

# HHV-8 Seroprävalenz in ausgewählten (Risiko)-Kollektiven im Raum Frankfurt am Main

HHV-8 Seroprevalence in Selected (Risk)-Groups in the Area of Frankfurt am Main

H. F. Rabenau, N. I. Szép, W. Preiser, H. W. Doerr

**Zusammenfassung:** 603 Seren aus dem Raum Frankfurt am Main wurden in 12 verschiedenen Einzelkollektiven mit einem „in house“ IFT mit latenten Antigenen und einem rekombinanten Prototyp ELISA mit dem LANA und K8.1-Protein auf Antikörper gegen das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) – auch bekannt als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV) – getestet. Untersucht wurden (Risiko)gruppen wie HIV-seropositive Männer und Frauen, HIV-seronegative homosexuelle bzw. bisexuelle Männer, Patienten mit Kaposi-Sarkom, Transplantationspatienten und Kinder mit Hämophilie. Zur Abschätzung von Kreuzreaktionen und anderen Störungen der Testsysteme wurden Patienten mit akuten bzw. abgelaufenen EBV-Infektionen, HHV-6-seropositive Patienten, Rheumafaktor-positive Probanden und Frauen mit primärer biliärer Zirrhose (PBC) untersucht. Dreiundfünfzig diskrepante Proben wurden mit kommerziellen IFTs mit latenten bzw. lytischen Antigenen nachgetestet.

Hohe HHV-8-Seroprävalenzen wurden bei HIV-Infizierten ohne (15,7 % bei Frauen, 23,3 % bei Männern) und insbesondere mit Kaposi-Sarkomen (100 %) gefunden. Eine geschlechtsabhängige Verteilung der Seroprävalenz bei den HIV-seropositiven Patienten wurde nicht festgestellt. Bei Blutspendern wurde eine HHV-8-Durchseuchung von 3 % (im „in-house-IFT“), bei Hämophilen von 0 % und bei Transplantationspatienten von 9,1 % ermittelt.

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Herpesviren wie EBV und HHV-6 schienen die Tests nicht zu beeinflussen, während sich tendenziell eine erhöhte Anzahl reaktiver Proben bei Patienten mit Autoimmunantikörpern (Rheumafaktor-positive Patienten und Patientinnen mit PBC) zeigte.

Insgesamt stimmten die Ergebnisse des rekombinanten ELISA mit denen des „in house“ IFT im Gesamtkollektiv gut überein. Unterschiedliche Ergebnisse fanden sich in den Einzelkollektiven, insbesondere bei Rheumafaktor-positiven Patienten und solchen mit PBC.

**Schlüsselwörter:** HHV-8; KSHV, Epidemiologie; IFT; ELISA.

**Summary:** For this study, 603 serum samples, collected in the area of Frankfurt am Main, Germany and subdivided into twelve sub-cohorts, were tested with an in-house immunofluorescence test (IFT) for the detection of antibodies against human herpesvirus 8 (HHV-8) – also known as Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) – latent antigens and a recombinant prototype ELISA with HHV-8 latency-associated nuclear antigen (LANA) (Open Reading Frame 73) and K8.1 protein. Fifty-three discrepant samples were additionally tested with two commercial IFTs for the detection of antibodies to HHV-8 latent or lytic antigens.

A high HHV-8 seroprevalence rate was found in HIV-infected patients with Kaposi's sarcoma (100 % as per latent IFT and ELISA) and without Kaposi's sarcoma (23.3 % of the men and 15.7 % of the women as per latent IFT, or 17.8 % of the men and 13.7 % of the women as per ELISA). No correlation between the seroprevalence in HIV-seropositive subjects and their sex was found. The HHV-8 seroprevalence in 101 blood donors by latent IFT and ELISA was 3 and 2 %, respectively, comparable to that found in Britain, Northern Italy, and Switzerland.

The tests appeared to be equally impervious to cross-reactions with antibodies to other herpesviruses such as Epstein-Barr virus (EBV) and HHV-6.

The recombinant ELISA agreed well with the in-house IFT in the total cohort. Discrepant results were found, especially in the sub-cohorts of homosexual men and in patients suffering from primary biliary cirrhosis (PBC) or with rheumatoid factor (RF).

**Keywords:** HHV-8; KSHV epidemiology; IFT; ELISA.

**D**as Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) – auch Kaposi-Sarkom-assoziiertes Virus (KSHV) genannt – gehört – ebenso wie das Epstein Barr Virus (EBV) – zu den  $\gamma$ -Herpesviren und wurde 1994 erstmals beschrieben [1]. HHV-8 ist assoziiert mit dem Kaposi-Sarkom (KS – in der klassischen und endemischen Form als auch nach Transplantation), dem primären Effusionslymphom und dem Castleman-Tumor [2, 3].

Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany.

Korrespondenz: H. F. Rabenau, Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Paul-Ehrlich-Str. 40, Frankfurt am Main, Germany.

Fax: +49 6 96 30 18 30 61

E-mail: Rabenau@em.uni-frankfurt.de

Die klassische Form des Kaposi-Sarkoms (KS) wurde erstmals 1872 von dem ungarischen Dermatologen Kaposi beschrieben und wird vornehmlich bei älteren Männern aus dem mediterranen Raum und insbesondere bei ashkenazi-jüdischen Patienten beobachtet [4]. Typisch ist der Hautbefall besonders der unteren Extremitäten mit langsam aufsteigender Progredienz und die seltene Beteiligung der inneren Organe. Iatrogene Varianten traten mit der immunsuppressiven Therapie zum Beispiel von Organtransplantierten in Erscheinung. Bei Aufhebung der Immunsuppression kann eine spontane Rückbildung beobachtet werden [5].

Eine dramatische Steigerung der Inzidenz von Kaposi-Sarkomen entstand durch die HIV-Epidemie seit 1990. Beral *et al.* fanden eine bis zu 20000-fach höhere Prävalenz von Kaposi-Sarkomen bei HIV-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung [6]. Mehr als 25 % der AIDS-Patienten entwickelten am Anfang der Epidemie ein Kaposi-Sarkom [7]. Diese hohe Zahl war im Verlauf der Epidemie rückläufig [8]. Es blieb aber der häufigste Tumor bei AIDS und mit 20 % eine der häufigsten AIDS-definierenden Erkrankungen bei der Initialdiagnose. Das Auftreten des Tumors ist deutlich abhängig von der zellulären Immunkompetenz des Erkrankten. Verschiedenartige Stimuli können das HHV-8 reaktivieren und in die lytische Infektionsform mit klinischer Manifestation überführen [9]. Durch Sequenzanalyse der DNA konnten drei HHV-8-Subtypen unterschieden werden: A, B und C. B und C kommen häufiger in Afrika vor, A im Mittelmeerraum, und alle drei Subtypen wurden in den USA gefunden [8].

Zum Nachweis der HHV-8-Infektion eignen sich sowohl serologische Tests wie auch Verfahren zum Nachweis der Virus-DNA. Nach der Entdeckung des HHV-8 wurden verschiedene serologische Tests entwickelt auf Basis von indirekten Immunfluoreszenztests, ELISAs, Western blots und anderen Immunoblottechniken. Ein potentielles Problem dieser Tests ist die Kreuzreaktivität mit EBV und anderen Herpesviren.

Epidemiologische Studien zeigen, daß die höchsten Titer und mit fast 100 % die stärkste Durchseuchung mit HHV-8 bei den Patienten mit klassischem Kaposi-Sarkom gefunden werden [10, 11]. Auch bei den afrikanischen Kaposi-Sarkom-Patienten kommen ähnlich hohe Seroprävalenzen vor [8], z. B. in Nigeria, der Elfenbeinküste, Zaire, Gambia und Uganda (80–100 %). In diesen Regionen ist die endemische Form des Kaposi-Sarkoms häufig [11]. Nur wenig niedrigere Werte weisen HIV-positive homosexuelle Männer auf. Bei der Gruppe der HIV-positiven Frauen findet man unterschiedliche Seroprävalenzen. Manche Arbeiten beschreiben eine ähnlich hohe Seroprävalenz wie bei HIV-positiven Männern, andere beschreiben eine Durchseuchung eher vergleichbar mit der bei Blutspendern [11, 12, 13]. Bei HIV-positiven Drogensüchtigen, hämophilen und knochenmarktransplantierten Individuen wird, ebenso wie bei gesunden Blutspendern in Europa, eine geringe bis keine Durchseuchung beschrieben [8, 11].

Im Allgemeinen korreliert die Seroprävalenz der verschiedenen Länder gut mit der Prävalenz von Kaposi-Sarkomen [14]. Im Mittelmeerraum ist die HHV-8-Seroprävalenz und auch die Prävalenz der klassischen Form des Kaposi-Sarkoms erhöht (Seroprävalenz bei Blutspendern bis zu 35 %). Die meisten neueren Studien weisen auf ein Süd-Nord-Gefälle der HHV-8-Seroprävalenz in Europa hin [15, 16, 17]. Bei Blutspendern in der Schweiz wurde eine HHV-8-Durchseuchung von 5 %, in Großbritannien von 0–3 % beschrieben [16, 18].

In der vorliegenden Studie werden die HHV-8-Seroprävalenzdaten in verschiedenen (Risiko-) Kollektiven im Raum Frankfurt am Main vorgestellt. Gleichzeitig erfolgt ein Vergleich eines „in house“ Immunfluoreszenztests (IFT) mit einem kommerziellen, rekombinanten ELISA und zwei kommerziell erhältlichen IFTs.

## Material und Methoden

### Patientenkollektive

Insgesamt wurden 603 Serumproben aus unterschiedlichen Kollektiven auf HHV-8-Antikörper untersucht. Die Proben stammten aus der serologischen Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Virologie in Frankfurt am Main bzw. vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) Frankfurt am Main und wurden bis zur Testung bei –20 °C gelagert. Untersucht wurden folgende Proben:

- *Blutspender (Kontrollkollektiv)*: 101 Seren – anti-HIV, anti-HCV und HBsAg negativ. Alter der Patienten zwischen 20 bis 60 Jahre, Frauen und Männer jeweils 50 %.
- *HIV-Seropositive*: 214 Proben von 51 Frauen und 163 Männer. Klinisch kein Hinweis auf Kaposi-Sarkom. Alter der Patienten zwischen 18 und 69 Jahren (Median Männer: 36 Jahre, Frauen: 31 Jahre).
- *Homo- bzw. bisexuelle Männer*: 100 Seren – anti-HIV negativ. Alter der Patienten zwischen 15 und 69 Jahren (Median: 29 Jahre).
- *Hämophile Patienten*: 51 Seren. Alter der Patienten zwischen acht Monaten und 55 Jahren (Median: 8 Jahre).
- *Transplantationspatienten*: 11 Seren. Alter der Patienten zwischen 29 und 61 Jahren.
- *Patienten mit Kaposi-Sarkom*: 20 Seren. Alter der Patienten zwischen 22 und 88 Jahren (Median: 43 Jahre). Zur Abklärung einer möglichen Kreuzreaktivität der beiden Testsysteme wurden Seren von folgenden Patientengruppen getestet:
  - *Rheumafaktor-positive Proben*: 20 Seren. Alter der Patienten zwischen 20 und 56 Jahren.
  - *Patienten mit frischer EBV-Infektion*: 30 Seren (anti-VCA-IgM 1: >80, anti-VCA-IgG positiv und anti-EBNA negativ, anti-HHV-6 negativ). Alter der Patienten zwischen einem und 39 Jahren (Median: 18 Jahre).
  - *Patienten mit abgelaufener EBV-Infektion*: 14 Seren (anti-VCA-IgM negativ, anti-VCA-IgG positiv und

anti-EBNA positiv, anti-HHV-6 negativ). Alter der Patienten zwischen 12 und 85 Jahren (Median: 48 Jahre).

- *Patienten mit abgelaufener HHV-6-Infektion*: 16 Seren (EBV-seronegativ). Alter der Patienten zwischen 4 und 72 Jahren (Median: 43 Jahre).
- *Patienten mit primärer biliärer Zirrhose*: 23 Seren (anti-HHV-6 seropositiv, EBV-seronegativ). Alter der Patientinnen zwischen 43 und 82 Jahren (Median: 59 Jahre).

#### **Immunfluoreszenztest (IFT) – in-house**

Mit HHV-8 latent infizierte BCP-1-Zellen wurden aus Effusionslymphomen (body cavity lymphoma) gewonnen (freundlicherweise zu Forschungszwecken überlassen von Prof. Dr. P. S. Moore, Columbia Universität, New York) [29]. Die Vermehrung der Zellen erfolgte in einem Medium aus 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 Mega/l Penicillin [Fa. Grünenthal] + 10 g/l Streptomycinsulfat [Fa. HEFA Pharma]), 2 % L-Glutaminlösung (0,2 M = 29,2 g/l L-Glutamin [Fa. Sigma]), 4 % NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (7,5 % [Fa. Sigma]), 20 % „fetal calf serum“ (FCS [Fa. Sigma]), 10 % Hybrimax (3,92 g/200 ml) in IMDM (Iscove mit 15 mg/l Phenol red., ohne L-Glutamin und ohne NaCO<sub>3</sub>). Die Kultur wurde wöchentlich im Verhältnis 1:5 umgesetzt. Die BCP-1 Zellen wurden mittels PCR auf HHV-8- und EBV-DNA untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zelllinie HHV-8-DNA positiv und EBV-DNA negativ ist. Die Zellsuspension wurde auf 10-Feld-Lochobjektträger aufgebracht, so daß ein dünner Zellfilm verblieb. Nach Luftrocknung wurden die Objektträger mit –20 °C kalten Aceton-Methanol-Gemisch (40 % Aceton, 60 % Methanol) 90 Sekunden lang fixiert und anschließend bis zur Verwendung bei –20 °C kryokonserviert.

Zur Durchführung des Tests wurden Objektträger und Seren auf Raumtemperatur gebracht. Die Patientenserum wurden in einem Verhältnis von 1:50 mit PBS verdünnt. Auf jedes Feld wurden 15 µl verdünntes Serum getropft. Die Objektträger wurden anschließend 1 Std. bei 37 °C inkubiert, mit PBS gewaschen (15 min), getrocknet, mit 15 µl FITC (10 µl FITC (Fluorescein Isothiocyanate markiertes Antihuman IgG [Fa. Dianova]) und 10 µl „Evans Blue“ 1 % [Fa. Argene Biosoft] in 500 µl PBS) überschichtet, nachfolgend für 30 min bei 37 °C gelagert, erneut in PBS gewaschen (15 min) und abschließend bei 200–400facher Vergrößerung begutachtet. Als positiv wurde eine Probe gewertet, wenn Zellen eine deutliche apfelgrüne Fluoreszenz im Zellkern aufwiesen.

#### **Kommerzieller IFT zum Nachweis von HHV-8-spezifischen Antikörpern gegen latente bzw. lytische Antigene**

Dreiundfünfzig Patientenserum wurden mit den Testkits der Firma Viramed GmbH, Planegg-Steinkirchen, getestet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

#### **IgG ELISA – rekombinant (Fa. Biotest) zum Nachweis von anti-HHV-8**

Es wurde ein indirekter Sandwich-ELISA (Prototyp A) verwendet, der bislang noch nicht kommerziell vertrieben wird. Das K 8.1 Protein und das durch ORF 73 codierte LNA (latent nuclear antigen, Aminosäure 948–1057) sind an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte in *Escherichia coli* als GST-Fusionsproteine (Glutathione-S-Transferase) [19]. Die Testdurchführung wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgenommen. Alle Seren wurden 1:21 mit einem Lösungspuffer verdünnt, anschließend 200 µl der verdünnten Proben in jede Vertiefungen pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Platten gewaschen, 100 µl Konjugat zugesetzt (für 30 min bei 37° inkubiert) und abschließend 100 µl TMB (als Substrat) (für 30 min) und 100 µl einer Stopplösung hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte spektralphotometrisch bei 450 nm (Referenz bei 620 nm). Der Test wurde ausgewertet, wenn die optische Dichte (OD) der Leerprobe <0,1, die der Negativkontrolle <0,2 und die der Positivkontrolle >1,3 war. Die Cutt-Off-Grenze (CO) war definiert durch  $CO = 0,6 + OD$  (der Negativkontrolle)

#### **Statistische Methoden**

Die Korrelation zwischen den einzelnen serologischen Tests im Gesamtkollektiv und in den Einzelkollektiven wurde mit dem Cohen's Kappa-Koeffizienten berechnet. Werte des Koeffizienten zwischen null bis 0,40 bedeuten keine bis geringe Übereinstimmung, Werte zwischen 0,40 bis 0,75 eine mittlere bis gute Übereinstimmung und solche zwischen 0,75 bis 1,00 eine sehr gute bis vollständige Übereinstimmung der beiden serologischen Tests [20].

Im Cohen's Kappa-Koeffizienten wird der P-Wert durch eine Hilfsgröße (Prüfgröße) abgeschätzt. Bei dem Gesamtkollektiv reichte ein P-Wert kleiner 0,05 aus, um es als statistisch signifikant anzusehen. Bei Betrachtung der 12 Teilkollektive musste diese Grenze weiter verschärft werden. Der P-Wert musste kleiner 0,004 ( $1/12$  mal 0,05 = 0,004) sein, um als statistisch signifikant bewertet zu werden. Bei schwach besetzten Vierfeldertafeln kann man den sogenannten „exakten Test“ von Fisher verwenden, der analoge Fragestellungen wie der Chi-Quadrat-Vierfelder-Test bei kleinen Fallzahlen behandelt [20]. In dieser Studie wurde der Fisher-Test für Vergleiche von Einzelkollektiven desselben Tests benutzt. Die Beurteilung des P-Wertes wurde analog zum Cohen's Kappa-Koeffizienten vorgenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der von Herrn Dr. H. Ackermann *et al.* entwickelten Win BIAS Version 7.02 durchgeführt [21].

#### **Ergebnisse**

Von den 603 untersuchten Patientenserum (einschließlich solchen aus den EBV-, HHV-6, PBC und Rheuma-

**Tabelle 1** Vergleich der HHV-8-Positivität im „in house“ IFT und ELISA für das Gesamtkollektiv

	HHV-8-seropositiv im „in house“ IFT	HHV-8-seronegativ im „in house“ IFT	Summe
HHV-8-seropositiv im ELISA	46 (7,6 %)	17 (3,8 %)	63 (10,5 %)
HHV-8-seronegativ im ELISA	36 (6,0 %)	504 (83,6 %)	540 (89,5 %)
Summe	82 (13,6 %)	521 (86,4 %)	603

faktor-Kollektiven) waren im „in house“ IFT 82 (13,6 %) und im ELISA 63 (10,5 %) HHV-8-seropositiv (Tabelle 1).

Beim Vergleich der beiden Testsysteme („in house“ IFT und ELISA) zeigt sich für das Gesamtkollektiv kein statistisch signifikanter Unterschied (Fisher's  $p=0,117$  exakt zweiseitig). Im Cohen's Kappa-Test besteht eine gute Übereinstimmung der beiden Testsysteme mit einem Kappa-Wert von 0,59 ( $p=0,000$ ;  $Z=14,54$ ).

Die seroepidemiologischen Ergebnisse in den Einzelkollektiven (Tabelle 2) zeigen, daß die höchste HHV-8-Seroprävalenz in der Gruppe der Patienten mit Kaposi-Sarkom (100 %) zu finden ist, gefolgt von der Gruppe der anti-HIV-positiven Männer (23,3 %) und Frauen (15,7 %) und der homo-/bisexuellen HIV-negativen Männer (11 %) (jeweils im „in house“ IFT). Im Kollektiv der Blutspender wurde eine anti-HHV-8-Durchsuchung von 3 %, bei den Hämophilien von 0 % und bei

den Transplantationspatienten von 9,1 % (jeweils im „in house“ IFT) ermittelt.

Die Resultate im „in house“ IFT und ELISA korrelieren in Abhängigkeit von den Kollektiven unterschiedlich gut (Tabelle 2).

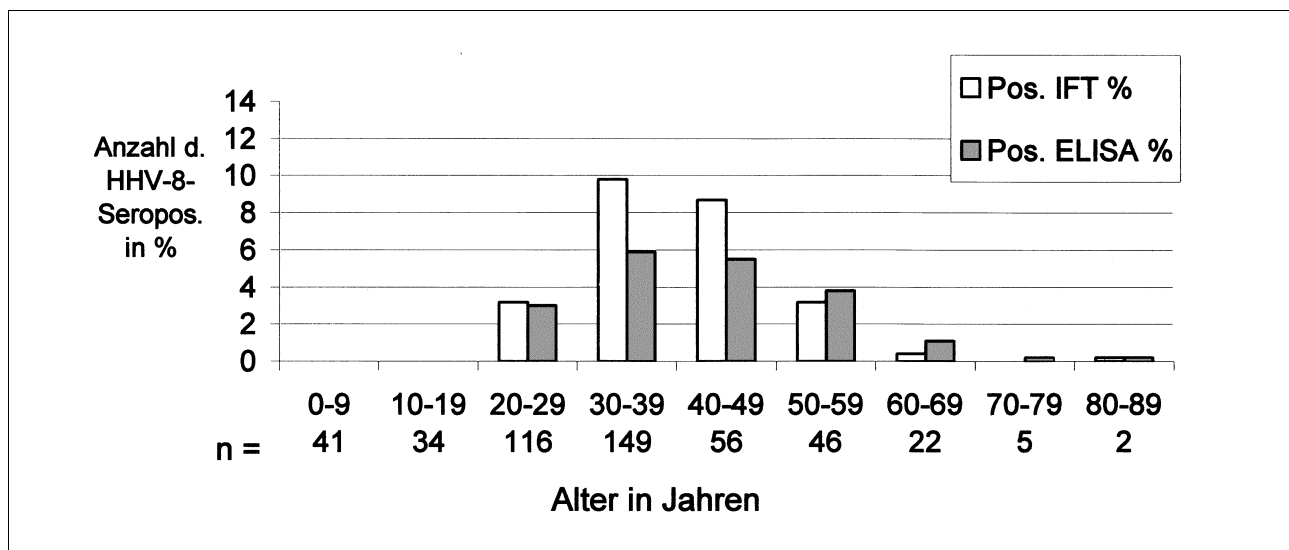
Die HHV-8-positiven Patienten waren im Durchschnitt älter als die Grundgesamtheit der untersuchten Patienten. Die meisten seropositiven Probanden waren zwischen dem 30.–60. Lebensjahr anzutreffen (Abb. 1). In fast allen Altersgruppen fand man mehr HHV-8-seropositive Patienten im „in house“ IFT als im ELISA.

Zur weiteren Abklärung bzw. Verifizierung der im „in house“ IFT und im ELISA-Test diskrepanten Resultate wurden die 53 betreffenden Proben mit zwei kommerziellen IFT zum Nachweis von latenten bzw. lytischen Antigenen nachgetestet. Von diesen 53 Proben waren 36 nur im „in house“ IFT und 17 nur im ELISA HHV-8-seropositiv (Tabelle 3).

**Tabelle 2** HHV-8-Prävalenz in den Einzelkollektiven und Übereinstimmung der Ergebnisse im „in house“ IFT und im ELISA

Patienten- kollektive	HHV-8-seropos. Patienten in %* (HHV-8-AK- positive Proben/Gesamtzahl der Proben)		Übereinstim. Ergeb. im IFT und ELISA	Statistische Übereinstimmung (Cohen's kappa)
	„in house“ IFT	rekom. ELISA		
Blutspender	0,6-3,0-8,4 (3/101)	0,2-2,0-7,0 (2/101)	96 (95,1 %)	(wegen des Fehlens gemeinsam-pos. Seren keine Berechnung möglich)
Patienten m. Kaposi-Sarkom	86,1-100,0-100,0 (20/20)	86,1-100,0-100,0 (20/20)	20 (100,0 %)	1,0
HIV-Ak-pos. Männer	17,1-23,3-30,6 (38/163)	12,3-17,8-24,5 (29/163)	140 (85,9 %)	0,57
HIV-Ak-pos. Frauen	7,0-15,7-28,6 (8/51)	5,7-13,7-26,3 (7/51)	46 (90,2 %)	0,61
Homo/bisex. HIV-Ak-neg. Männer	5,6-11,0-18,8 (11/100)	1,1-4,0-9,9 (4/100)	90 (90,0 %)	0,36
Hämophilie	0,0-0,0-5,7 (0/51)	0,0-0,0-5,7 (0/51)	50 (100,0 %)	1,0
Transplantations- patienten	0,2-9,1-41,3 (1/11)	2,2-18,2-51,8 (2/11)	10 (90,9 %)	0,62

\*mit 95 % Konfidenzintervall nach Theta



**Abbildung 1** Altersverteilung aller HHV-8 seropositiven Patienten. (Nicht mit einbezogen ist die Gruppe der Blutspender und die Gruppe der Rheumapatienten, bei denen keine Alters- und Geschlechtsangaben vorlagen)

In der statistischen Auswertung mit der Cohen's Kappa-Vierfeldertafel zeigte sich eine mittlere Übereinstimmung des „in house“ IFTs (mit latenten Antigen), mit dem kommerziellen latenten IFT. Eine schlechte Übereinstimmung bestand zwischen dem „in house“ IFT und dem kommerziellen IFT mit lytischen Antigenen. Zwischen den beiden kommerziellen IFTs bestand ebenfalls nur eine schlechte bis mittlere Übereinstimmung. Der rekombinante ELISA hatte eine schlechte Übereinstimmung mit den kommerziellen IFTs.

Die Untersuchungen der beiden anti-HHV-8-Testsysteme („in house“ IFT und ELISA) auf Kreuzreaktivität mit anderen Herpesviren erbrachten keine Hinweise, daß eine solche in signifikantem Maße besteht (Tabelle 4). Jedoch zeigte sich tendenziell eine erhöhte Anzahl reaktiver Proben bei Patienten mit Autoimmunantikörpern (Rheumafaktor-positive Patienten und Patientinnen mit Primärer biliärer Zirrhose).

## Diskussion

Die innerhalb dieser Studie ermittelte HHV-8-Seroprävalenz bei Blutspender (3% im (latenten) „in-house-IFT“ bzw. 2% im (ELISA) im Raum Frankfurt ist vergleichbar mit Seroprävalenzdaten aus Großbritannien (latenter IFT: 1,7%, ORF 65-ELISA: 3%), der Schweiz (latenter IFT und rekombinanter ELISA auf Basis von ORF-65.2-Proteinen: je 5%) und Norditalien (latenter IFT: 3,8–13,2%) [14, 16, 18]. Neuere Daten aus Deutschland belegen bei HIV-negativen gesunden Probanden ebenfalls eine Prävalenz von 3% [22]. Im Mittelmeerraum ist die HHV-8-Seroprävalenz und auch die Inzidenz der klassischen Form des Kaposi-Sarkoms erhöht (Seroprävalenz bei Blutspendern bis zu 35%). In Italien kann man die Zunahme beider Prävalenzen im Süden, besonders in Sizilien, beobachten [14]. Für die Vereinigten Staaten von Amerika gibt es sehr unter-

**Tabelle 3** Vergleich der vier anti-HHV-8-Tests bei 53 im ELISA und im „in house“ IFT diskrepanten Proben

Testsystem	HHV-8 seropositiv im kommerziellen IFT zum Nachweis von Antikörpern gegen	
	latentes Antigen	lytisches Antigen
nur im „in house“ IFT pos. (n = 36)	27 / 36 (75%)	15 / 36 (41,7%)
nur im ELISA pos. (n = 17)	6 / 17 (35%)	6 / 17 (35%)
im kommerziellen „latenten“ IFT pos.	33	17 / 33 (51,5%)

**Tabelle 4** Untersuchung auf potentielle Kreuzreaktivität der anti-HHV-8 Tests bei Patienten mit Infektionen mit anderen Herpesviren bzw. Autoimmunerkrankung

Patientenkollektive	HHV-8-seropositive Patienten in % (HHV-8-AK-positive Proben/ Gesamtzahl der Proben) *		Übereinstimmende Ergebnisse im IFT und ELISA
	„in house“ IFT	rekom. ELISA	
Serologisch akute EBV- Infektionen	0,0–0,0–9,5 (0/30)	0,1–3,3–17,2 (1/30)	29 (96,6%)
Serologisch abgelauf. EBV-Infektionen	0,0–0,0–19,3 (0/14)	0,0–0,0–19,3 (0/14)	14 (100,0%)
HHV-6-AK-positive Patienten	0,0–0,0–14,6 (0/19)	0,0–5,3–26,0 (1/19)	18 (94,7%)
Rheumafaktor-positive Patienten	1,2–10,0–31,7 (2/20)	0,1–5,0–24,9 (1/20)	17 (85%)
Primäre biliäre Zirrhose (PBC)	2,8–13,0–33,6 (3/23)	1,1–8,7–28,0 (2/23)	19 (82,6%)

\*mit 95 % Konfidenzintervall nach Theta

schiedliche Untersuchungen über die Seroprävalenz von HHV-8 bei Blutspendern; die Angaben schwanken zwischen 0–25 % [10, 11, 18, 23]. Über deutlich höhere Seroprävalenzen wird auf dem afrikanischen Kontinent berichtet. Hier liegen die Durchseuchungsraten zwischen 32–84 % (in Nigeria, Zimbabwe, Zaire, Uganda, Gambia und Elfenbeinküste) [11].

In der vorliegenden Untersuchung wurde übereinstimmend mit anderen Studien die höchste Seroprävalenz bei Patienten mit Kaposi-Sarkom gefunden [8, 10, 11, 18, 24]. Das innerhalb dieser Studie untersuchte Kollektiv bestand größtenteils aus HIV-assoziierten KS-Fällen (zwei Patienten mit klassischem Kaposi-Sarkom). Bei allen Patienten (100 %) wurden HHV-8-Antikörper mit beiden Testsystemen nachgewiesen. Simpson *et al.* ermittelte demgegenüber bei HIV-assoziierten KS eine Prävalenz von 81 %, und Spira *et al.* von 97 % (IFT mit lytischem Antigen) bzw. 83 % (IFT mit latenten Antigenen) [18, 25]. Die Diskrepanz zur vorliegenden Studie ist ggf. durch die Mischung des Kollektives (HIV-assoziiertes KS und klassisches KS) zu erklären und der eventuell durch die Immunsuppression der HIV-Patienten bedingten reduzierten Immunantwort.

Bei der Betrachtung der anderen Einzelkollektive konnte bei der HHV-8-Seroprävalenz eine Abhängigkeit von einer bestehenden HIV-Infektion festgestellt werden, was durch mehrere andere epidemiologische Studien bestätigt wird [10, 14, 18]. Unsere Daten zeigen keinen signifikanten Unterschiede der HHV-8 Durchseuchung bei HIV-positiven Frauen (15,7 bzw. 13,7 % [IFT/ELISA]) und Männern (23,3 bzw. 17,8 %), was die Ergebnisse verschiedener anderer Studien erhärtet [12, 13, 16]. Demgegenüber fanden Lennette *et al.* eine hohe Seroprävalenz bei HIV-seropositiven, homosexuellen Männern, während HIV-seropositive Frauen selten Antikörper aufwiesen [11].

Die meisten Studien beschreiben Homosexualität als einen wichtigen Faktor für die Seroprävalenz von HHV-8 [8, 11, 24]. Homosexuelle Geschlechtspraktiken scheinen einen möglichen Übertragungsweg darzustellen. Regamey *et al.* fanden eine erhöhte HHV-8-Seroprävalenz bei HIV-seronegativen, homosexuellen Männern (20 %) gegenüber den Blutspendern (5 %) [16]. In der vorliegenden Studie konnte im „in house“ IFT einerseits kein statistisch signifikanter Unterschied der HHV-8-Seroprävalenz zwischen HIV-positiven Männern (23,3 %) und HIV-negativen, homosexuellen Probanden (11 %) festgestellt werden, andererseits wiesen beide Gruppen eine statistisch signifikant höhere HHV-8-Durchseuchung auf als Blutspender (3 %).

In Übereinstimmung mit anderen epidemiologischen Daten zeigt sich auch innerhalb dieser Untersuchung, dass Patienten mit einer Hämophilie zumeist keine Antikörper gegen HHV-8 aufweisen [11, 18]. Größtenteils handelte es sich um sehr junge Patienten (in unserem Kollektiv im Median: 8 Jahre), die somit nur ein geringeres Risiko für eine Infektion hatten [23].

Von den 11 Proben der Transplantationspatienten waren im rekombinanten ELISA 18,2 % und im „in house“ IFT 9,1 % HHV-8-seropositiv. Eine der beiden seropositiven Seren war in beiden Tests, wie auch im kommerziellen, lytischen IFT positiv. Statistisch findet man keinen signifikanten Unterschied zu der Seroprävalenz der Blutspender (3 bzw. 2 %). Autoantikörper oder eventuelle Infektionen mit HHV-8 durch Organtransplantationen könnten die HHV-8-seropositiven Seren erklären [26, 27].

Die Patientenkollektive, die zur Abklärung möglicher Kreuzreaktivitäten gegenüber anderen Herpesviren (EBV, HHV-6) untersucht wurden, zeigten, daß keine solche in signifikantem Maße besteht. Gleichzeitig wurde jedoch bei den anderen Kontrollkollektiven eine tendenziell erhöhte Anzahl reaktiver Proben bei Patienten

mit Autoimmunantikörpern (Rheumafaktor-positive Patienten und Patientinnen mit primärer biliärer Zirrhose) beobachtet. In anderen Studien zeigten sich hingegen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis ähnliche HHV-8-Seroprävalenzen wie bei Blutspendern [11]. In der Gruppe der Patientinnen mit primärer biliärer Zirrhose erwiesen sich 3 Seren (13 % – im „in house“ IFT) bzw. 2 (8,7 % – im ELISA) als HHV-8-seropositiv. In der Nachtestung der Seren fanden sich übereinstimmende Ergebnisse der beiden IFTs mit latenten Antigenen, während der kommerzielle IFT mit lytischen Antigenen keine Probe als seropositiv bestätigte. Die vorhandenen anti-mitochondrialen Autoantikörper schienen den IFT mit lytischen Antigenen nicht zu beeinflussen, während die Testsysteme, die Antikörper gegen latente Antikörper nachweisen, durch Autoantikörper falsch-positive Ergebnisse hervorbringen könnten.

Grundsätzlich sind beim Vergleich epidemiologischer Studien sowohl die Art der serologischen Tests, insbesondere die Art des Antigens, als auch die verwandte Serumverdünnung, die in verschiedenen Arbeiten um Zehnerpotenzen differiert, von entscheidender Bedeutung. Bei den IFTs mit latenten Antigenen wurden in unserer Studie Effusionslymphomzellen (BC-3 in der Schweiz, sonst BCP-1) verwandt, die alle das LANA als Antigen präsentieren [28]. Die Serumverdünnungen der IFTs waren in fast allen Studien unterschiedlich (Großbritannien: 1:150, Norditalien 1:100, Frankfurt: 1:50, Schweiz: 1:40). Die relativ hohe Serumverdünnung von 1:150 könnte die geringere HHV-8-Seroprävalenz im IFT in Großbritannien erklären. In Norditalien scheinen andere Faktoren eine Rolle zu spielen, wie zum Beispiel der geografisch enge Kontakt mit Süditalien, wo eine deutlich höhere Seroprävalenz gefunden wurde [14]. Rabkin *et al.* verglichen aus diesem Grund sieben serologische Tests miteinander [10]. Vier dieser Tests waren IFTs mit latent bzw. lytisch infizierten Zellen (BCP-1 und BcbL) und drei ELISAs mit dem Orf 65 Protein, bzw. mit einem „minor capsid protein“ oder mit nativem Virus. In der Gesamtheit aller Proben korrelierten sechs der sieben Tests (außer dem „minor capsid protein“ ELISA) sehr gut. Besonders gute Übereinstimmung bestand zwischen dem latent BcbL-1 IFT mit monoklonalen Maus-Antikörpern und dem ELISA, der Nativvirus präsentiert.

In der vorliegenden Studie wurden die 53 diskrepanten Seren mit zwei kommerziellen IFTs, die lytische bzw. latente Antigene beinhalten, nochmals untersucht. In der statistischen Auswertung mit dem Cohen's Kappa-Vierfeldertafel zeigte sich eine mittlere Übereinstimmung des „in-house-IFT“ mit dem kommerziellen latenten IFT. Dies ist durch die Ähnlichkeit der präsentierten Antigene und der Methoden der beiden latenten IFTs zu erklären. Nur eine schlechte Übereinstimmung fand sich zwischen dem „in-house-IFT“ und dem lytischen Antigenen präsentierenden IFT, wie auch zwischen den beiden kommerziellen IFTs. Der rekombinante ELISA wies eine schlechte Übereinstimmung zu den kommerziellen IFTs auf. Eine mögliche Erklärung

hierfür wäre bereits die Ähnlichkeit der drei Immunfluoreszenztests, während der Prototyp ELISA schon durch seine Methode heraustritt. Der ELISA ist zudem der einzige Antikörpertest in dieser Untersuchung, der Immunglobuline gegen lytische als auch latente Antigenen erfaßt. Das von ORF K8.1 kodierte 35–37-kDA große Protein findet sich in der Virushülle und ist ein wichtiger Angriffspunkt für weitere Antikörper [29]. Die diskrepanten Proben, die im ELISA HHV-8-seropositiv waren, könnten durch Antikörper gegen dieses Glykoprotein erklärt werden. Andererseits könnten falsch positive Ergebnisse durch die Art der Herstellung des ELISAs bedingt sein. Zur Synthese der oben genannten Peptide werden *Escherichia coli* verwendet. Nicht vollständig gereinigte Proteine könnten bei der Präsentation unspezifische Antikörper binden.

Die Resultate unserer epidemiologischen Untersuchungen bestätigen im Wesentlichen die Daten anderer Studien aus dem mitteleuropäischen Raum. Des Weiteren belegen unsere Daten, daß die Ergebnisse der verschiedenen Studien auch von der verwendeten Nachweismethode abhängig sind und damit ein Teil der im internationalen Schrifttum beschriebenen Diskrepanz der epidemiologischen Daten erklärt werden kann. Um die „wahre Prävalenz“ in der Bevölkerung oder auch in speziellen Risikogruppen zu ermitteln, ist die Etablierung eines diagnostischen „Goldstandard“ oder einer Referenzmethode wünschenswert.

## Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. H. Ackermann (Abt. für Biomathematik, der J.-W.-Goethe-Universitätskliniken, Frankfurt) für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie dem DRK Hessen (Frankfurt) für das zu Verfügung stellen der Blutspenderseren.

## Literatur

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin M, Lee F, Culpeper J, Knowles DM, Moore PS. Identifikation of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865.
2. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995;332(18):1186–1191.
3. Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med* 1995;332(18):1181–1185.
4. Kaposi M. Classics in oncology. Idiopathic multiple pigmented sarcoma. *Cancer J Clinicians* 1928;32:342.
5. Brook JJ. Kaposi's sarcoma—a reversible hyperplasia. *Lancet* 1986;II:1309.
6. Beral V, Petermann T, Berkelman R, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: A sexually transmitted infection? *Lancet* 1990;335:123.
7. Fritsch A. *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1998:616–617.
8. Greenblatt R. Kaposi's sarcoma and Human Herpesvirus-8. *Infect dis clin north America* 1998;12:63–80.

9. Memar O, Rady P, Tyring S. Human herpesvirus-8: Detection of novel herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma and other lesions. *J Mol Med* 1995;73:603.
10. Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI, Chatlynne L, Biggar RJ. Interassay correlation of Human Herpesvirus 8 serologic tests. *J Infect Dis* 1998;178:304–309.
11. Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 1996;348:858–861.
12. Perna AM, Bonura F, Vitale F, Viviano E, Di Benedetto MA, Ajello F, Villafrate MR, Prestileo T, Mancuso S, Goedert JJ, Romano M. Antibodies to human herpesvirus 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. *Int J Epidemiol* 2000;29:175–179.
13. Cerimele F, Cattani P, Graffeo R, Cerimele D, Fadda G. Age-specific seroprevalence of HHV8 in central and southern Italy. 2th international workshop on KSHV/HHV8 and related agents. Oxford UK, 10<sup>th</sup> - 13<sup>th</sup> Sept. 1999.
14. Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpes virus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Nat Cancer Institute* 1998;90:395–397.
15. Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, Hatzioannou T, Sugett FE, Aldam DE, Denton AS. Detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;346:799–802.
16. Regamey N, Cathomas G, Schwager M, Wernli M, Harr T, Erb P. High human herpesvirus 8 seroprevalence in the homosexual population in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998;36:1784–1786.
17. Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 1998;338:948–954.
18. Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IV, Weiss RA, Moore PS. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 1996;349:1133–1138.
19. Lang D, Hinderer W, Rothe M, Sonneborn HH, Neipel F, Raab M, Rabenau H, Masquelier B, Fleury H. Comparison of the Immunoglobulin-G-Specific seroreactivity of different recombinant antigens of the human herpesvirus 8. *Virology* 1999;260:47–54.
20. Sachs L. *Angewandte Statistik*, Springer Berlin, Heidelberg, 1997:467.
21. Ackermann H, Stotz M, Zelmer G. BIAS für Windows 95/98/NT-Biometrische Analysen von Stichproben. 1998:Version 7.02.
22. Müller A, Bendick C, Salzberger B, Him S, Franzen C. Seroprevalence of human herpesvirus-8 in different patient groups in Cambodia and Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20(4):291–293.
23. Huang LM, Huang SY, Chen MY, Chao MF, Lu CY, Tien HF, Lee CY, Jeang KT. Geographical differences in human herpesvirus 8 seroepidemiology: a survey of 1201 individuals in Asia. *J Med Virol* 2000;60:290–293.
24. Gillison M, Ambinder R. Human herpesvirus-8. Current opinion in Oncology 1997;9:440–449.
25. Spira TJ, Lam L, Dollard SC, Meng YX, Pau CP, Black JB, Burns D, Cooper B, Hamid M, Huang J, Kite-Powell K, Pellett P. Comparison of serologic assays and PCR diagnosis of human herpesvirus 8 infection. *J Clin Microbiol* 2000;38:2174–2180.
26. Kim S, Kang SH, Moon J, Kim MS, Kim YS, Park K. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* 1998;30:3165.
27. Nocera A, Corbellino M, Valente U, Barroci S, Torre F, De Palma R, Sementa A, Traverso GB, Icardi A, Fontana I, Arcuri V, Poli F, Cagetti P, Moore P, Parravicini C. Post-transplant Human herpesvirus 8 infection and seroconversion in a Kaposi's sarcoma affected kidney recipient transplanted from a human herpesvirus 8 positive living donor. *Transplantation Proceeding* 1998;30:2095–2096.
28. Rainbow L, Platt GM, Simpson GR, Sarid R, Gao SJ, Toiber H, Herrington S, Moore PS, Schulz TF. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* 1997;71:5915–5921.
29. Raab MS, Albrecht JC, Yaguboglu S, Birkmann A, Lang D, Fleckenstein B, Neipel F. The immunogenic glycoprotein gp35/37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol* 1998;72:6725–6731.