

Infektionsdiagnostik

Multiplex Partikel-Assay für die HIV-1/2-IgG-Differenzierung

CHRISTIAN POPP¹, OLAF DEGEN¹, JÜRGEN BURKHART², BEATE FUCHS², SABINE REDER¹, FRANZ WEINAUER² UND GERHARD HERMANN¹

¹INSTITUT VIRION\SERION GMBH, WÜRZBURG

²INSTITUT FÜR TRANSFUSIONSMEDIZIN MÜNCHEN, BLUTSPENDEDIENST DES BAYERISCHEN ROTEN KREUZES

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) ist ein weltweit verbreitetes RNA-Retrovirus, welches die Krankheit AIDS (Erworbenes Immundefektsyndrom) verursacht. Allein in Deutschland lebten Ende 2006 rund 56.000 Menschen mit einer HIV-Infektion. Blut, Urin oder andere Gewebe können auf HIV-Antikörper überprüft werden: In der Diagnostik sind ELISA-Tests, PCR und Western-Blots am gebräuchlichsten, wobei ein positives ELISA-Ergebnis allein kein sicherer Befund für eine HIV-Infektion ist. Mehrfache Bestätigungstests sind die Regel.

Aktueller Stand der HIV-Diagnostik

Die Übertragung der HI-Viren erfolgt hauptsächlich über Blut- und Sexualkontakt. Besonders häufig sind HIV-Neuinfektionen bei 30–39-Jährigen, die zweithäufigste Gruppe sind die 20–29-Jährigen. International sind HIV-Neuinfektionen besonders stark unter jungen Menschen (15–24 Jahre) zu beobachten. Da es in den 80er-Jahren zu tragischen HIV-Infektionen nach Transfusion von Blutspenden kam, wurde die Untersuchung von Blutspendern in Deutschland obligatorisch, um potenziell infektiöse Spenden zu eliminieren. Weltweit sind Bluttransfusionen weiterhin eine mögliche Infektionsquelle, die nur durch gezielte Routineuntersuchungen der Blutspender vermieden werden kann.

Für die Identifizierung von HIV-infiziertem Probenmaterial stehen verschiedenste Methoden zur Verfügung. Bei Patienten mit Verdacht auf eine HIV-Infektion wird die HIV-Diagnose durch zwei Tests gestellt: einen Suchtest und einen Bestätigungstest. Im Falle eines positiven Ergebnisses wird eine zweite Blutprobe genommen und die Tests werden wiederholt. Eine Möglichkeit der Untersuchung von Serum und Plasma besteht in dem Nachweis von HIV-spezifischen Antikörpern. Als Suchtest werden häufig auto-

matisierte Screeningtests, meist HIV-ELISA-Tests durchgeführt. Diese weisen Antikörper gegen HIV-1, HIV-2 und HIV-1 Gruppe O im Blut nach. Suchtests der neuesten Generation detektieren nicht nur HIV-Antikörper, sondern auch das HIV-p24-Antigen. Damit lassen sich Infektionen noch zeitnäher nachweisen. Aber auch hier ist ein Risiko vorhanden, da zwischen der Ansteckung des Spenders und der Nachweisbarkeit des p24-Antigens im HIV-Test mehrere Wochen verstreichen können.

Blutspenden müssen zusätzlich auf HIV mittels PCR getestet werden, um dieses diagnostische Risiko auszuschließen. In Deutschland wird dies regelmäßig durchgeführt, wohingegen weltweit nicht immer molekularbiologische Methoden bereitstehen. Der Vorteil der PCR ist, dass sie über eine hohe Sensitivität und Spezifität verfügt, daher können Blutspendenserien zunächst gepoolt untersucht werden.

Bei positivem Ergebnis in den Antikörper- und/oder PCR-Untersuchungen werden in der Regel ein- oder mehrfache Bestätigungstests wie Immunoblots und Einzelproben-PCRs durchgeführt. Letztere sind jedoch deutlich teurer als Immunoblots. Mit dem klassischen Immunoblot werden Antikörper verschiede-

ner Spezifität gegen das HI-Virus nachgewiesen. Jedoch dauert die Testabarbeitung oft sehr lange und die Interpretation der erhaltenen Banden ist aufwändig und sehr subjektiv geprägt.

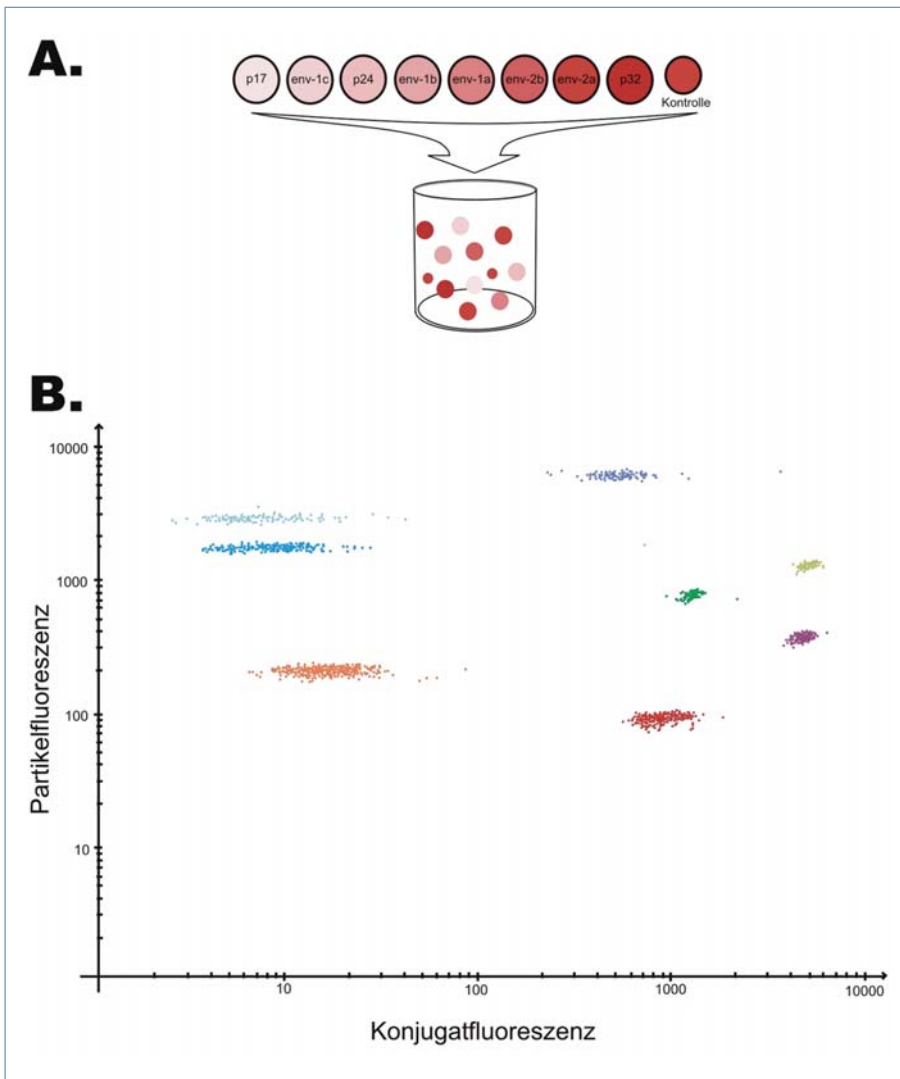
Das SERION Multianalyt™-System

Für eine präzise und kostengünstige Serodiagnostik hat die Institut Virion\Serion GmbH neue Multiplex-Tests entwickelt und validiert. Mit dem SERION Multianalyt™-System ist die Bestimmung mehrerer Parameter in einem Testansatz möglich. Die Analyse erfolgt am Durchflussszytometer. Bei der Produktion werden farbkodierte Partikel (Beads) mit erregerspezifischen Antigenen beschichtet und in einem Multiplex-Testsystem zusammengestellt (**Abb. 1A**). Die Plexe enthalten Partikel, die aufgrund ihrer verschiedenen Größen und Fluoreszenzfärbungen voneinander unterschieden werden können. Aus einer Probe können Antikörper verschiedener Spezifitäten unter Verwendung eines Konjugatantikörpers detektiert und quantifiziert werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und somit der Diagnose bietet eine große Sicherheit; die anwenderfreundliche, schnelle und einfache Bewertung mit der SERION Multianalyt™-Software runden das System ab.

Der SERION Multianalyt™-HIV-Test wurde als blotäquivalenter Bestätigungstest entwickelt, der zwischen HIV-1- und HIV-2-Infektionen diskriminieren kann (**Abb. 1B**). Im Rahmen einer Studie im Institut für Transfusionsmedizin München, Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK), sollte die Eignung als Bestätigungstest überprüft werden.

Studie zu SERION Multianalyt™ HIV-Test

Für die Studie beim Blutspendedienst des BRK wurde der SERION Multianalyt™-HIV-IgG-Assay zwei automatisierten Antikörper-Screeningtests (Chemilumineszenz-Immunoassay (ChLIA), Mikropartikel-Enzym-Immunoassay (MEIA)), einem Line-Immunoassay (LIA) und dem PCR-Verfahren (*in-house*



Screening- und Bestätigungstests				
SERION Multianalyt™		pos.	gw	neg.
	pos.	27	0	1
	gw	0	0	1
	neg.	1	3	199

Tab. 1: Gegenüberstellung der Testergebnisse. Für die negativen Seren wurden die Ergebnisse der Screeningtests und der PCR gewertet. Bei positiven bzw. fraglichen Seren wurde das Ergebnis des Line-Immunoassays als richtig angenommen.

Methode) gegenübergestellt. Insgesamt wurden 232 Seren auf IgG-Antikörper gegen HIV untersucht. Das für den Multianalyt-Assay genutzte Durchflusszytometer war das FACS-Calibur™ der Firma Becton, Dickinson and Company (BD).

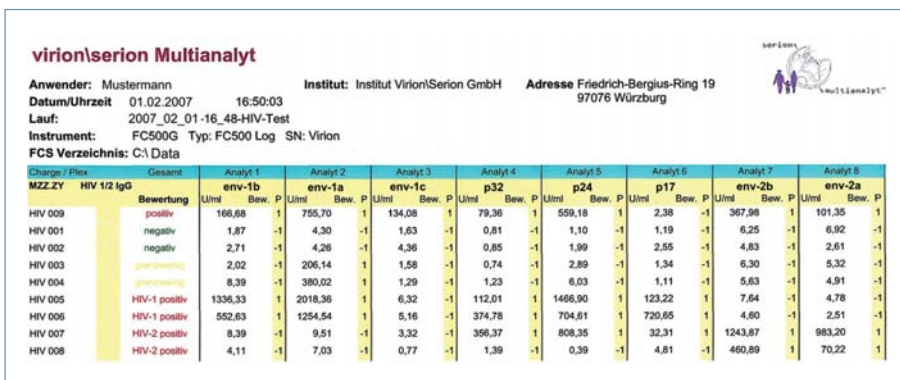
Die 232 getesteten Proben setzten sich wie folgt zusammen:

- 111 in Screeningtests HIV-reaktive Seren (LIA- und PCR-negativ)
- 3 in Screeningtests HIV-reaktive Seren (LIA-fraglich und PCR-negativ)
- 1 im Screeningtest HIV-reaktives Serum (LIA-HIV-2-positiv und PCR-negativ)
- 27 bestätigte HIV-1-Seren (Screeningtests reaktiv, LIA- und PCR-positiv)
- 90 in Screeningtests HIV-negative Seren (PCR-negativ).

Für Nachweis und Differenzierung HIV-spezifischer Antikörper wurden insgesamt acht verschiedene HIV-1- und HIV-2-Antigene auf acht Partikel verschiedener Fluoreszenzintensitäten gebracht. Ein weiteres Partikel war mit Kontrollantigen zur Detektion unspezifischer Bindungen beschichtet. Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an DIN 58969-41 Immunoblot (IB), Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen HIV-1 oder HIV-2. Hierfür wurde ein Algorithmus entwickelt, sodass mithilfe der SERION Multianalyt™-Software die Auswertung vollautomatisch geschehen konnte (Abb. 2).

Die **Tabelle 1** zeigt die gegenübergestellten Ergebnisse. Alle HIV-positiven Seren wurden mithilfe des SERION Multianalyt™-HI-Virus-IgG detektiert. Von 111 im Screeningassay reaktiv vorbewerteten Seren zeigten 110 im SERION Multianalyt™-Assay die korrekte negative Bewertung. Ein Serum zeigte ein positives Ergebnis. Die drei im Screeningassay reaktiven und in den Bestätigungstests fraglichen Seren wurden negativ, ein Serum

▲ Abb. 1: A, Mischung von mit unterschiedlichen HIV- bzw. Kontrollantigenen beschichteten Partikeln (Beads) im SERION Multianalyt™-HI-Virus-IgG-Kit zum simultanen Nachweis HIV-spezifischer Antikörper. B, Punktediagramm eines SERION Multianalyt™-HI-Virus-IgG-Tests nach Reaktion mit einem Serum. Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Reaktivität der verschiedenen Beadpopulationen. Die Kontrollpartikel sind nicht abgebildet.



▲ Abb. 2: Screenshot des SERION Multianalyt™-HIV-Reports. In dem übersichtlichen Report werden die Ergebnisse aller testspezifischen Antikörpertiter, sowie chargenspezifischen Daten angezeigt. Die in arbiträre Units umgerechneten Antikörpertiter zeigen die Wertung des einzelnen Analyts an: <10 U/ml negativ, 10–15 U/ml grenzwertig, >15 U/ml positiv. In der zweiten Spalte steht die Gesamtbewertung als Interpretationsvorschlag in Anlehnung an DIN 58969-41.

aus dem Blutspenderkollektiv wurde grenzwertig und das im Bestätigungstest HIV-2-positive, PCR-negative Serum wurde negativ bewertet.

Die mit dem SERION Multianalyt™-System durchgeführte Zweitbestimmung dieser sechs nicht übereinstimmenden Seren ergab keine Änderung der Verteilung.

Diskrepanzanalyse

Es folgte die Analyse aller sechs diskrepanten Ergebnisse. Alle sechs Seren waren in der PCR negativ für HIV-RNA. Im Rahmen dieses Artikels soll jedoch nur auf das vermeintlich falsch-positive (Serum A) und auf das vermeintlich falsch-negative Serum (Serum B) eingegangen werden (**Tab. 2**).

Serum A war in beiden Screeningtests reaktiv, die Nachtestung des Immunoblots ergab erneut ein negatives Resultat, Einzel-PCR und Pool-PCR waren negativ. Die Endbewertung war negativ bzw. unspezifisch.

Serum B war im Screeningtest 1 reaktiv, im Screeningtest 2 negativ und im Line-Immunoassay auch in der Nachtestung HIV-2-positiv. HIV-Einzel- und Pool-PCR wiesen ein negatives Ergebnis auf, daher wurde eine spezifische HIV-2-PCR in einem externen Referenzlabor durchgeführt. Der Blutspendedienst des BRK bewertete das Serum B am Ende als unspezifisch.

Methode	Serum A	Nachtestung Serum A	Serum B	Nachtestung Serum B
SERION Multianalyt™	pos.	pos.	neg.	neg.
Screeningtest 1 ChLIA	reaktiv	-	reaktiv	-
Screeningtest 2 MEIA	reaktiv	-	neg.	-
Line-Immunoassay	neg.	neg.	HIV-2-pos.	HIV-2-pos.
Pool-PCR	neg.	-	neg.	-
Einzel-PCR	neg.	-	neg.	-
HIV-2-PCR (extern)	-	-	neg.	-
Endbewertung	neg. bzw. unspezifisch		unspezifisch	

Tab. 2: Diskrepanzanalysen. Vergleichende Austestungen des im SERION Multianalyt™-System vermeintlich falsch-positiv (Serum A) und des vermeintlich falsch-negativ (Serum B) bewerteten Serums. Wegen des im Line-Immunoassay positiven HIV-2-Befunds wurde in einem externen Labor eine HIV-2-PCR durchgeführt. Aufgrund fehlenden Serummaterials konnte kein zweiter Line-Immunoassay durchgeführt werden.

renzlabor durchgeführt. Der Blutspendedienst des BRK bewertete das Serum B am Ende als unspezifisch.

Wird Serum B aufgrund der unspezifischen Reaktion nicht einbezogen, so errechnen sich für den Multianalyt-Assay eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 99,5 %.

Zusammengefasst: Sensitivität und Spezifität liegen im Bereich der auf dem Markt eta-

bierten und CE-zertifizierten Immunoblots (LIA).

Diskussion und Ausblick

Von 111 eindeutig im Screeningtest reaktiv vorbewerteten Seren zeigten 110 im SERION Multianalyt™-Assay die korrekte negative Bewertung. Ein Serum zeigte eine positive Reaktion übereinstimmend mit beiden Scree-

ningtests, jedoch im Gegensatz zum Line-Immunoassay und der PCR. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der PCR wurde keines der im Line-Immunoassay grenzwertigen Seren, als grenzwertig oder positiv bewertet. Ebenso übereinstimmend mit der PCR und Screeningtest 2 wurde das im Line-Immunoassay vermeintlich HIV-2-positive Serum negativ bewertet. Die Endbewertung hier war „unspezifische Reaktion“. Grundsätzlich ist es möglich, einen positiven Antikörpertiter nachzuweisen, wenn das PCR-Ergebnis negativ ist. Dies wäre z. B. der Fall, wenn bei einer HIV-Infektion antiretrovirale Medikamente die Viruslast unter die Nachweisgrenze drücken bzw. das noch intakte Immunsystem die Virusreproduktion hemmt.

Von dem Kollektiv aus 90 Blutspenden wurden 89 Seren als negativ erkannt, nur eins wurde im Gegensatz zur negativen Pool-PCR und dem negativen Line-Immunoassay mit grenzwertig bewertet.

Die bestehenden serologischen Testverfahren bieten in der Regel qualitative (Blot, PCR) oder quantitative Einzel-Nachweise (ELISA, Fluoreszenz-PCR) an. Das SERION Multianalyt™-System ermöglicht den zuverlässigen quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen bestimmte Antigenstrukturen des HI-Virus in einer Probe mittels Durchflusszytometrie. Obwohl sich der SERION Multianalyt™-HIV-Assay noch in der Studienphase befindet, unterstreichen diese Ergebnisse die zu diesem Zeitpunkt schon marktreife Performance des Tests.

Das SERION Multianalyt™-System für den serologischen Nachweis kann mit einer Rei-

he von im Labor häufig verbreiteten Geräten verschiedener Hersteller genutzt werden (wie dem BD FACSCalibur™, Beckman Coulter® Cytomics FC 500 und EPICS® XL™, Partec CyFlow® usw.) – ein wichtiges Merkmal ist die Durchflusszytometertypunabhängigkeit.

Die neuen SERION Multianalyt™-Tests eröffnen in naher Zukunft völlig neue Wege in der Analyse von Blutspenderproben und im Patientenmonitoring. Neben den HI-Virus-Tests können auch andere serologische Fragestellungen mit dieser Methode bearbeitet werden. Multiplex-Assays sind besonders bei aufwändigen Bestätigungstests (z. B. Nachweis von Epstein-Barr-Viren, *Borrelia burgdorferi* (Borreliose) oder *Bordetella pertussis* (Keuchhusten)) für den Labormediziner oder das Klinikum von Interesse. Um den personellen Aufwand weiter zu reduzieren, wird eine Automatisierung der Abarbeitung eines SERION Multianalyt™-Tests bereits realisiert. ■

Danksagung

Für die technische Unterstützung bedanken wir uns herzlich bei Frau Stefanie Pannier, Frau Manuela Drescher und Frau Nathalie Zobel.

Literatur

- [1] Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868–871.
- [2] DIN-Taschenbuch 222 (2004): Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Diagnostische Verfahren. Beuth, Berlin, Wien, Zürich, 616 S.
- [3] Epidemiologisches Bulletin (2006), 31. Oktober 2006, Sonderausgabe B.

- [4] Epidemiologisches Bulletin (2006), 24. November 2006/Nr. 47.
- [5] Franco-Paredes, C., Tellez, I., del Rio, C. (2006): Rapid HIV testing: a review of the literature and implications for the clinician. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 3(4): 169–75.
- [6] Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., Popovic, M. (1983): Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 865–867.
- [7] Robertson, B. H., Nicholson, J. K. (2005): New microbiology tools for public health and their implications. *Annu. Rev. Public Health* 26: 281–302.
- [8] Raoult, D., Fournier, P. E., Drancourt, M. (2004): What does the future hold for clinical microbiology? *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 151–159.
- [9] Shapiro, H. M. (1995): Practical Flow Cytometry, 3rd Edition. Wiley-Liss, New York.
- [10] Stine, G. J. (2004): AIDS update 2005. Benjamin-Cummings Publishing Company, San Francisco.

Korrespondenzadressen:

Olaf Degen
Christian Popp
Institut Virion\Serion GmbH
Friedrich-Bergius-Ring 19
D-97076 Würzburg
Tel.: 0931-3045160
Fax: 0931-3035100
dialog@virion-serion.de

Jürgen Burkhart
Institut für Transfusionsmedizin München
Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes
Herzog-Heinrich-Str. 4
D-80336 München
j.burkhart@blutspendedienst.com

AUTOREN



Christian Popp

Studium der Biologie an der Universität Gießen; Promotion 1999–2002 an der Universität Würzburg, Institut für Anatomie und Zellbiologie über das Thema „Arzneimitteltransportproteine“; 2003 tätig bei Aventis Pharma, R&D-Functional Genomics; dann Gruppenleiter in der Abteilung F&E bei der Institut Virion\Serion GmbH.



Olaf Degen

Studium der Biologie an der FU Berlin und Studium „Executive MBA Kellogg-WHU“ an der Northwestern University (USA) und WHU Vallendar; Zunächst an der HU Berlin Arbeiten zu „Nickel-Transportproteinen“, 2003–2006 tätig bei Eurofins GeneScan, R&D – Molekulare Diagnostik. Heute Leiter Produktmanagement/Marketing bei der Institut Virion\Serion GmbH.



Jürgen Burkhart

Abschluss Studium Humanmedizin 1991 an der LMU München, Facharzt für Transfusionsmedizin, Oberarzt, seit 1992 am Institut für Transfusionsmedizin München des Blutspendedienstes des Bayerischen Roten Kreuzes.