

# Klinische Virologie: Dauerbrenner und aktuelle Viren

Weiter- und Fortbildungs-Symposium

„Molekulare Diagnostik 2010“

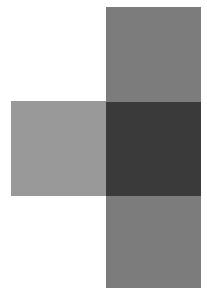
Forum St. Peter, Zürich, 3. - 4. März 2010



Dr. med. Klaus Korn  
Leiter der Sektion für  
Klinische Diagnostik

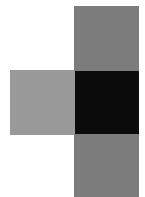
Virologisches Institut  
Nationales Referenzzentrum  
für Retroviren

**Universitätsklinikum  
Erlangen**



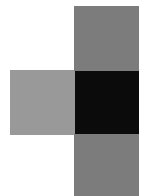
# Fragestellungen für die molekularbiologische Diagnostik in der Virologie

- Ist **das** Virus vorhanden ?
- Wieviel Virus ist vorhanden ?
- Wie sieht das Virus aus ?
- Ist **ein** Virus vorhanden ?



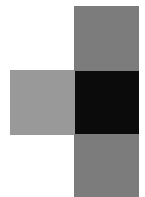
## Fall 1: Säugling mit rezidivierenden Infekten, im Alter von 4 Monaten Pneumocystis-Pneumonie

- Diagnose einer (vertikalen) HIV-1-Infektion
- Viruslast initial 130.000 Kopien/ml
- HIV-Antikörper nachweisbar (mütterliche Ak)
- Therapie mit AZT/3TC+Nevirapin+Nelfinavir
- Ab 6 Monaten Viruslast immer unter Nachweisgrenze
- Mit 2 Jahren Absetzen von Nelfinavir, übrige Therapie weiter
- Wechsel des betreuenden Arztes
- Durchführung eines HIV-Suchtests: negativ !
- Ist das Kind überhaupt HIV-infiziert ?



## Befunde im Alter von 4 Jahren:

- HIV-seronegativ (ELISA)
- Blot: schwache Reaktion mit p24-Antigen, erfüllt nicht die Kriterien für HIV-Positivität
- Viruslast: negativ ( $<50$  /  $<20$  Kopien/ml)
- CD4-Zellen:  $1180/\mu\text{l}$  (40 %), CD4/CD8-Ratio  $> 1$
- Normale Immunglobulinspiegel, normale Immunreaktionen
- Klinisch asymptomatisch
  - in Blutzellen (EDTA-Vollblut) provirale HIV-1-DNA nachweisbar



# Fall 2: eine Einsendung, die das Virologieherz erfreut ...

Für oben genannte(n) Patient(in) möchten wir eine Untersuchung anfordern.

Diagnosen: \_\_\_\_\_

Erbetene Untersuchung: HIV-RNA quant.

Material: 20ml EDTA-Blut Entnahmedatum: 15.05.07

Klinische Angaben: HIV-Neuinfektion im 2107 mit 20 peripheren Werten.

Die Indizes sind weit am oberen Ende des Normbereichs, mit 2107  
~ 200 HIV-1 Kopien/ml, CD4+Zellen sind positiv, CD4+Zellen 160  
und p24, Antikörper als 47 Kopien/ml und 179 CD4+Zellen/ml  
21.77. Q 0,8.

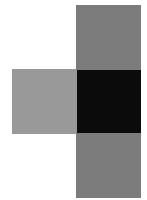
Könnte ein Detektionsproblem für das Virus vorliegen? Es wurde der  
Kostenträger: Roche TaqMan-PCR eingereicht.

Überweisung liegt bei  Selbstzahler  Besonderheiten

Mit freundlichen Grüßen Infektionsambulanz  
der Universität

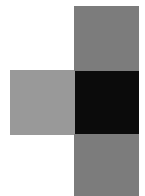
„Viruslast“

„Helfer-  
zellen“



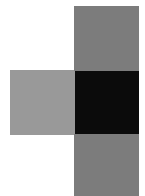
„Viruslast“ = Quantitativer HIV-1-RNA-Nachweis –  
wofür brauchen wir ihn ?

- Patienten mit bekannter HIV-Infektion:
  - Wichtiger prognostischer Parameter bei unbehandelten Patienten
    - Viruslast im „steady state“ korreliert mit der Wahrscheinlichkeit, eine AIDS-Erkrankung zu entwickeln
  - Zentraler Parameter für die Erfolgskontrolle der antiviralen Therapie
    - Ziel: keine virale RNA im Plasma mehr nachweisbar
- Patienten ohne bekannte HIV-Infektion:
  - Abklärung bei unklaren Befunden in HIV-Suchtests
  - Frühdiagnose der Infektion (vor der Serokonversion)
  - Einsatz im Blutspendewesen zusätzlich zu Antikörpertests seit 1.4. 2004 vorgeschrieben (qualitativ, Pooltestung)



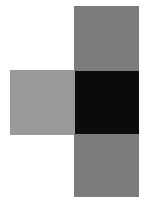
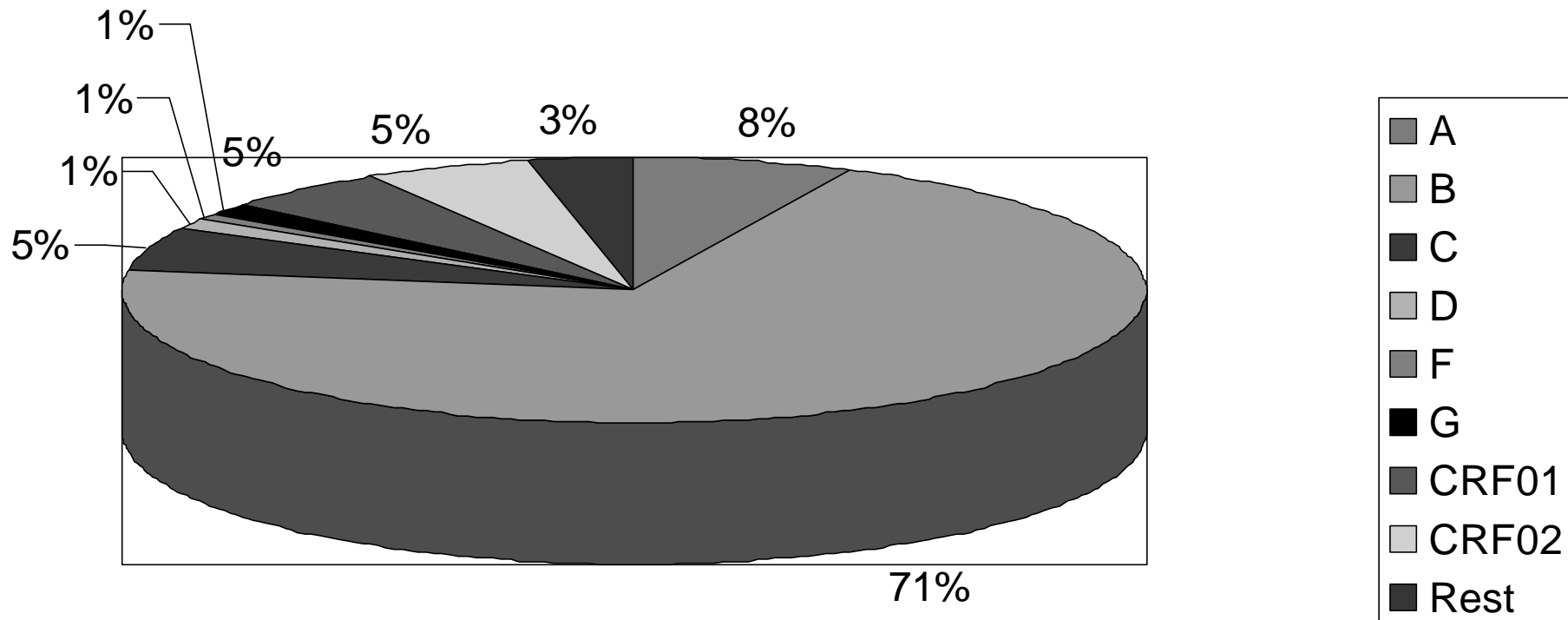
# HIV-Nomenklatur und relative Anteile an den HIV-Infektionen (ca. 65.000) in Deutschland

- HIV-1 ca. 99,5 %
  - Gruppe M (Major) > 99,9 %
    - Subtypen A, **B**, C, D, F, G, H, J, K
    - Sub-Subtypen A1, A2 und F1, F2
    - CRF01 - CRF43 (Intersubtyp-Rekombinanten)
  - Gruppe O (Outlier) < 0,1 %
  - Gruppe N (between M and O) < 0,01 %
  - Gruppe P < 0,01%
  
- HIV-2 ca. 0,5 %
  - Gruppen A-G
  - CRF01\_AB



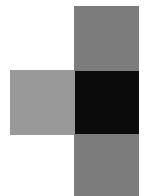
# Welche Subtypen gibt es bei uns ?

Subtyp-Analyse von Einsendungen an das NRZ zur HIV-Resistenztestung 1/2005 – 4/2008 (n = 1081)

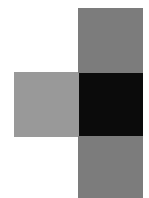
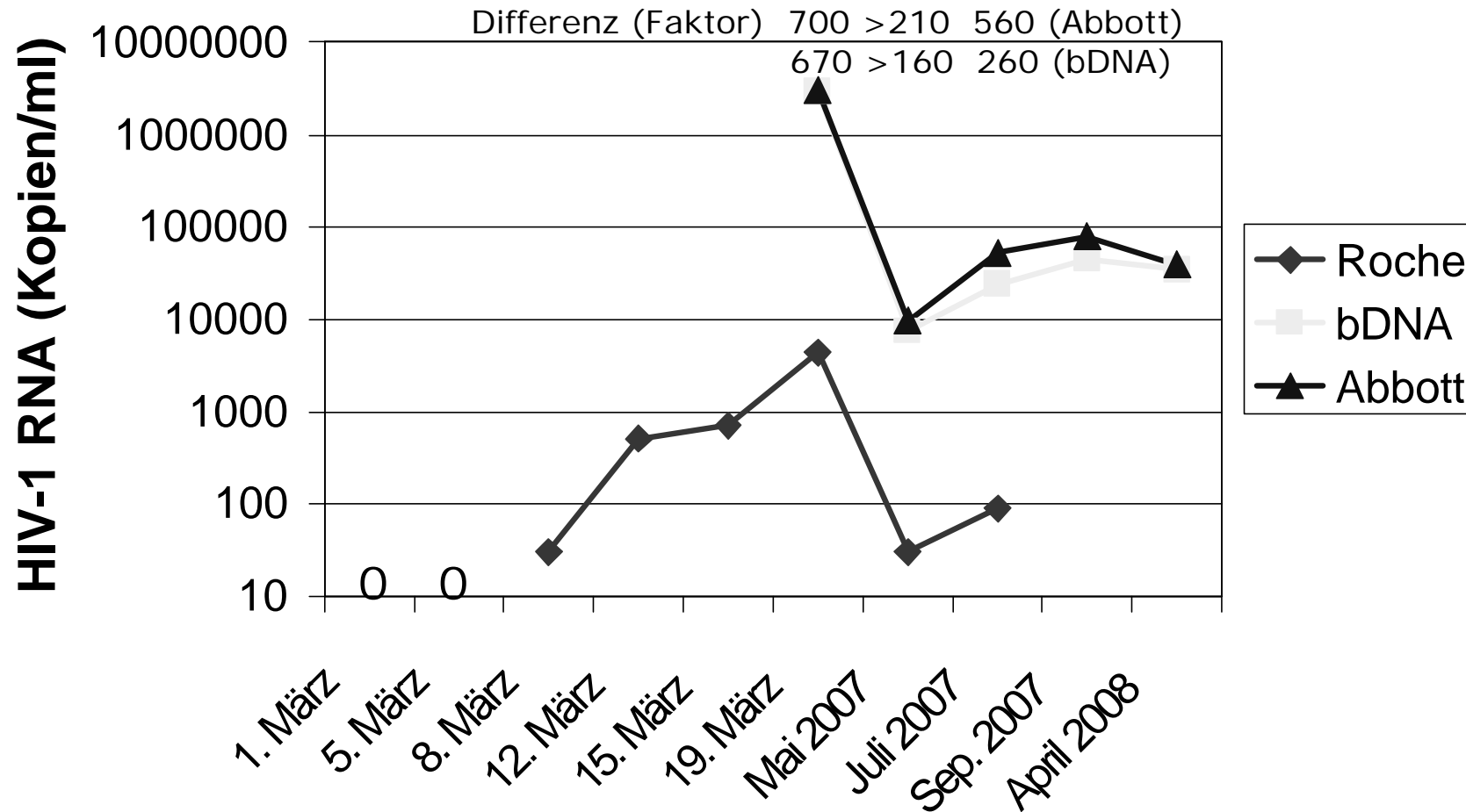


.... zurück zu unserem Fall: HIV-1-RNA in unterschiedlichen Tests im Vergleich

Proben-Datum	Roche Cobas TaqMan (1.0)	Branched-DNA 3.0	Abbott real-time
30.04.2007	pos. / <47 Kopien/ml		
02.05.2007	pos. / <47 Kopien/ml		
15.05.2007		7.600 Kopien/ml	9.700 Kopien/ml

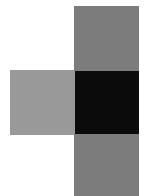


# noch mehr Vergleichsdaten - grafisch aufgepeppt ...

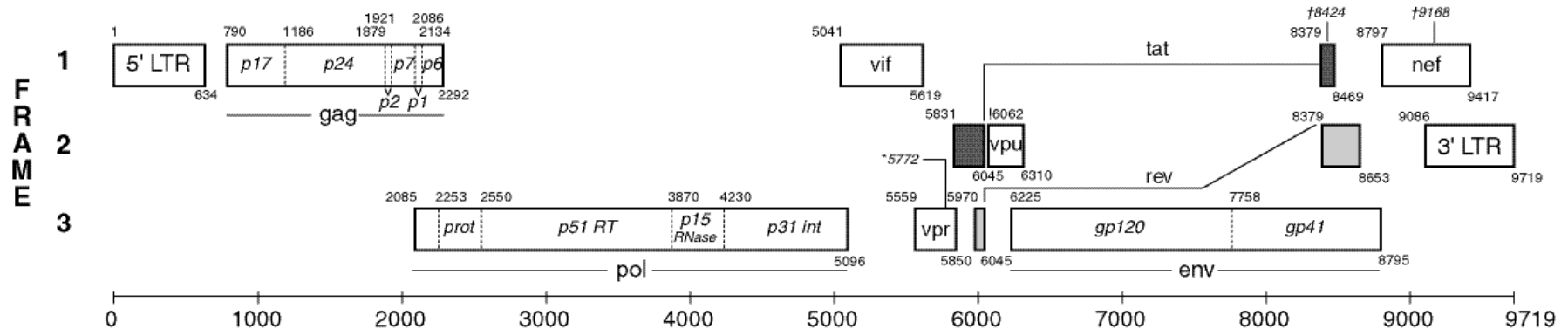


## Nähere Analyse des Virus

- Sequenzierung im pol-Bereich (Resistenztestung, ca. 1200 bp)
  - „ganz gewöhnlicher“ Subtyp B
  - Kein Hinweis auf Resistenzen
- Weitere Sequenzanalysen aus proviraler DNA:
  - LTR: ebenfalls Subtyp B (ca. 300 bp)
  - Gag: Subtyp B (ca. 900 bp)
  - Integrase: Subtyp B (ca. 800 bp)



# Amplifikationsbereiche verschiedener Tests zur HIV-1-Viruslastbestimmung

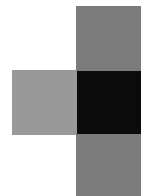


Amplifizierte Bereiche kommerzieller Viruslast-Tests\*:

- Roche Cobas Amplicor (155 bp)
- Bio-Merieux NASBA (127 bp)
- Roche Cobas TaqMan (157 bp)
- bDNA (> 30 Sonden)

\*grau: genaue Lage nicht bekannt      — Abbott real-time

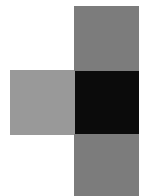
5'-Ende: gleich bei Cobas Amplicor, Cobas TaqMan und NASBA  
 3'-Ende: 2 Basen verschoben gegenüber Cobas Amplicor  
 Länge der Primer und Lage/Länge der TaqMan-Sonde unklar





# Wie häufig sind Mutationen an dieser Position ?

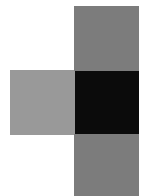
- Analyse von insgesamt 613 HIV-Sequenzen aus der Los Alamos HIV-Database:
  - 9 Sequenzen (1,5 %) haben „G“ statt „A“ an dieser Position
  - 5 Sequenzen (0,8 %) haben „T“ statt „A“ an dieser Position
  - Alle 14 sind non-B-Subtypen
- Unterquantifizierte Proben:
  - 5 von 8 in diesem Bereich sequenzierten Proben haben „C“
  - 3 von 8 in diesem Bereich sequenzierten Proben haben „T“
  - 4 von 8 sind Subtyp B !
- Kein ganz exotisches Problem
- Anfang 2009 kam ein geänderter Test (Version 2.0) mit zusätzlicher Amplifikation im LTR auf den Markt



# Zurück zu Frage 1: Ist das Virus vorhanden ?

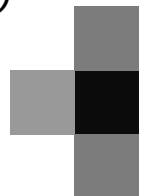
## ■ Fragestellungen für qualitative/semiquantitative Nukleinsäure-Diagnostik

- Infektionssicherheit: HIV, HCV, HBV, (HAV, Parvovirus B19, WNV)
- Liquordiagnostik: Herpesviren, Enteroviren,....
- Respiratorische Infektionen: Influenza, RSV, Parainfluenzaviren, Adenoviren, Enteroviren ....
- Gastrointestinale Infektionen: Noroviren, Rotaviren, Adenoviren, Astroviren
- Pränatale Infektionen: Röteln, CMV, Parvovirus B19
- Perinatale Infektionen: HIV, HBV, HCV, CMV
- Transplantationsmedizin: persistierende Viren (Herpesviren), fehlende/verzögerte Immunantwort



## Frage 2: Wieviel virale DNA/RNA ist vorhanden ?

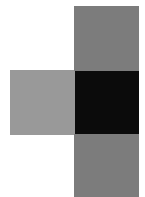
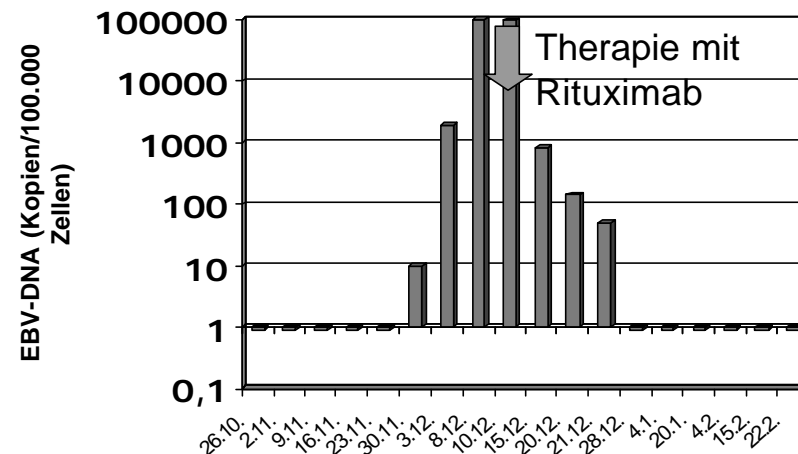
- HIV:
  - als prognostischer Marker und für das Therapiemonitoring
- HCV:
  - Therapiemonitoring (Kinetik), prognostisch Genotyp wichtiger
- HBV:
  - Prognose (HCC-Risiko), Therapiemonitoring mit HBe-Antigen und HBs-Antigen
- CMV:
  - bei Immunsuppression (Transplantation u.a.) für Prognose, präemptive Therapie und Therapiemonitoring
- EBV:
  - Früherfassung PTLD nach Transplantation, präemptive Therapie
- BK-Virus:
  - Prognostischer Marker für PVAN (Polyomavirus-assoziierte Nephropathie)
- Adenoviren, HHV-6



# Beispiel: Monitoring der EBV-Virämie nach Transplantation zur präemptiven Therapie

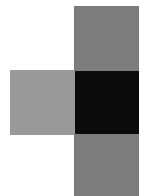
- PTLD: Lymphoproliferationen nach Organtransplantation, zunächst reversibel, später z. T. hochmaligne Lymphome

Verlauf der EBV-Viruslast im Blut  
(Z. n. Stammzelltransplantation)



## Frage 3: Wie sieht das Virus aus ? Charakterisierung der viralen Nukleinsäure

- als individueller prognostischer Parameter
  - HCV-Genotypisierung
  - HBV-Genotypisierung
  - HIV-Korezeptor-Tropismustestung
  - Papillomvirus-(HPV)-Typisierung
- Suche nach resistenzassoziierten Mutationen
  - HIV, HBV, Influenzaviren, CMV, HSV
- für epidemiologische Zwecke
  - Influenza-A-Viren
  - Enteroviren (Identifizierung von Ausbrüchen einzelner Serotypen)
- Sequenzvergleiche zur Verfolgung von Infektionsketten
  - HIV, HCV, HBV, Noroviren, HAV ....



# Möglichkeiten der molekularbiologischen Virustypisierung

## ■ Spezifische Amplifikation

- Typspezifische PCR (z. B. neue Influenza)
- Allel- bzw. mutationsspezifische PCR (Detektion geringer Anteile von Mutanten in einem Hintergrund von Wildtyp)

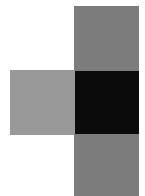
## ■ PCR-Fragmentanalyse

- Restriktionsenzymspaltung
- Schmelzkurvenanalyse
- Massenspektrometrie u. a.

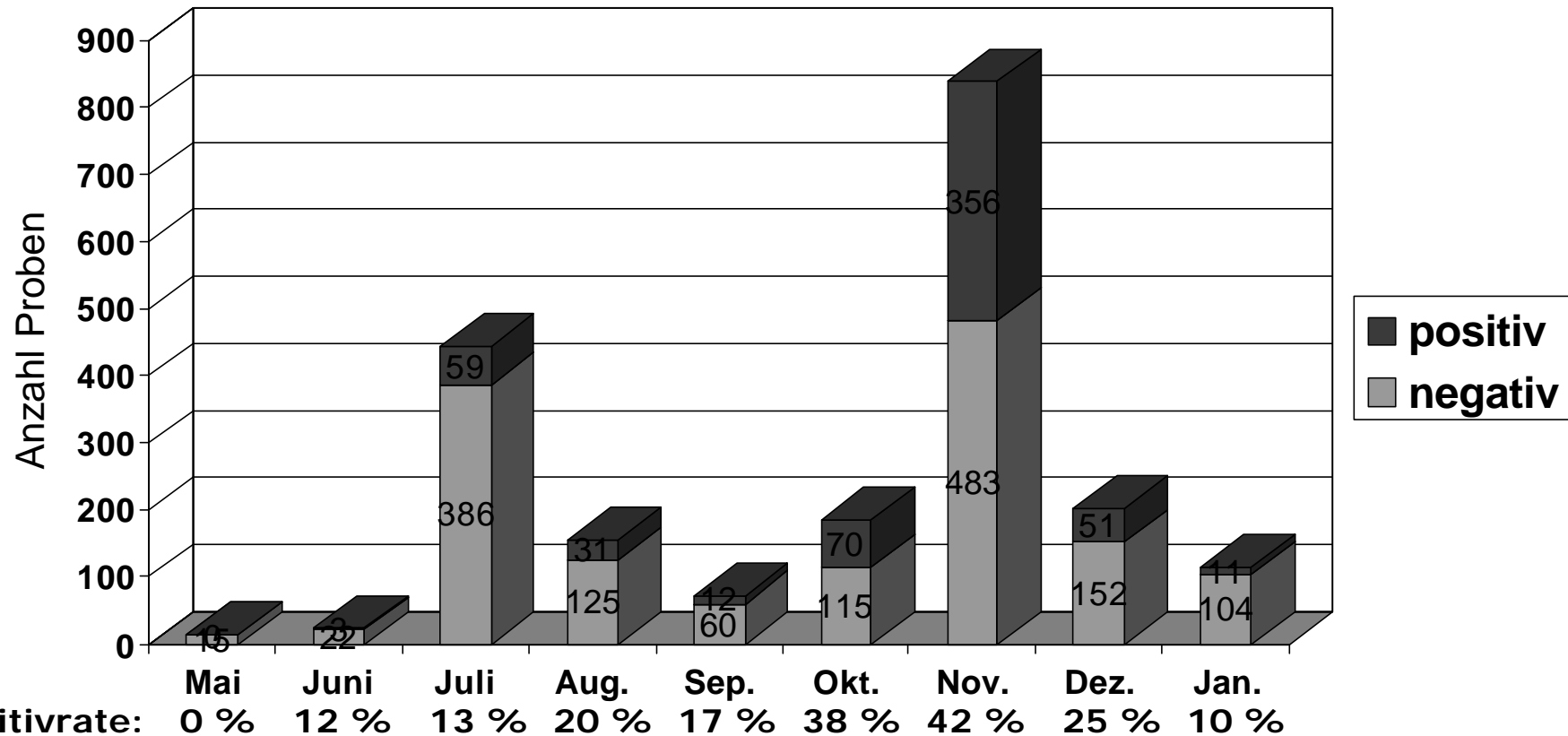
## ■ Hybridisierung von PCR-Produkten

- Reverse Hybridisierung (LiPA-System)
- Arrays, Gene Chips

## ■ Sequenzierung von PCR-Produkten

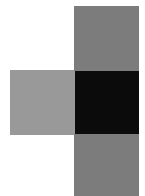


# Typspezifische real-time-PCR zum Nachweis der neuen Influenza A H1N1: eine Bilanz aus Erlangen

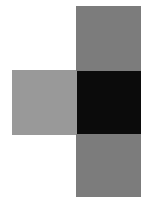
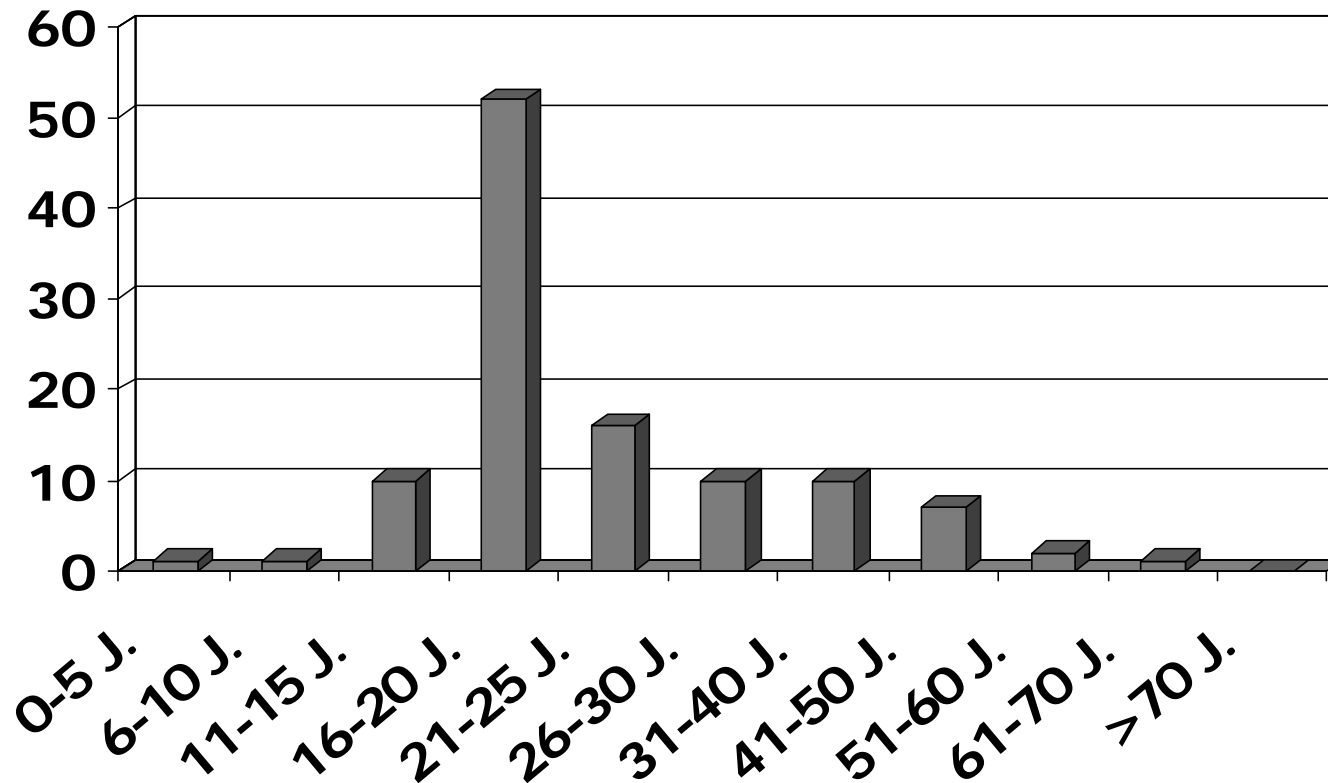


insgesamt 593 positive Proben, alle (!) neue Influenza

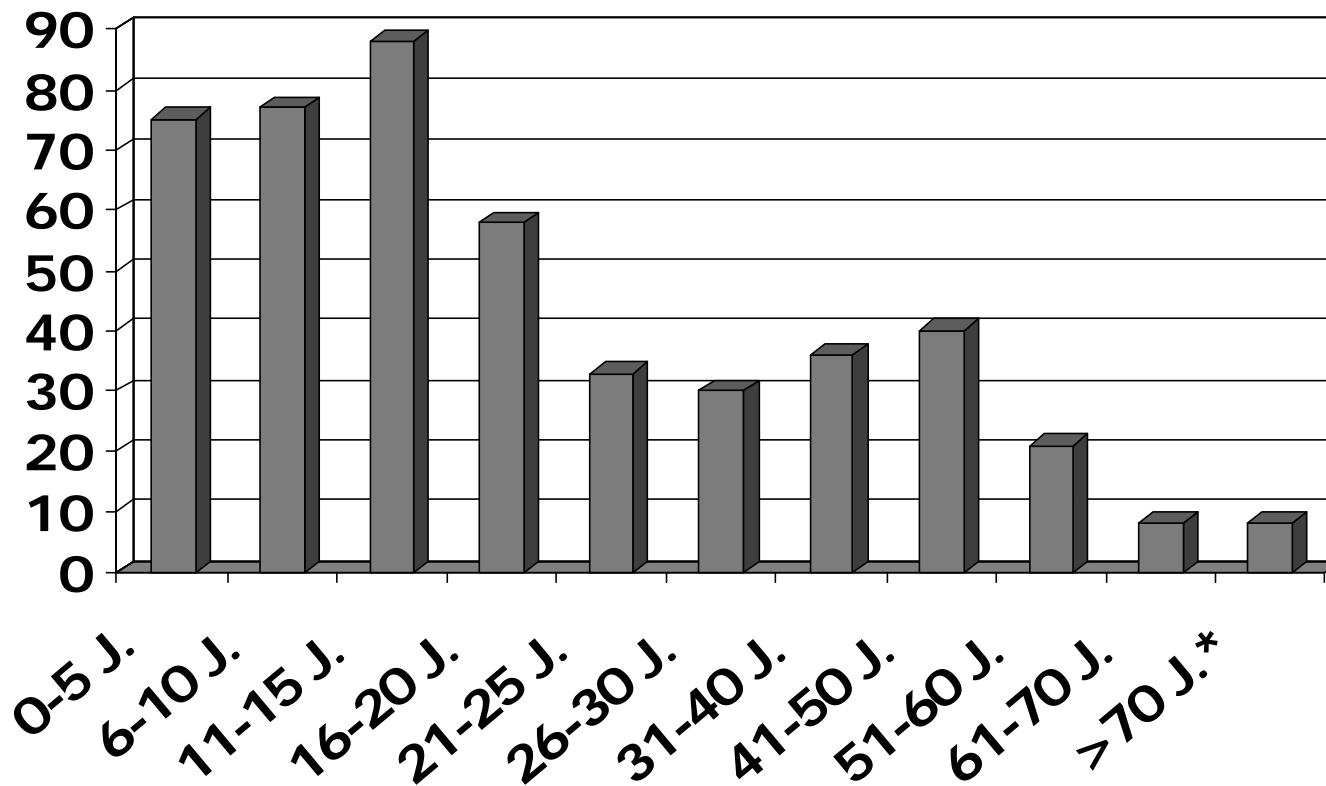
Universitätsklinikum  
Erlangen



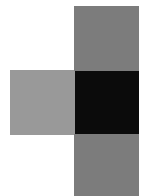
# Altersverteilung der diagnostizierten Fälle bis 30.09.09 (n=110)



# Altersverteilung der diagnostizierten Fälle ab 01.10.2009 (n=475)

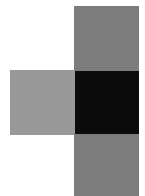


\*davon 2 über 80 J.



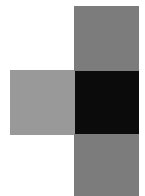
# Neue Influenza A H1N1: Mythen und Fakten

- War ja alles halb so schlimm, wurde maßlos übertrieben
  - trifft in Bezug auf die Schwere im Vergleich mit H5N1 sicher zu
  - Saisonale Influenza: keine vergleichbare Datenbasis
  - Intensiv- und ECMO-Kapazitäten waren zur Peak-Zeit vielerorts voll ausgelastet, teils sogar überlastet
  - Von den (wenigen) älteren Patienten im Erlanger Klinikum ist fast die Hälfte verstorben
  - Mortalität bei Kindern (USA) zwar niedrig, aber vergleichbar mit saisonaler Influenza
  - Hinterher ist man immer schlauer



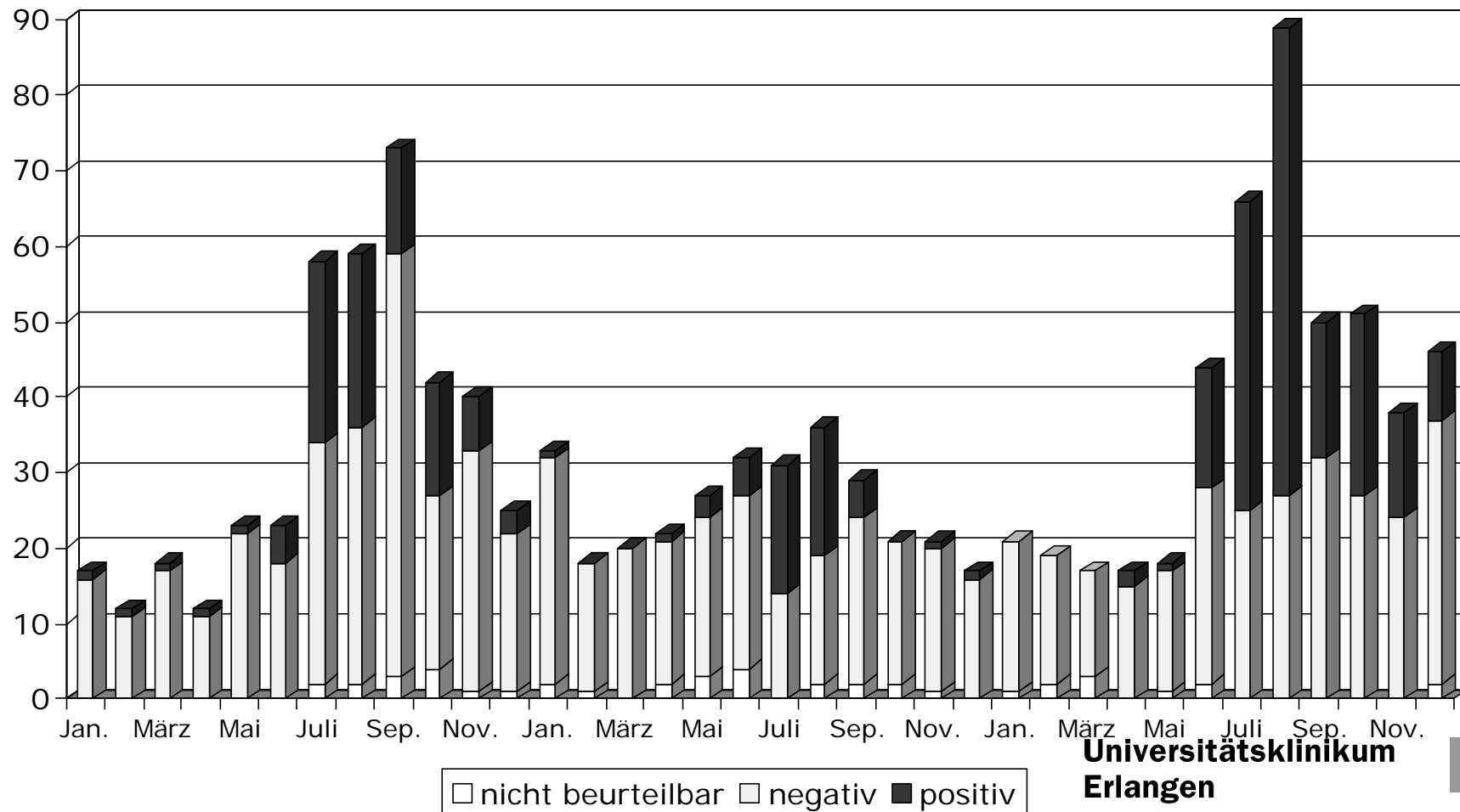
# Neue Influenza A H1N1: Mythen und Fakten

- Propagierung der Impfung dient nur den Interessen der Pharmaindustrie
  - Der Impfstoff fällt nicht vom Himmel, wenn man ihn braucht
  - Produktion ist aufwändig, Aufbau neuer Kapazitäten erfordert(e) jahrelange Vorarbeit
  - Produktionsbeginn muss „auf Verdacht“ erfolgen
  - Obwohl die Produktion des Impfstoffs sehr früh begonnen wurde und Optimierung der Ausbeute (z. B. mit Adjuvantien) versucht wurde, war viel zu wenig Impfstoff verfügbar, als man ihn sinnvoll hätte einsetzen können (Ende Oktober, Anfang November)
  - Wer hat ein so drastisches Abflauen der Epidemie prognostizieren können ?

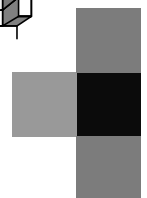


# Nested-PCR mit Typisierung durch Sequenzierung: Picornavirus-PCR in Erlangen 2006 – 2008

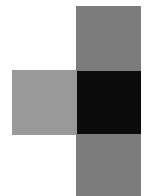
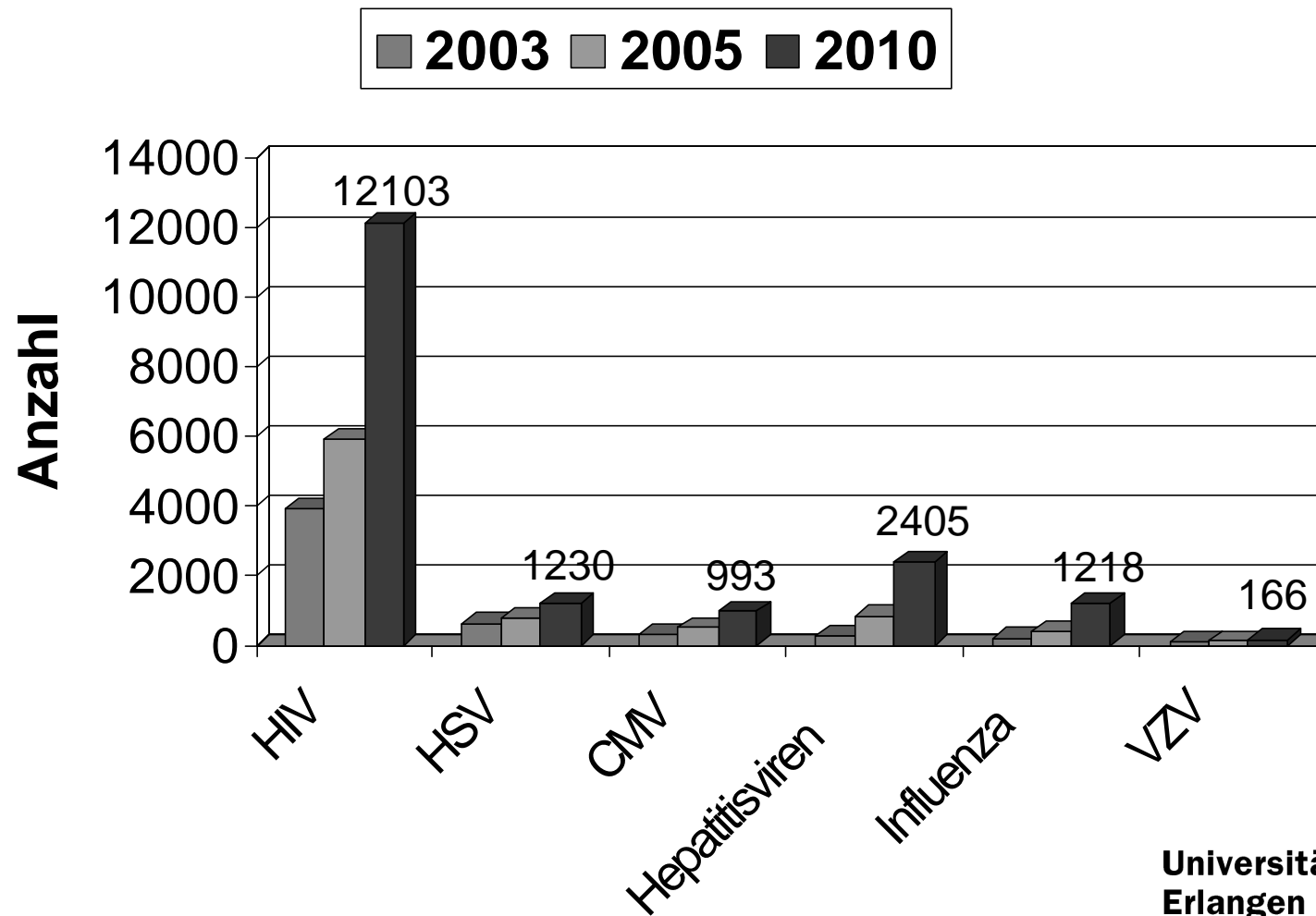
2008: 39 % positive Einsendungen, davon 81 % Echovirus 30



Universitätsklinikum  
Erlangen



# Auf der Suche nach Resistenzen: PubMed-Zitate zum Stichwort „drug resistance“



# Viele Medikamente – viel Resistenz ? Virostatika zur Behandlung der HIV-Infektion

## ■ Nukleosidanaloga



## Fusionsinhibitor



## ■ NNRTI



## CCR5-Antagonist



## ■ Proteaseinhibitoren

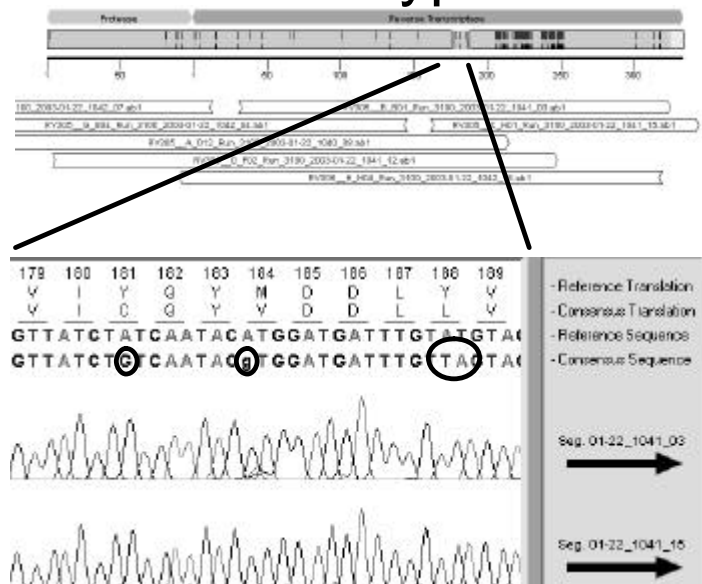
## Integrase-Inhibitor



ersitätsklinikum  
ngen

# Extrembeispiele gibt es durchaus ...

## Genotyp



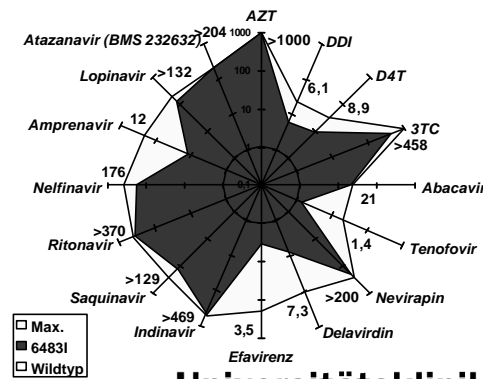
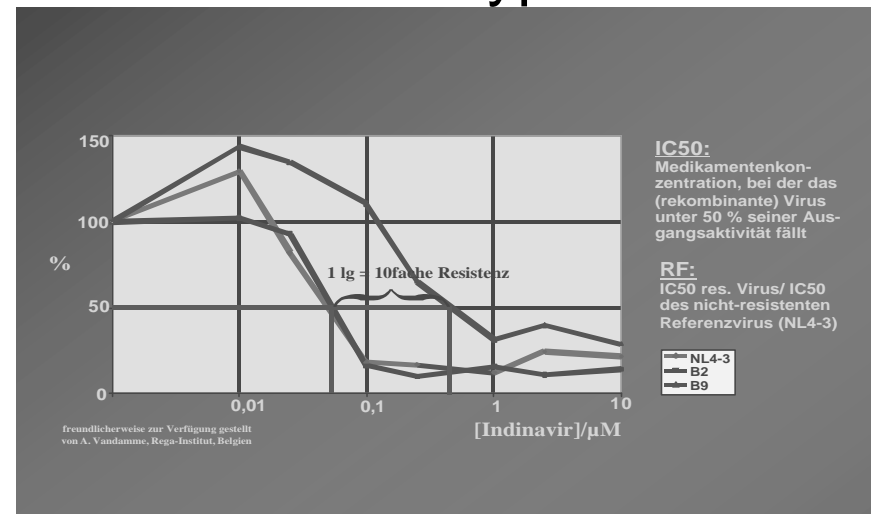
Protease:

V3I, **L10I**, **L33F**, E34Q, **G48V**, I54T, D60E, I62V, **L63P**, A71I, **V77I**, **V82S**

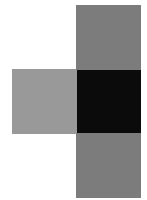
Reverse Transkriptase:

K20R, V35L, T39A, **M41L**, K43E, **E44D**, **D67N**, **L74V**, R83K, **K101R**, **V118I**, E122K, D123E, K166E/K/Q, D177E, V179L, **Y181C**, **M184V**, G196E, T200A, E203D, **H208Y**, **L210W**, R211K, L214F, **T215Y**, H221Y, E224D, A288S, E297K

## Phänotyp

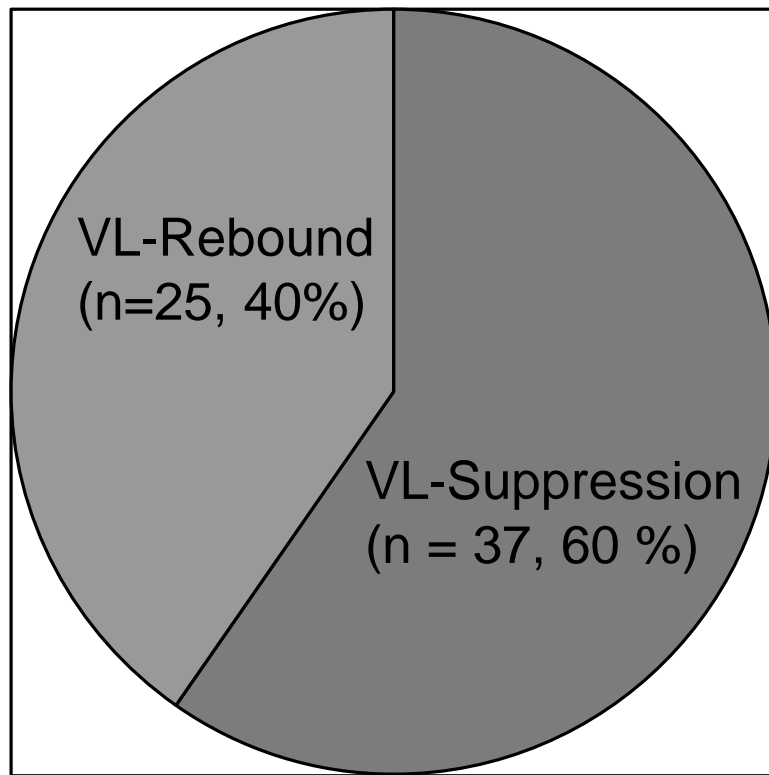


Universitätsklinikum  
Erlangen

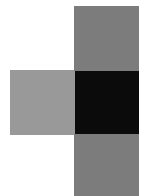


.... aber die Therapie wird immer besser:  
Viruslastverlauf bei 100 konsekutiven  
Patienten 2001

62 Patienten auswertbar (initialer Abfall der Viruslast  
und > 12 Monate follow-up)

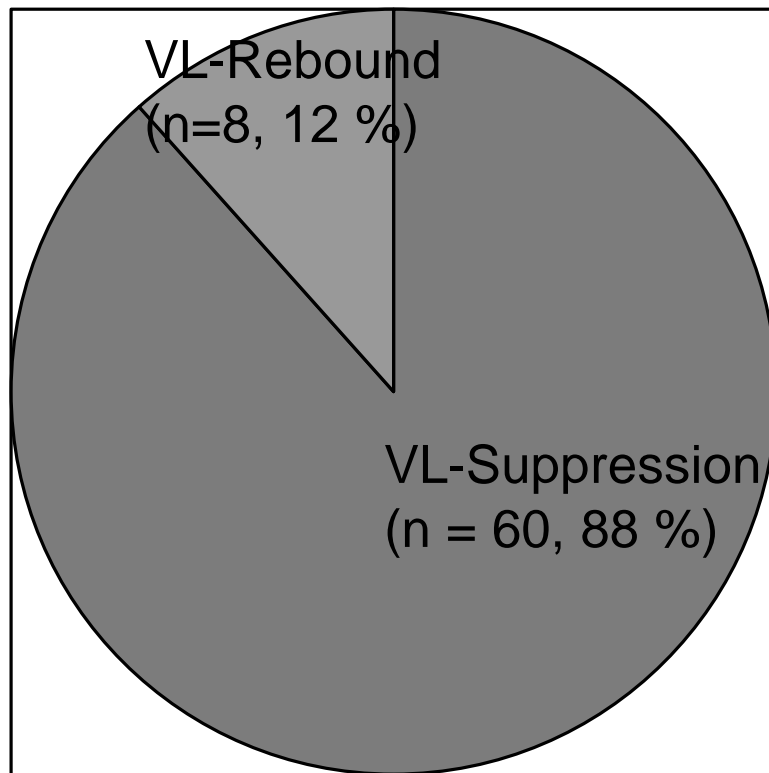


- Patienten mit anhaltender Viruslast-Suppression:
  - mittlere Dauer: 30 Monate (12 - 50 Monate)
- Patienten mit Viruslast-Rebound:
  - mittlere Dauer der Suppression: 13 Monate (2 - 34 Monate)

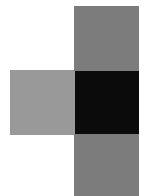


# Viruslastverlauf bei 120 konsekutiven Patienten 2008

68 Patienten auswertbar (initialer Abfall der Viruslast und > 12 Monate follow-up)

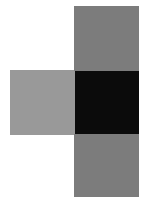


- Patienten mit anhaltender Viruslast-Suppression:
  - mittlere Dauer: 65 Monate (12 - 142 Monate)
- Patienten mit Viruslast-Rebound:
  - mittlere Dauer der Suppression: 40 Monate (4 - 112 Monate)

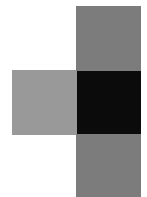
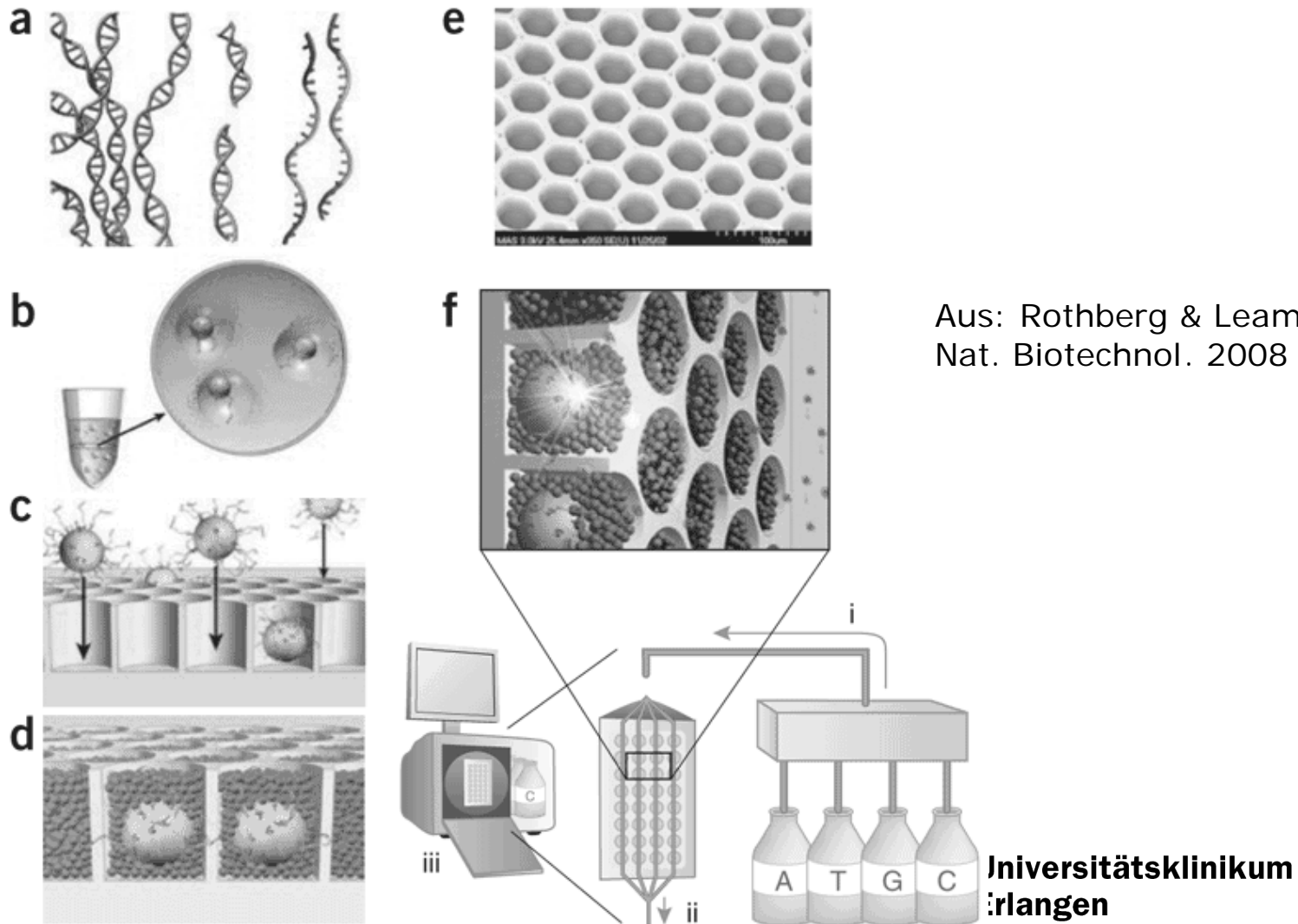


# Resistenz bei unbehandelten Patienten: Daten aus Deutschland

- CATCH-Studie (1996 – 2002, retrospektiv):
  - 2208 Therapienaive aus 19 Ländern
  - Gesamt: 230 (10,4 %); D: 14/62 (23 %)
- SPREAD-Studie (2003, prospektiv):
  - D: 12,9 % (20/155)
- Serokonverter-Studie (1996 - 2004):
  - 15,5 % (78/504)
- RESINA-Studie (2001 – 2004):
  - 12,3 % (71/584)
  - Patienten mit chronischer Infektion vor geplanter Therapie
  
- Häufig nur eine Mutation, keine ausgeprägten Resistenzen

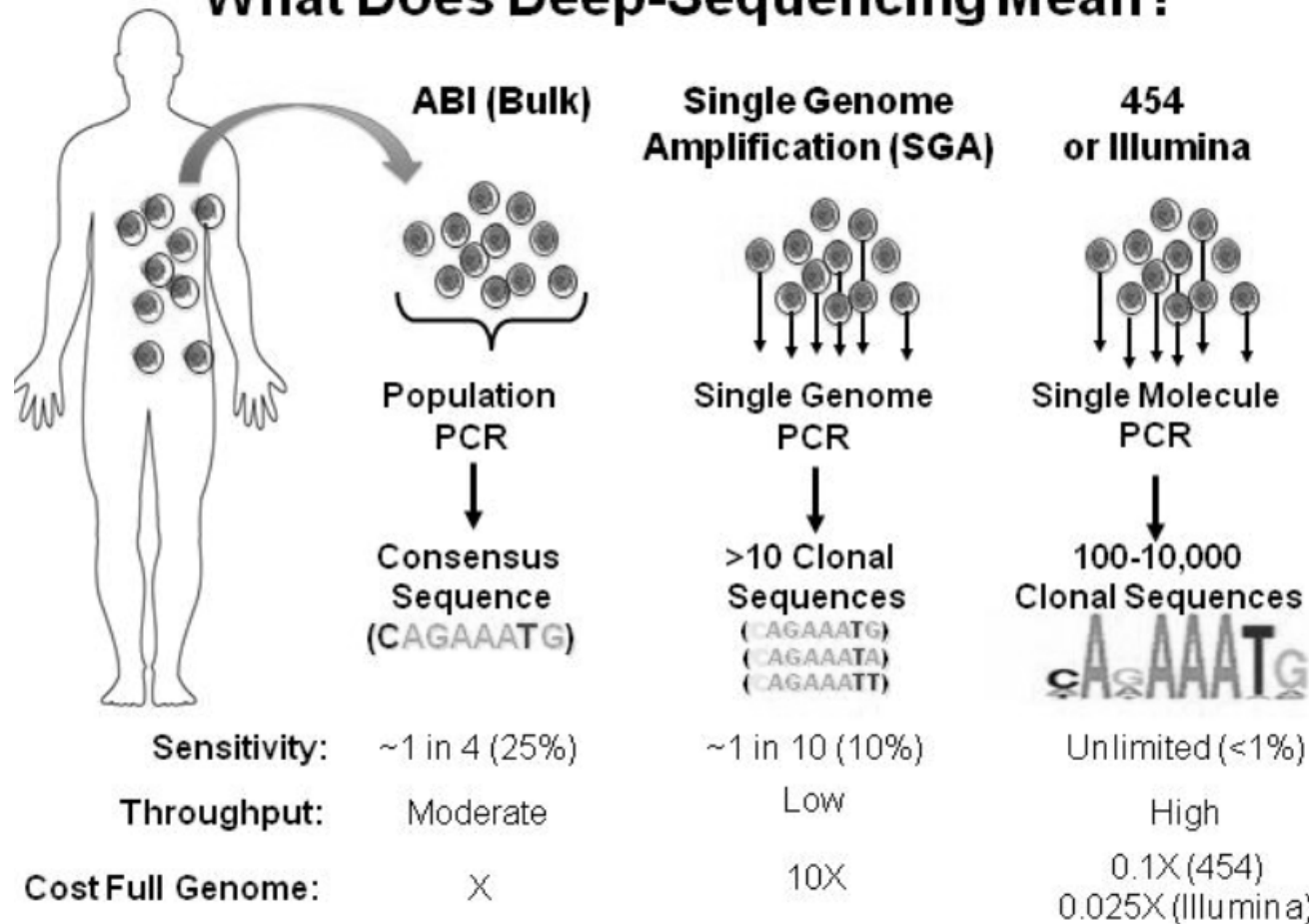


# Was steht vor der Tür ? „Ultra-deep sequencing“

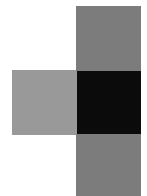


# zur detaillierten Analyse der Viruspopulation (z. B. Minoritäten resistenter Viren)

## What Does Deep-Sequencing Mean?



Source: Matthew Henn, CROI 2010, San Francisco



# Zur detaillierten Analyse der Viruspopulation (z. B. Minoritäten CXCR4-troper Viren)

**Table 1. Analysis of V3 loop sequences from day 1 sample single clone identified using the BLAST algorithm**

Sequence	% frequency	Number	Predicted genotype
CTRPNNNTRKGSINVGPGRAPYATGEIIGNIRKAY	27.771	1139	R5
.I.....L.....	15.907	652	R5
...S.....	7.865	322	R5
.I.....G.HL...G....D...D...R.H	4.892	200	R5
.I.....G.HL...L.....	3.756	154	R5
.I.....G.HL...G....D...D...H	1.506	61	R5
.I.....G.RL...G....D...D...H	1.367	56	R5
.I.....L.....R..	0.414	16	R5
.I...D...G.HL...L.....	0.292	11	R5
.....X.....	0.244	10	R5
.....G.....	0.195	8	R5
..G.....	0.171	7	R5
.....V.....	0.171	7	R5
.....X.....	0.146	5	R5
...S...G.....	0.146	5	R5
...D.....	0.146	5	R5
.I.....L...V.....	0.146	5	R5
.I..S.....L.....	0.146	5	R5
.I..T.....L.....	0.122	5	R5
.IS.....L.....	0.122	5	R5
.I.....R.....L.....	0.122	5	R5
...S.....G.....	0.122	5	R5
.....E..	0.122	5	R5
.I.....R.YI...G.....D.....	0.024	1	CXCR4-using

**Table 2. Analysis of V3 loop sequences from day 11 sample**

Sequence	% frequency	Number	Predicted genotype
CIRPNNNTRKRIYIGPGGAFYATGEIIGDIRKAY	36.974	3058	CXCR4-using
.T.....	11.807	976	CXCR4-using
.....SVH.....D.....H	9.973	825	R5
.T.....N.....	1.755	145	CXCR4-using
.....R..	0.797	65	CXCR4-using
.....X.....	0.363	30	CXCR4-using
.....G.....	0.193	15	CXCR4-using
.....G.....	0.193	15	CXCR4-using
RT.....	0.145	11	CXCR4-using
.....V.....	0.133	11	CXCR4-using
.T.....S.NV...R.....N.....	0.133	11	R5
.....G...	0.133	11	CXCR4-using
R.....	0.121	10	CXCR4-using
.....SVH.....D...G...H	0.121	10	R5
.....R.....	0.121	10	CXCR4-using
...D.....	0.121	10	CXCR4-using
.....L.....	0.121	10	CXCR4-using
...S.....	0.121	10	CXCR4-using
.....T.....	0.109	9	CXCR4-using
...S.NV...R.L.....N.....	0.109	9	R5
.....E..	0.109	9	CXCR4-using

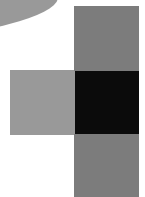
Source: L. Swenson, R. Harrigan, CROI 2010, San Francisco  
**Universitätsklinikum Erlangen**

oder als „Unbiased high-throughput sequencing“:

Palacios et al.: A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases, NEJM 358(2008), 991ff

- RNA-Extraktion aus:
  - Hirn, Niere, Leber, Serum, Liquor von Empfänger 1
  - Serum und Liquor von Empfänger 2
- DNase-Verdau, reverse Transkription, random-Primer-PCR einzeln
- Weitere Schritte aus gepoolten PCR-Produkten
- 103632 Sequenzfragmente, Größe 45 – 337 nt

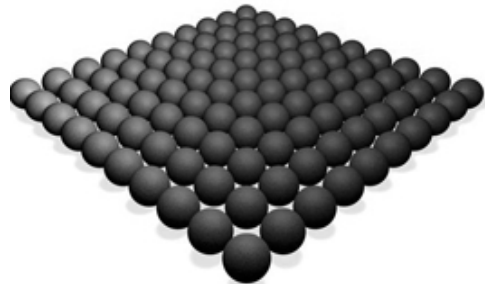
At the nucleotide level, sequence data were uninformative; however, BLASTX analysis of the deduced protein sequence revealed 14 fragments that were consistent with Old World arenaviruses



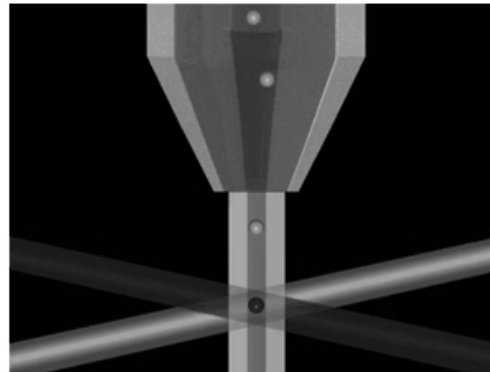
# Frage 4: Ist **ein** Virus vorhanden ?

## Möglichkeiten der Multiplex-Analyse

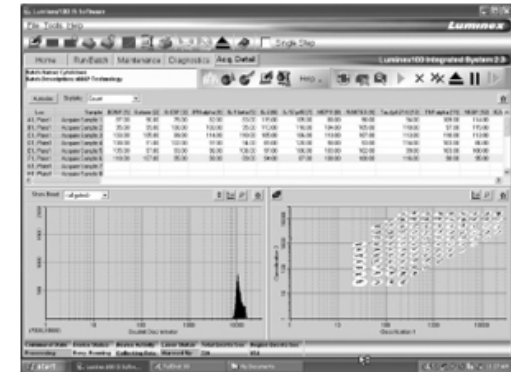
### ■ Luminex-Technologie



100 colour-codes is equivalent to 100 different simultaneous analytes.

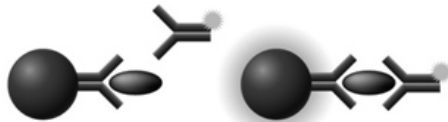


Red laser determines bead classification and the green laser excites the PE reporter.



The IS software calculates the concentration of each analyte in reference to a standard curve.

#### Immunoassay



#### Nucleic Acid Assay



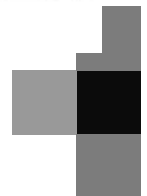
#### Enzyme Assay



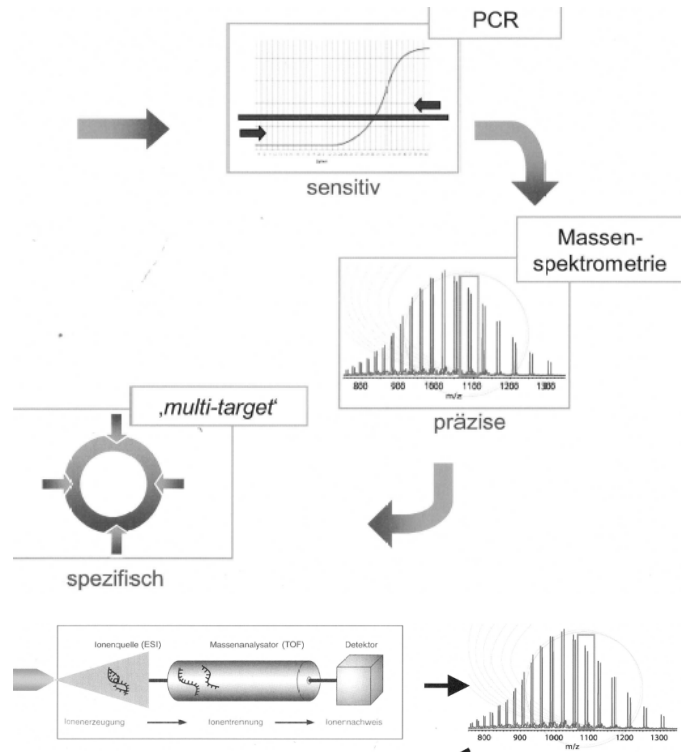
#### Receptor-Ligand



Universitätsklinikum  
Erlangen

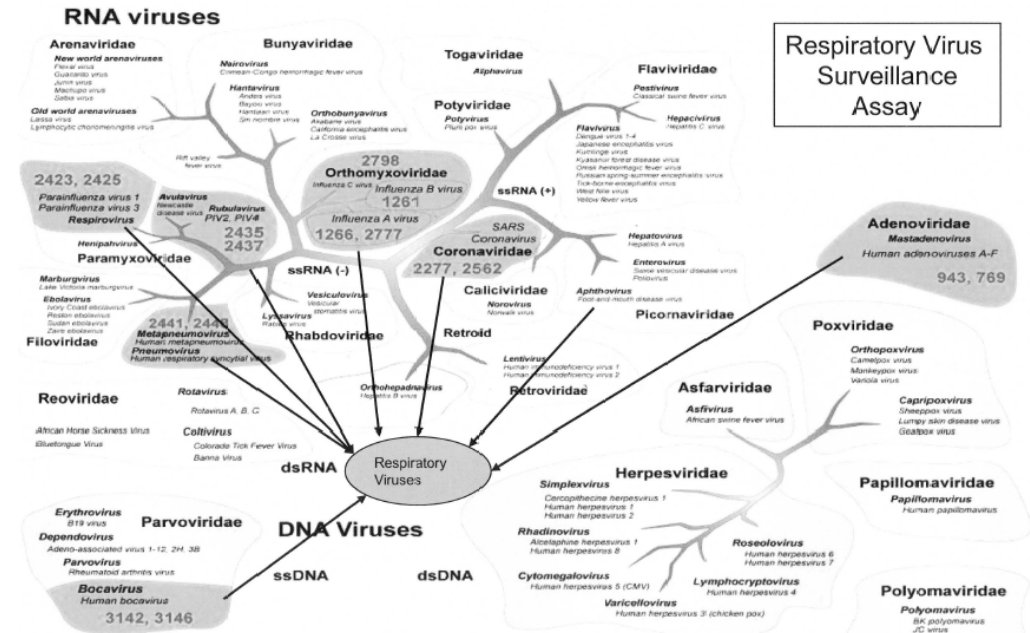


# Eine weitere Möglichkeit der Multiplex-Analyse: Kombination real-time-PCR und ESI-TOF



**Signal Processing  
Masses to Base Compositions**

#	Mass	Base Count	Quantity
1	35875.03	A <sub>25</sub> G <sub>35</sub> C <sub>30</sub> T <sub>26</sub>	4260
2	35297.70	A <sub>29</sub> G <sub>33</sub> C <sub>27</sub> T <sub>25</sub>	1948
3	35619.87	A <sub>26</sub> G <sub>36</sub> C <sub>29</sub> T <sub>24</sub>	1555
4	36196.21	A <sub>23</sub> G <sub>37</sub> C <sub>31</sub> T <sub>26</sub>	1306
5	35297.70	A <sub>29</sub> G <sub>33</sub> C <sub>27</sub> T <sub>26</sub>	1949
6 (IC)	33734.22	A <sub>19</sub> G <sub>21</sub> C <sub>17</sub> T <sub>27</sub>	1000



# Jedes Jahr werden neue Viren entdeckt (bzw. Viren neu entdeckt) - Beispiele

## ■ Respiratorische Viren

- 2000: humanes Metapneumovirus
- 2003: SARS-Coronavirus
- 2004: Coronaviren NL-63 und HKU1
- 2005: Bocavirus (neues Parvovirus)
- 2007: Polyomaviren KI und WU

## ■ andere:

- 2006: XMRV (Retrovirus, Assoziation mit Prostatakarzinom und „chronic fatigue syndrome“)
- 2008: MC-Polyomavirus (Assoziation mit Merkelzell-Karzinom)
- 2008: neues Arenavirus bei Transplantationspatienten
- 2009: Arenavirus „LuJo“ (hämorrhagisches Fieber)

