

**Aus dem Institut für  
Virologie und Immunbiologie  
der Universität Würzburg  
Vorstand : Professor Dr. med. V. ter Meulen**

**Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Antikörperavidität bei  
HIV-1-infizierten Patienten mit antiretroviraler Therapie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christoph Pöhlmann  
aus Würzburg**

**Würzburg, im Juni 2003**

**Referent : Prof. Dr. med. V. ter Meulen**

**Koreferent : Priv.-Doz. Dr. med. H. Klinker**

**Dekan : Prof. Dr. med. S. Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung : 28. Mai 2004**

**Der Promovend ist Arzt**

**Meinen Eltern und meinem Bruder in Dankbarkeit**

### Erläuterungen

Im Text sowie in den Abbildungen und Tabellen werden folgende Abkürzungen eingesetzt :

ABC	Abacavir (Handelsname ZIAGEN <sup>®</sup> )
Ag	Antigen
AI	Aviditätsindex
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ak	Antikörper
APV	Amprenavir (Handelsname AGENERASE <sup>®</sup> )
ART	Antiretrovirale Therapie
AVI	Avidität
AZT	Zidovudin (Handelsname RETROVIR <sup>®</sup> )
BSA	Bovines Serumalbumin
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
DDC	Zalcitabin (Handelsname HIVID <sup>®</sup> )
DDI	Didanosin (Handelsname VIDEX <sup>®</sup> )
DEA	Diethylamin
DSV	DEA Shift Value
D4T	Stavudin (Handelsname ZERIT <sup>®</sup> )
DTT	Dithiothreitol
EA	Early Antigen
EBNA	Epstein-Barr nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-) Carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFV	Efavirenz (Handelsname SUSTIVA <sup>®</sup> )

## Erläuterungen und Abkürzungen

---

EIA	Enzyme-Immuno-Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPR	Ratio of End-point Titers
Fab	Fragment antigenbindend
FBS	Fetales Bovines Serum
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
gag	Gruppenspezifisches (HIV-) Antigen
gp	Glykoprotein
HAART	Hochaktive Antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBc	Hepatitis-B core
HBsAg	Hepatitis-B soluble antigen
HCV	Hepatitis-C-Virus
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IgG/M	Immunglobulin G/M
IDV	Indinavir (Handelsname CRIXIVAN <sup>®</sup> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i. v.	intravenös
LPV	Lopinavir
LTS	Long Term Survivors
NFV	Nelfinavir (Handelsname VIRACEPT <sup>®</sup> )
NNRTI	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NVP	Nevirapin (Handelsname VIRAMUNE <sup>®</sup> )
OD	optische Dichte
p	Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Protease-Inhibitor
pMAL	Maltose Bindendes Protein

## Erläuterungen und Abkürzungen

---

RES	Retikuloendotheliales System
rp	Rekombinantes Protein
RS-Virus	Respiratory Syncytial Virus
RTV	Ritonavir (Handelsname NORVIR®)
Sog.	sogenannte(r)
SQV	Saquinavir (Handelsname INVIRASE® / FORTOVASE®)
STD	Sexually transmitted disease
TBE	Tick-Borne Encephalitis (= FSME)
3TC	Lamivudin (Handelsname EPIVIR®)
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxy-methyl)-methylamin
T4-	CD4 <sup>+</sup> -T-
V. a.	Verdacht auf
VCA	Virales Kapsidantigen
Vk	Variationskoeffizient
VZV	Varizella-Zoster-Virus
Z. n.	Zustand nach

### Anmerkung zu den antiretroviralen Kombinationspräparaten :

COMBIVIR®	Präparat mit den Wirkstoffen AZT und 3TC
KALETRA®	Präparat mit den Wirkstoffen LPV und RTV
TRIZIVIR®	Präparat mit den Wirkstoffen AZT, 3TC und ABC

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<u>1</u>
1. 1. Definitionen und Grundlagen.....	<u>1</u>
1. 2. Epidemiologie und Übertragungswege.....	<u>1</u>
1. 3. Immunpathogenese und Krankheitsverlauf.....	<u>3</u>
1. 4. Serodiagnostik.....	<u>3</u>
1. 5. Antiretrovirale Therapie.....	<u>4</u>
1. 6. Affinität und Avidität.....	<u>6</u>
1. 7. Probleme der klassischen Serodiagnostik.....	<u>7</u>
1. 8. Mechanismen der Aviditätsreifung.....	<u>8</u>
1. 9. Bedeutung der AVI-Messung in der Routinediagnostik.....	<u>9</u>
1. 10. Methoden der Aviditätsbestimmung.....	<u>14</u>
1. 10. 1. DSV-Methode (DEA shift value).....	<u>15</u>
1. 10. 2. Einpunktmethode.....	<u>15</u>
1. 10. 3. Endpunkttiter-Methode.....	<u>16</u>
<b>2. AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<u>18</u>
2. 1. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	<u>18</u>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<u>20</u>
3. 1. Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	<u>20</u>
3. 2. Gerätschaften.....	<u>26</u>
3. 3. Rekombinante Virusproteine.....	<u>27</u>
3. 4. Serum- bzw. Plasmaproben der HIV-Patienten.....	<u>27</u>
3. 5. Patientenkollektiv.....	<u>28</u>
3. 6. Vorbemerkungen zur EIA-Versuchsdurchführung.....	<u>29</u>
3. 7. Allgemeine EIA-Versuchsdurchführung.....	<u>30</u>
3. 8. Spezielle Beschichtungs- und EIA-Abarbeitungsmethoden bei den einzelnen Plattensystemen.....	<u>31</u>
3. 9. Bestimmung der optimalen HIV-Protein-Beschichtungskonzentration.....	<u>38</u>
3. 10. Testung der Intra-Assay-Variabilität.....	<u>41</u>
3. 11. Stabilitätsprüfung der beschichteten Mikrotiterplattenoberflächen.....	<u>42</u>

## Inhaltsverzeichnis

---

3. 12. Vorbemerkungen zum HIV-AVI-EIA.....	<u>43</u>
3. 13. Versuchsdurchführung HIV-AVI-EIA.....	<u>44</u>
3. 14. Prinzip der Messergebnisauswertung und Kalkulation des Aviditätsindex .....	<u>44</u>
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<u>46</u>
4. 1. Präzision und Reproduzierbarkeit .....	<u>46</u>
4. 2. Auswahl des Immunkomplex-dissoziierenden Agens.....	<u>48</u>
4. 3. Ak-Avidität HIV-Patientenkollektive LTS, PROG und HAART.....	<u>51</u>
4. 3. 1. Verlauf der Anti-gp41-IgG-Avidität .....	<u>54</u>
4. 3. 2. Verlauf der Anti-gp120-IgG-Avidität .....	<u>57</u>
4. 3. 3. Verlauf der Anti-p55-IgG-Avidität .....	<u>59</u>
4. 4. Einfluß der T4-Zellzahl auf die Ak-Avidität.....	<u>64</u>
4. 5. Einfluß von HAART auf die Ak-Avidität.....	<u>67</u>
4. 6. Abhängigkeit des Aviditätsindex von der Ak-Konzentration .....	<u>74</u>
<b>5. DISKUSSION UND AUSBLICK</b> .....	<u>77</u>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<u>86</u>
<b>7. ANHANG</b> .....	<u>87</u>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<u>93</u>



---

## **1. EINLEITUNG**

### **1. 1. Definitionen und Grundlagen**

AIDS („acquired immunodeficiency syndrome“) ist ein Syndrom bestehend aus einem vielfältigen Spektrum klinischer Merkmale, die durch eine schwerwiegende Störung wesentlicher Teile des Immunsystems verursacht sind und unter anderem opportunistische Infektionen, maligne Tumoren, das HIV-Auszehrungssyndrom und die HIV-Enzephalitis umfassen. Der verantwortliche Erreger für die AIDS-Epidemie weltweit ist das Retrovirus HIV-1 („human immunodeficiency virus“). HIV-1 kann an Hand von Genomanalysen in mehrere genetische Subtypen (A-H, O) eingeteilt werden, wobei in Europa und Nordamerika der Subtyp B dominiert. Demgegenüber hat HIV-2 insbesondere in Europa praktisch keine Bedeutung.

Die wesentlichen biologischen Eigenschaften der HIV-Infektion sind :

- die lebenslange Persistenz des Virus im Wirtsorganismus
- die dadurch bedingte lebenslange Infektiosität
- die sehr lange Zeit von der Infektion bis zur Manifestation von AIDS (im Mittel ca. 10 Jahre ohne Therapie)
- der außerordentliche Polymorphismus des Virus, der die Entwicklung einer Vakzine und Therapie erheblich erschwert

Nach dem derzeitigen Wissensstand sind HIV-1 und –2 Erreger einer Zoonose, die von Affen auf Menschen unter natürlichen Bedingungen übertragen wurde. Sowohl die Art der Transmission als auch die Primatenspezies ihres Ursprungs sind jedoch bis heute unbekannt.

### **1. 2. Epidemiologie und Übertragungswege**

Nach Schätzungen der WHO lebten bis Ende 2002 global insgesamt ca. 42 Millionen Kinder und Erwachsene mit HIV/AIDS <sup>1</sup>. Insbesondere die Länder Afrikas südlich der

Sahara sind am stärksten betroffen. In Deutschland ist das Ausmaß der HIV-Epidemie im Vergleich zu anderen mehr südlichen Regionen Europas sowie zur Lage in Nordamerika moderat geblieben. Bis Ende 2002 lebten ca. 39000 HIV-Infizierte in Deutschland, von denen ca. 5000 das Vollbild AIDS entwickelt haben<sup>2</sup>. Die Zahl der HIV-Neuinfektionen im Jahr 2002 wird in Deutschland auf ca. 2000 geschätzt<sup>2</sup>.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass sich in manchen Regionen Europas (z. B. Deutschland, Schweiz, Niederlande) und manchen Populationen (z. B. homosexuelle Männer in London oder Amsterdam) die HIV-Prävalenz stabilisiert, weil sich Mortalität und Rate der geschätzten Neuinfektionen einander annähern. Eine solche Stabilität der HIV-Prävalenz kann jedoch dazu führen, dass wichtige Veränderungen in der Verbreitung der HIV-Infektion nicht oder zu spät wahrgenommen werden. So beobachtet man in vielen Ländern Europas einen langsamen, aber kontinuierlichen Anstieg von HIV-Infektionen unter Heterosexuellen und einen überproportionalen Anstieg in jüngeren Altersgruppen (< 30 Jahren). Diese Phänomene können Anzeichen für den Übergang der HIV-Epidemie in eine HIV-Endemie sein.

Ungeschützter homo- und heterosexueller Geschlechtsverkehr sowie i.v.-Drogenabusus sind die bedeutsamsten Übertragungswege von HIV. Die Effizienz der HIV-Übertragung beim Sexualverkehr ist wesentlich abhängig von der Virusmenge im Genitalsekret des Infizierten, von Schleimhautirritationen und Ulzera bei anderen Geschlechtskrankheiten sowie von der Menge des Sekrets und der Verweildauer des Sekrets im Genitaltrakt. Die Übertragung durch Blut bzw. Blutprodukte ist überall dort auf der Welt bedeutsam, wo Bluttransfusionen bzw. Blutprodukte nicht oder nicht ausreichend auf Ak gegen HIV untersucht werden (können).

Daneben kann HIV diaplazentar bzw. perinatal übertragen werden sowie beim Stillen über die Muttermilch. Im Gegensatz zu anderen Viren wie CMV oder Röteln verursacht die intrauterine HIV-Infektion keine Fehlbildungen. Die meisten HIV-Übertragungen finden im letzten Trimester und unter der Geburt statt, weswegen durch antiretrovirale Therapie und Kaiserschnitt das Infektionsrisiko für das Kind deutlich reduziert werden kann.

### **1. 3. Immunpathogenese und Krankheitsverlauf**

Die HIV-Infektion ist charakterisiert durch einen chronischen Verlauf, der zu einer weitgehenden Zerstörung des humanen Immunsystems führt. Unmittelbar nach Virusinokulation werden ortsständige Makrophagen, dann Antigen-präsentierende Zellen infiziert, die das Virus in die Lymphknoten transportieren. Das freie HIV hat eine Halbwertszeit von  $< 6$  h, in aktiv replizierenden Zellen von ca. ein bis zwei Tagen. Es schließt sich eine asymptomatische Phase an, die immunpathogenetisch durch folgende Merkmale gekennzeichnet ist : HI-Virusreplikation auf hohem Niveau, schleichender Verbrauch von  $CD4^+$ -T-Zellen, Zytokindysregulation durch „Switch“ der  $CD4$ -Helfer-Subtypen von TH1 zu TH2, vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine bei gleichzeitiger reduzierter Synthese protektiver Zytokine sowie Verlust neutralisierender Ak. Ein gesteigerter T-Zellumsatz ist zunächst für eine folliculäre Lymphknotenhyperplasie verantwortlich, mit fortschreitendem Krankheitsverlauf kommt es jedoch zu einer Involution der Keimzentren der Lymphknoten, was den Verlust der spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort zur Folge hat. Im Stadium des AIDS-Vollbildes liegt ein ausgebranntes Immunsystem vor mit erschöpfter T-Zellnachbildung und unkontrollierter HI-Virusreplikation.

### **1. 4. Serodiagnostik**

Die heutigen HIV-Ak-Suchtests verwenden Antigene von HIV-1, -O und HIV-2. Damit können HIV-spezifische Ak durchschnittlich 35-40 Tage nach erfolgter Infektion nachgewiesen werden. Jeder reaktive Suchtest muss in einem Western Blot bestätigt werden. Ein positiver Befund sollte in einer zweiten unabhängigen Blutprobe verifiziert werden. Zur Detektion der HIV-RNA stehen verschiedene kommerzielle Testverfahren zur Verfügung, die eine quantitative Bestimmung der Viruslast erlauben : PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion), LCR (Ligase-Ketten-Reaktion), bDNA (branched DNA signal amplification assay) und NASBA (nucleic acid sequence based amplification). Ultrasensitive Assays haben eine Nachweisgrenze von unter 50 copies/ml. In Kombination mit der  $CD4^+$ -T-Zellzahl, dem wichtigsten Surrogatmarker für das Immunsystem,

spielt die quantitative Viruslastbestimmung heute für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes sowie für Therapieentscheidungen eine bedeutsame Rolle.

### **1. 5. Antiretrovirale Therapie**

Derzeit stehen folgende Medikamentenklassen für die Behandlung zur Verfügung : Nukleosidale bzw. nicht-nukleosidale Reverse Transkriptaseinhibitoren (NRTI bzw. NNRTI) und Proteaseinhibitoren (PI). Generell können alle drei Medikamentenklassen in einer Therapie miteinander kombiniert werden. Unter hochaktiver antiretroviraler Therapie (HAART) versteht man die Kombination von NRTI's bzw. NNRTI's mit PI's in Form einer Drei- oder Vierfachtherapie. Therapieformen, die nur die Verabreichung eines Medikaments oder eine Zweifach-Nukleosidgabe vorsehen, werden nicht als hochaktive antiretrovirale Therapieformen bezeichnet. Bei der Auswahl einer Firstline Therapie sollten Begleiterkrankungen, Patientenwunsch, Adherence, Lebensweise und Höhe der Baseline-HIV-RNA sowie T-Helferzellzahl mit in die Auswahl der jeweiligen Medikamente einbezogen werden.

Die bessere Wirksamkeit der heute verfügbaren antiretroviralen Kombinationstherapien in Kombination mit den Nebenwirkungen dieser Therapien erschwert die Entscheidung über den idealen Zeitpunkt des Beginns einer Therapie der HIV-Infektion. Eine Indikation für eine antiretrovirale Therapie besteht grundsätzlich bei allen Patienten mit symptomatischer HIV-Infektion (klinisches Stadium CDC B, C) <sup>3</sup>. Bei asymptomatischen Patienten gibt es bisher keine Studie, welche die Frage beantworten könnte, zu welchem Zeitpunkt mit einer antiretroviralen Behandlung begonnen werden sollte. Kohortenstudien haben gezeigt, dass eine Grenze für den Behandlungsbeginn, unterhalb derer mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität zu rechnen ist, bei einer CD4-Zellzahl von 200/ $\mu$ l liegt <sup>3</sup>. Ein Abfall der CD4-Zellzahl unter diesen Wert sollte daher nach Möglichkeit vermieden werden. Eine Behandlung asymptomatischer Patienten mit einer CD4-Zellzahl < 200/ $\mu$ l ist deshalb unabhängig vom Ausmaß der Virusreplikation sinnvoll <sup>3</sup>. Die Grenzen der Zahl der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und der HI-Viruslast, bei denen eine Therapie begonnen werden sollte, können nach derzeitigem Kenntnisstand nur

unscharf formuliert werden und liegen zwischen 200-350 CD4<sup>+</sup>/μl bzw. im Bereich von unter 15-20 % Anteil der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten an den Gesamtlymphozyten <sup>3</sup>.

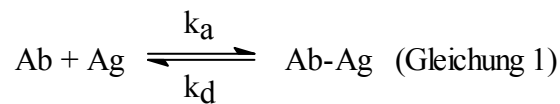
Durch eine signifikante Absenkung der Viruslast um ca. 1-2 log-Einheiten kann bereits eine deutliche Verminderung der HIV-assoziierten Morbidität und Mortalität erreicht werden. Die Selektion resistenter Virusmutanten hingegen lässt sich dauerhaft nur vermeiden, wenn die HIV-Replikation möglichst vollständig gehemmt wird. Dies setzt eine hohe antiretrovirale Aktivität der eingesetzten Medikamentenkombination voraus. Die Tiefe des erreichten Niveaus der quantitativ gemessenen HIV-RNA bestimmt maßgeblich die Dauer der virologisch definierten Wirksamkeit einer Therapie. Zusammengefasst sollte im Einverständnis mit dem Patienten eine möglichst maximale Suppression der HIV-Replikation erzielt werden, da dies für den Langzeiterfolg der Therapie von entscheidender Bedeutung ist. Abhängig von der individuellen Situation (langjährige Vorbehandlung mit suboptimalen Therapieregimen bzw. Vorliegen multipler Resistenzen) kann es aber notwendig werden, weniger strikte und angesichts der Vorgeschichte noch realisierbare Therapieziele mit dem Patienten zu vereinbaren.

Um einen nachhaltigen Therapieerfolg zu gewährleisten, ist ein regelmäßiges Monitoring der Patienten unerlässlich. Die wichtigsten Verlaufsmarker zur Beurteilung der HIV-Infektion sind die Bestimmung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und der quantitativen HIV-RNA. Sie sollten deshalb in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert werden.

Die Therapierichtlinien für die in dieser Studie untersuchten HIV-Patienten waren aufgrund des langen Beobachtungszeitraumes von bis zu zehn Jahren pro Patient ständigen Änderungen unterworfen. So bestand die Behandlung von HIV-Patienten Ende der 80-iger Jahre im wesentlichen aus einer Monotherapie mit NRTI's, bevor sich Anfang der 90-iger Jahre die effektivere Kombinationstherapie mit zwei Nukleosidanaloga durchsetzte. Mit der Einführung zweier neuer Wirkstoffklassen, der PI's und NNRTI's, im Jahr 1996 begann die Ära der „hochaktiven antiretroviralen Therapie“ (HAART), die eine Kombination der drei Wirkstoffklassen NRTI, NNRTI und PI darstellt. Sie gilt bis heute trotz ständig wechselnder Richtlinien zur Medikamentenkombination als Standard für die Behandlung von HIV-Patienten.

### 1. 6. Affinität und Avidität

Die einfachste Antigen-Antikörper-Reaktion, die man sich überhaupt vorstellen kann, ist die zwischen immunologisch monovalenten Reaktanten, d. h. zwischen einem Hapten und der entsprechenden Antigenbindungsstelle am Fab-Fragment eines monomeren Antikörpermoleküls. Die Stärke der nichtkovalenten Bindungen zwischen beiden Reaktionspartnern wird als Antikörperaffinität oder intrinsische Affinität bezeichnet<sup>4-7</sup>. Sie stellt eine thermodynamische Größe dar und entspricht der aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Gleichgewichtskonstanten<sup>4-6</sup>.



$$\text{affinity} = k_a/k_d = K = \frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ab}] * [\text{Ag}]} \quad (\text{Gleichung 2})$$

In Gleichung 1 und 2 stellen  $k_a$  und  $k_d$  die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation respektive Dissoziation der beiden Reaktionspartner dar, Ab, Ag und Ab-Ag bezeichnen den Antikörper, das Antigen und den gebildeten Immunkomplex, Symbole in eckigen Klammern entsprechen deren Konzentrationen im „Steady State“ und K ist die Gleichgewichtskonstante, die identisch ist mit der Antikörperaffinität. In Lösung und fester Phase wird die Antigen-Antikörper-Assoziation in erheblichem Maß durch die Diffusion bestimmt, während die Dissoziation vor allem von der Qualität der Bindungsstelle abhängig ist<sup>5</sup>.

Die Reaktion zwischen immunologisch komplexen mikrobiellen Antigenen mit ihren multiplen Epitopen einerseits und Antikörpern mit ihrer klonalen Heterogenität und Bi- bzw. Multivalenz andererseits ist weitaus komplizierter und kann mit dem Begriff der Affinität nicht annähernd erfasst werden. Die Gesamtbindungsstärke zwischen einem komplexen, multivalenten Antigen und einem polyklonalen Antiserum wird als Antikörperavidität oder funktionelle Affinität bezeichnet<sup>5,6,8,9</sup>. Streng genommen kann also die Antikörperaffinität nur mit monoklonalen Antikörpern und Haptenen gemessen wer-

den. Sobald komplexe Antigene und polyklonale Antiseren involviert sind, was in der Regel der Fall ist, können lediglich durchschnittliche Aviditätswerte angegeben werden.

### **1. 7. Probleme der klassischen Serodiagnostik**

Bei Kontakt mit einem neuen mikrobiellen Antigen kommt es im Rahmen der primären Immunantwort zunächst zu einer transitorischen Bildung spezifischer IgM-Antikörper. Im weiteren Verlauf der Infektion treten dann spezifische IgG-Antikörper auf, die über einen langen Zeitraum im Plasma persistieren können. In der klassischen Infektionserologie gilt deshalb die Anwesenheit spezifischer IgM-Antikörper als Indikator für eine Erstinfektion, während der Nachweis spezifischer IgG-Antikörper in Abwesenheit entsprechender IgM-Antikörper für eine länger zurückliegende, abgelaufene Infektion oder für eine Immunität infolge Vakzinierung spricht. Unglücklicherweise kann es bei der Bestimmung von IgG und IgM zu Abweichungen von der klassischen Befundkonstellation kommen, was zu beträchtlichen Schwierigkeiten bei der Differenzierung von Erst- und länger zurückliegenden, abgelaufenen Infektionen führt. So kann der Nachweis einer spezifischen IgM-Antwort verursacht sein durch eine Reaktivierung der Infektion, durch eine chronische Infektion, durch eine polyklonale B-Zellstimulation oder durch eine Persistenz der IgM-Antwort nach der akuten Infektion<sup>7</sup>.

Umgekehrt können in Folge der großen Variabilität der IgM-Antwort auch falsch negative Testergebnisse auftreten, die dann zu einem fälschlichen Ausschluss einer Primärinfektion führen können. Die Variabilität in Bezug auf die Stärke und Kinetik der IgM-Antwort zwischen verschiedenen Individuen hat entscheidenden Einfluss auf die Nachweisbarkeit spezifischer IgM-Antikörper in der ersten Serumprobe nach der Manifestation klinischer Symptome. So kann im ersten untersuchten Serum die IgM-Konzentration bereits unterhalb der Nachweisgrenze gelegen haben oder aber es kann in seltenen Fällen passieren, dass IgM in Relation zu IgG zeitlich verzögert auftritt<sup>7</sup>.

So kann eine negative IgM-Antwort vorgetäuscht werden, die dann als Ausschluss einer Primärinfektion missinterpretiert wird.

### 1. 8. Mechanismen der Aviditätsreifung

Schwierigkeiten bei der Differenzierung von akuter und abgelaufener Infektion lassen sich dadurch lösen, dass z. B. beim Nachweis einer akuten EBV- und HBV-Infektion zusätzliche serologische Marker (bei EBV neben Anti-VCA-Ak Anti-EBNA-1-Ak, bei HBV neben Anti-HBc-Ak HBsAg und Anti-HBs-Ak) untersucht werden. Einen anderen Ausweg bietet die Einbeziehung der IgG-Avidität.

Bereits ältere Studien mit Versuchstieren haben gezeigt, dass nach Immunisierung die Antikörperavidität mit der Zeit zunimmt, ein immunologischer Vorgang, der als Reifung der Immunantwort bezeichnet wird<sup>6</sup>. Im Rahmen von Primärinfektionen ist die Avidität zunächst niedrig und steigt in den folgenden Wochen und Monaten dann kontinuierlich an<sup>5</sup>. Die Aviditätsreifung im Verlauf einer Immunantwort kann als Darwinischer Selektionsprozess aufgefasst werden, der zunächst die Bildung verschiedener B-Zell-Rezeptoren erfordert und dann die Selektion derjenigen mit der größten Affinität für das Antigen<sup>10</sup>. Die Diversität der exprimierten B-Zell-Rezeptoren wird durch somatische Hypermutation in den V-Gensegmenten erzeugt, die für den variablen Bereich der schweren und leichten Ketten der Immunglobuline kodieren<sup>5,7,10</sup>.

Es gibt Anzeichen dafür, dass die Aviditätsreifung von der Antigenkonzentration abhängig ist<sup>6,11</sup>. Niedrige Antigenkonzentrationen führen wahrscheinlich deshalb zu einer rascheren Aviditätsreifung, weil unter Antigenmangel vorzugsweise B-Zellen selektiert werden, die auf ihrer Oberfläche hochaffine Ig-Rezeptoren exprimieren, und deren Klone dann ebenfalls hochaffine Antikörper sezernieren<sup>6,12</sup>. Für die B-Zellstimulation ist ein ausreichend langer Kontakt zwischen dem B-Zell-Rezeptor und dem Antigen notwendig, der bei niedriger Antigenkonzentration lediglich von hochaffinen B-Zell-Rezeptoren aufrechterhalten werden kann<sup>6,13</sup>. Bei hohen Antigenkonzentrationen hingegen ist die Selektion nicht nur auf B-Zellen mit hochaffinen Antikörperrezeptoren beschränkt. Es werden auch Zellen mit niedriger bzw. mittlerer Rezeptoraffinität ausreichend stimuliert, was zur Entstehung von Zellklonen führt, die folglich Antikörper mit niedriger bzw. mittlerer Affinität sezernieren<sup>6,14</sup>.



Demnach werden während des frühen Stadiums einer Infektion, wenn die Erregerantigene im Überfluss vorhanden sind, B-Zellen mit niedriger, mittlerer und hoher Affinität der Ig-Rezeptoren stimuliert. Im Endergebnis resultiert eine spezifische Immunantwort mit der Bildung von Antikörpern, die einem großen Affinitätsbereich angehören<sup>6</sup>.

Mit zunehmender Infektionsdauer nimmt in der Regel die Konzentration des Antigens ab, da es durch das RES entfernt wird. Unter diesen Bedingungen des Antigenmangels werden vorzugsweise B-Zellen stimuliert, die eine hohe Rezeptoraffinität aufweisen. Durch die daraus resultierende Proliferation von Zellklonen, die zunehmend hochaffine Antikörper bilden, steigt die Avidität mit dem zeitlichen Fortschreiten der Infektion deutlich an<sup>6</sup>. Während also nach Antigenexposition der Anteil hochaffiner Antikörper kontinuierlich zunimmt, lässt sich auch noch lange Zeit (mindestens ein Jahr) nach Infektionsbeginn eine nahezu konstante Menge niedrigaffiner Antikörper quasi als „Background“ nachweisen<sup>5,6,15,16</sup>.

### **1. 9. Bedeutung der AVI-Messung in der Routinediagnostik**

Optimale serologische Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn die Aviditätsbestimmung mit der klassischen (IgM und IgG) Serologie kombiniert wird. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass mittlerweile für eine Vielzahl von Krankheitserregern Verfahren zur Bestimmung der Antikörperavidität entwickelt worden sind.

Bei der Rötelninfektion ist insbesondere während der Schwangerschaft die Differenzierung zwischen einer Erst- und einer „alten“ Infektion bzw. Reinfektion von essentieller Bedeutung<sup>5-7,17-19</sup>. Da Röteln-spezifische IgM-Ak auch bei abgelaufener Rötelninfektion oder bei Röteln-Reinfektion nachgewiesen werden können, kann die Bestimmung der Avidität spezifischer IgG-Ak hilfreich sein, um die Diagnose einer Röteln-Primärinfektion auszuschließen bzw. zu bestätigen<sup>5-7,17-19</sup>. Die Avidität spezifischer IgG-Ak ist während des ersten Monats nach einer Röteln-Primärinfektion niedrig, wo hingegen sie hoch ist nach abgelaufener Infektion und in Fällen einer Röteln-Reinfektion<sup>5,6,17-19</sup>.

Die Infektion mit dem obligat intrazellulären Protozoon *Toxoplasma gondii* ist aus vielen Gründen medizinisch bedeutsam. Bei immunkompetenten Menschen verläuft sie in der Regel (80-90 %) klinisch asymptomatisch<sup>20</sup>. Während der Schwangerschaft hingegen kann sowohl eine symptomatische wie eine subklinische Toxoplasma-Primärinfektion zu einer schweren konnatalen Toxoplasmose mit Chorioretinitis und Schädigungen des ZNS beim Kind führen. Die Wahrscheinlichkeit einer diaplazentaren Übertragung des Erregers auf den Fötus ist im ersten Trimenon am geringsten, nimmt aber mit der Gestationsdauer deutlich zu (1. Trimenon 15 %, 2. Trimenon 30 % und 3. Trimenon > 60 %<sup>21</sup>). Die Reaktivierung einer latenten Toxoplasmose dagegen, die überwiegend bei immunsupprimierten Patienten auftritt, hat keine konnatale Toxoplasmose zur Folge, da spezifische IgG-Ak der Mutter diaplazentar auf den Fötus übertragen werden und diesen schützen.

Aus klinischer Sicht ist daher die Unterscheidung zwischen einer Primärinfektion und der Reaktivierung einer latenten Infektion von großer Bedeutung. Serologisch ist diese Differenzierung allerdings nicht immer ganz einfach, da bei vielen Patienten mit Toxoplasma-Primärinfektion spezifische IgM-Ak über einen langen Zeitraum (ein Jahr und länger) persistieren können<sup>5,20</sup>. In asymptomatischen Patienten mit konstantem Titer spezifischer IgG-Ak sind positive IgM-Ergebnisse daher mit Vorsicht zu interpretieren. Andere potentielle Fehlerquellen bei der Toxoplasma-Serodiagnostik können kreuzreagierende Ak<sup>22</sup>, Rheumafaktoren<sup>23</sup>, antinukleäre IgM-Ak<sup>24</sup> sowie die Verwendung hitzeinaktivierter Serumproben<sup>25</sup> sein.

Ein Ausweg aus diesem diagnostischen Dilemma besteht in der Bestimmung der Avidität Toxoplasma-spezifischer IgG-Ak<sup>5,20</sup>. Dabei weisen Patienten mit Toxoplasma-Primärinfektion eine niedrige Avidität spezifischer IgG-Ak auf, die mehrere Monate nach dem Auftreten der Symptome der Toxoplasmose bestehen bleibt. Im Gegensatz dazu lässt sich bei Patienten mit einer latenten Infektion oder Reaktivierung eine hohe Avidität Toxoplasma-spezifischer IgG-Ak feststellen<sup>20</sup>. Der Toxoplasma-Aviditäts-EIA stellt demnach eine sinnvolle Ergänzung zur konventionellen Toxoplasma-Serologie dar.

Die Diagnose einer Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion basiert üblicherweise auf einer kombinierten Bestimmung von Antikörpern gegen virales Capsid-Antigen (VCA) und

EBV nukleäres Antigen (EBNA) <sup>26</sup>. Während mit der Manifestation der Symptome der Mononukleose anti-VCA-IgM-Ak positiv werden, lassen sich anti-EBNA-IgG-Ak erst Monate nach einer EBV-Primärinfektion nachweisen <sup>26</sup>. Demzufolge spricht die Befundkonstellation von positivem anti-VCA-IgM und negativem anti-EBNA-IgG nachdrücklich für den Verdacht einer akuten EBV-Infektion, wo hingegen die Ergebniskombination negatives anti-VCA-IgM und positives anti-EBNA-IgG charakteristisch ist für eine „alte“, länger zurückliegende EBV-Infektion <sup>26</sup>.

Unglücklicherweise kommen auch heute noch bei den zum Nachweis von anti-VCA-IgM und anti-EBNA-IgG eingesetzten modernen ELISA-Verfahren sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse vor <sup>26</sup>. Die Gründe dafür sind vielfältig. Im Verlauf der akuten EBV-Infektion kann die anti-VCA-IgM-Antwort insbesondere bei immunsupprimierten Patienten (z. B. Zustand nach Organtransplantation), Tumoren oder HIV-Infektion schwach ausfallen oder überhaupt nicht nachweisbar sein <sup>26</sup>. Andererseits können spezifische IgM-Ak über Monate nach einer akuten Infektion persistieren oder infolge der Reaktivierung einer EBV-Infektion wieder nachweisbar werden <sup>26</sup>. Ähnliche Schwierigkeiten gelten auch für den Nachweis von anti-EBNA-IgG-Ak. Bei einigen Patienten mit vergangener EBV-Infektion bleiben sie unterhalb der Nachweisgrenze. Darüber hinaus können eine immunsuppressive Therapie, Tumoren oder eine HIV-Infektion zu einem Verlust von anti-EBNA-Ak führen, der dann als Hinweis für eine Erstinfektion fehlgedeutet wird <sup>7,26</sup>.

Abhilfe kann die zusätzlich zur konventionellen EBV-Serologie durchgeführte Bestimmung der Antikörperavidität schaffen, die eine Interpretation der serologischen EBV-Ergebnisse entscheidend erleichtern kann. Typisch für eine Primärinfektion mit EBV ist neben positivem anti-VCA-IgM und negativem anti-EBNA-IgG eine niedrige Avidität der anti-VCA-IgG-Ak <sup>7</sup>. Die IgG-Immunantwort gegen das „early antigen“ (EA) erfolgt mit geringer zeitlicher Verzögerung im Vergleich zur anti-VCA-IgG-Antwort, zeigt aber ebenso eine Reifung der Antikörperavidität. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetik ist auch in Fällen mit grenzwertiger Avidität von anti-VCA-IgG die Diagnose einer akuten EBV-Infektion an Hand der niedrigen Avidität von anti-EA-IgG zu stellen <sup>7</sup>. Eine länger zurückliegende, „alte“ Infektion mit EBV ist dagegen neben positivem anti-EBNA-IgG durch eine hohe Avidität von anti-VCA-IgG charakterisiert, wobei sowohl anti-VCA-IgM wie anti-EA-IgG üblicherweise negativ sind <sup>7</sup>.

Im Rahmen der CMV-Serologie kann ebenfalls unter bestimmten Umständen die Bestimmung der Antikörperavidität mittels ELISA hilfreich sein, da ähnlich wie bei EBV sowohl eine CMV-Primärinfektion als auch die Reaktivierung einer latenten CMV-Infektion eine spezifische IgM-Immunantwort hervorrufen können<sup>7</sup>. Eine Differenzierung ist aber möglich, wenn die anti-CMV-IgG-Avidität in die Diagnosestellung mit einbezogen wird. Im Verlauf der Primärinfektion wird der IgG-Titeranstieg von einer niedrigen anti-CMV-IgG-Avidität begleitet, während der Reaktivierung geht der Titeranstieg hingegen mit einer hohen Avidität von anti-CMV-IgG einher<sup>7</sup>.

Auch für die Infektion mit anderen Viren aus der Herpes-Gruppe wie HHV-6<sup>27,28</sup> und VZV<sup>29-31</sup> sind ELISA-Methoden zur Bestimmung der Avidität etabliert worden. Die Varizellen sind eine hoch kontagiöse Kinderkrankheit, die durch eine Primärinfektion mit dem Varicella-Zoster-Virus verursacht wird. Im Anschluss an die Erstinfektion persistiert das Virus in den Spinalganglien, von wo aus unter bestimmten Umständen (z. B. höheres Lebensalter, immunsuppressive oder zytostatische Therapie, Tumoren, HIV-Infektion sowie Stress, Sonneneinwirkung und Traumata) Reaktivierungen der latenten Infektion ihren Ausgang nehmen können. Eine solche Reaktivierung kann subklinisch oder apparent als Herpes Zoster verlaufen. Menschen, die einmal im Leben die Windpocken durchgemacht haben, gelten in Bezug auf diese als immun, d. h. sie erkranken in der Regel kein zweites Mal an Varizellen, bei entsprechender Prädisposition kann jedoch sehr wohl als endogenes Rezidiv ein Herpes Zoster auftreten.

Allerdings sind aus der Literatur Fallbeispiele bekannt, in denen Patienten mit amnesisch und serologisch gesicherter Varizelleninfektion beschrieben werden, die zum wiederholten Mal an zumeist milden Episoden von Windpocken erkrankt sind<sup>32-34</sup>. Leider sind konventionelle serologische Testmethoden in Bezug auf die Differenzierung von Primärinfektion, Reaktivierung und exogener Reinfektion oft nicht zuverlässig genug<sup>35</sup>. Gelegentlich kann aber gerade eine solche Unterscheidung klinisch von Bedeutung sein, z. B. wenn immunsupprimierte Patienten von einer VZV-Infektion betroffen sind. In derartigen Fällen kann die Bestimmung der Avidität VZV-spezifischer Ak diagnostisch weiterhelfen. Während des frühen Stadiums der Varizellen-Primärinfektion ist die Avidität spezifischer Antikörper niedrig, in der Rekonvaleszenz nimmt sie dann aber aufgrund der fortschreitenden Reifung der humoralen Immunantwort deutlich zu

und ist fortan, auch bei Reaktivierung der VZV-Infektion in höherem Lebensalter, hoch  
29-31

Die Untersuchung der Avidität VZV-spezifischer Ak bei Patienten, die zum wiederholten Mal von Windpocken-Episoden heimgesucht wurden, liefert indes kein einheitliches Bild<sup>29,31</sup>. Bei einem Teil der untersuchten Probanden lässt sich eine „Varizellen-ähnliche“ Immunantwort mit ausgeprägter Dominanz niedrigavidier spezifischer Ak nachweisen, die sehr stark jener bei Erstinfektion mit VZV gleicht<sup>29,31</sup>. Im Gegensatz dazu zeigt ein anderer Teil von Patienten eine „Zoster-ähnliche“ Immunantwort mit überwiegend hochaviden spezifischen Ak, so wie sie beim endogenen Rezidiv der VZV-Infektion, dem Herpes Zoster, infolge Reaktivierung zu finden ist<sup>29</sup>.

Zahlreiche Hypothesen, die versuchen, die geschilderten Beobachtungen zu erklären, werden diskutiert. Als Ursache für die Manifestation von Herpes Zoster, dem endogenen Rezidiv der VZV-Infektion, wird eine spezifische zelluläre Immunschwäche mit daraus resultierender Reaktivierung der latenten Infektion bei adäquater humoraler Immunität vermutet<sup>31</sup>. Exogene Reinfektionen, die als Varizellen bei den Betroffenen in Erscheinung treten, sind dagegen vermutlich auf eine Störung der humoralen Immunität zurückzuführen<sup>29,31</sup>. Diese Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort könnte darin bestehen, dass aufgrund einer zu niedrigen Antigenkonzentration während der Primärinfektion spezifische B-Gedächtniszellen nicht in ausreichendem Maße generiert werden<sup>29</sup>. Eine Selektion von B-Zellklonen, die in der Lage wären, spezifische Antikörper mit hoher Avidität zu produzieren, hat demnach nicht stattgefunden. Ebenfalls in Betracht zu ziehen ist die Unfähigkeit des Immunsystems zum „Klassenwechsel“ in Richtung spezifischer IgG1-Ak, dem Isotyp mit der größten virusneutralisierenden Wirkung<sup>29</sup>.

Der Vollständigkeit wegen sei erwähnt, dass auch bei Infektionen mit dem RS-Virus<sup>36</sup>, Parvovirus B19<sup>37,38</sup>, Masern-Virus<sup>39,40</sup>, Hepatitis-C-Virus<sup>41,42</sup>, Hantavirus (Serotyp Puumala)<sup>43,44</sup> und dem TBE-Virus<sup>45</sup> wohl etablierte ELISA-Methoden zur Bestimmung der IgG-Avidität zur Verfügung stehen, die die Differenzierung einer akuten von einer früheren Infektion maßgeblich erleichtern können.

Aus den bislang angegebenen Beispielen geht eindeutig hervor, dass die Bestimmung der Avidität spezifischer IgG-Ak in Bezug auf die Klassifikation einer Infektion als Pri-

märinfektion, Reinfektion, Reaktivierung oder als „alte“ Infektion mit bestehender Immunität dem Nachweis spezifischer IgM- und IgG-Ak als Methode der Wahl in der klassischen Serologie überlegen sein kann, u. a. deshalb, weil, wie bereits erwähnt, IgM-Ak länger als bislang angenommen im Serum persistieren können und bei Reaktivierung oder Reinfektion erneut im Serum nachweisbar werden können<sup>20,28,30,38,46-48</sup>.

### **1. 10. Methoden der Aviditätsbestimmung**

Grundsätzlich existieren 2 experimentelle Verfahren zur Bestimmung der Antikörperavidität. Bei der Dilutionsmethode werden denaturierende Reagenzien wie DEA der Serumprobe zur Verdünnung zugesetzt, um je nach Höhe der Affinität der Antikörper zu ihren entsprechenden Antigenepitopen die Bildung der Immunkomplexe zu verhindern<sup>5-7,9,49,50</sup>. Das Prinzip der Elutionsmethode hingegen besteht darin, bereits gebildete Immunkomplexe mit denaturierenden Reagenzien wie Harnstoff, Kaliumthiozyanat (KSCN) oder Guanidinhydrochlorid zu behandeln, um in Abhängigkeit von der Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung eine Dissoziation der Immunkomplexe zu erreichen<sup>5-7,9,51-53</sup>.

Die dissoziierende Wirkung von Harnstoff auf die Antigen-Antikörper-Interaktion ist reversibel<sup>54</sup>. Bis heute ist der genaue Mechanismus der Harnstoffwirkung aber unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass die Beeinflussung hydrophober Wechselwirkungen bedeutsamer ist als die Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen<sup>55</sup>. Im Gegensatz dazu kann der dissoziierende Effekt von DEA auf die Antigen-Antikörper-Bindung gänzlich auf das durch DEA erzeugte alkalische Milieu (pH-Wert > 11) zurückgeführt werden, was an Hand von Untersuchungen mit auf physiologischen pH-Wert abgepufferten DEA-Lösungen sowie mit Bicarbonatpuffern ohne DEA belegt wird<sup>5</sup>.

In Bezug auf die Auswertung der Messergebnisse und die Berechnung des Aviditätsindex AI existieren zahlreiche verschiedene Verfahrensweisen. Die wichtigsten werden im folgenden kurz beschrieben :

### **1. 10. 1. DSV-Methode (DEA shift value)**

Aus zwei parallel angesetzten, in 4er-Schritten fortlaufenden Verdünnungsreihen der jeweiligen Serumprobe, von denen bei der einen DEA zur Serumverdünnung zugesetzt wird und bei der anderen nicht, lassen sich nach Abarbeitung des ELISA's für jede Serumprobe zwei Titrationskurven generieren, indem die OD-Werte gegen den  $\log_{10}$  des Reziprokwertes der Serumverdünnungen aufgetragen werden (halblogarithmische Auftragung). Der „DEA shift value“ (DSV)<sup>6,8,18,19,48</sup> lässt sich dann aus dem horizontalen Abstand der beiden Titrationskurven bei halbmaximaler Absorption der nicht mit DEA behandelten Verdünnungsreihe errechnen. Parallel zu jeder untersuchten Serumprobe werden mindestens sechs Kontrollseren von Patienten mit länger zurückliegender, „alter“ Infektion getestet. Für diese Kontrollseren wird der durchschnittliche DSV (X) errechnet und anschließend zum 3- bzw. 5-fachen der Standardabweichung (SD) addiert<sup>6,8,18,19,48</sup>. In Abhängigkeit von der untersuchten Infektion und dem verwendeten Assay werden Testseren üblicherweise als positiv in Bezug auf die Anwesenheit von niedrig-aviden Ak klassifiziert, wenn ihre DSV's  $> X + 5 * SD$ 's der Kontrollseren sind, als zweideutig, wenn ihre DSV's  $\geq X + 3 * SD$ 's, aber  $\leq X + 5 * SD$ 's sind und als negativ (bei Reifung der Immunantwort), wenn ihre DSV's  $< X + 3 * SD$ 's sind<sup>6,8,18,19,48</sup>.

### **1. 10. 2. Einpunktmethode**

Bei der Einpunktmethode<sup>8,9,17-19,53,56,57</sup> wird der Aviditätsindex AI für jede Serumprobe bei einer einzigen Arbeitsverdünnung ermittelt. Die eingesetzte Arbeitsverdünnung kann entweder willkürlich festgelegt werden oder durch vorherige Titration der Probe ermittelt werden (üblicherweise wird dann ein OD-Wert ohne Elution mit dem denaturierenden Reagenz von  $1,0 \pm 0,1$  angestrebt). Die Bestimmung des Aviditätsindex AI bei dieser einen Probenverdünnung erfolgt, indem nach Seruminkubation die eine Hälfte der Näpfe mit PBS, die andere Hälfte mit einem denaturierenden Reagenz gewaschen wird und im Anschluss daran die Menge gebundener spezifischer Ak auf herkömmliche Weise gemessen wird. Der Aviditätsindex AI (in %) errechnet sich dadurch, dass der durchschnittliche OD-Wert der mit dem denaturierenden Reagenz behandelten

Näpfe durch den durchschnittlichen OD-Wert der unbehandelten Näpfe dividiert wird und mit 100 multipliziert wird. Ist der AI  $\leq 30\%$ , dominieren überwiegend niedrigavide Ak, ist er  $\geq 50\%$ , besitzt die Mehrzahl der Ak eine hohe Avidität. Ist der AI  $\geq 30\%$ , aber  $\leq 50\%$ , lässt sich über die Avidität spezifischer Ak keine eindeutige Aussage machen. Die genannten Prozentzahlen stellen Richtwerte dar, die in Bezug auf die untersuchte Infektion und den verwendeten Assay variieren können. Parallel zu allen untersuchten Testseren wird der AI von Kontrollseren gemessen, um die Reproduzierbarkeit des Assays zu überprüfen.

Da bei diesem Verfahren die Avidität bei nur einer einzigen Serumverdünnung bestimmt wird, ist die AI-Methode in der Routinediagnostik schnell und kostengünstig durchzuführen. Gleichzeitig ergibt sich daraus aber auch ein entscheidender Nachteil. Aufgrund der nichtlinearen Beziehung zwischen der optischen Dichte und der Ak-Konzentration ist die Avidität und damit auch der Aviditätsindex bis zu einem gewissen Maß von der Ak-Konzentration abhängig<sup>53</sup>. Dieser Effekt besitzt häufig für die Unterscheidung zwischen akuter und lange zurückliegender Infektion keine praktische serodiagnostische Bedeutung, es sei denn, der Titer spezifischer IgG-Ak ist sehr niedrig (bei Röteln z. B. IgG-Titer  $< 25$  IU/ml)<sup>5</sup>.

### **1. 10. 3. Endpunkttiter-Methode**

Trotz der Kostspieligkeit und des hohen technischen Aufwandes gilt die Endpunkttiter-Methode<sup>20,30,37,43,58-62</sup> derzeit aufgrund ihrer exzellenten Sensitivität und Spezifität als Referenzmethode für die Aviditätsbestimmung bei zahlreichen Mikrobeninfektionen<sup>5,58</sup>. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass durch Angabe der Antikörperavidität als Verhältnis der IgG-Endpunkttiter (sog. „Aviditätstiter“) per definitionem keine Abhängigkeit von der Ak-Konzentration besteht<sup>5,58</sup>.

Im Gegensatz zur Einpunktmethode sind für die Endpunkttiter-Methode zwei parallel angesetzte, in 2er-Schritten fortlaufende Verdünnungsreihen der jeweiligen Serumprobe erforderlich. Nach Inkubation der Serumverdünnungen wird die eine Hälfte der Näpfe mit einem Puffer, z. B. PBS, gewaschen, während die andere Hälfte mit einem denatu-



rierenden Reagenz, z. B. PBS-Harnstoff, behandelt wird. Anschließend wird die Menge gebundener spezifischer Ak auf herkömmliche Weise gemessen. Auf diese Weise ergeben sich für jede Serumprobe zwei Titrationskurven, eine für die ohne bzw. eine für die mit dem denaturierenden Reagenz behandelten immobilisierten Immunkomplexe. Als sog. Endpunkttiter versteht man die niedrigste Verdünnung einer Probe, die in Bezug auf einen vorbestimmten Grenzwert nachgewiesen werden kann. Dieser untere Grenzwert wird als sog. „Cutoff“ bezeichnet. Die Antikörperavidität wird dabei als Verhältnis der IgG-Endpunkttiter (Ratio of IgG end-point titers oder kurz EPR) angegeben, indem der Endpunkttiter mit Behandlung durch ein denaturierendes Reagenz durch den ohne Elution mit einem denaturierenden Agens dividiert wird und das Ergebnis anschließend mit 100 multipliziert wird (sog. „Aviditätstiter“ = Aviditätsindex in %).

## 2. AUFGABENSTELLUNG

### 2. 1. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen zur Avidität von anti-HIV-Ak sind bislang nur in relativ wenigen Publikationen abgehandelt worden <sup>4,8,9,56,57,63-67</sup>. Im Vordergrund dieser Arbeiten stehen kinetische Untersuchungen zur Aviditätsreifung der humoralen Immunantwort bei akut bzw. chronisch infizierten HIV-Patienten. In der frühen Phase nach HIV-Serokonversion ist lediglich für Anti-gp41-IgG eine Zunahme der Avidität im Sinne einer Reifung der Immunantwort zu beobachten <sup>4,8</sup>, während für Anti-p17- und Anti-p24-IgG sehr viel variablere Aviditätsverläufe festzustellen sind <sup>8,56,57,63</sup>. Eine Unterscheidung von frischer und länger zurückliegender, alter HIV-Infektion scheint folglich nur durch Bestimmung der anti-gp41-IgG-Avidität verlässlich möglich zu sein <sup>8</sup>. Ferner wird von einer im Vergleich zu Patienten mit asymptomatischer HIV-Infektion signifikant niedrigeren anti-p17- bzw. anti-p24-IgG-Avidität bei AIDS-Patienten berichtet <sup>56,63</sup>. Darüber hinaus soll die Avidität der anti-p17- und anti-p24-IgG-Antwort mit dem klinischen Verlauf der Infektion korrelieren, wobei der Abfall der anti-gag-IgG-Avidität bzw. das Fehlen hochavidere anti-gag-IgG-Ak ein früheres Anzeichen für eine Krankheitsprogression darstellen soll als die Abnahme der T4-Zellzahl bzw. des Ak-Titers <sup>56,57,63</sup>. Demnach wäre die anti-gag-IgG-Avidität als prädiktiver prognostischer Marker gut geeignet <sup>56,57,63</sup>.

Sowohl die mögliche Bedeutung der Ak-Avidität als prädiktiver Parameter im Hinblick auf die Krankheitsprogression und damit auf die Prognose der HIV-Infektion als auch der mögliche Einfluss einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) auf den zeitlichen Verlauf der Ak-Avidität sind nach heutigem Kenntnisstand unzureichend wissenschaftlich untersucht.

Demnach ist die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit klar umschrieben : Es soll der zeitliche Verlauf der Avidität HIV-spezifischer Ak an Patientenkollektiven mit bzw. ohne HAART untersucht werden. Im Anschluss soll der Aviditätsverlauf mit der zeitlichen Entwicklung von Viruslast und CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl verglichen werden, um feststellen zu können, ob zwischen diesen Parametern eine Korrelation besteht. Darüber hinaus soll abgeklärt werden, ob die Antikörperavidität einen prädiktiven Parameter in Bezug auf

die Progression und Prognose der HIV-Infektion darstellt. Schließlich sollen mögliche Auswirkungen der antiretroviralen Therapie auf die Höhe des Aviditätsindex und damit auf die humorale Immunantwort analysiert werden.

Die Arbeit lässt sich in folgende Teilschritte gliedern :

- 1.) Auswahl der für die Beschichtung mit den HIV-Proteinen am besten geeigneten Mikrotiterplatten sowie Optimierung der Beschichtungsbedingungen (Art und pH-Wert des Beschichtungspuffers, Konzentration der einzelnen HIV-Proteine, Elimination unspezifischer Antikörperbindung).
- 2.) Unter Verwendung von Serumproben von Patienten mit seit langem bekannter HIV-Infektion respektive mit frischer HIV-Infektion Auswahl des denaturierenden Reagenz zur Dissoziation der gebildeten Immunkomplexe (Elutionsmethode) und Bestimmung jener Konzentration, mit der eine Differenzierung von frischer (akuter) bzw. „alter“ HIV-Infektion möglich ist.
- 3.) Ermittlung der Intra-Assay-Variabilität für die verschiedenen Mikrotiterplatten und Prüfung der Stabilität der mit HIV-Protein beschichteten festen Phase gegenüber dem denaturierenden Reagenz.
- 4.) Zusammenstellung der drei Patientenkollektive (Gruppe der Langzeitüberlebenden [sog. Long Term Survivors, kurz LTS]; Gruppe der HIV-Patienten mit rascher Krankheitsprogression [PROG]; Gruppe der HIV-Patienten mit Hemmung der Progression durch HAART [HAART]) sowie der entsprechenden Serum- bzw. Plasmaproben.
- 5.) Einsatz von Vorverdünnungen zur Abschätzung der Reaktivität der einzelnen Serum- bzw. Plasmaproben und Festlegung der zur Aviditätsmessung optimalen Serumverdünnungen (OD-Werte ohne Harnstoff zwischen 0,5 und 2,0).
- 6.) Bestimmung der Antikörperavidität an Hand von jeweils vier in 2er-Schritten fortlaufenden Verdünnungen pro Serumprobe und anschließende graphische Auswertung mittels Microsoft Excel® zur Ermittlung des durchschnittlichen Aviditätsindex (unabhängig von der jeweiligen Serumverdünnung bzw. Antikörperkonzentration).

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3. 1. Chemikalien und Verbrauchsmittel**

Die Beschichtung der HIV-Proteine wurde unter Verwendung von Mikrotiterplatten der folgenden Firmen ausgeführt :

##### **1.) NUNC :**

MAXISORP®

POLYSORP®

MEDISORP®

COVA-LINK®

##### **2.) CORNING COSTAR :**

#3590

#3690

#3695

#9017

DNA-BIND®

UNIVERSAL-BIND®

CARBO-BIND®

SULFHYDRYL-BIND®

##### **3.) NUNC/DADE BEHRING :**

B-Modul®

E-Modul®

C-Modul®

BC-Modul®

##### **4.) DYNATECH IMMULON :**

IMMULON I

IMMULON II HB

IMMULON IV

IMMULON 129A

IMMULON 129B

##### **5.) GREINER :**

#655061

#655001

Für die Herstellung der diversen Puffersysteme (Waschpuffer, Beschichtungspuffer, Blockierungspuffer etc.), für die Aktivierung der HIV-Proteine bzw. der Mikrotiterplatten sowie für die Abarbeitung der ELISA's wurden Chemikalien der folgenden Firmen verwendet :

NaCl	Ferak, Artikel# 01121
KCl	Merck, Artikel# 4936
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dihydrat)	Merck, Artikel# 6580
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Artikel# 4873
BSA	Roth, Artikel# 8076.3
Tween 20	AppliChem, Artikel# A1389
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Artikel# 6392.0500
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Artikel# 6329
Cyanurchlorid (C <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> )	Sigma, Artikel# C9,550-1
EDAC * HCl (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> )	Sigma, Artikel# E 7750
Sulfo-NHS (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> NSO <sub>4</sub> Na)	Sigma, Artikel# 34,185-1
Aceton (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O)	AppliChem, Artikel# A 1582
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	AppliChem, Artikel# A 0688
MgSO <sub>4</sub> (Heptahydrat)	Merck, Artikel# 5886
DTT (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	Sigma, Artikel# D-9779
NaIO <sub>4</sub>	Sigma, Artikel# S-1878
Essigsäure 100% (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Ferak, Artikel# 00697
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na)	Sigma, Artikel# S-8750
FBS	Gibco, Artikel# 10270106
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	AppliChem, Artikel# A 1104
Magermilchtrockenpulver	Töpfer, Artikel# 009
Concanavalin A Typ IV	Sigma, Artikel# C2010
Harnstoff (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O)	Sigma, Artikel# U-1250
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Merck, Artikel# 1.08387.0500
Tris-HCl (C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> Cl)	Sigma, Artikel# T-3253
1-Butanol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	Roth, Artikel# 7724.1

---

Harnstoff-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Artikel# 8.18356.0500
TMB	Dade Behring
Anti-Human-IgG/POD-Konjugat	Dade Behring
POD-Stopplösung	Dade Behring
POD-Waschpuffer	Dade Behring
POD-Probenpuffer	Dade Behring
NaOH 1 M	AppliChem, Artikel# A 1432
HCl 1 M	AppliChem, Artikel# A 1434
Essigsäure 1 M	Aldrich, Artikel# 31,859-0

### **Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Puffersysteme :**

- 1.) Phosphate Buffered Saline (PBS) : 0,15 M, pH 7,4 bzw. 9,0

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g

- 2.) Carbonat-/Bicarbonatpuffer : 0,05 M, pH 9,6

Ansatz für 1 Liter :

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,12 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,52 g

- 3.) COVA<sup>®</sup>-Puffer (Rezeptur nach NUNC) : pH 7,2

Ansatz für 1 Liter :

PBS 1,5 M, pH 7,2	100 ml
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10,00 g
NaCl	116,90 g
Tween 20	0,50 ml

- 4.) Essigsäure-/Natriumacetat-Puffer : 0,01 M, pH 5,5

Ansatz für 1 Liter :

CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na	0,82 g
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H (Eisessig, 100 %)	0,60 g

- 5.) PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 10 % FBS (Fetal bovine serum)

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
FBS	100 ml

- 6.) PBS-Puffer (0,15 M, pH 6,5) mit 1 mM EDTA bzw. 1 mM EDTA und 14 µM DTT

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
EDTA	0,29 g
DTT	2,20 mg

- 7.) PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 2,5 % BSA (sterile Zubereitung)

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
BSA	25,00 g

- 8.) PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 0,2 % „non fat dry milk“ (Trockenmilchpulver mit niedrigem Fettanteil)

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Non fat dry milk	2,00 g

- 9.) PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 2,5 % Tween 20

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Tween 20	25,0 ml

- 10.) PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 4 M Harnstoff bzw. mit 4 M Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ansatz für 1 Liter :

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Harnstoff	240,24 g
Harnstoff-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	376,16 g

- 11.) Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,4) mit 0,5 % NaCl und 0,1 % Tween 20

Ansatz für 1 Liter :

Tris-HCl	6,61 g
Tris-Base	0,97 g
NaCl	5,00 g
Tween 20	1,0 ml



- 12.) Carbonat-/Bicarbonatpuffer (0,05 M, pH 9,6) mit 0,2 % BSA und 1 % n-Butanol

Ansatz für 1 Liter :

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,12 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,52 g
BSA	2,00 g
n-Butanol	10,0 ml

Für die EIA-Abarbeitung wurden die Reagenzien aus den Enzygnost<sup>®</sup> Kits der Firma Dade Behring, Marburg, Deutschland, verwendet. Die Inhaltsstoffe gemäß Packungsbeilage sind :

- 13.) Proben-Puffer POD

Tris-Puffer 0,3 mol/l mit den Konservierungsmitteln :

Amphotericin B	ca. 5,0 mg/l
Gentamycin	ca. 100,0 mg/l

- 14.) Konjugat-Puffer Microbiol.

Phosphat-Puffer 0,01 mol/l mit 37 mg/l EDTA und den Konservierungsmitteln :

Gentamycin	ca. 100,0 mg/l
5-Chlor-2-Methylisothiazol-3-on	ca. 6,0 mg/l
2-Methyl-4-Isouthiazol-3-on	2,0 mg/l

- 15.) Anti-Human-IgG/POD-Konjugat

Tris-Puffer 0,05 mol/l mit dem Fab-Anteil eines Kaninchen-Ak's, der mit Peroxidase (POD) konjugiert wurde sowie mit :

Patentblau (Farbstoff)	max. 60,0 mg/l
Phenol (Konservierungsmittel)	max. 1,0 g/l

Gebrauchsverdünnung ist 1+50

- 16.) Stopplösung POD

Schwefelsäure-Lösung 0,5 N

- 17.) Waschlösung POD (Konzentrat)  
Phosphatpuffer 90 mmol/l mit 18 g/l Tween sowie mit :  
Phenol (Konservierungsmittel) max. 1,0 g/l  
Gebrauchsverdünnung (mit destilliertem oder entionisiertem Wasser) ist 1+19
- 18.) Puffer-/Substratlösung für TMB  
Acetat-Pufferlösung 25 mmol/l mit :  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ca. 0,1 g/l  
n-Butanol (Konservierungsmittel) ca. 1,0 %
- 19.) Chromogen TMB  
Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid 5,0 g/l  
Chromogen-Gebrauchsverdünnung 1+10  
Nach frischer Zubereitung unbedingt unter Lichtschutz aufbewahren

Der pH-Wert der verschiedenen Puffersysteme wurde entsprechend den Anforderungen mit 1 M Salzsäure bzw. 1 M Natronlauge eingestellt, mit Ausnahme des Essigsäure-, Natriumacetat-Puffers, wo neben 1 M Natronlauge 1 M Essigsäure zur pH-Korrektur verwendet wurde.

### 3. 2. Gerätschaften

pH-Meter	WTW, pH90
Photometer	Dade Behring, EL 311
ELISA-Automat	Dade Behring, BEP III
Zentrifuge	Heraeus, Biofuge 13
Vortexer	GLW, L46
UV-Crosslinker	Stratagene, Stratalinker 1800

### **3. 3. Rekombinante Virusproteine**

Rekombinantes HIV-1 HXB2 p17 und p24 (rp17 bzw. rp24) wurden vom MRC AIDS Directed Programme (Gabe von Dr. G. Reid, Universität von Glasgow, UK) bezogen. rp17 und rp24 wurden in einem pGEX-System als Glutathion S-Transferase-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und anschließend chromatographisch gereinigt<sup>68</sup>.

Die rekombinanten und gereinigten HIV-Proteine p55 (Kp55) und gp120 (W61D-lot 47/027) wurden von der Firma SmithKline Beecham Pharmaceuticals bezogen und von Priv.-Doz. Dr. C. Jassoy vom Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Kp55 wurde in *E. coli*, gp120 in CHO (Chinese hamster ovary cells) exprimiert.

Das HIV-Protein gp41 wurde von der Firma Dade Behring (Gabe von Dr. H.-P. Hauser, Dade Behring, Infectious Disease Diagnostics, Marburg, Deutschland) bereitgestellt. Gp41 wurde als Fusion mit Maltose bindendem Protein (pMAL) exprimiert. Darüber hinaus stellte die Firma Dade Behring freundlicherweise auch Maltose bindendes Protein (pMAL) ohne Fremdanteile als Negativkontrolle zur Verfügung.

Alle HIV-Proteine wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren gelagert. Die entsprechenden Protein-stammlösungen wurden mit Hilfe von PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,40) auf eine Endkonzentration zwischen 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Die resultierenden Aliquots wurden ebenfalls bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren gelagert.

### **3. 4. Serum- bzw. Plasmaproben der HIV-Patienten**

Die Serum- bzw. Plasmaproben aller HIV-Patienten wurden in einem Zeitraum zwischen Anfang 1991 und Anfang 2001 aus peripherem Blut gewonnen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Studie wurden die Proben aliquotiert (50  $\mu\text{l}$  Aliquots) und anschließend wieder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren gelagert. Alle Proben wurden vor Verwendung für 0,5 h bei  $56^{\circ}\text{C}$  hitzeinaktiviert, um die Infektiosität der Proben zu reduzieren.

Untersuchungen mit EBV-positiven Serumproben haben gezeigt, dass die Hitzeinaktivierung keinen Einfluss auf die Antikörperavidität hat. Unmittelbar vor der Herstellung der entsprechenden Serumverdünnungen wurden alle Serumproben fünf Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert.

Pro HIV-Patient wurden zwischen zwei bis sechs Serum- bzw. Plasmaproben auf ihre Antikörperavidität hin untersucht. Die zeitliche Differenz der aufeinanderfolgenden Proben betrug zwischen ein bis maximal drei Jahre, abhängig von der Verfügbarkeit und Quantität der Proben sowie von der Dauer der HIV-Erkrankung. Eine Ausnahme diesbezüglich stellten die drei Patienten mit frischer HIV-Infektion dar, bei denen pro Patient zwischen zwei und vier Serum- bzw. Plasmaproben auf ihre Antikörperavidität untersucht wurden und das zeitliche Intervall der fortlaufenden Proben mit ein bis zwei Monaten deutlich kürzer gewählt wurde.

Wenn möglich, so war die erste auf Antikörperavidität hin analysierte Serum- bzw. Plasmaprobe die älteste asservierte von dem betreffenden Patienten. Die letzte auf Avidität untersuchte Patientenprobe datierte aus dem Zeitraum von 1999-2001, sofern die Patienten nicht vorher verstorben waren.

### **3. 5. Patientenkollektiv**

Die Gesamtzahl von HIV-Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, betrug 39. Davon waren 27 Probanden männlichen und 12 weiblichen Geschlechts. Das Alter der HIV-Infizierten lag zwischen 27 und 75 Jahren. Von den 39 HIV-Patienten, deren Serum- bzw. Plasmaproben retrospektiv zwischen den Jahren 1991 und 2001 untersucht wurden, verstarben 11 Patienten bis Mitte 2001 an der HIV-Infektion. Die Patienten wurden gemäß ihrem klinischen Status und Verlauf der HIV-Infektion in vier Gruppen eingeteilt :

- LTS-Gruppe :** Zwölf Patienten (davon 11 männlich, 1 weiblich; ein Patient infolge einer anderen Erkrankung verstorben), die als sog. Langzeitüberlebende („Long term survivors“, kurz LTS) klassifiziert wurden.
- PROG-Gruppe :** Elf Patienten (davon sieben männlich, vier weiblich; 10 Patienten bereits verstorben), die vor der HAART-Ära durch eine rasche Progression der HIV-Infektion charakterisiert waren.
- HAART-Gruppe :** Dreizehn Patienten (davon sieben männlich, sechs weiblich; kein Patient bislang verstorben), bei denen durch HAART eine Hemmung der Krankheitsprogression erzielt werden konnte.
- SKP-Gruppe :** Drei Patienten (davon zwei männlich, einer weiblich; kein Patient bislang verstorben), die als Patienten in der HIV-Serokonversionsphase eingestuft wurden.

Als Positivkontrolle wurde die Serumprobe eines 38-jährigen männlichen HIV-Patienten verwendet, bei dem die Infektion mit HIV seit 1984 bekannt ist und der seit Mai 1999 mit HAART behandelt wird. Die Avidität der Positivkontrolle wurde parallel zu allen auf Avidität hin untersuchten Serum- bzw. Plasmaproben der ausgewählten HIV-Patienten bestimmt, um die Reproduzierbarkeit des entwickelten ELISA-Testverfahrens überprüfen zu können.

### **3. 6. Vorbemerkungen zur EIA-Versuchsdurchführung**

Alle Voruntersuchungen, die zum Zweck die Auswahl der geeigneten ELISA-Mikrotiterplatte sowie die Optimierung der Beschichtungsbedingungen (Beschichtungskonzentrationen der HIV-Proteine, Puffersysteme, Elimination der unspezifischen Bindung etc.) hatten, wurden mit Serumproben (Proben-Nummern : 1999010359, 1999010936,

1999012244 und 1999012916) von HIV-Patienten durchgeführt, die im Western Blot eine starke Intensität aller HIV-spezifischen Banden zeigten.

Die Abarbeitung der ELISA-Mikrotiterplatten erfolgte bei allen Aviditätsmessungen ausschließlich manuell, im Rahmen der Optimierung der Beschichtungsbedingungen wurde hingegen zumindest teilweise auf die automatisierte Abarbeitung der ELISA-Platten zurückgegriffen. Manuelle und automatisierte Abarbeitung unterschieden sich in Bezug auf die Anzahl und Art der einzelnen Abarbeitungsschritte sowie in Bezug auf die Inkubationszeiten nicht. Ein direkter Vergleich beider Abarbeitungsverfahren erbrachte keinen signifikanten Unterschied.

Alle zur Austestung in Frage kommenden und mit den HIV-Proteinen p17, p24, p55, gp41 und gp120 beschichteten ELISA-Mikrotiterplatten wurden anfangs mit einer Serumverdünnung von 1:50 auf ihre Reaktivität hin überprüft. Diejenigen ELISA-Platten, bei denen OD-Werte von 2,5 und mehr zu erzielen waren, wurden anschließend bei höheren, in 4er-Schritten fortlaufenden Verdünnungen, üblicherweise 1:200, 1:800, 1:3200 und, je nach Reaktivität, auch 1:12800 und 1:51200, getestet.

### **3. 7. Allgemeine EIA-Versuchsdurchführung**

Zunächst wurde mittels PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) bzw. Bicarbonat-Puffer (0,05 M, pH 9,6) eine in 2er-Schritten fortlaufende Verdünnungsreihe der HIV-Proteine p17, p24, p55, gp41 und gp120 hergestellt. Zur Evaluierung der diversen Mikrotiterplatten wurden folgende Proteinkonzentrationen (in µg/ml) eingesetzt : 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156 und 0,078. Anschließend wurden je 50 µl von jeder HIV-Protein-Verdünnungsstufe in die Näpfe der entsprechenden ELISA-Platten pipettiert, die Platten mit einer Klebefolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 8-10°C inkubiert. Nach Abzug des Überstandes im Wasserstrahlvakuum wurden freie Bindungsstellen mit jeweils 200 µl pro Napf einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung für 2 h bei 37°C in einer feuchten Kammer blockiert. Danach wurde fünfmal mit jeweils 200 µl pro Napf einer Tris-HCl-Lösung (0,05 M, pH 7,4) mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Dann wurden je 100 µl der jeweiligen Serumprobe, mit POD-Probenpuffer auf die entsprechenden Verdünnungen eingestellt, in die Näpfe pipettiert und dann für 1 h bei 37°C in einer

feuchten Kammer inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit je 200 µl pro Napf einer POD-Standardwaschlösung wurden je 100 µl pro Napf Anti-Human-IgG/POD-Konjugatlösung den Nöpfen zugegeben und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Schließlich wurde erneut fünfmal mit je 200 µl pro Napf der POD-Standardwaschlösung gewaschen. Im Anschluss daran wurden je 100 µl pro Napf TMB-Chromogenlösung in die Nöpfe der Platten pipettiert und für 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wurden je 100 µl pro Napf POD-Stopplösung zugesetzt und unmittelbar danach die Extinktion im Photometer bestimmt (Messwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 650 nm).

### **3. 8. Spezielle Beschichtungs- und EIA-Abarbeitungsmethoden bei den einzelnen Plattensystemen**

*1.) HIV-EIA unter Verwendung der EIA-Mikrotiterplatten COSTAR #3590, IMMULON IIHB #3455, NUNC Polysorb<sup>®</sup> und Maxisorb<sup>®</sup> sowie GREINER #655061 und #655001*

Im Vergleich zur allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung bestanden folgende Unterschiede :

- Zur Beschichtung der oben aufgeführten Mikrotiterplatten wurden die HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 verwendet.
- Als Beschichtungspuffer kam PBS (0.15 M, pH 7,4) zum Einsatz.
- Alle Waschschritte wurden mit der POD-Standardwaschlösung durchgeführt.
- Die Anzahl der Waschschritte betrug jeweils vier.

*2.) HIV-EIA unter Verwendung einer NUNC COVALINK<sup>®</sup> Mikrotiterplatte*

Zwei Variationen der Beschichtung waren mit dieser Mikrotiterplatte möglich :

A) Oberflächenaktivierung mit Cyanurchlorid („Technical Notes“ Volume 4 No. 29 von NUNC<sup>69</sup> mit geringfügiger Modifikation) :

Zunächst wurde die Aktivierungslösung für die ELISA-Platte hergestellt, indem 48 mg Cyanurchlorid in 48 ml Methanol gelöst wurden. Innerhalb von zwei Minuten nach der Herstellung wurden je 100 µl von dieser Lösung in die Näpfe der ELISA-Platte pipetiert und dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abzug des Überstandes im Wasserstrahlvakuum wurde dreimal mit je 200 µl pro Napf Methanol gewaschen und die so aktivierte ELISA-Platte sofort zur Beschichtung mit den HIV-Proteinen verwendet.

Das weitere Vorgehen entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung mit den folgenden Modifikationen :

- Zur Beschichtung der oben aufgeführten Mikrotiterplatte wurden die HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 verwendet.
- Als Beschichtungspuffer kam ausschließlich Bicarbonat-Puffer (0.05 M, pH 9,6) zum Einsatz.
- Die Inkubation der HIV-Proteinlösungen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.
- Nach Abzug der HIV-Proteinlösungen wurde dreimal mit je 300 µl pro Napf Cova<sup>®</sup>-Puffer gewaschen.
- Auf eine Blockierung freier Bindungsstellen mit einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung wurde verzichtet.
- Alle übrigen Waschschrte wurden mit POD-Standardwaschlösung durchgeführt, die Anzahl der Waschschrte betrug jeweils vier.

B) Aktivierung der HIV-Proteine mit Sulfo-NHS und EDAC („Technical Notes“ Volume 4 No. 28 von NUNC<sup>69</sup>) :

Zunächst wurde mittels Bicarbonat-Puffer (0,05 M, pH 9,6) eine in 2er-Schritten fortlaufende Verdünnungsreihe der HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 mit den Kon-



zentrationen 30, 15, 7,5, 3,75, 1,875, 0,938, 0,469 und 0,234 µg/ml hergestellt. Anschließend wurden je 50 µl von jeder HIV-Protein-Verdünnungsstufe in die Näpfe der Mikrotiterplatte vorgelegt. Danach wurden zuerst je 50 µl pro Napf einer 16 µM Sulfo-NHS/Aqua dest.-Lösung sowie im weiteren je 50 µl pro Napf einer 16 µM EDAC/Aqua dest.-Lösung hinzupipettiert.

Die weitere Abarbeitung entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung mit den folgenden Modifikationen :

- Die Inkubation der HIV-Proteinlösungen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.
- Nach Abzug der HIV-Proteinlösungen wurde zunächst dreimal mit je 200 µl pro Napf Aqua dest. und dann dreimal mit je 200 µl pro Napf einer POD-Standardwaschlösung gewaschen.
- Auf eine Blockierung freier Bindungsstellen mit einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung wurde verzichtet.
- Alle übrigen Waschschrte wurden mit POD-Standardwaschlösung durchgeführt, die Anzahl der Waschschrte betrug jeweils vier.

### 3.) HIV-EIA unter Verwendung der Mikrotiterplatten COSTAR #3690 und #3695

Verglichen mit der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung bestanden die folgenden Unterschiede :

- Aufgrund des reduzierten Füllungsvermögens der EIA-Platten betrug das Waschvolumen pro Waschschrte und Napf lediglich 150 µl.
- Aus demselben Grund wurde das Reagenzvolumen der POD-Stopplösung auf 50 µl limitiert.

#### 4.) HIV-EIA unter Verwendung der Mikrotiterplatte COSTAR UNIVERSAL-BIND®

Zunächst wurden gemäß der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung die HIV-Proteinlösungen hergestellt und je 50 µl von jeder HIV-Protein-Verdünnungsstufe in die Näpfe der Mikrotiterplatte pipettiert. Im folgenden wurde die Platte mit einer Alufolie abgedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Nach Abdekantieren des Überstandes erfolgte die Bestrahlung der EIA-Platte in einem UV-Stratalinker 1800 mit UV-Licht (254 nm, Intensität 270 bzw. 360 mJ/cm<sup>2</sup>).

Das weitere Vorgehen entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung mit den folgenden Modifikationen :

- Zur Beschichtung der oben aufgeführten Mikrotiterplatte wurden die HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 verwendet.
- Freie Bindungsstellen wurden mit einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung für 0,5 h bei 37°C in einer feuchten Kammer blockiert.
- Nach der Blockade freier Bindungsstellen erfolgte kein Waschsritt, der Überstand wurde lediglich abdekantiert.
- Sämtliche Waschsritte wurden mit POD-Standardwaschlösung durchgeführt, die Anzahl der Waschsritte betrug jeweils vier.

#### 5.) HIV-EIA unter Verwendung der Mikrotiterplatte COSTAR DNA-BIND®

Im Vergleich zur allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung bestanden folgende Unterschiede :

- Zur Beschichtung der oben aufgeführten Mikrotiterplatte wurden die HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 verwendet.
- Als Beschichtungspuffer kam ausschließlich PBS (0.15 M, pH 9,0) zum Einsatz.

- Die Inkubation der HIV-Proteinlösungen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.
- Nach Abzug der HIV-Proteinlösungen wurde dreimal mit je 300 µl pro Napf einer PBS-Tween 20 2,5 %-igen Lösung gewaschen.
- Freie Bindungsstellen wurden mit einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung für 0,5 h bei 37°C in einer feuchten Kammer blockiert.
- PBS (0,15 M, pH 7,4) mit 10 % FBS als Zusatz wurde zur Herstellung der entsprechenden Serumverdünnungen verwendet.
- Alle übrigen Waschschrirte wurden mit POD-Standardwaschlösung durchgeführt, die Anzahl der Waschschrirte betrug jeweils vier.

#### 6.) HIV-EIA unter Verwendung der Mikrotiterplatte COSTAR SULFHYDRYL-BIND®

Im Vergleich zur allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung ergaben sich die folgenden Modifikationen :

- Zur Beschichtung der oben aufgeführten Mikrotiterplatte wurden die HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 verwendet.
- Als Beschichtungspuffer wurde PBS-EDTA- bzw. PBS-EDTA-DTT-Puffer (0,15 M PBS, pH 6,5) eingesetzt.
- Die Inkubation der HIV-Proteinlösungen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.
- Nach Abzug der HIV-Proteinlösungen folgten drei Waschschrirte mit PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4).
- Freie Bindungsstellen wurden mit PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 0,2 % Magermilchpulver für 0,5 h bei 37°C in einer feuchten Kammer blockiert.
- Nach der Blockade freier Bindungsstellen erfolgte kein Waschschrirte, der Überstand wurde lediglich abdekantiert.
- PBS (0,15M, pH 7,4) mit 10 % FBS als Zusatz wurde zur Herstellung der entsprechenden Serumverdünnungen verwendet.
- Alle übrigen Waschschrirte wurden mit POD-Standardwaschlösung durchgeführt, die Anzahl der Waschschrirte betrug jeweils vier.

7.) HIV-EIA unter Verwendung der EIA-Platte COSTAR CARBOHYDRATE-BIND®

Zunächst wurde mit Hilfe eines Essigsäure-, Natriumacetat-Puffers (0,01 M, pH 5,5) eine in 2er-Schritten fortlaufende Verdünnungsreihe der HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 mit den Konzentrationen 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313 und 0,156 µg/ml hergestellt. Anschließend wurde eine 30 mM NaIO<sub>4</sub>-Lösung in Natriumacetatpuffer (0,01 M, pH 5,5) für die Aktivierung der HIV-Proteine zubereitet. Unmittelbar nach Präparation wurden jeweils 50 µl der NaIO<sub>4</sub>-Lösung zu gleichen Teilen der jeweiligen HIV-Protein-Verdünnungsstufe gegeben und für 0,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden je 100 µl des Reaktionsgemisches in die Näpfe der EIA-Platte überführt, die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die weitere Vorgehensweise entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung mit den folgenden Veränderungen :

- Nach Abzug der HIV-Proteinlösungen wurde dreimal mit einer PBS-Tween 20 2,5 %-igen Lösung gewaschen.
- Freie Bindungsstellen wurden mit einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung für 0,5 h bei 37°C in einer feuchten Kammer blockiert.
- Nach der Blockade freier Bindungsstellen erfolgte kein Waschschrift, der Überstand wurde lediglich abdekantiert.
- PBS (0,15 M, pH 7,4) mit 10 % FBS als Zusatz wurde zur Herstellung der entsprechenden Serumverdünnungen verwendet.
- Alle übrigen Waschschriffe wurden mit POD-Standardwaschlösung durchgeführt, die Anzahl der Waschschriffe betrug jeweils vier.

8.) ConA HIV-EIA unter Verwendung der Mikrotiterplatte IMMULON IIHB #3455 und Concanavalin A gemäß Cole et al.<sup>70</sup>

Zunächst wurde eine Immulon II HB Mikrotiterplatte mit je 100 µl pro Napf einer PBS-ConA-Lösung (0,15 M, pH 7,4; ConA-Konzentration 50 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abzug des Überstandes wurde zweimal mit je 200 µl pro Napf PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) gewaschen.

Die auf diese Weise mit Concanavalin A beschichtete EIA-Platte wurde zur Adsorption des HIV-Glykoproteins gp120 verwendet. Die weitere Vorgehensweise entsprach dabei der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung mit den folgenden Änderungen :

- Lediglich das HIV-Glykoprotein gp120 wurde zur Beschichtung der präparierten Immulon-Mikrotiterplatte verwendet, als Beschichtungspuffer wurde PBS (0,15 M, pH 7,4) eingesetzt.
- Freie Bindungsstellen wurden mit PBS-Puffer (0,15 M, pH 7,4) mit 5,0 % Magermilchpulver für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer blockiert.
- Als Waschpuffer wurde PBS (0,15 M, pH 7,4) eingesetzt.
- Die Anzahl der Waschschrte betrug jeweils vier, mit einer Ausnahme : Nach Blockade freier Bindungsstellen folgten lediglich zwei Waschschrte.

9.) HIV-EIA unter Verwendung eines Bicarbonatbeschichtungspuffers mit 0,2 % BSA als Zusatz

Im Vergleich zur allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung bestanden die folgenden Modifikationen :

- Als Mikrotiterplatte wurde die Costar #3695 EIA-Platte gewählt.
- Zur Beschichtung der Costar-Mikrotiterplatte wurden die HIV-Proteine p17, p24 und p55 eingesetzt.
- Als Beschichtungspuffer wurde ein Bicarbonat-Puffer (0,05 M, pH 9,6) mit 1,0 % n-Butanol und 0,2 % BSA als Zusätze verwendet.

- Die Inkubation der HIV-Proteinlösungen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.
- Auf eine Blockierung freier Bindungsstellen mit einer PBS-BSA 2,5 %-igen Lösung wurde verzichtet.
- Bei sämtlichen Waschsritten kam ein Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,4) mit 0,1 % Tween 20 zum Einsatz.
- Die Anzahl der Waschsritte betrug jeweils vier, mit einer Ausnahme : Nach Abzug der HIV-Proteinlösungen folgten lediglich zwei Waschsritte.

10.) HIV-EIA unter Verwendung der EIA-Platten COSTAR #9017, NUNC MEDISORP<sup>®</sup>, IMMULON I, IV, 129A und B sowie der B-, E-, C- und BC-Modul<sup>®</sup>-Platten von NUNC / Dade Behring

Verglichen mit der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung bestanden nur die folgenden Unterschiede :

- Die Anzahl der Waschsritte betrug jeweils vier.
- Bei der EIA-Platte Costar #9017 wurden alle Waschsritten mit einem Tris-HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,4) mit 0,1 % Tween 20 durchgeführt.

### **3. 9. Bestimmung der optimalen HIV-Protein-Beschichtungskonzentration**

Die Versuchsdurchführung entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung. Für die HIV-Proteine p17, p24 und p55 wurde die EIA-Platte Costar #3695 verwendet, für die Glykoproteine gp41 und gp120 die Costar #3690 bzw. Nunc / Dade Behring B-Modul<sup>®</sup> Mikrotiterplatte. Als Beschichtungspuffer wurde für die HIV-Proteine p17, p24, p55 und gp120 PBS (0,15 M, pH 7,4) verwendet, für das Glykoprotein gp41 dagegen ein Bicarbonatpuffer (0,05 M, pH 9,6). Modifiziert wurden zusätzlich die eingesetzten Beschichtungskonzentrationen und die zur Erstellung der Titrationskurven notwendigen Serumverdünnungen (in 2er-Schritten fortlaufend), die im Anschluss für jedes HIV-Pro-

tein aufgelistet sind. Die getestete Serumprobe trug die Nummer 1999012244 und war für alle HIV-Proteine identisch.

HIV-p17 : Konzentrationsbereich : 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0 und 1,5 µg/ml  
Serumverdünnungsstufen : 1:12,5 bis 1:25600

HIV-p24 : Konzentrationsbereich : 2,0, 1,5, 1,0 und 0,5 µg/ml  
Serumverdünnungsstufen : 1:50 bis 1:25600 (bei Beschichtungskonzentration 1,0 µg/ml 1:12,5 bis 1:6400, bei 0,5 µg/ml 1:25 bis 1:3200)

HIV-p55 : Konzentrationsbereich : 1,75, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75 und 0,5 µg/ml  
Serumverdünnungsstufen : 1:25 bis 1:3200 (bei Beschichtungskonzentrationen 1,75 und 1,5 µg/ml 1:100 bis 1:12800)

HIV-gp120 : Konzentrationsbereich : 4,0, 3,5, 3,0, 2,5 und 2,0 µg/ml  
Serumverdünnungsstufen : 1:200 bis 1:25600 (bei Beschichtungskonzentration 2,0 µg/ml 1:100 bis 1:25600)

HIV-gp41 : Konzentrationsbereich : 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 und 0,5 µg/ml  
Serumverdünnungsstufen : 1:100 bis 1:51200 (bei Beschichtungskonzentration 0,5 µg/ml 1:50 bis 1:25600)

Die optimale Beschichtungskonzentration wurde an Hand von Titrationskurven ermittelt. Idealerweise sollten sich die Titrationskurven über einen Bereich von etwa 2-3 log-Einheiten der Serumverdünnung erstrecken mit einem oberen Wert der Extinktion über 2,0, um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Tatsächlich ist eine Bezugskurve über 4 oder 5 log-Einheiten der Serumverdünnung in der Praxis nicht wünschenswert, da eine sehr flache Verdünnungskurve bedeutet, dass eine große Veränderung in der Ak-Konzentration nur eine kleine Veränderung in der Extinktion zu Folge hat.

Exemplarisch für die Titrationskurven sämtlicher HIV-Proteine ist in Abbildung 1 diejenige für p55 dargestellt. Die optimale p55-Beschichtungskonzentration ergibt sich mit 1,5 µg/ml aus der am steilsten verlaufenden blauen Titrationskurve.

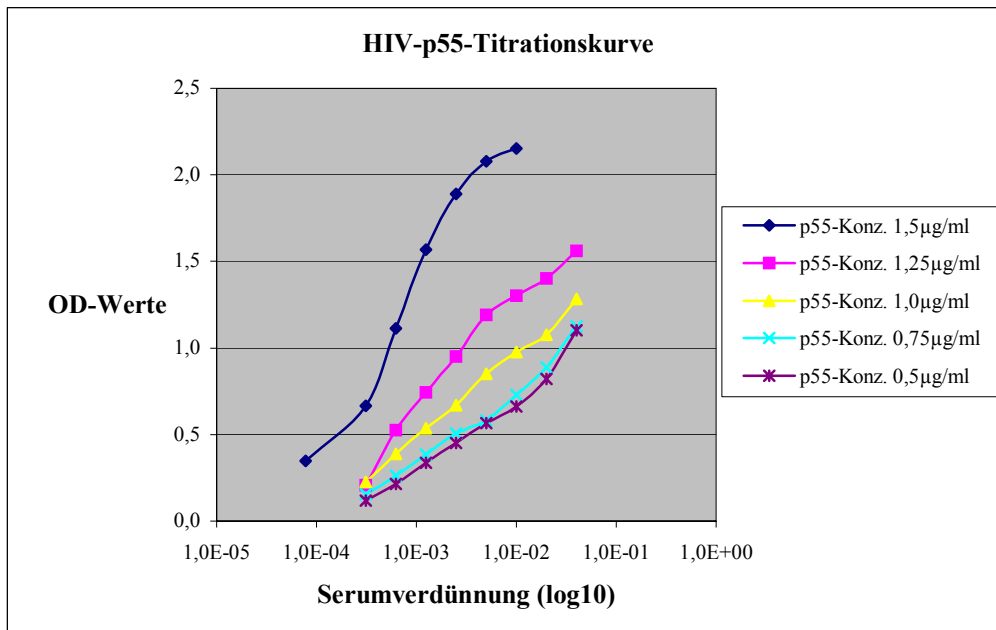


Abbildung 1

Die optimalen Beschichtungskonditionen sind für die HIV-Proteine p17, p24, p55, gp41 und gp120 im folgenden aufgelistet :

**HIV-p17 :**

Mikrotiterplatte Corning Costar # 3695

Beschichtungspuffer PBS 0,15 M, pH 7,4 ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>

Beschichtungskonzentration 4,0 µg/ml

Beschichtungszeit mind. 18 h bis max. 24 h

Beschichtungstemperatur 8-10°C

**HIV-p24 :**

Mikrotiterplatte Corning Costar # 3695

Beschichtungspuffer PBS 0,15 M, pH 7,4 ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>

Beschichtungskonzentration 2,0 µg/ml

Beschichtungszeit mind. 18 h bis max. 24 h

Beschichtungstemperatur 8-10°C

**HIV-p55 :**

Mikrotiterplatte Corning Costar # 3695

Beschichtungspuffer PBS 0,15 M, pH 7,4 ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>

Beschichtungskonzentration 1,5 µg/ml



Beschichtungszeit mind. 18 h bis max. 24 h  
Beschichtungstemperatur 8-10°C

**HIV-gp41 :** Mikrotiterplatte Corning Costar # 3690  
Beschichtungspuffer NaHCO<sub>3</sub> / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M, pH 9,6  
Beschichtungskonzentration 1,0 µg/ml  
Beschichtungszeit mind. 18 h bis max. 24 h  
Beschichtungstemperatur 8-10°C

**HIV-gp120 :** Mikrotiterplatte Dade Behring B-Modul  
Beschichtungspuffer PBS 0,15 M, pH 7,4 ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>  
Beschichtungskonzentration 2,5 µg/ml  
Beschichtungszeit mind. 18 h bis max. 24 h  
Beschichtungstemperatur 8-10°C

### **3. 10. Testung der Intra-Assay-Variabilität**

Die Intra-Assay-Variabilität wurde an Hand von jeweils drei Riegeln (à acht Näpfe) der entsprechenden Mikrotiterplatten geprüft. Die Abarbeitung der Assays entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung unter Verwendung der optimalen Beschichtungsbedingungen. Die getestete Serumprobe war bei allen HIV-Proteinen identisch und trug die Nummer 1999012244.

Die jeweilige Verdünnung der Serumprobe wurde für die einzelnen HIV-Proteine so gewählt, dass sich ein OD-Wert von  $1,0 \pm 0,2$  ergab. Im folgenden sind die Probenverdünnungen für die einzelnen HIV-Proteine aufgeführt :

HIV-p17 : Serumverdünnung 1:800  
HIV-p24 : Serumverdünnung 1:3200  
HIV-p55 : Serumverdünnung 1:1600  
HIV-gp120 : Serumverdünnung 1:6400  
HIV-gp41 : Serumverdünnung 1:12800

### 3. 11. Stabilitätsprüfung der beschichteten Mikrotiterplattenoberflächen

Für die Überprüfung der Stabilität der beschichteten Festphasen wurden ebenfalls die optimierten Beschichtungskonditionen verwendet. Pro HIV-Protein kamen zwei Serumproben von zwei verschiedenen HIV-Patienten zum Einsatz. Von jeder Serumprobe wurde eine Verdünnungsreihe bestehend aus vier Verdünnungen, in 2er-Schritten fortlaufend, hergestellt. Die verwendeten Serumproben und Verdünnungsstufen sind für jedes HIV-Protein im Anschluss aufgeführt :

HIV-p17 :            Serumproben-Nr. 1999012244 : 1:100 bis 1:800  
                         Serumproben-Nr. 1999012916 : 1:100 bis 1:800

HIV-p24 :            Serumproben-Nr. 1999012916 : 1:1600 bis 1:12800  
                         Serumproben-Nr. 1999021440 : 1:3200 bis 1:25600

HIV-p55 :            Serumproben-Nr. 1999012916 : 1:200 bis 1:1600  
                         Serumproben-Nr. 1999021440 : 1:3200 bis 1:25600

HIV-gp120 :        Serumproben-Nr. 1999012916 : 1:100 bis 1:800  
                         Serumproben-Nr. 1999021440 : 1:1600 bis 1:12800

HIV-gp41 :        Serumproben-Nr. 1999010936 : 1:100 bis 1:800  
                         Serumproben-Nr. 1999021440 : 1:3200 bis 1:25600

Die Abarbeitung der Assays entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung, mit einer Änderung :

Nach Inkubation der HIV-Proteinlösungen wurde bei Raumtemperatur der erste Riegel dreimal fünf Minuten mit POD-Standardwaschlösung behandelt, der zweite dreimal fünf Minuten mit Harnstoff 4 M und der dritte einmal fünf Minuten mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M sowie anschließend zweimal fünf Minuten mit POD-Standardwaschlösung. Nach vier weiteren Waschschritten pro Riegel mit der POD-Standardwaschlösung wurde entsprechend der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung verfahren.

### **3. 12. Vorbemerkungen zum HIV-AVI-EIA**

Aus Gründen der HIV-Proteinverfügbarkeit konnte die Messung der Avidität lediglich für anti-p55-, anti-gp120- und anti-gp41-IgG durchgeführt werden, obgleich der AVI-EIA auch für HIV-p17 und HIV-p24 etabliert wurde.

Vor der eigentlichen Aviditätsbestimmung wurde die Reaktivität für jede Serum- bzw. Plasmaprobe durch einen herkömmlicher EIA mit den jeweiligen HIV-Proteinen untersucht. Dies war notwendig, um die Verdünnungsschritte für die Aviditätsmessung so wählen zu können, dass die OD-Werte (ohne Harnstoffelution) in einem Bereich zwischen 2,0 und 0,5 ( $\pm 0,2$ ) zu liegen kamen.

Die Abarbeitung der Assays entsprach der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung unter Berücksichtigung der optimierten Beschichtungskonditionen. Jede Patientenprobe wurde in drei Verdünnungen, 1:50, 1:500 und 1:5000, getestet. Eine Ausnahme stellten die Proben der HIV-Patienten #1, #2 und #3 dar, die in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 eingesetzt wurden.

Das HIV-Glykoprotein gp41 war als Fusion mit Maltose bindendem Protein (pMAL) exprimiert. Deshalb wurde jede Patientenprobe auf anti-pMAL-IgG untersucht. Dazu wurden Costar #3690 Mikrotiterplatten mit pMAL, in Bicarbonat-Puffer (0,05 M, pH 9,6) auf eine Endkonzentration von 1,5  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt (diese Konzentration entsprach jener, die bei einer gp41-Beschichtungskonzentration von 1,0  $\mu\text{g/ml}$  vorliegt, unter der Annahme, dass gp41 und pMAL äquimolar fusioniert sind), über Nacht bei 8-10°C beschichtet. Die Abarbeitung der Assays erfolgte entsprechend der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung, die verwendete Serumverdünnung war mit 1:50 bei allen untersuchten Proben identisch.

Die gemessenen Extinktionswerte für anti-pMAL-IgG waren bei allen getesteten Proben  $\leq 0,5$ . Da die zur Bestimmung der anti-gp41-IgG-Avidität eingesetzten Verdünnungen um  $\geq 10$  höher waren als jene, die bei den pMAL-Vortests verwendet wurde, war der Beitrag zur Extinktion, der von der Bindung unspezifischer anti-pMAL-Ak herrührte, zu vernachlässigen.

### **3. 13. Versuchsdurchführung HIV-AVI-EIA**

Es kam die allgemeine EIA-Versuchsdurchführung mit den ermittelten optimalen Beschichtungsbedingungen zur Anwendung. Folgende Modifikationen in der Assay-Abarbeitung waren zur Bestimmung der Avidität notwendig :

Von jeder Probe der Patienten #1, #2 und #3 wurden drei identische Verdünnungsreihen, von jeder übrigen Probe paarweise identische Verdünnungsreihen, bestehend aus je vier, in 2er-Schritten fortlaufenden Verdünnungsstufen, hergestellt. Dann wurden die Verdünnungsreihen parallel mit den einzelnen Serumverdünnungsstufen inkubiert. Im Anschluss daran wurde die erste Serie von Näpfen dreimal fünf Minuten mit POD-Standardwaschlösung bei Raumtemperatur behandelt, die zweite dreimal fünf Minuten bei Raumtemperatur mit PBS-Harnstoff 4 M. Die ausschließlich für die Proben der HIV-Patienten #1, #2 und #3 vorhandene dritte Serie von Näpfen wurde bei Raumtemperatur einmal fünf Minuten mit PBS-Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M und dann zweimal fünf Minuten mit POD-Standardwaschlösung behandelt.

Es folgten für alle Näpfe vier Waschschrte mit POD-Standardwaschlösung bevor mit der allgemeinen EIA-Versuchsdurchführung fortgefahren wurde.

### **3. 14. Prinzip der Messergebnisauswertung und Kalkulation des Aviditätsindex**

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die Avidität bzw. der Aviditätsindex bis zu einem gewissen Maß von der Ak-Konzentration abhängig ist <sup>53</sup>, wurden jeweils vier Verdünnungsstufen von jeder Serum- bzw. Plasmaprobe für die Bestimmung der Avidität verwendet. Bei der Messergebnisauswertung und Berechnung des Aviditätsindex kam die von R. Kneitz et al. evaluierte Methode (persönliche Mitteilung) in modifizierter Form zur Anwendung. Mit Hilfe von Microsoft Excel<sup>®</sup> wurden graphisch die OD-Werte mit Elution des denaturierenden Reagenz (Y-Achse) gegen die ohne Denaturanselution (X-Achse) aufgetragen. Der resultierende Graph entsprach näherungsweise einer Geraden des mathematischen Gleichungstyps  $y = m * x + t$ . Mittels Microsoft Excel<sup>®</sup> wurde eine Ausgleichsgerade durch den Graph gelegt und die dazugehörige mathematische Gleichung ermittelt. An Hand des Bestimmtheitsmaßes (aus Microsoft Excel<sup>®</sup>)

ließ sich der Grad der Übereinstimmung des experimentell ermittelten Graphen mit der Ausgleichsgeraden feststellen. Der Aviditätsindex AI wurde für einen OD-Wert ohne Denaturanselution von 1,0 aus der Gleichung für die Ausgleichsgerade berechnet und mit 100 multipliziert<sup>9</sup>, er war jedoch auch für jeden beliebigen OD-Wert ohne Denaturanselution leicht anzugeben. Änderungen des Aviditätsindex, die  $\geq 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  waren, wurden als signifikant angesehen.

Die Kurvendarstellung erfolgte aus mindestens drei der vier experimentell ermittelten OD-Wertepaare. Ferner wurde von jedem Graphen, aus dessen Funktionsgleichung der Aviditätsindex berechnet werden sollte, ein Bestimmtheitsmaß von  $\geq 97\%$  gefordert. Eine Wiederholung der Probestellung war notwendig, wenn dieser Wert nicht erreicht wurde oder wenn AI-Schwankungen  $> 20\%$  in Relation zu den übrigen getesteten Proben eines Patienten auftraten. Unterschieden sich nach Wiederholung der Probestellung die Bestimmtheitsmaße beider Graphen um mehr als  $2\%$ , wurde zur AI-Berechnung der Graph mit dem höheren Bestimmtheitsmaß herangezogen. War die Differenz  $< 2\%$ , wurde aus den Funktionsgleichungen der beiden Graphen der durchschnittliche Aviditätsindex errechnet.

Das Computerprogramm InStat<sup>®</sup> 3.0 wurde für die statistische Analyse der Messergebnisse verwendet. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant bezeichnet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4. 1. Präzision und Reproduzierbarkeit

Abweichungen innerhalb eines Testes (sog. Intra-Assay-Variation) sowie von Test zu Test (sog. Inter-Assay-Variation) müssen überprüft werden, damit die Reproduzierbarkeit des Assays gewährleistet ist. Ein Maß für die Variation zwischen Assays ist der sog. Variationskoeffizient (Vk), der sich nach folgender Formel berechnen lässt :

$$Vk = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \times 100$$

Die Intra-Assay-Reproduzierbarkeit wurde für jedes HIV-Antigen im einfachen EIA-Format (ohne Aviditätsbestimmung) überprüft. In Abhängigkeit von der Bindungskapazität der Mikrotiterplatte ist ein Intra-Assay-Vk  $\leq 10\%$  wünschenswert.

In Tabelle 1 sind Mittelwert (X), Varianz (S<sup>2</sup>), Standardabweichung (S) sowie der Intra-Assay-Variationskoeffizient (Vk<sub>Intra</sub>) für die HIV-Proteine p17, p24, p55, gp41 sowie gp120 und ihre zugehörigen Mikrotiterplattensysteme aufgeführt.

<b>Tabelle 1 : Statistik-Parameter zur Intra-Assay-Variation der Extinktionswerte</b>						
<b>HIV-Protein</b>	<b>ELISA-Platte</b>	<b>Anzahl Näpfe</b>	<b>Mittelwert der Extinktion (X)</b>	<b>Varianz (S<sup>2</sup>)</b>	<b>Standardabweichung (S)</b>	<b>Vk<sub>Intra</sub> (in %)</b>
HIV-p17	Costar # 3695	24	1,868	0,0403	0,2007	10,74
HIV-p24	Costar # 3695	24	0,5183	0,0041	0,0643	12,41
HIV-p55	Costar # 3695	24	1,0343	0,0075	0,0866	8,37
HIV-gp41	Costar # 3690	24	0,4498	0,0003	0,0184	4,09
HIV-gp120	D.B. B-Modul	24	0,5313	0,0005	0,0224	4,22

Darüber hinaus ist es notwendig, durch Qualitätskontrollen zu überprüfen, ob vergleichbare Ergebnisse von Assay zu Assay erhalten werden. Zu diesem Zweck liefen bei allen Tests zur Bestimmung der IgG-Ak-Avidität Kontrollproben mit, um die Reproduzier-

barkeit der Aviditätsergebnisse mit Hilfe des Inter-Assay-Variationskoeffizienten ( $Vk_{\text{Inter}}$ ) verifizieren zu können. Die Kontrollproben wurden jeweils bei vier Verdünnungen ohne bzw. mit Harnstoffelution durchgeführt, um aus den beiden sich ergebenden Bezugskurven den Aviditätsindex bestimmen zu können.

In Tabelle 2 sind Mittelwert ( $\bar{X}$ ), Varianz ( $S^2$ ), Standardabweichung ( $S$ ) und Inter-Assay-Variationskoeffizient ( $Vk_{\text{Inter}}$ ) sowohl für die Aviditätsindices (berechnet für einen OD-Wert ohne Harnstoffelution von 1,0) der Serumkontrollproben als auch für das Bestimmtheitsmaß aufgeführt, das den Grad der Übereinstimmung der experimentell und graphisch ermittelten Aviditätskurve mit einer Geradengleichung vom mathematischen Typ  $y = m \cdot x + t$  widerspiegelt und mittels Microsoft Excel® leicht bestimmt werden kann. Ferner sind in Tabelle 2 für jedes HIV-Antigen die Gesamtzahl der Kontrollläufe  $n$  aufgeführt sowie der niedrigste bzw. höchste Wert des Aviditätsindex und des Bestimmtheitsmaßes.

<b>Tabelle 2 : Statistische Parameter zu den Kontrollproben</b>						
<b>Untersuchungs-kriterien</b>	<b>Zahl der Kontrollläufe (n)</b>	<b>Minimum / Maximum in %</b>	<b>Mittelwert (X) in %</b>	<b>Varianz (S<sup>2</sup>) in %</b>	<b>Standardabweichung (S) in %</b>	<b>Vk<sub>Inter</sub> in %</b>
<b>gp41 : Aviditätsindex</b>	16	78,50 / 94,80	85,31	0,19	4,36	5,11
<b>gp41 : Bestimmtheitsmaß</b>	16	98,88 / 99,94	99,68	8,8E-04	0,30	0,30
<b>gp120 : Aviditätsindex</b>	20	41,40 / 70,78	58,27	0,78	8,81	15,11
<b>gp120 : Bestimmtheitsmaß</b>	20	96,67 / 99,98	99,17	5,9E-03	0,75	0,76
<b>p55 : Aviditätsindex</b>	20	40,53 / 68,45	54,60	0,52	7,20	13,19
<b>p55 : Bestimmtheitsmaß</b>	20	95,56 / 99,98	98,79	0,01	1,00	1,02

#### 4. 2. Auswahl des Immunkomplex-dissozierenden Agens

In der Literatur werden zahlreiche Reagenzien zur Dissoziation von Ak-Ag-Komplexen beschrieben<sup>5-9,17-19,48,56,57</sup>. Die Auswahl des betreffenden Reagenz und seiner Konzentration richtet sich in erster Linie nach der Möglichkeit durch Bestimmung des Aviditätsindex zwischen einer frischen und einer abgelaufenen Infektion differenzieren zu können. Im Falle einer HIV-Infektion ist die Selektion des Reagenz sowie die Optimierung seiner Konzentration nach diesen Gesichtspunkten schwierig, da frische HIV-Infektionen selten diagnostiziert werden und demnach nur wenige Serum- bzw. Plasma-proben von Serokonversionspatienten zur Verfügung stehen.

Zur Auswahl des dissozierenden Reagenz und der Optimierung seiner Konzentration standen für diese Arbeit die Serumproben von drei Serokonversionspatienten zur Verfügung. Die Patienten #1 und #2 wiesen bereits bei der ersten verfügbaren Probe einen reaktiven ELISA-Test sowie einen positiven Bestätigungstest (Western Blot) auf. Bei Patient #3 ergab die erste erhältliche Probe ein negatives Ergebnis im ELISA-Test, die folgende Probe, einen Monat später gewonnen, zeigte hingegen einen reaktiven ELISA-Test, der durch einen Western Blot bestätigt wurde.

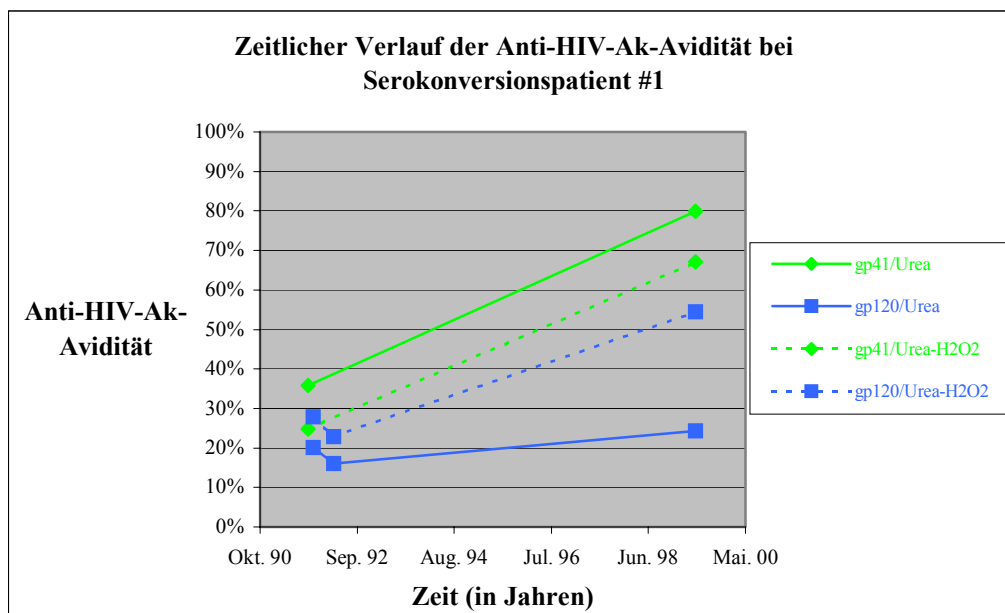
Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-Ak-Avidität erfolgte experimentell durch Elution der präformierten Immunkomplexe mit den zwei denaturierenden Reagenzien Harnstoff 4 M und Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M. Vor der eigentlichen Aviditätsmessung wurde die Stabilität der mit gp41, gp120 und p55 beschichteten Festphase gegenüber Harnstoff 4 M bzw. Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M geprüft. Dabei zeigte sich, dass sich im Vergleich zur Kontrolle (Behandlung der Immunkomplexe mit POD-Waschpuffer) die Reaktivität der mit gp120 und gp41 beschichteten Festphasen durch die Behandlung mit Harnstoff 4 M bzw. Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M nicht signifikant verändert hatte (Verlust der Reaktivität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe maximal 10 % in Relation zur Kontrolle). Die mit p55 beschichtete Mikrotiterplattenoberfläche war indes nach der Behandlung mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M in ihrer Reaktivität massiv reduziert (OD-Werte bei allen Verdünnungsstufen < 0,2; OD-Werte der Kontrolle zwischen 0,6 und 2,1), während die Behandlung mit Harnstoff 4 M keine wesent-



liche Beeinflussung der Reaktivität der p55-Festphase ergab (Reaktivitätsabfall in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe maximal 10 % im Vergleich zur Kontrolle).

Eine mögliche Erklärung dafür kann lauten, dass die Bindung spezifischer HIV-Ak nicht durch reversible Denaturierung der adsorbierten p55-Moleküle beeinträchtigt wird, sondern durch die durch Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachte irreversible Oxidation von p55-Epitopen, die für die Wechselwirkung mit den spezifischen HIV-Ak essentiell sind. Dieser Sachverhalt ist bei der Elutionsmethode allerdings nicht von entscheidender Bedeutung.

In den Abbildungen 2-4 ist der zeitliche Verlauf der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-Avidität für die drei Serokonversionspatienten #1-3 dargestellt. Aufgrund der zu geringen Konzentration HIV-spezifischer Ak war die Bestimmung der Anti-gp120-IgG-Avidität für die Serokonversionspatienten #2 und #3 sowie der Anti-p55-IgG-Avidität für die HIV-Patienten #1 und #2 nicht möglich.



**Abbildung 2**

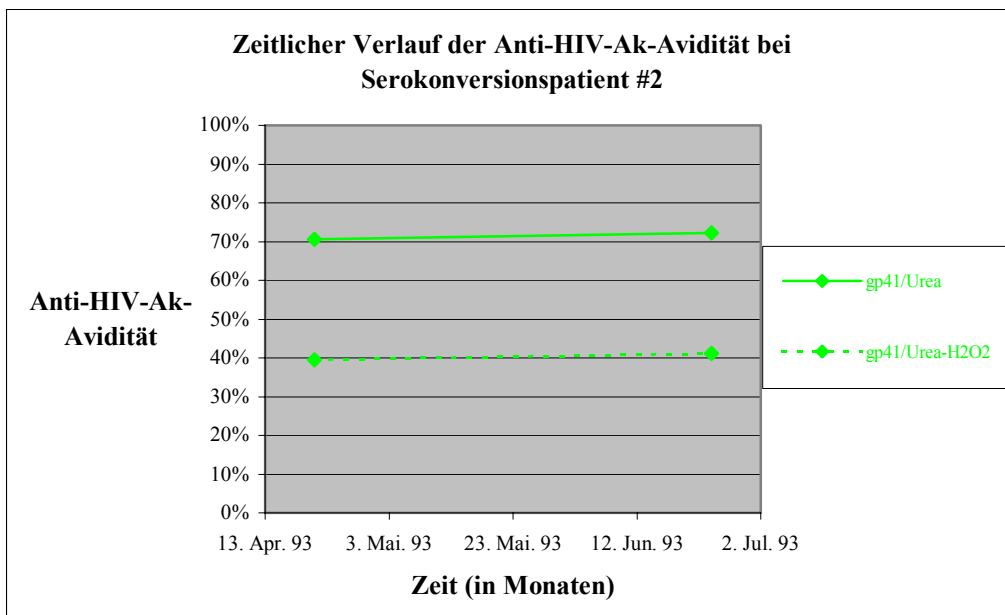


Abbildung 3

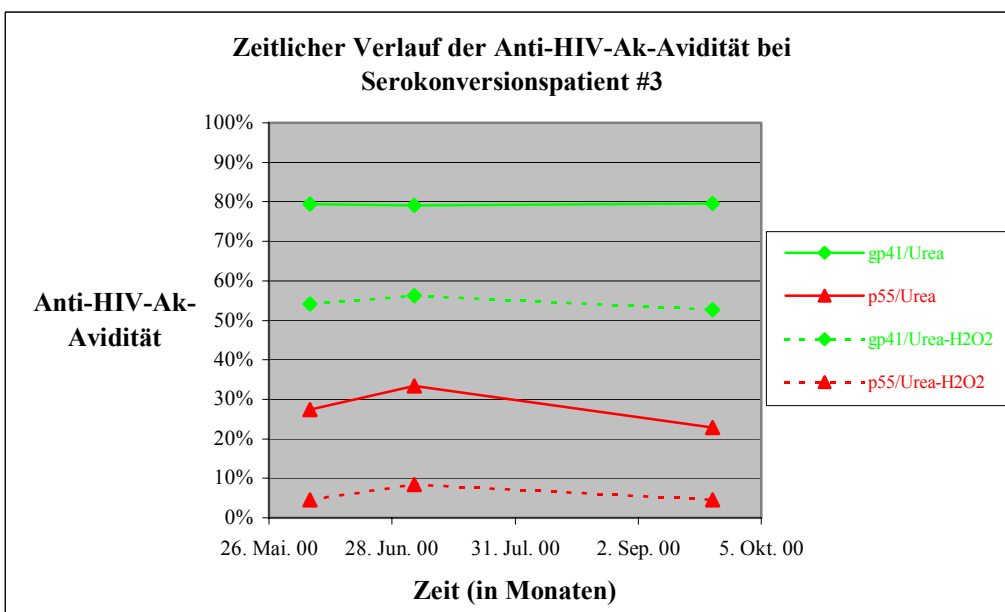


Abbildung 4

Diejenigen Aviditätsindices, die durch Elution präformierter Immunkomplexe mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M bestimmt wurden, lagen im allgemeinen 10-30 % niedriger als jene, die sich aus der Behandlung der gebildeten Immunkomplexe mit Harnstoff 4 M ergaben. Bei Serokonversionspatient #1 war indes nach Behandlung mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M für Anti-gp120-IgG unerklärlicherweise eine höhere Avidität als bei der Behandlung mit

Harnstoff 4 M zu beobachten. Darüber hinaus trat bei diesem Patienten eine Diskrepanz bezüglich des Verlaufes der Anti-gp120-IgG-Avidität auf. Während die mittels Harnstoff 4 M bestimmte Anti-gp120-IgG-Avidität über die Zeit nahezu konstant war, ließ sich bei den mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M ermittelten Aviditätswerten mit der Zeit ein Aufwärtstrend nachweisen. Darüber hinaus war eine Reifung der Immunantwort im Sinne eines deutlichen Anstieges der Ak-Avidität, wie sie im Rahmen anderer Virusinfektionen üblicherweise auftritt, sowohl bei Elution mit Harnstoff 4 M als auch mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M lediglich bei Serokonversionspatient #1 für Anti-gp41-IgG festzustellen.

Da Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M im Vergleich zur Elution mit Harnstoff 4 M keinen nachweisbaren Vorteil ergab, wurden im folgenden sämtliche Aviditätsmessungen mit dem bereits vielfach als dissoziierendes Reagenz verwendeten Harnstoff 4 M ausgeführt.

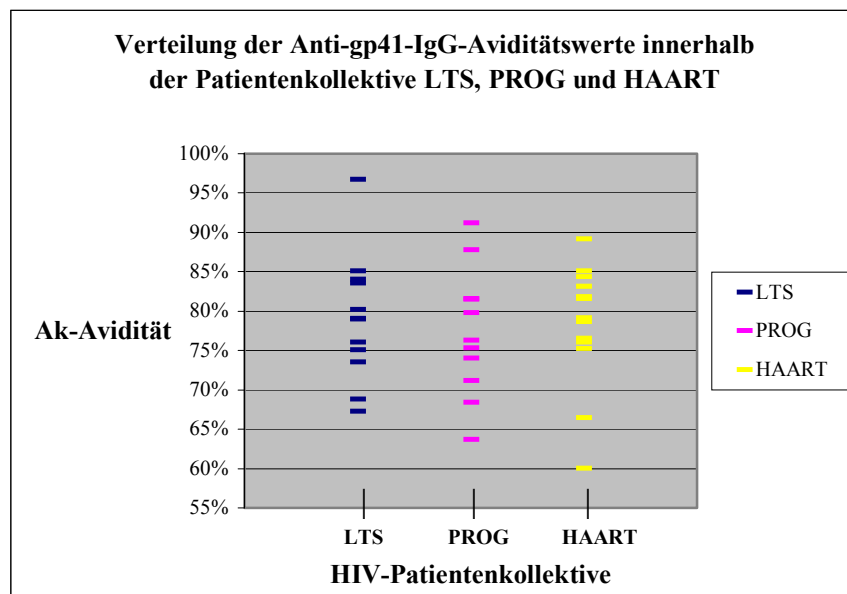
#### **4. 3. Ak-Avidität HIV-Patientenkollektive LTS, PROG und HAART**

Der zeitliche Verlauf der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-Ak-Avidität wurde bei insgesamt 36 Patienten mit länger bestehender HIV-Infektion dokumentiert. Aufgrund der zu geringen Quantität spezifischer HIV-Ak (OD-Werte  $\leq 0,5$  bei 1:50-Verdünnung) war eine Bestimmung der Anti-gp120-IgG-Avidität bei den LTS-Patienten #7 und #15 sowie der Anti-p55-IgG-Avidität bei den PROG-Patienten #18, #19 und #22 nicht möglich.

Um zu untersuchen, ob die absoluten Aviditätswerte in den Patientengruppen vor Beginn jeglicher antiretroviraler Therapie unterschiedlich sind, ist in den Abbildungen 5-7 die Verteilung der Aviditätswerte für Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG innerhalb der drei HIV-Patientenkollektive gezeigt. Für die graphische Darstellung der Aviditätsverteilungen wurde deshalb von jedem HIV-Patient der Aviditätswert der ersten getesteten Probe ausgewählt, da diese in der Regel zu einem Zeitpunkt gewonnen wurde, wo keinerlei antiretrovirale Therapie (weder ART, noch HAART) durchgeführt wurde. Bei jenen HIV-Patienten, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes überhaupt keiner antiretroviralen Therapie (weder ART, noch HAART) zugeführt wurden

(LTS-Patienten #6-8, #13 und #15) wurde als repräsentativer Aviditätswert ebenfalls jener der ersten getesteten Patientenprobe ausgewählt.

Eine Ausnahme stellten die PROG-Patienten #22 und #24 sowie die HAART-Patienten #28, #36 und #38 dar, weil von ihnen aus der Zeit vor Beginn jedweder antiretroviraler Therapie keine Proben verfügbar waren. Für diese Patienten wurde deshalb der Aviditätswert der Probe graphisch dargestellt, die dem Beginn jedweder antiretroviraler Therapie zeitlich am nächsten kam. Der Zeitraum zwischen Beginn der Behandlung und Entnahme der ersten getesteten Probe betrug zwischen einem Monat für PROG-Patient #28 und 26 Monaten für PROG-Patient #36. Während dieses Zeitraums wurde bei den genannten Patienten eine Monotherapie mit AZT durchgeführt.



**Abbildung 5**

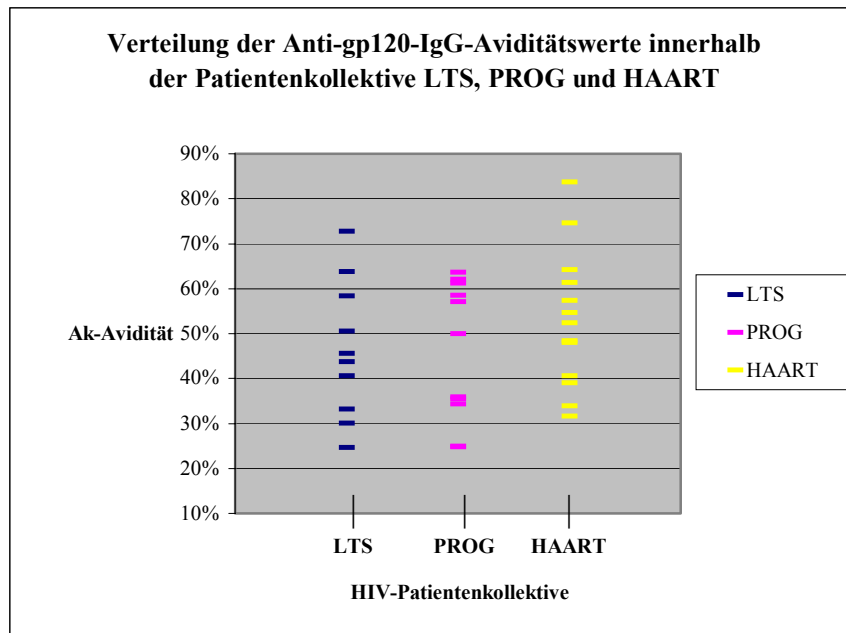


Abbildung 6

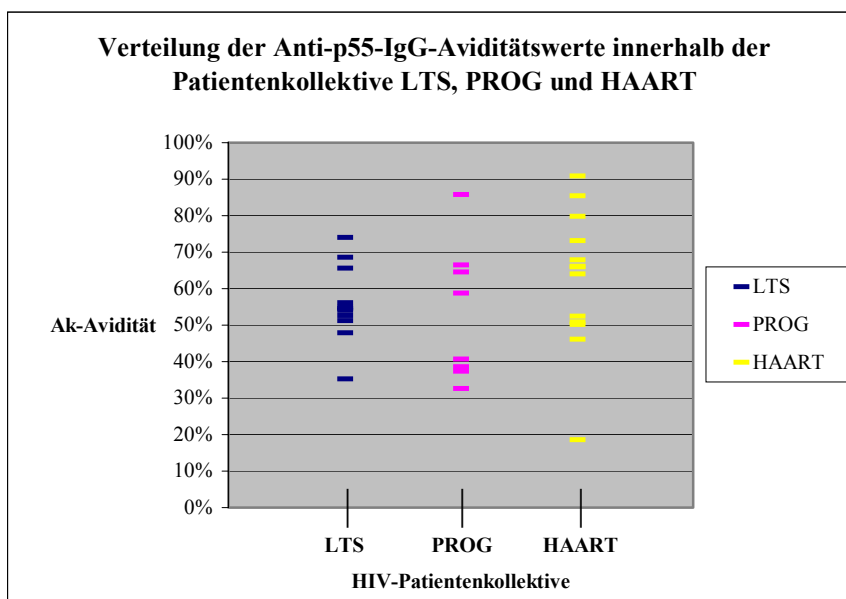


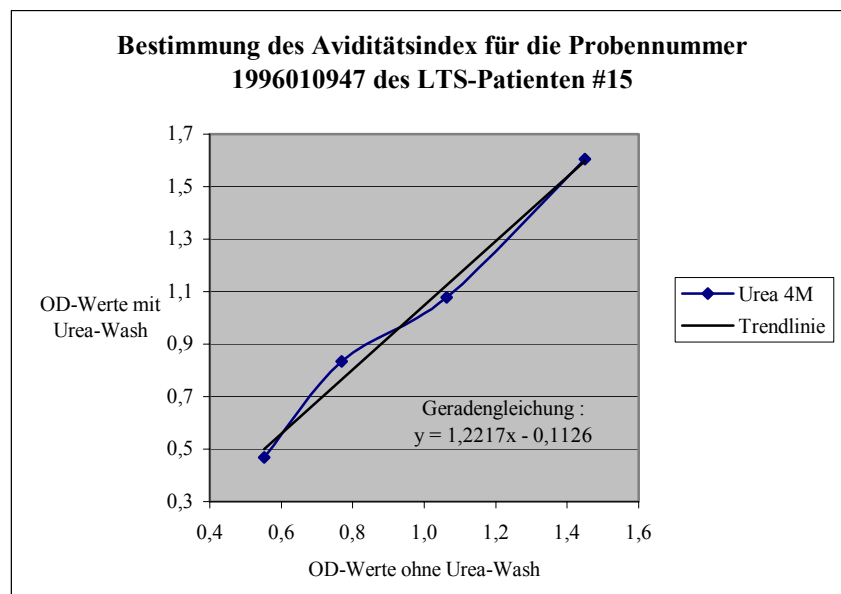
Abbildung 7

Der statistische Vergleich der Aviditätswerte (unpaired t-Test, Welch corrected; InStat<sup>®</sup> 3.0) zeigte weder zwischen LTS- und PROG-Patienten ( $P_{gp41} \approx 0,62$ ;  $P_{gp120} \approx 0,87$ ;  $P_{p55} \approx 0,40$ ), noch zwischen PROG- und HAART-Patienten ( $P_{gp41} \approx 0,80$ ;  $P_{gp120} \approx 0,32$ ;  $P_{p55}$

≈ 0,20) bzw. zwischen LTS- und HAART-Patienten ( $P_{gp41} \approx 0,79$ ;  $P_{gp120} \approx 0,41$ ;  $P_{p55} \approx 0,44$ ) einen signifikanten Unterschied.

#### 4.3.1. Verlauf der Anti-gp41-IgG-Avidität

Die Anti-gp41-IgG-Avidität war bei allen getesteten HIV-Patienten unabhängig vom klinischen Status hoch. Die ermittelten Werte für den Aviditätsindex lagen zwischen 60 und 97 %. Bei einzelnen Verdünnungsstufen der Serum- bzw. Plasmaproben von LTS-Patient #15 waren die OD-Werte nach Harnstoffelution um bis zu 0,3 höher als jene ohne Harnstoffbehandlung. Deshalb ergaben sich bei der graphischen Auswertung vereinzelt Aviditätsindices > 100 %. Dies wird in Abbildung 8 am Beispiel der Probennummer 1996010947 des LTS-Patienten #15 (Verdünnungsstufen in 2er-Schritten von 1:10 bis 1:80) demonstriert.

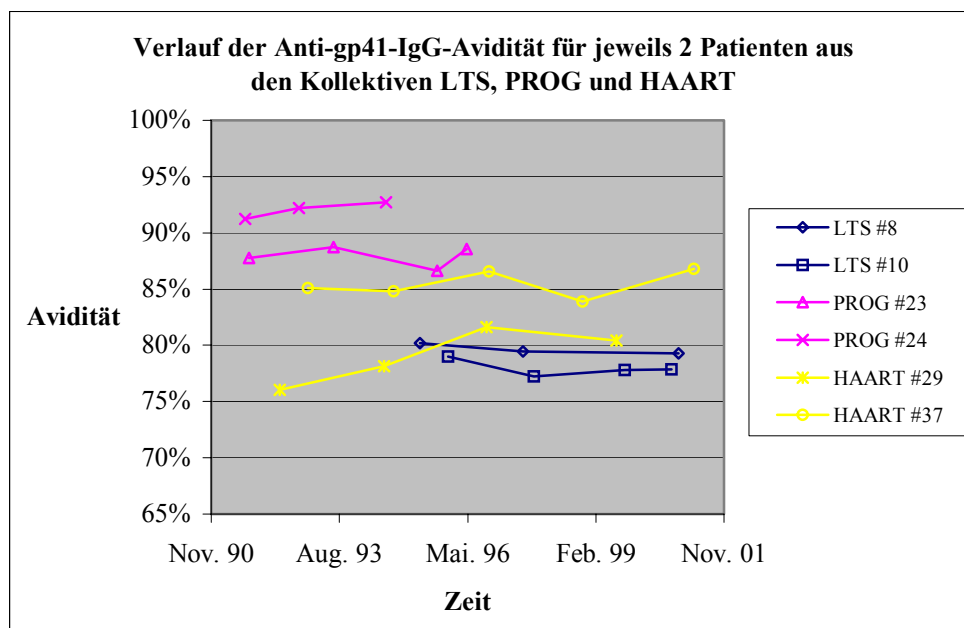


**Abbildung 8**

Der AI (bezogen auf einen OD-Wert ohne Harnstoffelution von 1,0) für die Probennummer 1996010947 lässt sich aus der Geradengleichung der Trendlinie berechnen, indem zunächst für den X-Wert (OD-Wert ohne Harnstoffelution) 1,0 der zugehörige Y-Wert (OD-Wert mit Harnstoffelution) bestimmt wird (hier 1,1091) und dieser Wert dann mit

100 multipliziert wird. Der AI der Probennummer 1996010947 des LTS-Patienten #15 beträgt demnach 110,91 %.

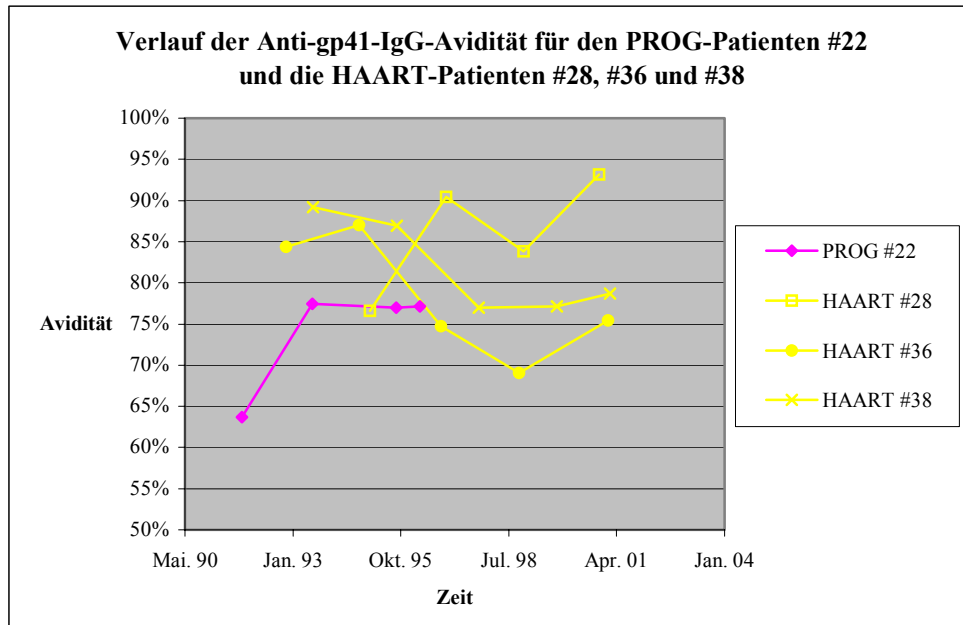
In Abbildung 9 ist der zeitliche Verlauf der Anti-gp41-IgG-Avidität für je zwei Patienten aus den Gruppen LTS (#8, #10), PROG (#23, #24) und HAART (#29, #37) dargestellt. Abgesehen von kleineren Schwankungen, die jedoch  $< 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der gp41-Kontrollen sind, bleibt die Anti-gp41-IgG-Avidität über die Zeit nahezu konstant. Die in Abbildung 9 dargestellten sechs Patienten wurden ausgewählt, weil ihr Anti-gp41-IgG-Aviditätsverlauf für die Mehrheit des untersuchten Patientenkollektivs repräsentativ ist. Deshalb wurde auf die graphische Darstellung des Aviditätsverlaufes jener Probanden verzichtet, bei denen die Aviditätsschwankungen nicht signifikant ( $< 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der gp41-Kontrollen) waren.



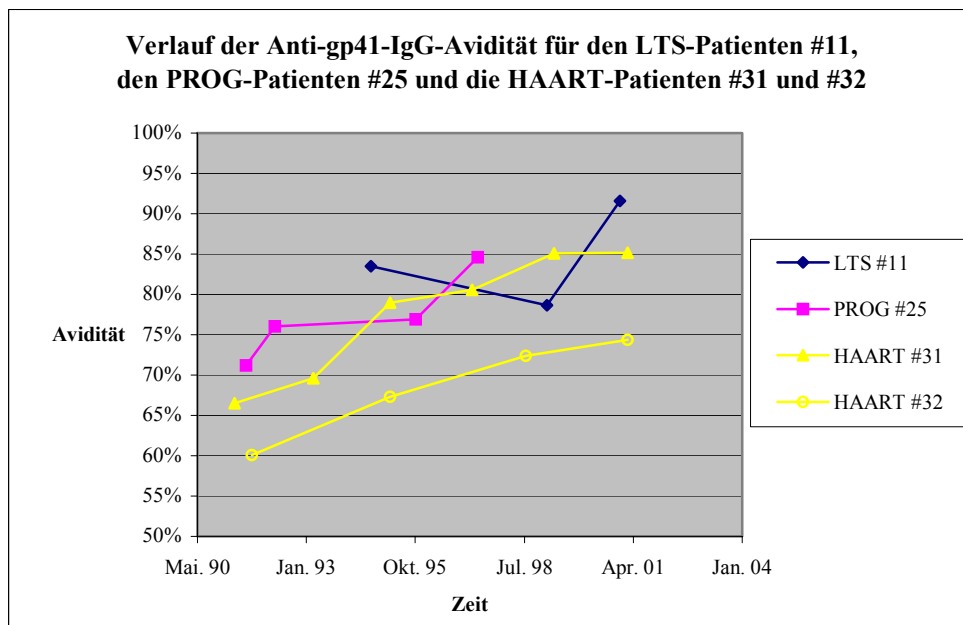
**Abbildung 9**

Bei acht getesteten HIV-Patienten waren die intraindividuellen Aviditätsänderungen für Anti-gp41-IgG signifikant, d. h. sie waren  $> 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der gp41-Kontrollen. Einen reproduzierbaren Aviditätsanstieg zeigten der LTS-Patient #11, die PROG-Patienten #22 und #25 sowie die HAART-Patienten #28, #31 und #32. Im Gegensatz dazu war bei den HAART-Patienten #36 und #38 eine reproduzierbare Aviditätsabnahme feststellbar.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Verläufe der Anti-gp41-IgG-Avidität für diese HIV-Patienten auf die beiden Abbildungen 10 und 11 verteilt.



**Abbildung 10**

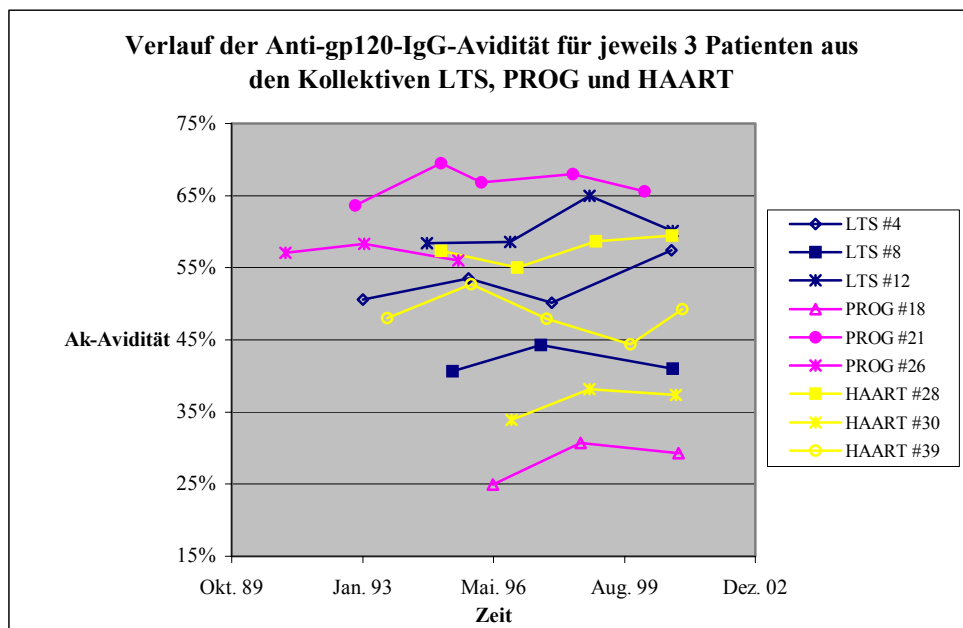


**Abbildung 11**



### 4. 3. 2. Verlauf der Anti-gp120-IgG-Avidität

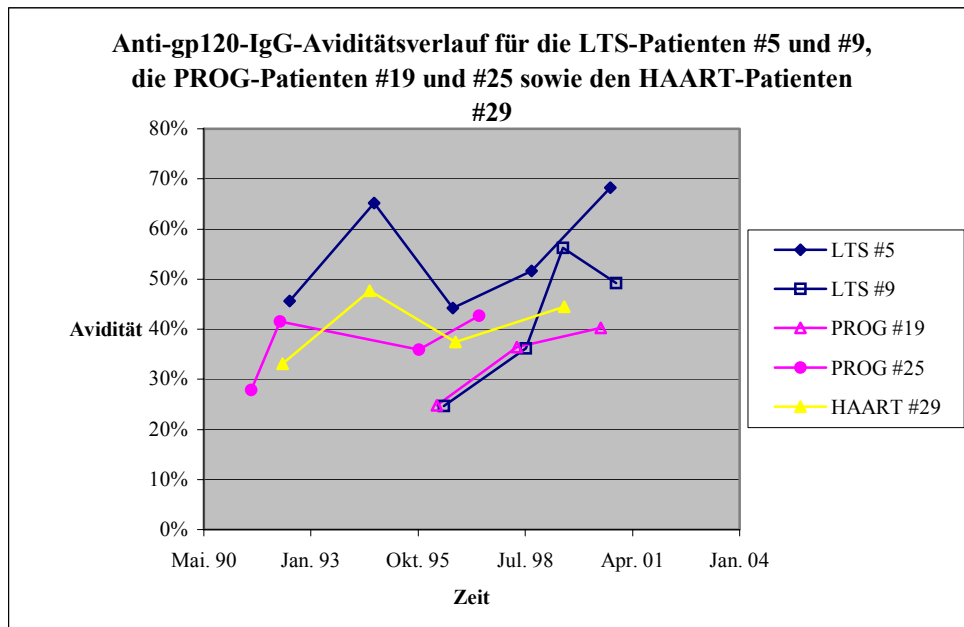
Die gemessenen Aviditätsindices für Anti-gp120-IgG lagen zwischen 25 und 91 % und schwankten somit in einem größeren prozentualen Bereich als jene für Anti-gp41-IgG. In allen drei untersuchten HIV-Patientenkollektiven waren sowohl Probanden zu finden, deren Proben sich durch eine hohe Anti-gp120-IgG-Avidität ( $> 50\%$ ) auszeichneten als auch solche, bei denen alle analysierten Proben einen Aviditätsindex  $< 40\%$  aufwiesen. Bei der Mehrzahl der getesteten HIV-Patienten waren die intraindividuellen Aviditätsschwankungen im zeitlichen Verlauf für Anti-gp120-IgG  $< 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der gp120-Kontrollproben. Stellvertretend für diese Patientengruppe ist in Abbildung 12 der zeitliche Verlauf der Anti-gp120-IgG-Avidität von jeweils drei repräsentativen Patienten aus den Kollektiven LTS, PROG und HAART abgebildet.



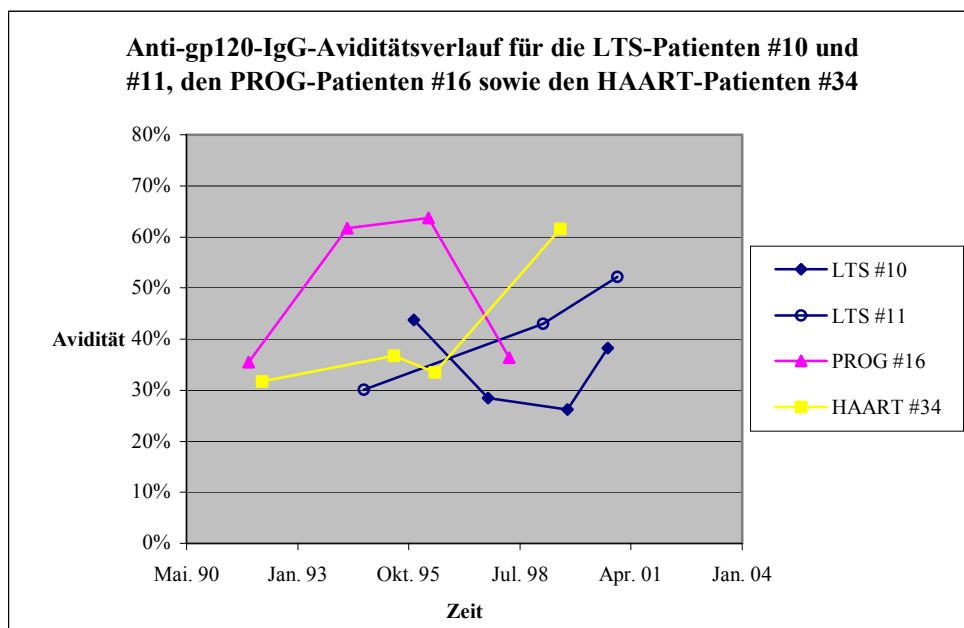
**Abbildung 12**

Bei neun HIV-Patienten konnten intraindividuelle Aviditätsänderungen festgestellt werden, die signifikant waren ( $> 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der gp120-Kontrollen). Einen reproduzierbaren Aufwärtstrend der Anti-gp120-IgG-Avidität zeigten die LTS-Patienten #5, #9 und #11, die PROG-Patienten #19 und #25 sowie die HAART-Patienten #29 und #34. LTS-Patient #10 wies nach einem stetigen Aviditätsabfall in den ersten drei Proben einen repro-

duzierbaren Anstieg der Anti-gp120-IgG-Avidität in der letzten untersuchten Probe auf. Für PROG-Patient #16 wurden signifikant niedrigere Aviditätswerte in der ersten und vierten Probe gemessen. Die Verläufe der Anti-gp120-IgG-Avidität für die genannten Patienten sind der Übersichtlichkeit wegen in den beiden Abbildungen 13 und 14 gezeigt.



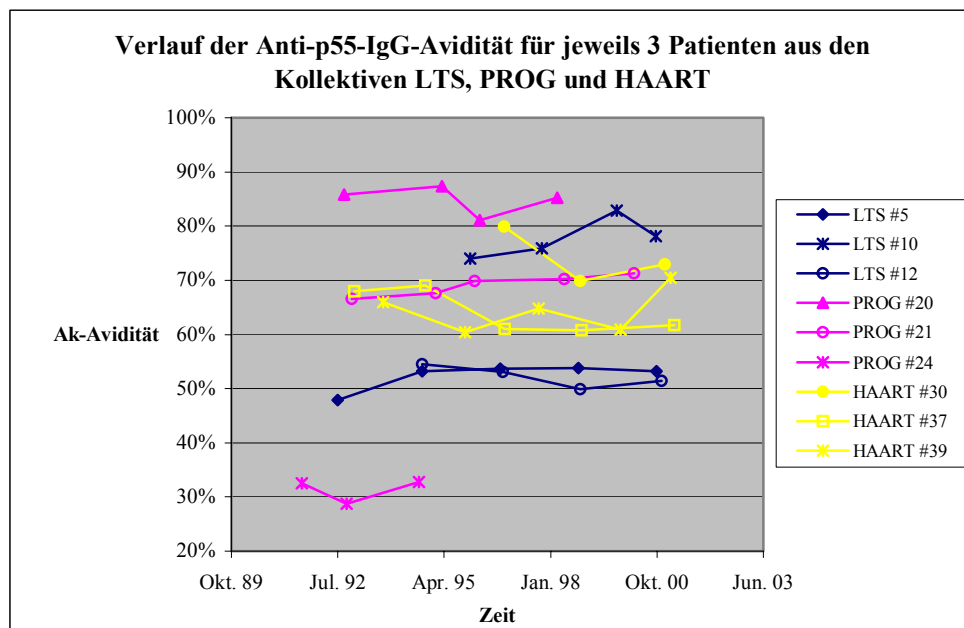
**Abbildung 13**



**Abbildung 14**

### 4. 3. 3. Verlauf der Anti-p55-IgG-Avidität

Die bei den ausgewählten HIV-Patienten gemessenen Anti-p55-IgG-Aviditätswerte erstreckten sich über einen Bereich von 14-106 % und zeigten damit von allen untersuchten Ak-Aviditäten die größte prozentuale Bandbreite. Analog zur Verteilung der Anti-gp120-IgG-Aviditätswerte waren Patienten mit Anti-p55-Aviditätsindices  $< 40\%$  sowie solche, deren Proben eine hohe Anti-p55-IgG-Avidität ( $> 50\%$ ) besaßen, in allen drei HIV-Patientenkollektiven zu finden. Für die Mehrheit der getesteten HIV-Patienten war die intraindividuelle Schwankung der ermittelten Aviditätsindices  $< 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der p55-Kontrollproben und damit nicht signifikant. Stellvertretend für diese Patientengruppe wurden die Anti-p55-IgG-Aviditätsverläufe von jeweils drei repräsentativen Patienten pro Kollektiv ausgewählt und in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15**

Bei acht Probanden wurden intraindividuelle Aviditätsschwankungen gemessen, die signifikant, d. h.  $> 2 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der p55-Kontrollen, waren. Bei LTS-Patient #7 und den beiden HAART-Patienten #28 und #36 war ein reproduzierbarer Abfall der Anti-p55-IgG-Avidität nachweisbar, während für PROG-Patient #16 und die HAART-Patienten #34 und #38 ein reproduzierbarer Aviditätsanstieg festzustellen war. LTS-Patient #11

zeigte im Vergleich zu den übrigen getesteten Proben eine reproduzierbar niedrigere Avidität in der zweiten Probe. PROG-Patient #25 wies einen stetigen Aviditätsanstieg in den ersten drei Proben sowie eine reproduzierbar niedrigere Avidität in der letzten analysierten Probe auf. Der Anti-p55-IgG-Aviditätsverlauf für diese HIV-Patienten ist aus Gründen der Übersichtlichkeit in den beiden Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

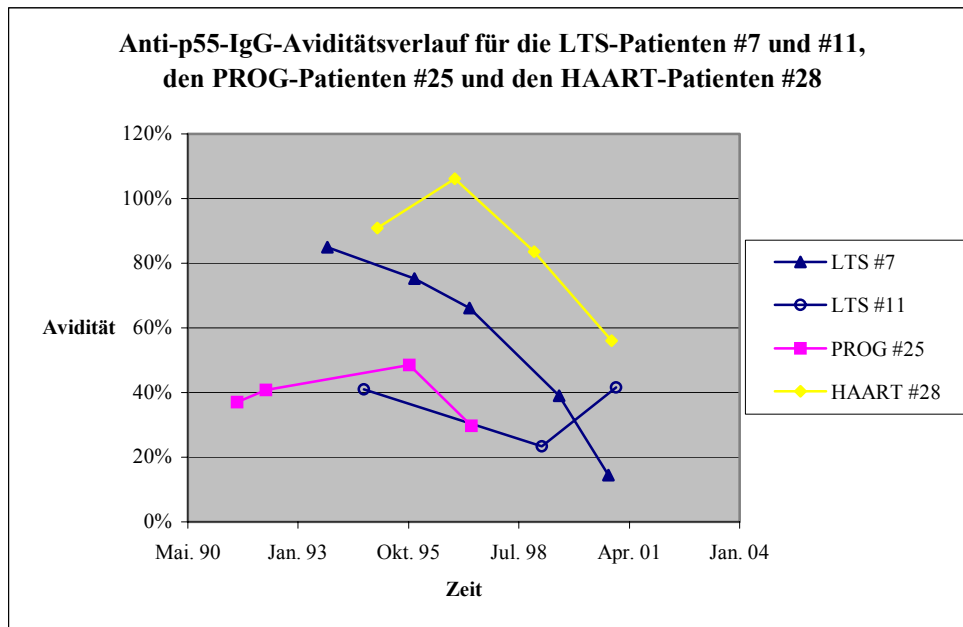


Abbildung 16

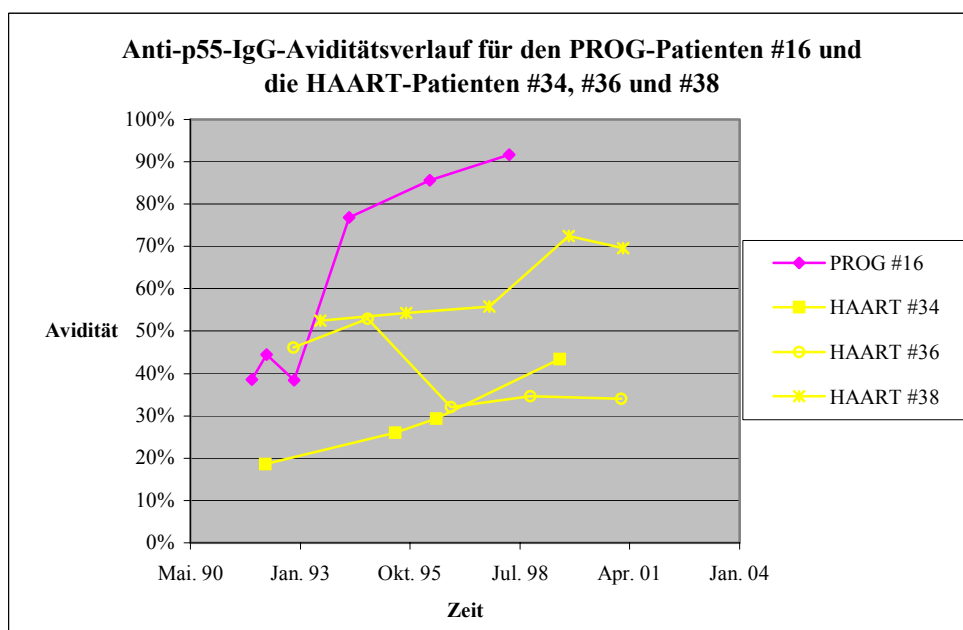
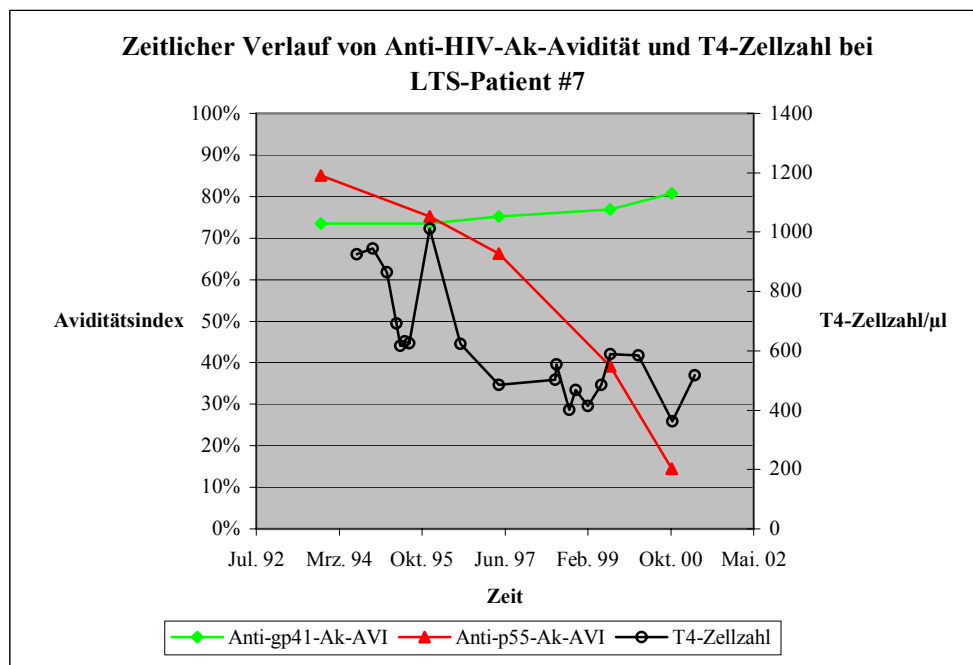


Abbildung 17

Für die HIV-Patienten (LTS #7, PROG #16 und HAART #28), bei denen die intraindividuellen Aviditätsschwankungen erheblich größer waren als das Zweifache des  $V_{k_{\text{Inter}}}$  der p55-Kontrollen ( $\geq 4 * V_{k_{\text{Inter}}}$  der p55-Kontrollen), wurde im folgenden die Anti-p55-IgG-Avidität mit der  $CD4^+$ -T-Zellzahl und der HI-Viruslast korreliert.

In Abbildung 18 wird der zeitliche Verlauf von Anti-p55-IgG-Avidität und T4-Zellzahl für LTS-Patient #7 gezeigt. Aufgrund des stabilen Immunstatus des Probanden war eine antiretrovirale Behandlung während des gesamten Beobachtungszeitraumes aus medizinischer Sicht nicht erforderlich.



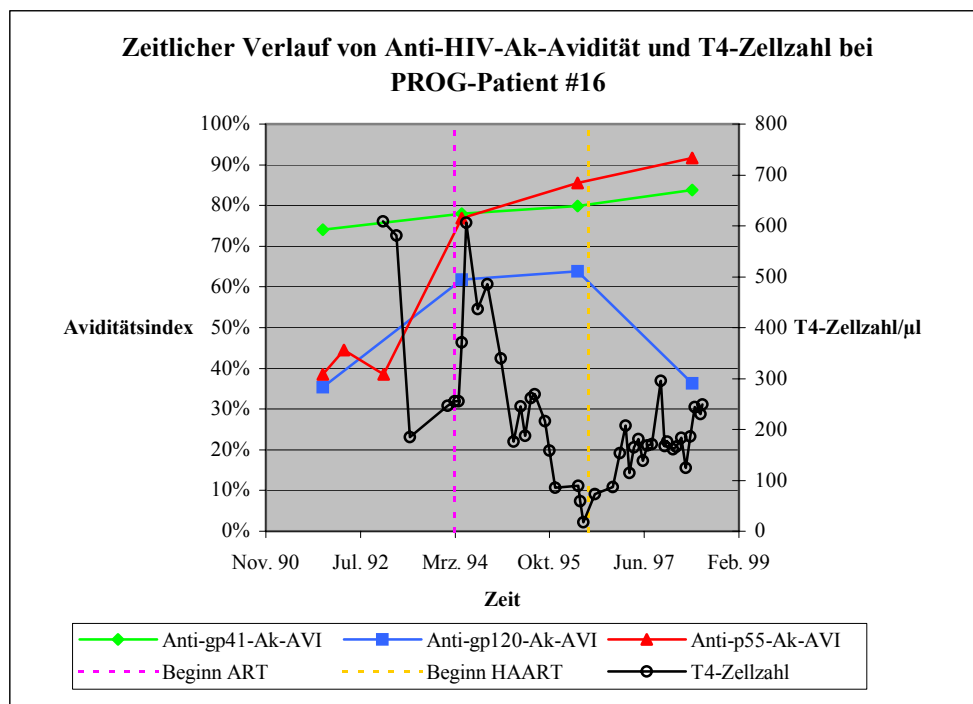
**Abbildung 18**

LTS-Patient #7 zeigte nach anfänglich hohen Aviditätswerten (zwischen 66 und 85 %) einen kontinuierlichen Abfall der Anti-p55-IgG-Avidität auf einen Endwert von 14 % in der letzten analysierten Probe. Parallel zu dieser deutlichen Abnahme der Anti-p55-IgG-Avidität sanken auch die T4-Zellzahlen von ca. 900/μl im Jahr 1994 auf ca. 400/μl in der letzten untersuchten Probe aus dem Jahr 2000. Die HI-Viruslast des Patienten (keine Abbildung) lag zu jedem Zeitpunkt der Studie unterhalb der Nachweisgrenze (50 Copies/ml).

PROG-Patient #16 zeichnete sich durch einen deutlichen p55-AI-Anstieg aus. Nach AI-Werten von 38-44 % zu Beginn der Studie war ein ausgeprägter Aviditätsanstieg auf 86 bzw. 92 % in den letzten beiden untersuchten Serumproben feststellbar. Ebenso reproduzierbar war die verglichen mit den übrigen getesteten Proben signifikant niedrigere Anti-gp120-IgG-Avidität in der ersten und letzten Probe des Patienten.

Die T4-Zellzahl von Patient #16 zeigte anfänglich starke Schwankungen von ca. 200-600/ $\mu$ l, dann folgte ein stetiger Abfall auf ein Niveau deutlich unter 100/ $\mu$ l sowie zum Schluß des Beobachtungszeitraumes nach Beginn einer HAART eine Stabilisierung auf Werte von ca. 200/ $\mu$ l.

Die HI-Viruslast von PROG-Patient #16 (keine Abbildung) pendelte zwischen  $1,0E+03$  und  $6,0E+05$  Copies/ml und zeigte eine uneinheitliche Entwicklung. Ein Vergleich der zeitlichen Verläufe von HI-Viruslast und Anti-p55-IgG-Avidität war insofern von geringer Aussagekraft als Angaben zur Viruslast für diesen Patienten erst ab 06/95 verfügbar waren. Zu diesem Zeitpunkt aber hatte der größte p55-AI-Anstieg bereits stattgefunden. In Abbildung 19 ist der zeitliche Verlauf von Anti-p55-IgG-Avidität und T4-Zellzahl für Patient #16 dargestellt. Ferner ist der Beginn von ART (03/94; antiretrovirale Monotherapie oder 2er-Kombinationstherapie mit NRTI's) und HAART (07/96; Kombinationstherapie mit NRTI's und / oder NNRTI's plus PI's) eingezeichnet.



**Abbildung 19**

Die Abbildungen 20 und 21 zeigen den Verlauf von Anti-p55-IgG-Avidität, T4-Zellzahl und HI-Viruslast für HAART-Patient #28 (Beginn ART 12/94; Beginn HAART 03/96).

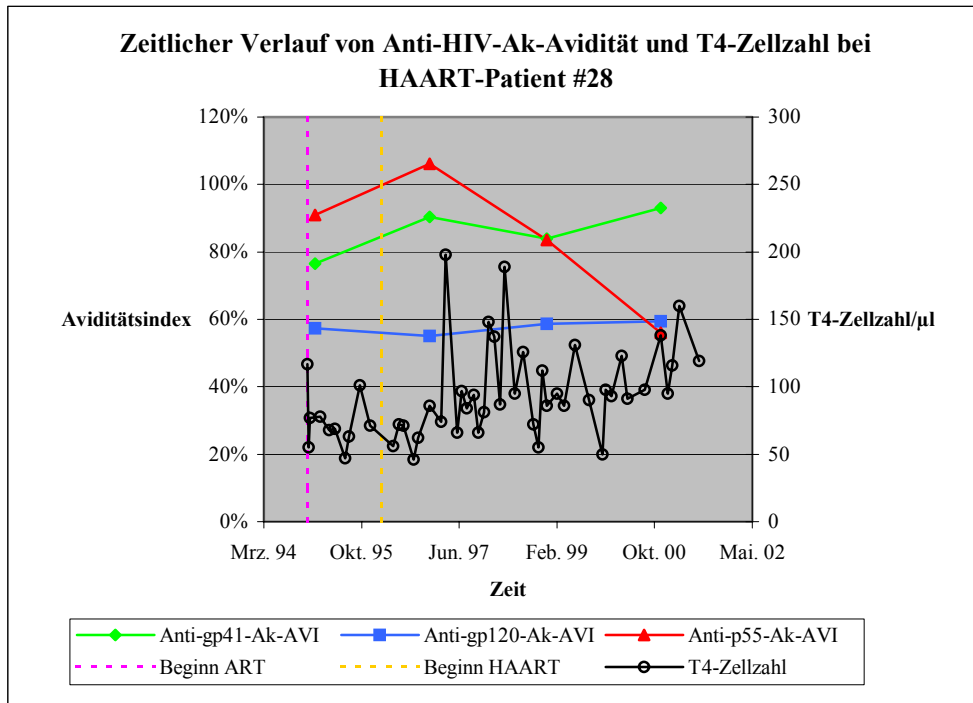


Abbildung 20

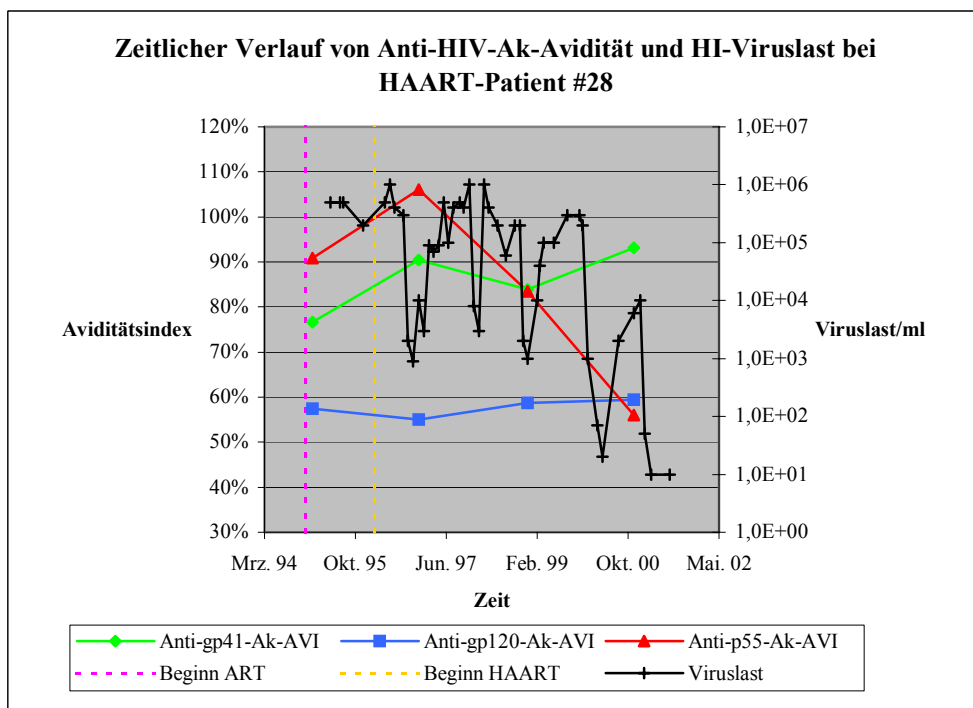


Abbildung 21

Bei HAART-Patient #28 wiesen die ersten drei aufeinanderfolgenden Proben sehr hohe Aviditätswerte für Anti-p55-IgG auf (zwischen 84 und 106 %), die letzte untersuchte Serumprobe aber besaß mit durchschnittlich 50 % einen deutlich niedrigeren Aviditätsindex. Eine Testwiederholung konnte das bestehende AI-Ergebnis der letzten Patientenprobe bestätigen.

Die T4-Zellzahl war über den gesamten Untersuchungszeitraum  $< 200/\mu\text{l}$ , wobei sich allenfalls ein leichter Aufwärtstrend andeutete.

Die Viruslast war zu Beginn des Beobachtungsintervalls sehr hoch ( $> 1,0\text{E}+05/\text{ml}$ ), im weiteren Verlauf konnte jedoch trotz starker Schwankungen eine eindeutige Abwärtstendenz festgestellt werden.

#### **4. 4. Einfluß der T4-Zellzahl auf die Ak-Avidität**

Um einen möglichen Einfluß der T4-Zellzahl auf die Anti-HIV-Ak-Avidität ohne HAART nachzuweisen, wurden bei den Patientengruppen LTS, PROG und HAART die Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-Aviditätsindices mit der T4-Zellzahl für den Beobachtungszeitraum vor HAART-Beginn korreliert. Der Vergleich von Anti-HIV-Ak-Avidität und T4-Zellzahl wurde folgendermaßen vorgenommen :

Für die HIV-Patienten, die im Laufe der Studie HAART bekamen, wurden die AI- bzw. T4-Zellzahldifferenzen für den Zeitraum vor HAART-Beginn berechnet, indem pro Patient der AI-Wert bzw. die T4-Zellzahl der letzten getesteten Probe vor HAART-Beginn von dem jeweiligen Wert der ersten untersuchten Patientenprobe subtrahiert wurde. Der Zeitraum vor HAART-Beginn, für den die AI- bzw. T4-Zellzahldifferenzen berechnet wurden, war für die einzelnen HIV-Patienten unterschiedlich lang und lag zwischen 34 (HAART #39) und 83 Monaten (HAART #32).

Für alle übrigen Probanden, die während des gesamten Untersuchungszeitraums keine HAART erhielten, wurden die AI- bzw. T4-Zellzahldifferenzen zwischen der letzten und der ersten untersuchten Patientenprobe gebildet.

Für die HIV-Patienten #18, #28 und #30 war eine Datenpräsentation nicht möglich, weil in der Zeit vor HAART-Beginn bei maximal einer Probe die Ak-Avidität bestimmt und deshalb keine Aviditätsdifferenz berechnet werden konnte.



In den Abbildungen 22-24 sind die Anti-gp41-, Anti-gp120- bzw. Anti-p55-IgG-Aviditäts- und T4-Zellzahldifferenzen für den Beobachtungszeitraum ohne HAART-Applikation gegeneinander aufgetragen.

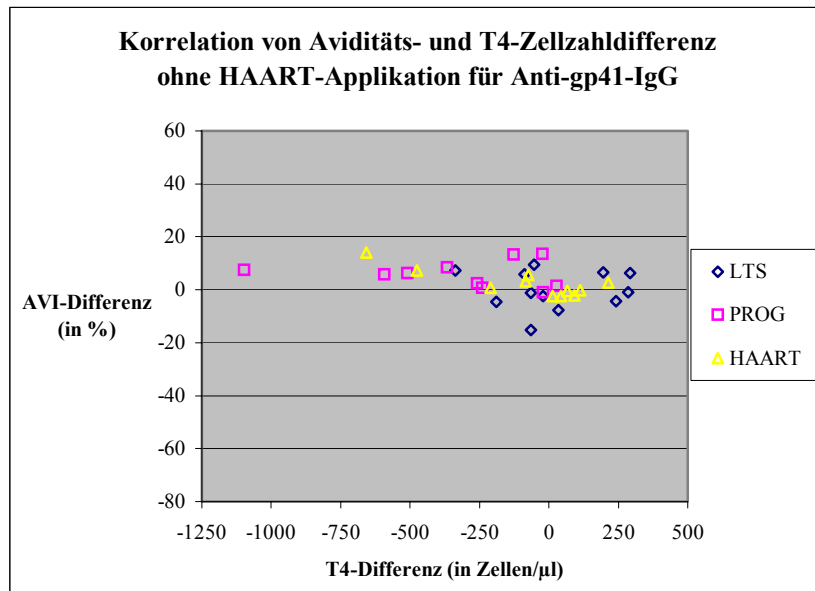


Abbildung 22

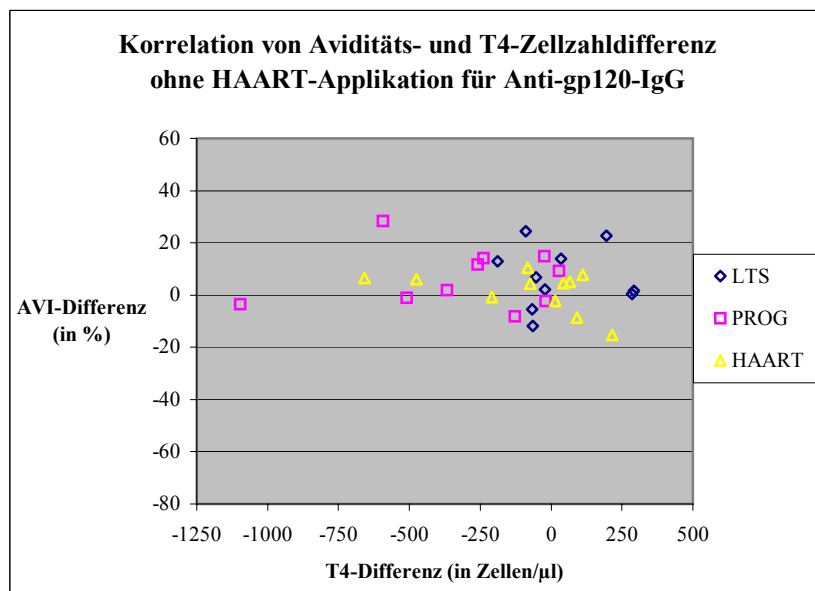
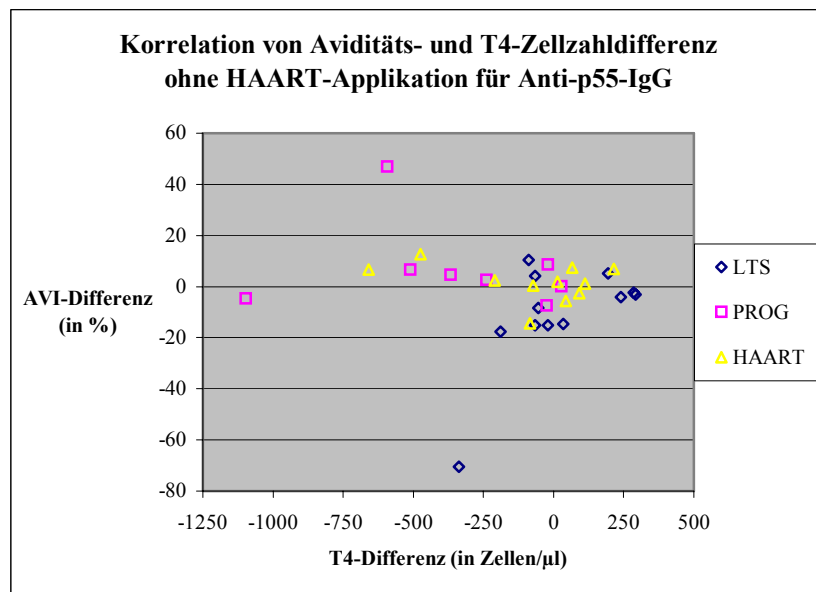


Abbildung 23



**Abbildung 24**

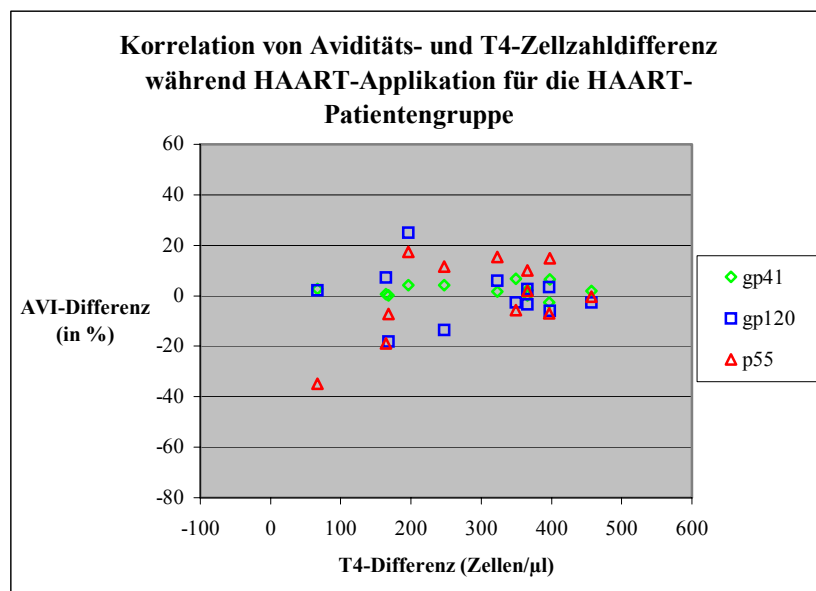
Die Wechselbeziehung der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-Aviditätsdifferenzen zwischen den drei HIV-Patientenkollektiven wurde an Hand des t-Tests (unpaired, Welch corrected; InStat<sup>®</sup> 3.0) untersucht. AI-Differenzen von schwacher Signifikanz waren zwischen LTS- und PROG-Patienten für Anti-gp41-IgG ( $P_{gp41} \approx 0,04$ ) und Anti-p55-IgG ( $P_{p55} \approx 0,05$ ) nachweisbar. Im übrigen jedoch konnten weder zwischen LTS- und PROG-Patienten ( $P_{gp120} \approx 0,95$ ), noch zwischen PROG- und HAART-Patienten ( $P_{gp41} \approx 0,16$ ;  $P_{gp120} \approx 0,27$ ;  $P_{p55} \approx 0,38$ ) bzw. zwischen LTS- und HAART-Patienten ( $P_{gp41} \approx 0,34$ ;  $P_{gp120} \approx 0,27$ ;  $P_{p55} \approx 0,08$ ) signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Darüber hinaus wurden innerhalb eines jeden Patientenkollektivs die AI-Differenzen zwischen den einzelnen HIV-Antigenen für den Zeitraum ohne HAART-Anwendung verglichen (unpaired t-Test, Welch corrected; InStat<sup>®</sup> 3.0). Lediglich in der LTS-Gruppe konnte beim Vergleich der Anti-gp120- mit den Anti-p55-IgG-AI-Differenzen eine Signifikanz ermittelt werden ( $P_{gp120-p55} \approx 0,02$ ). Im übrigen ließen sich weder im LTS-Kollektiv ( $P_{gp41-gp120} \approx 0,14$ ;  $P_{gp41-p55} \approx 0,11$ ), noch in der PROG- ( $P_{gp41-gp120} \approx 0,84$ ;  $P_{gp41-p55} \approx 0,79$ ;  $P_{gp120-p55} \approx 0,90$ ) bzw. der HAART-Gruppe ( $P_{gp41-gp120} \approx 0,77$ ;  $P_{gp41-p55} \approx 0,69$ ;  $P_{gp120-p55} \approx 0,93$ ) signifikante Unterschiede in den AI-Differenzen zwischen den einzelnen HIV-Antigenen nachweisen.

#### 4. 5. Einfluß von HAART auf die Ak-Avidität

Die mögliche Wirkung von HAART auf den Verlauf der Anti-HIV-Ak-Avidität wurde an den Patienten der HAART-Gruppe untersucht. Für den Zeitraum der HAART-Applikation wurden die Differenzen der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-Aviditätsindizes und der T4-Zellzahlen berechnet, indem für jeden HAART-Patient der AI-Wert bzw. die T4-Zellzahl der letzten untersuchten Probe unter HAART von dem jeweiligen Wert der ersten verfügbaren, unter HAART abgenommenen Probe subtrahiert wurde. Die Zeitspanne der HAART-Anwendung, die der Berechnung der Aviditäts- und T4-Zellzahldifferenzen zu Grunde lag, war für die einzelnen Patienten unterschiedlich lang und betrug zwischen 22 (HAART #31) und 53 (HAART #37) Monaten.

In Abbildung 25 sind die Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-Aviditätsdifferenzen gegen jene der T4-Zellzahl für die Zeitraum der HAART-Anwendung aufgetragen. Dargestellt sind auch die Daten der HIV-Patienten #28 und #30, bei denen eine Berechnung der Aviditäts- und T4-Zellzahldifferenzen für die Zeit vor HAART-Beginn nicht möglich war.

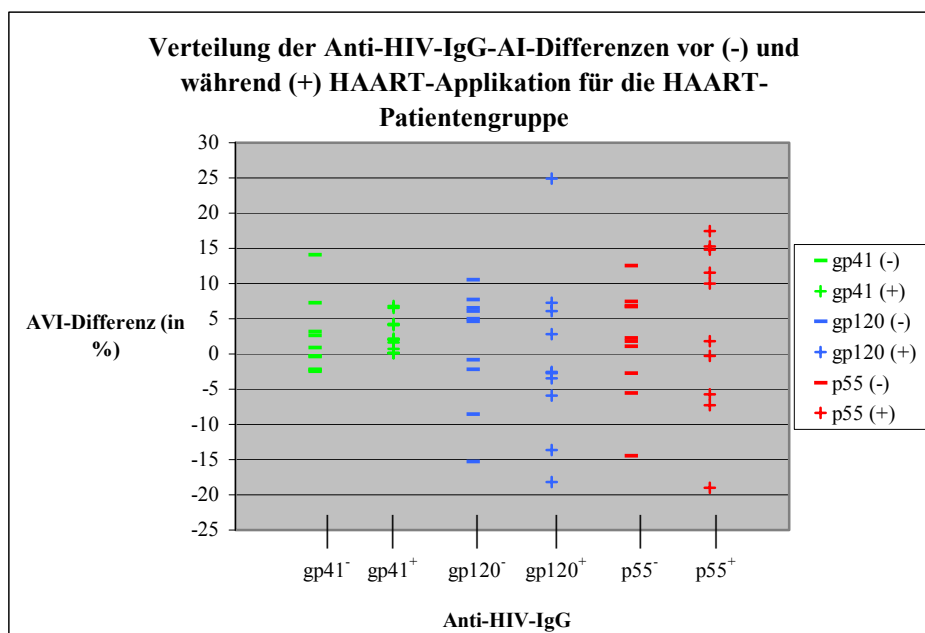


**Abbildung 25**

Ein Vergleich der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-Aviditätsdifferenzen innerhalb des HAART-Kollektivs für den Zeitraum der HAART-Anwendung zeigte keine

signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen HIV-Antigenen (unpaired t-Test, Welch corrected; InStat<sup>®</sup> 3.0;  $P_{gp41-gp120} \approx 0,46$ ;  $P_{gp41-p55} \approx 0,57$ ;  $P_{gp120-p55} \approx 0,98$ ).

Um einen möglichen Einfluß von HAART auf den Anti-HIV-Ak-Aviditätsverlauf nachweisen zu können, wurden die Aviditätsdifferenzen vor HAART-Beginn mit denen für den Zeitraum der HAART-Anwendung verglichen. In Abbildung 26 ist die Verteilung der Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-AI-Differenzen vor bzw. während der HAART-Applikation für die HAART-Patientengruppe gezeigt.



**Abbildung 26**

Der statistische Vergleich der Aviditätsdifferenzen vor HAART-Beginn mit denen für den Zeitraum der HAART-Anwendung erbrachte für das HAART-Patientenkollektiv keinen signifikanten Unterschied (unpaired t-Test, Welch corrected; InStat<sup>®</sup> 3.0;  $P_{gp41} \approx 0,70$ ;  $P_{gp120} \approx 0,65$ ;  $P_{p55} \approx 0,62$ ).

Im folgenden soll stellvertretend für die 13 mit HAART behandelten HIV-Patienten der Einfluß von HAART auf die zeitliche Entwicklung der Ak-Avidität und T4-Zellzahl exemplarisch an fünf Probanden dargestellt werden. Die T4-Zellzahl wurde als Parameter zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes gewählt, weil sie den immunologischen Status

des Patienten widerspiegelt. Die Auswahl der fünf HIV-Patienten richtete sich nach dem Verlauf der T4-Zellzahl. Zur Beurteilung einer möglichen Beeinflussung der Ak-Avidität durch die HAART wurde als Kriterium gefordert, dass bei den ausgewählten Probanden (#20, #27 sowie #30-32) sowohl vor HAART-Beginn infolge einer Progression der HIV-Infektion als auch während der HAART-Anwendung infolge einer Stabilisierung des Immunsystems signifikante Veränderungen ihrer T4-Zellzahlen nachweisbar sein mussten.

Bei PROG-Patient #20 wurde mit der HAART erst drei Monate vor dem Tod des Patienten begonnen. Die zuvor durchgeführte antiretrovirale Therapie mit AZT bzw. 3TC und D4T war indes nicht in der Lage, den Abfall der T4-Zellzahl zu bremsen. In Abbildung 27 sind die Verläufe der Anti-HIV-Ak-Avidität und T4-Zellzahl für PROG-Patient #20 dargestellt. Die T4-Zellzahlen des Patienten waren bis September 1992 hoch (Werte zwischen 480 und 1125/ $\mu$ l), zwischen März 1995 bis zum Tod des Patienten im März 1998 lagen die Werte dann jedoch deutlich unter 100/ $\mu$ l (zwischen September 1992 und März 1995 waren von Patient #20 keine Daten zur T4-Zellzahl verfügbar). Die erste der vier untersuchten Patientenproben wurde zu Zeiten einer hohen T4-Zellzahl abgenommen und wies hohe (61 % für Anti-gp120-IgG, 75 % für Anti-gp41-IgG sowie 86 % für Anti-p55-IgG) Aviditätswerte auf. Die übrigen drei Proben wurden zu einer Zeit niedriger T4-Zellzahlen gewonnen, zeigten aber nur geringfügig veränderte Aviditätswerte an (maximale intraindividuelle AI-Schwankung zwischen 6 % für Anti-p55-IgG und 12 % für Anti-gp120-IgG).

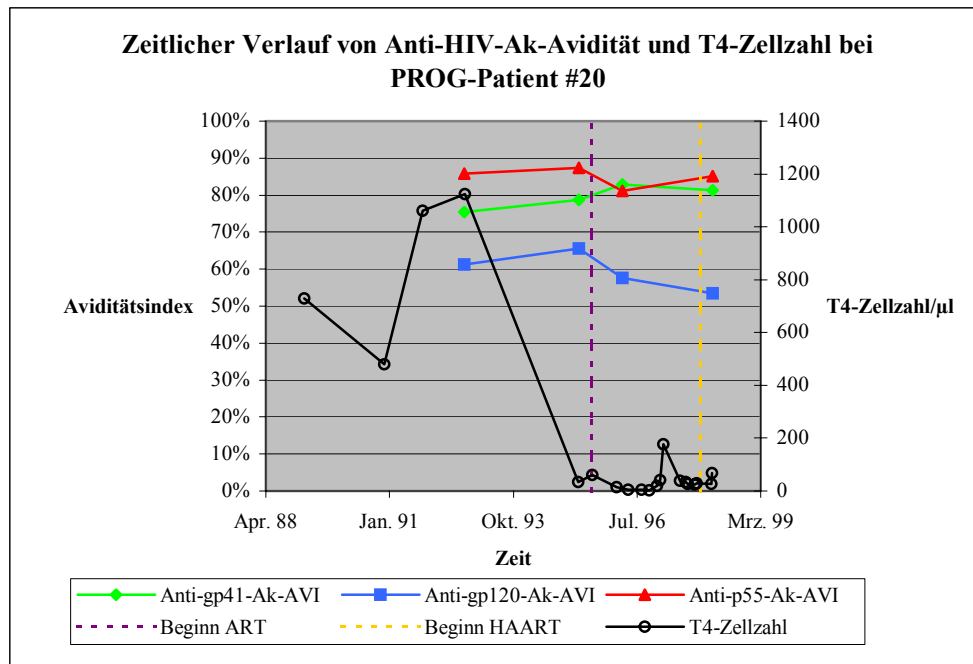


Abbildung 27

In Abbildung 28 werden die zeitlichen Verläufe der Anti-HIV-Ak-Avidität und T4-Zellzahl von HAART-Patient #27 dargestellt. Nach anfänglich hohen Werten sank die T4-Zellzahl infolge einer Progression der HIV-Infektion zeitweise auf Werte unter 100/μl ab. Zwischen 1991 und Anfang 1996 war der Patient immer wieder intermittierend mit NRTI's behandelt worden, ohne dass sich ein nennenswerter Erfolg in Bezug auf den Verlauf der T4-Zellzahl einstellte. Im April 1996 wurde die HAART mit der Gabe von AZT, 3TC und SQV begonnen. Ab diesem Zeitpunkt war sowohl eine stetige Zunahme der T4-Zellzahl auf Werte > 400/μl zu beobachten als auch (ohne Abbildung) eine deutliche Reduktion der HI-Viruslast von ca 1,0E+04 Copies/ml zu Beginn auf Werte, die zum Schluß unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die gemessenen Aviditätswerte waren für Anti-gp41-IgG mit 81-87 % sehr hoch bei geringer intraindividuelle Schwankung. Die Anti-p55-IgG-Aviditätswerte des Patienten zeigten mit 73 % in der ersten und 90 % in der letzten untersuchten Probe eine kontinuierliche, auf hohem Niveau stattfindende Zunahme um 17 %, die sich mit dem Verlauf der T4-Zellzahl des Patienten deckte. Die für Anti-gp120-IgG ermittelten Aviditätswerte waren hingegen mit 29-39 % in einem deutlich niedrigeren Bereich angesiedelt und schwankten kaum.

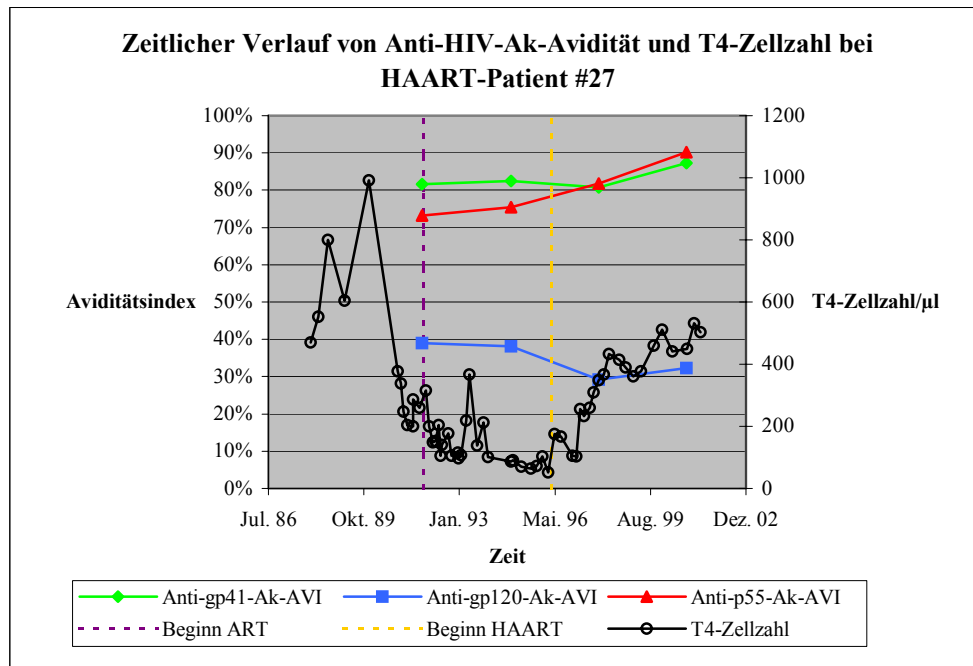


Abbildung 28

Der HIV-Patient #30 gehörte zu den Probanden, bei denen der Anstieg der T4-Zellzahl während der HAART-Applikation am stärksten ausfiel. In Abbildung 29 werden der T4-Zellzahl- und Anti-HIV-Ak-Aviditätsverlauf für den Patienten gezeigt. Mit Beginn der HAART im September 1997 war ein stetiger Anstieg der T4-Zellzahlen von 102/µl im November 1997 auf 739/µl im Mai 2001 zu verzeichnen (vor 09/97 waren keine T4-Zellzahlen verfügbar). Die Anti-gp41-IgG-Aviditätswerte waren mit 75-78 % hoch bei minimaler intraindividuelle Schwankung. Eine intraindividuelle Schwankung ähnlicher Größenordnung zeigten die Aviditätswerte für Anti-gp120-IgG, die aber mit 34-38 % in einem deutlich niedrigeren Bereich lagen. Die Anti-p55-IgG-Aviditätswerte waren ähnlich hoch wie die für Anti-gp41-IgG und schwankten ebenfalls nur geringfügig.

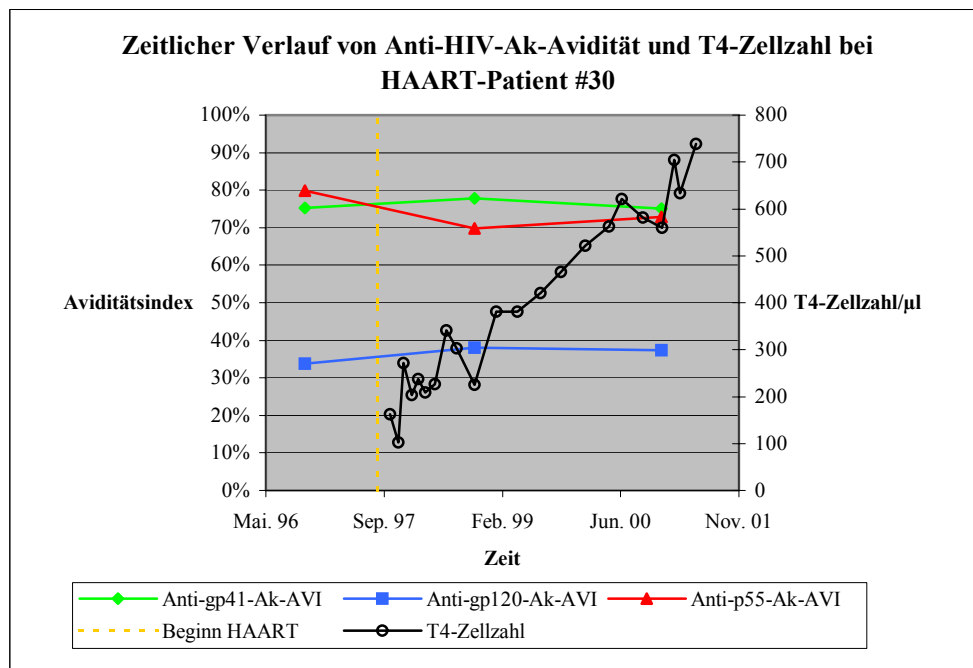
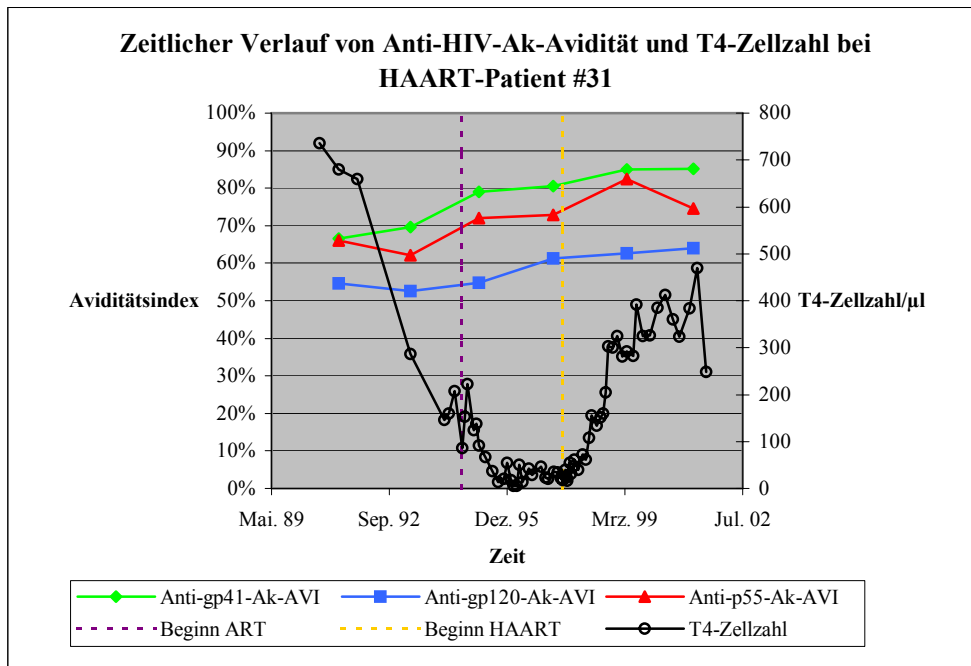


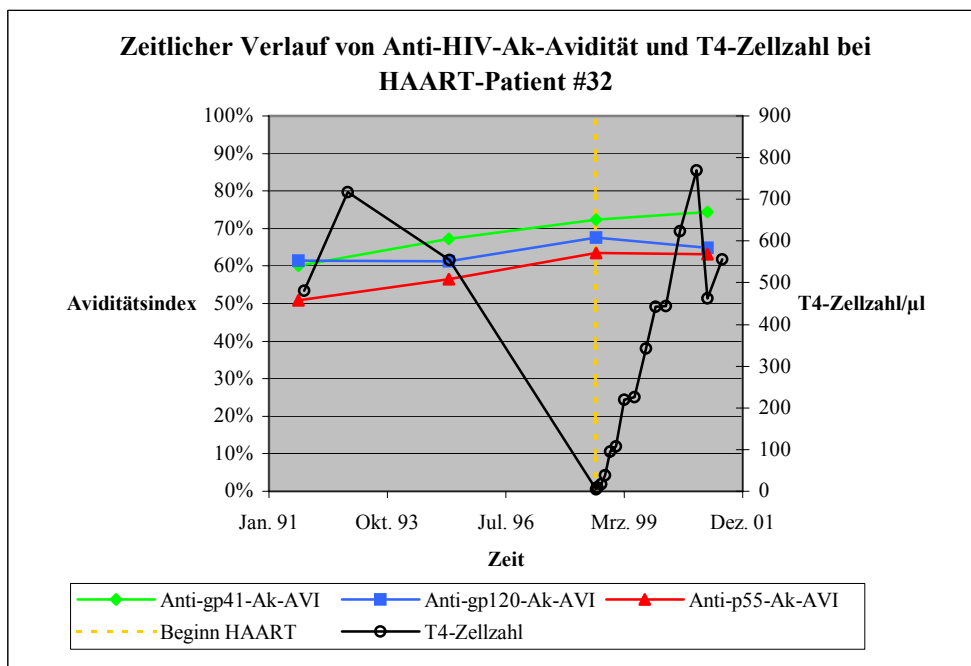
Abbildung 29

Ein nahezu identischer zeitlicher Verlauf von T4-Zellzahl, Anti-HIV-Ak-Avidität und HI-Viruslast (ohne Abbildung) zeigte sich bei den beiden HIV-Patienten #31 und #32 wie aus den Abbildungen 30 (#31) und 31 (#32) zu sehen ist. In beiden Fällen war zunächst eine massive Progression der HIV-Infektion zu beobachten, die durch einen Abfall der T4-Zellzahl auf zeitweise unter 20/μl sowie durch hohe HI-Viruslasten (durchschnittlich  $\geq 1,0E+04$  Copies/ml) gekennzeichnet war (bei Patient #32 waren zwischen März 1995 und August 1998 keine Angaben zur T4-Zellzahl verfügbar). Bei Patient #31 wurde im Juli 1997 mit der HAART begonnen, bei Patient #32 im August 1998. In der Zeit davor wurde Proband #31 von September 1994 an abwechselnd mit einer NRTI-Mono- bzw. Zweifachtherapie behandelt, während Patient #32 vor August 1998 keine antiretrovirale Medikation bekam. Unter dem Einfluß von HAART zeigten beide HIV-Patienten eine signifikante Zunahme ihrer T4-Zellzahlen sowie eine Stabilisierung auf deutlich höherem Niveau.





**Abbildung 30**



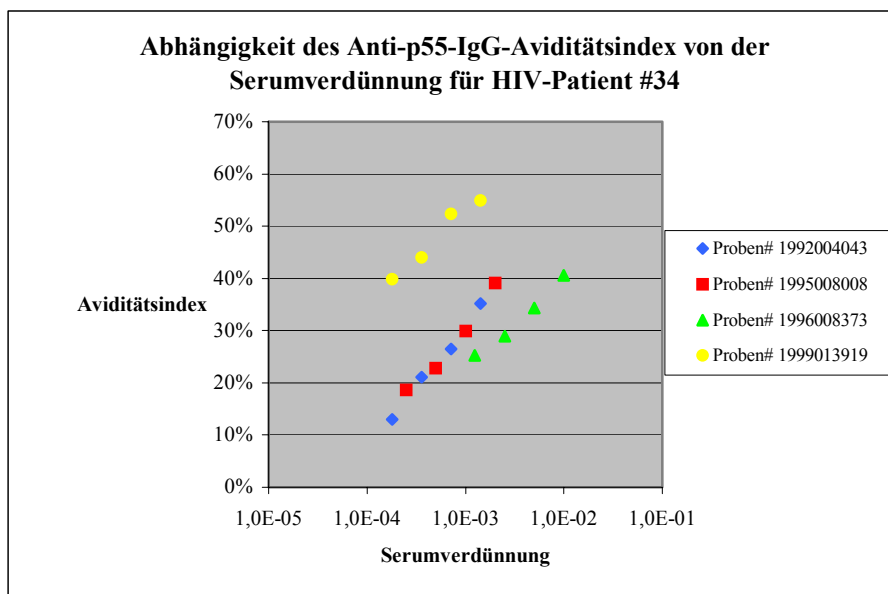
**Abbildung 31**

Die HI-Viruslasten beider Probanden sanken dank HAART unter die Nachweisgrenze ab (keine Abbildung). Die gemessenen Aviditätsindizes waren in beiden Fällen hoch. Die AI-Werte für Anti-gp41-IgG nahmen bei HIV-Patient #31 von 66 auf 85 % zu, bei Proband #32 stiegen sie von 60 auf 74 % an. Die Anti-gp120-IgG-Aviditätsindizes von

Patient #31 zeigten mit 55 % in der ersten und 64 % in der letzten untersuchten Probe einen geringen Aufwärtstrend, ebenso die Werte für Anti-p55-IgG, die von 66 auf 75 % zunahmen. Bei HIV-Patient #32 war eine Zunahme der Anti-p55-IgG-Avidität um 12 % feststellbar, die AI-Werte für Anti-gp120-IgG lagen zwischen 61 % in den ersten beiden und 68 bzw. 65 % in den letzten beiden analysierten Proben. Bei beiden Patienten kann jedoch nicht die HAART-Applikation für die beschriebenen AI-Zunahmen verantwortlich gemacht werden, da diese bereits vor HAART-Beginn messbar waren.

#### **4. 6. Abhängigkeit des Aviditätsindex von der Ak-Konzentration**

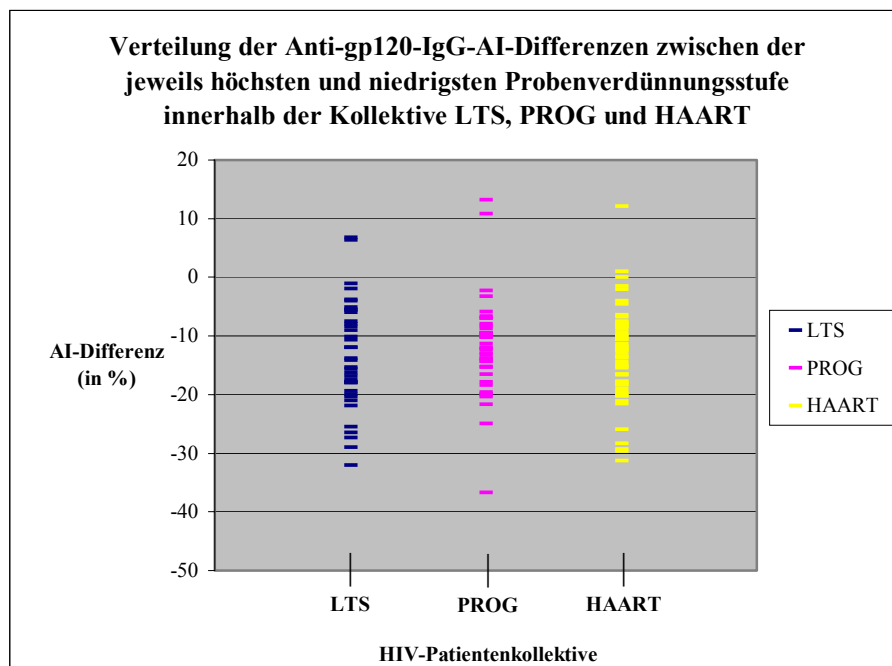
Die einfachste Methode der AI-Berechnung besteht darin, den Quotienten aus den Extinktionen mit und ohne Harnstoffelution bei einer einzigen, vorgegebenen Verdünnung der Serumprobe zu bilden und diesen Wert mit 100 zu multiplizieren. Der gravierende Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Abhängigkeit der Avidität von der Konzentration spezifischer Ak<sup>53</sup>. Stellvertretend für alle getesteten Probanden wird in Abbildung 32 der Einfluß der Anti-p55-IgG-Titerhöhe auf den AI am Beispiel der vier, von Patient #34 untersuchten Proben (Proben-Nummern : 1992004043, 1995008008, 1996008373 und 1999013919) dargestellt.



**Abbildung 32**

Die in Abbildung 32 dargestellten Aviditätsindices für Anti-p55-IgG wurden nicht wie in dieser Arbeit üblich aus Titrationskurven berechnet. Vielmehr wurde für jede der vier in 2er-Schritten fortlaufenden Verdünnungsstufen der Aviditätsindex nach der Formel  $A/B \times 100$  ( $A = \text{OD-Wert mit Harnstoffelution}$ ,  $B = \text{OD-Wert ohne Harnstoffelution}$ ) separat ermittelt. Pro Serumprobe wurden so vier AI-Werte (anstelle von einem Wert wie bei der AI-Berechnung aus Titrationskurven) generiert, die in Relation zu ihren jeweiligen Verdünnungsstufen aufgetragen wurden. Dabei war feststellbar, dass der Aviditätsindex mit zunehmender Verdünnung der Probe (gleichbedeutend mit einer Abnahme der Konzentration spezifischer Ak) abnahm. Dieser Effekt war von wenigen Ausnahmen abgesehen bei allen getesteten Proben (insgesamt 159) zu beobachten und unabhängig von der Ak-Spezifität.

Stellvertretend für alle untersuchten Antigene wird in Abbildung 33 am Beispiel von Anti-gp120-IgG die Verteilung der Differenzen zwischen den AI-Werten der höchsten und denen der niedrigsten Verdünnungsstufe aller getesteten Patientenproben innerhalb der Kollektive LTS, PROG und HAART gezeigt. Die AI-Berechnung erfolgte nach der Formel  $A/B \times 100$  ( $A = \text{OD-Wert mit Harnstoffelution}$ ,  $B = \text{OD-Wert ohne Harnstoffelution}$ ).



**Abbildung 33**

---

Die in Abbildung 33 gezeigten AI-Differenzen für Anti-gp120-IgG waren für die überwiegende Mehrzahl der getesteten Proben negativ, d. h. mit zunehmender Probenverdünnung bzw. abnehmender Konzentration spezifischer Ak war ein Abfall des Aviditätsindex nachweisbar. Auf eine graphische Darstellung der AI-Differenzen für Anti-gp41- und Anti-p55-IgG wurde verzichtet, weil keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu Anti-gp120-IgG auftraten. Der statistische Vergleich der Differenzen zwischen den Aviditätsindices der höchsten und denen der niedrigsten Verdünnungsstufe ergab für Anti-gp120-IgG keine signifikanten Unterschiede zwischen den HIV-Patientengruppen (unpaired t-Test, Welch corrected; InStat<sup>®</sup> 3.0;  $P_{\text{LTS-PROG}} \approx 0,52$ ;  $P_{\text{PROG-HAART}} \approx 0,48$ ;  $P_{\text{LTS-HAART}} \approx 0,95$ ).

## **5. DISKUSSION UND AUSBLICK**

Zunächst müssen in Anbetracht der im Vergleich zu gp41 deutlich höheren Schwankungsbreite der Aviditätswerte der gp120- und p55-Kontrollproben mögliche Ursachen dafür diskutiert werden. Die gemessenen AI-Schwankungen der gp120- und p55-Kontrollproben können indes nicht auf eine unzureichende Übereinstimmung des mittels der jeweils vier OD-Wertepaare (ohne bzw. mit Harnstoffelution) generierten Graphen mit der eingefügten Ausgleichsgeraden zurückgeführt werden, da das Bestimmtheitsmaß (ein Maß für den Grad der Übereinstimmung des Graphen mit der Ausgleichsgeraden) bei sämtlichen Graphen der gp120- und p55-Kontrollproben  $\geq 98\%$  lag. Vielmehr muss die große AI-Schwankungsbreite der gp120- und p55-Kontrollproben andere Ursachen haben.

Bis heute ist die Bestimmung der Ak-Avidität mit Hilfe der Festphasen-ELISA-Technik nicht unumstritten<sup>19,71</sup>, da bei dieser Methode unterstellt wird, dass die Ak-Bindung an das auf der Plattenoberfläche immobilisierte Ag homogen ist und das lineare Verhältnis zwischen der Ak-Konzentration und der gemessenen optischen Dichte widerspiegelt. Tatsächlich wird aber die Ak-Avidität maßgeblich von der Ag-Dichte auf der Plattenoberfläche sowie einer Vielzahl weiterer konzentrationsabhängiger Oberflächeneffekte beeinflusst<sup>71</sup>, auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll.

Bei dem für diese Arbeit entwickelten Aviditäts-Assay wurden die HIV-Proteine über den Mechanismus der passiven Adsorption an die Festphase gebunden. Für diese Art der Bindung von Proteinen an Polystyrol sind hauptsächlich hydrophobe und ionische Wechselwirkungen verantwortlich. Obgleich die meisten Immunoassays zur Aviditätsmessung auch heute noch auf dem Prinzip der passiven Adsorption beruhen, lassen sich Störungen bei der Proteinadsorption an die Festphase nicht völlig ausschließen.

Die Lösungen zur nicht-kovalenten Beschichtung enthalten meist Konzentrationen bis zum 10-fachen der Menge an Protein, die für eine Belegung der Oberfläche mit einer monomolekularen Schicht nötig wäre. Dieser Proteinüberschuß kann durch das Auftreten von Protein-Protein-Wechselwirkungen instabile Mehrfachschichten an der Oberfläche bilden, die den weiteren Ablauf des Assays stören. Ferner kann die Affinität zwischen Ak und Ag durch eine ungünstige Ausrichtung der adsorbierten Moleküle

(sterische Hinderung) sowie durch mögliche Konformationsänderungen bei der Adsorption verringert werden. Schließlich erfolgt die Molekülausrichtung an der Oberfläche nach dem Zufallsprinzip, so dass durch die unterschiedliche räumliche Orientierung der Antigenepitope auf der Plattenoberfläche eine Vielzahl möglicher Bindungen entsteht, deren Stärke von sehr fest bis ganz leicht variiert.

Ein weiteres Problem, das die Bestimmung der Ak-Avidität mit Hilfe der Elutionsmethode mit sich bringt, besteht darin, dass die Spaltung präformierter Ag-Ak-Bindungen bei einem zuvor auf der Festphase immobilisierten Antigen ungleich schwerer ist als bei einem Flüssigphasen-System mit mobilen Immunkomplexen<sup>19</sup>.

Die Unterscheidung zwischen einer akuten und einer länger zurückliegenden Infektion basiert üblicherweise auf der Fähigkeit, durch geeignete Wahl sowohl des denaturierenden Agens als auch seiner Konzentration eine Separation von niedrig- und hochaviden Ak zu erreichen. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass es im Verlauf der Infektion zu einer Reifung der Immunantwort mit kontinuierlichem Anstieg der Avidität spezifischer Ak kommt.

Über die Differenzierung von akuter und abgelaufener Infektion hinaus kommt der Aviditätsbestimmung auch dadurch Bedeutung zu, dass funktionelle Immunität von der Präsenz hochavider Ak abzuhängen scheint. Aus der Literatur sind Arbeiten bekannt, die zeigen, dass die Anwesenheit neutralisierender Ak hoher Avidität die Grundlage für funktionelle Immunität darstellt. So weist die Mehrheit der wenigen Patienten, die das klinische Bild einer Varizellen-Primärinfektion zweimal zeigten, eine niedrige Avidität spezifischer Ak gegen VZV auf<sup>29</sup>. Offensichtlich kam es während der ersten Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Virus nicht zu einer Aviditätsreifung, was das Fehlen von funktioneller Immunität und damit das Auftreten einer zweiten Varizellenepisode zur Folge hat. Aus ähnlichem Grund scheinen intrauterine CMV-Infektionen bei Schwangeren mit niedrigaviden IgG-Ak gegen CMV häufiger aufzutreten<sup>72</sup>. Mütter, die im ersten Trimenon der Schwangerschaft über hochavide IgG-Ak gegen Toxoplasma verfügen, neigen weniger zur Übertragung intrauteriner Toxoplasma-Infektionen<sup>73</sup>. Dies scheint ebenso für intrauterine HIV-Infektionen zuzutreffen<sup>74</sup>.

Die Aviditätsreifung im Rahmen der HIV-Infektion wurde in dieser Studie an Hand der Proben von drei Serokonversionspatienten untersucht. Nach Auswertung der Messergebnisse zeigte sich lediglich bei HIV-Patient #1 sowohl nach Behandlung mit Harnstoff 4 M als auch mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M ein Anstieg der Anti-gp41-IgG-Avidität. Für Anti-gp120-IgG blieben die Aviditätswerte von Patient #1, die durch Elution mit Harnstoff 4 M erhalten wurden, nahezu konstant, während durch Elution mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M eine Zunahme der Avidität zu beobachten war. Darüber hinaus waren die Aviditätswerte für Anti-gp120-IgG nach Behandlung mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M höher als jene, die durch Elution mit Harnstoff 4 M erhalten wurden. Dies war insofern unerwartet als die von J. Schubert und R. Kneitz et al. (persönliche Mitteilung) angestellten Untersuchungen zur Ak-Avidität bei EBV-, Masernvirus- und VZV-Infektionen, bei denen als denaturierendes Reagenz ebenfalls Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet wurde, diese Beobachtung nicht bestätigen konnten. Infolge der stärker polar protischen Lösungseigenschaften von Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sollte eine Dissoziation präformierter Immunkomplexe im Vergleich zu Harnstoff alleine erleichtert sein und zu messbar niedrigeren Aviditätswerten führen. Als mögliche Ursache der nach Elution mit Harnstoff-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 M aufgetretenen höheren Aviditätswerte für Anti-gp120-IgG ist eine vereinzelte, durch Oxidation verursachte irreversible Bindung von Ag und Ak in Betracht zu ziehen.

Bei den übrigen beiden Serokonversionspatienten war weder für Anti-gp41-IgG (#2-3) noch für Anti-p55-IgG (#3) eine Zunahme der Avidität nachweisbar. Insofern kann eine Reifung der Immunantwort im Sinne eines Anstieges der Ak-Avidität, wie sie bei einer Vielzahl mikrobieller Infektionen<sup>5,7,11</sup> üblicherweise auftritt, für die Infektion mit HIV weder ausgeschlossen noch sicher festgestellt werden. Hinzu kommt, dass die Anzahl der untersuchten Serokonversionspatienten sehr klein war, so dass die diesbezüglichen Ergebnisse nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzen.

Die bezüglich der HIV-Patientenkollektive LTS, PROG und HAART gewonnenen Resultate dieser Studie stehen teilweise in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen bereits publizierter Arbeiten über den Aviditätsverlauf HIV-spezifischer Ak. So berichten Chargelegue et al. über signifikant niedrigere Aviditäts- bzw. Affinitätswerte für Anti-p17- und Anti-p24-IgG bei AIDS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit asymptomata-

tischer HIV-Infektion<sup>56,63</sup>. Im Gegensatz dazu konnten in dieser Studie weder für Anti-gp41-, noch für Anti-gp120- oder für Anti-p55-IgG signifikante Aviditätsunterschiede zwischen den HIV-Patientenkollektiven LTS, PROG und HAART festgestellt werden. Niedrig- wie hochavide IgG-Ak gegen HIV-gp120 bzw. HIV-p55 waren gleichermaßen in allen drei untersuchten Patientenkollektiven nachweisbar. Selbst in der PROG-Gruppe, deren Patienten durch eine bereits weit fortgeschrittene HIV-Infektion gekennzeichnet waren, konnten Aviditätsindices > 50-60 % (für Anti-gp120-IgG z. B. die Probanden #20-24 und #26; für Anti-p55-IgG z. B. die Patienten #20-21, #23 und #26; Daten nicht für alle Patienten gezeigt) gefunden werden. Bei diesen Patienten hohe Aviditätswerte zu finden, ist bemerkenswert. Funktionstüchtige CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind sowohl bei der Aviditätsreifung als auch bei der Konservierung hochavider Ak von Bedeutung<sup>75</sup>. Bereits in der frühen Phase der Erkrankung kommt es jedoch bevorzugt zu einer Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit HIV-1 in den Lymphknoten<sup>76,77</sup>. Der durch die HIV-Infektion resultierende T-Helferzell-Defekt<sup>78</sup> kann die Reifung der humoralen Immunantwort stören und so entweder die Unfähigkeit des Immunsystems zur Bildung hochavider Ak bewirken oder ihren Verlust induzieren.

Die Autoren Chargelegue et al. zeigen ferner eine Korrelation zwischen der Anti-p24-IgG-Avidität und der T4-Zellzahl auf. Danach sind bei Patienten mit asymptomatischer HIV-Infektion hochavide Ak mit stabilen und hohen T4-Zellzahlen assoziiert während bei AIDS-Patienten niedrigavide Ak zusammen mit niedrigen T4-Zellzahlen oder einer Abnahme der T4-Zellzahl einhergehen<sup>63</sup>. Die in dieser Studie gemessenen Aviditäten gp120- und p55-spezifischer HIV-Ak zeigten keine einheitliche Entwicklung in Relation zum T4-Zellzahlverlauf. Aviditätswerte von ≤ 40 % (z. B. bei den Patienten #6 und #10 für Anti-gp120-IgG sowie bei Proband #11 für Anti-p55-IgG; Daten für Patient #6 nicht gezeigt) waren ebenso zusammen mit hohen T4-Zellzahlen (≥ 400/μl) zu beobachten wie hohe Aviditätswerte von ≥ 50-60 % (z. B. bei den HIV-Patienten #22-24, #26 und #28 für Anti-gp120-IgG sowie bei den Probanden #23, #26 und #28 für Anti-p55-IgG; Daten nicht für alle Patienten gezeigt) gemeinsam mit niedrigen T4-Zellzahlen (≤ 200/μl) auftraten. Eine Beeinflussung der Avidität HIV-spezifischer Ak durch den immunologischen Status muß somit zumindest angezweifelt werden.



Darüber hinaus wird von verschiedenen Autoren<sup>8,63</sup> die Behauptung vertreten, dass die Anti-p24- bzw. Anti-p17-IgG-Avidität ein im Vergleich zur T4-Zellzahl besserer Prognoseparameter sei, da das Auftreten von niedrigaviden Anti-p17- bzw. Anti-p24-IgG's der Abnahme der T4-Zellzahl zeitlich (um ca. fünf bis sechs Jahre) vorausgeht.

Es wurden zwar in dieser Studie bei den ausgewählten HIV-Patienten weder Anti-p17- noch Anti-p24-IgG-Aviditäten bestimmt. Jedoch konnten keine Übereinstimmungen zwischen den für Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG gemessenen Aviditätsverläufen und dem Krankheits- bzw. Infektionsverlauf der Patienten festgestellt werden. Ein signifikanter Aviditätsanstieg war sowohl bei Patienten mit stabilem immunologischen Status und Krankheitsverlauf zu beobachten als auch bei Patienten, deren HIV-Infektion durch eine deutliche Progression gekennzeichnet war. Umgekehrt waren signifikante Aviditätsabnahmen nicht nur bei Patienten mit Krankheitsprogression nachzuweisen, sondern auch bei Probanden mit jahrelangem konsolidierten Krankheitsverlauf. Bei Betrachtung des Aviditätsverlaufes ohne HAART-Anwendung waren gerade noch signifikante AI-Differenzen lediglich zwischen der LTS- und PROG-Gruppe für gp41- und p55-spezifische IgG's nachweisbar. Negative Aviditätsdifferenzen, gleichbedeutend mit einem Aviditätsabfall in dem untersuchten Zeitintervall, waren indes signifikant häufiger bei Patienten der LTS-Gruppe, deren HIV-Infektion einen stabilen Verlauf zeigte, zu finden als bei Probanden der durch rasche Krankheitsprogression gekennzeichneten PROG-Gruppe.

Exemplarisch sollen dafür die beiden HIV-Patienten LTS #7 und PROG #16 angeführt werden. Bei beiden Probanden kam es im Verlauf zu großen Änderungen der Avidität für Anti-p55-IgG (Abnahme um 71 % bei #7; Anstieg um 51 % bei #16). Bei Patient #7 verlief die Abnahme der Anti-p55-IgG-Avidität von 85 auf 14 % parallel zur Entwicklung der T4-Zellzahlen, die von anfangs ca. 900/ $\mu$ l auf ca. 400/ $\mu$ l in der letzten untersuchten Probe abfielen. Diese Ergebnisse waren aus zwei Gründen höchst ungewöhnlich. Erstens war Patient #7 vom Zeitpunkt der HIV-Erstdiagnose im April 1994 bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes im März 2001 klinisch völlig asymptomatisch gewesen. Es bestanden somit in dieser Hinsicht keinerlei Anzeichen für eine Progression der HIV-Infektion. Zweitens waren sowohl die quantitative HIV-PCR als auch die Virusdirektisolierung aus Blutlymphozyten bei LTS-Patient #7 immer negativ ausgefallen. Das Fehlen einer Virämie stellte ebenfalls ein Indiz für eine Stagnation der HIV-In-

fektion dar. Der Anti-p55-IgG-Aviditätsverlauf korrelierte weder mit der zeitlichen Entwicklung der HI-Viruslast, noch mit dem klinischen Status des Patienten bzw. dessen Krankheitsverlauf. Eine übereinstimmende Entwicklung war lediglich zwischen Anti-p55-IgG-Avidität und T4-Zellzahl des Patienten feststellbar, wobei die Abnahme der Avidität dem Abfall der T4-Zellzahlen keineswegs zeitlich voranging, sondern vielmehr parallel zu ihm verlief. Ferner war die Avidität der letzten untersuchten Probe mit 14 % sehr gering in Relation zu der nur mäßig erniedrigten T4-Zellzahl (ca. 400/ $\mu$ l) aus dem gleichen Zeitraum.

Bei Proband #16 war ein signifikanter Anstieg der Anti-p55-IgG-Avidität von durchschnittlich 41 % in den ersten drei Proben auf 92 % in der letzten Probe nachweisbar. Der Aviditätsanstieg war insofern ungewöhnlich, da bei Patient #16 zum Zeitpunkt der HIV-Erstdiagnose im September 1991 eine bereits weit fortgeschrittene HIV-Infektion (Stadium IV C/D) vorlag, die knapp sieben Jahre später, im August 1998, zum Tod des Patienten führte. In Übereinstimmung mit dem Krankheitsverlauf nahm auch die Zahl der T4-Zellen ab. Die Anti-p55-IgG-Avidität dagegen wies eine zum Krankheits- und T4-Zellzahlverlauf konträre Entwicklung auf. Die Anti-gp120-IgG-Avidität von Patient #16 zeigte eine uneinheitliche Entwicklung. Während die erste und letzte untersuchte Probe Werte von 35 bzw. 36 % aufwies, lagen die Aviditätsindices der beiden übrigen Proben bei 62 bzw. 64 %. Ein Vergleich des Anti-gp120-IgG-Aviditätsverlaufes mit dem der T4-Zellzahlen von Patient #16 ergab eine gegensätzliche Entwicklung. Während die Aviditätswerte von der ersten (aus dem Jahr 1991) bis zur dritten untersuchten Probe (aus dem Jahr 1996) um 29 % anstiegen, sanken die T4-Zellen im gleichen Zeitraum von ca. 600/ $\mu$ l auf unter 100/ $\mu$ l ab. Dagegen war von der dritten bis zur letzten untersuchten Probe (aus dem Jahr 1998) ein Aviditätsabfall von 28 % nachweisbar. Parallel dazu erholten sich die T4-Zellen und stiegen von unter 100/ $\mu$ l auf Werte um 250/ $\mu$ l an. Der Krankheitsverlauf spiegelte sich ebenfalls nicht im Verlauf der Anti-gp120-IgG-Avidität wider, da zwischen der ersten untersuchten Probe, die zu Beginn der Krankheitsprogression abgenommen wurde, und der letzten analysierten Probe, die kurz vor dem Tod des Patienten gewonnen wurde, lediglich eine Aviditätsdifferenz von 1 % lag.

Wenige Erkenntnisse gibt es über die Auswirkungen einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) auf den Aviditätsverlauf HIV-spezifischer Ak<sup>67</sup>. Zweifelsfrei kann durch HAART eine Erholung der T4-Zellzahl sowie eine Hemmung der Krankheitsprogression erreicht werden. Inwieweit aber der unter HAART feststellbare Anstieg der T4-Zellzahl auch zu einer verbesserten funktionellen Aktivität dieser Zellpopulation im Sinne einer Aviditätsreifung und gesteigerten funktionellen Immunität führt, ist wenig untersucht. Ältere Studien über die Kinetik der Anti-HIV-Avidität bei Patienten ohne antiretrovirale Therapie behaupten, dass eine Progression der HIV-Infektion mit einer fehlenden Aviditätsreifung assoziiert sein soll<sup>63</sup>. Die einzige Arbeit über den Aviditätsverlauf bei HIV-Patienten unter HAART stellt nach einem temporären Abfall der Anti-HIV-Avidität zu HAART-Beginn eine Rückkehr auf das Ausgangsniveau fest<sup>67</sup>. Einschränkung muss angemerkt werden, dass in dieser Studie lediglich die globale Anti-HIV-Avidität gemessen wurde. Eine Aussage über die Aviditätshöhe spezifischer Ak gegen einzelne HIV-Antigene ist demnach nicht möglich. Ferner sind methodische Unzulänglichkeiten zu beanstanden, weil die Aviditätsmessungen bei einer Serumverdünnung und ohne Kontrollen durchgeführt wurden.

In dieser Studie wurden bei den 13 mit HAART behandelten Patienten die AI-Differenzen für den Zeitraum vor HAART-Beginn und jene für die Zeitspanne der HAART-Applikation berechnet und miteinander verglichen. Signifikante Unterschiede waren für keines der drei untersuchten HIV-Antigene feststellbar, ein Einfluss von HAART auf den Aviditätsverlauf konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Einzig die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zur Anti-gp41-IgG-Avidität decken sich mit jenen bereits veröffentlichter Studien<sup>4,8</sup>. Danach weisen HIV-Patienten unabhängig vom klinischen Stadium ihrer Erkrankung ausnahmslos hohe Aviditätswerte für Anti-gp41-IgG auf. Bei Serokonversionspatienten ist die Anti-gp41-IgG-Avidität zu Beginn der HIV-Infektion niedrig und steigt im weiteren Verlauf kontinuierlich an<sup>8</sup>. Wie bereits an anderer Stelle erläutert, zeigte von den drei Serokonversionspatienten, die dieser Studie zur Verfügung standen, lediglich Proband #1 eine Zunahme der Anti-gp41-IgG-Avidität.

Eine mögliche Ursache für die von den Ergebnissen bereits publizierter Studien<sup>8,56,63,64</sup> zur Anti-HIV-Ak-Avidität abweichenden Resultate dieser Arbeit kann in der Methode der Aviditätsbestimmung liegen. Häufig wird unabhängig von der Art der Infektion die Avidität spezifischer Ak bei lediglich einer einzigen Verdünnung der Probe bestimmt<sup>8,9,17-19,53,56,57</sup>. Dies ist insofern problematisch als die Avidität infolge der nicht-linearen Beziehung von optischer Dichte und Ak-Konzentration bis zu einem gewissen Grad von der Konzentration spezifischer Ak abhängig ist<sup>53</sup>. In dieser Arbeit konnte eine solche Konzentrationsabhängigkeit der Avidität ebenfalls nachgewiesen werden. Wurde nämlich die Avidität einer Probe für jede der vier Verdünnungsstufen getrennt berechnet (gemäß der Formel  $A/B \times 100$ , wobei  $A = \text{OD-Wert mit Harnstoffelution}$  sowie  $B = \text{OD-Wert ohne Harnstoffelution}$ ), so war eine Abnahme der Avidität von der niedrigsten zur höchsten Verdünnungsstufe, gleichbedeutend mit einem Abfall der Konzentration spezifischer IgG, feststellbar. Aus diesem Grund wurden alle in dieser Studie präsentierten Aviditätsindices an Hand von Titrationskurven, die sich aus der Auftragung der Extinktionswerte mit und ohne Harnstoffelution ergaben, bestimmt. Eine Beeinflussung der Avidität durch unterschiedliche Titerhöhen spezifischer IgG ist bei diesem Verfahren ähnlich wie bei der Endpunkttiter-Methode<sup>20,30,37,43,58-62</sup> nicht gegeben. Insofern ist die AI-Bestimmung bei einer einzigen vorgegebenen Probenverdünnung dann unzulässig, wenn Aviditätsindices verschiedener Patienten oder Kollektive miteinander verglichen werden sollen, da die Titerhöhe spezifischer IgG zwischen den einzelnen Probanden erheblich differieren kann. Ebenso können im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen dadurch Probleme entstehen, z. B. bei einer Titerabnahme.

Die HI-Viruslast war für die Korrelation mit der Anti-HIV-Ak-Avidität weniger gut geeignet als die T4-Zellzahl, da die Viruslastzahlen zum Teil deutliche Schwankungen im Bereich von zwei bis vier Zehnerpotenzen zeigten. Ursächlich verantwortlich dafür waren Therapiepausen erzwungen durch Arzneimittelnebenwirkungen und eine unregelmäßige Medikamenteneinnahme oder Resistenzentwicklung. Ferner wurden Viruslastmessungen ab Mai 1995 durchgeführt, womit bei den HIV-Patienten (#17, #23, #24 und #26), die im Laufe der Jahre 1995 und 1996 verstarben, eine Auswertung aufgrund der geringen Datenmenge nicht aussagekräftig war. Ein Zusammenhang zwischen Ak-Avidität und Viruslast ergab sich aus den vorliegenden Daten nicht.

In Anbetracht der differierenden Ergebnisse zur Avidität HIV-spezifischer Ak lässt sich abschließend schwer sagen, in wieweit der Aviditätsbestimmung jemals eine Bedeutung in der HIV-Routinediagnostik zukommen wird. Dies betrifft vor allem den Stellenwert der Avidität als Verlaufs- und Prognoseparameter der HIV-Infektion. Eine Differenzierung von frischer und länger zurückliegender, alter Infektion, wie sie bei anderen Virusinfektionen durch Messung der Avidität spezifischer Ak möglich gemacht wird, ist bei HIV äußerst schwierig. Am meisten erfolgversprechend erscheint es diesbezüglich, bei einer größeren Zahl von HIV-Patienten bzw. Serokonversionspatienten weiterführende Untersuchungen zur Kinetik der Aviditätsreifung von Anti-gp41-IgG anzustellen.

## **6. ZUSAMMENFASSUNG**

**Hintergrund** : Die HIV-Infektion ist durch eine schwere Beeinträchtigung sowohl der zellulären wie der humoralen Immunantwort gekennzeichnet. Dies kann auch Auswirkungen auf die bei mikrobiellen Infektionen auftretende Aviditätsreifung der Immunantwort haben. Wir haben die Kinetik der Anti-HIV-Ak-Avidität bei HIV-Patienten studiert und untersucht, inwieweit die Aviditätsentwicklung mit dem Krankheitsverlauf der Infektion, der CD4-Zellzahl und der HI-Viruslast korreliert und ob der Aviditätsverlauf durch eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) beeinflusst wird.

**Methoden** : Bei insgesamt 39 HIV-Patienten wurden die Anti-gp41-, Anti-gp120- und Anti-p55-IgG-Avidität von Proben aus den Jahren 1991-2001 in ein- bis dreijährigem Abstand bestimmt. Auf der Basis des Infektionsverlaufes wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt : 1. Langzeitüberlebende (LTS; n = 12); 2. Patienten mit rascher Progression der HIV-Infektion vor der HAART-Ära (PROG; n = 11); 3. Patienten, die mit HAART behandelt wurden (HAART; n = 13); 4. Patienten in der Serokonversionsphase (SKP; n = 3). Die Aviditätsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Festphasen-Enzymimmunoassays und 4 M Harnstoff als Elutionsreagenz.

**Ergebnisse** : Unabhängig vom klinischen Status zeigten alle Patienten hohe (> 60 %) Aviditätswerte für Anti-gp41-IgG. Lediglich bei einem der drei Patienten in der Serokonversionsphase war eine Zunahme der Anti-gp41-IgG-Avidität feststellbar. Die Aviditätswerte für Anti-gp120-IgG bzw. Anti-p55-IgG lagen zwischen 25 und 91 % bzw. 14 und 106 %. Ein Vergleich der Aviditätswerte zwischen den Kollektiven LTS, PROG und HAART ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Höhe der CD4-Zellzahl und der HI-Viruslast hatte keinen nachweisbaren Effekt auf den Aviditätsindex. Der Vergleich der Aviditätsdifferenzen für den Zeitraum vor HAART-Beginn mit denen für den Zeitraum während der HAART-Applikation wies keine signifikanten Unterschiede auf.

**Schlussfolgerungen** : Obwohl bei einigen Patienten signifikante Änderungen der Aviditätswerte im Verlauf nachgewiesen werden konnten, ergab sich kein Hinweis darauf, dass die Aviditätsentwicklung durch den Krankheitsverlauf, den Immunstatus oder durch HAART beeinflusst wird.

**7. ANHANG****Übersicht über die epidemiologischen Daten der getesteten HIV-Patienten :**

<b>Tabelle 3 : Epidemiologische Daten der getesteten HIV-Patienten</b>				
<b>Patient</b>	<b>Geburtsjahr</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>HIV-ED</b>	<b>Risikofaktor</b>
<b># 01 SKP-Gruppe</b>	<b>1967</b>	<b>männlich</b>	<b>1991</b>	<b>Homosexualität</b>
<b># 02 SKP-Gruppe</b>	<b>1926</b>	<b>männlich</b>	<b>Keine Angabe</b>	<b>Keine Angabe</b>
<b># 03 SKP-Gruppe</b>	<b>1960</b>	<b>weiblich</b>	<b>06/00</b>	<b>HIV-positiver Partner</b>
<b># 04 LTS-Gruppe</b>	<b>1966</b>	<b>männlich</b>	<b>1988</b>	<b>Hämophilie A</b>
<b># 05 LTS-Gruppe</b>	<b>1968</b>	<b>männlich</b>	<b>1984</b>	<b>Hämophilie A</b>
<b># 06 LTS-Gruppe</b>	<b>1935</b>	<b>männlich</b>	<b>04/98</b>	<b>Promiskuität</b>
<b># 07 LTS-Gruppe</b>	<b>1964</b>	<b>weiblich</b>	<b>04/94</b>	<b>HIV-positiver Partner</b>
<b># 08 LTS-Gruppe</b>	<b>1955</b>	<b>männlich</b>	<b>1983</b>	<b>i.v.-Drogenabusus seit 1975</b>
<b># 09 LTS-Gruppe</b>	<b>1966</b>	<b>männlich</b>	<b>05/96</b>	<b>i.v.-Drogenabusus seit ca. 1986</b>
<b># 10 LTS-Gruppe</b>	<b>1971</b>	<b>männlich</b>	<b>12/95</b>	<b>Z. n. i.v.-Drogenabusus von 1991 bis 1993</b>
<b># 11 LTS-Gruppe</b>	<b>1974</b>	<b>männlich</b>	<b>1994</b>	<b>Promiskuität ?</b>
<b># 12 LTS-Gruppe</b>	<b>1958</b>	<b>männlich</b>	<b>1985</b>	<b>Hämophilie B</b>
<b># 13 LTS-Gruppe</b>	<b>1958 verstorben 03/99</b>	<b>männlich</b>	<b>1985</b>	<b>i.v.-Drogenabusus</b>
<b># 14 LTS-Gruppe</b>	<b>1963</b>	<b>männlich</b>	<b>02/90</b>	<b>Bisexualität</b>
<b># 15 LTS-Gruppe</b>	<b>1966</b>	<b>männlich</b>	<b>04/94</b>	<b>Homosexualität</b>

<b>Tabelle 3 : Epidemiologische Daten der getesteten HIV-Patienten</b>				
<b>Patient</b>	<b>Geburtsjahr</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>HIV-ED</b>	<b>Risikofaktor</b>
# 16 PROG-Gruppe	1957 verstorben 08/98	männlich	10/91	Keine Angabe
# 17 PROG-Gruppe	1951 verstorben 01/96	männlich	07/93	Bluttransfusion im Jahr 1986 ?
# 18 PROG-Gruppe	1969 verstorben 03/01	männlich	03/96	Homosexualität
# 19 PROG-Gruppe	1971	männlich	11/95	i.v.-Drogenabusus seit 1987/1988
# 20 PROG-Gruppe	1958 verstorben 03/98	weiblich	1985	i.v.-Drogenabusus
# 21 PROG-Gruppe	1962 verstorben 03/00	weiblich	06/88	i.v.-Drogenabusus
# 22 PROG-Gruppe	1961 verstorben 08/96	männlich	11/90	Bisexualität; Promiskuität
# 23 PROG-Gruppe	1953 verstorben 06/96	männlich	08/91	Keine Angabe
# 24 PROG-Gruppe	1950 verstorben 05/95	weiblich	1986	Z. n. i.v.-Drogenabusus bis ca. 1985; Prostitution
# 25 PROG-Gruppe	1968 verstorben 05/97	männlich	06/91	Keine Angabe
# 26 PROG-Gruppe	1961 verstorben 07/95	weiblich	02/91	Z. n. i.v.-Drogenabusus von 1977 bis 1981; Bluttransfusion 1987 ?
# 27 HAART-Gruppe	1951	männlich	1987	Keine Angabe
# 28 HAART-Gruppe	1947	männlich	11/94	Keine Angabe
# 29 HAART-Gruppe	1965	männlich	01/92	HIV-positiver Partner
# 30 HAART-Gruppe	1957	weiblich	11/96	Bluttransfusion 1993 ?
# 31 HAART-Gruppe	1955	männlich	1986	Z. n. i.v.-Drogenabusus von 1976 bis 1986
# 32 HAART-Gruppe	1956	weiblich	1988	i.v.-Drogenabusus; HIV-positiver Partner



<b>Tabelle 3 : Epidemiologische Daten der getesteten HIV-Patienten</b>				
<b>Patient</b>	<b>Geburtsjahr</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>HIV-ED</b>	<b>Risikofaktor</b>
<b># 33 HAART-Gruppe</b>	<b>1965</b>	<b>männlich</b>	<b>1984</b>	<b>Hämophilie A</b>
<b># 34 HAART-Gruppe</b>	<b>1964</b>	<b>weiblich</b>	<b>03/92</b>	<b>HIV-positiver Partner</b>
<b># 35 HAART-Gruppe</b>	<b>1962</b>	<b>weiblich</b>	<b>1988</b>	<b>Kontakt zu potentiell infektiösem Material; Promiskuität ?</b>
<b># 36 HAART-Gruppe</b>	<b>1948</b>	<b>männlich</b>	<b>07/87</b>	<b>Keine Angabe</b>
<b># 37 HAART-Gruppe</b>	<b>1957</b>	<b>männlich</b>	<b>1984</b>	<b>Z. n. i.v.-Drogenabusus von 1980 bis 1987</b>
<b># 38 HAART-Gruppe</b>	<b>1960</b>	<b>weiblich</b>	<b>1986</b>	<b>Z. n. i.v.-Drogenabusus von 1979 bis 12/90</b>
<b># 39 HAART-Gruppe</b>	<b>1968</b>	<b>weiblich</b>	<b>1989</b>	<b>HIV-positiver Partner</b>
<b># 40 Positivkontrolle</b>	<b>1963</b>	<b>männlich</b>	<b>1984</b>	<b>Z. n. i.v.-Drogenabusus</b>

### **Anmerkungen zu Tabelle 3 :**

Es gilt zu betonen, dass der Zeitpunkt der HIV-Erstdiagnose nicht identisch ist mit dem Infektionszeitpunkt. Lediglich bei Patient #3 kann der Infektionszeitpunkt abgeschätzt werden, da einen Monat nach einem negativen ELISA-Befund ein weiterer ELISA-Test reaktiv ausfiel und der daraufhin durchgeführte Western Blot das positive ELISA-Testergebnis bestätigte. Bei Patient #2 waren bezüglich Risikofaktor, HIV-Erstdiagnose und antiretroviraler Therapie keine Daten verfügbar.

**Übersicht über die Therapierung der getesteten HIV-Patienten :**

<b>Tabelle 4 : Therapieschemata der getesteten HIV-Patienten</b>	
<b>Patient</b>	<b>Antiretrovirale Therapie</b>
<b># 01</b>	Seit 05/95 AZT u. DDI, später AZT, 3TC u. IDV Ab 02/99 SQV, RTV, NVP u. D4T
<b># 02</b>	Keine Angaben zur Therapie verfügbar
<b># 03</b>	Seit 07/00 AZT, 3TC u. ABC
<b># 04</b>	Seit 11/96 AZT u. 3TC Seit 04/00 IFN $\alpha$ -2b/Ribavirin bei HCV-Infektion
<b># 05</b>	Seit 01/94 AZT, ab 07/96 zusätzlich 3TC Z. n. IFN $\alpha$ -2b-Therapie 10/95-04/96 bei HCV-Infektion Ab 10/00 3 Zyklen IL-2 im Rahmen der ESPRIT-Studie
<b># 06</b>	Bislang noch keine antiretrovirale Therapie
<b># 07</b>	Bislang noch keine antiretrovirale Therapie
<b># 08</b>	Bislang noch keine antiretrovirale Therapie
<b># 09</b>	Seit 03/98 AZT u. 3TC, ab 10/98 als COMBIVIR <sup>®</sup>
<b># 10</b>	03/97-08/97 AZT u. 3TC, ab 02/98 erneut AZT u. 3TC, ab 05/98 als COMBIVIR <sup>®</sup> Intermittierende Pausen bei Non-Compliance des Patienten
<b># 11</b>	Seit 04/99 AZT, 3TC, IDV u. RTV Wegen RTV-Unverträglichkeit AZT, 3TC u. IDV bis Sommer 1999 11/00-12/00 AZT, 3TC u. ABC Wegen V. a. ABC-Unverträglichkeit ab 12/00 AZT, 3TC u. NVP
<b># 12</b>	Seit 11/96 AZT u. 3TC
<b># 13</b>	Therapieverweigerung durch Patient
<b># 14</b>	Seit 10/93 AZT, von 12/95 bis 12/98 zusätzlich DDC, ab 12/98 D4T, DDI u. IDV
<b># 15</b>	Bislang noch keine antiretrovirale Therapie
<b># 16</b>	Seit 03/94 AZT, ab 03/95 zusätzlich DDC Ab 07/96 AZT, 3TC u. IDV, ab 03/97 D4T u. DDI Ab 03/98 D4T, 3TC u. IDV, ab 04/98 D4T, SQV, NVP u. NFV Ab 07/98 D4T, DDI u. NFV
<b># 17</b>	Seit 11/93 AZT 04/94-07/95 DDI, danach selbstständiges Absetzen der Medikation

<b>Tabelle 4 : Therapieschemata der getesteten HIV-Patienten</b>	
<b>Patient</b>	<b>Antiretrovirale Therapie</b>
# 18	Seit 07/96 AZT u. DDC, ab 09/96 zusätzlich SQV Ab 06/98 RTV, IDV, NVP u. D4T 11/98-12/98 RTV, IDV, 3TC u. ABC Ab 02/99 EFV, ab 03/99 zusätzlich AZT u. 3TC als COMBIVIR® Von 10/99 bis 11/99 zusätzlich RTV, ab 11/99 zusätzlich APV 06/00-08/00 D4T, DDI u. NVP Seit 11/00 bis 02/01 AZT, 3TC, ABC (TRIZIVIR®) u. LPV, RTV (KALETRA®)
# 19	03/96-04/96 AZT u. DDC, von 05/96 bis 09/96 intermittierend Nach Unterbrechung ab 03/97 erneut AZT Ab 06/97 D4T u. 3TC, von 03/99 bis 06/99 AZT, 3TC, SQV u. NFV 06/99-08/00 AZT, 3TC u. EFV, ab 08/00 AZT, 3TC u. NVP
# 20	Seit 07/95 AZT, von 01/97 bis 11/97 D4T u. 3TC 12/97-02/98 D4T, 3TC u. IDV
# 21	Seit 06/93 AZT, Abbruch der Therapie nach wenigen Monaten Ab 05/96 AZT u. DDC, unregelmäßige Einnahme der Medikamente
# 22	Seit 12/90 AZT, ab 06/93 zusätzlich DDC 08/94 Absetzen von AZT, DDC weiter bis mindestens Ende 1994
# 23	Seit 09/91 AZT, von 11/93 bis 08/94 zusätzlich DDC Ab 08/94 DDC nur noch intermittierend
# 24	Seit 02/91 AZT, ab 08/94 bis mindestens 03/95 DDI
# 25	Vor 06/96 D4T, ab 06/96 bis 08/96 zusätzlich AZT 10/96-11/96 3TC u. DDC, ab 12/96 bis 05/97 3TC-Monotherapie
# 26	Seit 02/92 AZT, ab 03/93 zusätzlich DDC bis mindestens 02/95
# 27	1991-1994 AZT intermittierend, von 01/94 bis 09/95 LOVIRIDE 07/95-09/95 DDI intermittierend 01/94-02/94 u. 08/95-10/95 intermittierend AZT u. DDC Seit 10/95 AZT u. 3TC, ab 04/96 zusätzlich SQV Ab 04/97 3TC, SQV, D4T u. RTV
# 28	12/94-06/96 AZT, ab 08/95 bis 06/96 zusätzlich DDI 03/96-06/96 AZT, DDI u. SQV, von 06/96 bis 09/96 DDI, SQV u. D4T 06/96-06/97 AZT, 3TC u. IDV 06/97-10/98 D4T, DDI, SQV u. RTV 10/98-12/99 D4T, DDI, SQV u. EFV 12/99-12/00 AZT, 3TC, EFV, RTV, ABC u. APV Ab 12/00 AZT, 3TC, ABC, RTV u. LPV
# 29	Seit 11/94 AZT, ab 05/96 zusätzlich DDC, ab 04/97 zusätzlich SQV

<b>Tabelle 4 : Therapieschemata der getesteten HIV-Patienten</b>	
<b>Patient</b>	<b>Antiretrovirale Therapie</b>
# 30	09/97-11/97 AZT, DDC, SQV u. NFV, ab 11/97 AZT, SQV, NFV u. 3TC
# 31	Seit 09/94 AZT, ab 08/95 zusätzlich DDC Ab 10/95 DDI, von 02/96 bis 04/96 zusätzlich D4T Seit 05/96 zunächst AZT u. 3TC, später zusätzlich IDV Ab 07/97 IDV u. NVP
# 32	Seit 08/98 AZT, 3TC u. IDV
# 33	12/95-03/96 AZT, ab 03/96 zusätzlich 3TC, ab 07/96 zusätzlich IDV 12/99-08/00 DDI, D4T, SQV u. RTV Ab 08/00 DDI, D4T, RTV u. LPV
# 34	Seit 05/92 AZT, ab 08/95 zusätzlich DDC, ab 05/96 zusätzlich SQV 05/97-07/97 AZT, DDC, SQV u. RTV Ab 07/97 bis mindestens 08/99 3TC, D4T u. IDV
# 35	Seit 05/93 AZT, ab 06/94 zusätzlich DDC, ab 06/96 zusätzlich IDV Seit 01/98 D4T, 3TC, IDV, ab 03/00 zusätzlich RTV
# 36	Seit 10/90 AZT, ab 11/95 zusätzlich DDI, ab 06/96 zusätzlich SQV Ab 07/97 D4T, 3TC, SQV u. RTV Seit 08/99 bis mindestens 12/00 AZT u. 3TC als COMBIVIR®, EFV u. ABC
# 37	Seit 02/93 AZT, ab 02/94 zusätzlich DDC, ab 02/96 zusätzlich SQV Von 07/96 bis 12/97 AZT, DDC u. IDV 12/97-10/98 D4T, 3TC u. RTV, ab 10/98 zusätzlich EFV bis mindestens 03/01 07/95-08/95 IFN $\alpha$ -2b bei HCV-Infektion
# 38	Seit 04/93 AZT, ab 05/95 zusätzlich DDC, ab 09/96 zusätzlich SQV, ab 06/98 zusätzlich RTV Ab 01/99 AZT, DDC, SQV u. NFV Ab 09/99 AZT, DDC, ABC u. EFV Ab 10/99 wegen ABC-Unverträglichkeit AZT, DDC, SQV, EFV u. NFV 08/00-04/01 AZT, SQV, EFV, NFV u. 3TC Ab 04/01 LPV u. RTV als KALETRA® sowie EFV
# 39	Seit 09/93 AZT, ab 10/95 bis 03/96 zusätzlich DDI Ab 03/96 AZT u. 3TC, ab 07/96 zusätzlich IDV Ab 11/98 zunächst 3TC, D4T, SQV u. RTV 11/98-03/99 wegen RTV-Unverträglichkeit 3TC, D4T, SQV u. NFV Ab 03/99 3TC, D4T, ABC u. EFV
# 40	Seit 05/99 DDI, D4T, NFV u. SQV, ab 09/99 AZT u. 3TC als COMBIVIR® u. ABC

## **8. LITERATURVERZEICHNIS**

- 1.) WHO, AIDS Epidemic Update December 2002; <http://who.int>
- 2.) RKI, Epidemiologisches Bulletin Dezember 2002; <http://rki.de>
- 3.) RKI, Deutsch-Österreichische Richtlinien zur Antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion Juli 2002; <http://rki.de>
- 4.) M. Radkowski, T. Laskus, A. Goch & J. Slusarczyk. Affinity of anti-GP41 antibody in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur. J. Clin. Invest.* 1993; **23**, 455-8.
- 5.) K. Hedman, M. Lappalainen, M. Söderlund & L. Hedman. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Microbiol.* 1993; **4**, 123-9.
- 6.) H. I. J. Thomas & P. Morgan-Capner. The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella. *Rev. Med. Virol.* 1991; **1**, 41-50.
- 7.) T. Wolter, C. Gassmann, V. Vetter & G. Bauer. Avidity determination : utilization of a basic immunological mechanism allows improvement of the serodiagnosis of infections. *Reviews in Clin. Lab.* 1997; **43**, 125-35.
- 8.) H. I. J. Thomas, S. Wilson, C. M. O'Toole, C. M. Lister, A. M. Saeed, R. P. F. Watkins & P. Morgan-Capner. Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1. *Clin. Exp. Immunol.* 1996; **103**, 185-91.
- 9.) J. M. Binley, H. Arshad, T. R. Fouts & J. P. Moore. An Investigation of the high-avidity antibody response to glycoprotein 120 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1997; **13**, 1007-15.
- 10.) C. A. Janeway & P. Travers, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1997, 96-105 sowie 285 ff.
- 11.) H. N. Eisen & G. W. Siskind. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochem.* 1964; **3**, 996-1008.
- 12.) M. H. Julius & L. A. Herzenberg. Isolation of antigen-binding cells from unprimed mice : demonstration of antibody-forming cell precursor activity and correlation between precursor and secreted antibody avidities. *J. Exp. Med.* 1974; **140**, 904-20.

- 13.) H. Ramseier. Quantitative studies on antigen recognition. II. Kinetics of the recognition event. Eur. J. Immunol. 1971; **1**, 171-80.
- 14.) G. W. Siskind & B. Benacerraf. Cell selection by antigen in the immune response. Adv. Immunol. 1969; **10**, 1-50.
- 15.) T. P. Werblin & G. W. Siskind. Distribution of antibody affinities : technique of measurement. Immunochemistry 1972; **9**, 987-1011.
- 16.) Y. T. Kim, T. P. Werblin & G. W. Siskind. Distribution of antibody-binding affinity. III. Detection of low affinity antibody in the presence of high affinity antibody. J. Immunol. 1974; **112**, 2002-12.
- 17.) K. Hedman & S. A. Rousseau. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. J. Med. Virol. 1989; **27**, 288-92.
- 18.) H. I. J. Thomas, P. Morgan-Capner, G. Enders, S. O'Shea, D. Caldicott & J. M. Best. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG<sub>1</sub> following primary rubella. J. Virol. Meth. 1992; **39**, 149-55.
- 19.) H. I. J. Thomas & P. Morgan-Capner. Rubella-specific IgG<sub>1</sub> avidity : a comparison of methods. J. Virol. Meth. 1991; **31**, 219-28.
- 20.) K. Hedman, M. Lappalainen, I. Seppälä & O. Mäkelä. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J. Infect. Dis. 1989; **159**, 736-40.
- 21.) H. Brandis, W. Köhler, H. J. Eggers & G. Pulverer, Medizinische Mikrobiologie, Gustav Fischer Verlag, 1994, 655-7.
- 22.) F. G. Araujo, J. P. Dubey & J. S. Remington. Antigenic similarity between the coccidian parasites *toxoplasma gondii* and *hammondia hammondi*. J. Protozool. 1984; **31**, 145-7.
- 23.) M. E. Camargo, A. W. Ferreira, J. R. Mineo, C. K. Takiguti & O. S. Nakahara. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect. Immun. 1978; **21**, 55-8.
- 24.) F. G. Araujo, E. V. Barnett, L. O. Gentry & J. S. Remington. False-positive anti-*toxoplasma* fluorescent antibody tests in patients with antinuclear antibodies. Appl. Microbiol. 1971; **22**, 270-5.

- 
- 25.) J. M. Francis, R. A. Payne, D. H. Joynson & A. H. Balfour. False-positive results with heated sera in *toxoplasma* ELISA for IgG antibody. *J. Clin. Pathol.* 1987; **40**, 356.
  - 26.) B. Weissbrich. The use of semi-automated EBV IgG avidity determination for the diagnosis of infectious mononucleosis. *J. Med. Virol.* 1998; **54**, 145-53.
  - 27.) K. N. Ward, J. J. Gray, M. W. Fotheringham & M. J. Sheldon. IgG antibodies to human herpesvirus-6 in young children : changes in avidity of antibody correlate with time after infection. *J. Med. Virol.* 1993 a; **39**, 131-8.
  - 28.) K. N. Ward, J. J. Gray, M. E. Joslin & M. J. Sheldon. Avidity of IgG antibodies to human herpesvirus-6 distinguishes primary from recent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses. *J. Med. Virol.* 1993 b; **39**, 44-9.
  - 29.) A. K. Junker & P. Tilley. Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG-subclass patterns in children with recurrent chickenpox. *J. Med. Virol.* 1994; **43**, 119-24.
  - 30.) H. O. Kangro, S. Manzoor & D. R. Harper. Antibody avidity following varicella-zoster virus infections. *J. Med. Virol.* 1991; **33**, 100-5.
  - 31.) B. D. Schoub, N. K. Blackburn, S. Johnson, J. M. McAnerney & B. Miller. Low antibody avidity in elderly chickenpox patients. *J. Med. Virol.* 1992; **37**, 113-5.
  - 32.) A. Gershon, S. Steinberg, L. Gelb & the NIAID Varicella Vaccine Study Group. Clinical reinfection with varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.* 1984; **149**, 137-42.
  - 33.) A. K. Junker, E. Angus & E. E. Thomas. Recurrent varicella-zoster virus infections in apparently immunocompetent children. *Ped. Infect. Dis. Journal* 1991; **10**, 569-75.
  - 34.) I. Gurevich, L. Jensen, R. Kalter & B. A. Cunha. Chickenpox in apparently „immune“ hospital workers. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1990; **11**, 510-2.

- 35.) H. O. Kangro, A. Ward, S. Argent, R. B. Heath, J. E. Cradock-Watson & M. K. S. Ridehalgh. Detection of specific IgM in varicella and herpes zoster by antibody-capture radioimmunoassay. *Epidemiology and Infection* 1988; **101**, 187-95.
- 36.) O. Meurman, M. Waris & K. Hedman. Immunoglobulin G antibody avidity in patients with respiratory syncytial virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30**, 1479-84.
- 37.) M. Söderlund, C. S. Brown, B. J. Cohen & K. Hedman. Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity. *J. Infect. Dis.* 1995; **171**, 710-3.
- 38.) J. J. Gray, B. J. Cohen & U. Desselberger. Detection of human parvovirus B19-specific IgM and IgG antibodies using a recombinant viral VP1 antigen expressed in insect cells and estimation of time of infection by testing for antibody avidity. *J. Virol. Meth.* 1993; **44**, 11-24.
- 39.) H. Tuokko. Detection of acute measles infections by indirect and  $\mu$ -capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay. *J. Med. Virol.* 1995; **45**, 306-11.
- 40.) M. Narita, S. Yamada, Y. Matsuzono, O. Itakura, T. Togashi & H. Kikuta. Immunoglobulin G avidity testing in serum and cerebrospinal fluid for analysis of measles virus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996; **3**, 211-5.
- 41.) K. N. Ward, W. Dhaliwal, K. L. Ashworth, E. J. Clutterbuck & C. G. Teo. Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody. *J. Med. Virol.* 1994; **43**, 367-72.
- 42.) T. G. Wreghitt, J. J. Gray, S. Aloyisus, M. Contreras & J. A. Barbara. Antibody avidity test for recent infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1990; **31** (335), 789.
- 43.) K. Hedman, A. Vaheri & M. Brummer-Korvenkontio. Rapid diagnosis of hantavirus disease with an IgG-avidity assay. *Lancet* 1991; **338**, 1353-6.



- 
- 44.) H. Kallio-Kokko, O. Vapalahti, K. Hedman, M. Brummer-Korvenkontio & A. Vaheiri. Puumala virus antibody and immunoglobulin G avidity assays based on a recombinant nucleocapsid antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31**, 677-80.
  - 45.) C. Gassmann & G. Bauer. Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections. *J. Med. Virol.* 1997; **51**, 242-51.
  - 46.) N. K. Blackburn, T. G. Besselaar, B. D. Schoub & K. F. O'Connell. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J. Med. Virol.* 1991; **33**, 6-9.
  - 47.) G. Enders & F. Knotek. Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Infection* 1989; **17**, 218-26.
  - 48.) H. I. J. Thomas & P. Morgan-Capner. Rubella-specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. *Epidemiol. Infect.* 1988; **101**, 591-8.
  - 49.) S. Inouye, A. Hasegawa, S. Matsuno & S. Katow. Changes in antibody avidity after virus infections : detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J. Clin. Microbiol.* 1984; **20**, 525-9.
  - 50.) M. E. Devey, K. Bleasdale, S. Lee & S. Rath. Determination of the functional affinity of IgG1 and IgG4 antibodies to tetanus toxoid by isotype-specific solid-phase assays. *J. Immunol. Methods* 1988; **106**, 119-25.
  - 51.) G. R. Pullen, M. G. Fitzgerald & C. S. Hosking. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J. Immunol. Methods* 1986; **86**, 83-7.
  - 52.) R. A. Macdonald, C. S. Hosking & C. L. Jones. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J. Immunol. Methods* 1988; **106**, 191-4.
  - 53.) K. Hedman & I. Seppälä. Recent rubella virus infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Clin. Immunol.* 1988; **8**, 214-21.

- 54.) R. A. Hall, R. J. Coelen & J. S. Mackenzie. Immunoaffinity purification of the NS1 protein of Murray Valley encephalitis virus : selection of the appropriate ligand and optimal conditions for elution. *J. Virol. Meth.* 1991; **32**, 11-20.
- 55.) P. P. Kamoun. Denaturation of globular proteins by urea : breakdown of hydrogen or hydrophobic bonds ? *Trends Biochem. Sci.* 1988; **13**, 424-5.
- 56.) D. Chargelegue, C. M. O'Toole & B. T. Colvin. A longitudinal study of the IgG antibody response to HIV-1 p17 *gag* protein in HIV-1<sup>+</sup> patients with haemophilia : titre and avidity. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; **93**, 331-6.
- 57.) D. Chargelegue, B. T. Colvin & C. M. O'Toole. A 7-year analysis of anti-*gag* (p17 and p24) antibodies in HIV-1 seropositive patients with haemophilia : immunoglobulin G titre and avidity are early predictors of clinical course. *AIDS* 1993; **7**, S87-S90.
- 58.) M. H. Korhonen, J. Brunstein, H. Haario, A. Katnikov, R. Rescaldani & K. Hedman. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; **6**, 1-4.
- 59.) A. Andersson, V. Vetter, L. Kreutzer & G. Bauer. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen : useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J. Med. Virol.* 1994; **43**, 238-44.
- 60.) P. Jenum, B. Stray-Pedersen & A.-G. Gundersen. Improved diagnosis of primary *toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35**, 1972-7.
- 61.) M. Lappalainen, P. Koskela, M. Koskiniemi, P. Ämmälä, V. Hiilesmaa, K. Teramo, K. O. Raivio, J. Remington & K. Hedman. Toxoplasmosis acquired during pregnancy : improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J. Infect. Dis.* 1993; **167**, 691-7.
- 62.) A. Sensini, S. Pascoli, D. Marchetti, R. Castronari, M. Marangi, G. Sbaraglia, C. Cimmino, A. Favero, M. Castelletto & A. Mottola. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *toxoplasma gondii* infection : a multicenter study. *Clin. Microbiol. Infect.* 1996; **2**, 25-9.

- 63.) D. Chargelegue, C. M. Stanley, C. M. O'Toole, B. T. Colvin & M. W. Steward. The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; **99**, 175-81.
- 64.) K. S. Cole, M. Murphey-Corb, O. Narayan, S. V. Joag, G. M. Shaw & R. C. Montelaro. Common themes of antibody maturation to simian immunodeficiency virus, simian-human immunodeficiency virus, and human immunodeficiency virus type 1 infections. *J. Virol.* 1998; **72**, 7852-9.
- 65.) N. Ikegami, K. Akatani, M. Imai & K. Yoshioka. Assay for avidity of p24 specific immunoglobulin G in sera of HIV-1 infected patients. *Int. Conf. AIDS* 1994; **10** (2), 84.
- 66.) J. Miguez, J. Laferté, Y. Tejero, G. González, A. J. Otero, J. Rivero & C. Duarte. Evaluation of the serologic response against two consensus V3 loop peptides from human immunodeficiency virus-1 in Cuban patients. *Int. J. Infect. Dis.* 1998; **2** (4), 221-5.
- 67.) M. Riou, G. Renier, S. Mattman, P. Fialaire, J. Loison, J.-M. Chenebault & C. Payan. Étude dynamique de l'avidité des anticorps anti-VIH lors de la restauration de l'immunité cellulaire sous traitement antirétroviral. *Ann. Biol. Clin.* 2000; **58** (6), 715-20.
- 68.) D. B. Smith & K. S. Johnson. Single purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusion glutathione-S transferase. *Gene* 1988; **67**, 31-40.
- 69.) Pertinent Tech Notes in NUNC Solid Phase Guide, 1999, Appendix 9, Volume 4, No. 28 & 29.
- 70.) K. S. Cole, J. L. Rowles, M. Murphey-Corb, J. E. Clements, T. Unangst, J. Robinson, R. C. Desrosiers, M. S. Wyand & R. C. Montelaro. Evolution of envelope-specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with SIV and its association with the development of protective immunity. *J. Virol.* 1997; **71**, 5069-79.
- 71.) P. A. Underwood. Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA. *J. Immunol. Methods* 1993; **164**, 119-30.

- 
- 72.) S. B. Boppana & W. J. Britt. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* 1995; **171**, 1115-21.
- 73.) M. Lappalainen, M. Koskiniemi, V. Hiilesmaa, P. Ämmälä, K. Teramo, P. Koskela, M. Lebech, K. O. Raivio & K. Hedman. Outcome of children after maternal primary toxoplasma infection during pregnancy with emphasis on avidity of specific IgG. *The study group. Ped. Infect. Dis. Journal* 1995; **14**, 354-61.
- 74.) Y. Devash, T. A. Calvelli, D. G. Wood, K. J. Reagan & A. Rubinstein. Vertical transmission of human immunodeficiency virus is correlated with the absence of high-affinity/avidity maternal antibodies to the gp120 principal neutralizing domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**, 3445-9.
- 75.) R. K. Gershon & W. E. Paul. Effect of thymus-derived lymphocytes on amount and affinity of anti-hapten antibody. *J. Immunol.* 1971; **106**, 872-4.
- 76.) G. Pantaleo, C. Graziosi & J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler & A. S. Fauci. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of the disease. *Nature* 1993; **362**, 355-8.
- 77.) J. Embretson, M. Zupancic & J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz & A. T. Haase. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; **362**, 359-62.
- 78.) G. M. Shearer & M. Clerici. Early T-helper cell defects in HIV infection. *AIDS* 1991; **5**, 245-53.

## DANKSAGUNG

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. med. V. ter Meulen für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas und die stets freundliche Unterstützung aussprechen. Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. Klinker möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats herzlichst bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. B. Weissbrich bedanken, der mich in das Thema eingeführt hat, meine Arbeit während der gesamten Zeit meiner Tätigkeit am Institut für Virologie betreut hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein persönlicher Dank gebührt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Diagnostik am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg für ihre kollegiale Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die mir zuteil wurden. Namentlich erwähnen möchte ich Herrn Dr. med. J. Schubert, der mich mit der ELISA-Technik vertraut gemacht hat, Herrn Dr. med. F. Tollmann für die wertvollen Ratschläge in Sachen EDV, Frau B. Scheiner und Herrn R. Kneitz für die fachspezifischen Hinweise und Literaturvermerke sowie, „last but not least“, Frau M. Laux und Frau A. Oesterlein, die mir bei der Bedienung der ELISA-Automaten behilflich waren.

Gleichfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C. Jassoy, der mir die HIV-Proteine gp120 und p55 zur Verfügung gestellt hat, bei den Herren Priv.-Doz. Dr. med. H. Klinker und Dr. med. P. Langmann für die Zusammenstellung der Patientenkollektive und die Erlaubnis zur Einsicht der Patientenakten sowie ferner bei den Firmen Corning Costar Inc. und Dade Behring, die bereitwillig und unentgeltlich Mikrotiterplatten und die HIV-Proteine p24 und gp41 für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben. Darüber hinaus gilt mein ganz persönlicher Dank Herrn O. Norbeck, MD, PhD, der mir für die statistische Auswertung der Daten das Programm InStat® 3.0 zur Verfügung stellte und mir mit wertvollen Hilfestellungen in Sachen Statistik zur Seite stand.

Zum guten Schluss sei meinen Eltern gedankt, die mir nach meinem Hochschulabschluss in Chemie das Zweitstudium der Humanmedizin finanziell möglich gemacht haben, mich in meiner Entscheidung immer wieder bekräftigt haben und niemals müde wurden, mich auf meinem langen Weg der Ausbildung zu unterstützen. Ferner möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Bruder Dipl. Ing. Steffen Pöhlmann herzlichst für die zahlreichen und wertvollen Hilfestellungen beim Erstellen der Diagramme in Microsoft Excel<sup>®</sup> sowie für die Tipps im Umgang mit Microsoft Word<sup>®</sup> bedanken.

## CURRICULUM VITAE

- Name :** Christoph Pöhlmann
- Geburtsdatum, -ort :** 16. Juli 1968, Würzburg
- Eltern :** Dr. rer. nat. Eberhard Pöhlmann, Apotheker  
Anne-Christel Pöhlmann, Apothekerin
- Schulbildung :** 1974-1978 Grundschule in Veitshöchheim  
1978-1987 Wirsberg-Gymnasium Würzburg  
Abschluss : Abitur (Note 1,5)
- Wehrdienst :** 01.07.1987-30.09.88 Grundausbildung zunächst in  
Hammelburg, später Einsatz als Sanitätssoldat in  
Veitshöchheim
- Erststudium :** WS 88/89-SS 94 Studium der Chemie an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Abschluss : Dipl.-Chem. univ., Note sehr gut  
Diplomarbeitsthema : Methoden und Mechanismus  
für TiO<sub>2</sub>-Grundierungen auf NEM-Legierungen  
nach dem Sol-Gel-Verfahren (Note sehr gut)
- Zweitstudium :** Ab WS 94/95 Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Promotionsarbeit am Institut für Virologie und  
Immunbiologie unter Leitung von Prof. Dr. med.  
V. ter Meulen  
Thema der Arbeit : Untersuchung zum zeitlichen  
Verlauf der Antikörperavidität bei HIV-1-infizier-  
ten Patienten mit antiretroviraler Therapie

Abschluss des Humanmedizinstudiums mit dem 3.  
Staatsexamen im Mai 2002

**Berufstätigkeit :**

Beginn des AiP im September 2002 in der Abteilung für Klinische Virologie, Huddinge Universitätsklinik, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden

**Sprachen :**

Deutsch (Muttersprache)

Englisch in Wort und Schrift

Französisch in Wort und Schrift

Schwedisch in Wort und Schrift