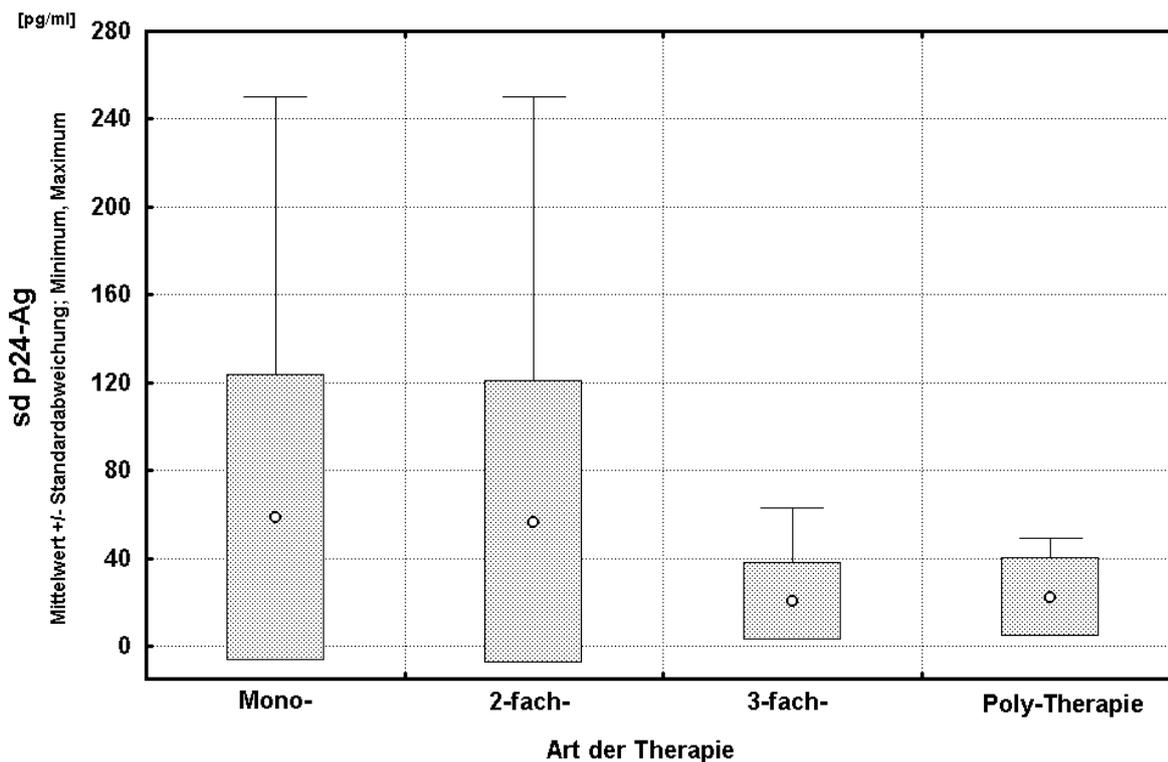


Abbildung 6: Vergleich der unterschiedlichen Therapiearten hinsichtlich des ersten nach Therapie erhobenen sd p24-Ag-Wertes

3.10 Prüfung eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten aidsdefinierender Erkrankungen und Entwicklung von sd p24-Ag

Zur Untersuchung dieses Punktes wurden Patienten aus dem Kollektiv ausgewählt, deren Datensätze wenigstens zwei Messwerte für sd p24-Ag vor dem ersten Auftreten ($n=204$) oder nach dem ersten Auftreten ($n=308$) einer aidsdefinierenden Erkrankung enthielten. Für jeden Patienten wurden die zwei zeitlich jeweils nächstgelegenen Messwerte vor bzw. nach dem Auftreten der aidsdefinierenden Erkrankung betrachtet (s. Anhang, Tabelle B10).

Vor einer aidsdefinierenden Erkrankung war in 44% der Fälle (89 von 204) ein Anstieg des sd p24-Ag-Wertes festzustellen, in 56% (114 von 204) dagegen kein Anstieg.

Nach einer aidsdefinierenden Erkrankung war in 47% der Fälle (145 von 308) ein Anstieg des sd p24-Ag-Wertes dokumentiert, in 53% (163 von 308) dagegen kein Anstieg.

Weder vor noch nach einer aidsdefinierenden Erkrankung zeigte die Entwicklung des sd p24-Ag-Wertes eine bestimmte Richtung. In beiden Fällen unterschieden sich die mittleren sd p24-Ag-Werte des jeweils 1. und 2. Messpunktes nicht statistisch signifikant voneinander (Wilcoxon-Test, $p > 0,05$).

3.11 Tendenz der sd p24-Ag-Werte 3, 6, 9 und 12 Monate vor dem Tod des Patienten

Die Daten der 197 Patienten, die im Verlauf verstorben waren, wurden hinsichtlich der Entwicklung von sd p24-Ag vor dem Tod ausgewertet. Dabei wurden die Mittelwerte für die Zeitpunkte t3 (3 Monate vor dem Tod), t6 (6 Monate vor dem Tod), t9 (9 Monate vor dem Tod) und t12 (12 Monate vor dem Tod) erfasst (s. Anhang, Tabelle B11).

Mit zunehmendem Abstand zum Tode des Patienten ist der Anteil der Fälle, in denen niedrige sd p24-Ag-Werte zu verzeichnen sind, größer. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Mittelwerte von sd p24-Ag in zeitlichem Zusammenhang mit dem Tod

Zeitraum bis zum Tod [Monate]	Anteil der Fälle mit niedrigem sd p24- Ag [%]	Mittelwert sd p24-Ag +/- Standardabweichung [pg/ml]
3	39	107,8 +/- 96,6
6	47	105,4 +/- 90,0
9	44	101,7 +/- 85,7
12	48	98,1 +/- 82,5

Die Mittelwerte des sd p24-Ag steigen tendenziell an, je kürzer das betrachtete Intervall vor dem Tod ist. Die Unterschiede zwischen diesen Mittelwerten sind allerdings nicht statistisch signifikant (Wilcoxon-Test, $p > 0,05$) - (s. Abbildung 7).

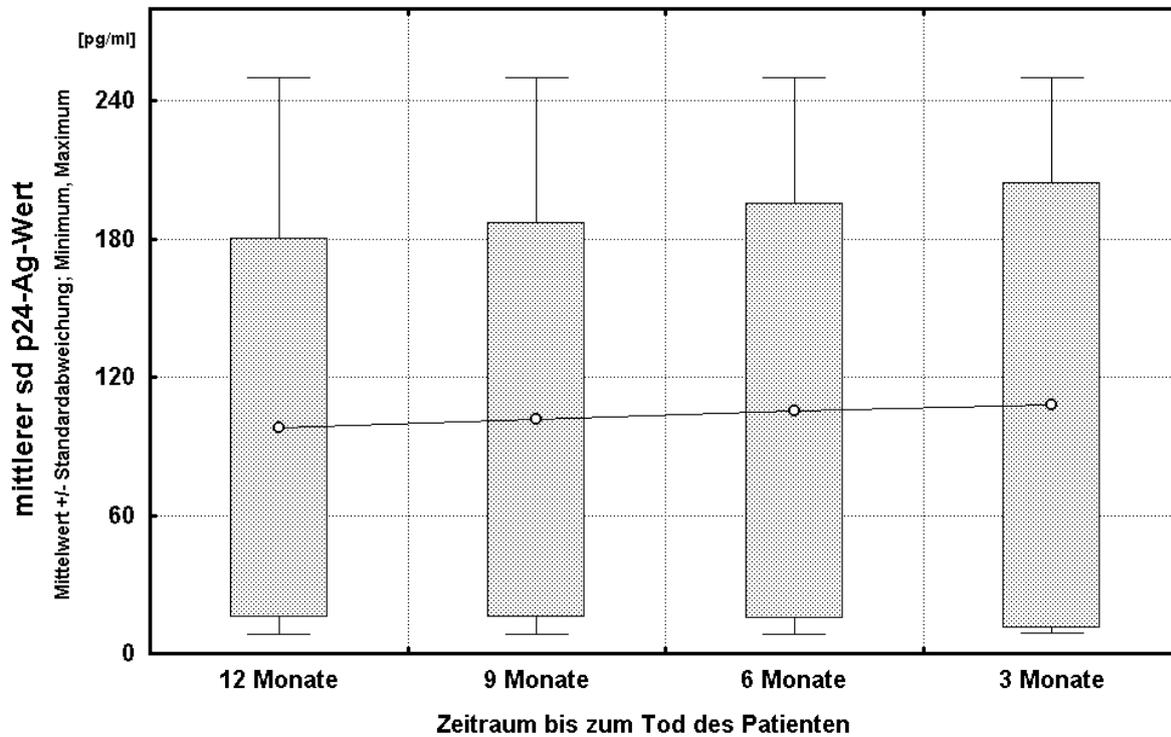


Abbildung 7: Mittlere sd p24-Ag-Werte in zeitlichem Zusammenhang zum Tod eines Patienten

3.12 Fazit

Die bisher gezeigten Ergebnisse für die ausgewählten Kollektive zeigen, dass sich lediglich für die Zusammenhänge sd p24-Ag und Viruslast (VL) sowie nsd p24-Ag und VL signifikante positive Korrelationen ergeben. Negativ korreliert sind sd p24-Ag mit CD4-Zellzahl, nsd p24-Ag mit CD4-Zellzahl sowie Therapieart und sd p24-Ag; auch diese Ergebnisse sind statistisch signifikant. Für die übrigen untersuchten Fragestellungen (die Veränderung von sd p24-Ag und CD4-Zellzahl bzw. Viruslast zwischen zwei aufeinander folgenden Messungen im Krankheitsverlauf; Zusammenhang zwischen „permanent niedrigen“/ „nicht permanent niedrigen“ sd p24-Ag-Werten und der Entwicklung der CD-4-Zellzahl; Zusammenhang zwischen dem Auftreten aidsdefinierender Erkrankungen und Entwicklung von sd p24-Ag; Tendenz der sd p24-Ag-Werte 3, 6, 9 und 12 Monate vor dem Tod des Patienten) sind keine signifikanten Korrelationen zu bestimmen. Der wesentliche Grund dafür liegt – wie später diskutiert wird – in der Heterogenität des Patientenkollektivs hinsichtlich synchroner Infektionsverläufe sowie in den unterschiedlichen Therapieschemata. Anhand von 12 ausgewählten Einzelverläufen sollen die individuellen Beobachtungen über die Korrelationen der einzelnen Parameter vorgestellt werden.

3.13 Einzelverläufe

Zu jeder Fragestellung (s. Kap. 1.5) wurden zur Illustration der unterschiedlichen, individuellen Krankheitsverläufe exemplarisch Patienten ausgewählt, die über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren beobachtet worden waren. In diese Einzelverlaufsdigramme von insgesamt 12 Patienten wurden die jeweils verfügbaren Messwerte eingetragen, aufgetretene besondere Ereignisse (Diagnosezeitpunkt einer aidsdefinierenden Erkrankung und Tod) sowie Daten bezüglich der durchgeführten medikamentösen Therapie. Die Patienten wurden ausgewählt, um die unterschiedlichen Verläufe der Parameter beim Individuum darzustellen und verschiedene Parameterkorrelationen exemplarisch zu zeigen. Anzumerken ist, dass Angaben zu den jeweiligen Therapieentscheidungen nicht vorlagen.

3.13.1 Einzelverlaufsbeobachtungen von Patienten mit langen Beobachtungszeiträumen unter antiretroviraler Therapie

3.13.1.1 Patient 003 (s. Abb. 8a+b): Zu Beginn des Verlaufs bewegten sich die CD4-Zellzahlen schwankend zwischen 150 und 300/ μ l. Sd p24-Ag wies einen flachen Anstieg auf. 6/94 fielen die CD4-Zahlen rasant ab, der Anstieg von sd p24-Ag wurde steiler, kurz darauf kam es zum ersten Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung. Die CD4-Zellen stiegen wieder auf ein hohes Niveau von etwa 300/ μ l, sd p24-Ag stieg ebenfalls weiter an, zunächst auch unter der 12/94 begonnenen Therapie mit AZT.

Unter dieser Therapie kam es dann zunächst zu einem Abfall von sd p24-Ag, auch die CD4-Zellen sanken tendenziell. Diese Tendenz verstärkte sich Anfang '96, es kam zu einem steilen Anstieg von sd p24-Ag auf das im Verlauf höchste Niveau, die CD4-Zellen fielen erneut steil ab. Zu diesem Zeitpunkt (Anfang 1996) begann die Bestimmung der Viruslast, die von einem ersten sehr hohen Wert (140 000 Kopien/ml) ausgehend zunächst einen starken Abfall (unter die Nachweisgrenze) zeigte. Mit der Umstellung der Therapie auf d4T/3TC blieb sd p24-Ag auf leicht schwankendem, jedoch niedrigem Niveau, während die Viruslast starke Schwankungen zeigte (zwischen 3 und 5 log-Stufen). Die CD4-Zellzahlen blieben im weiteren Verlauf zwischen 250 und 400/ μ l. Die Viruslast und p24-Ag scheinen die aidsdefinierenden Erkrankungen nicht anzeigen zu können.

Deutlich gleichsinnige Veränderungen der Parameter waren am Ende der Therapiephase mit AZT zu beobachten. Bestimmte Parameterbewegungen, z. B. in Zusammenhang mit dem Auftreten von aidsdefinierenden Erkrankungen, waren nicht festzustellen. Ein kontinuierlich korrelierender Verlauf der Parameter lag nicht vor. So sah man vor der ersten aidsdefinierenden Erkrankung einen deutlichen Abfall von CD4, vor den weiteren jedoch eher einen leichten Anstieg. Zu Ende der AZT-Therapie zeigte sich ein steiler Anstieg von sd p24-Ag, der vermutlich durch Resistenzbildung bedingt war, da der Therapiewechsel zu einem Abfall von sd p24-Ag führte.

Patient 003

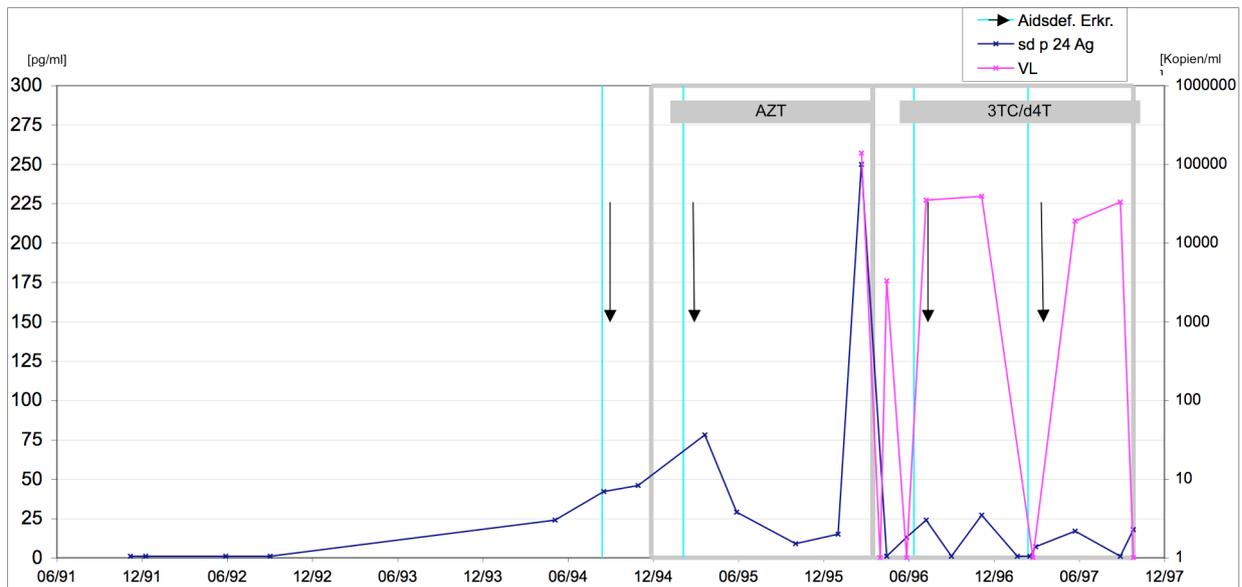


Abb. 8a

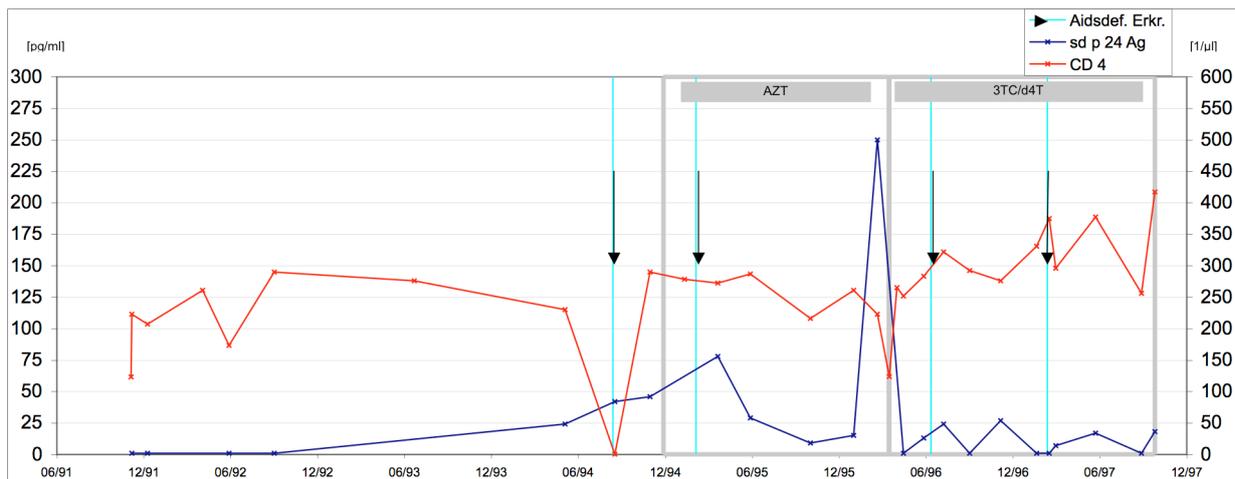


Abb. 8b

Abbildung 8: Patient 003: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zur Viruslast (VL)(a) und CD4-Zellzahl (b). Das Therapieintervall mit der jeweiligen antiretroviralen Medikation ist durch senkrechte graue Striche markiert.

3.13.1.2 Patient 298 (s. Abb. 9a+b): Von 7/91 bis Mitte 1993 lagen sowohl sd als auch nsd p24-Ag unter der Nachweisgrenze. Anschließend konnte man einen korrelierenden Verlauf beobachten. Die Werte für sd p24-Ag waren dabei jeweils deutlich höher als die für nsd p24-Ag. Der Anstieg des sd p24-Ag stand in zeitlichem Zusammenhang mit dem erstmaligen Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung. Insgesamt waren vier Krankheitsereignisse dokumentiert. Sd p24-Ag stieg im Verlauf weiter an, auch der zu Beginn des Anstiegs erfolgte Therapiewechsel von ddC auf AZT hatte zunächst keine Auswirkungen. Die CD4-Zellzahl lag bereits zu Erkrankungsbeginn auf niedrigstem Niveau und blieb in der Folgezeit unbeeinflusst. Mit dem Auftreten des vierten Krankheitsereignisses kam es zu einem zwischenzeitlichen steilen Abfall von sd p24-Ag. Der Wiederanstieg am Ende bzw. nach Beendigung der Therapie mit AZT verlief schwankend. Der Therapieabbruch führte zu einem Anstieg von sd p24-Ag.

Patient 298

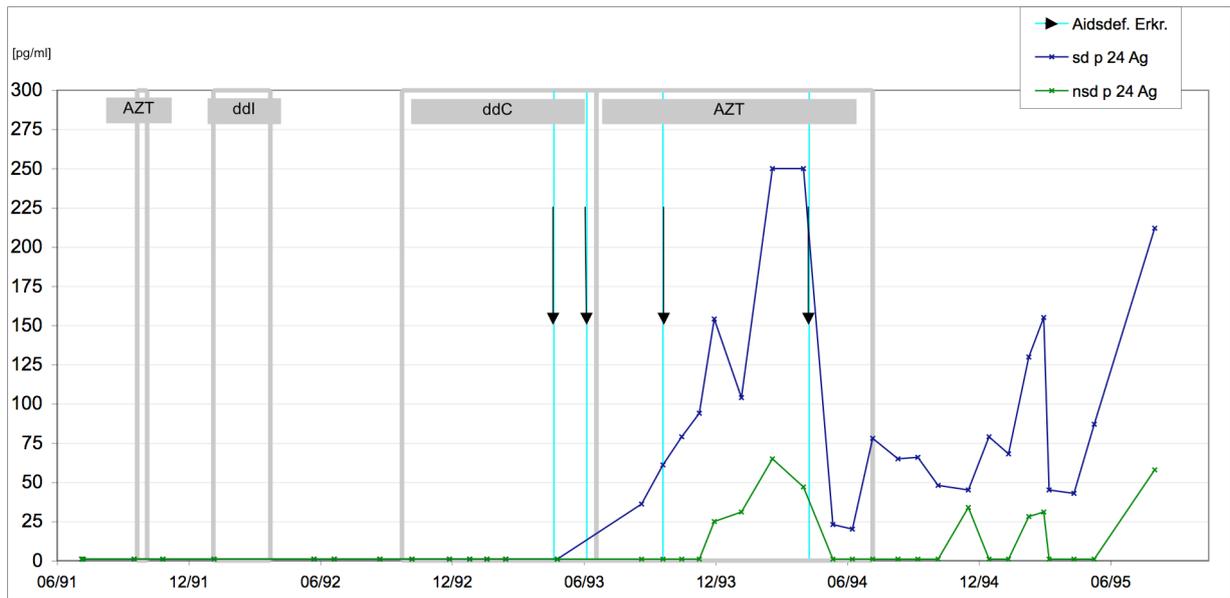


Abb. 9a

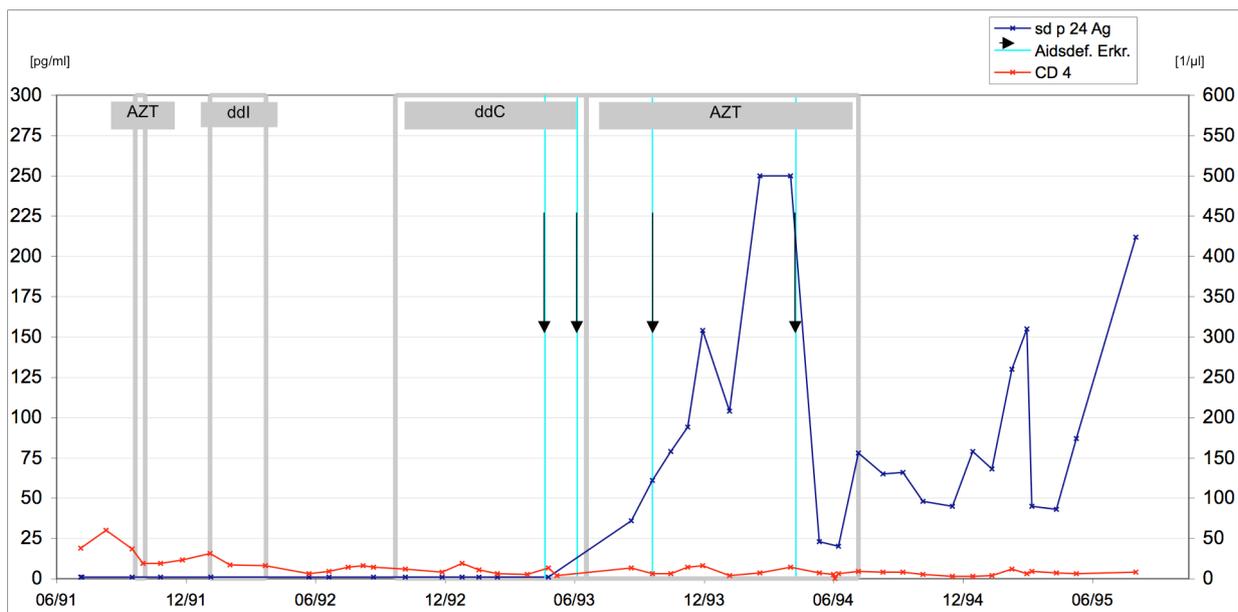


Abb. 9b

Abbildung 9: Patient 298: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24- Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zu nicht säuredissoziiertem p24-Antigen (nsd p24-Ag) (a) und CD4-Zellzahl (b). Das Therapieintervall mit der jeweiligen antiretroviralen Medikation ist durch senkrechte graue Striche markiert.

3.13.1.3 Patient 148 (s. Abb. 10a+b): Sd p24-Ag und nsd p24-Ag zeigten tendenziell eine Korrelation, die Werte von sd p24-Ag waren dabei in der Regel deutlich höher als bei nsd p24-Ag. Nach Einleitung einer Therapie mit AZT und ddI bzw. AZT und 3TC fielen beide Parameter deutlich ab, blieben dann unter 3TC/d4T auf demselben niedrigen Niveau zwischen 0 und 50 pg/ml. Der Zusatz von NVP zur Therapie hatte keinen Einfluss.

Die Viruslast blieb über den gesamten Verlauf im Niveau zwischen 10^4 und 10^5 Kopien/ml. Auffallend war insbesondere, dass der plötzliche Anstieg von sd p24-Ag keine Entsprechung in der Viruslast fand. Nach Therapiebeginn mit AZT/ddI bzw. AZT/3TC bzw. 3TC/4TC fiel die Viruslast zwar leicht ab, stieg dann jedoch auch unter der Therapie wieder an. Der Zusatz von NVP zeigte auch hier keinen wesentlichen Einfluss. Eine dauerhafte Korrelation zwischen VL und sd p24-Ag war nicht zu erkennen.

Die CD4-Zellzahlen zeigten Schwankungen, die z. T. mehr als 250 Zellen/ μ l betragen. Der plötzliche Anstieg von sd p24-Ag, das zuvor unterhalb der Nachweisgrenze lag, fiel mit einer tendenziellen Abnahme der CD4-Zellen zusammen, auch p24-Ag fiel in der Folge wieder ab. Nach Therapiebeginn entwickelten sich die Werte kurzzeitig gegenläufig: die CD4-Zellzahlen stiegen tendenziell an, sd p24-Ag fiel ab. Die Werte pendelten sich im Verlauf der Therapien auf einem Level ein, das durch weitere Therapieveränderungen nicht wesentlich beeinflusst wurde.

Die dokumentierte aidsdefinierende Erkrankung trat unter der Therapie mit 3TC/d4T auf und lag zeitlich nach einem Abfall von Viruslast und sd p24-Ag und einem kurzzeitigen Wiederanstieg der CD4-Zellen.

Patient 148

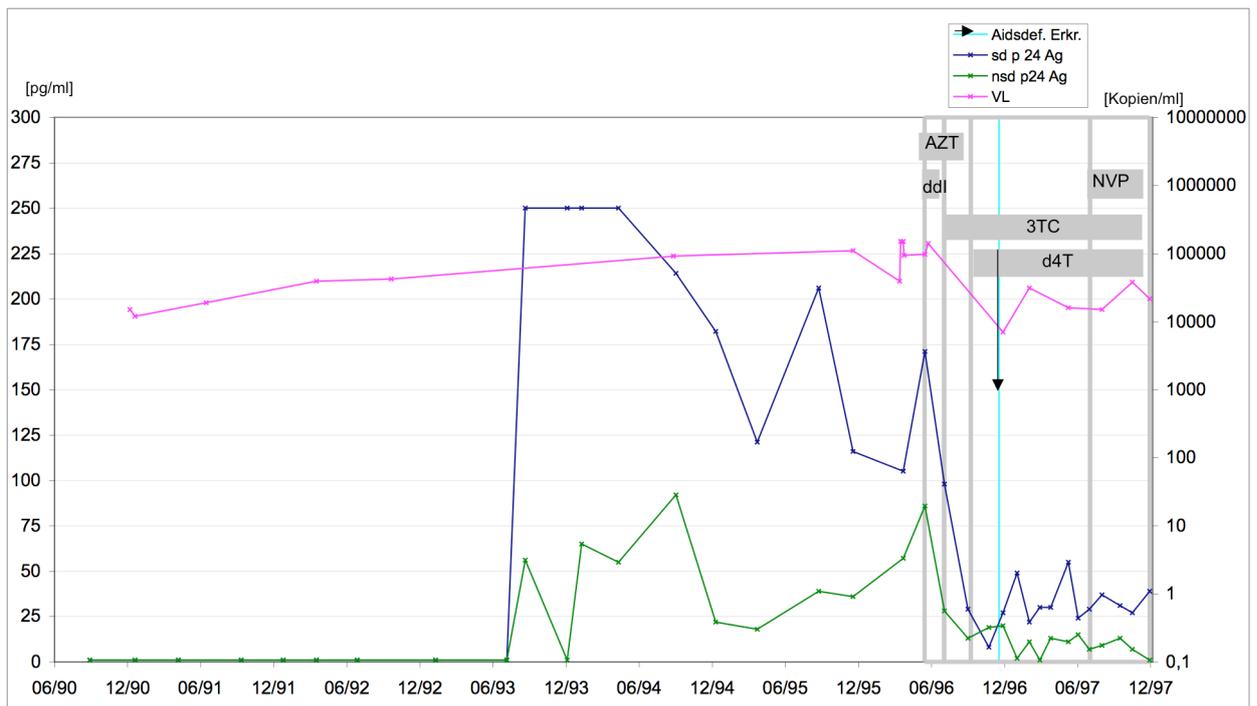


Abb. 10a

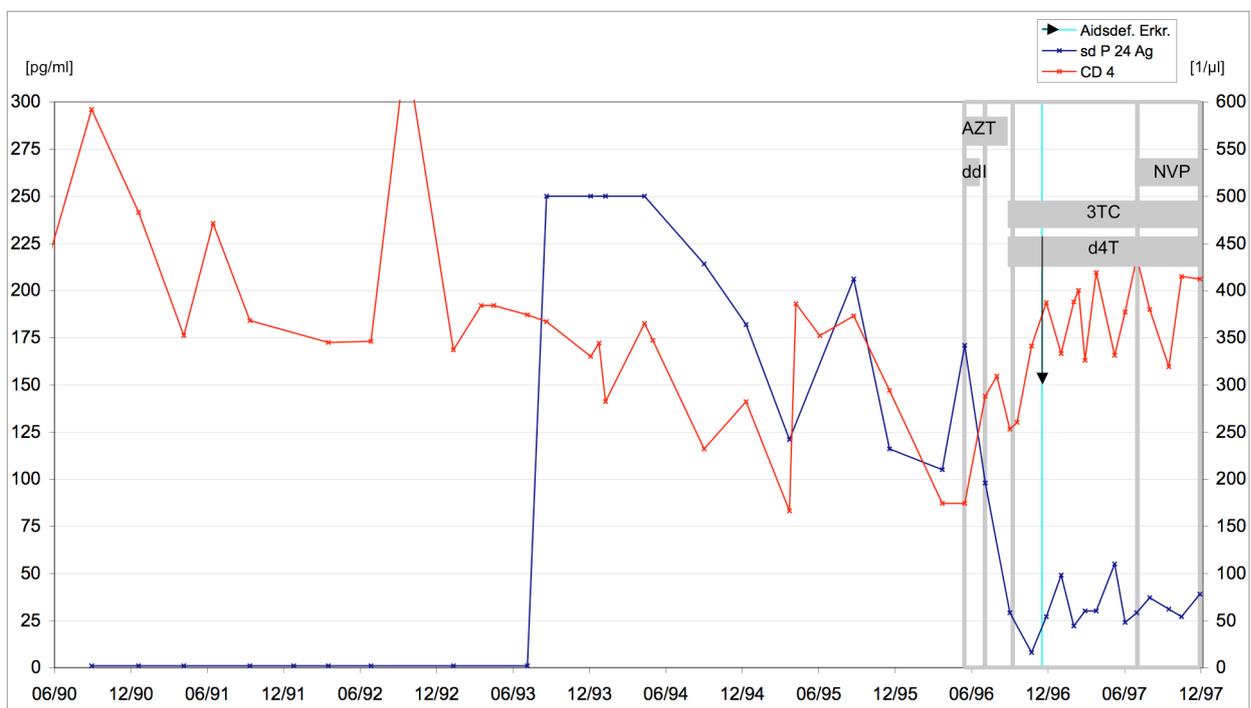


Abb. 10b

Abbildung 10: Patient 148: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zu nicht säuredissoziiertem p24-Antigen (nsd p24-Ag) (a) Viruslast (VL) (a) und CD4-Zellzahl (b). Das Therapieintervall mit der jeweiligen antiretroviralen Medikation ist durch senkrechte graue Striche markiert.

3.13.1.4 Patient 549 (s. Abb. 11a+b): In diesem Beispiel verliefen die Werte von sd p24-Ag und nsd p24-Ag nahezu parallel. Es traten nur vereinzelt gegenläufige Parameterentwicklungen auf (Ende 1994). Die CD4-Zellzahl war kontinuierlich niedrig (Ausgangswert <100 Zellen/ μ l). Der Anstieg von sd p24-Ag ab etwa 06/93 fand hier keine Entsprechung.

Besondere Entwicklungen der Parameter im Zusammenhang mit dem Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung waren nicht abzuleiten.

Unter der Therapie mit AZT sanken die CD4-Zellen weiter ab, ein Einfluss auf den Nachweis von sd p24-Ag war nicht festzustellen.

Patient 549

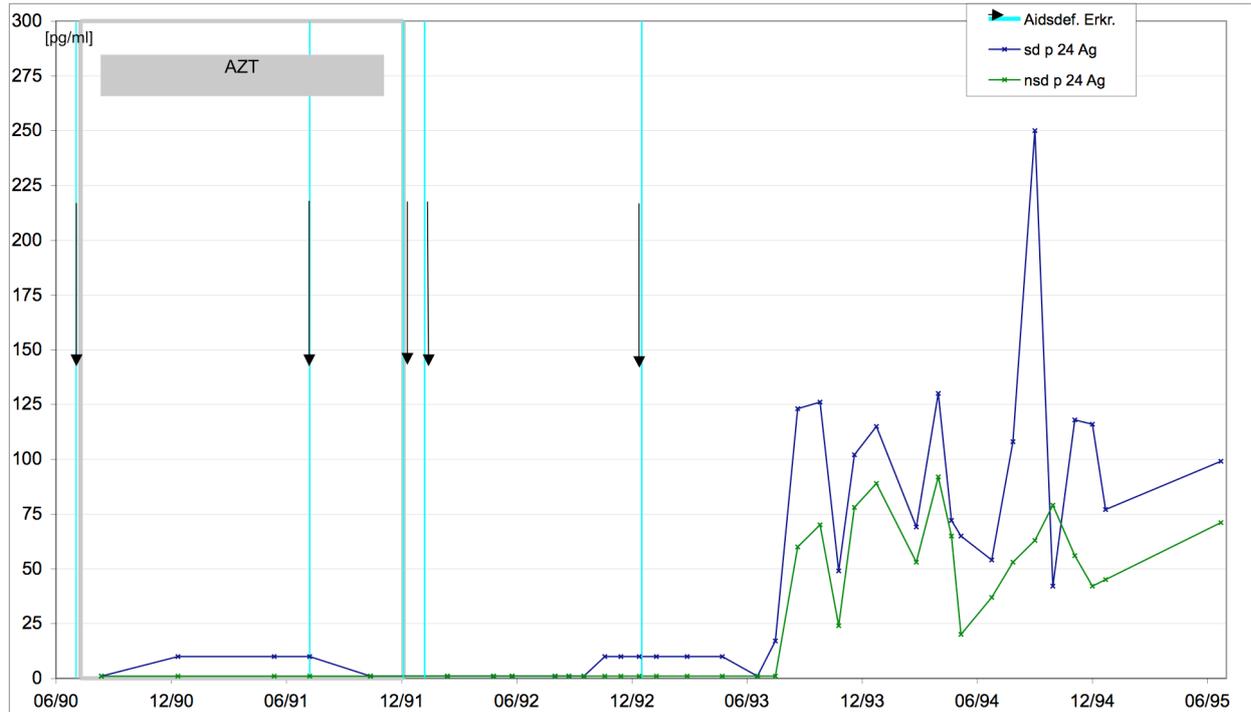


Abb. 11a

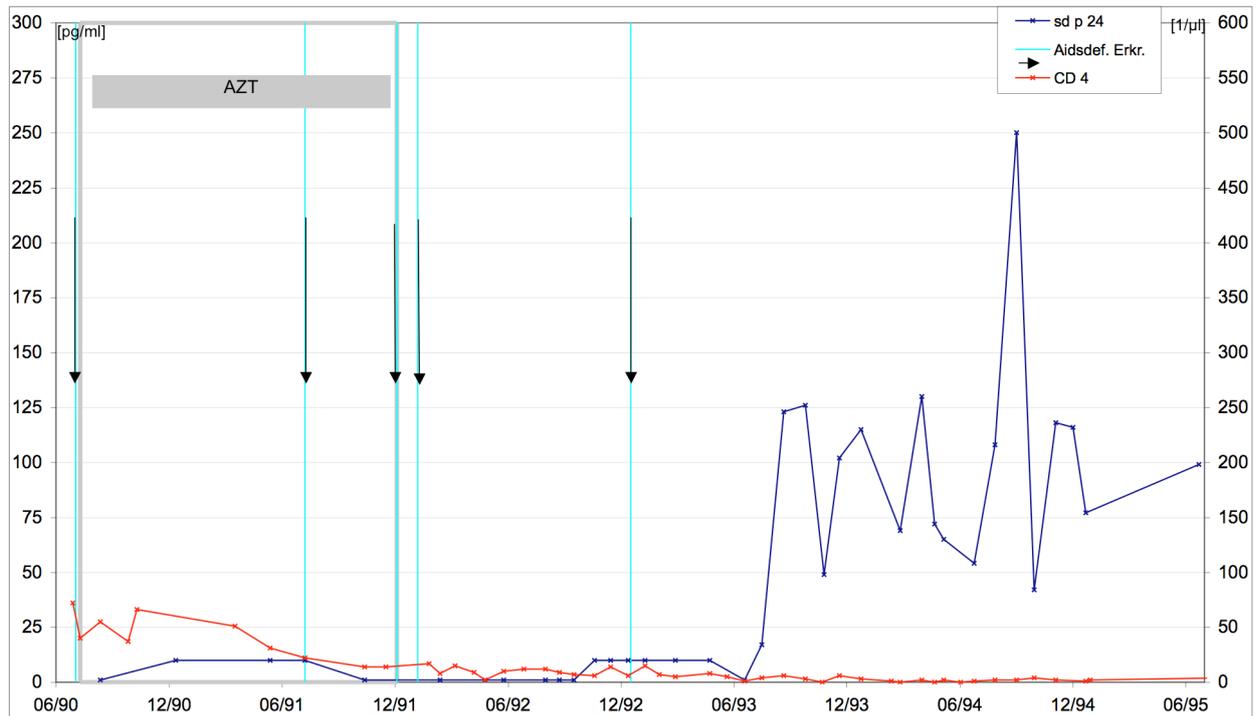


Abb. 11b

Abbildung 11: Patient 549: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zu nicht säuredissoziiertem p24-Antigen (nsd p24-Ag) (a) und CD4-Zellzahl (b). Das Therapieintervall mit der jeweiligen antiretroviralen Medikation ist durch senkrechte graue Striche markiert.

3.13.1.5 Fazit: Es wurden exemplarisch vier Patienten mit langen Krankheitsverläufen ausgewählt, die eine antiretrovirale Therapie bekommen hatten. Hier konnte gezeigt werden, dass jeder Patient individuelle Parameterveränderungen auf Therapien zeigte. Insgesamt waren die durchgeführten Therapien sehr vielfältig. Bis ca. 1996 hatte man fast nur Monotherapien angewandt. Monotherapien (heute schon ausreichend bekannt) hatten bei den ausgewählten Beispielen keinen Einfluss auf sd p24-Ag (Abb. 8a+b, 9a+b, 11a+b). Bei zwei Patienten wurde eine 2fach-Kombination gegeben. Bei diesen Beispielen sah man nach Therapiebeginn einen Abfall des sd p24-Ag (Abb. 8a+b, 10a+b). Bei Patient 148 kam eine 3fach-Therapie zum Einsatz, die keinen weiteren sd p24-Ag-Abfall zur Folge hatte (Abb. 10a+b). Bei den Patienten 003, 298 und 549 konnte man sehen, dass die Monotherapie die CD4-Zellzahl nicht erhöhte (Abb. 8b, 9b, 11b). 2fach-Therapie führte bei diesen Beispielen zu einer Anhebung der CD4-Zellen (Abb. 8b, 10b). Die 3fach-Therapie bei Patient 148 zeigte keine weitere Erhöhung der CD4-Zellen (Abb. 10b).

Die Monotherapie hatte keinen Einfluss auf die Viruslast bei Patient 003 (Abb. 8b), nach Beginn der 2fach-Kombination fiel sie zunächst deutlich ab. Auch bei Patient 148 kam es zu einem leichten Abfall der Viruslast durch die Gabe von zwei Medikamenten (Abb. 10a). Die Tripletherapie bei Patient 148 zeigte dagegen keinen weiteren Abfall (Abb. 10a).

Es zeigte sich, dass **säuredissoziiertes und nicht-säuredissoziiertes p24-Antigen** untereinander gut korrelierten, solange nsd p24-Ag über der Nachweisgrenze lag (Abb. 9a, 10a, 11a).

Betrachtet man die Kurven von **sd p24-Ag und CD4-Zellzahl**, zeigen sich bei diesen Beispielen teils gegenläufige, teils parallele Verläufe (Patient 003 und 148, Abb. 8b+10b). Zwei Patienten (Patient 298 und 549) mit durchweg sehr niedrigen CD4-Zahlen zeigten zunächst lange Zeit niedrige sd p24-Ag-Werte und dann einen plötzlichen Anstieg mit nachfolgenden Schwankungen der Werte (Abb. 9b, 11b), ohne dass sich diese Veränderung in den CD4-Werten niederschlug.

In Bezug auf **aidsdefinierende Erkrankungen** konnte man nur bei Patient 298 (Abb. 9a+b) einen Anstieg des sd p24-Ag in zeitlichem Zusammenhang mit dem Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung beobachten. Bei Patient 003, 148 und 549 (Abb. 8a+b, 10a+b, 11a+b) war kein durchgehender Zusammenhang zu erkennen, wenn auch einmalig eine aidsdefinierende Erkrankung zeitlich nahe zu einem starken Abfall von sd p24-Ag und Viruslast

dokumentiert war (Abb. 8a). Bei Patient 003 kam es vor dem Krankheitsereignis zu einem deutlichen Abfall der Viruslast (nach Umsetzung der Therapie bei vermutlich entwickelter AZT-Resistenz), die nach der Erkrankung wieder deutlich anstieg (Abb. 8a). Die Therapie konnte in diesen Fällen das Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung nicht verhindern.

3.13.2 Einzelverläufe bei Patienten mit langen Beobachtungszeiträumen ohne Therapie

3.13.2.1 Patient 594 (s. Abb. 12a+b): Sd p24-Ag und nsd p24-Ag zeigten hier einen recht parallelen Kurvenverlauf bei insgesamt höheren sd p24-Ag-Werten. Es waren dennoch zahlreiche gegensinnige Kurvenabschnitte feststellbar, z. T. war nsd p24-Ag sogar höher als sd p24-Ag. Auch wurde hier sehr deutlich, dass die Werte für sd p24-Ag und nsd p24-Ag in keinem festen Verhältnis zueinander standen. Auffällig war der rapide Abfall beider Parameter zu Anfang 1996.

Die Bestimmung der Viruslast erfolgte ab etwa 09/95. Die Werte fielen zusammen mit sd p24-Ag unter Ausbildung eines "spike"-artigen kurzfristigen Wiederanstiegs steil ab. Auch in diesem Beispiel kam es in kurzem zeitlichem Abstand zum Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung. Die Viruslast blieb im weiteren Verlauf auf dem gleichen niedrigen Niveau.

Auch in diesem Beispiel zeigten sich sehr niedrige CD4-Zellzahlen, ausgehend von einem Wert um ca. 120/ μ l. Mit Ansteigen des sd p24-Ag nahmen diese Werte weiter ab. Auffallend war ein Anstieg der CD4-Zellen in zeitlicher Nähe zu dem rapiden Abfall von sd p24-Ag und Viruslast bzw. vor dem Auftreten des dritten dokumentierten Krankheitsereignisses. Dieser Anstieg hielt über den weiteren Verlauf bei konstant niedriger Viruslast und auf niedrigem Niveau pegelndem sd p24-Ag tendenziell an.

Patient 594

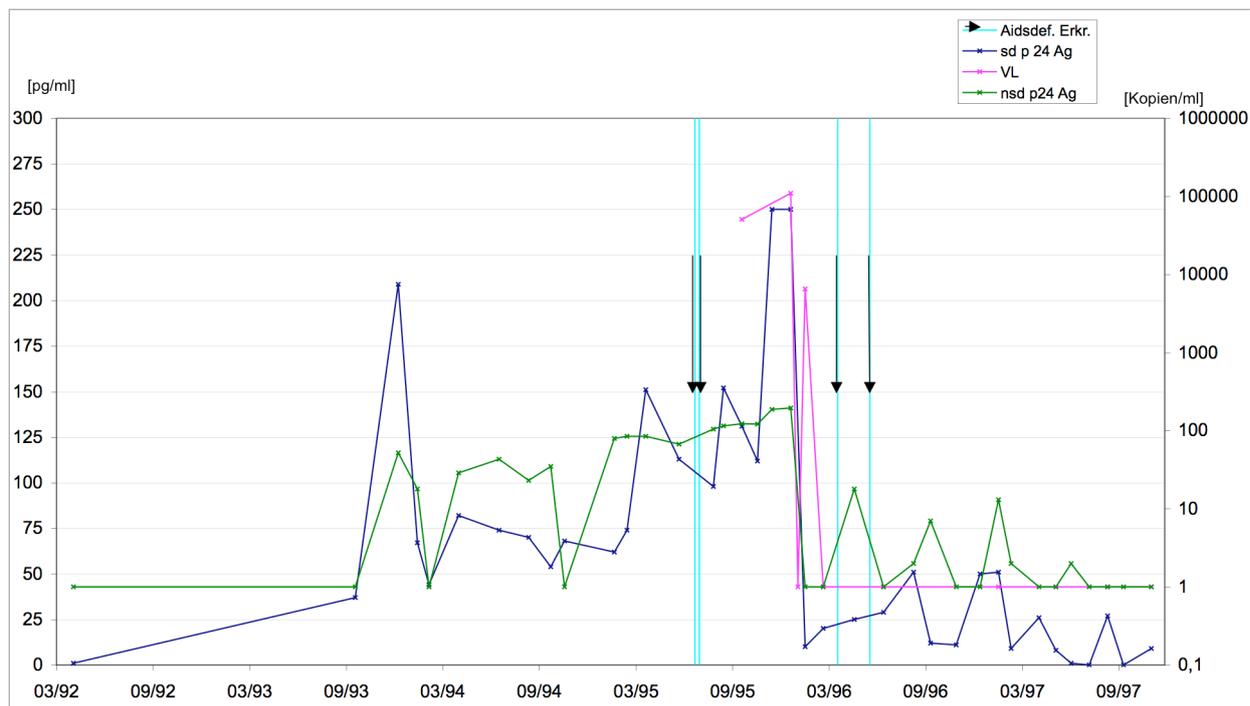


Abb. 12a

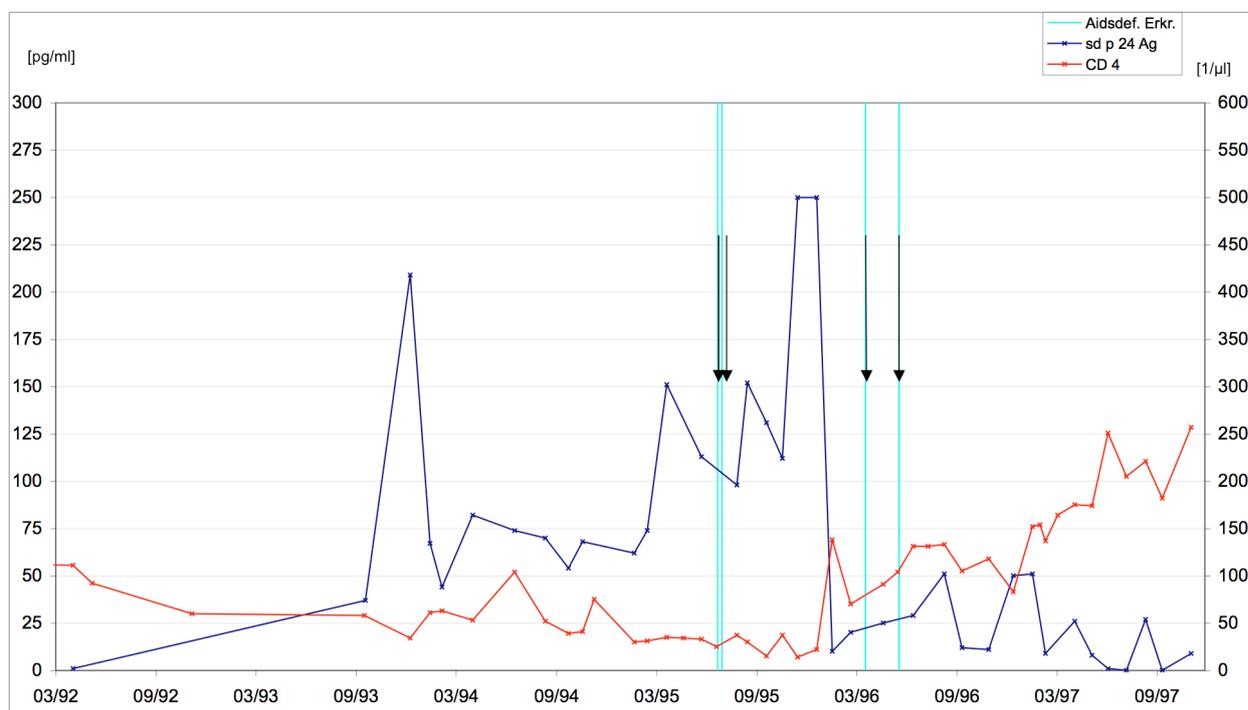


Abb. 12b

Abbildung 12: Patient 594: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zu nicht säuredissoziiertem p24-Antigen (nsd p24-Ag) (a), Viruslast (VL) (a) und CD4-Zellzahl (b).

3.13.2.2 Patient 564 (s. Abb. 13a+b): Hier zeigte sich bei durchweg unter der Nachweisgrenze liegenden nsd p24-Ag-Werten ein Verlauf von sd p24-Ag im mittleren bis unteren Messdrittel.

Die VL wurde ab 11/95 gemessen. Bei kontinuierlich hohen Viruslast-Werten mit leicht fallender Tendenz blieb sd p24-Ag auf einem niedrigen Niveau (<40 pg/ml).

Die CD4-Zellzahl zeigte breite Schwankungen bei tendenziellem Abfall der Werte. Dabei zeigten sich gleich- sowie gegensinnig verlaufende Kurvenabschnitte.

Eine Therapie wurde nicht durchgeführt. Aidsdefinierende Erkrankungen waren nicht dokumentiert.

Auffällige Korrelationen der Parameter bestanden nicht.

Patient 564

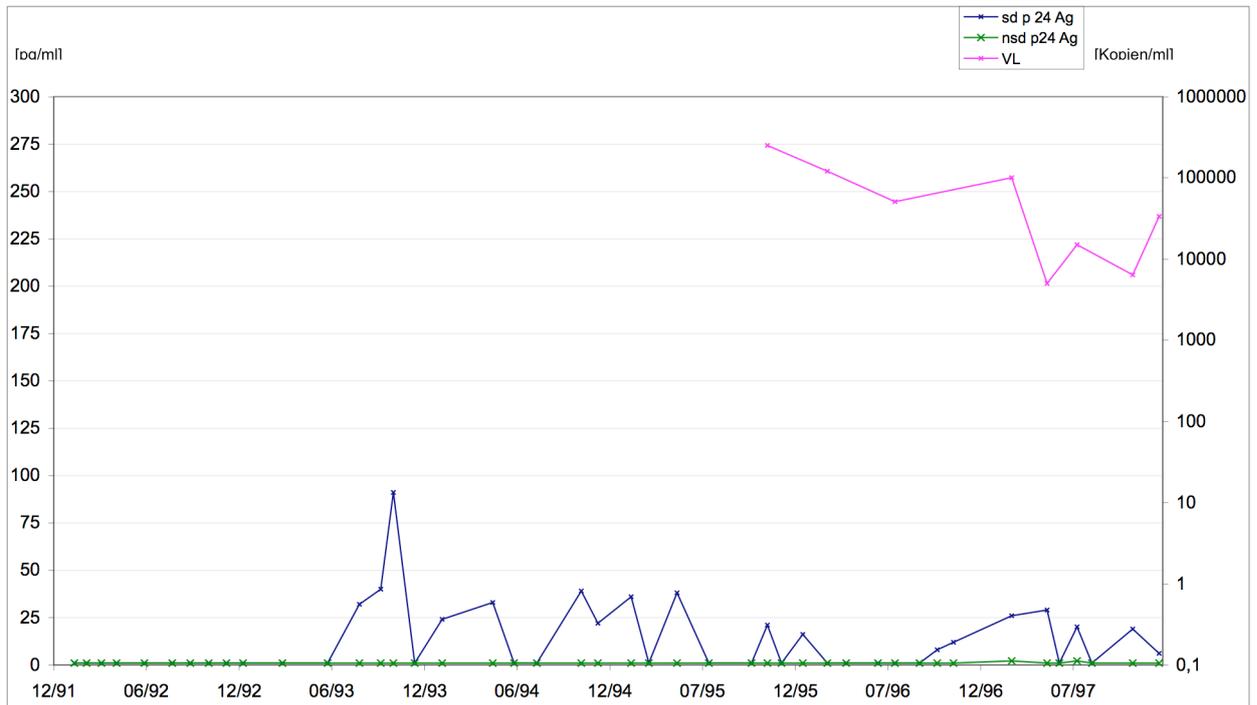


Abb. 13a

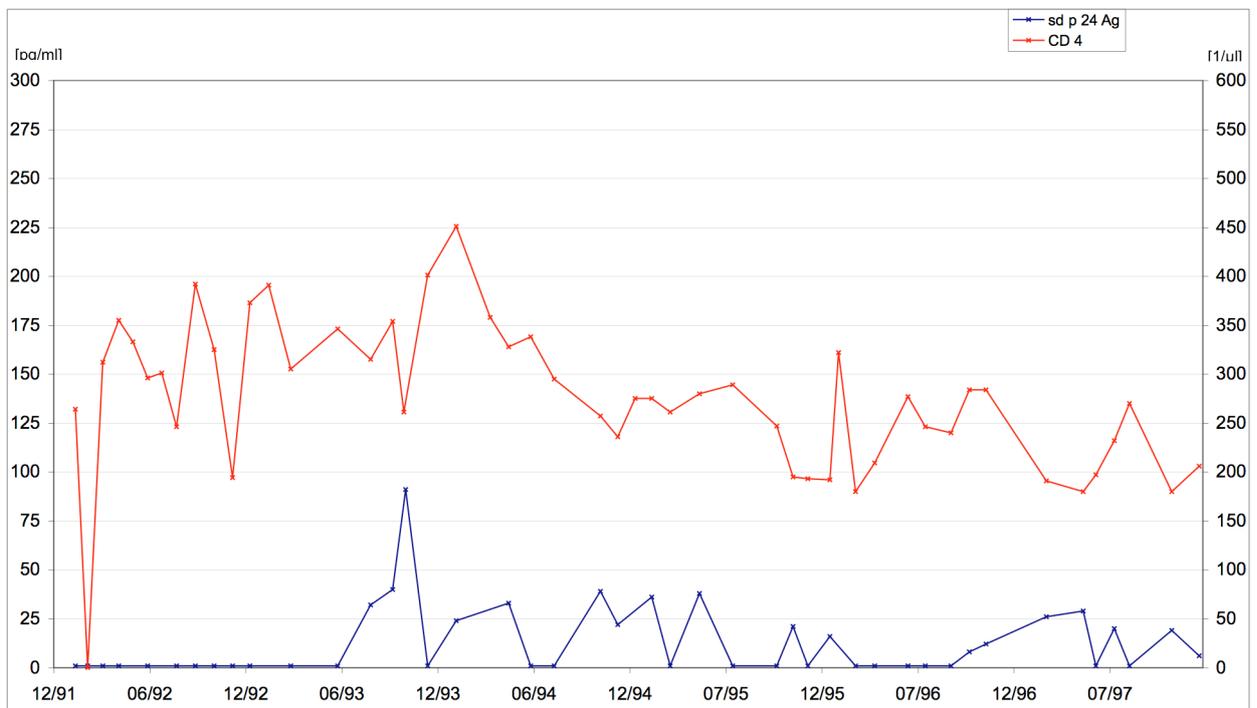


Abb. 13b

Abbildung 13: Patient 564: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zu nicht säuredissoziiertem p24-Antigen (nsd p24-Ag) (a), Viruslast (VL) (a) und CD4-Zellzahl (b).

3.13.2.3 Patient 062 (s. Abb. 14a+b): Während nsd p24-Ag anfänglich über zwei Jahre unter der Nachweisgrenze blieb, zeigte sd p24-Ag schon deutlich positive Werte. Insgesamt korrelierten die Verläufe bis auf zwei Ausreißer nach oben von sd p24-Ag, die von nsd p24-Ag nicht mitgemacht wurden.

Sd p24-Ag verlief anfänglich flach ansteigend im unteren bis mittleren Niveau, die Viruslast hingegen wurde von Anfang an auf hohem Niveau gemessen. Der auffällige "Einbruch" der Viruslastwerte Ende '96/Anfang '97 war zunächst ebenfalls von einem Abfall von sd p24-Ag begleitet, doch kam es dann zur gegensinnigen Wertveränderung. Mit dem Wiederanstieg der Viruslast kam es zeitverzögert zu einem Wiederanstieg von sd p24-Ag. Eine Korrelation der Parameter konnte im Verlauf nicht festgestellt werden.

Die CD4-Zellen hielten sich in diesem Beispiel auf eher höherem Niveau. Parallele oder gegenläufige Entwicklungen zum Verlauf von sd p24-Ag waren nicht festzustellen.

Patient 062

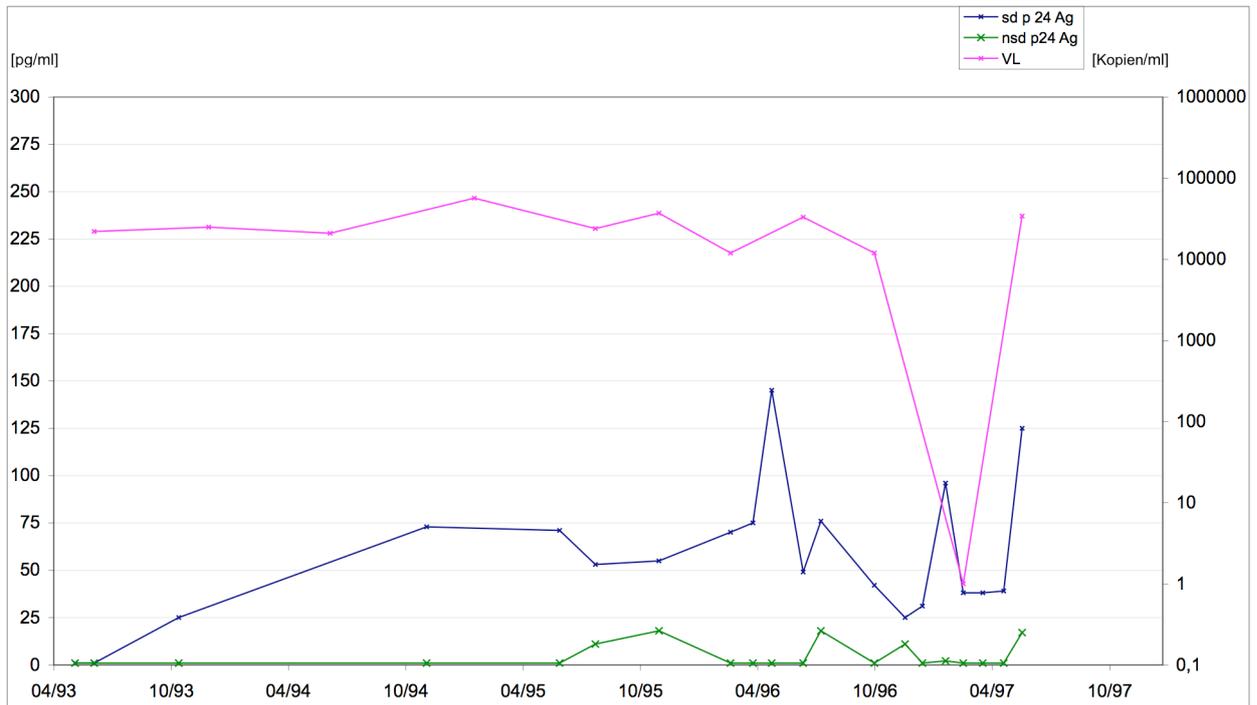


Abb.14a

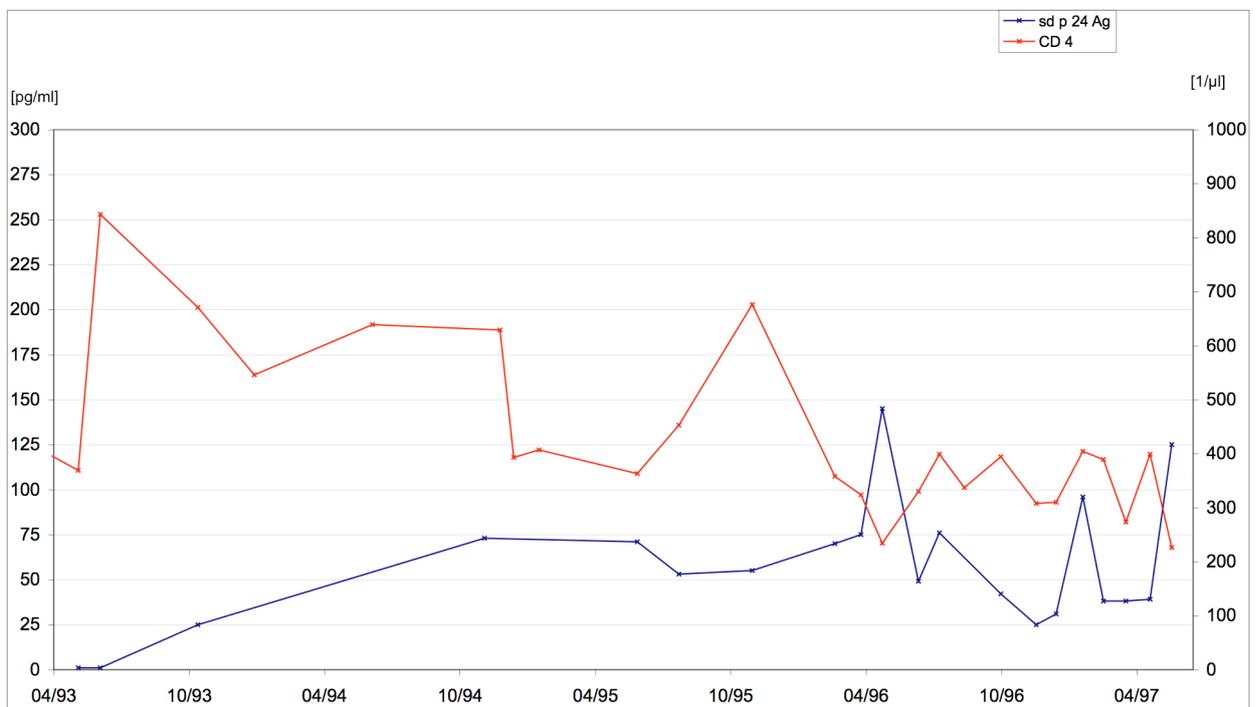


Abb. 14b

Abbildung 14: Patient 062: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) im Vergleich zu nicht säuredissoziiertem p24-Antigen (nsd p24-Ag) (a), Viruslast (VL) (a) und CD4-Zellzahl (b).

3.13.2.4 Patient 541 (s. Abb. 15): Wie bereits schon häufig beschrieben konnte man bei diesem Patienten wiederum eine Korrelation von sd und nsd p24-Ag sehen, wobei sd p24 insgesamt höhere Werte anzeigte.

Während die CD4-Zellzahlen tendenziell langsam fielen mit einigen Schwankungen nach unten und oben, kam es bei sd p24-Ag zu einem kontinuierlichen Anstieg.

Patient 541

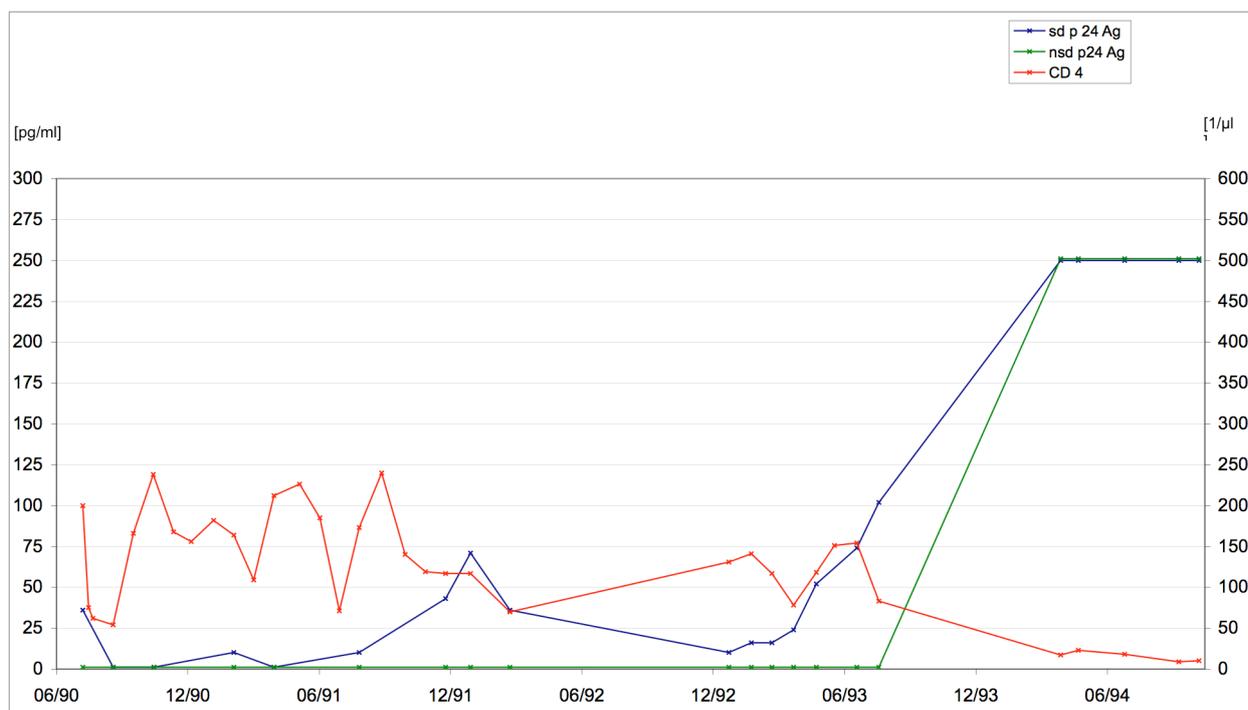


Abbildung 15: Patient 541: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag), nicht säuredissoziiertes p24-Antigen (nsd p24-Ag) und CD4-Zellzahl.

3.13.2.5 Fazit: Anhand dieser vier Beispiele sollte gezeigt werden, dass im natürlichen Verlauf einer HIV-Infektion die Verläufe der Parameter über einen langen Zeitraum individuell sehr unterschiedlich sein können, wenn keine äußeren Einflüsse (Therapien) einwirken.

Eine kontinuierliche Korrelation von **sd p24-Ag und Viruslast** war lediglich bei Patient 594 (Abb. 12a) im Verlauf zu sehen: bei hoher Viruslast war auch sd p24-Ag hoch und umgekehrt. Bei Patient 564 ließ sich eine phasenweise Korrelation feststellen (Abb. 13a). Bei Patient 062 (Abb. 14a) korrelierte der Kurvenverlauf durchweg nicht.

Die Betrachtung der Kurvenvergleiche von **sd p24-Ag und CD4-Zellzahlen** zeigte ebenso uneinheitliche Verläufe. Bei drei von vier Patienten konnte ein dauerhafter, gegenläufiger Kurvenverlauf über den gesamten Messzeitraum festgestellt werden (Abb. 12b, 14b, 15). Bei Patient 564 verliefen die Kurven teils gegenläufig teils parallel (Abb. 13b).

Bei Patient 594 kam es im Verlauf mehrfach zum Auftreten einer **aidsdefinierenden Erkrankung**. Bezüglich sd p24-Ag zeigte sich kein durchgehender Zusammenhang. Es zeigte sich sogar vor dem dritten Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung ein Abfall der Viruslast und des sd p24-Ag. Die CD4-Zellzahl zeigte keine signifikante Veränderung vor dem Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung in diesem Fall.

Insgesamt ergab sich auch hier ein unterschiedliches Bild mit diversen Verläufen bei verschiedenen Individuen.

3.13.3 Einzelverläufe von Patienten, die im Verlauf der HIV-Infektion verstarben

3.13.3.1 Patient 053 (s. Abb. 16): Die sd p24-Ag-Werte lagen bei diesem Patienten gleichförmig auf einem mittleren Niveau, die CD4-Zellzahlen fielen bei niedrigem Ausgangsniveau (<150/ μ l) weiter ab.

Das Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung war von keiner wesentlichen Veränderung der Parameter in zeitlicher Nähe begleitet.

Ca. 8 Monate vor dem Tod zeigte sich ein deutlicher Abfall von sd p24-Ag mit weiterem Abfall der Werte, die CD4-Zellzahlen blieben konstant niedrig.

Patient 053

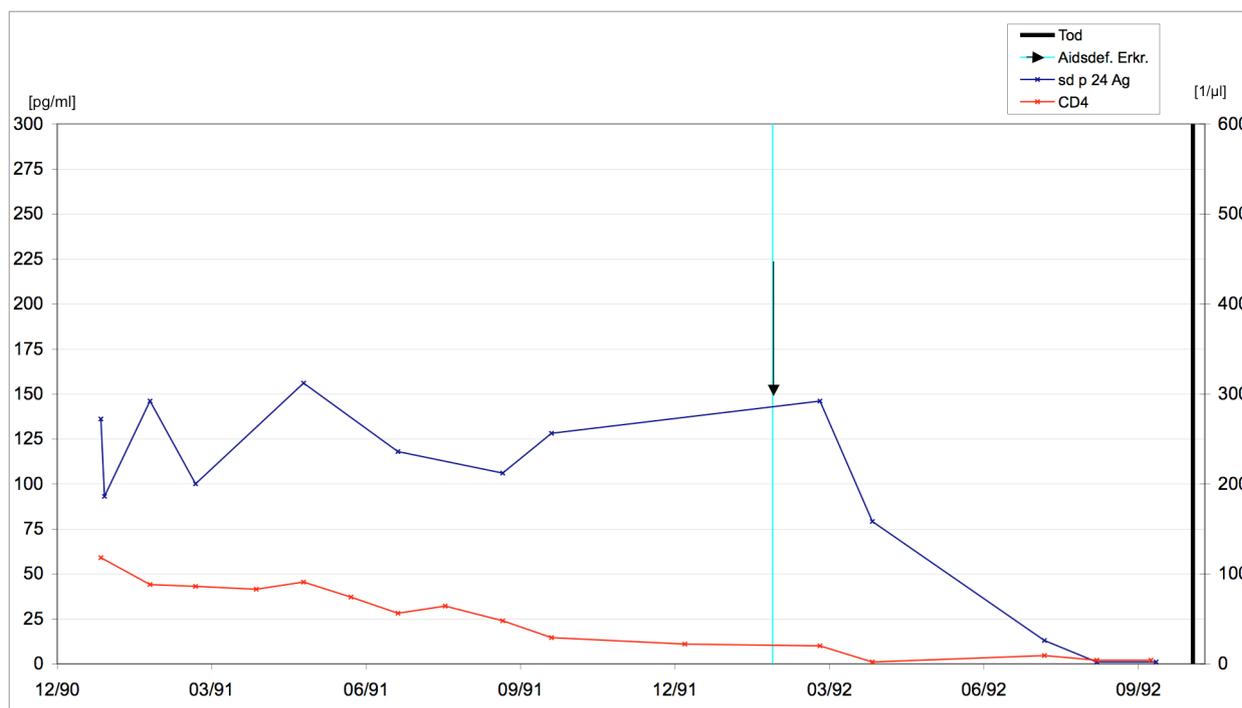


Abbildung 16: Patient 053: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) und CD4-Zellzahl.

3.13.3.2 Patient 056 (s. Abb. 17): Tendenziell fielen die CD4-Zellzahlen im Verlauf langsam ab während sd p24-Ag zunächst auf niedrigem Niveau schwankte. Um den Monat 06/93 kam es zu einem abrupten Anstieg von sd p24-Ag in den oberen Messbereich. Die Werte blieben dann kontinuierlich im oberen Niveau.

Vor dem ersten dokumentierten Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung zeigten die CD4-Zellzahlen einen akuten Abfall. In der Folgezeit bestand eine geringere Schwankungsbreite bei tendenziellem Abfall. Die Entwicklung von p24-Ag ließ sich nicht in Beziehung zu den Krankheitsereignissen setzen, diese schienen unabhängig von Veränderungen der Laborparameter aufzutreten. Rückschlüsse von Parameterveränderungen auf bevorstehende oder stattgehabte aidsdefinierende Erkrankungen konnten nicht erfolgen.

Vor dem Tod waren die sd p24-Ag-Werte über 1,5 Jahre kontinuierlich hoch, die CD4-Zellzahlen dagegen kontinuierlich niedrig.

Patient 056

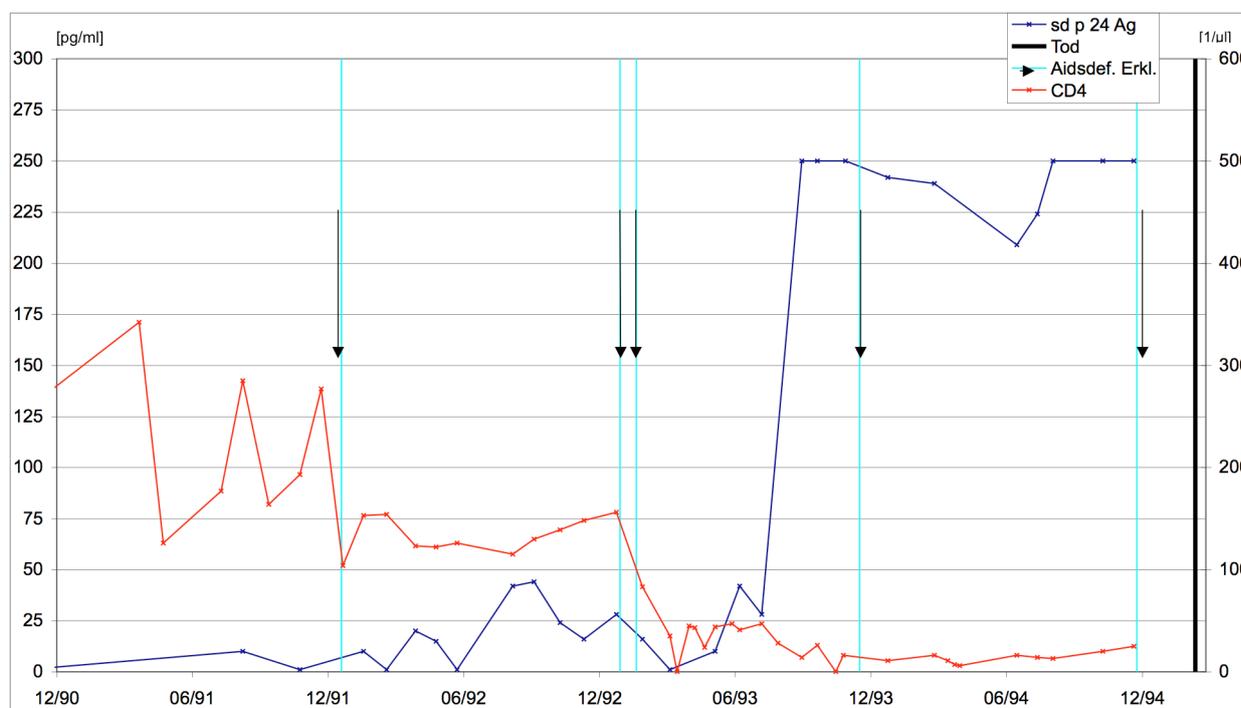


Abbildung 17: Patient 056: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) und CD4-Zellzahl.

3.13.3.3 Patient 058 (s. Abb. 18): Hier zeigte sich im Verlauf ein CD4-Zellzahlenabfall mit geringen Schwankungen, während sd p24-Ag anstieg.

Während der AZT-Gabe von 12/90 bis zur 2. Jahreshälfte 1992 zeigten sich ein Abfall von CD4 und ein leichter Anstieg von sd p24-Ag. Auch während der ddI-Gabe zeigte sich zunächst ein weiterer Anstieg, dann leichter Abfall von sd p24-Ag während die CD4-Zellzahl weiter absank. Nach erneuter Therapieänderung von ddI auf AZT kommt es zu einem kurzzeitigen Abfall und flachen Wiederanstieg von sd p24-Ag. Nach Absetzen der Therapie kam es zu einem starken Anstieg von sd p24-Ag.

Das Auftreten von aidsdefinierenden Erkrankungen ließ sich nicht zur Entwicklung von sd p24-Ag in Beziehung setzen, es wurden jedoch Krankheitsereignisse unter ansteigendem sd p24-Ag beobachtet.

Von Ende 1993 bis zum Tod Anfang 1996 blieb sd p24-Ag am oberen Detektionslimit. In dieser Phase kam es noch zum mehrfachen Auftreten aidsdefinierender Erkrankungen.

Patient 058

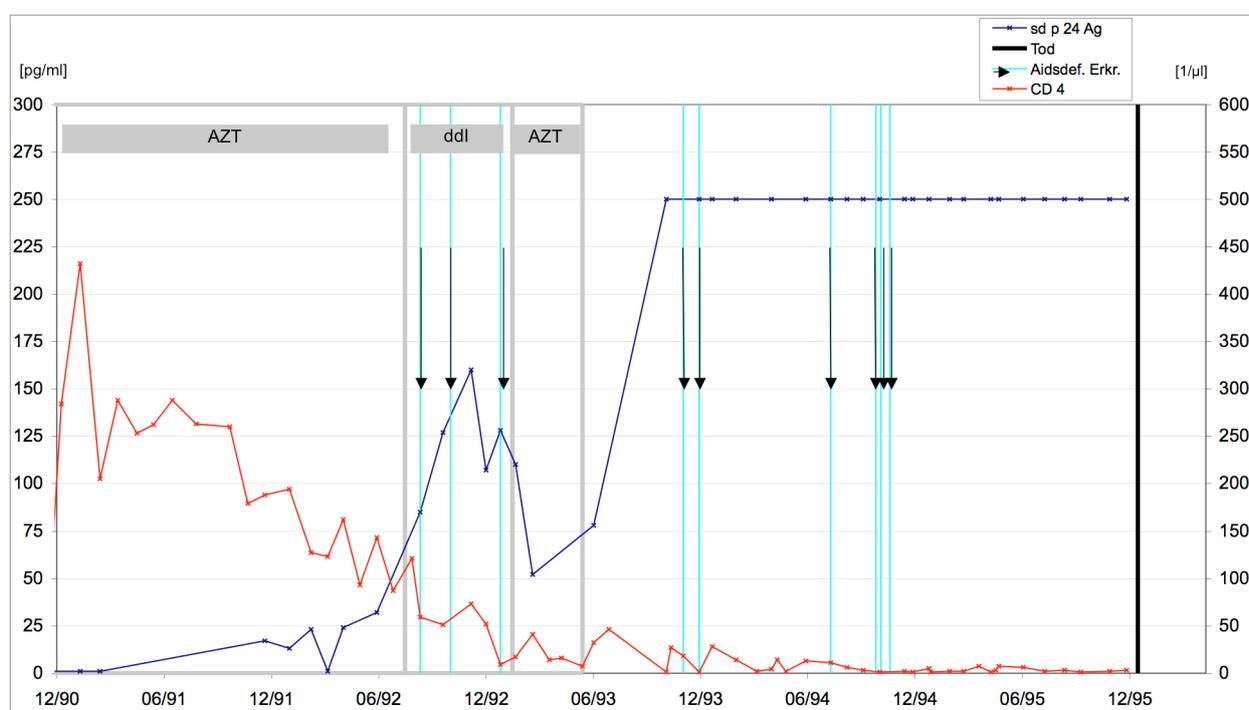


Abbildung 18: Patient 058: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) und CD4-Zellzahl. Das Therapieintervall mit der jeweiligen antiretroviralen Medikation ist durch senkrechte graue Striche markiert.

3.13.3.4 Patient 040 (s. Abb. 19): Während die CD4-Zellzahlen bei niedrigem Ausgangswert (<100/ μ l) kontinuierlich abfielen, blieben die sd p24-Ag-Werte auf einem kontinuierlich niedrigen Niveau.

Vor dem Tod sah man also niedriges sd p24-Ag sowie niedrige CD4-Zellzahlen über etwa 20 Monate.

Patient 040

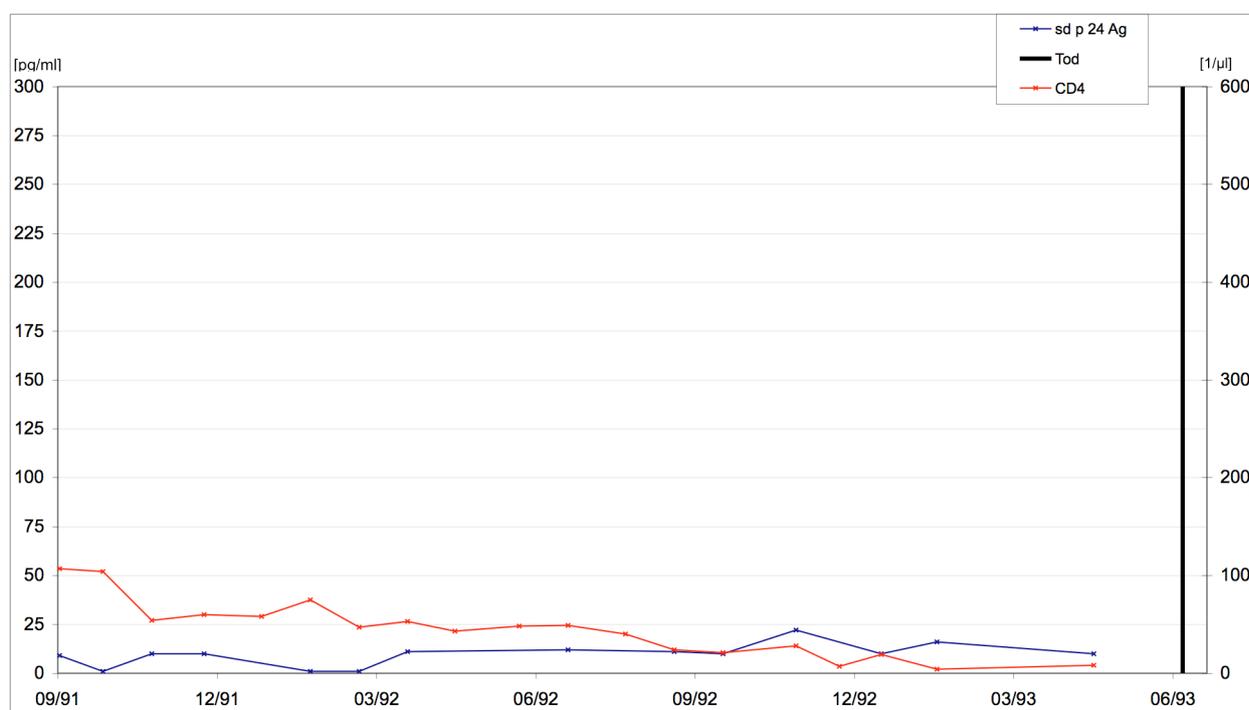


Abbildung 19: Patient 040: Verlauf der Messwerte für säuredissoziiertes p24-Antigen (sd p24-Ag) und CD4-Zellzahl.

3.13.3.5 Fazit: In den aufgeführten vier Beispielen, bei denen ein **Todeszeitpunkt** bekannt war, sah man unterschiedliche, individuelle Verläufe. Bei zwei Patienten waren die sd p24-Ag-Werte vor dem Tod kontinuierlich hoch – bei einem davon einhergehend mit kontinuierlich niedrigen CD4-Zellzahlen (Abb. 17), bei dem anderen mit abfallenden CD4-Zellzahlen (Abb. 18). Bei einem Patienten kam es zu einem Abfall der sd p24-Ag-Werte bei kontinuierlich niedrigen CD4-Zellzahlen (Abb. 16). Bei einem Patienten waren die sd p24-Ag-Werte sowie die CD4-Zellzahlen kontinuierlich niedrig (Abb. 19).

4. DISKUSSION

4.1 Nachweis von p24-Ag

Der Nachweis von nsd p24-Ag gelang unter 743 Patienten in 43,6% der Fälle zum Zeitpunkt der Erstmessung, nach Säuredissoziation bei 60,3%. Allerdings konnte bei zwei Patienten sd p24-Ag nicht nachgewiesen werden, obwohl nsd p24-Ag im positiven Messbereich lag. Die in der Untersuchung festgestellte Verbesserung der p24-Ag-Bestimmung nach Säuredissoziation entspricht den Ergebnissen anderer Studien [8, 14, 54, 60, 86, 95, 101, 107, 108, 111, 119, 120, 123, 163]. Folgende Probleme können bei der Bestimmung von p24-Ag auftreten: 1. Die Anwesenheit von p24-spezifischen Antikörpern, die mit den p24-Ag Komplexe bilden, diese der Nachweisreaktion entziehen und so zu einer Unterdetektion führen [2, 73, 108]. 2. Die relativ häufige Anwesenheit von Immunglobulin (Ig)-spezifischen, rheumafaktorähnlichen Antikörpern [70, 117], die möglicherweise die Primär- mit den Sekundär-Antikörpern des p24-Ag-Tests (s. Kap. 2.3.1) überbrücken und so einen überhöhten Nachweis verursachen [162]. Säureinduzierte Immunkomplexdissoziation des p24-Ag führt zu einer signifikanten, jedoch unvollständigen Lösung des Antigens [135]. Die Säurebehandlung hat auch den Nebeneffekt, dass präformierte Ig-anti-Ig-Komplexe teilweise dissoziiert werden. Dadurch können wiederum Ig-spezifische Antikörper, z. B. Rheumafaktoren, freigesetzt werden, welche zu einer Verbindung der im p24-Ag-Assay vorhandenen primären und sekundären Antikörpern führen können, so dass auch ohne die Beteiligung von p24-Ag ein Reaktionsprodukt (Farbprodukt) nachweisbar wird. Dieser Vorgang kann zu einem falsch positiven Nachweis von p24-Ag führen [9, 55]. Durch die Anwendung eines modifizierten Verfahrens zur Bestimmung von p24-Ag (Tyramid-Signal-Amplifikation nach hitzevermittelter Immunkomplexdissoziation von p24-Ag) werden jedoch offenbar alle Antikörper gelöst, so dass es zu keiner Interferenz kommt [135, 136]. Immunkomplexe werden irreversibel zerstört und p24-Ag quantitativ freigesetzt, so dass es danach mit einem ELISA in seiner wahren Konzentration nachgewiesen werden kann [135, 136]. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens zum Nachweis des p24-Ag erfolgte jüngst durch Knuchel et al. [78, 79]. Hierbei wurde der ultrasensitive p24-Ag-Test zur Anwendung mit sogenannten „dried plasma spots“ (DPS) adaptiert. Das Plasma wird hierfür auf Filterpapiere aufgebracht und getrocknet, wodurch die Proben auch unter verschiedenen Lagerungsbedingungen sehr stabil bleiben. Der Test kann somit auch bei unzureichenden

Kühlmöglichkeiten angewendet werden, was den Einsatz in ressourcenarmen Ländern erleichtert. Die Proben können als DPS leicht gelagert und transportiert werden, was einen wichtigen Schritt zur Standardisierung darstellt. Vollständig getrocknete Blutproben stellen außerdem kein Infektionsrisiko dar. Darüber hinaus war die Korrelation von DPS p24-Ag und Plasma-p24-Ag-Konzentrationen exzellent ($p < 0,0001$) [78, 79].

4.2 Zusammenhang zwischen p24-Ag und CD4-Zellzahl

Durch die vorliegenden Daten konnte eine umgekehrt proportionale Korrelation sowohl zwischen sd p24-Ag und CD4-Zellzahl ($p = 0,0052$) als auch zwischen nsd p24-Ag und CD4-Zellzahl ($p = 0,026$) festgestellt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch andere Studien [26, 28, 83, 84, 124, 150, 163], wohingegen weitere Studien keinen Zusammenhang feststellen konnten [81, 87, 109]. Ortigao-de-Sampaio et al. [109] untersuchten Kinder, bei denen die Korrelation von p24-Ag und CD4-Zellzahl eventuell eine andere darstellt als bei Erwachsenen. Low et al. [87] bzw. Lafeuillade et al. [81] untersuchten eine kleinere Patientenzahl (33 bzw. 40). Ein Problem stellt die eingeschränkte Nachweisbarkeit von p24-Ag dar, was auch mit verfeinerten Nachweisverfahren, z.B. der vorherigen Säuredissoziation, nicht völlig gelöst wurde (s. a. Kap. 4.1). Durch die hitzevermittelte Immunkomplexdissoziation von p24-Ag scheint dieses Problem allerdings behoben [135, 136].

In der vorliegenden Studie konnte keine gerichtete (gleich- oder gegensinnige) Veränderung von p24-Ag (sd und nsd) und CD4-Zellzahl festgestellt werden. Auch bei „permanent“ sowie „nicht permanent“ niedrigem sd p24-Ag zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zur CD4-Zellzahl. Dies bestätigte sich auch an den Einzelverläufen (s. Kap. 3.13). Bei fünf der insgesamt 12 ausgewählten Patienten zeigte sich ein gegenläufiger Kurvenverlauf von sd p24-Ag und CD4-Zellzahl, also Anstieg von sd p24-Ag bei gleichzeitigem Abfall der CD4-Zellzahl und umgekehrt (Abb. 12b, 14b, 15, 17, 18). Bei den anderen sieben Patienten konnte man ein heterogenes Bild beobachten und im Verlauf keinen kontinuierlichen Zusammenhang im zeitlichen Verlauf sehen (Abb. 8b, 9b, 10b, 11b, 13b, 16, 19). Die prädiktive Aussagekraft des p24-Ag-Wertes hinsichtlich einer Veränderung der CD4-Zellzahl, wie sie von z. B. Schüpbach et al. postuliert wurde [78], konnte in diesem Kollektiv nicht festgestellt werden. Allerdings ist in der genannten Studie ein sensitiveres Nachweisverfahren für p24-Ag verwendet worden.

4.3 Zusammenhang zwischen p24-Ag und Viruslast (VL)

Vorab muss erwähnt werden, dass zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieser Studie die Bestimmung der Viruslast weniger stark verbreitet war als heute. In der vorliegenden Studie konnte eine direkt proportionale, allerdings schwach signifikante Korrelation sowohl zwischen sd p24-Ag und VL ($p < 0,00001$) als auch zwischen nsd p24-Ag und VL ($p < 0,00001$) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der Studie von Cao et al. 1995 [14]. Eine Korrelation zwischen (nsd) p24-Antigenämie und VL wurde auch von Holodniy et al. 1991 [64], Vandamme et al. 1996 [156], Bruisten et al. 1997 [10], Spijkerman et al. 1997 [144], Sitnik et al. 1998 [140] und Aschbacher et al. 1999 [5] beschrieben. Witt et al. [163] beobachteten 1999 eine schwache Korrelation zwischen der VL und sd p24-Ag. Keine Korrelation zwischen den beiden Markern stellten Coombs et al. 1989 [24], Coste et al. 1996 [25], Izopet et al. 1996 [68] und Gobbers et al. 1997 [48] fest.

In der vorliegenden Studie konnte keine zeitgleiche, gleichsinnige Änderung zwischen den beiden Parametern p24-Ag (weder nsd noch sd) und VL nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu verliefen die Änderungen von p24-Ag und VL in den Studien von Paul et al. 1995 [114], Stellbrink et al. 1996 [149] und Lathey et al. 1998 [83] gleichsinnig. Allerdings muss erwähnt werden, dass der Nachweis von p24-Ag (sd und nsd) in den genannten Studien im Vergleich zur VL-Bestimmung bei einem geringeren Teil der Patienten überhaupt gelang.

Bessere Ergebnisse konnten durch Hitzedenaturierung von p24-Immunkomplexen erzielt werden [9, 84, 150]. Bei diesem Verfahren zeigten sich in der Nachweishäufigkeit sowohl von VL als auch von p24-Ag ähnliche Ergebnisse, wobei die beiden Parameter korrelierten und auch zeitgleiche, gleichsinnige Änderungen zeigten. Schüpbach et al. konnten in ihrer Untersuchung von 2005 sogar in manchen Fällen eine Überlegenheit von p24-Ag gegenüber dem Nachweis von HIV-1 RNA zeigen. Bei einem Drittel von behandelten Patienten, die über eine mittlere Dauer von 24 Monaten HIV-1 RNA-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml, konnte p24-Ag detektiert werden [137]. Dieses überraschende Ergebnis wurde der Tatsache zugeschrieben, dass sich die größte Menge von p24-Ag im Plasma chronisch infizierter Patienten außerhalb der Viruspartikel befindet. Das Verschwinden der Viruspartikel (und somit der HIV-1 RNA) unter ART ist scheinbar nicht immer begleitet von einem kompletten

Verschwinden des extraviralen p24-Ag, was eine weitere Virusexpression bei diesen Patienten vermuten lässt.

Eine solche Konstellation findet sich im eigenen Untersuchungsgut z. B. bei dem behandelten Patienten 148 (Abb. 10 a) und dem nicht behandelten Patienten 594 (Abb. 12 a) wieder (s. 3.13.1.3 und 3.13.2.1), wobei es sich im zweiten Fall eher um ein Problem des Nachweises an der unteren Nachweisgrenze zu handeln scheint. Obwohl die Verläufe der Parameter sich im Einzelfall relativ unabhängig voneinander zu bewegen schienen (s. Abb. 8a, 13a, 14a), so ließ sich doch im Gesamtkollektiv der grundsätzliche positiv korrelierte Zusammenhang zwischen sd p24-Ag und der Viruslast nachweisen (s. 3.2).

Die starken Schwankungen bei den Virusgenomnachweisen könnten durch eine suboptimale Standardisierung bedingt sein. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Genomnachweisteknik noch nicht so standardisiert wie heutzutage. Unter Einbeziehung der modernen Ansätze zu externer und interner Qualitätskontrolle ist die Viruslastbestimmung standardisiert worden, was zu einer Verminderung der Varianz sowohl innerhalb des Labors (Intralaborvarianz) als auch zwischen verschiedenen Labors (Interlaborvarianz) geführt hat.

4.4 Zusammenhang zwischen Art der Therapie (1-, 2-, 3- oder Mehrfachtherapie) und absoluter Höhe von sd p24-Ag

In der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass der mittlere sd p24-Ag-Wert umso niedriger ist, je mehr Medikamente kombiniert wurden. So ist bei 3- und Mehrfach-Kombination der mittlere sd p24-Ag-Wert deutlich niedriger als bei Mono- und 2-fach-Therapien. In der Literatur finden sich mehrheitlich Studien zu Monotherapien, insbesondere Azidothymidin (AZT), und deren Auswirkung auf den Nachweis von nsd p24-Ag. So zeigten Fischl et al. [40] in ihrer 1987 publizierte Doppelblind-Studie, dass es bei den 36 Patienten mit detektierbarem p24-Ag zu statistisch signifikanten Abfällen der Serumlevel von p24-Ag nach Gabe von AZT kam. In der 1988 erschienenen Studie von Surbone et al. [152], konnte bei zwei Patienten mit nachweisbarem p24-Ag nach 10 Wochen Therapie mit AZT p24-Ag nicht mehr nachgewiesen werden. Chaisson et al. [20] konnten bei 31 von insgesamt 83 AZT-behandelten Patienten p24-Ag nachweisen. Das mittlere p24-Ag-Niveau bei Patienten, die behandelt wurden, fiel im

Gegensatz zu Patienten, die Placebo erhielten, signifikant ab. Die dosisabhängige Wirksamkeit von AZT wurde 1988 mit Hilfe des p24-Ag-Nachweistestes von Dournon et al. untersucht [32]. An 52 Patienten wurde gezeigt, dass bei Patienten mit mehr als 200 U p24-Ag pro Milliliter Serum die Antigenämie nicht eliminiert werden konnte, wenngleich deutlich abfallende p24-Ag-Konzentrationen beobachtet wurden. Die Verlaufsbeobachtung erstreckte sich hier allerdings auf kurze Zeiträume von ein bis zwei Monaten. Stambuk et al. [146] erzielten ähnliche Ergebnisse bei 53 von 87 Patienten mit AZT-Behandlung.

Sämtliche der oben aufgeführten Studien bezogen ausschließlich Patienten mit **AIDS oder ARC** ein.

1338 **asymptomatische Patienten** mit zwei unterschiedlichen AZT-Dosierungen wurden von Volberding et al. [158] im Rahmen einer placebokontrollierten Doppelblindstudie untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Abfall von p24-Ag nach Therapie im Vergleich mit Placebo. Auch Mulder et al. [102] zeigte 1994 bei asymptomatischer HIV-Infektion mit hohem Risiko, eine aidsdefinierende Erkrankung zu entwickeln, einen Abfall des p24-Ag nach AZT-Behandlung.

Durch Säuredissoziation des p24-Ag kann theoretisch mehr p24-Ag detektiert werden (s. Kap. 1.4.1). Kappes et al. [74] verglichen in ihrer Studie Viruslast (gemessen mit quantitativer PCR) und sd p24-Ag in Bezug auf Therapie mit AZT. Im Gegensatz zur HIV-RNA, die bei allen Proben nachweisbar war, konnte nsd p24-Ag nur bei 42% und sd p24-Ag nur bei 56% der Proben nachgewiesen werden. Nach 1 Woche Therapie mit AZT kam es zu einem Abfall beider Parameter (sd, nsd p24-Ag sowie HIV-RNA). Der Vorteil eines Monitorings mittels Messung der HIV-RNA gegenüber p24-Ag bestand jedoch darin, dass hierbei auch ein Therapiemonitoring früherer Stadien der HIV-Infektion und bei niedrigeren Leveln der Viruslast möglich war. Katlama et al. [75] verwendeten in ihrer 1996 veröffentlichten Studie als Maß für Therapieerfolg unter anderem den Abfall von sd p24-Ag. Sie verglichen in ihrer Doppelblindstudie die AZT-Monotherapie mit der Kombinationstherapie aus 3TC und AZT bei insgesamt 129 Patienten. Es zeigte sich bei der alleinigen AZT-Verabreichung ein Abfall des sd p24-Ag von 49% versus 88% Abfall bei der Kombinationstherapie. Lillo et al. [86] zeigten in ihrer Studie anhand von 104 Patienten unter antiretroviraler Therapie in unterschiedlichen Krankheitsstadien, dass sd p24-Ag ein guter virologischer Kurzzeitparameter für die antivirale

Aktivität ist. Die beste Effizienz einer antiretroviralen Therapie lag im Stadium CDC II und III vor und konnte hier gut durch Untersuchung von sd p24-Ag beobachtet werden.

Betrachtet man die in der vorliegenden Studie dokumentierten Einzelverläufe (s. Kap. 3.13), so kann man feststellen, dass die Monotherapie im Verlauf keinen unmittelbaren Einfluss auf sd p24-Ag zu haben scheint (Abb. 8a+b, 9a+b, 11a+b, 18). Im Gegenteil illustrieren drei der Fälle in der vorliegenden Arbeit (Patient 003, 298 und 058) ansteigende Verläufe von p24-Ag unter der Behandlung (Abb. 8a, 9a, 18), nur kurzfristig kommt es initial zum Abfall von p24Ag bei Patient 058 (2. Behandlungsphase; s. Abb. 18). Kombinationen von 2 Medikamenten zeigten im Gegensatz hierzu einen Abfall von sd p24-Ag, welcher auch längerfristig von niedrigen p24-Ag-Messwerten gefolgt wurde (Patient 003, Abb. 8a; Patient 148, Abb. 10a). Ein Patient (Patient 148) wurde mit einer 3fach-Kombination behandelt, die jedoch im Vergleich zu der vorher gegebenen 2fach-Kombination keinen weiteren Abfall des sd p24-Ag-Wertes zur Folge hatte (Abb. 10a+b). Die Auswertung des Gesamtkollektivs dieser Studie zeigt zwar quantitativ einen niedrigeren Mittelwert von sd p24-Ag je mehr Medikamente kombiniert werden (s. 3.9), jedoch kann der Verlauf im Einzelfall von dieser Beobachtung abweichen. Dies könnte auch mit einer unterschiedlichen Resistenzlage der Patienten zusammenhängen oder einer anderen individuellen Ansprechbarkeit auf das zusätzlich gegebene Medikament bzw. einer mangelnden Compliance des Patienten.

Eine bereits erwähnte neuere Methode, die mittels Hitzedenaturierung Antigen-Antikörper-Komplexe löst, scheint für ein Therapiemonitoring deutlich besser geeignet zu sein [135]. Diese Methode scheint eine Detektionslücke zu füllen und kann p24-Ag auch in niedrigeren Konzentrationen (0,2 pg/ml) nachweisen. So konnten Böni et al. [9] 1997 zeigen, dass mittels Hitzedenaturierung bei allen 23 untersuchten Patienten p24-Ag nachweisbar war und die Methode zum Therapiemonitoring genauso geeignet war wie die HIV-RNA-Bestimmung mittels PCR. Ähnliche Ergebnisse konnten Schüpbach et al. [134] 2001 vorlegen. Sie untersuchten prospektiv 34 Patienten, die in zwei Therapiestudien einbezogen waren und bei denen Viruslast (Roche HIV-1 Monitor[®]) sowie p24-Ag gemessen wurden, um die Veränderung dieser Marker bei antiretroviraler Therapie zu beobachten. P24-Ag konnte bei 75,8% von 178 Proben, HIV-RNA bei 73,9% von 138 Proben detektiert werden.

4.5 Zusammenhang zwischen der ersten auftretenden aidsdefinierenden Erkrankung bei einem Patienten und fallenden oder steigenden sd p24-Ag-Werten

Als einschneidendes klinisches Ereignis wurden in der vorliegenden Studie nur die aidsdefinierenden Erkrankungen betrachtet. Es wurde beurteilt, ob es vor oder nach einer aidsdefinierenden Erkrankung zu einem Abfall oder Anstieg von sd p24-Ag kommt. Aus statistischen Gründen konnte nur die erstmalig aufgetretene aidsdefinierende Erkrankung ausgewertet werden, um die Daten in der sehr heterogenen Population vergleichen zu können. Aus den vorliegenden Daten war nur in 44% bzw. nur in 47% der Fälle vor bzw. nach dem erstmaligen Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung ein Anstieg von p24-Ag zu verzeichnen. In beiden Fällen unterschieden sich die mittleren sd p24-Ag-Werte des jeweils ersten und zweiten Messpunktes nicht statistisch signifikant voneinander (Wilcoxon-Test, $p > 0,05$). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den Einzelverläufen ausgewählter Patienten wider (s. Kap. 3.13). Lediglich bei einem Patienten zeigte sich ein deutlicher Anstieg des sd p24-Ag vor dem erstmaligen Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung (Abb. 18). Geringere Wertanstiege waren zwar auch bei anderen Patienten zu verzeichnen, jedoch zeigten diese bei Betrachtung des Messwertverlaufs über längere Zeiträume keinen hinweisenden Charakter (s. 3.12). Ähnliche Werteveränderungen wurden auch ohne Zusammenhang zum erstmaligen Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung verzeichnet (z. B. Abb. 8, 9, 10, 11, 16, 17), bzw. ein Abfall des p24-Ag trat ebenso auf (z. B. Abb. 12). Bei den anderen fünf Patienten konnte kein Zusammenhang der Werte und dem Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung gesehen werden (Abb. 8a+b, 11a+b, 12a+b, 16, 17). 1994 stellten Molina et al. [99] bei 18 Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion fest, dass sd p24-Ag nicht als prognostischer Marker hinsichtlich des Neuauftretens einer aidsdefinierenden Erkrankung gelten konnte. Auch Merigan et al. [93] zeigten in ihrer 1996 veröffentlichten Studie bei 352 AZT-behandelten, asymptomatischen Patienten, dass ein sd p24-Ag-Wert von ≥ 30 pg/ml kein prognostischer Faktor für eine Krankheitsprogression war. Im Gegensatz dazu waren eine HIV-RNA-Konzentration von $\geq 20\,000$ Kopien/ml, weniger als 350 CD4-Zellen/ μ l und Mutationen am Codon 215 der HIV Reverse Transkriptase als prognostische Faktoren zu bewerten. Anhand von 391 Patienten zeigten Lathey et al. 1998 [83], dass sd p24-Ag mit dem Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung, Tod oder CD4-Zellverlust von über 50% assoziiert war, jedoch war auch in dieser

Studie die Messung der Viruslast der sd p24-Ag-Bestimmung überlegen. Sabin et al. [128] stellten fest, dass p24-Antigenaemie (qualitative Bestimmung) mit schnellerer Krankheitsprogression zu AIDS assoziiert war, CD4-Zellzahlen und HIV-RNA-Niveau waren jedoch auch hier die überlegenen Parameter.

Durch Anwendung von Hitzedenaturierung bei p24-Ag konnten Ledergerber et al. 2000 [84] eine hochsignifikante Korrelation zwischen Ausgangswerten des HIV-1-RNA-Niveaus und klinischer Progression nachweisen, jedoch nur eine schwache Korrelation zwischen p24-Ag und klinischer Progression. In einer Studie von Sterling et al. 2002 [150] konnte wiederum gezeigt werden, dass sowohl die CD4-Zellzahl, die HIV-RNA-Konzentration als auch die Höhe des hitzedenaturierten p24-Ag hoch prädiktiv waren für spätere Krankheitsprogression. Die Kombination aus HIV-RNA-Konzentration und CD4-Zellzahl war der stärkste Prädiktor für Krankheitsprogression, jedoch war auch die Kombination aus p24-Ag und CD4-Zellzahl ein starker Prädiktor für spätere Krankheitsprogression.

4.6 Aussagekraft der sd p24-Ag-Werte vor dem Tod eines Patienten

1989 stellten Stambuk et al. [146] fest, dass die Mortalität bei AZT-behandelten Patienten sinkt, bei denen nsd p24-Ag nach Therapie unter der Nachweisgrenze liegt oder um mehr als 50% des Ausgangswertes sinkt. Mulder et al. [103] fanden 1990 dagegen in ihrer Studie heraus, dass die An- oder Abwesenheit von nsd p24-Ag zum Zeitpunkt der Diagnose AIDS kein Prädiktor für die Überlebenszeit war. Änderungen von nsd p24-Ag innerhalb der ersten 8-16 Wochen nach antiretroviraler Therapie mit AZT waren bei 264 AIDS-Patienten nicht mit einer reduzierten Mortalität assoziiert (deGruttola et al. 1994) [29]. An 111 männlichen Hämophiliepatienten, die seit weniger als 20 Jahren HIV-infiziert waren, konnten Sabin et al. [128] nach Einbeziehung von CD4-Zellzahlen ebenso keine signifikante Beziehung zwischen p24-Antigenaemie und Tod feststellen. Guay et al. [54] wiederum zeigten, dass bei HIV-infizierten Kindern die Anwesenheit von p24-Ag innerhalb der ersten zwei Lebensjahre assoziiert war mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum Alter von 80 Monaten (20%) als bei Kindern ohne Antigenaemie (43%). Rubio Caballero et al. [127] beobachteten über vier Jahre 251 HIV-infizierte Patienten, von denen die meisten unter antiretroviraler Therapie standen. 55 Patienten

verstarben im Beobachtungszeitraum. Das Risiko einer AIDS-Progression bzw. eines Todeseintritts war 4,8-fach höher bei Patienten mit Ausgangs-p24-Ag-Werten ≥ 40 pg/ml als bei Werten < 20 pg/ml und 7,7-fach höher als bei Werten zwischen 20 und 39 pg/ml; das relative Risiko bei Patienten mit Werten zwischen 20 und 39 pg/ml war 2,5-fach höher als bei denen mit < 20 pg/ml. Die meisten aufgeführten Studien untersuchten dabei nur den Ausgangs-p24-Ag-Wert.

Bulterys et al. [11] zeigten 1995 in ihrer Studie an 36 HIV-infizierten Kindern, dass die mittlere Überlebenszeit für Kinder mit hoher (50 pg/ml) sd p24-Ag-Konzentration (7 Monate) deutlich geringer war als für Kinder mit Konzentrationen zwischen 10 und 50 pg/ml (20 Monate - Werte gemessen im Alter von sechs Wochen und drei Monaten). Dagegen konnten Mofenson et al. [98] 1999 keine Assoziation zwischen sd p24-Ag und Mortalität feststellen, wohl aber eine Beziehung zu anderen Parametern wie p24-Antikörper, HIV-RNA und CD4-Zellzahl. Die Prädiktion der Mortalität bei Kindern durch eine Kombination aus nachweisbarem sd p24-Ag und niedrigen p24-Antikörpern war bei Read et al. [120] sensitiver, aber weniger spezifisch als durch eine Kombination von hoher HIV-RNA und niedrigen CD4-Zellzahlen.

In der hier vorliegenden Studie sollte ein möglicher prädiktiver Wert von sd p24-Ag hinsichtlich des Todeseintritts untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass je zeitlich näher zum Tod des Patienten die Messung erfolgt war, desto höher waren die Werte von sd p24-Ag im Mittel. Diese Tendenz war jedoch nicht statistisch signifikant (s. Tab. 5). Die ausgewählten Einzelverläufe (s. Kap. 3.13) zeigen die in Bezug auf den Todeseintritt völlig unterschiedlichen Verläufe der sd 24-Ag-Werte. Bei zwei Patienten konnte man kontinuierlich hohe Werte vor dem Tod messen (Abb.17+18), bei einem anderen waren die Werte kontinuierlich niedrig (Abb. 19), und bei dem vierten Patienten kam es zu einem Abfall der sd p24-Ag-Werte vor dem Tod (Abb. 16). Auch hier muss hervorgehoben werden, dass Einzelverläufe sich von der zusammenfassenden Auswertung des Gesamtkollektivs deutlich unterscheiden können.

Auch hier ist das verwendete Nachweisverfahren wiederum von erheblicher Relevanz: Der prädiktive Wert des p24-Ag für die Überlebenszeit war bei Nachweis durch Tyramid-Signal-Amplifikation nach hitzevermittelter Immunkomplexdissoziation dem Nachweis der HIV-RNA überlegen (Ledergerber et al. 2000) [84].

4.7 Kosten und Nutzen der verschiedenen Methoden zum Monitoring

Zur Viruslastbestimmung haben sich in vielen Ländern folgende Testverfahren bewährt: RT-PCR (Roche Amplicor[®] HIV Monitor RT-PCR-Test und COBAS[®] TaqMan[®], Roche Diagnostic Systems; Abbott Real-Time HIV), b-DNA (Bayer Versant[®] bDNA 3.0 HIV-RNA-Test, Bayer Diagnostics) und NASBA (NucliSens EasyQ[®] HIV-1, BioMerieux)(s. Kap. 1.4.2). Solche Tests sind teuer, brauchen spezielle technische Ausstattungen und Geräte sowie erfahrene Diagnostiker, die insbesondere in Entwicklungsländern schwer verfügbar sind. Hinzu kommen häufig ganz spezielle Schwierigkeiten im Hinblick auf technische Unterstützung und Qualitätssicherung, z. B. lange Anfahrtswege durch unsichere Konfliktregionen. Für den Einsatz in Entwicklungsländern werden die virologischen Tests meist über Hilfsorganisationen oder Fonds eingekauft, Preise sind wie überall abhängig von der Abnahmemenge und speziellen Vereinbarungen. Die Kosten der einzelnen Tests belaufen sich von 20-50 US-Dollar mit „Roche COBAS[®] Amplicor HIV-1 Monitor 1.5“, ca. 80 US-Dollar mit „BioMerieux NucliSens EasyQ[®] HIV-1“ auf bis zu 85-90 US-Dollar mit „Bayer Versant[®] bDNA“. Ein Test mit Perkin Elmer Ultrasensitive HIV-1 p24-Ag kostet ca. 10 US-Dollar [151].

Die hier vorgelegten Untersuchungen bestätigen, dass der Nutzen eines Nachweises von p24-Ag zum Infektions- und Therapiemonitoring stark von der Wahl des Nachweisverfahrens abhängt. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf Techniken zur Auflösung von möglicherweise vorhandenen Immunkomplexen, welche das p24-Ag dem Nachweis entziehen sowie auf der Vermeidung von falsch positiven Reaktionen durch z. B. körpereigene Immunglobuline. Gerade bei der Diagnostik von HIV-Infektionen bei Säuglingen und Kindern unter 18 Monaten hat dieser ELISA-basierte Nachweis des Viruskapsidproteins p24 eine besondere Berechtigung, da ein rein serologischer Antikörpernachweis nicht zwischen eigenen und von der Mutter übertragenen Antikörpern unterscheidet. Gerade in Entwicklungsländern mit hoher Durchseuchung und hoher Geburtenrate kann nicht flächendeckend auf die technisch anspruchsvollen Verfahren zur Bestimmung von z. B. HIV-RNA zurückgegriffen werden. Obwohl die Viruslastbestimmung und CD4-Zellzahl in den industrialisierten Ländern inzwischen als Standardverfahren zum Monitoring der HIV-Infektion benutzt werden, konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass p24-Ag bei den in jüngster Zeit verbesserten Detektionsmethoden gut mit der Viruslast korreliert [78]. Dieses vergleichsweise kostengünstige, einfach anzuwendende Nachweisverfahren ist

offenbar gut zur Diagnostik und zum Therapiemonitoring geeignet. Dies erscheint gerade im Hinblick auf ein hohes Probenaufkommen bei gleichzeitig knappen finanziellen Ressourcen in den stark von der HIV-Infektion betroffenen Entwicklungsländern wünschenswert.

Obwohl die Viruslastbestimmung die genauere Untersuchung als die p24-Ag-Diagnostik ist, kann man mit der Bestimmung von p24-Ag die Effektivität der medizinischen Therapie im Verlauf beobachten. Mit Hilfe des p24-Antigen-Nachweises steht ein preiswertes Verfahren zur Verfügung, dessen Kosten zur Untersuchung einer Probe sich auf etwa 10 US-Dollar belaufen. Da durch Preissenkungen bei wichtigen Medikamenten durch die pharmazeutische Industrie (um bis zu 90%) und durch preiswerte Nachahmerprodukte (Generika) immer mehr Menschen, die mit HIV leben, behandelt werden können, ist mittlerweile das Therapiemonitoring in Entwicklungsländern durch HIV-Viruslastbestimmung unter qualitätskontrollierten Bedingungen wegen der hohen Kosten für Test-Beschaffung und -Durchführung zu einem einschränkenden Faktor geworden. Therapiemonitoring ist jedoch unabdingbar zur Erkennung von Resistenzentwicklung nach antiretroviraler Therapie. Ein preiswerter, modifizierter, sensitiver und standardisierter p24-Ag-Test wäre eine wichtige Alternative zu den teuren Virusgenomnachweistests. Weiterführende Studien dazu sind notwendig. Jüngste Forschungen, die sich speziell der Weiterentwicklung des p24-Ag-Nachweises widmen, argumentieren speziell mit der Anwendbarkeit in sog. Low-Ressource-Settings [78, 79].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit sind nach Schätzungen von UNAIDS/WHO ca. 33,2 Mio. Menschen mit HIV infiziert, wovon mehr als 95% in den Entwicklungsländern leben. Da eine antiretrovirale Therapie in diesen Ländern zunehmend verfügbar wird, wäre zur Verlaufsbeobachtung der HIV-Infektion ein preisgünstiger und technisch einfach anwendbarer Parameter wie z. B. das p24-Ag von Nutzen.

In dieser retrospektiven Studie wurden Daten von insgesamt 743 Patienten erfasst, die sich von 1990-1998 in medizinischer Betreuung in der HIV-Tagesklinik des Universitätsklinikums Rudolf-Virchow (jetzt: Charité, Campus Virchow) befanden. Die Laboruntersuchungen erfolgten dort sowie im Robert-Koch-Institut. Die Patienten befanden sich in klinisch unterschiedlichen Stadien, wurden je nach Notwendigkeit und nach den jeweils aktuellen wissenschaftlichen Kenntnissen individuell medikamentös behandelt. Es wurden die Messwerte von p24-Ag (säuredissoziiert (sd) und nicht säuredissoziiert (nsd)), CD4-Zellzahlen und die Viruslast (NASBA-Verfahren) erfasst und auf Korrelationen zwischen den Parametern überprüft. Besonderes Augenmerk wurde auf Veränderungen des sd p24-Ag im Zusammenhang mit dem erstmaligen Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung und mit dem Eintritt des Todes gerichtet, was anhand unterschiedlicher Einzelverläufe illustriert wurde. Bedingt durch das sehr heterogene Datenmaterial konnten die einzelnen Fragestellungen jeweils nur auf unterschiedlich große Subpopulationen bezogen werden.

In Übereinstimmung mit anderen Studien zeigte sich, dass p24-Ag bei einer größeren Anzahl von Patienten nachgewiesen wurde, wenn die Bestimmung mit Säuredissoziation erfolgte. So konnte bei 60,3% aller Patienten sd p24-Ag zum Zeitpunkt der Erstmessung nachgewiesen werden, wohingegen nsd p24-Ag nur bei 43,6% der Patienten nachweisbar war.

Es konnte eine negative Korrelation zwischen p24-Ag (sd und nsd) und CD4-Zellzahl festgestellt werden, allerdings ließ sich im zeitlichen Verlauf kein gerichteter, d. h. grundsätzlich gleich- oder gegensinniger Zusammenhang zwischen den Veränderungen der beiden Parameter nachweisen. Die Einzelverläufe bekräftigten dies, so dass die p24-Ag- und CD4-Werte unabhängig voneinander zu verlaufen scheinen.

Ähnlich verhielt es sich beim Vergleich von p24-Ag und Viruslast. Zwar korrelierte der Verlauf von p24-Ag (sd und nsd) positiv mit dem der Viruslast, jedoch fanden sich auch hier im zeitlichen Verlauf keine gerichteten Veränderungen der beiden Parameter.

In Bezug auf die Therapieart zeigten sich signifikante Unterschiede nach Mono-, 2-, 3-fach- und Polytherapien. So lag der Mittelwert von sd p24-Ag bei Patienten mit Polytherapie am niedrigsten und bei Patienten mit Monotherapie am höchsten.

Das (erstmalige) Auftreten einer aidsdefinierenden Erkrankung für den einzelnen Patienten konnte anhand der Messwerte von sd p24-Ag nicht vorhergesagt werden. Weder vor noch nach einer aidsdefinierenden Erkrankung zeigte die Entwicklung des sd p24-Ag-Wertes eine bestimmte Richtung.

Im Zeitverlauf von 12, 9, 6 bis 3 Monate vor dem Tod zeigten sich tendenziell ansteigende sd p24-Ag-Mittelwerte, was jedoch ohne statistische Signifikanz war.

Die Varianz der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit ist in erster Linie bedingt durch die Heterogenität des Patientenkollektivs und die zum Zeitpunkt der Untersuchung zur Verfügung stehenden technischen Voraussetzungen für die angewendeten Testsysteme. Die vorliegenden Ergebnisse können als Grundlage für zukünftige Untersuchungen unter Verwendung moderner, ultrasensitiver p24-Ag-Nachweistestsysteme dienen, wie sie kürzlich von der Arbeitsgruppe von Knuchel et al 2006/2007 für „dried plasma spots“ beschrieben wurden [78, 79]. Vor allem in Entwicklungsländern mit hoher HIV-Durchseuchung, in denen mittlerweile eine antiretrovirale Therapie zur Verfügung steht, ist eine alternative Methode zum Therapiemonitoring auf der Basis des p24-Ag-Nachweises notwendig, um nicht ausschließlich von den teuren und apparativ intensiven Virusgenomnachweistests abhängig zu sein.

6. LITERATUR

1. Ainsworth M, Batson A, Lamb G, Rosenhouse S. Accelerating an AIDS Vaccine for developing countries: Recommendations for the World Bank, Vol. 1 of 1. 2000.
2. Allain JP, Paul DA, Laurian I, Senn D. Serological markers in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. *Lancet* 1986; ii:1233-1236
3. Allain JP, Laurian Y, Paul DA, et al. Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. *N Engl J Med* 1987; 317:1114-1121
4. Allan JS, Coligan JE, Barin F, et al. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 1985; 228:1091-1094
5. Aschbacher R, Monari P, Lolli S, et al. Evaluation of three different commercial procedures for quantifying human immunodeficiency virus type-1 RNA levels. *New Microbiol* 1999; 22:1-9
6. Baillou A, Barin F, Allain JP, Petat E, Kocheleff P, Kadende P, Goudeau A. Human immunodeficiency virus antigenemia in patients with AIDS and AIDS-related disorders. A comparison between european and central african populations. *J Infect Dis* 1987; 156:830-833
7. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-870
8. Bollinger RC Jr, Kline RL, Francis HL, Moss MW, Bartlett JG, Quinn TC. Acid dissociation increases the sensitivity of p24 antigen detection for the evaluation of antiviral therapy and disease progression in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 1992; 165:913-916
9. Böni J, Opravil M, Tomasik Z, et al. Simple monitoring of antiretroviral Therapy with a signal-amplification-boosted HIV-1 p24 antigen assay with heat-denatured plasma. *AIDS* 1997; 11: F47-F52
10. Bruisten SM, Frissen PH, Van Swieten P, et al. Prospective longitudinal analysis of viral load and surrogate markers in relation to clinical progression in HIV type 1-infected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:327-335
11. Bulterys M, Farzadegan H, Chao A, et al. Diagnostic utility of immune-complex-dissociated p24 antigen detection in perinatally acquired HIV-1 infection in Rwanda. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10:186-91
12. Burger H, Paul D, Siegal FP, et al. Comparison of antigen immunoassay and reverse transcriptase assay for monitoring human immunodeficiency virus infection in an antiviral trial. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1890-1892
13. Cao YZ, Valentine F, Hojvat S, et al. Detection of HIV antigen and specific antibodies to HIV core and envelope proteins in sera of patients with HIV-infection. *Blood* 1987; 70:575-578
14. Cao Y, Ho DD, Todd J, Kokka R, et al. Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:353-361
15. CDC. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. Reported by Gottlieb MS. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1981; 30:250-252
16. CDC. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. Reported by Friedman-Kein A. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1981; 30:305-308
17. CDC. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1982; 31:507-514

18. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1992; 41:1-19
19. Chaisson MA, Berenson L, Schwartz T, et al. Accelerating decline in New York City AIDS Mortality. 5th Conf. on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, IL, 1998; oral presentation, session 6, abstract 9B
20. Chaisson RE, Leuther MD, Allain JP, et al. Effect of zidovudine on serum human immunodeficiency virus core antigen levels. Results from a placebo-controlled trial. *Arch Intern Med* 1988; 148:2151-2153
21. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:954-960
22. Clavel F, Mansinho K, Chamaret S, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233:343-346
23. Coffin JM. Retroviridae and their replication. 2nd ed. *Virology*, ed. D.M.K. B.N. Fields. Raven Press, Ltd., New York 1990:1437-1500
24. Coombs RW, Collier AC, Allain JP, et al. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989; 321:1626-1631
25. Coste J, Montes B, Reynes J, Peeters M, Segarra C, Vendrell JP, Delaporte E, Segondy M. Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Med Virol* 1996; 50:293-302
26. Cotte L, Escaich S, Ritter J, Martin JL, Trepo C. Prognostic value of kinetic parameters of HIV isolation from peripheral blood mononuclear cells. *Res Virol* 1992; 143:329-335
27. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:961-964
28. de Mendoza C, Lu W, Machuca A, Sainz M, Castilla J, Soriano V. Monitoring the response to antiretroviral therapy in HIV-1 group O infected patients using two new RT-PCR assays. *J Med Virol* 2001; 64:217-222
29. DeGruttola V, Beckett LA, Coombs RW, et al. Serum p24 antigen level as an intermediate end point in clinical trials of zidovudine in people infected with human immunodeficiency virus type 1. *Aids Clinical Trials Group Virology Laboratories. J Infect Dis* 1994; 169:713-21
30. Delta Coordinating Committee. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *Lancet* 1996; 348:283-91
31. DIFÄM, Studienheft Nr. 4, 2004
32. Dournon E, Matheron S, Rozenbaum W, et al. Effects of zidovudine in 365 consecutive patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1988; 2:1297-1302
33. Elbe S. Aid gegen AIDS - Die Auswirkungen von HIV/AIDS müssen in die Entwicklungspolitik einbezogen werden. *Internationale Politik* 11-12/2004
34. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993 Mar 25;362(6418):359-62
35. Feinberg MG et al. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation. *Cell* 1986; 46:807-817

36. Feorino P, Forrester B, Schable C, Warfield D, Schoecketman G. Comparison of antigen assay and reverse transcriptase assay for detecting human immunodeficiency virus in culture. *J Clin Microbiol* 1987; 12:2344-2346
37. Finizi D, Siliciano RF. Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* 1998; 93:665-671
38. Firmeninformation zu COULTER-HIV-1-p24-Antigen-Assay, Firma Beckman Coulter, Europark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld
39. Firmeninformation zur Nukleinsäure-Amplifikation, Firma bioMérieux Deutschland GmbH, Weberstrasse 8 - D 72622 Nürtingen
40. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1987; 317:185-191
41. Frankel SS, Wenig BM, Burke AP, et al. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996; 272:115-117
42. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224:500-503
43. Gallo RC und Montagnier L. AIDS im Jahre 1988. *Spektrum der Wissenschaft* 1988; 12/88:48-56
44. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, et al. Fine structure of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987; 156:171-176
45. Gelderblom HR, Ozel M, Pauli G. Morphogenesis and fine structure of lentiviruses. *Animal models in AIDS*, ed. H.S.a. M.C. Hoerzinek 1990, Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publisher: 1-26
46. Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991; 5:617-638
47. Ghani AC, de Wolf F, Ferguson NM, et al. Surrogate markers for disease progression in treated HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28:226-231
48. Gobbers E, Fransen K, Oosterlaken T, et al. Reactivity and amplification efficiency of the NASBA HIV-1 RNA amplification system with regard to different HIV-1 subtypes. *J Virol Methods* 1997; 66:293-301
49. Goudsmit J, Lange JMA, Paul DA, Dawson GJ. Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex and subclinical human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1987; 1:558-560
50. Goudsmit J, Paul DA. Circulation of HIV antigen in blood according to stage of infection, risk group, age and geographic origin. *Epidem Inf* 1987; 99:701-710
51. Graham BS. Infection with HIV-1. *BMJ* 1998; 317:1297-1301
52. Graziosi C, Gantt KR, Vaccarezza M, et al. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-infection. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1993; 90:6405-6409
53. Grob PJ, Joller-Jemelka H, Luthy R, et al. HIV-Serologische Parameter zur Prognose und Verlaufsbeurteilung einer HIV-Infektion. *Schweiz Med Wschr* 1988; 118:58-64
54. Guay LA, Hom DL, Kabenger SR, et al. HIV-1 ICD p24 antigen detection in ugandan infants: use in early diagnosis of infection and as a marker of disease progression. *J Med Virol* 2000; 62:426-434
55. Gutierrez M, Vallejo A, Soriano V. Enhancement of HIV antigen detection after acid dissociation of immune complexes is associated with loss of specificity. *Vox Sang* 1995; 68:132-3

56. Hammer S, Crumpacker C, D'Aquila R, Jackson B, Lathey J, Livnat D, Reichelderfer P. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2557-2564
57. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* 1996; 335:1081-90
58. Hartmann M, Kühn J, Näher H, Doerr HW, Braun R. Bewertung des p24-Antigennachweises in der Laboratoriumsdiagnostik der HIV-Infektion. *AIFO* 1987; 2:447-451
59. Hehlmann R, Fischer A, Matuschke A et al. Development of HIV markers during the later stages of HIV-infection. *AIFO* 1987; 2:441-447
60. Henrard DR, Wu S, Phillips J, Wiesner D, Phair J. Detection of p24 antigen with and without immune complex dissociation for longitudinal monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol* 1995; 33:72-75
61. Ho DD. Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. *Science* 1998; 280:1866-1867
62. Hodara V, Monticelli A, Pampuro S, Salomon H, Jauregui Rueda H, Libonatti O. HIV-1 viral load: comparative evaluation of three commercially available assays in Argentina. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1998; 48:107-13
63. Hoffmann C, Kamps BS. Wann mit HAART beginnen in: HIV.NET 2004. Steinhäuser Verlag. 2. Auflage 2004; 174-187
64. Holodniy M, Katzenstein DA, Sengupta S, et al. Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991; 163:862-6
65. Hoover DR, Graham NM, Chen B, Taylor JM, Phair J, Zhou SY, Munoz A. Effect of CD4+ cell count measurement variability on staging HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:794-802
66. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, et al. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med* 1997;126:929-38
67. Husson RN, Comeau AM, Hoff R. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants and children. *Pediatrics* 1990; 86:1-10
68. Izopet J, Poggi C, Dussaix E, et al. Assessment of a standardized reverse-transcriptase PCR assay for quantifying HIV-1 RNA in plasma and serum. *J Virol Methods* 1996; 60:119-129
69. Jackson, GG, Paul DA, Falk LA, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) antigenemia (p24) in the acquired immunodeficiency syndrome and effect of treatment with zidovudine (AZT). *Ann Intern Med* 1988; 108:175-180
70. Jarvis JN, Taylor H, Iobidze M, Dejonge J, Chang S, Cohen F. Rheumatoid factor expression and complement activation in children congenitally infected with human immunodeficiency virus. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 67:50-54
71. Joag SV, Adany I, Li Z, et al. Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS. *J Virol* 1997; 71:4016-4023.
72. Johnson VA, Barlow MA, Merrill DP, Chou TC, Hirsch MS. Three-drug synergistic inhibition of HIV-1 replication in vitro by zidovudine, recombinant soluble CD4, and recombinant interferon-alpha A. *J Infect Dis* 1990; 161:1059-1067

73. Joller-Jemelka H, Grob PJ. HIV-Serologie in der Frühphase einer HIV-Infektion. *Schweiz Med Wschr* 1987; 117:1283-1288
74. Kappes JC, Saag MS, Shaw GM, Hahn BH, Chopra P, Chen S, Emini EA, McFarland R, Yang LC, Piatak M Jr, et al. Assessment of antiretroviral therapy by plasma viral load testing: standard and ICD HIV-1 p24 antigen and viral RNA (QC-PCR) assays compared. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10:139-149
75. Katlama C, Ingrand D, Loveday C, et al. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in antiretroviral-naive patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA* 1996; 276:118-125
76. Kessler HA, Blaauw B, Spear J, Paul DA, Falk LA, Landay A. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. *JAMA* 1987; 258:1196-1199
77. Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* 1989; 63:3708-3713
78. Knuchel MC, Tomasik Z, Speck RF, Lüthy R, Schüpbach J. Ultrasensitive quantitative HIV-1 p24 antigen assay adapted to dried plasma spots to improve treatment monitoring in low-resource settings. *J Clin Virol* 2006; 36 (1); 64-67
79. Knuchel MC, Julli B, Shah C, et al. Adaptation of the Ultrasensitive HIV_1 p24 Antigen Assay to Dried Blood Spot Testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 00; 1-7
80. Krivine A, Yakudima A, LeMay M, PenaCruz V, Huang AS, McIntosh K. A comparative study of virusisolation, polymerase chain reaction, and antigen detection in children of mothers infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1990; 116:372-376
81. Lafeuillade A, Tamalet C, Pellegrino P, de Micco P, Vignoli C, Quilichini R. Correlation between surrogate markers, viral load, and disease progression in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7:1028-1033
82. Lange JM, Paul DA, Huisman HG, et al. Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *BMJ* 1986; 293:1259-1462
83. Lathey JL, Hughes MD, Fiscus SA, et al. Variability and prognostic values of virologic and CD4 cell measures in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with 200-500 CD4 cells/mm (3) (ACTG 175). AIDS Clinical Trials Group Protocol 175 Team. *J Infect Dis* 1998; 177:617-624
84. Ledergerber B, Flepp M, Böni J, Tomasik Z, Cone RW, Lüthy R, Schüpbach J. Human immunodeficiency virus type 1 p24 concentration measured by boosted ELISA of heat-denatured plasma correlates with decline in CD4 cells, progression to AIDS, and survival: comparison with viral RNA measurement. *J Infect Dis* 2000; 181:1280-1288
85. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Micobiol Rev* 1993; 57: 183-289
86. Lillo FB, Maillard M, Saracco A, Varnier OE. Monitoring antiretroviral activity using ICD p24 and CD4 counts in HIV infection. *J Infect* 1997; 35:67-71
87. Low P, Weber C, Harrer E, Rohwer P, Kalden JR, Harrer T. CD80 expression on monocytes in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 15:264-268
88. Ludewig B. Mature Langerhanszellen. Dissertation, FU Berlin 1995. Journal Nr. 1881
89. Luzuriaga K and Sullivan JL. Transmission of the human immunodeficiency virus from mother to the fetus and infant in AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and prevention. V.T. de Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg, Editors. Lippincott-Raven: Philadelphia, USA 1997: 167-173

90. Lyles RH, Munoz A, Yamashita TE, et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 2000; 181:872-80
91. Masur H, Michelis MA, Wormser GP, et al. An outbreak of community-acquired pneumocystis carinii pneumonia. Initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981; 305:1431-1438
92. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 126:946-954
93. Merigan TC, Hirsch RL, Fisher AC, Meyerson LA, Goldstein G, Winters MA. The prognostic significance of serum viral load, codon 215 reverse transcriptase mutation and CD4+ T cells on progression of HIV disease in a double-blind study of thymopentin. *AIDS* 1996; 10:159-165
94. Merigan TC, Skowron G, Bozzette SA, et al. and the ddC Study Group of the AIDS Clinical Trials Group. Circulating p24 antigen levels and responses to dideoxycytidine in human immunodeficiency virus (HIV) infections. *Ann Intern Med* 1989; 110: 189-194
95. Miles SA, Balden E, Magpantay L, et al. Rapid serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. *N Engl J Med* 1993; 328:297-302
96. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* 1994; 179:101-113
97. Modrow S, Falke D, Truyen U. Viren mit Einzelstrang-RNA und Doppelstrang-DNA-Zwischenprodukt in: „Molekulare Virologie“. Spektrum Akademischer Verlag. 2. Auflage. 2003; 414-425
98. Mofenson LM, Harris DR, Rich K, et al. Serum HIV-1 p24 antibody, HIV-1 RNA copy number and CD4 lymphocyte percentage are independently associated with risk of mortality in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *AIDS* 1999; 13:31-39
99. Molina JM, Ferchal F, Chevret S, Barateau V, Poirot C, Morinet F, Modai J. Quantification of HIV-1 virus load under zidovudine therapy in patients with symptomatic HIV infection: relation to disease progression. *AIDS* 1994; 8:27-33
100. Montagnier L, Chermann JC, Barré-Sinoussi F et al. A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. Report from Cold Spring Harbor Meeting 1983; 363-376
101. Morand-Joubert L, Costagliola D, Bludau H, Petit JC, Lefrere JJ. Predicting progression of HIV disease: usefulness of acid-dissociated p24 antigen. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7:676-680
102. Mulder JW, Cooper DA, Mathiesen L, et al. Zidovudine twice daily in asymptomatic subjects with HIV infection and a high risk of progression to AIDS: a randomized, double-blind placebo-controlled study. The European-Australian Collaborative Group (Study 017) *AIDS* 1994; 8:313-321
103. Mulder JW, Krijnen P, Goudsmit J, Schattenkerk JK, Reiss P, Lange JM. HIV-1 P24 antigenaemia does not predict time of survival in AIDS patients. *Genitourin Med* 1990; 66:138-141
104. Murphy DG, Cote L, Fauvel M, Rene P, Vincelette J. Multicenter comparison of Roche COBAS AMPLICOR MONITOR version 1.5, Organon Teknika NucliSens QT with Extractor, and Bayer Quantiplex version 3.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4034-4041
105. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989; 70 (Pt 7): 183-289
106. Nebe CT. Durchflußzytometrische Messtechnik und Datenauswertung. *Infusionsther Transfusionsmed* 1996; 23:111-113

107. Nesheim S, Lee F, Kalish ML, et al. Diagnosis of perinatal human immunodeficiency virus infection by polymerase chain reaction and p24 antigen detection after immune complex dissociation in an urban community hospital. *J Infect Dis* 1997; 175:1333-1336
108. Nishanian P, Huskins KR, Stehn S, Detels R, Fahey JL. A simple method for improved assay demonstrates that HIV p24 antigen is present as immune complexes in most sera from HIV-infected individuals. *J Infect Dis* 1990; 162:21-28
109. Ortigao-de-Sampaio MB, Abreu TF, Linhares-de-Carvalho MI, Ponce de Leon A, Castello-Branco LR. Surrogate markers of disease progression in HIV-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Trop Pediatr* 1999;45:299-302
110. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338:853-860
111. Palomba E, Gay V, de Martino M, Fundaro C, Perugini L, Tovo PA. Early diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants by detection of free and complexed p24 antigen. *J Infect Dis* 1992; 165:394-395
112. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355-358
113. Paul DA, Falk LA, Kessler HA, et al. Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status in HIV-infected patients. *J Med Virol* 1987; 22: 357-363
114. Paul DB, Kuhns MC, McNamara AL, Pottage JC Jr, Spear GT. Short-term stability of HIV provirus levels in the peripheral blood of HIV-infected individuals. *J Med Virol* 1995; 47:292-297
115. Pedersen C, Nielsen CM, Vestergaard BF, Gerstoft J, Krogsgaard K, Nielsen JO. Temporal relation of antigenaemia and loss of antibodies to core antigens to development of clinical disease in HIV-infection. *Br Med J* 1987; 295:567-569
116. Phillips AN, Lee CA, Elford J, et al. P24 antigenaemia, CD4 lymphocyte counts and the development of AIDS. *AIDS* 1991; 5:1217-1222
117. Procaccia S, Lazzarin A, Colucci A, et al. IgM, IgG and IgA rheumatoid factors and circulating immune complexes in patients with AIDS and AIDS-related complex with serological abnormalities. *Clin Exp Immunol* 1987; 67:236-244
118. Prud'homme IT, Kim JE, Pilon RG, et al. Amplicor HIV monitor, NASBA HIV-1 RNA QT and quantiplex HIV RNA version 2.0 viral load assays: a Canadian evaluation. *J Clin Virol* 1998; 11:189-202
119. Quinn TC, Kline R, Moss MW, Livingstone RA, Hutton N. Acid dissociation of immune complexes improves diagnostic utility of p24 antigen detection in perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167:1193-1196
120. Read JS, Rich KC, Korelitz JJ, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen and antibody rivals human immunodeficiency virus type 1 RNA and CD4+ enumeration for prognosis. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:544-551
121. Report des Workshops QA/Qc of CD4 and Viral Load Assays in the Resource-Limited Setting vom 30.10.2003, Warschau (Polen), Forum for Collaborative HIV Research, Department of Health Policy, School of Public Health and Health Services The George Washington University
122. Revets H, Marissens D, de Wit S, et al. Comparative evaluation of NASBA HIV-1 RNA QT, AMPLICOR-HIV monitor, and QUANTIPLEX HIV RNA assay, three methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996 May; 34(5): 1058-64

123. Rich KC, Janda W, Kalish LA, et al. Immune Complex-Dissociated p24 Antigen in Congenital or Perinatal HIV Infection: Role in the Diagnosis and Assessment of Risk of Infection in Infants. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 15:198-203
124. Rinaldo C, Kingsley L, Neumann J, Reed D, Gupta P, Lyter D. Association of human immunodeficiency virus (HIV) p24 antigenemia with decrease in CD4+ lymphocytes and onset of acquired immunodeficiency syndrome during the early phase of HIV infection. *J Clin Microbiol* 1989; 27:880-4
125. RKI. Epidemiologisches Bulletin Sonderausgabe A/2008.
126. Robey WG, Satai B, Oroszlan S, et al. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* 1985; 228:593-595
127. Rubio Caballero M, Rubio Rivas C, Nogues Biau A, Falguera Sacrest M, Manonelles Fernandez A. Survival and disease progression in 251 patients with HIV-1 infection. Study of p24 antigen and viral burden as prognosis makers. Their value at 4 years of follow-up. *An Med Interna* 2001; 18:517-20
128. Sabin CA, Lepri AC, Devereux H, Phillips AN, Loveday C, Lee CA. Relationships among the detection of p24 antigen, human immunodeficiency virus (HIV) RNA level, CD4 cell count, and disease progression in HIV-infected individuals with hemophilia. *J Infect Dis* 2001; 184:511-4
129. Sachs L. *Angewandte Statistik*. 8. Aufl. Springer; Berlin; (1997) 511ff
130. Sachs L. *Angewandte Statistik*. 8. Aufl. Springer; Berlin; (1997) 410ff
131. Sachs L. *Angewandte Statistik*. 8. Aufl. Springer; Berlin; (1997) 393ff
132. Sachs L. *Angewandte Statistik*. 8. Aufl. Springer; Berlin; (1997) 397
133. Sachs L. *Angewandte Statistik*. 8. Aufl. Springer; Berlin; (1997) 449ff
134. Schüpbach J, Böni J, Flepp M, Tomasik Z, Joller H, Opravil M. Antiretroviral treatment monitoring with an improved HIV-1 p24 antigen test: an inexpensive alternative to tests for viral RNA. *J Med Virol* 2001; 65:225-232
135. Schüpbach J, Böni J: Quantitative and sensitive detection of immune-complexed and free HIV antigen after boiling of serum. *J Virol Methods* 1993; 43:247-256.
136. Schüpbach J. Measurement of HIV-1 p24 antigen by signal-amplification-boosted ELISA of heat-denatured plasma is a simple and inexpensive alternative to tests for viral RNA. *AIDS Rev* 2002; 4:83-92
137. Schüpbach J, Gunthard HF, Joos B, et al. HIV-1 p24 may persist during long-term HAART, increases little during short treatment breaks, and its rebound after treatment stop correlates with the CD4+ loss. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40:250-6
138. Schuurman R, Descamps D, Weverling GJ, et al. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34:3016-3022
139. Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, et al. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* 1981; 305:1439-1444
140. Sitnik R, Pinho JR. Quantitation of HIV-1 RNA viral load using nucleic acid sequence based amplification methodology and comparison with other surrogate markers for disease progression. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:411-415
141. Sodroski JC, Goh WC, Rosen C, Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 1986; 312:412-417

142. Spector SA, Kennedy C, McCutchan JA, et al. The antiviral effect of zidovudine and ribavirin in clinical trials and the use of p24 antigen levels as a virologic marker. *J Infect Dis* 1989; 159:822-828
143. Spiegel PB. HIV/AIDS among Conflict-affected and Displaced Populations: Dispelling Myths and Taking Action. *Disasters* 2004. 28(3):322-339
144. Spijkerman IJ, Prins M, Goudsmit J, Veugelers PJ, Coutinho RA, Miedema F, de Wolf F. Early and late HIV-1 RNA level and its association with other markers and disease progression in long-term AIDS-free homosexual men. *AIDS* 1997; 11:1383-1188
145. Spira AL, Marx PA, Patterson BK, et al. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996; 183:215-225
146. Stambuk D, Hawkins D, Gazzard BG. Zidovudine treatment of patients with acquired immune deficiency syndrome and acquired immune deficiency syndrome-related complex: St Stephen's Hospital experience. *J Infect* 1989; 18 Suppl 1:41-51
147. Staszewski S, Loveday C, Picazo JJ, et al. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in zidovudine-experienced patients. A randomized controlled comparison with zidovudine monotherapy. Lamivudine European HIV Working Group. *JAMA* 1996; 276: 111-117
148. Stein DS, Korvick JA, Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J Infect Dis* 1992; 165:352-363
149. Stellbrink HJ, Zoller B, Fenner T, et al. Rapid plasma virus and CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: evidence for an only transient interruption by treatment. *AIDS* 1996; 10:849-857
150. Sterling TR, Hoover DR, Astemborski J, Vlahov D, Bartlett JG, Schupbach J. Heat-denatured human immunodeficiency virus type 1 protein 24 antigen: prognostic value in adults with early-stage disease. *J Infect Dis* 2002; 186:1181-1185
151. Stevens W, Sherman G, Downing R, Parsons LM, et al. Role of the Laboratory in Ensuring Global Access to ARV Treatment for HIV-Infected Children: Consensus Statement on the Performance of Laboratory Assays for Early Infant Diagnosis. *Open AIDS J.* 2008;2:17-25. Epub 2008 Mar 10
152. Surbone A, Yarchoan R, McAtee N, et al. Treatment of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex with a regimen of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (azidothymidine or zidovudine) and acyclovir. A pilot study. *Ann Intern Med* 1988; 108:534-40
153. Uchiyama T. Human T cell leukaemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev. Immunol* 1997; 15:15-37
154. UNAIDS/WHO: AIDS epidemic update: December 2007
155. UNDP: Human Development Report Documents Catastrophic Impact of AIDS in Africa. July 2004
156. Vandamme AM, Schmit JC, Van Dooren S, et al. Quantification of HIV-1 RNA in plasma: comparable results with the NASBA HIV-1 RNA QT and the AMPLICOR HIV monitor test. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13:127-139
157. Vermund SH. Transmission of HIV-1 among adolescents and adults in AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and prevention. V.T. de Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg, Editors. Lippincott-Raven: Philadelphia, USA 1997:147-165
158. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. *The AIDS*

- Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *N Engl J Med* 1990; 322:941-949
159. von Sydow M, Gaines H, Sonnerborg A, Forsgren M, Pehrson PO, Strannegard O. Antigen detection in primary HIV infection. *Br Med J* 1988; 296:238-240
160. Wall RA, Denning DW, Amos A. HIV antigenaemia in acute HIV infection. *Lancet* 1987; i:566
161. Weiss RA. How does HIV cause AIDS. *Science* 1993; 260:1273-1279
162. Whittier S, Hopfer RL, Gilligan P. Elimination of false-positive serum reactivity in latex agglutination test for cryptococcal antigen in human immunodeficiency virus-infected population. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2158-2161
163. Witt DJ, Ginocchio CC, Wang XP, Kaufman MK. Comparison of the frequencies and levels of human immunodeficiency virus type 1 markers in specimens from chronically infected human T-lymphocyte cultures and from patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:369-376
164. Wolfs TF. Genetic variation of the third variable envelope region in natural HIV-1 infection. Dissertation 1992. Universität Amsterdam
165. Wong-Staal F. Human immunodeficiency viruses and their replication. *Virology*, 2nd edition, edited by B.B. Fields, D.M. Knipe et al, Raven Press, Ltd., New York 1990: 1529-1543
166. Zoetewij JP, Blauvelt A. HIV-dendritic cell interactions promote efficient viral infection of T cells. *J Biomed Sci* 1998; 5:253-259

7. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. Pauli danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit am Robert-Koch-Institut sowie für seine kontinuierliche Unterstützung und die hilfreichen Kommentare.

Herrn Prof. Dr. Zeichhardt danke ich für die anschließende wissenschaftliche Betreuung und für die konstruktiven und kritischen Anmerkungen.

Herrn Dr. Bergmann danke ich für die Hilfe bei der Datenerhebung und für die wertvollen Anregungen während der Planung.

Den Mitarbeitern des Robert-Koch-Instituts, Frau Dr. Claudia Kücherer und Frau Sabrina Neumann, danke ich für die Unterstützung bei der Datensammlung und der Interpretation der Daten.

8. ERKLÄRUNG

„Ich, Andreas Müller erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Nachweis von p24-Antigen bei HIV-Infektion Typ1 in Bezug zu Viruslast, CD4-Zellzahl, aidsdefinierenden Erkrankungen und Tod“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Andreas Müller

9. LEBENSLAUF

Andreas Müller

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.