

## Die *virus load* Bestimmung: Klinische Relevanz bei Infektionen mit HIV, HBV und HCV

Clinical Relevance of Viral Load Determination in HIV, HBV and HCV Infection

Annemarie Berger<sup>1</sup>, H.W.Doerr<sup>1</sup>, B. Weber<sup>1,2,3</sup>

**Zusammenfassung:** Die quantitative Bestimmung der Hepatitis B Virus (HBV) DNA mit Hilfe der Hybridisierung wird neben der klassischen Serologie zur Verlaufskontrolle der chronischen Hepatitis B seit längerer Zeit eingesetzt. Dagegen sind erst seit kurzem molekularbiologische Verfahren zur Quantifizierung der „Virus-Last“ bei der HIV- und Hepatitis C Virus (HCV) Infektion in Form kommerzieller Testkits verfügbar. Die HIV-1 RNA Kopienzahl stellt neben der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl den zuverlässigsten prognostischen Marker, mit einer vergleichbar hohen Aussagekraft wie onkologische Stadieneinteilungen, dar. Dennoch bedürfen die aktuellen Testkits einiger Verbesserungen. Mangelhafte Reproduzierbarkeit im unteren Meßbereich, fehlende Standardisierung sowie eine schlechte Sensitivität für Non-B HIV-1 Subtypen stellen neben den hohen Reagenzienkosten die wichtigsten Nachteile der meisten zur Zeit verfügbaren Testkits dar. Bei der Verlaufskontrolle der chronischen Hepatitis B nimmt die Quantifizierung der HBV-DNA über Hybridisierung oder PCR nur eine untergeordnete Rolle ein. Der qualitative HBV-DNA-Nachweis wird bevorzugt zur Überprüfung der Infektiosität oder zur Abklärung ungewöhnlicher Serokonstellationen eingesetzt. Nach neueren Erkenntnissen wird der Verlauf der HCV-Infektion nicht oder nur unwesentlich vom Ausmaß der Viruslast beeinflusst. Als prognostische Faktoren spielen vor allem Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum eine wesentliche Rolle. Dagegen scheint die Erfolgsaussicht der antiviralen Therapie mit der vor Behandlungsbeginn gemessenen Kopienzahl zu korrelieren.

**Schlüsselwörter:** Viruslast; HIV-Infektionen; Hepatitis B; Hepatitis C; DNA, Virale/Blut; RNA, Virale/Blut, Variation (Genetik); Serodiagnostik.

**Summary:** While the determination of HBV DNA with hybridization techniques has been used together with conventional serology for several years in the fol-

low-up of chronic hepatitis B, molecular assays for quantification of viral load in HIV and HCV infected patients have only recently become available as commercial test kits. HIV-1 RNA copy number measurement represents independently of CD4<sup>+</sup> cell count the most accurate prognostic marker for HIV infection with a high-precision corresponding to that of oncologic tumor staging procedures. However, currently available test kits need to be improved. The poor reproducibility for low copy numbers, the absence of standardization and low sensitivity for non-B HIV-1 subtypes represent the major drawbacks of most of the assays. Quantification of HBV DNA by hybridization or PCR plays only a minor role for the follow-up of chronic hepatitis B. Qualitative HBV DNA detection is preferentially used for the determination of infectiosity and resolution of unusual serological profiles. According to most recent findings, the course of HCV infection is not influenced by viral load. Age, gender and alcohol consumption represent the most important prognostic factors. In contrast, the response to antiviral therapy seems to be correlated with the copy number measured prior to treatment.

**Keywords:** Viral Load; HIV-Infections; Hepatitis B; Hepatitis C; DNA, Viral/blood; RNA, Viral/blood; Variation (Genetics); Serodiagnosis.

Die Feststellung der hämatogenen Erregerausbreitung im Organismus ist ein diagnostisches Verfahren, dessen prinzipielle Bedeutung für Pathogenese und Prognose einer Infektion seit langem bekannt ist. Aus methodisch-technischen Gründen hat diese Untersuchung in der Virologie, anders als in der Bakteriologie, jedoch nur in Einzelfällen eine wichtige Rolle gespielt. Musterbeispiel hierfür ist die Virushepatitis B, weil es hier meist zu einer exzessiven Freisetzung von Antigen in die Blutbahn kommt, was immunologisch leicht nachgewiesen werden kann. Allerdings ist diese Antigenämie mit der Virämie nur eingeschränkt korreliert. Das haben u.a. klinische Verlaufsstudien und elektronenoptische Serumuntersuchungen gezeigt. Auch bei vielen anderen Virusinfektionen verläuft die Replikation mit einer hohen Ausschussrate unter Bildung inkompletter bzw. defekter Partikel.

<sup>1</sup> Institut für Medizinische Virologie, Universitätskliniken Frankfurt

<sup>2</sup> Laboratoire Réunion Kutter-Lieners-Hastert, Junglinster, Luxemburg

<sup>3</sup> Korrespondenzadresse: Priv. Doz. Dr. Bernard Weber, Laboratoire Réunion Kutter-Lieners-Hastert, Centre Langwies, L-6131 Junglinster. Fax: +352-788894

Eingegangen: 7. Oktober 1997

Der Genomnachweis gilt heute als der ideale Surrogatmarker für die Bestimmung der Zahl von in die Blutbahn freigesetzten kompletten, infektionstüchtigen Viren. Da Viren generell nur aufwendig bzw. oft gar nicht routinemäßig in Kultur angezüchtet werden können, hat die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation viraler Genomsequenzen (an Stelle der Amplifikation des kompletten Virus in Kultur) die virologische Labordiagnostik regelrecht revolutioniert. Dies gilt besonders für Diagnose und Therapiebeurteilung bei chronischen Viruskrankheiten. Im folgenden soll der Stellenwert dieser modernen molekularbiologischen Virusdiagnostik, die Bestimmung des *virus load* im Plasma bzw. Serum des Patienten für die Infektionen mit HIV, HBV und HCV, besprochen werden.

## HIV-assoziierte Krankheiten

Obwohl die Pathogenese der HIV-assoziierten Krankheiten noch einige Rätsel aufgibt, ist heute allgemein akzeptiert, daß die hämatogene, nicht zellassoziierte Aussaat kompletter Viruspartikel unter allen Labormarkern den höchsten pathognomonischen Stellenwert besitzt [1-7]. Darauf haben bereits frühe Untersuchungen hingedeutet, die auf den Nachweis des inneren Virusstrukturantigens p24 oder auf die Isolierung und Anzüchtung des Virus in Zellkultur zielten. Trotz einer recht guten statistischen Korrelation zur HIV-Pathogenese erwies sich der vergleichsweise wenig sensitive HIV p24-Antigentest für die Beurteilung des individuellen Infektionsfalles als ungeeignet. Sein eingeschränkter Stellenwert liegt weiterhin in der kostengünstigen screening-Diagnostik einer neonatalen bzw. Frühdiagnostik einer primären HIV-Infektion (also im Falle einer bekannten Infektexposition) [8, 9]. Der Zellkulturversuch zum HIV-Nachweis hat eine entscheidende prognostische Aussagekraft, wenn *Synzytium-induzierende* Virusstämme bzw. -Varianten im Untersuchungsmaterial des Patienten gefunden werden. Diese Methodik ist jedoch zeit-, arbeits- und kostenintensiv und bringt hohe Sicherheitsauflagen an das Laboratorium mit sich.

Der entscheidende Durchbruch für die therapiebestimmende Labordiagnostik der HIV-Infektion kam mit der Entwicklung des HIV-RNA-Nachweises über die reverse transcriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) oder alternative Amplifikations- bzw. Detektionsverfahren [7]. Es stehen drei Methoden, RT-PCR; nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) und der branched-DNA Assay (bDNA)

**Non standard abbreviations:** AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; AZT, Azidothymidin; bDNA, branched deoxyribonucleic acid; CD, cluster designation; ddC, Dideoxycytidin; ddI, Dideoxyinosin; HBc, hepatitis B core (antigen, antibody); HBe, hepatitis B early (antigen, antibody); HBs, hepatitis B surface (antigen, antibody); HBV, Hepatitis B Virus; HCV, Hepatitis C Virus; HIV, human immunodeficiency virus; NASBA, nucleic acid sequence-based amplification; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

kommerziell und damit allgemein zur Verfügung. Die Untersuchungen liefern qualitative (positiv/negativ) und quantitative Ergebnisse, die als Zahl der Genomäquivalente oder Genomkopien bezeichnet und auf 1 ml Plasma oder Serum bezogen angegeben werden. Die Tests sind zwar firmenspezifisch normiert, weisen aber dennoch in der Hand ganz unterschiedlich versierter Anwender eine Reihe von Standardisierungsproblemen auf. Die virologische Fachgesellschaften des In- und Auslandes organisieren daher Ringversuche, an denen alle Anwender teilnehmen sollten, wenn diese Untersuchungsmethodik nicht in Mißkredit geraten soll.

Zur klinischen Aussage der *virus load* Bestimmung liegen eine Reihe von systematischen Studien und eine Fülle von Einzelfallbeobachtungen vor [4-6]. Die HIV-1 RNA-Bestimmung besitzt eine ähnlich hohe prognostische Aussagekraft wie die chirurgische Stadieneinteilungen in der Onkologie. Ab einem Schwellenwert von über 10.000 Genomäquivalenten pro ml ist die Progression der HIV-1 Infektion wesentlich schneller als bei Patienten mit einer geringen Viruslast, in fast 50% der Fälle erfolgt ein Fortschreiten der Infektion bis zum Vollbild AIDS innerhalb der nächsten 5 Jahre [4].

Auch für die Verlaufskontrolle der antiretroviralen Therapie nimmt die Quantifizierung der HIV-1 RNA den höchsten Stellenwert ein. Ein Ansprechen auf die Therapie läßt sich über den Abfall der HIV-1 RNA-Kopienzahl pro ml Plasma innerhalb weniger Wochen beobachten. Kommt es unter Azidothymidin (AZT)-Monotherapie nur zu einer relativ kurzfristigen Reduzierung der Viruslast von 0,7  $\log_{10}$ , wird bei der Kombination von zwei Nukleosidanaloga ein Abfall von 1,5  $\log_{10}$  nachgewiesen. Unter Zugabe von Protease-Hemmern erreicht man eine 99%ige (2  $\log_{10}$ ) Reduktion der Viruslast [7]. Die Suppression der Viruslast geht einher mit einer verbesserten Prognose, bei einem 90%igen Abfall der HIV-1 RNA-Kopienzahl wird bereits das relative Risiko für das Fortschreiten der Erkrankung um 80% reduziert [5,10].

Diese Erfahrungen wurden auf einer Konsensuskonferenz der Deutschen Arbeitsgemeinschaft niedergelassener Ärzte gegen AIDS (DAGNÄ) im Mai 1996 am Bundesamt für die Zulassung von Seren und Impfstoffen (Paul-Ehrlich-Institut) in Langen zusammengefaßt (Tabelle 1).

Daraus ergibt sich:

- (1) die Notwendigkeit zum Beginn einer virostatischen Therapie, wenn eine Genomkopienzahl von 10.000/ml Plasma überschritten wird.
- (2) das Ziel die Viruslast unter 10.000 Kopien HIV-1 RNA/ml zu reduzieren ist aus Gründen der Selektion resistenter Mutanten unter unvollständiger Suppression der Virusreplikation nicht mehr ausreichend. Es sollte, obwohl diese Empfehlung zur Zeit noch Gegenstand kontroverser Diskussionen ist, eine Reduzierung der Viruslast unter die Nachweisgrenze der HIV-1 RNA-Bestimmungsmethoden angestrebt werden [11].

**Tabelle 1** HIV viral load: Konsensus-Empfehlungen der DAGNÄ, Paul Ehrlich- Institut 05/96

Diagnostische Fragestellung	Vorgehen und Kriterien
Prognose	<p>≥ 6 Monate nach Serokonversion                      &lt; 100.000 Kopien = gute Prognose                      &gt; 100.000 Kopien = schlechte Prognose</p>
Therapiebeginn	<p>Viruslast zusammen mit CD4-Zellzahl als Marker für Therapiebeginn                      Empfehlung 06/96:antiretrovirale Therapie zu erwägen bei mehr als 10.000 Kopien/ml</p>
Therapiemonitoring	<p>Reduktion der Viruslast um mehr als 0,5 log-Stufen signalisiert therapeutischen Benefit                      Persistierender Wiederanstieg ist Indikator für Therapieversagen                      kombinierte Messung von Virusbelastung und CD4-Zellzahl ist derzeit zuverlässigste                      Verlaufskontrolle einer antiretroviralen Therapie</p>

(3) eine infauste Prognose, wenn trotz Therapie eine Genomkopienzahl von 1 Million/ml Plasma überschritten wird.

Entsprechendes gilt umgekehrt für den Therapieerfolg. Der Rückgang der Virus-(genom)kopienzahl unter Therapie geht der reziproken Entwicklung der CD4-Lymphozytenzahl zeitlich bis zu einer Woche voraus.

Die Zählung der Viren erfolgt gewöhnlich im logarithmischen Maßstab. Das gilt auch für die Ermittlung der Genomkopienzahl. US-Arbeitsgruppen geben den Faktor 3 als signifikante, methodenunabhängige Änderung im Spontan- oder therapeutisch beeinflussten Infektionsverlauf an [7]. Nach unseren Erfahrungen mit dem Amplicor System (Hoffmann-LaRoche) oder dem bDNA-Test (Chiron) sollte dieser Faktor im Routinebetrieb jedoch 5 betragen. Die Testsensitivität wird z.Zt. international mit 500 Kopien/ml Plasma angegeben, so daß ein signifikanter Anstieg mindestens 2500 Kopien/ml betragen sollte. Gerade im unteren Wertebereich fällt jedoch die Streuung nach unseren Erfahrungen wesentlich größer aus, so daß bis zum Anstieg auf 5000 der Faktor 10 realistischer und störunanfälliger ist. Auch beim Überschreiten hoher Werte (ab 10<sup>6</sup>/ml) sollte dieser Signifikanzfaktor verwendet werden.

Wenn kein Verdacht auf eine akute oder reaktivierete opportunistische Infektion besteht, genügt es, die Bestimmung im zeitlichen Abstand von 3 Monaten durchzuführen. Da die opportunistische Infektion vorübergehend die Absenkung der zellulären Immunität (Absinken der CD4-Zahl) bewirkt, muß ggf. kurzfristiger kontrolliert werden (Tab. 1). Ohnehin sollte die molekularbiologische Virusdiagnostik stets mit der CD4-Zahlbestimmung kombiniert werden.

Bei fortgeschrittenem AIDS ist der Wiederanstieg der CD4-Zahl allerdings nicht unbedingt gleichbedeutend mit der klinischen Besserung bzw. (partiellen) Erholung des Immunsystems. Andere Teile des Immun- bzw. retikulären Zellsystems sind möglicherweise dann schon irreversibel geschädigt [12].

Ob die Messung der HIV-1 RNA oder die HIV-1 cDNA-Bestimmung das Verfahren der Wahl für eine

frühe und sensitive Labordiagnose der neonatalen Infektion darstellt, wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert [13, 14].

Mit der PCR bzw. RT-PCR kann die neonatale Infektion früher und zuverlässiger erkannt werden (spätestens 2 Wochen nach der Geburt) als mit dem Antigentest oder der Virusisolierung in der Zellkultur. Bereits kurze Zeit nach der Geburt findet bei infizierten Kindern eine intensive Virusreplikation statt, die Plasmavirämie steigt um 2 bis 4 log-Stufen in weniger als 1 Woche an und bleibt im ersten Lebensjahr sehr hoch (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Kopien HIV-1 RNA/ml, [15]).

Aus nicht bekannten Gründen zeigen HIV-infizierte Kinder häufig signifikante Spontanschwankungen des virus load, so daß in der Pädiatrie die molekularbiologische Virusdiagnostik in dieser Weise zum Therapiemonitoring weniger gut geeignet ist.

Die Sensitivität der quantitativen HIV-1 RNA-Detektionsverfahren wird ständig verbessert. So können mit einem modifizierten Protokoll, nach vorheriger Ultrazentrifugierung, bis zu 20 Kopien HIV-1 RNA/ml mit dem HIV-Monitor - Kit nachgewiesen werden. Um den Einfluß der genetischen Variabilität auf die Amplifikationsrate auszuschließen bzw. zu reduzieren, werden in Zukunft verbesserte Primer-Paare eingesetzt werden, welche möglichst alle HIV-1 Subtypen gleich gut erkennen. Bei der bDNA steht die Problematik der genetischen Variabilität weniger im Vordergrund, da hier ohnehin über 20 verschiedene Fang- und Detektionssonden eingesetzt werden.

Die Sequenzierung ausgewählter PCR-Amplifikate der viralen Nukleinsäure im Bereich des RT-Gens ermöglicht die Identifikation therapieresistenter HIV-Stämme und damit die Beurteilung der Wirksamkeit verschiedener einzeln oder in Kombination eingesetzter Virostatika. Nach den Ergebnissen der DELTA-Studie in welcher bei einem AZT-naivem Subkollektiv, phenotypische und genotypische Resistenzuntersuchungen des RT-Gens sowie HIV-1 RNA Quantifizierungen durchgeführt wurden, besitzt die Bestimmung verschiedener Resistenz-Mutationen keine klinische Relevanz bei Patienten unter einer Nukleosidanaloga-Kombinationstherapie [16]. Obwohl unter der Kombi-

nation von AZT + Dideoxyinosin (ddI) bzw. AZT + Dideoxyzytidin (ddC), AZT-Resistenzmutationen genau so häufig auftraten als unter Monotherapie, wurde im Kombinationsarm eine wesentlich stärkere und langfristige Suppression der Virusreplikation beobachtet. Wie weit diese Ergebnisse auf aktuelle Therapieschemata (2 RT- + 1 Protease-Hemmer) übertragbar sind, bleibt fraglich. Es ist aber abzusehen, daß die Resistenzbestimmung im klinischen Alltag wenig Bedeutung einnehmen wird und vor allem für Studienzwecke (in vitro und in vivo) eingesetzt werden sollte.

### Virushepatitis B

Für die Labordiagnose der Virushepatitis B verfügen wir wie bei den HIV-assoziierten Krankheiten ebenfalls über eine breite Palette von Labormethoden. Eine Erregeranzüchtung ist zwar nicht möglich, dafür ist die Infektionsserologie wesentlich leistungsfähiger und seit Jahrzehnten gut eingespielt. Die virologische Beurteilung des Infektionsverlaufes beruhte bisher in erster Linie auf der qualitativen und quantitativen HBs-Antigenbestimmung im Plasma oder Serum. Ergänzend stehen der HBe-Antigentest und die quantitative IgM-anti-HBc-Bestimmung zur Verfügung. Der signifikante Abfall des HBs-Antigen- und IgM-anti-HBc-Titers, das Verschwinden des HBe-Antigens und der Nachweis von anti-HBe werden als Marker der nachlassenden Infektivität gewertet.

Die Bildung von anti-HBs zeigt die Elimination des Virus an. In 10 bis 15% der Fälle ist die Elimination nicht vollständig und man findet zirkulierende Immunkomplexe. Die Einführung der molekularbiologischen Diagnostik hat dieses festgefügte Schema etwas erschüttert. Trotz erfolgreicher Impfung von Neugeborenen HBV-infizierter kommt es in verschiedenen Erdteilen (Südeuropa und Afrika) zur vertikalen Übertragung des Hepatitis B Virus, bedingt durch eine Aminosäuresubstitution im hauptneutralisierenden Epitop des HBsAg (S-Mutanten) [17]. Infektionen mit prä-core-Mutanten des HBV laufen ohne HBe-Antigenbildung ab. Prä-core-Mutationen werden vor allem im Mittelmeerraum beobachtet und sind häufig mit einer schlechteren Prognose der chronischen Hepatitis B, trotz Serokonversion, assoziiert [18, 19]. Allerdings gibt es auch asymptomatische Verlaufsformen bei chronischen Infektionen mit HBeAg-negativen Mutanten.

Diese Erkenntnisse verdanken wir den molekularbiologischen Untersuchungsmethoden, mit denen wir wie bei HIV problemlos die Zahl viraler Genomkopien im Plasma des Patienten ermitteln und therapieresistente Mutanten identifizieren können. Im wesentlichen Unterschied zu HIV kommt jedoch der virus load Bestimmung bei der HBV-Infektion auch heute nur eine ergänzende Bedeutung zu. Im Fall der akuten und spontan abheilenden Virushepatitis kann auf die molekularbiologische Untersuchung ganz verzichtet werden. Bei chronischen Verläufen und im Therapiemoni-

toring ist sie die Methodik der zweiten (unterstützenden) Wahl, wenn die konventionelle Diagnostik nicht dem Krankheitsverlauf entspricht oder bei ungewöhnlichen Befundkonstellationen [20]. Wie bei HIV hat die so bestimmte quantitative Virämie im individuellen Krankheitsfall den höchsten klinischen Aussagewert. Das Verfahren der weniger sensitiven und z.Zt. noch besser standardisierten klassischen Direkthybridisierung zur quantitativen Bestimmung viraler Nukleinsäure im Plasma weist ebenfalls eine hohe klinische Plausibilität auf. Es ist besser mit dem HBe- und anti-HBe-System korreliert als die hypersensitive PCR-Testung. Die Frage der klinischen Infektiosität (die eine bestimmte Mindestmenge infektiöse Viren voraussetzt) wird mit diesem Test realistischer beantwortet (Abbildung 1). Die Nachweisgrenze der klassischen Hybridisierung bewegt sich zwischen 1 bis 5 pg HBV DNA (280.000 - 1.400.000 Genomäquivalente), für die bDNA liegt der cut-off bei 700.000 Genomäquivalenten.

Trotzdem wird bei über 5% der HBeAg negativen „gesunden“ HBV-Trägern virale DNA mit der Hybridisierung nachgewiesen (Abbildung 1). Umgekehrt sind 22,7% der HBeAg positiven Patienten in der Hy-

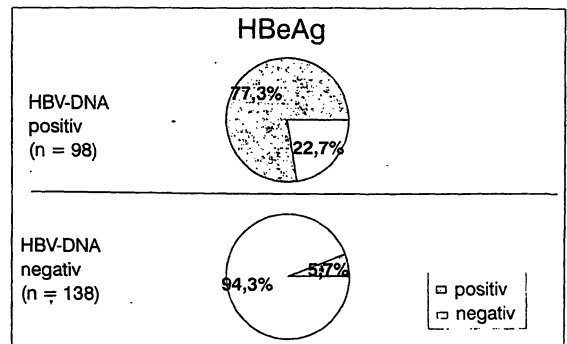


Abbildung 1 Ergebnisse der HBV DNA Hybridisierung und HBeAg-Nachweis in einem Kollektiv HBsAg-positiver Patienten (Institut für Med. Virologie, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt)

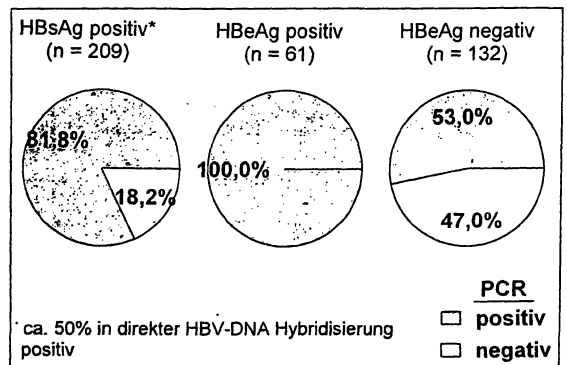
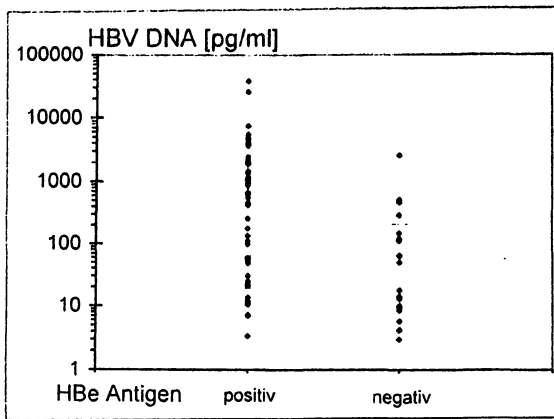


Abbildung 2 Vergleich zwischen HBeAg-Nachweis und HBV-DNA-Messung bei HBeAg-positiven und HBeAg-negativen Patienten



**Abbildung 3** Ergebnisse der HBV DNA PCR bei HBsAg-positiven Patienten (Institut für Med. Virologie, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt)

bridisierung negativ. Mehr als 50% der HBeAg negativen HBsAg-Träger sind in der HBV-DNA-PCR positiv (Abbildungen 2 und 3).

Zur Verlaufskontrolle der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis B ist die quantitative HBV-DNA-Bestimmung im Plasma oder Serum besser geeignet als die Messung der HBeAg-Konzentration, da im Falle eines Therapieerfolges HBV-DNA bereits mehrere Monate vor der Verminderung von HBeAg bzw. HBsAg nicht mehr nachweisbar ist und somit auch besser die tatsächliche Replikationsaktivität des Virus widerspiegelt [21].

Der „sichere“ Ausschluß der Infektiosität, z.B. einer Blutkonserve, wird natürlich besser durch die PCR, deren Nachweisgrenze bei einigen hundert Kopien viraler DNA liegt, gewährleistet. Biometrische Überlegungen zur Kosten-Nutzen-Relation haben allerdings noch nicht zur obligatorischen Einführung der PCR in die Transfusionsmedizin geführt. Selbst wenn das HBV auch nach kompletter Ausheilung als „minimal infection“ oder proviral latent lebenslang im Organismus persistieren sollte, reicht die nur noch mit der PCR nachweisbare Virusrestdosis in den meisten Fällen offenbar nicht für eine Infektiosität der Blutkonserve aus. Dies muß allerdings noch besser erforscht werden, wenn man nicht den US-amerikanischen Weg wählt, alle anti-HBc-seropositiven Blutspender auszuschließen.

Isoliert anti-HBc-positive Befunde werden je nach Studie bei 0,7 bis 1% der gesunden Blutspender beobachtet [22]. Diese Befundkonstellation wird in verschiedenen klinischen Situationen beobachtet. Während des sogenannten diagnostischen Fensters in der Rekonvaleszenzphase einer akuten selbstlimitierenden Hepatitis ist der Nachweis von hochtitrigem anti-HBc-IgM neben anti-HBc bei negativem HBsAg beweisend für eine relativ frische HBV-Infektion. Diese Patienten werden trotz negativem HBsAg- und HBeAg-Nachweis als infektiös betrachtet, weil noch

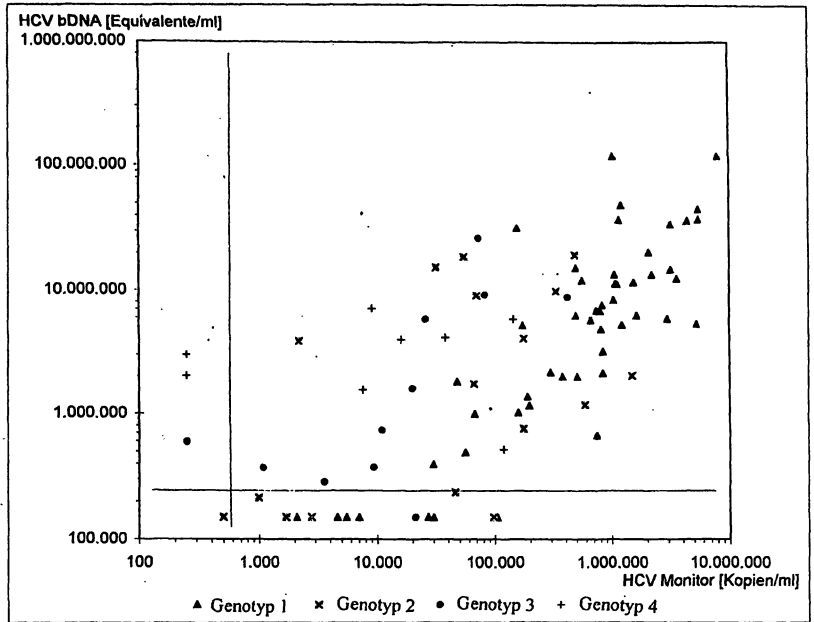
HBV in geringen Konzentrationen im Serum vorhanden sein kann. Bei einer protrahierten, aber limitierten HBV-Infektion wird die diagnostische Lücke länger und kann Monate bis Jahre anstelle von wenigen Wochen dauern. Es handelt sich in diesen Fällen um eine chronische Hepatitis B (meistens bei immunsupprimierten Patienten) mit einer niedrigen HBsAg-Produktion. Bei einer Koinfektion oder Superinfektion mit HCV kommt es zu einer Interferenz mit der Replikation von HBV, so daß bei diesen Patienten gehäuft isolierte anti-HBc-positive Befunde beobachtet werden [23].

Bei HIV-Trägern und AIDS-Patienten findet man relativ häufig anti-HBc als einzigen Marker einer zu einem unbekanntem Zeitpunkt erworbenen HBV-Infektion [22-24]. Die Probanden sind in der Regel leberge-sund, was die immunpathogenetische Komponente der HBV-Infektion bestätigt. In einer Serie von 186 solchen Probanden konnten wir bei 4 Personen HBV-Genom mit der PCR nachweisen. Personen mit nur schwach positivem (unsicherem) anti-HBc-Ergebnis sind hierbei nicht berücksichtigt worden (>90% Inhibition im AxSYM bzw. IMx Core-Test und positives Testergebnis bei einer Probenverdünnung von 1:3).

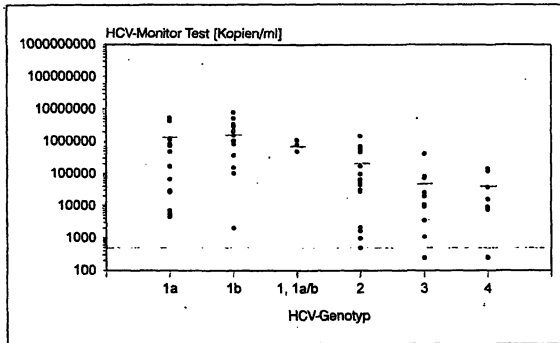
Über die Relevanz der HBV-DNA Messung für die Risikobeurteilung bzw. Diagnose und Verlaufskontrolle der vertikalen HBV-Infektion liegen relativ wenige Daten vor. Obwohl das höchste Risiko einer Übertragung bei HBeAg-positiven Müttern liegt, erscheint wegen der bereits oben erwähnten Diskrepanz zwischen anti-HBe-Seropositivität und HBV-DNA-Trägerstatus eine qualitative oder quantitative Bestimmung der HBV-DNA zur Überprüfung der Infektiosität sinnvoll.

## Virushepatitis C

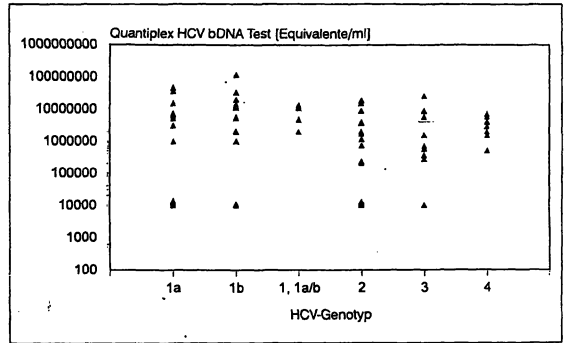
Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) weist eine hohe epidemiologische und klinische Ähnlichkeit zur HBV-Infektion auf. Subklinische und chronische Infektionsverläufe sind allerdings wesentlich häufiger. Somit ist auch die Gefahr einer später auftretenden Leberzirrhose oder eines Leberkarzinoms größer. Im Hinblick darauf besteht für die HCV-Infektion bei nicht zu alten Patienten eine häufigere Indikation zur Einleitung der virostatischen Intervention als bei der Virushepatitis B. Die virusdiagnostische Palette zur Erkennung und Verlaufsbeurteilung der HCV-Infektion ist im Vergleich zu HIV und HBV beschränkt. Es stehen weder die Erregerisolierung in Zellkulturen noch Antigentests zur Verfügung. Der Antikörpertest wird in der Regel nicht vor 7 Wochen post infectionem positiv. Weder Titer noch Ig-Klassen-spezifische Analysen sind mit dem Infektionsverlauf korreliert. Etwa 2-4 Wochen p.i. kommt es zu einer beträchtlichen Virämie [25], die im weiteren Infektionsverlauf immunologisch kontrolliert wird. In mindestens 70% der Infektionsfälle erfolgt keine spontane Abheilung zu der Erregerelimination. Im weiteren Infektionsverlauf korreliert



**Abbildung 4** Bestimmung der HCV RNA Kopienzahl mit HCV Monitor und Quantiplex bDNA im Vergleich



**Abbildung 5** Einfluß des HCV-Genotyps auf die viral load Bestimmung, HCV Monitor (a) und Quantiplex bDNA (b) im Vergleich.



**Abbildung 6**

ren die meist niedrigen Virämietiter nicht mit der Krankheitsmanifestation. Alle diese Erkenntnisse beruhen auf der molekularbiologischen Diagnostik, der also bei HCV ein besonderer bzw. singulärer Stellenwert innerhalb der virologischen Labordiagnostik zukommt.

Unabhängig von und in einem gewissen Widerspruch zur Inkongruenz von HCV-Genomkopienzahl/ml Plasma und spontanem Krankheitsverlauf haben die klinische Empirie und mehrere Studien gezeigt, daß der Erfolg einer virostatistischen Intervention mit dem Ziel der Erregerelimination mit der vor Therapiebeginn gemessenen Kopienzahl korreliert ist [26-28]. Somit trägt diese Untersuchung nicht nur zur Erfolgsbeurteilung, sondern auch zur Indikation der Therapie bei. Diese wird als erfolversprechender bei niedrigerer Virämie angesehen. Weitere Studien weisen auch auf die Bedeutung des HCV-Genotyps für

Krankheits- und Therapieverlauf hin [29, 30], wobei es noch nicht restlos geklärt ist, ob die Infektion bestimmter Genotypen niedrigere Virämien verursacht. Wie bei HIV ist die kommerziell erhältliche Testausrüstung auf einheimische Genotypen (HCV 1b) optimiert, so daß die Amplifikationsrate mit kommerziellen RT-PCR Verfahren vor allem bei Genotyp 3 Infektionen wesentlich geringer als für HCV 1b (Abbildungen 4 bis 6). Die Sensitivität der HCV Monitor Primer für Genotypen 2 und 3 beträgt nur 11% bzw. 8% im Vergleich zu Genotyp 1 [31].

Es ist deshalb davon auszugehen, daß die Assoziation einer niedrigen Virämie und einer günstigen Prognose von Infektionen mit HCV-Genotyp 3 ein Laborartefakt ist. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß vor allem Alter, Geschlecht und Alkoholkonsum den Verlauf der chronischen Hepatitis C beeinflussen [32].

Für die Risikobemessung der vertikalen HCV-Infektion spielt die Quantifizierung der HCV RNA eine wesentliche Rolle, da die Wahrscheinlichkeit einer Mutter-Kind-Übertragung mit der Viruslast zunimmt. Bei HIV-HCV-koinfizierten Müttern ist das Risiko durch höhere HCV-RNA-Konzentrationen, bedingt durch die Immunsuppression, erhöht [33, 34]. Dagegen wird der Einfluß der HIV-Infektion auf den spontanen Verlauf der Hepatitis C noch immer kontrovers diskutiert [29, 35].

## Resümee

Die virus load Bestimmung hat die Labordiagnostik und das Therapiemonitoring der Infektionen mit HIV, HBV, HCV wesentlich verbessert. Sie muß bei HIV-assoziierten Krankheiten als unentbehrlich betrachtet werden. Sie ist ebenfalls notwendig bei schwierigen Verläufen der chronischen Hepatitis B und unterstützt die Verlaufskontrolle der HCV-Infektion unter antiretroviraler Therapie; hier reichen allerdings auch qualitative Messungen in den meisten Fällen aus.

## Literatur

1. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4+ lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-6.
2. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996;271:1582-6.
3. Raboud JM, Montaner JS, Conway B, Haley L, Sherlock C, O'Shaughnessy MV, Schechter MT. Variation in plasma RNA levels, CD4 cell counts, and p24 antigen levels in clinically stable men with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1996;174:191-4.
4. Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-70.
5. O'Brien TR, Blattner WA, Waters D, Eyster E, Higartner MW, Cohen AR, Luban N, Hatzakis A, Aledorf LM, Rosenberg PS, Miley WJ, Kroner BL, Goedert JJ. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the multicenter hemophilia cohort study. *JAMA* 1996;276:105-10.
6. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Eschhart J, Hill A, Benoit S, Rubin M, Simberkoff MS, Hamilton JD. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. *N Engl J Med* 1996;334:425-31.
7. Saag MS, Holodny M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD, Volberding PA. HIV viral load markers in clinical practice. *Nature Medicine* 1996;2:625-9.
8. Scarlatti G. Paediatric HIV infection. *Lancet* 1996;348:863-8.
9. Weber B. Aktuelle Entwicklungen in der Diagnostik der HIV-Infektion. *AIFO* 1995;10:339-49.
10. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundockz H, Schooley RT, Haubich RH, Henry WK, Lederman HM, Phair JP, Niu M, Hirsch MS, Merigan TC. A trial comparing monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. *New Engl J Med* 1996;335:1081-90.
11. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD et al. A controlled trial of two nucleosides analogues plus didanosine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl J Med* 1997;337:725-32.
12. Rowe PM. The ups and downs of T-cell recovery in HIV-1 disease. *Lancet* 1997;350:720.
13. Krivine A, Le Bourdelles G, Firtion G, Lebon P. Viral kinetics in HIV-1 perinatal infection. *Lancet* 1997;350:493.
14. Palumbo PE, Kwok S, Waters S et al. Viral measurement by polymerase chain reaction-based assays in HIV-infected infants. *J Pediatr* 1995;126:192-5.
15. Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, et al. Viral load and disease progression in infants infected with HIV type 1. *N Engl J Med* 1997;336:1337-42.
16. Brun-Vézinet F, Boucher C, Loveday C, Decamps D, Fauveau V, Izopet J, Jeffries D, Kaye S, Kryanowski C, Nunn A, Schuurman R, Seigneurin JM, Tamalet C, Tedder R, Weber J, Weyerling GJ, the National Virology Groups and the Delta Virology Working Group and Coordinating Committee. HIV-1 viral load, phenotype, and resistance in a subset of drug-naïve participants from the Delta trial. *Lancet* 1997;350:983-90.
17. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manziello G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-9.
18. Brunetto MR, Stemmler M, Schodel F, Will H, Ottobrelli A, Rizzetto M, Verne G, Bonino F. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital J Gastroenterol* 1989;21:151-4.
19. Carman W, Thomas H, Domingo E. Viral genetic variation: hepatitis B as a clinical example. *Lancet* 1993;341:349-53.
20. Perrillo R, Mimms L, Schechtman K, Robbins D, Campbell C. Monitoring of antiviral therapy with quantitative evaluation of HBeAg: A comparison with HBV DNA testing. *Hepatology* 1993;18:1306-12.
21. Weber B, Doerr HW. Bedeutung von anti-HBc-IgM für die Diagnose und Verlaufskontrolle der Hepatitis B: aktuelle Entwicklungen. *J Lab Med* 1996;20:390-4.
22. Gross, A., H. I. Joller-Jemelka, A. N. Wicki, P. J. Grob. Der Hepatitis-serologische Befund „Anti-HBc allein“, zirkulierende virale DNS und Befund-Interpretation. *Schweiz Med Wochenschr* 1993;123:1193-1202.
23. Jilg W, Sieger E, Zachoval R, Schätzl R. Individuals with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker for hepatitis B infection: high percentage of carriers of hepatitis B and C virus. *J Hepatol* 1995;23:14-20.
24. Sanchez-Quijano, A, Jauregui JJ, Leal M, Pineda JA, Castilla A, Abad MA, Civeira MP, Garcia de Pesquera F, Prieto J, Lissen E. Hepatitis B virus occult infection in subjects with persistent isolated anti-HBc reactivity. *J Hepatol* 1993;17:288-93.
25. Berger A, Doerr HW, Scharer I, Weber B. Follow-up of four HIV-infected individuals after administration of hepatitis C virus and GBV-C/hepatitis G virus contaminated intravenous immunoglobulin: Evidence for HCV but not for GBV-C/HGV transmission. *J Med Virol* 1997;53:25-30.
26. Kanai K, Kako M, Okamoto H. HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. *Lancet* 1992;339:1543.
27. Chemello LA, Alberti A, Rose K, Simmonds P. Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N Engl J Med* 1994;330:143.
28. Pozzato G, Moretti M, Croce LS, Sasso F, Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K, Crovatto M, Santini G, Tiribelli C. Interferon therapy in chronic hepatitis C: evidence of different outcome with respect to different viral strains. *J Med Virol* 1995;45:445-50.
29. Berger A, v. Depka-Prondzinski M, Doerr HW, Rabenau H, Weber B. Hepatitis C plasma viral load is associated with HCV genotype but not with HIV coinfection. *J Med Virol* 1996;48:339-43.
30. Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol* 1992;14:35-40.
31. Hawkins A, Davidson F, Simmonds P. Comparison of plasma virus loads among individuals infected with hepatitis C virus (HCV) genotypes 1, 2, and 3 by Quantiplex HCV RNA assay, and in-house limiting dilution method. *J Clin Microbiol* 1997;35:187-92.
32. Poynard Th, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997;349:825-32.
33. Lin HH, Kao JH, Hsu HY, Ni YH, Yen SH, Hwang LH, Chang MH, Hwang SC, Chen PJ, Chen DS. Possible role of high-titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1994;169:638-41.
34. Wejstål R, Hermudsson S, Iwarson S, Norrköping G. Mother to infant transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1990;30:178-80.
35. Eyster ME, Fried MW, Di Besceglie AM, Goedert JJ. Increasing hepatitis C virus RNA levels in hemophiliacs: relationship to human immunodeficiency virus infection and liver disease. *Blood* 1994;84:1020-3.