

Technische Universität Berlin – Fakultät III
Institut für Biotechnologie
Fachgebiet Medizinische Biotechnologie
Gustav-Meyer-Allee 25
13355 Berlin

Bachelorarbeit

Evaluation neuer Methoden zur HIV-Inzidenztestung

Orjin Han

WS 2014/2015

Betreuer: PD Dr. Norbert Bannert
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Berlin, den 01.11.2014

Orjin Han

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	3
2 ABSTRACT	5
3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
4 EINLEITUNG	8
4.1 Das humane Immundefizienzvirus HIV	8
4.2 Vorkommen und Verbreitung von HIV	8
4.3 Verlauf der Infektion	9
4.3.1 Infektionsstadien	9
4.3.2 Antikörperreifung im Infektionsverlauf	10
4.4 HIV-Diagnostik	10
4.5 Methoden der Inzidenztestung	11
4.6 Die „Falsch-Inzidenzrate“ (FRR) und die Mittlere Dauer der Neuinfektion (MDR)	13
4.7 Ziel der Arbeit und Aufgabenstellung	15
5 MATERIAL UND METHODEN	16
5.1 Material	16
5.1.1 Reagenzien und Puffer	16
5.1.2 HIV-1/-2 ELISA-Teste	16
5.1.3 Technische Geräte	16
5.2 Vortest- und Evaluationspanel	17
5.3 Methoden	17
5.3.1 Vortestungspanel	17
5.3.2 Evaluationspanel	18
5.3.3 Probenaufbereitung und Lagerung	20
5.3.4 ELISA, ein enzym-gekoppelter Immunoassay	20
5.3.5 BED-CEIA	20
5.3.6 BioRad Aviditätstest	21
5.3.7 Verdünnung der Proben für den BioRad Aviditätstest	22
5.3.8 Berechnung der Test-Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität, und der Falsch-Inzidenzrate	22
5.3.9 Der Multiassay Algorithmus (MAA)	23
5.3.10 Berechnung der MDR	25
6 ERGEBNISSE	26

6.1 Vorbehandlung der filtergetrockneten Plasmaproben für das BioRad Aviditätstestprotokoll	26
6.2 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BED-CEIA	28
6.3 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BioRad Aviditätstests	29
6.4 Vergleich des BED-CEIA mit dem BioRad Aviditätstests für die Bestimmung inzidenter Infektionen	30
6.5 Ermittlung der Cutoffs für die Algorithmen MAA 1 und MAA 2	30
6.6 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAAs 1	33
6.7 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAAs 2	34
6.8 Vergleich von BED-CEIA, BioRad, MAA1 und MAA2 anhand des Subsets der Subtyp B- und „non-B“-Infektionen	35
6.9 Ergebnisse der Mittleren Infektionsdauer (MDR)	37
7 DISKUSSION	38
7.1 Elution und Verdünnung der DPS/DSS für den BioRad Aviditätstests	38
7.2 Bewertung der Inzidenzteste im Vergleich zum BED-CEIA	38
7.3 Cutoff-Werte der MAAs	39
7.4 Anwendung des MAAs	39
7.5 Die Mittlere Infektionsdauer (MDR)	40
7.6 Ausblick	41
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	42
9 TABELLENVERZEICHNIS	43
10 LITERATURVERZEICHNIS	44
11 DANKSAGUNG	47

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Kenntnis der HIV-Neuinfektionen und ihrem Anteil in einer Bevölkerung (HIV-Inzidenz) ist für die epidemiologische Überwachung von HIV (HIV-Surveillance) von zentraler Bedeutung. Dadurch kann die Epidemie in einer Population charakterisiert werden, indem die Trends im Infektionsgeschehen aufgezeigt und wichtige Risikogruppen identifiziert werden, um die entsprechenden Präventionsmaßnahmen vorzunehmen.

Zur Unterscheidung von kürzlich erworbenen und länger bestehenden HIV-Infektionen gibt es verschiedene Methoden. In Deutschland wird routinemäßig der serologische BED-CEIA verwendet, der jedoch relativ geringe Sensitivität (80%) und Spezifität (86%) für die Detektion rezenter Infektionen aufweist. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur HIV-Inzidenztestung nach dem Vorbild des von Brookmeyer *et al.* (2012) beschriebenen „Multiassay Algorithm“ (MAA) (2012) etabliert³⁸. Die Ergebnisse des BED-CEIA, des BioRad Aviditätstestes und die klinischen Daten des Patienten wurden für den MAA verwendet.

Material und Methoden: Zur Etablierung und Validierung wurden insgesamt 559 Proben von 449 Patienten der Serokonverter-Studie mit bekanntem Infektionszeitpunkt und bekannten HIV-1 Subtypen untersucht. Zunächst wurde das Protokoll des BioRad Aviditätstest für die Verwendung von filter-getrockneten Plasmaproben (DPS – „Dried Plasma Spots“, 50µl) anhand eines Vortestungspanels (n=117) optimiert. Dafür wurde die Probenpuffermenge zur Elution der Antikörper aus der getrockneten Filterprobe und somit die Vorverdünnung der Probe evaluiert. Daraufhin wurde die Performance von DPS in den beiden Inzidenztesten, BED-CEIA und BioRad Aviditätstest, miteinander verglichen. Schließlich wurde der MAA anhand der Ergebnisse der beiden Inzidenzteste angewendet: a) mit Einbeziehung der klinischen Patientendaten (MAA1) und b) ohne diese (MAA2). Die Assay Cutoffs für den MAA1 und MAA2 wurden so gewählt, dass die höchste Richtigkeit („accuracy“) für das Evaluationspanel erreicht wurde.

Ergebnisse: Bei einer Elution der DPS im 10-fachen Volumen des getropften Plasmas für den BioRad Aviditätstest wurde die beste Differenzierbarkeit für „inzidente“ und „prävalente“ Proben erreicht.

Anhand eines für Deutschland repräsentativen Probenpanels hinsichtlich der HIV-Subtypenverteilung (85% Subtyp B und 15% Subtyp „non-B“) konnte mit dem MAA1 eine signifikant höhere Richtigkeit (91,5%), Spezifität (95,8%) und geringere FRR (4,2%) im Vergleich zum BED-CEIA (alle $p < 0,005$) erzielt werden. Eine nahezu signifikant höhere Richtigkeit (90,9%) wurde mit dem MAA2 erreicht ($p = 0,09$). Die ermittelten Test Cutoffs für den MAA1 betragen: BED-CEIA: 1,7 ODn; BioRad Avidität: 40%; CD4 Zellzahl 50 Zellen/µl und Viruslast: 400 Kopien/ml. Für den MAA 2 betragen diese: BED-CEIA: 1,6 ODn; BioRad

Avidität: 40%. Die mittlere Infektionsdauer (MDR) betrug 59 Tage für den MAA 1 und 68 Tage für den MAA 2.

Schlussfolgerung: Die beiden MAAs, MAA1 und MAA2, konnten mit höheren Richtigkeiten als neue Methode zur HIV-Inzidenztestung etabliert werden. Die ermittelten Test Cutoffs waren vergleichbar mit denen von Brookmeyer et al. (2012)³⁸. Die MDRs waren mit 59 Tagen (MAA1) und 68 Tagen (MAA2) jedoch kürzer als die publizierten MDRs. Zur Validierung dieser Daten bedarf es einer Untersuchung einer größeren Studienpopulation.

2 Abstract

Background: Information about newly diagnosed HIV-infections and their ratio in a population (HIV-incidence) is crucial for the epidemiological surveillance. Therefore the epidemic in a population can be characterized by recognizing changes over time and identifying risk groups to conduct preventive treatments.

Different methods exist to discriminate recent from long-term HIV-infections. In Germany, the serological test BED-CEIA is used for routine, which though showed low rates in sensitivity (80%) and specificity (86%).

In this work, the “Multiassay Algorithm” (MAA) which was described by Brookmeyer *et al.* (2012) was established³⁸. Test results of the BED-CEIA, the BioRad Avidity assay and clinical dates of the patient were used for the MAA.

Material and Methods: Altogether, 559 samples of 449 patients from the Seroconverter-study with documented date of infection were examined. In the first instance, the protocol of the BioRad Avidity assay was established for dried plasma spots (DPS) in pre-test panel (n=117). Therefore we evaluated the amount of the dilution buffer for the elution of the antibodies from the dried filter samples and thus the pre-dilution of the samples. Afterwards, the performance of DPS was compared in both incidence assays, the BED-CEIA and the BioRad Avidity assay. Eventually, the MAA was applied for both incidence assays in which two different MAAs: a) including the clinical data of the patient (MAA 1) and b) without any data (MAA 2), were chosen and generated for the highest accuracy in the evaluation panel.

Results: A dilution of 1:10 for the BioRad avidity protocol, the best differentiability for “incident” and “prevalent” samples were achieved.

In respect of a test panel, which was representative for the German subtype panel (85% subtype B and 15% subtype “non-B”), we achieved significantly better results for the MAA 1 with an accuracy of 91,5%, a sensitivity of 86,2%, a specificity of 95,8% and a false-recent rate of 4,2% in comparison to the BED-CEIA ($p<0.005$) and nearly significantly higher accuracy (90,9%) for the MAA2 ($p=0.09$). The generated cutoffs for the MAA 1 are: BED-CEIA: 1.7 ODn; BioRad Avidity: 40%; CD4 cell count 50 cells/ μ l and viral load: 400 copies/ml. For the MAA 2 the cutoffs are: BED-CEIA: 1.6 ODn; BioRad Avidity: 40%.

The mean duration of recency (MDR) was estimated over 59 days for the MAA 1 and 68 days for the MAA 2.

Conclusions: Both MAAs, MAA 1 and MAA 2, have been established as a new method for HIV incidence testing with higher accuracies. The generated test cutoffs were comparable with those of Brookmeyer *et al.* (2012)³⁸. However, the MDRs were much shorter than the publicized MDRs with 59 days (MAA 1) and 68 days (MAA 2). For further validation, the examination of a broader study population is required.

3 Abkürzungsverzeichnis

Abb,	Abbildung
AI	<u>A</u> viditäts <u>i</u> ndex
AIDS	<u>A</u> cquired <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency <u>S</u> yndrome, erworbenes Immundefizienzsyndrom
ART	<u>a</u> ntiretrovirale <u>T</u> herapie
BED-CEIA	BED- <u>c</u> apture <u>e</u> nzyme <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay (BED: Subtyp B, E, D)
bidest.	Doppelt destilliert
C	<u>C</u> utoff
CDC	<u>C</u> enters for <u>D</u> isease <u>C</u> ontrol and Prevention
CRF	<u>c</u> irculating <u>r</u> ecombinant <u>f</u> orm; zirkulierende rekombinante Form
DEA	<u>D</u> iethyl <u>a</u> min
DP/SS	<u>d</u> ried <u>p</u> lasma / <u>s</u> erum <u>s</u> pot
ELISA	<u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay, Enzym-gekoppelter Immunnachweis
Env	envelope; Hüllglykoproteinkomplexe / Hüllproteine
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration
FRR	<u>F</u> alse- <u>r</u> ecent <u>r</u> ate; Falsch-Inzidenzrate
Gag	<u>g</u> roup-specific <u>a</u> ntigen
gp36	<u>G</u> lykoprotein 36
gp120	<u>G</u> lykoprotein 120
gp160	<u>G</u> lykoprotein 160
HET	<u>h</u> eterosexuelles HIV- <u>T</u> ransmissionsrisiko
HIV	<u>h</u> umanes Immundefizienz <u>v</u> irus
HRMD Assay	<u>H</u> igh- <u>R</u> esolution <u>M</u> elting <u>D</u> iversity Assay
IgG/M	<u>I</u> mmunglobulin G/M
IVD	<u>i</u> ntravenöser <u>D</u> rogengebrauch
LA _g	<u>l</u> imited <u>A</u> ntigen

MAA	<u>M</u> ulti <u>a</u> ssay <u>A</u> lgorithm
MDR	<u>M</u> ean <u>D</u> uration of <u>R</u> ecency; mittlere Infektionsdauer
MSM	<u>m</u> en having <u>s</u> ex with <u>m</u> en; Männer, die Sex mit Männern haben
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
ODn	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte, normalisiert
p24	Kapsidprotein des HIV-1
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline; Phosphat-gepufferte Saline
RKI	<u>R</u> obert <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut
SK	<u>S</u> ero <u>k</u> onverter
STAHRS	<u>S</u> erologic <u>t</u> esting <u>a</u> lgorithm for recent HIV seroconversions
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'- <u>T</u> etra <u>m</u> ethyl <u>b</u> enzidin
u.ä.	und ähnliche
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization
WP	<u>W</u> asch <u>p</u> uffer
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

4 Einleitung

4.1 Das humane Immundefizienzvirus HIV

Das humane Immundefizienzvirus HIV wurde erstmalig 1983 von Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi beschrieben¹. Es gehört zu der Familie der Retroviren (Genus der Lentiviren) und ist der Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome).

Es gibt Evidenz, dass HIV durch zoonotische Transmissionen von nicht humanen Primaten auf den Menschen übertragen wurde. Es wird unterteilt in zwei Typen: HIV-1 und HIV-2, wobei Typ 1 für 99% aller HIV-Infektionen verantwortlich ist. HIV Typ-1 wird in folgende vier Gruppen unterteilt: M, N, O und P, wobei man M wiederum in neun Subtypen (A-D, F-H; J, K) und 61 zirkulierende rekombinante Formen (engl.: „circulating recombinant form“, CRF) untergliedern kann. In Europa ist Subtyp B der hauptsächlich auftretende. Hinweise aus genetischen Stammbaumanalysen ließen darauf schließen, dass HIV-1 in mindestens drei unabhängigen Ereignissen von Schimpansen (*Pan troglodytes*) auf den Menschen übertragen wurden, während HIV-2 auf die Rauchmangaben (*Cercocebus atys*) zurückzuführen ist².

HIV ist übertragbar durch ungeschützten sexuellen Kontakt mit einem Infizierten, über Blut und Blutprodukte eines Infizierten, durch gemeinsamen Gebrauch von Spritzenutensilien unter Drogenabhängigen oder perinatal von einer HIV-positiven Mutter auf das Kind.

4.2 Vorkommen und Verbreitung von HIV

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation³⁷ (WHO) lebten im Jahre 2012 weltweit mehr als 35 Millionen Menschen mit HIV. 2,3 Millionen davon waren neu infiziert. 1,6 Millionen erlagen bisher an den Folgen ihrer Krankheit.

Subsahara-Afrika stellt mit rund 25 Millionen Infizierten die Region mit den meisten HIV-Infektionen dar, gefolgt von Süd- und Süd-Ostasien mit 3,9 Millionen, Lateinamerika mit 1,5 Millionen, Osteuropa und Zentralasien mit 1,3 Millionen, sowie Nordamerika mit 1,3 Millionen. In West- und Zentraleuropa leben mit 860.000 Erkrankungen nur ein kleiner Anteil aller Infizierten (2,4%)³⁷.

In Deutschland wurden für das Jahr 2013 insgesamt 3263 HIV-Neudiagnosen an das RKI gemeldet (Robert-Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 24, 30. Juni 2014). Im Vergleich zum Vorjahr (2976 Neudiagnosen) ist dies eine Zunahme von 10%. Betrachtet man die Transmissionsgruppen unter den Neudiagnosen, so stellen Männer, die Sex mit Männern haben (MSM), mit 57% der HIV-Neudiagnosen die größte Risikogruppe dar. Darauf

folgen Personen mit Angabe eines heterosexuellen Transmissionsrisikos (HET) mit 16% und Konsumenten intravenös verabreichter Drogen (IVD) mit 3%. Bei 23% der Neudiagnosen fehlten Angaben zum Infektionsweg.

4.3 Verlauf der Infektion

4.3.1 Infektionsstadien

HIV ist ein Virus, welches hauptsächlich die CD4-T-Lymphozyten infiziert. Die Infektion verläuft in drei Stadien:

In der ersten Phase der Krankheit (akute Phase) kommt es nach ca. 10-14 Tagen zu einem starken Anstieg der Viruslast von bis zu 1.000 Millionen Viruspartikel pro ml Plasma, während die Anzahl der CD4-T-Zellen deutlich sinkt. Gleichzeitig steigt auch die Anzahl der zytotoxischen CD8-T-Zellen. Das Krankheitsbild kann durch Symptome wie Fieber, Unwohlsein, Kopfschmerzen, Appetitverlust, Hautausschlägen u.ä. gekennzeichnet sein, jedoch weisen nur ungefähr 30% der Patienten nach ca. zehn Tagen der Infektion dieses akute retrovirale Syndrom auf. Es ähnelt einem grippalen Infekt und wird daher anfangs selten als HIV-Infektion erkannt.

Anschließend kommt es zur Serokonversion des Patienten, also zur Produktion von humoralen IgG- und IgM-Antikörpern (Ig = Immunglobulin). Durch die adaptive Immunantwort steigt die Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten wieder an. Dadurch sinkt auch die Anzahl der Viren im Blut und es kommt zu einer klinischen Latenz – eine Phase scheinbarer Ruhe – die chronische Phase der Infektion. Während der ganzen Zeit wird jedoch das Virus permanent vermehrt. Die Viruslast pendelt sich auf einen sogenannten „viralen Setpoint“ ein. Je nach Höhe des „viralen Setpoints“ ist die Dauer der Latenzzeit länger bzw. kürzer. Je höher die Viruslast ist, umso rascher fallen auch die CD4-Zellzahlen im Verlauf.

Sinkt die CD4-Zellzahl schließlich auf <200 Zellen pro μ l, fällt der Patient ins AIDS-Stadium. Es kommt zu einem starken Anstieg der Viruslast, da das Immunsystem nun nicht mehr in der Lage ist die Infektion zu kontrollieren. Durch die starke Reduzierung der CD4-Zellen sinken auch die im Blut nachweisbaren HIV-spezifischen Antikörper. AIDS-Patienten weisen u.a. Erkrankungen mit opportunistischen Erregern oder auch neurologische Symptome, wie die HIV-bedingte Enzephalopathie, auf.

Wird die Krankheit nicht behandelt, beträgt die Lebenserwartung nach Eintritt ins AIDS-Stadium weniger als zwei Jahre.

4.3.2 Antikörperreifung im Infektionsverlauf

Während der ersten zwei Jahre nach der Serokonversion kommt es im HIV-Infizierten zur Evolution und Reifung der Antikörper. Im Besonderen nehmen die HIV-spezifischen IgG Antikörper sowohl an Titer als auch an deren Bindungsstärke, der sogenannten Avidität, zu^{3, 4}. Die Avidität umfasst die Gesamtheit der Bindungskräfte von multivalenten Antikörpern zu einem Antigen mit verschiedenen Epitopen. Die Affinität hingegen umfasst lediglich die Bindungskraft einer einzigen Bindung zwischen einem Molekül des Antikörpers an eine spezifische Antigenbindungsstelle.

IgM ist die erste Klasse der Immunglobuline, welche noch vor der somatischen Hypermutation der B-Zellen gebildet wird. IgM besteht aus Makroglobulinen, die ein Pentamer bilden. An diesen Bindungsstellen des Pentamers können die multimeren Antigene interagieren. Aufgrund der frühen und somit unspezifischen Immunantwort der IgM besitzen diese Antikörper gewöhnlich eine nur geringe Affinität zum Antigen. Die geringe Affinität wird jedoch durch die Bindung des IgM-Monomers an vielen solcher Stellen ausgeglichen und führt so zu einer insgesamt höheren Avidität. Die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung ist hier also sowohl von der Affinität als auch von der Anzahl der Bindungsstellen abhängig. IgG hingegen werden durch somatische Hypermutation gebildet und erreichen eine hohe Affinität und Avidität. Die Affinitäts-/Aviditätsreifung im Verlauf einer Immunantwort kann als Selektionsprozess gesehen werden. Hierzu werden unterschiedliche B-Zell-Rezeptoren benötigt. Die B-Zellen mit Rezeptoren hoher Avidität zum Antigen werden im Gegensatz zu B-Zellen mit niedrig-aviden Rezeptoren selektiert und expandieren. Auch wird vermutet, dass die Aviditätsreifung abhängig von der Antigenkonzentration ist. Dies beruht auf der Tatsache, dass zur Stimulation von B-Zellen der Antigenkontakt sichergestellt werden muss. Dies gelingt nur dann, wenn eine hohe Avidität des Antikörpers zum Antigen vorhanden ist.

4.4 HIV-Diagnostik

In Deutschland erfolgt die HIV-Diagnose durch einen reaktiven Antikörper-Suchtest und einem positiven Immunoblot als Bestätigungstest. Zusätzlich können Antigenteste, PCR-Verfahren und Virusanzucht zum Nachweis von HIV eingesetzt werden. Es werden zwei unabhängige Proben des Patienten getestet, um mögliche Probenverwechslungen auszuschließen.

Üblicherweise wird aus dem Blut des Patienten Serum bzw. Plasma gewonnen, welches dann mithilfe eines „Enzym linked immunoabsorbent assay“ (ELISA) untersucht werden kann. Nachgewiesen werden hierbei vor allem die HIV-spezifischen Antikörper der Immunglobulinklassen A, M und G.

Mittlerweile existieren HIV-ELISA verschiedener Generationen. Hauptsächlich unterscheiden sich diese in der Antigenzusammensetzung.

Für die Teste der 1. Generation wurden lysierte und inaktivierte, partiell gereinigte Viren aus infizierten, humanen CD4⁺-T-Zelllinien verwendet. Die Teste der 2. Generation nutzten gereinigte, gentechnisch bzw. synthetisch hergestellte gag- und env-Proteine. In der 3. Generation wurden auch als Antigene synthetische Peptide des Hüll- und des Transmembran- bzw. Kernproteins verwendet. Bei der 4. Generation ist es mittlerweile möglich, gleichzeitig virusspezifische Antikörper und das HIV-p24-Antigen nachzuweisen.

Durch die Diagnostik ist es zwar möglich, die HIV-Infektion selbst anhand spezifischer Antikörper nachzuweisen. Jedoch kann man aufgrund der langen symptomfreien, chronischen Phase nicht auf den Infektionszeitpunkt schließen. Dafür bedarf es sogenannte Inzidenzteste.

4.5 Methoden der Inzidenztestung

In den letzten 15 Jahren wurden eine Vielzahl an serologischen Methoden entwickelt, um kürzlich erworbene (inzidente) von länger bestehenden HIV-1-Infektionen zu unterscheiden⁵⁻⁸.

Die meisten Inzidenzteste basieren auf a) den Anstieg der Antikörper-Titer⁹⁻¹¹, b) den Anstieg der HIV-1 spezifischen Immunglobulin G (IgG) Antikörper in Relation zum Gesamt-IgG¹², c) den Anstieg der Antikörper-Avidität^{4, 7, 17-19} oder d) einer Kombination dieser verschiedenen Marker^{4, 13-17}. Die Klassifikation in "kürzlich" erworbenen bzw. "länger" bestehenden Infektionen erfolgt schließlich anhand definierter Cut-Off-Werte der ELISA-Reaktivität.

Erstmals wurde eine Methode zur Inzidenztestung von Janssen *et al.* in 1998 beschrieben⁵. Sie modifizierten dafür einen kommerziellen HIV-1-Antikörper-Suchtest der ersten Generation (HIV-ELISA 3A11, Abbott Laboratories), in dem sie sehr starke Vorverdünnungen (1:20.000) für die Seren durchführten und die Inkubationszeiten verkürzten.

Das Prinzip ihrer Überlegung lag darin, dass innerhalb der ersten Monate der Infektion der Antikörperspiegel an HIV-spezifischen Antikörper steigt. So wurden Patienten, die seropositiv waren, im frühen Infektionsstadium mit einem niedrigen HIV-Antikörper-Titer durch die starke Verdünnung Antikörper-schwach-reaktiv im Vergleich zur unverdünnten Probe. Des Weiteren können für Patienten unter Therapie und im AIDS-Stadium falsch-inzidente Testergebnisse erhalten werden. Dieser weniger sensitive Test wird als „detuned“ bzw. als „less sensitive“ ELISA bezeichnet.

Es folgten Weiterentwicklungen, die unter dem Begriff STAHR („Serologic testing algorithm for recent HIV seroconversions“) zusammengefasst wurden.

Von Parekh *et al.*¹² wurde 2002 der BED-IgG-capture ELISA (BED-CEIA) entwickelt und kommerzialisiert. Mithilfe dieses Testes wird der Anteil an HIV-1-spezifischen IgG-Antikörpern unter den gesamten IgG-Antikörper im Serum bestimmt. Lange Zeit war der BED-CEIA der einzig kommerzielle und von der Food and Drug Administration (FDA) für epidemiologische Studien zugelassene Test für HIV-1 Inzidenz, der deshalb sowohl in Deutschland als auch weltweit zur Untersuchung genutzt wurde¹⁸⁻²². Jedoch geriet dieser Test in Kritik, nachdem viele Berichte über eine Überschätzung der Inzidenz aufgrund von Falsch-Klassifizierung von bereits „länger“ bestehenden Infektionen als „kürzlich“ erworbene veröffentlicht wurden^{30, 31}. Daraufhin erfolgten zwar Anpassungen²³⁻²⁵ an den Test durch Formeln u.ä., jedoch gaben diese Limitierungen Anlass neue Teste mit verbesserter Test-Richtigkeit zu etablieren.

Schon 2002 beschrieben dann Suligoi *et al.*³⁹ eine andere Methode zur Inzidenzbestimmung, die auf der Antikörper-Avidität beruhte. Diese Methode war bereits für viele andere Infektionskrankheiten (z.B. Hepatitis B und C, Humanes Herpes Virus etc.) bekannt und häufig angewandt worden. Auch hier wurde der kommerzielle HIV-Suchtest modifiziert, in dem die zu untersuchende Probe einmal in PBS und einmal in einem chaotropen Agens verdünnt wurde, der dazu führte, dass weniger avide Bindungen wieder gelöst werden. Aus dem Quotient der beiden Messergebnisse wird dann der Aviditätsindex (AI) errechnet. Je frischer die Infektion, desto weniger avide binden die Antikörper. Daraus resultiert für eine frisch erworbene Infektion ein kleinerer AI-Wert als für chronische Infektionen.

Da die von Suligoi *et al.*³⁹ (2002) beschriebenen Assays Automatenteste sind, ist es möglich die Messung der Proben vollautomatisch durchzuführen. Jedoch sind die Anschaffungskosten des Automaten sehr hoch, so dass dieser nicht in Laboren mit geringem Probendurchsatz in Einsatz gebracht werden konnte.

In 2010 wurde daraufhin ein Protokoll eines neuen manuellen Aviditätstests von Masciotra *et al.*²⁶ beschrieben. Dieser Test stellte eine Modifikation des BioRad HIV-1/2 Plus O Protokolls dar und wies deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Test-Richtigkeit^{27, 28} auf.

Ferner wurden in 2010 zwei weitere aviditätsbasierende Teste vorgestellt, in der die Durchführung mithilfe des Multisubtyp-rekombinanten Proteins gp41 in einem „two-well“ und einem „novel single-well“-Format erfolgte. Letzterer ist seit 2012 kommerziell erhältlich unter dem Namen: Sedia TM HIV-1 LAg Avidity EIA (LAg Avidity)^{29, 30}.

Aber auch die nachfolgenden serologischen Inzidenzteste unterlagen Limitierungen. Oft wurden Proben, die bereits „länger“ infiziert waren fälschlicherweise als nur „kurz-infiziert“ eingestuft. Wie beim BED-CEIA betraf dies Proben von Patienten, die sich im späten Infektionsstadium befanden, therapierte Patienten und Patienten, die eine Infektionen mit HIV „non-B“-Subtypen aufwiesen.

In Folge dessen wurde ein „Multiassay algorithm“ (MAA) entwickelt, bei dem die Ergebnisse der serologischen Inzidenzteste als kombinierte Biomarker angewendet werden. Erstmals wurde ein MAA von Brookmeyer *et al.* (2012) beschrieben³⁸. Brookmeyer benutzte dabei verschiedene klinische (CD4-Zellzahl, Viruslast) und serologische Marker (Ergebnisse des BED-CEIA und des BioRad Aviditätstests) einer Probe und ließ sie nacheinander bewerten. Tatsächlich erhielt man mithilfe dieses MAA nicht nur bessere Testergebnisse, sondern auch die Kosten konnten erheblich reduziert werden. Diesem Beispiel folgend gab es daraufhin weitere Modifizierungen. Es wurden verschiedene Biomarker als Kriterium verwendet: In der Publikation von Matthew M. Cousins *et al.* (2014) wurde z.B. die Methode des High-Resolution Melting Diversity Assay (HRMD) als zusätzliches Kriterium miteinbezogen³³. Auch an der Anzahl der einzubeziehenden Biomarker wurde variiert.

4.6 Die „Falsch-Inzidenzrate“ (FRR) und die Mittlere Dauer der Neuinfektion (MDR)

Als wichtige Parameter für die serologischen Inzidenzteste werden die „Falsch-Inzidenzrate“ – (engl.: „false-recent rate“; FRR) und die „mittlere Dauer der Neuinfektion“ – (engl.: „mean duration of recency“; MDR) erachtet^{8, 27, 31}.

Die „Falsch-Inzidenzrate“ beschreibt das Ausmaß, mit dem Proben aus langbestehenden Infektionen als „kürzlich erworben“ falsch klassifiziert werden und somit die Inzidenz überschätzt würde.

Ein weiteres wesentliches Kriterium zur Bewertung von Inzidenztesten ist die MDR. Sie gibt Auskunft über die durchschnittliche Dauer, in der ein Patient als „kürzlich infiziert“ gilt. Bislang wurden mehrere Methoden³² angewendet, um die MDR in Bezug auf jeweils einen Test zu bestimmen. Es gibt jedoch keine einheitliche Berechnung. Als sinnvoll wird ein Maximalwert zwischen vier bis zwölf Monaten erachtet. In dieser Arbeit wurde die Berechnung nach Brookmeyer *et al.* (2012) gewählt.

In Abb. 1 und 2 sind die Wahrscheinlichkeitsmodelle für einen Inzidenztest bzw. MAA dargestellt. Im Idealfall wäre es möglich, zu einem definierten Zeitpunkt die Infektion eines Patienten als inzident bzw. prävalent richtig zu bestimmen (Abb. 1). Solch ein Modell existiert jedoch nicht, denn die Wahrscheinlichkeit einer MAA positiven (inzidenten) Klassifikation variiert im Verlauf der Dauer der Infektion (Abb. 2). Daher wird zur Bestimmung die mittlere Dauer der Neuinfektion, also die MDR, genutzt.



Abbildung 1. Idealisiertes Wahrscheinlichkeitsmodell für einen Inzidenztest oder einen Multitassay Algorithmus (MAA). In diesem Modell würden alle Individuen, die seit weniger als 0,5 Jahren infiziert sind, als MAA positiv und alle Individuen, die mehr als 0,5 Jahren infiziert sind, als MAA negativ eingestuft werden.³³

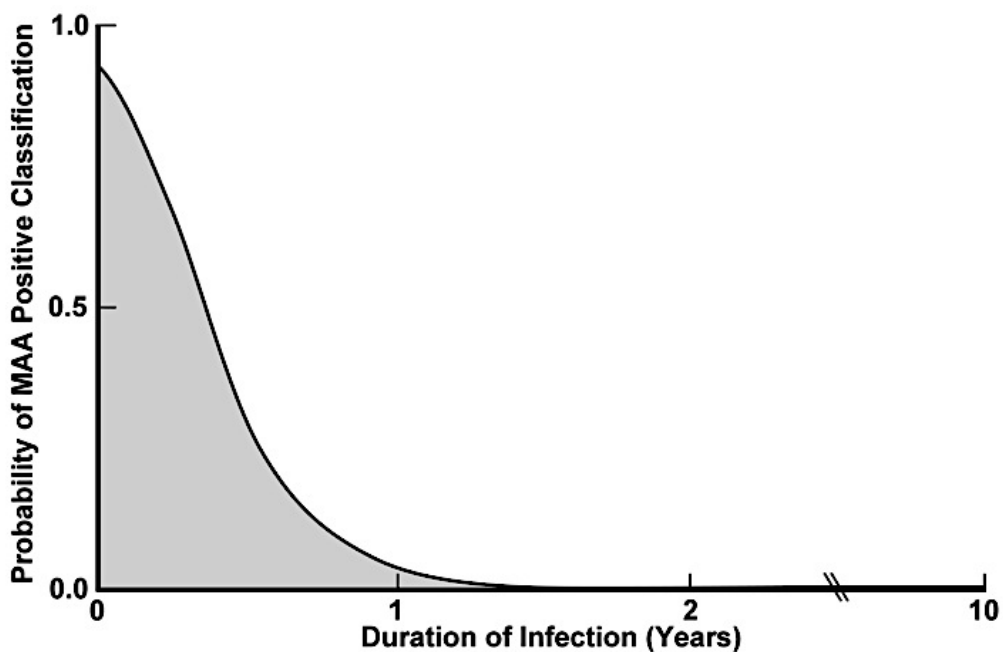


Abbildung 2. Realistisches Wahrscheinlichkeitsmodell für einen Inzidenztest bzw. einen Multiassay Algorithmus (MAA). Dieses Wahrscheinlichkeitsmodell demonstriert, dass die MAA Klassifikation mit Verlauf der Infektionsdauer abnimmt.³³

4.7 Ziel der Arbeit und Aufgabenstellung

In Deutschland erfolgt die HIV-Inzidenztestung von gemeldeten HIV-Neudiagnosen durch den serologischen Inzidenztest „BED-IgG Capture HIV-EIA“ (BED-CEIA) anhand von filtergetrockneten Serum- bzw. Plasmaproben (DSS – „dried serum spots“; DPS – „dried plasma spots“) und wird seit 2014 zur Routineuntersuchung am Robert Koch-Institut durchgeführt.

Die Erfassung der HIV-Inzidenz ist ein wichtiger Public Health Indikator, der zum allgemeinen Verständnis der Ausbreitungsdynamik der HIV-Epidemie und zur Konzeption und Ergreifung von Präventionsmaßnahmen dient. Bisher erhält das Robert Koch-Institut nur Informationen über den Zeitpunkt der Erstdiagnose. Der Infektionszeitpunkt aber jedoch ist unbekannt. Bisherige Inzidenzschätzungen beruhen auf Rückrechnungsmodellen anhand der AIDS-Fallzahlen. Diese sind durch Einführung der erfolgreichen Kombinationstherapie zunehmend ungenau.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der von Brookmeyer *et al.* (2012) beschriebene Algorithmus (MAA) zur Ermittlung neuer HIV-Infektionen unter den Neudiagnosen³⁸ etabliert werden, um die HIV-Inzidenztestung in Deutschland zu verbessern.

Dazu soll das Protokoll des BioRad Aviditätstest für die Verwendung von filtergetrockneten Plasmaproben (DPS) etabliert werden. Zunächst soll die Probenpuffermenge zur Elution der Antikörper aus der getrockneten Filterprobe und somit die entsprechende Verdünnung der Probe evaluiert werden. Daraufhin wird die Performance von DPS mit beiden Inzidenztesten, BED-CEIA und BioRad Aviditätstest, miteinander verglichen. Schließlich sollen neue Methoden zur HIV-Inzidenztestung – 2 MAAs - etabliert und evaluiert werden, mit dem Ziel für die Routine-Inzidenztestung in Deutschland höhere Richtigkeiten erreichen zu können.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Reagenzien und Puffer

Elutionspuffer	PBS „ohne“	500 ml
	0,05% Tween 20	2,5 ml
	3% FKS	15 ml
PBS „ohne“ (für 1L)	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,20 g
	Ad 1L mit acqua bidest., autoklaviert	
Diethylamin (DEA)	Sigma Aldrich, Germany	
Destilliertes acqua bidest		

5.1.2 HIV-1/-2 ELISA-Teste

BED EIA HIV-1 Incidence Test	Calypte Biomedical Corporation, USA
GS HIV-1/-2 Plus O EIA	BioRad Laboratories, USA

5.1.3 Technische Geräte

Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21 Centrifuge, Thermo Scientific, Hanau
ELISA-Reader	Thermo Scientific Multiskan Go, Thermo Scientific, Hanau
ELISA-Waschgerät	Hydro Flex, Tecan, Grödig
Inkubator	Mini THERM CTT, Sartorius Group, Göttingen
Pipettboy	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Filterkarten	Whatman 903™, GE Healthcare, Westborough

5.2 Vortest- und Evaluationspanel

Alle für die Arbeit verwendeten Proben sind Erst- bzw. Verlaufsproben von Patienten der deutschlandweiten HIV-1 Serokonverter-Studie, bei denen die Dauer der HIV-1 Infektion bis zum Blutentnahmedatum bekannt ist. Deren Infektionszeitpunkte wurden anhand folgender dokumentierter Testergebnisse im Labor festgelegt: (1) nachweisbare HIV-RNA plus einem negativen ELISA oder ein reaktiver ELISA plus einem negativen bzw. unvollständigen Immunoblot als Evidenz einer beginnenden, jedoch noch unvollständigen Serokonversion („akute Serokonversion“). Die Vollendung der Serokonversion wird schließlich während des Verlaufs innerhalb von sechs Wochen bestätigt. (2) Das letzte negative und das erste bestätigte positive dokumentierte Ergebnis eines HIV-Antikörpertests („dokumentierte Serokonversion“) ist vorhanden. Der Infektionszeitpunkt berechnet sich aus dem arithmetischen Mittel beider Testdaten. Für diese Arbeit wurden ausschließlich solche dokumentierten Serokonverter benutzt, bei denen das Zeitintervall zwischen dem letzten negativen und dem ersten positiven HIV-Antikörpertestergebnis maximal 90 Tage umfasste. Innerhalb der Serokonverter-Studie werden des Weiteren demographische Patientenangaben (Geschlecht und Alter zum Zeitpunkt der Einschreibung) und der klinische Status (CDC-Status und aktueller ART-Zustand), sowie Labordaten (HIV-Viruslast, CD4+ und CD8+ Zellzahl) der Patienten erhoben.

Longitudinale Plasmaproben und klinische Informationen werden jährlich in Follow-ups gesammelt. Eine unterschriebene Einverständniserklärung über Aufklärung und Information über die Studie wird vor Studienbeginn erhalten.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland genehmigt.

5.3 Methoden

5.3.1 Vortestungspanel

Vor der eigentlichen Inzidenz-Testung wurde ein Probenpanel zur Vortestung zusammengestellt, um für die Verwendung von DSS die Menge an Probenverdünnungspuffer (Bestandteil des Kits) zur Elution der Antikörper aus den Filtern und die damit einhergehende Probenverdünnung zu evaluieren. Dazu wurden insgesamt 72 Proben von Subtyp B-Infektionen verwendet. Es wurden 45 Proben mit „kurzer“ Infektionsdauer (zwei bis 100 Tage) und 27 Proben mit „langer“ Infektionsdauer (371 bis 3097 Tage) verwendet.

5.3.2 Evaluationspanel

Das Evaluationspanel bestand aus 559 Proben von insgesamt 440 Patienten der HIV-1 Serokonverter-Studie. Von 321 Patienten gab es nur eine Probe, von 119 Patienten gab es zwei oder mehr Proben (Follow-up-Proben). Alle Proben waren immunoblot-positiv mit bekannter Infektionsdauer zwischen null bis 5929 Tagen.

Das Evaluationspanel wurde in drei Sets unterteilt: (1) Proben aus HIV-Subtyp B Infektionen von therapie-naiven Patienten (n=436), (2) Proben aus Subtyp „non-B“-Infektionen von therapie-naiven Patienten (n=79) und (3) Proben von antiretroviral therapierten, langzeit-infizierten Patienten (Subtyp B: n=16; Subtyp „non-B“: n=1), die stellvertretend für Proben von Patienten mit geringen Antikörpertitern getestet werden sollten, da Patienten in fortgeschrittenem Stadium (AIDS) und geringen Antikörpertitern nicht im Studienkollektiv vorhanden waren.

Des Weiteren wurden die Probensets „Subtyps B“ und Subtyps „non-B“ in weitere Subsets unterteilt: in Proben mit „kurzer“ Infektionsdauer, „mittlerer“ Infektionsdauer und „langer“ Infektionsdauer. Die Proben mit „kurzer“ Infektionsdauer wurden hauptsächlich von Individuen mit akuter Serokonversion mit sehr genauem Zeitpunkt der Infektion gewählt, da bei diesen Proben der Infektionszeitpunkt am genauesten bestimmt werden kann.

In Tabelle 1 sind die Charakteristika der einzelnen Probensets aufgelistet.

Des Weiteren wurde ein Probenet zusammengestellt, welches den aktuellen Zahlen der HIV-Subtypen-Zusammensetzung in Deutschland nach Analysen der inzidenten Neudiagnosen von 2011-2013 entsprachen (persönliche Mitteilung von Andrea Hauser, Robert Koch-Institut), um der tatsächlichen Situation in Deutschland möglichst nahe zu kommen. Dieses Set bestand entsprechend aus insgesamt 515 Proben mit einem Anteil von 85% des Subtyps B und 15% aus „non-B“-Subtypen (Abb. 3).

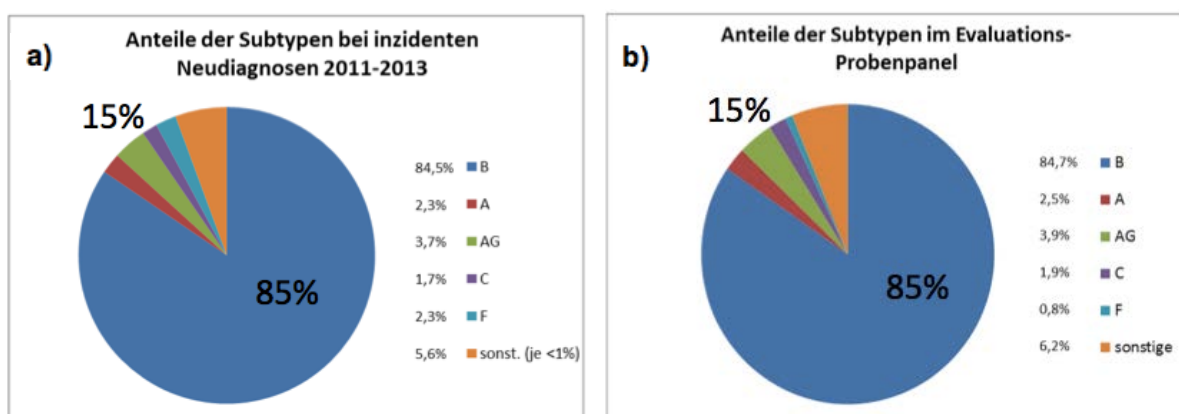


Abbildung 3. a) Anteile der Subtypen bei inzidenten Neudiagnosen und b) Anteile der Subtypen im Evaluationspanel

Tabelle 1 Charakteristika des Evaluationspanels

Charakteristika	Subtyp B-Infektionen (n=436)		Subtyp „non-B“-Infektionen (n=106)		Proben therapierter Patienten (n=17)
	Kurze Infektion (<365 Tage)	Lange Infektion (>365 Tage)	Kurze Infektion (<365 Tage)	Lange Infektion (>365 Tage)	
Probenanzahl	226	210	55	51	17
Alter [J]	33 (27-39)	33 (27-38)	31 (25-39)	33 (27-42)	35 (32-39)
Geschlecht	Männlich	209	33	30	17
	Weiblich	1	1	22	21
Kategorie der Serokonversion	Akute SK	217	36	18	17
	Dokumentierte SK	9	1	19	33
Infektionsdauer [T]	35 (15-77)	866 (554-1163)	52 (15-82)	835 (635-1262)	2272 (1407-3081)
Transmissionsgruppe	MSM	215	199	24	24
	Heterosexuell	6	5	24	21
	Sonstiges	-	4	5	6
	Unbekannt	5	2	2	-
CD 4 Zellzahl	532 (399-674)	411 (326-538)	540 (348-678)	490 (381-583)	594 (462-791)
Subtyp	B	B	A, A1, A2, C, CRF01_AE, CRF02_AG, F1, F2, G, URF	A, A1, A2, C, CRF01_AE, CRF02_AG, F1, F2, G, URF	B

J = Jahre; T = Tage; IQR = Interquartile range; SK = Serokonversion

5.3.3 Probenaufbereitung und Lagerung

Alle verwendeten Proben wurden aus der Serum- bzw. Plasmabank des HIV-Studienlabors entnommen. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -70°C.

Nach Auftauen des Probenmaterials wurden jeweils 50 bzw. 100µl Serum auf Filterkarten getropft und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden sie mit Silika-Trockenbeutel in verschließbare Plastiktüten aufbewahrt und bis zum Tag der Testung bei -20°C gelagert.

5.3.4 ELISA, ein enzym-gekoppelter Immunoassay

Die serologische Untersuchung der Proben hinsichtlich des Status in der Antikörperreifung (Titer und Bindungsstärke der HIV-spezifischen Antikörper) erfolgt mithilfe von ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay), in denen die Antigen/Antikörper-Wechselwirkung durch ein Antikörper nachgewiesen wird. Ist der konjugierte Antikörper am Enzym gebunden, so wird bei Substratumsatz durch das Enzym ein Farbumschlag sichtbar. Der Farbumschlag erfolgt nur beim gebundenen Konjugat. Das Reaktionsprodukt wird schließlich spektrometrisch vermessen, wobei sich Mengen von unter einem Nanogramm (10^{-9} g) Protein nachweisen lassen. Als Enzyme werden typischerweise Peroxidase, alkalische Phosphatase oder β -Galactosidase verwendet.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei ELISA-Varianten: die direkte und die indirekte Methode. Die indirekte Methode dient als Nachweis von Antikörper in der Probe. Im Gegensatz dazu misst die direkte Methode das Antigen.

Die in der Arbeit verwendeten ELISA gehören zu den Tests der 3. Generation.

5.3.5 BED-CEIA

Der BED-IgG-capture ELISA (BED-CEIA) ist ein Sandwich-ELISA und wurde erstmals von Parekh *et al.* im Jahre 2002 beschrieben¹². Der Test beruht auf dem Prinzip, dass mit zunehmender Infektionsdauer der Titer an HIV-1 spezifischen IgG-Antikörper im Blut zunimmt. Gemessen wird hier der Anteil an HIV-1 spezifischen anti-gp-41-IgG- unter den gesamten IgG-Antikörpern im Serum.

Als erster Schritt der Durchführung wird das verdünnte DSS-Eluat (1:101) auf die Platte gegeben. Die Platte ist dabei mit Ziegen-Anti-Human-IgG-Fangantikörper beschichtet, die die IgG-Antikörper der Probe binden. Daraufhin werden mithilfe eines spezifischen Peptides, welches die Sequenz der immundominanten Region des gp41 der HIV-Subtypen B, D und CRF01_AE trägt, die HIV-spezifischen anti-gp41-IgG Antikörper detektiert. Zur Auswertung wird dann die Kalibrator-normalisierte optische Dichte (OD_n) berechnet. Die Cutoffs für frisch

erworbene HIV-Infektionen betragen: ODN 0,8 und 140 Tage (Loschen *et al.*, 2008)²². Alle Proben wurden doppelt bestimmt.

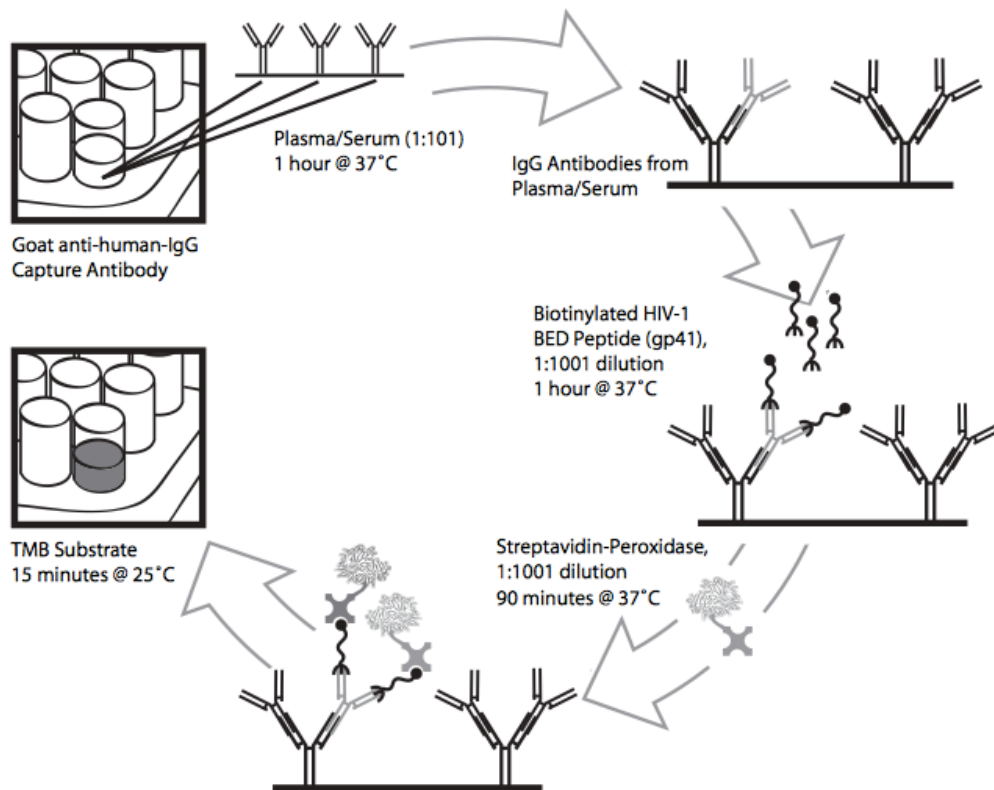


Abbildung 4. Schema des AWARE™ CED™ CEIA (Calypte). Die Abbildung wurde dem Kitprotokoll entnommen. TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; BED-CEIA= BED-IgG-capture ELISA

5.3.6 BioRad Aviditätstest

Der BioRad Aviditätstest beruht auf Messung der Antikörper-Bindungsstärke (Avidität). Das Prinzip besteht darin, dass die Bindungsstärke der HIV-spezifischen Antikörper an die spezifischen Fangantigene des Testkits (IgM, gp120, gp160) in Gegenwart und Abwesenheit eines schwach denaturierenden Agens gemessen wird.

Entsprechend des vom CDC bereit gestellten Protokoll²⁶ (Masciotra *et al.*, 2010) wird der kommerzielle BioRad GS HIV-1/-2 Plus O EIA in den ersten Schritten des Kit-Protokolls folgendermaßen modifiziert: die Serum-Probe wird zunächst im Probenpuffer 1:10 verdünnt und daraufhin in einem „two-well“-Test Format getestet. Nach Inkubation der Probe mit den gebundenen Fangantigenen aus der Plattenbeschichtung, wird in einem „well“ der Waschpuffer, in dem anderen ein chaotropes Agens hinzugefügt. Als denaturierendes, chaotropes Reagenz wurde Diethylamin (DEA) verwendet.

Nur die Antigen-Antikörper-Komplexe niedrig avider Antikörper werden in Gegenwart von DEA dissoziiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe hoch avider Antikörper bleiben im

Gegensatz dazu stabil. Aus den ELISA-Messdaten lässt sich schließlich der Aviditätsindex (AI) berechnen:

$$\text{AI (\%)} = \frac{\text{Cutoff} - \text{OD mit denaturierendem Agenz}}{\text{Cutoff} - \text{OD ohne denaturierendem Agenz}} \times 100$$

Der Cutoff für inzidente Proben liegt bei einem Aviditätsindex von 30% und 220 Tage für Subtyp B bzw. 209 Tage für Subtyp „non-B“ (persönliche Mitteilung von Silvina Masciotra, Division of HIV/AIDS prevention, CDC). Alle Proben wurden einfach getestet, wobei jene wiederholt wurden, deren AI zwischen 20 und 40% lag.

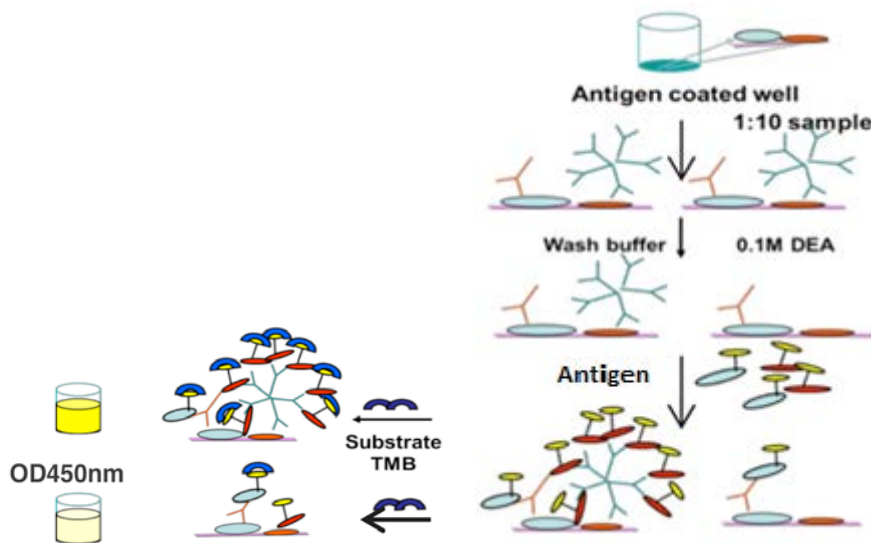


Abbildung 5. Schema des BioRad Aviditätstests nach Masciotra et al. (2010)²⁶. DEA = Diethylamin

5.3.7 Verdünnung der Proben für den BioRad Aviditätstest

Zur Anpassung des BioRad Aviditätstestprotokolls für DSS wurden die 50µl getropften DSS in unterschiedlichen Elutionsvolumina und somit in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet. Das geringste Elutionsvolumen war in 500µl Kit-Probenpuffer, welches einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Daraus wurden weitere Verdünnungen in Kit-Probenpuffer hergestellt, welche waren: 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000. Als Testseren dienten HIV-1 positive Patientenproben von Subtyp B mit dokumentiertem Zeitraum der Serokonversion aus der HIV-1 Serokonverter-Kohorte (siehe Vortestungspanel).

5.3.8 Berechnung der Test-Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität, und der Falsch-Inzidenzrate

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand folgender Kriterien: der Richtigkeit („accuracy“), der Sensitivität, der Spezifität, und der FRR. Die Sensitivität gibt an, wie viele

Proben unter den wahren inzidenten Proben tatsächlich inzident gemessen wurden. Die Testspezifität macht analog eine Aussage über die Anzahl der prävalent gemessenen Proben unter den wahr-prävalenten Proben. Die Falsch-Inzidenzrate beschreibt den Anteil der falsch-inzident gemessenen Proben unter den wahr-prävalenten Proben. Schließlich gibt die Richtigkeit an, zu wie viele Proben insgesamt richtig gemessen wurden.

$$\text{Testsensitivität (\%)} = \frac{\text{richtig inzident gemessene Proben}}{\text{wahr inzidente Proben}} \times 100$$

$$\text{Testspezifität (\%)} = \frac{\text{richtig prävalent gemessene Proben}}{\text{wahr prävalente Proben}} \times 100$$

$$\text{FRR (\%)} = \frac{\text{falsch inzident gemessene Proben}}{\text{wahr prävalenten Proben}} \times 100$$

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig inzidenter Proben} + \text{Anzahl richtig prävalenter Proben}}{\text{Anz. richtig inz. Proben} + \text{falsch inz.} + \text{richtig prä.} + \text{falsch prä.}} \times 100$$

5.3.9 Der Multiassay Algorithmus (MAA)

Brookmeyer *et al.* (2012) beschrieb erstmals die Anwendung eines Multiassay Algorithmus (MAA) zur Klassifizierung von Proben mit kürzlich erworbener bzw. länger bestehender Infektion³⁸ (s. Abb. 6). Dazu werden die Messwerte verschiedener Biomarker nacheinander unter Verwendung eines jeweiligen Cutoffs (C) angewendet, um die Proben als entweder inzident (Y=1) oder prävalent (Y=0) zu klassifizieren.

Zur Evaluierung eines MAAs für Deutschland wurde ein eigener Algorithmus (Inhouse) nach dem Prinzip von Brookmeyer *et al.* (2012) entworfen³⁸. Als Grundlage dienten sowohl ein MAA, der Ergebnisse aus BED-CEIA, BioRad Avidität, Viruslast und CD4 Zellzahl einbezieht (MAA1) als auch ein MAA ohne CD4 Zellzahl und ohne Viruslast (MAA2). Die Proben wurden als inzident eingestuft, wenn folgende Kriterien erfüllt wurden: $\text{BED} < C_B$, $\text{BioRad Aviditätstest} < C_A$, $\text{HIV-Viruslast} > C_{VL}$ und die $\text{CD4 Zellzahl} > C_{CD4}$, wobei C_B , C_A , C_{VL} und C_{CD4} die Test-Cutoffs darstellen.

Insgesamt wurden rund 352.800 Wertekombinationen mit folgenden unterschiedlichen Cutoffs generiert: 14 BED Cutoffs (C_B) – 0,6 / 0,7 / 0,8 / ... / 1,8 normalisierte ODn; sieben Avidität Cutoffs (C_A) – 30%, 40%, ..., 90%; vier CD4 Zellzahl Cutoffs (C_{CD4}) – 50, 100, 150, 200 Zellen/ μl und fünf Viruslast Cutoffs (C_{VL}) – 200, 400, ..., 10.000 Kopien/ml.

Um Y für alle Proben zu erhalten, wurden alle Wertekombinationen für jede Probe angewandt.

Zur Entwicklung des optimierten Algorithmus wurde ein selbst programmiertes Macro (erstellt von Steve Norley, Robert Koch-Institut) in Excel 2010 (Microsoft, USA) verwendet.

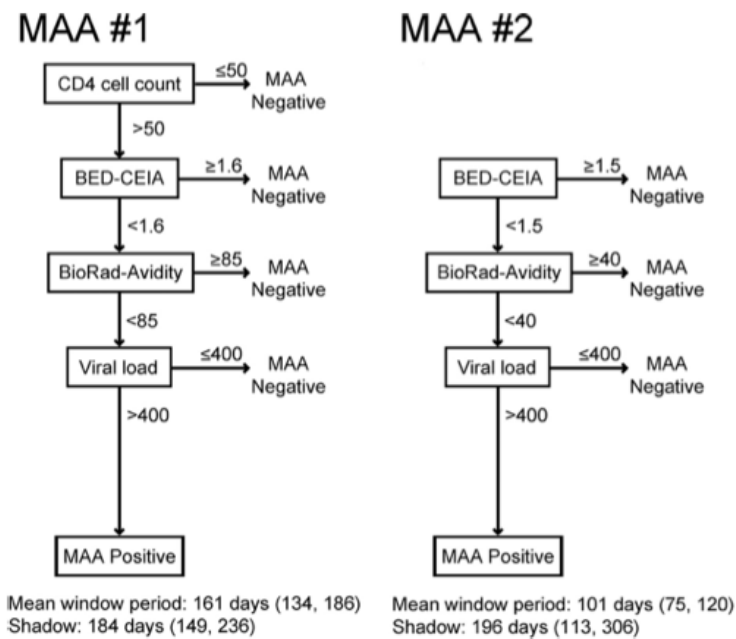


Abbildung 6. Schema des MAA nach Brookmeyer et al. 2012 mit den Biomarkern und u.a. der CD4-Zellzahl (MAA #1) und ohne CD4-Zellzahl (MAA #2)

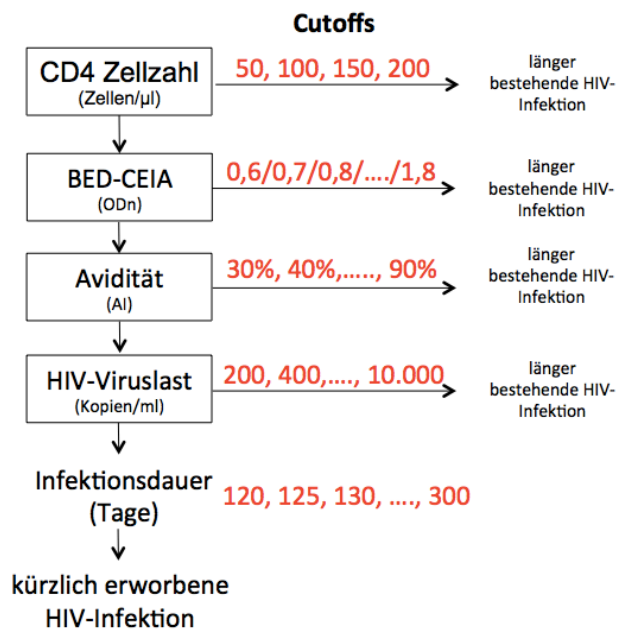


Abbildung 7. MAA nach Inhouse-Methode mit den verschiedenen Cutoffs

5.3.10 Berechnung der MDR

Zur Berechnung der MDR angelehnt an Brookmeyer *et al.*³⁸ (2012) wurde zunächst der Anteil der „inzident getesteten“ Proben pro Zeitintervall (1-3 Monate, 3-6 Monate, 6-12 Monate, 1-2 Jahre, 2-3 Jahre, 3-4Jahre, <4 Jahre Infektionsdauer) in Prozent berechnet. Aus dem Integral der Trendlinie (Polynom 3. Grades) ließ sich letztendlich die gesuchte MDR zu ermitteln.

6 ERGEBNISSE

6.1 Vorbehandlung der filtergetrockneten Plasmaproben für das BioRad

Aviditätstestprotokoll

Zur Evaluation der Vorbehandlung, d.h. Elution und Verdünnung der Antikörper aus filtergetrockneten Plasmaproben, wurden 45 DPS-Proben mit „kurzer“ Infektionsdauer (<100 Tage) und 27 Proben mit „langer“ Infektionsdauer (>365 Tage) in fünf unterschiedlichen Verdünnungsstufen getestet: 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000.

Bei kurzer Infektionsdauer nahm der OD-Wert der DEA-unbehandelten Proben mit zunehmender Verdünnung ab und näherte sich somit den in allen Verdünnungsstufen geringen OD-Werten der DEA-behandelten Proben an (Abb. 8).

Bei langer Infektionsdauer nahm der OD-Wert bei DEA-behandelten Proben mit zunehmender Verdünnung leicht ab und wich somit von den in allen Verdünnungsstufen gleich hohen OD-Werten der DEA-unbehandelten Proben ab (Abb. 9).

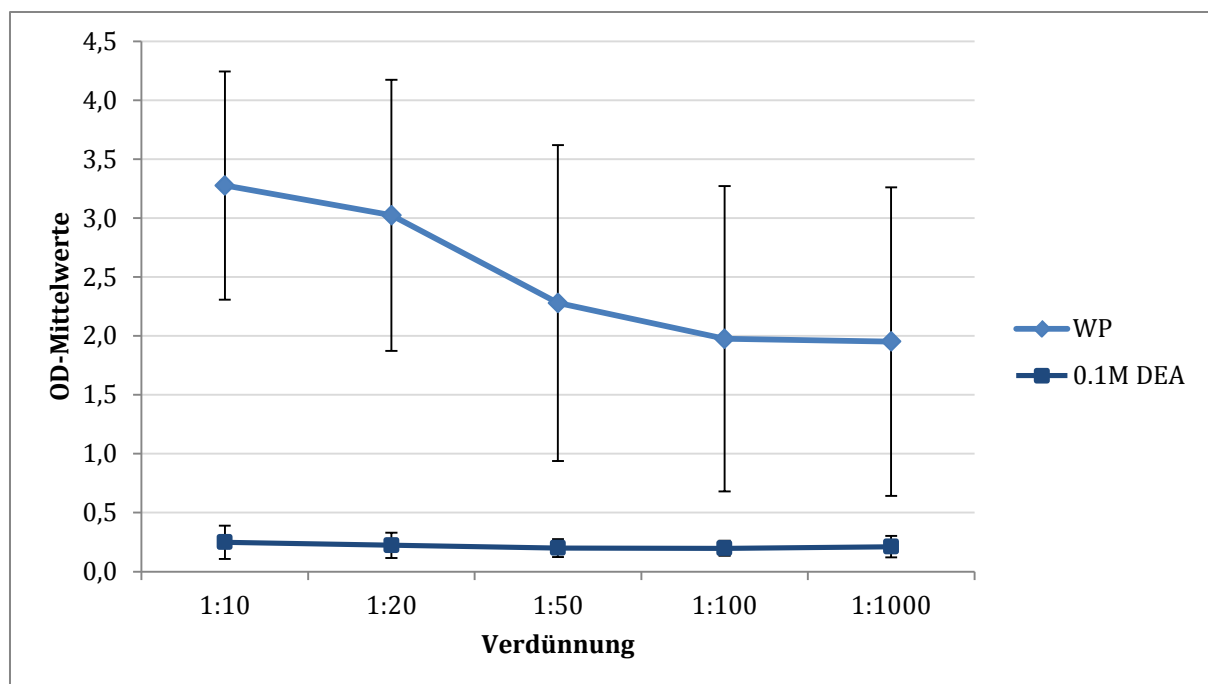


Abbildung 8. OD-Mittelwerte aus Waschpuffer (WP) bzw. DEA-Ansätzen pro Verdünnungsstufe für Proben mit kurzer Infektionsdauer

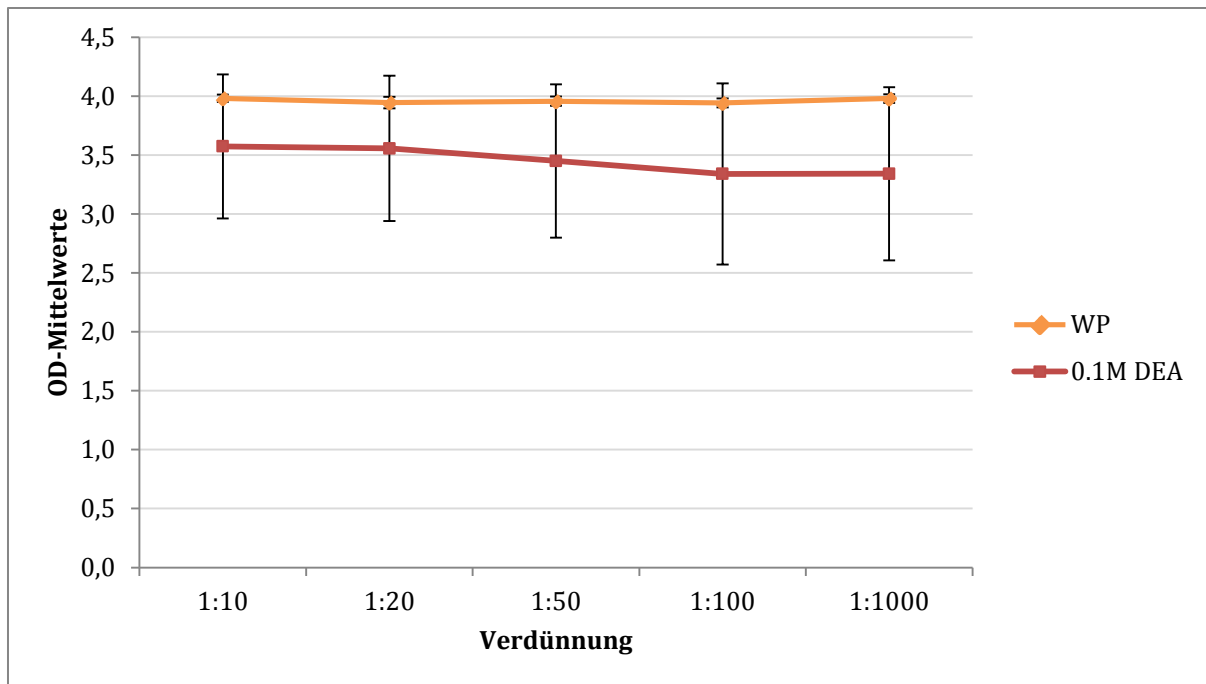


Abbildung 9. OD-Mittelwerte aus Waschpuffer (WP) bzw. DEA-Ansätzen pro Verdünnungsstufe für Proben mit langer Infektionsdauer

Für prävalente Proben resultieren geringe Verdünnungen (1:10, 1:20) in hohen AI-Werten (Abb. 10); Mit steigender Verdünnung (1:50, 1:100, 1:1000) nehmen die AI-Werte ab. der größte AI-Wert mit 89,92% ist bei einer Verdünnung von 1:10 zu erkennen. Analog dazu steigt der AI-Wert bei den inzidenten Proben mit zunehmender Verdünnung. Hier ist der geringste AI-Wert von 8,37% bei einer Verdünnung von 1:10 zu beobachten (Abb. 10).

Da geringe AI-Werte für inzidente Proben, hohe AI-Werte für prävalente Proben die bestmögliche Unterscheidung zwischen inzidenten und prävalenten Proben ermöglichen, wurde eine Verdünnung von 1:10 für den BioRad Aviditätstest gewählt.

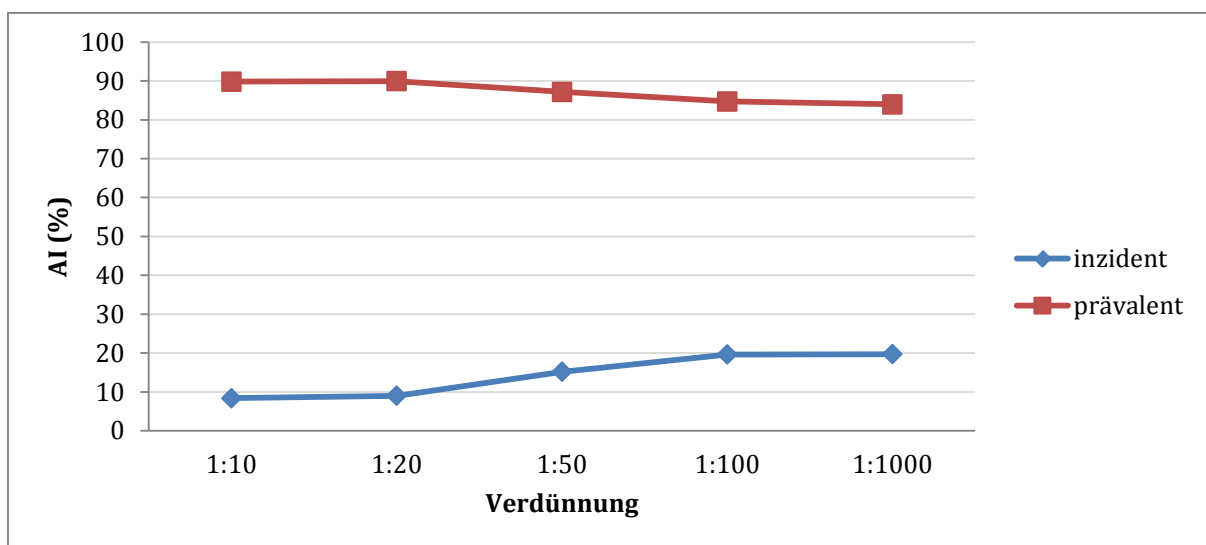


Abbildung 10. Aviditätsindex der unterschiedlichen Verdünnungen für inzidente und prävalente Proben

6.2 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BED-CEIA

Die Ergebnisse aus der richtigen und falschen Klassifizierung des BED-CEIA (Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität, FRR) für die Sets der Subtyp B-Infektionen, „non-B“-Infektionen, der therapierten Patienten und dem Subset der B- und „non-B“-Infektionen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Im Set der Subtyp B-Infektionen erreichte der BED-CEIA, wie erwartet, eine höhere Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und die niedrigste FRR als im Set der „non-B“-Infektionen. Für therapierte Patienten lieferte der BED-CEIA Ergebnisse mit der geringsten Richtigkeit, Spezifität und der höchsten FRR.

Tabelle 2 Ergebnisse des BED-CEIAs in den verschiedenen Sets „Subtyp B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“

	Subtyp B (n=436)	Subtyp „non-B“ (n=106)	Therapierte (n=17)	Subtyp B und „non-B“ (n=515)
Richtig klassifiziert (Richtigkeit)	391/436 (89,7%)	73/106 (68,9%)	11/17 (64,7%)	450/17 (35,3%)
Richtig inzident klassifiziert (Sensitivität)	163/188 (86,7%)	31/46 (67,4%)	-	189/225 (82,9%)
Richtig prävalent klassifiziert (Spezifität)	228/248 (91,9%)	742/60 (70%)	11/17 (64,7%)	261/290 (87,7%)
Falsch inzident klassifiziert (FRR)	20/248 (8,1%)	18/60 (30%)	6/17 (35,3%)	29/290 (12,3%)

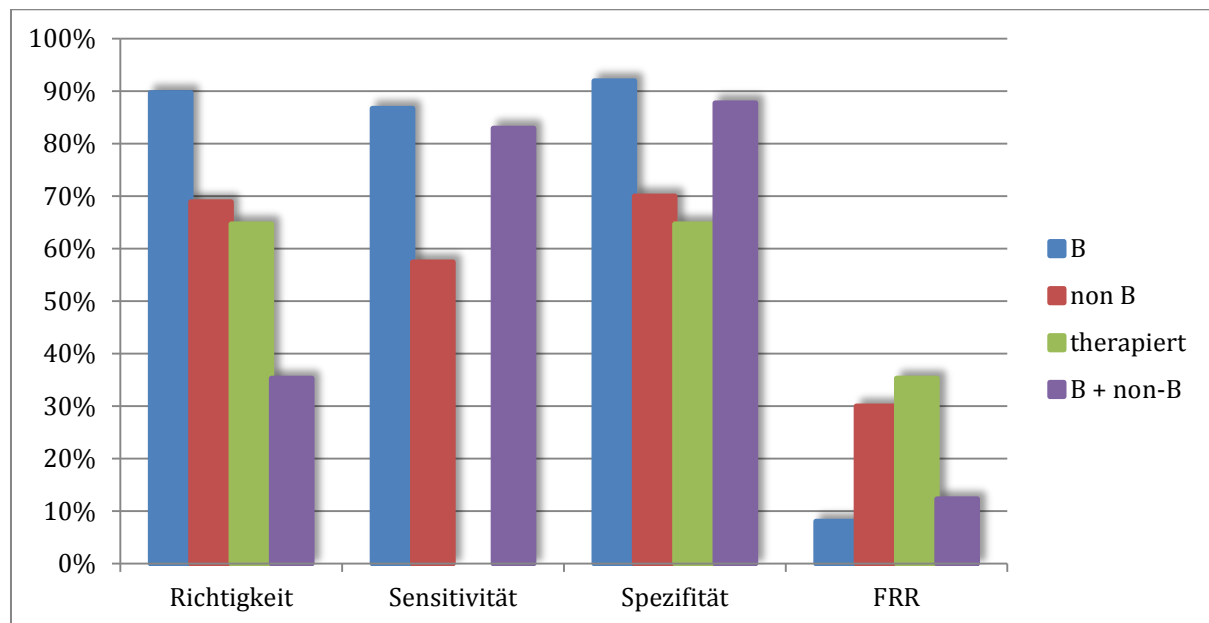


Abbildung 11. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BED-CEIAs für die Bestimmung inzidenter Infektionen.

6.3 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BioRad Aviditätstests

Die Richtig- und Falschklassifizierungen des BioRad Aviditätstests sind in Tabelle 3 und Abb. 12 gezeigt. Der Aviditätstest erreichte die höchste Sensitivität, Spezifität und Richtigkeit im Set der Subtyp B-Infektion; am geringsten waren diese im Set der Subtyp „non-B“-Infektionen. Die höchste FRR wurde im Set der Subtyp „non-B“-Infektionen beobachtet gefolgt vom Set der Therapierten. Die niedrigste, beste FRR lag im Set der Subtyp B-Infektionen.

Tabelle 3 Ergebnisse des BioRad Aviditätstests in den verschiedenen Sets „Subtypen B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“

	Subtyp B (n=436)	Subtyp „non-B“ (n=106)	Therapierte (n=17)	Subtyp B und „non-B“ (n=515)
Richtig klassifiziert (Richtigkeit)	400/436 (91,7%)	83/106 (78,3%)	15/17 (88,2%)	465/515 (90,3%)
Richtig inzident klassifiziert (Sensitivität)	180/203 (88,7%)	36/51 (70,6%)	-	211/244 (86,5%)
Richtig prävalent klassifiziert (Spezifität)	220/233 (94,4%)	47/55 (85,5%)	15/17 (88,2%)	254/271 (93,7%)
Falsch inzident klassifiziert (FRR)	13/233 (5,6%)	8/55 (14,5%)	2/17 (11,8%)	17/271 (6,3%)

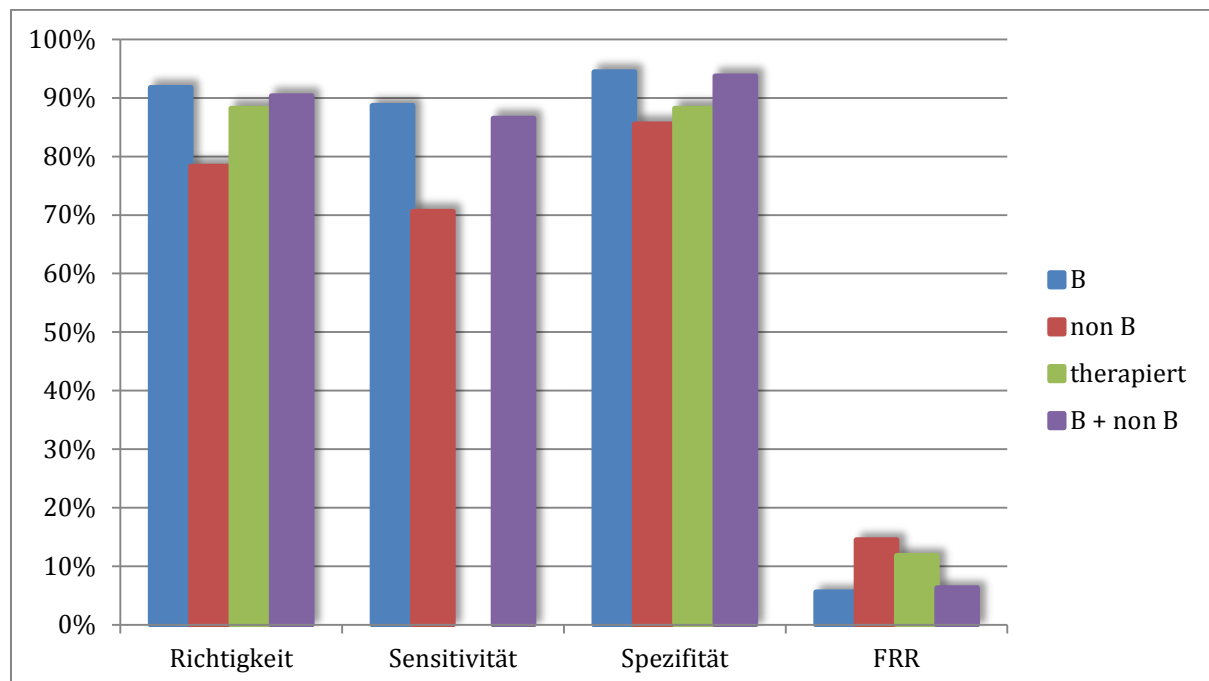


Abbildung 12. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BioRad Aviditätstests für die Bestimmung inzidenter Infektionen.

6.4 Vergleich des BED-CEIA mit dem BioRad Aviditätstests für die Bestimmung inzidenter Infektionen

Die Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR für die Sets der Subtyp B-Infektionen, „non-B“-Infektionen, der therapierten Patienten und dem Subset der B- und „non-B“-Infektionen des BED-CEIAs wurden mit dem des BioRad Aviditätstests verglichen (Tabelle 4). Der BioRad Aviditätstest erreichte in allen Sets und Subsets eine höhere Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und eine geringere FRR. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (alle p -Werte $>0,05$).

Insbesondere in den Sets der „non-B“-Infektionen und der Therapierten waren die FRRs im BioRad Aviditätstest nur halb so hoch wie mit dem BED-CEIA.

Tabelle 4 Testergebnisse des BED-CEIA und des BioRad Aviditätstests im Vergleich

		BED-CEIA	BioRad	p -Werte
Subtyp B (n=436)	Richtigkeit	391/436 (89,7%)	400/436 (91,7%)	0,35
	Sensitivität	163/188 (86,7%)	180/203 (88,7%)	0,64
	Spezifität	228/248 (91,9%)	220/233 (94,4%)	0,36
	FRR	20/248 (8,1%)	13/233 (5,6%)	0,36
Subtyp „non-B“ (n=106)	Richtigkeit	73/106 (68,9%)	83/106 (78,3%)	0,33
	Sensitivität	31/46 (67,4%)	36/51 (70,6%)	0,61
	Spezifität	742/60 (70%)	47/55 (85,5%)	0,23
	FRR	18/60 (30%)	8/55 (14,5%)	0,23
Therapierte (n=17)	Richtigkeit	11/17 (64,7%)	15/17 (88,2%)	0,22
	Sensitivität	-	-	-
	Spezifität	11/17 (64,7%)	15/17 (88,2%)	0,22
	FRR	6/17 (35,3%)	2/17 (11,8%)	0,22

6.5 Ermittlung der Cutoffs für die Algorithmen MAA 1 und MAA 2

Mithilfe eines programmierten Macros in Excel wurden die Cutoffs für den MAA 1 und MAA 2 innerhalb der einzelnen Subsets festgelegt. Die Cutoffs des MAA 1 und MAA 2 wurden für die höchste Richtigkeit in den jeweiligen Probensets optimiert.

Die Cutoffs bei höchst möglicher Richtigkeit für den MAA 1 und 2 im Set der „B Subtypen“, der „non-B“-Subtypen, der „therapieren“ und im Subset aus B und „non-B“-Subtypen sind in Tabelle 5 und 6 und in Abb. 13 dargestellt.

Die zeitlichen Cutoffs liegen für die Subtyp B-Infektionen, die therapierten Patienten und für das zusammengesetzte Subset der Subtyp B- und „non-B“-Infektionen bei beiden MAAs bei

165 Tagen-Infektionsdauer. Für das Set der Subtyp „non-B“-Infektionen liegt der zeitliche Cutoff beim MAA 1 bei 120 Tagen, beim MAA 2 bei 150 Tagen, wobei zu beachten ist, dass sich auch die anderen Cutoffs in den jeweiligen Sets leicht unterscheiden, so dass die Zeit-Cutoffs nicht direkt miteinander verglichen werden können.

Tabelle 5 Cutoff-Werte des MAA 1

Set	Subtyp B (t=165 Tage)	Subtyp „non-B“ (t=120 Tage)	Therapierte Patienten (t=165 Tage)	Subtyp B und „non-B“ (t=165 Tage)
CD4 Zellzahl [Zellen/µl]	< 50	< 50	< 50	< 50
BED-CEIA [ODn]	> 1,7	> 1,7	> 1,6	> 1,7
Avidität [%]	> 60	> 40	> 40	> 40
Viruslast [Kopien/ml]	> 600	> 400	> 600	> 600

Tabelle 6 Cutoff-Werte des MAA 2

Set	Subtyp B (t=165 Tage)	Subtyp „non-B“ (t=150 Tage)	Therapierte Patienten (t=165 Tage)	Subtyp B und „non-B“ (t=165 Tage)
BED-CEIA [ODn]	> 1,7	> 1,7	> 1,6	> 1,6
Avidität [%]	> 60	> 40	> 40	> 40

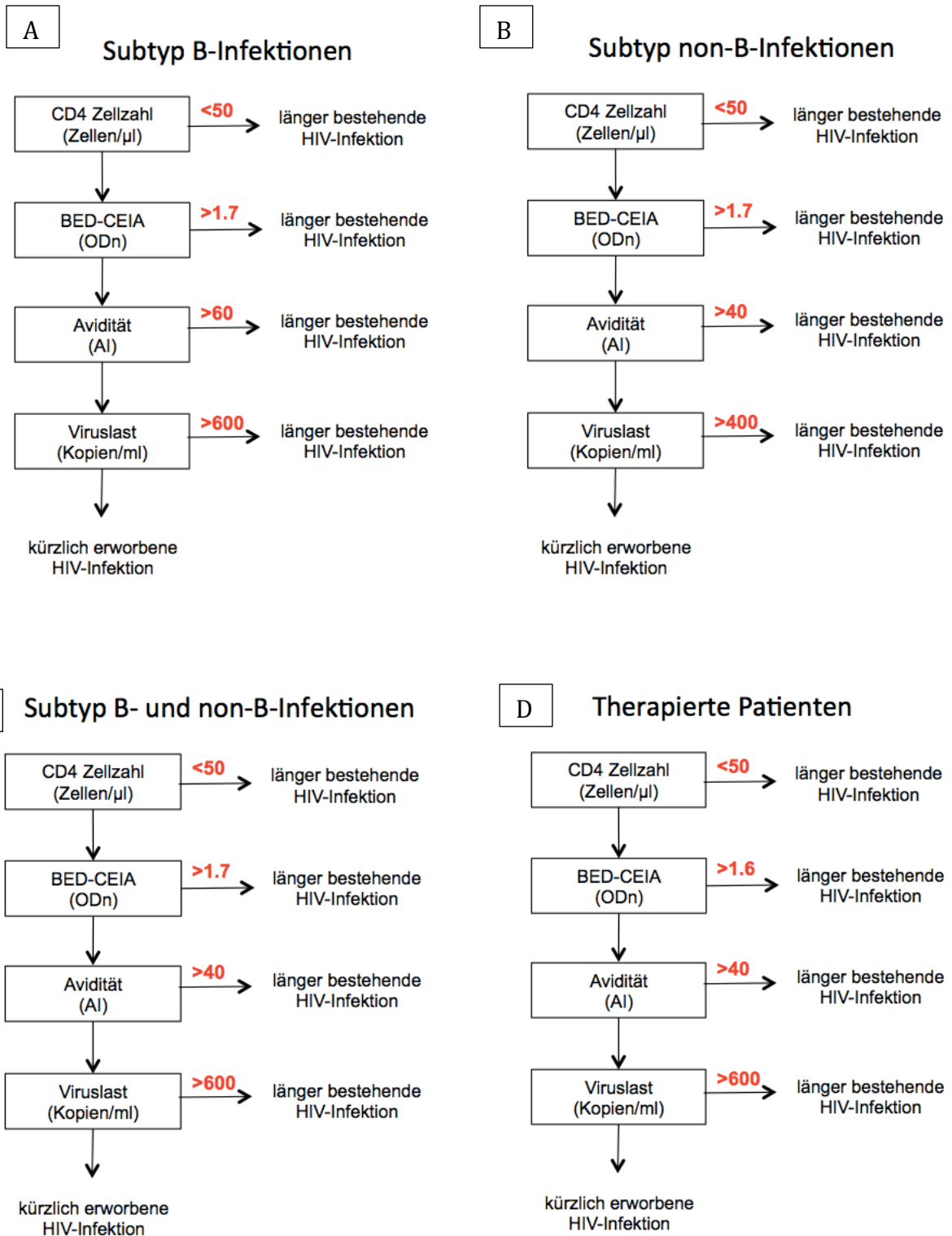


Abbildung 13. . Ergebnisse der Cutoff-Werte des MAA 1 in den verschiedenen Sets (A) „Subtypen B-Infektionen“, (B) Subtyp „non-B“-Infektionen, (C) Subtyp B- und „non-B“-Infektionen, und (D) therapierte Patienten für die jeweiligen Biomarker CD4 Zellzahl, BED-CEIA, Avidität und Viruslast.

6.6 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAAs 1

Mit den oben genannten Cutoffs wurden die Proben nacheinander anhand der Biomarker klassifiziert. Im Set der „non-B“-Subtypen wurde eine geringere Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität erreicht als im Set der „B Subtypen“. Das Set der „Therapierten“ wurde mit einer Richtigkeit von 100% und einer FRR von 0% klassifiziert (Tab.7, Abb. 14).

Tabelle 7 Ergebnisse des MAAs 1 in den verschiedenen Sets „Subtypen B“, „non-B“-Subtypen und „therapierte Patienten“

	Subtyp B (n=436)	Subtyp „non-B“ (n=106)	Therapierte (n=17)	Subtyp B und „non-B“ (n=515)
Richtig klassifiziert (Richtigkeit)	410/436 (94%)	85/106 (80,2%)	17/17 (100%)	471/515 (91,5%)
Richtig inzident klassifiziert (Sensitivität)	176/192 (91,7%)	29/46 (63,0%)	-	200/232 (86,25%)
Richtig prävalent klassifiziert (Spezifität)	234/244 (95,9%)	56/60 (93,0%)	17/17 (100%)	271/283 (95,8%)
Falsch inzident klassifiziert (FRR)	10/244 (4,1%)	4/60 (6,6%)	0/17 (0%)	12/283 (4,2%)

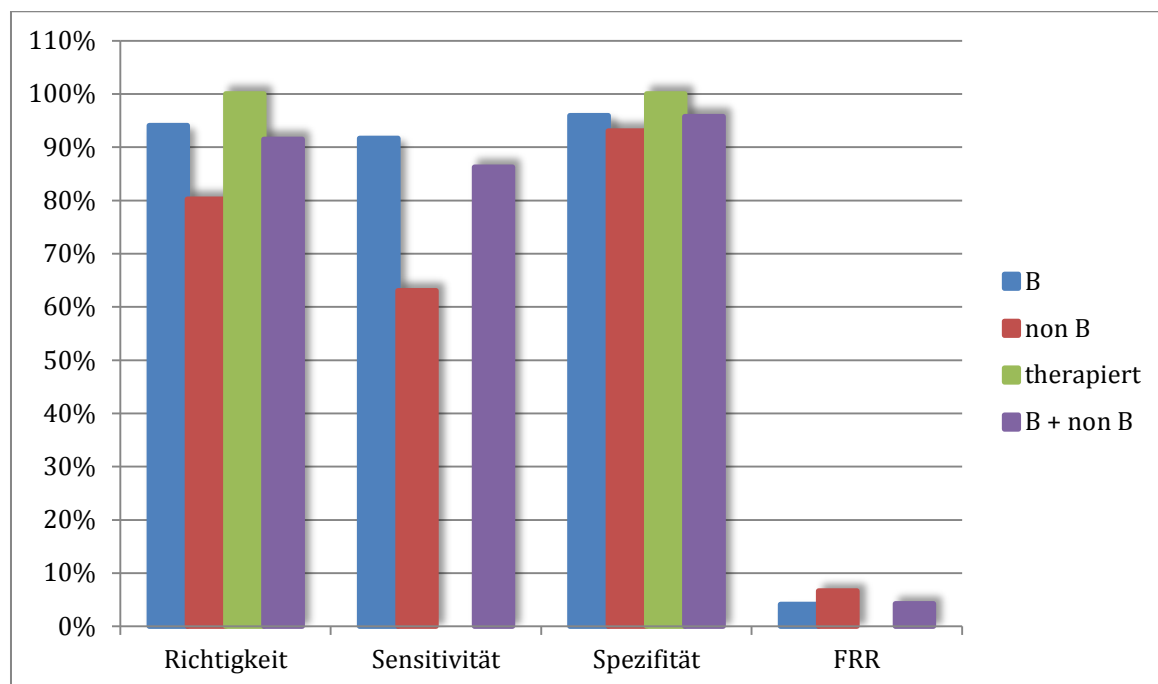


Abbildung 14. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAA 1

6.7 Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAAs 2

Im Set der „non-B“-Subtypen wurden geringere Werte für die Richtigkeit, Sensitivität und Spezifität erreicht als im Set der B Subtypen. Das Set der „therapierten Patienten“ wurde mit einer Richtigkeit von 100% und einer FRR von 0% klassifiziert.

Tabelle 8 Ergebnisse des MAAs 2 in den verschiedenen Sets „Subtypen B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“

	Subtyp B (n=436)	Subtyp „non-B“ (n=106)	Therapierte (n=17)	Subtyp B und „non-B“ (n=515)
Richtig klassifiziert (Richtigkeit)	406/436 (93,1%)	86/106 (81,1%)	17/17 (100%)	468/515 (90,9%)
Richtig inzident klassifiziert (Sensitivität)	177/192 (92,2%)	32/48 (66,7%)	-	203/232 (87,5%)
Richtig prävalent klassifiziert (Spezifität)	229/244 (93,9%)	54/58 (93,1%)	17/17 (100%)	265/283 (93,6%)
Falsch inzident klassifiziert (FRR)	15/244 (6,1%)	4/58 (6,9%)	0/17 (0%)	18/283 (6,4%)

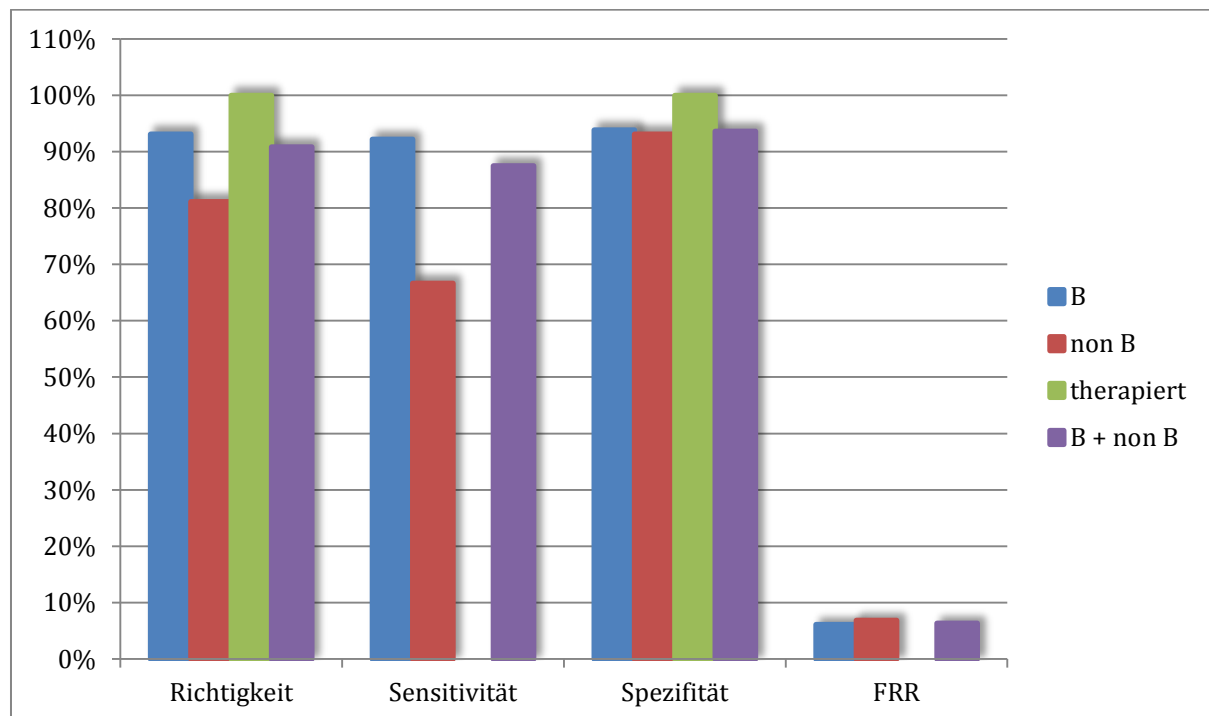


Abbildung 15. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAA 2

6.8 Vergleich von BED-CEIA, BioRad, MAA1 und MAA2 anhand des Subsets der Subtyp B- und „non-B“-Infektionen

Da diese Arbeit für die Inzidenzbestimmung in Deutschland etabliert werden sollte (s. S. 19 ff.), wird für den nachfolgenden Methodenvergleich nur noch das Subset der Subtyp B- und „non-B“-Infektionen betrachtet, welches der aktuellen Subtypenverteilung in Deutschland entspricht.

In Abb. 16 sind zunächst die verschiedenen Cutoff-Werte beider MAAs illustriert. Die höchste Richtigkeit für den MAA 1 erhielt man mit folgenden Cutoffs: $C_{CD4} = 50$ Zellen/ μ l, $C_B = 1,7$, $C_A = 40\%$ und $C_{VL} = 600$ Kopien/ml. Für den MAA 2 waren die Cutoffs: $C_B = 1,6$, $C_A = 40\%$.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der verschiedenen Testmethoden für das Subset gegenübergestellt.

Signifikante Verbesserungen (höhere Richtigkeit und Spezifität und niedrigere FRR) gegenüber dem BED-CEIA wurden mit dem MAA 1 erzielt. Auch der MAA 2 tendiert zu einer signifikanten Verbesserung der Richtigkeit mit einem p -Wert von 0,09 (Abb. 17).

Als signifikant wurden nur p -Werte kleiner 0,05 betrachtet.

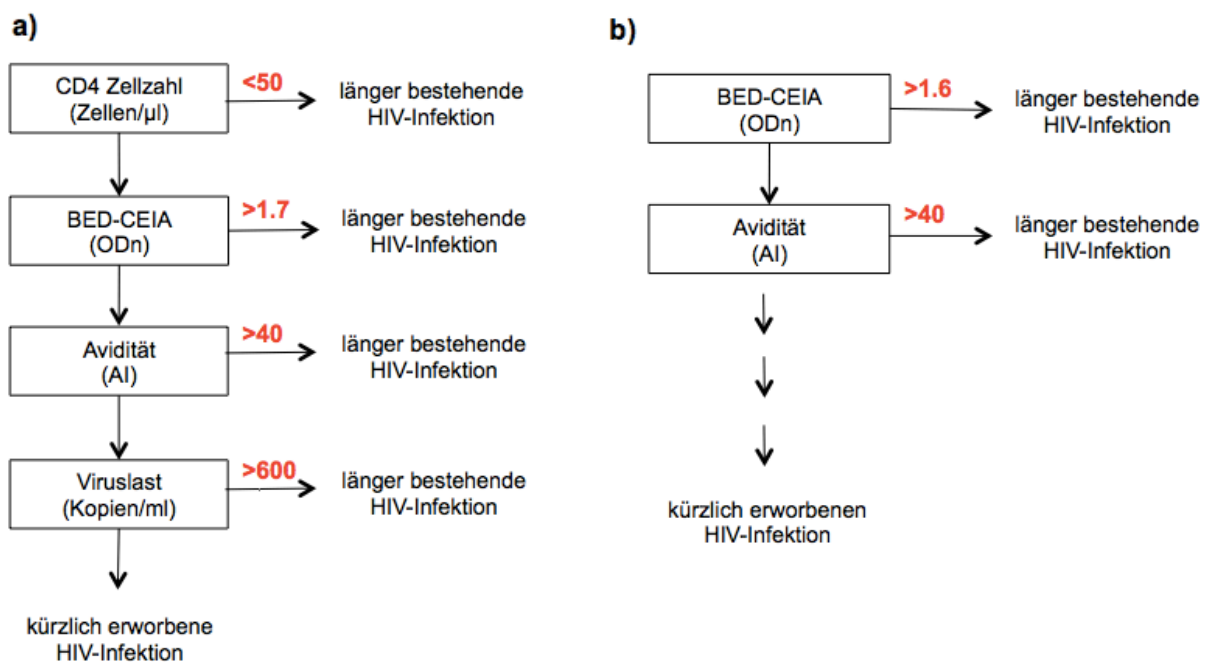


Abbildung 16. Cutoff-Werte des a) MAA 1 und b) des MAA 2

Tabelle 9 Ergebnisse des Subsets B- und „non-B“-Infektionen hinsichtlich der verschiedenen Testmethoden

	BED-CEIA (104 Tage)	BR Aviditätstest (220 Tage)	MAA 1 (165 Tage)	MAA 2 (165 Tage)
Richtig klassifiziert (Richtigkeit)	450/515 (87,4%)	465/515 (90,3%)	471/515 (91,5%)	468/515 (90,9%)
Richtig inzident klassifiziert (Sensitivität)	189/225 (84,0%)	211/244 (86,5%)	200/232 (86,2%)	203/232 (87,5%)
Richtig prävalent klassifiziert (Spezifität)	261/290 (90,0%)	254/271 (93,7%)	271/283 (95,8%)	265/283 (93,6%)
Falsch inzident klassifiziert (FRR)	29/290 (10,0%)	17/271 (6,3%)	12/283 (4,2%)	18/283 (6,4%)

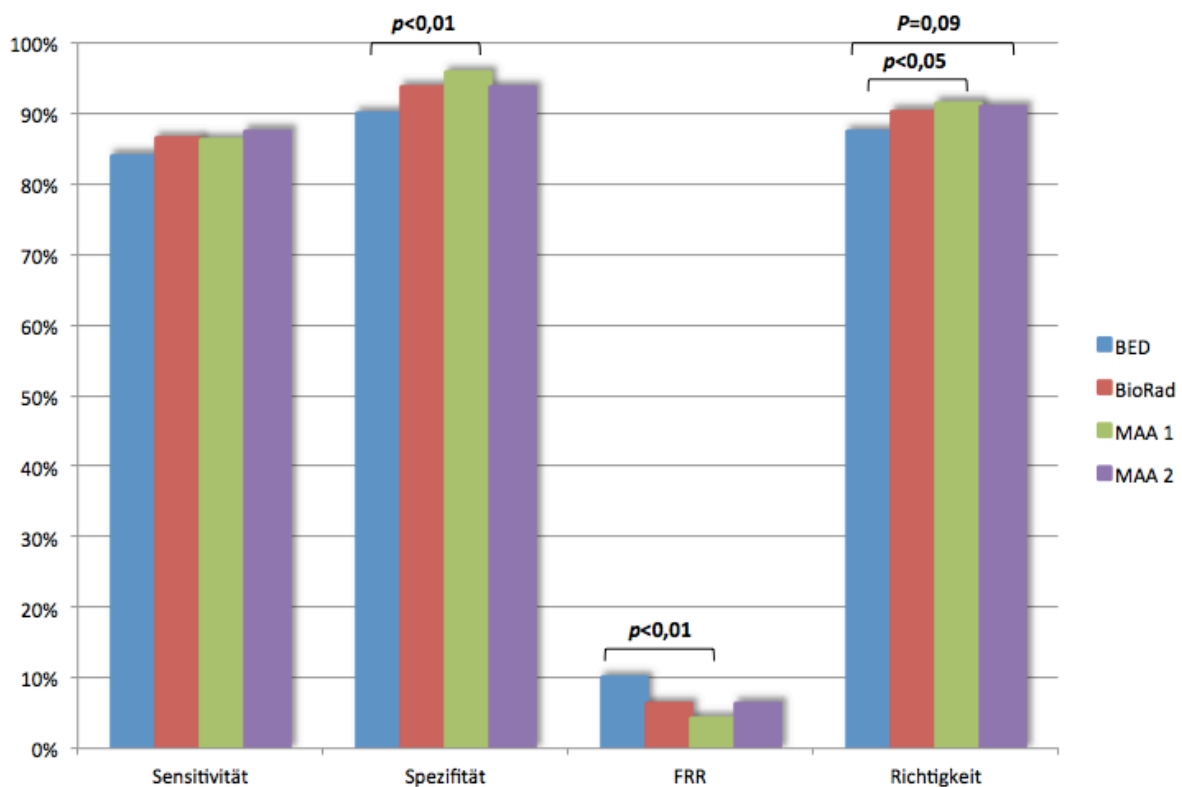


Abbildung 17. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR der unterschiedlichen Testmethoden. Nur p -Werte kleiner 0,1 sind angezeigt, davon sind nur Werte kleiner 0,05 signifikant.

6.9 Ergebnisse der Mittleren Infektionsdauer (MDR)

Zur Bestimmung der MDR wurden für die jeweiligen Tests die Anteile inzident getesteter Patienten pro Infektionsdauer-Intervall aufgetragen und mittels einer Trendlinie (Polynoms dritten Grades) dargestellt (Abb. 18). Die Funktionen der Trendlinien lauten wie folgt:

$$\text{BED-CEIA: } y = -0,867x^3 + 18,73x^2 - 80,154x + 107,67$$

$$\text{BioRad Aviditätstest: } y = -5,4647x^3 + 46,189x^2 - 124,12x + 111,25$$

$$\text{MAA1: } y = -9,474x^3 + 68,233x^2 - 154,22x + 109,84$$

$$\text{MAA2: } y = -9,2544x^3 + 67,722x^2 - 154,13x + 112,06$$

Durch die Berechnung des Integrals erhielt man schließlich folgende Ergebnisse für die MDR:

$$\text{BED-CEIA} = 119 \text{ Tage}$$

$$\text{BioRad Aviditätstest} = 83 \text{ Tage}$$

$$\text{MAA1} = 59 \text{ Tage}$$

$$\text{MAA2} = 68 \text{ Tage}$$

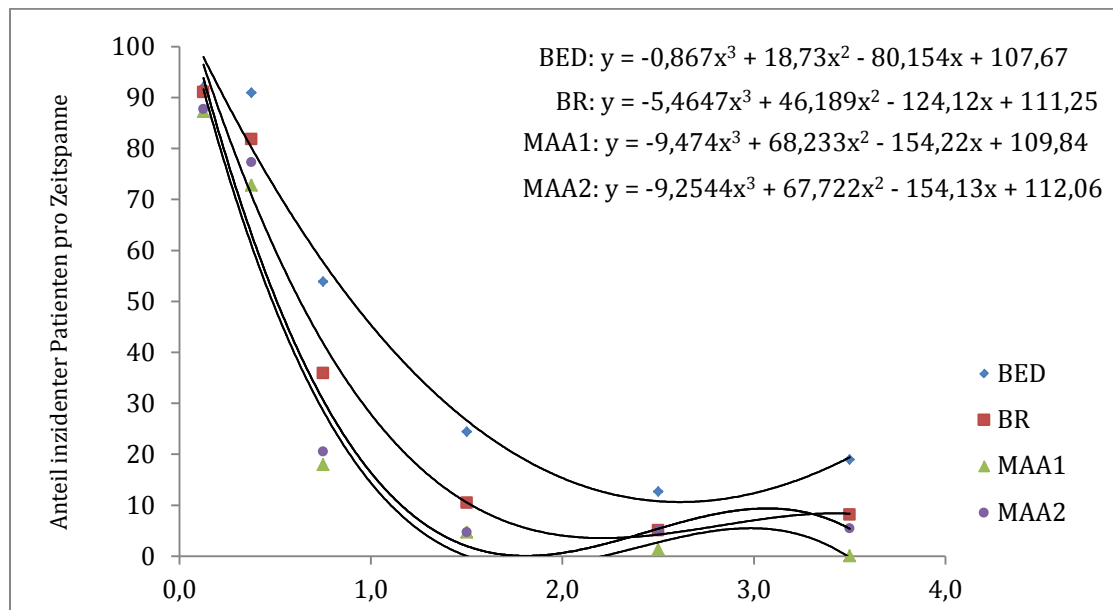


Abbildung 18. Anteil inzidenter Patienten pro Zeitspanne

7 Diskussion

7.1 Elution und Verdünnung der DPS/DSS für den BioRad Aviditätstests

Die Elution der DPS erfolgte im zehnfachen Volumen (500 μ l) des ursprünglich getropften Plasmavolumens (50 μ l). Die Antikörper lagen also in einer 1:10 Verdünnung vor. Diese Verdünnung entspricht der im Kitprotokoll vorgesehenen Verdünnung des Serums für einen Antikörpernachweis (BioRad HIV-ELISA). Auch im BioRad Aviditätsprotokoll nach Masciotra *et al.* (2010) wurde in etwa diese Verdünnung verwendet²⁶: 50 μ l Blutspots in 300 μ l Kit-Diluent eluiert, entspricht bei einem Plasmaanteil von ca. 55% einer Verdünnung von 10,1.

7.2 Bewertung der Inzidenzteste im Vergleich zum BED-CEIA

Der BED-CEIA erzielte in dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse wie in früheren Studien der Arbeitsgruppe (Loschen *et al.*, 2008)²². Aufgrund seiner geringeren Sensitivität und Spezifität und hoher FRR bei Patienten mit Subtyp „non-B“-Infektionen oder mit niedrigen Antikörpertitern wird der BED-CEIA jedoch international in Frage gestellt³⁴.

In vorangegangenen Untersuchungen³⁵ zeigte der BioRad Aviditätstest bereits eine höhere Sensitivität bei Subtyp B Infektionen als der BED-CEIA (88% vs. 60%, $p=0,05$; Hauser *et al.* 2014³⁵). Auch in der vorliegenden Arbeit schnitt der BioRad Aviditätstest für Subtyp B Infektionen in allen vier Parametern (Sensitivität, Spezifität, FRR, Richtigkeit) leicht, jedoch nicht signifikant besser ab.

Dies gilt auch für die Subtyp „non-B“-Infektionen. Insbesondere für die Patienten mit Subtyp „non-B“-Infektion und mit geringen Antikörpertitern kann mit dem BioRad Aviditätstest die FRR halbiert werden.

Für den BED-CEIA war bereits beschrieben, dass Proben therapierter Patienten oder auch Proben von Patienten im AIDS-Stadium erhöht als falsch-inzident eingestuft werden, weil beide Patientengruppen geringere Antikörpertiter aufweisen³⁶. Da der BED-CEIA auf dem Nachweis von Antikörperanteilen (Titer) beruht, führt dies zu einer falschen „inzident“-Klassifizierung. Beim Aviditätstest spielt der Antikörpertiter eine geringere Rolle.

Wie auch bereits bei Hauser *et al.* (2014) erwähnt³⁵, erschließt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit, dass der BioRad Aviditätstest akkurater ist als der BED-CEIA.

Vergleicht man das Ergebnis des BED-CEIAs mit dem der MAAs, so weisen sowohl MAA 1 als auch MAA 2 deutlich eine jeweils höhere Richtigkeit auf. Für den MAA 1 wurden sogar signifikante Unterschiede in der Spezifität ($p<0,01$), der FRR ($p<0,01$) und der Richtigkeit ($p<0,05$) festgestellt. Zwischen dem BED-CEIA und dem MAA 2 war zwar keine Signifikanz ersichtlich, jedoch schnitt der MAA 2 bei der Richtigkeit mit $p=0,09$ deutlich besser ab.

Die kombinierte Anwendung von zwei Inzidenztesten, die (A) mit unterschiedlichen Fangantigenen bzw. Fangantikörper bestückt sind und (B) auf unterschiedlichen Eigenschaften der Antikörper beruhen (Titer und Avidität), eignen sich daher gut für einen MAA.

7.3 Cutoff-Werte der MAAs

Vergleicht man die Cutoff-Werte des MAAs von Brookmeyer et al. (2012)³⁸ (MAA A) mit den hier im MAA 1 generierten, so sind nur geringe Differenzen ersichtlich.

(MAA A vs. MAA 1: CD4 Zellzahl C_{CD4} : 50 vs. 50 Zellen/ μ l; Cutoff BED C_B : OD 1,6 vs. 1,7; Cutoff BioRad C_A : 85% vs. 40%; Cutoff Viruslast C_{VL} : 400 vs. 600 Kopien/ml)

Lediglich der Cutoff für die Avidität scheint leicht diskrepant im Gegensatz zu dem von Brookmeyer beschriebenen Cutoff von $C_A = 85\%$ zu sein.

Der Grund dafür könnte darin bestehen, dass Brookmeyer ein leicht verändertes Protokoll zur Durchführung des BioRad Aviditätstests benutzte (persönlich Mitteilung von Silvana Masciotra, Division of HIV/AIDS prevention, CDC). Ferner wurden Patientenproben in Form von Serum bzw. Plasma zur Untersuchung verwendet, während in dieser Arbeit mit Filterproben (DSS/DPS) gearbeitet wurde.

7.4 Anwendung des MAAs

Obwohl der Aviditätstest vor allem hinsichtlich der Sensitivität im Set der Subtyp „non-B“-Infektionen (67,4%) und der FRR (5,6%) im Set der Subtyp B-Infektionen teilweise besser abschneidet als die MAAs (Sensitivität – MAA 1: 63% und MAA 2: 66,7%; FRR – MAA 2: 6,1%), muss in Betracht gezogen werden, dass in der Realität die Subtypen nicht getrennt betrachtet werden können. Zur Subtypbestimmung muss eine Sequenz der infizierenden Virusvariante vorliegen. Somit ist eine getrennte Beurteilung von B und „non-B“-Infektionen nicht realisierbar.

Die zusammengefasste Gruppe der B und „non-B“-Infektionen hingegen entspricht der Realität. Während bei der Inzidenztestung nur das Ergebnis des jeweiligen Tests gültig ist, werden beim Multiassay Algorithmus die Ergebnisse mehrerer Tests in Betracht gezogen. Diese Kombination der einzelnen Ergebnisse resultiert dann in einem Gesamtergebnis, welches zu einer zuverlässigeren Bewertung führt als das Ergebnis eines nur einzelnen Tests. Diese Aussage ist jedoch nur gültig für eine Patientenpopulation mit überwiegend Subtyp B Infektionen. Bestünde die zu untersuchende Population aus überwiegend „non-B“-Subtypen, sollte der Algorithmus spezifisch für diese Subtypgruppe neu optimiert werden. Des Weiteren muss auch berücksichtigt werden, dass für die Situation in Deutschland der

MAA 2 besser eignet wäre als der MAA 1, da die CD4 Zellzahl und Viruslast eines Patienten größtenteils dem RKI nicht mitgeteilt werden. Daher ist nur der MAA 2, der weder die CD4 Zellzahl noch die HI-Viruslast als Kriterium beinhaltet, in der Realität anwendbar.

Jedoch setzt ein kleiner zeitlicher Cutoff auch ein größeres Probenet voraus¹⁶, um eine statistisch zuverlässige Aussage über die Inzidenz treffen zu können.

Darüber hinaus ist die Anwendung des Multiassay Algorithmus erheblich kosten- und arbeitsaufwändiger als ein serologischer Inzidenztest allein, wobei erwähnt sei, dass der MAA 1 aufgrund der Bestimmung der CD4 Zellzahl und der Viruslast deutlich aufwändiger wäre als der MAA 2, der die beiden Biomarker nicht als Kriterium miteinbezieht.

7.5 Die Mittlere Infektionsdauer (MDR)

Die in dieser Arbeit berechneten MDRs liegen im Gegensatz zu den bereits vorliegenden MDRs³⁸ deutlich unter der publizierten Infektionsdauer. Die MDRs der verschiedenen Testmethoden liegen nach Angabe der jeweiligen Autoren bei folgenden: BED-CEIA 180 Tage, BioRad Aviditätstest 220 Tage, MAA1 161 Tage, MAA2 101 Tag.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die hier untersuchte Studienpopulation zu klein war im Vergleich zu den publizierten Studien und somit auftretende Fehler einen viel größeren Einfluss auf das Ergebnis hatten.

7.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Inzidenztestung in Deutschland evaluiert. Beste Ergebnisse wurden dabei bei den Multiassay Algorithmen festgestellt. Mit einer hohen Richtigkeit und einer geringen FRR scheinen beide MAAs für die Zukunft viel versprechend. Wichtig war vor allem auch, dass die Cutoffs der MAAs an die Situation in Deutschland angepasst wurden. Die bisherigen MAAs wurden nur an der nordamerikanischen Population definiert. Für eine Validierung einer Patientenpopulation mit einer anderen HIV-Subtyp-Zusammensetzung (v.a. höhere Anteile an „non-B“-Subtypen) bedarf es jedoch unbedingt einer separaten und eine für diese Population spezifischen Etablierung des MAAs. Dies ist anhand der Ergebnisse mit den „non-B“-Infektionen nachvollziehbar.

Des Weiteren gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem MAA 1 und dem MAA 2. Obwohl der MAA 1 präzisere Ergebnisse lieferte, besteht hier die Problematik darin, dass die Erfassung der CD4 Zellzahl und Viruslast sehr aufwändig und in der Realität nur schwer umsetzbar ist. Der Vorteil des MAAs 2 liegt daher darin, dass die klinischen Biomarker für die Auswertung nicht in Betracht gezogen werden. Mit einer Sensitivität von 88% und einer Spezifität von 94% liegt der MAA 2 für eine individuelle Diagnostik leider noch nicht in einem akzeptablen Bereich. Für eine genauere Auswertung sollte eine Untersuchung mit einer größeren Studienpopulation in Betracht gezogen werden.

Um jedoch international vergleichbare Aussagen über die Inzidenz zu erhalten, bedarf es einer Vereinheitlichung der Test- und Auswertmethoden. Sowohl die Durchführung der Inzidenzteste, als auch die Festlegung eines einheitlichen Cutoffs und MDRs sind für die internationale Vergleichbarkeit der Inzidenz unerlässlich.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Idealisiertes Wahrscheinlichkeitsmodell für einen Inzidenztest oder einen Multitassay Algorithmus (MAA).....	14
Abbildung 2. Realistisches Wahrscheinlichkeitsmodell für einen Inzidenztest bzw. einen Multiassay Algorithmus (MAA).....	14
Abbildung 3. a) Anteile der Subtypen bei inzidenten Neudiagnosen und b) Anteile der Subtypen im Evaluationspanel	18
Abbildung 4. Schema des AWARETM CEDTM CEIA (Calypte).....	21
Abbildung 5. Schema des BioRad Aviditätstests nach Masciotra et al. (2010) ²⁶	22
Abbildung 6. Schema des MAA nach Brookmeyer et al. 2012 mit den Biomarkern und u.a. der CD4-Zellzahl (MAA #1) und ohne CD4-Zellzahl (MAA #2).....	24
Abbildung 7. MAA nach Inhouse-Methode mit den verschiedenen Cutoffs	24
Abbildung 8. OD-Mittelwerte aus Waschpuffer (WP) bzw. DEA-Ansätzen pro Verdünnungsstufe für Proben mit kurzer Infektionsdauer	26
Abbildung 9. OD-Mittelwerte aus Waschpuffer (WP) bzw. DEA-Ansätzen pro Verdünnungsstufe für Proben mit langer Infektionsdauer	27
Abbildung 10. Aviditätsindex der unterschiedlichen Verdünnungen für inzidente und prävalente Proben	27
Abbildung 11. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BED-CEIAs für die Bestimmung inzidenter Infektionen.....	28
Abbildung 12. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des BioRad Aviditätstests für die Bestimmung inzidenter Infektionen.....	29
Abbildung 13. . Ergebnisse der Cutoff-Werte des MAA 1 in den verschiedenen Sets (A) „Subtypen B-Infektionen“, (B) Subtyp „non-B“-Infektionen, (C) Subtyp B- und „non-B“-Infektionen, und (D) therapierte Patienten für die jeweiligen Biomarker CD4 Zellzahl, BED-CEIA, Avidität und Viruslast.....	32
Abbildung 14. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAA 1	33
Abbildung 15. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR des MAA 2	34
Abbildung 16. Cutoff-Werte des a) MAA 1 und b) des MAA 2.....	35
Abbildung 17. Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und FRR der unterschiedlichen Testmethoden..	36
Abbildung 18. Anteil inzidenter Patienten pro Zeitspanne.....	37

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Charakteristika des Evaluationspanels.....	19
Tabelle 2 Ergebnisse des BED-CEIAs in den verschiedenen Sets „Subtyp B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“	28
Tabelle 3 Ergebnisse des BioRad Aviditätstests in den verschiedenen Sets „Subtypen B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“	29
Tabelle 4 Testergebnisse des BED-CEIA und des BioRad Aviditätstests im Vergleich.....	30
Tabelle 5 Cutoff-Werte des MAA 1	31
Tabelle 6 Cutoff-Werte des MAA 2	31
Tabelle 7 Ergebnisse des MAAs 1 in den verschiedenen Sets „Subtypen B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“	33
Tabelle 8 Ergebnisse des MAAs 2 in den verschiedenen Sets „Subtypen B“, „non-B“- Subtypen und „therapierte Patienten“	34
Tabelle 9 Ergebnisse des Subsets B- und „non-B“-Infektionen hinsichtlich der verschiedenen Testmethoden	36

10 Literaturverzeichnis

1. Barre-Sinoussi, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* **56**, 126-129 (2004).
2. Santiago, M.L. et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of virology* **79**, 12515-12527 (2005).
3. Thomas, H.I. et al. Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1. *Clinical and experimental immunology* **103**, 185-191 (1996).
4. Curtis, K.A. et al. Development and characterization of a bead-based, multiplex assay for estimation of recent HIV type 1 infection. *AIDS research and human retroviruses* **28**, 188-197 (2012).
5. Janssen, R.S. et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **280**, 42-48 (1998).
6. Murphy, G. & Parry, J.V. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **13** (2008).
7. Guy, R. et al. Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review. *The Lancet infectious diseases* **9**, 747-759 (2009).
8. Busch, M.P. et al. Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. *AIDS (London, England)* **24**, 2763-2771 (2010).
9. Kothe, D. et al. Performance characteristics of a new less sensitive HIV-1 enzyme immunoassay for use in estimating HIV seroincidence. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **33**, 625-634 (2003).
10. Rawal, B.D. et al. Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **33**, 349-355 (2003).
11. Barin, F. et al. Development and validation of an immunoassay for identification of recent human immunodeficiency virus type 1 infections and its use on dried serum spots. *Journal of clinical microbiology* **43**, 4441-4447 (2005).
12. Parekh, B.S. et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS research and human retroviruses* **18**, 295-307 (2002).
13. Keating, S.M. et al. Lower-sensitivity and avidity modifications of the vitros anti-HIV 1+2 assay for detection of recent HIV infections and incidence estimation. *Journal of clinical microbiology* **50**, 3968-3976 (2012).
14. Pilcher C, K.R., Motta L, Facente S, Keating S, McKinney E, Gunasekera D, Hecht F, Sperhake RD, Santos B, Busch M, Murphy G, Esfandiari J, Welte A A novel quantitative, multi-analyte rapid test for recent HIV infection and HIV incidence estimation, 19th International AIDS Conference Abstract no. TUPE194, Washington, USA. (2012).
15. Granade, T.C., Nguyen, S., Kuehl, D.S. & Parekh, B.S. Development of a novel rapid HIV test for simultaneous detection of recent or long-term HIV type 1 infection using a single testing device. *AIDS research and human retroviruses* **29**, 61-67 (2013).
16. Laeyendecker, O. et al. HIV incidence determination in the United States: a multiassay approach. *The Journal of infectious diseases* **207**, 232-239 (2013).

17. Laeyendecker, O. et al. Development of Methods for Cross-Sectional HIV Incidence Estimation in a Large, Community Randomized Trial. *PloS one* **8**, e78818 (2013).
18. Hu, D.J. et al. HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: use of the IgG capture BED enzyme immunoassay. *AIDS research and human retroviruses* **19**, 727-730 (2003).
19. Batzing-Feigenbaum, J. et al. Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: results from a pilot study in Berlin, Germany, in 2005-2007. *HIV medicine* **10**, 209-218 (2009).
20. Kim, A.A. et al. Evaluating the BED capture enzyme immunoassay to estimate HIV incidence among adults in three countries in sub-Saharan Africa. *AIDS research and human retroviruses* **26**, 1051-1061 (2010).
21. Scheer, S. et al. Estimated HIV Incidence in California, 2006-2009. *PloS one* **8**, e55002 (2013).
22. Loschen, S. et al. Comparison of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1-specific immunoglobulin G capture enzyme-linked immunosorbent assay and the avidity index method for identification of recent HIV infections. *Journal of clinical microbiology* **46**, 341-345 (2008).
23. McDougal, J.S. et al. Comparison of HIV type 1 incidence observed during longitudinal follow-up with incidence estimated by cross-sectional analysis using the BED capture enzyme immunoassay. *AIDS research and human retroviruses* **22**, 945-952 (2006).
24. Hargrove, J.W. et al. Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay. *AIDS (London, England)* **22**, 511-518 (2008).
25. Surveillance, U.W.W.G.o.G.H.A.a.S. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. 2011. Available: http://www.who.int/diagnostics_laboratory/hiv_incidence_may13_final.pdf. (2011).
26. Masciotra S, D.T., Dobbs T, Candal D, Hanson D, Delaney K, Rudolph D, et al. Antibody avidity-based assay for identifying recent HIV-1 infections Based on Genetic Systems[™] 1/2 Plus O EIA [#937]. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2010, San Francisco, CA. (2010).
27. Hallett, T.B. Estimating the HIV incidence rate: recent and future developments. *Current opinion in HIV and AIDS* **6**, 102-107 (2011).
28. Laeyendecker, O. et al. Specificity of four laboratory approaches for cross-sectional HIV incidence determination: analysis of samples from adults with known nonrecent HIV infection from five African countries. *AIDS research and human retroviruses* **28**, 1177-1183 (2012).
29. Wei, X. et al. Development of two avidity-based assays to detect recent HIV type 1 seroconversion using a multisubtype gp41 recombinant protein. *AIDS research and human retroviruses* **26**, 61-71 (2010).
30. Duong, Y.T. et al. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: potential for HIV-1 incidence estimates and avidity maturation studies. *PloS one* **7**, e33328 (2012).
31. Kassanjee, R., McWalter, T.A. & Welte, A. Short Communication: Defining optimality of a test for recent infection for HIV incidence surveillance. *AIDS research and human retroviruses* **30**, 45-49 (2014).
32. Hargrove, J., Eastwood, H., Mahiane, G. & van Schalkwyk, C. How should we best estimate the mean recency duration for the BED method? *PloS one* **7**, e49661 (2012).
33. Cousins, M.M. et al. HIV diversity as a biomarker for HIV incidence estimation: including a high-resolution melting diversity assay in a multiassay algorithm. *Journal of clinical microbiology* **52**, 115-121 (2014).

34. Hallett, T.B., Ghys, P., Barnighausen, T., Yan, P. & Garnett, G.P. Errors in 'BED'-derived estimates of HIV incidence will vary by place, time and age. *PloS one* **4**, e5720 (2009).
35. Hauser, A. et al. (Infektionskrankheiten / Erreger, 2014).
36. Hayashida, T., Gatanaga, H., Tanuma, J. & Oka, S. Effects of low HIV type 1 load and antiretroviral treatment on IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS research and human retroviruses* **24**, 495-498 (2008).
37. UNAIDS 2013 Global Report Epidemiology Slides (2013). Available: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/201309_epi_core_en.pdf. Accessed 22 July 2014
38. Brookmeyer, R., Konikoff, J., Laeyendecker, O., Eshleman, S. H. Estiman of HIV Incidence Using Multiple Biomarkers. *American Journal of Epidemiology* **177(3)**, 264-272 (2012)
39. Suligoj, B., Galli, C., Massi, M. Precision and Accuracy of a Procedure for Detecting Rceent Human Immunodeficiency Virus Infections by Calculating the Antibody Avidity Index by an Automated Immunoassay-Based Method. *J Clin Microbiol.* **40(11)**, 4015-4020 (2002)

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zur Anfertigung dieser Bachelorarbeit beigetragen haben.

Ganz besonders gilt dieser Dank Frau Dr. Andrea Hauser, die mich stets unterstützte und ohne deren Hilfe und Bemühungen diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ebenfalls bedanke ich mich bei Frau Dr. Claudia Kücherer für die Bereitstellung des Themas und für die Hilfsbereitschaft über den gesamten Zeitraum.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch an Herrn PD Dr. Norbert Bannert und Herrn Prof. Dr. Roland Lauster richten, die sich bereit erklärt haben, als Gutachter für meine Bachelorarbeit zur Verfügung zu stehen.

Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an das gesamte Team des HIV-Studienlabors, insbesondere an Ewelina Caspers, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir Mut zusprach.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit bedanken. Ohne sie wäre ich nie so weit gekommen.