

Möglichkeiten und Grenzen der DNA-Sonden in der Mykobakterien-Diagnostik

Potential and limitations of DNA-probes for the diagnosis of mycobacterium infections

Ruxandra Enzensberger^{1,2}, C. Schneider¹, V. Brade¹

Zusammenfassung

Im Rahmen einer retrospektiven Studie wurde die Leistungsfähigkeit einer kommerziellen nicht-radioaktiven DNA-Sonde zur Schnellidentifizierung von Mykobakterien in Kultur untersucht. Der hier eingesetzte Test beruht auf einer Hybridisierung der Mykobakterien-rRNA mit einer Chemilumineszenz-markierten DNA-Sonde. Insgesamt wurden 116 Flüssig-(Bactec 460TB) und 67 Festkulturen (Löwenstein-Jensen) mit spezifischen DNA-Sonden auf *M. tuberculosis*-Komplex, *M. avium*-Komplex oder *M. kansasii* getestet. Als Referenzmethode diente die konventionelle Identifizierung mittels biochemischer und kultureller Verfahren. Die *M. tuberculosis*- und die *M. avium*-Sonden zeichneten sich durch eine hohe Sensitivität aus (96,5 % bzw. 98 %). Bei bluthaltigen Materialien muß allerdings mit schwach falsch-positiven Reaktionen gerechnet werden. Eindeutig weniger zuverlässig erscheint demgegenüber die *M. kansasii*-Sonde, die 2 von 13 gesicherten Kulturen nicht erkannte. Durch Verwendung des Bactec-Systems und anschließender Testung mit spezifischen Accu-Probe-Tests wurde die Mykobakterien-Diagnostik für *M. tuberculosis* im Mittel auf 16 Tage und für *M. avium*-Komplex auf 21,8 Tage verkürzt.

Schlüsselwörter

DNA-Sonden – Chemilumineszenz – *M. tuberculosis* – *M. avium*-Komplex – Sensitivität – Spezifität

Summary

The performance of a commercial non-radioactive DNA-probe for the rapid detection of mycobacteria in culture was retrospectively assessed. The test is based on the hybridisation of mycobacterial rRNA with an acridinium-ester-labeled DNA-probe which is detected by chemiluminescence. A total of 116 Bactec TB broth cultures and 67 cultures on Löwenstein-Jensen medium were probed for *M. tuberculosis*-complex, *M. avium*-complex or *M. kansasii*. Results were compared to those obtained by conventional biochemical and cultural techniques. The *M. tuberculosis* and the *M. avium* assays proved to be highly sensitive (96.5 % and 98 %, respectively). However, weak false-positive reactions may occur with Bactec TB bottles if blood-containing specimens are processed. The *M. kansasii* probe failed to recognize 2 out of 13 confirmed cultures and thus appears to be less reliable than the *M. tuberculosis* and the *M. avium* tests. By using the Bactec 460 TB System in conjunction with specific DNA-probes, the detection time for *M. tuberculosis* and *M. avium*-complex was reduced to a mean of 16.0 days and 21.8 days, respectively.

Key words

DNA-probes – chemiluminescence – *M. tuberculosis* – *M. avium*-complex – sensitivity – specificity

Einleitung

Infektionen durch Mykobakterien haben in den letzten Jahren, nicht zuletzt als Folge der AIDS-Epidemie, an Bedeutung gewonnen. Ein positiver HIV-Serostatus gilt inzwischen als Hauptrisikofaktor für die Manifestation einer aktiven Tuberkulose, wohingegen bei fortgeschrittenem Immundefekt atypische Mykobakterien, allen voran *M. avium*-Komplex (MAC), als die häufigsten opportunistischen Bakterien in den Vordergrund rücken [1, 2, 3]. Da die klassische Humantuberkulose und die atypischen Mykobakterien unterschiedliche Prophylaxe- und Therapie-Maßnahmen erfordern, ist eine möglichst frühzeitige und korrekte Diagnose sowohl für den Patienten

¹ Abt. Med. Mikrobiologie im Zentrum der Hygiene, Klinikum der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/M.

² Korrespondenzadresse:
Dr. med. Ruxandra Enzensberger,
Abt. Med. Mikrobiologie, Zentrum der Hygiene, Klinikum der J. W. Goethe-Universität Frankfurt
Paul-Ehrlich-Str. 40
D-60596 Frankfurt am Main.
Fax: x49-69-63 01-57 67

als auch für seine Umgebung von essentieller Bedeutung [4]. Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Mykobakterien-Diagnostik, wie z. B. der Einführung einer kommerziellen PCR, bleibt der kulturelle Erregernachweis bis auf weiteres Goldstandard in der Labordiagnostik von Mykobakterien. Die nachfolgende Typendifferenzierung dieser Erreger mit klassischen Methoden ist immer noch eine aufwendige Prozedur, die mehrere Wochen in Anspruch nimmt [4, 5, 6].

Seit ca. 2 Jahren stehen Gen-Sonden zur Verfügung, mit denen man innerhalb von 2 Stunden die am häufigsten vorkommenden Mykobakterien in flüssiger oder fester Kultur durch Nukleinsäure-Hybridisierung identifizieren kann [7–12]. In dieser Arbeit werden die Erfahrungen unseres Mykobakterien-Laboratoriums mit einem kommerziellen Gen-Sondentest vorgestellt und die Vor- und Nachteile dieser Methode in der Routinediagnostik diskutiert.

Methoden

Kultur

Es wurden alle im Mykobakterien-Labor mit DNA-Sonden getesteten Mykobakterien-Kulturen retrospektiv ausgewertet. Die Isolate stammten ausnahmslos aus Routineeinsendungen des Klinikums und von umliegenden Krankenhäusern zwischen 1. 1. 1993 und 1. 3. 1994, wobei die Untersuchungsmaterialien in 54,6 % respiratorische Sekrete, in 14,2 % Blutkulturen, in 13,6 % Biopsien und in 9,7 % Punktate waren. Anderes Material war nur in 7,9 % der Fälle vertreten. Für die Isolierung wurden parallel drei Eiernährböden (nach Löwenstein-Jensen, Coletsos und Stonebrink) und Isotopen-markierte Middlebrook 7H9-Bouillon (Bactec 460 TB) verwandt, die bis zu acht Wochen bei 37° C bebrütet wurden.

Differenzierung mit DNA-Sonden

Visuell verdächtige Mikrokolonien bzw. signalpositive Bactec-Flaschen wurden gezielt mit spezifischen DNA-Sonden (Accu-Probe, Gen-Probe, San Diego) für *M. tuberculosis*-Komplex (MTBC), *M. avium*-Komplex (MAC), *M. kansasii* (MKA) und *M. gordonae* untersucht. Insgesamt wurden 183 Kulturen (116 Flüssig (Bactec)- und 67 Festkulturen) getestet. Da teilweise 2–3 verschiedene Sonden pro Kultur verwandt wurden, kamen 226 Accu-Probe-Assays zum Einsatz. Die Auswahl der DNA-Sonden erfolgte nach Kriterien der Wahrscheinlichkeit (s. Diskussion, Abb. 2).

Der Accu-Probe-Test beruht auf der Hybridisierung von Mykobakterien-rRNA mit spezifischen DNA-Sonden. Der Assay verläuft in 3 Schritten:

1. Freisetzung der Mykobakterien-RNA: Die Bakterienkultur wurde in einem Lysisreagenz aufgeschwemmt;

anschließend wurde in einem Ultraschallbad die Zellwand zerstört.

2. DNA-RNA-Hybridisierung: Nach Zugabe des Sondenreagenz bindet die Ziel-RNA an die komplementäre Test-DNA, die mit Acridiniumester markiert ist.
3. Detektion der gebildeten Hybride durch Chemilumineszenz: Durch Hydrolyse des Acridiniumesters entsteht Licht, das im PAL-Luminometer (Gen-Probe) gemessen wurde. Werte > 900 Lichteinheiten (LE) wurden als positiv, Werte < 600 LE als negativ interpretiert. Ergebnisse zwischen 600 und 900 LE gelten als fraglich.

Differenzierung mit konventionellen Methoden

Als Referenzmethode wurde die konventionelle Differenzierung mittels kultureller und biochemischer Methoden eingesetzt. Alle Mykobakterienisolate wurden mit einer Reihe von herkömmlichen Kulturverfahren untersucht, wie Pigmentbildung, Wachstumsgeschwindigkeit, Toleranz gegenüber 5 % NaCl, Temperaturbreite, Empfindlichkeit gegenüber Brenzschleimsäure-Hydrasid (BSH) oder Bildung eines Niveaus im halbflüssigen Medium (Lebek). Daneben wurde noch eine Vielzahl biochemischer Reaktionen geprüft: Niacintest, Nitratreduktase, Katalase bei 68° C, Arylsulfatase, Pyrazinamidase, saure Phosphatase, Tween-Hydrolyse, Kalium-Tellurit sowie die aufwendige Amidreihe nach Bönicke [6]. Die Testergebnisse der Accu-Probe-Tests wurden jeweils mit den Resultaten der konventionellen Differenzierung verglichen und evaluiert.

Ergebnisse

Insgesamt wurden 152 Stämme kultiviert, von denen 57,9 % auf *M. tuberculosis*-Komplex, 32,8 % auf *M. avium*-Komplex und 8,6 % auf *M. kansasii* entfielen. Da *M. gordonae* nur zweimal getestet wurde, wobei das Ergebnis einmal positiv ausfiel, wurde diese Spezies für die weitere Evaluation nicht berücksichtigt (Tabelle 1). Bei 31 weiteren Fällen handelte es sich um andere Spezies, die mit DNA-Sonden nicht identifizierbar sind (z. B. *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. marinum*).

In der Tabelle 2 wird die Korrelation zwischen den Ergebnissen der Accu-Probe-Tests und konventioneller

Tabelle 1. Spektrum identifizierter Mykobakterien

	Anzahl	
	Isolate	%
<i>M. tuberculosis</i> -Komplex	88	57,9 %
<i>M. avium</i> -Komplex	50	32,8 %
<i>M. kansasii</i>	13	8,6 %
<i>M. gordonae</i>	1	0,7 %

Kulturmethode wiedergegeben. 87 von 88 identifizierten Mykobakterien aus dem Tuberkulose-Komplex (84 x *M. tuberculosis* und 4 x *M. bovis*) wurden im ersten Versuch oder nach Wiederholung von der MTBC-Sonde erkannt. Falsch-positive Reaktionen wurden insgesamt viermal beobachtet, davon dreimal bei bluthaltigen Materialien, die in Bactec-Flüssigmedium angezüchtet wurden (Tabelle 2). Ein einziges mal wurde bei der Testung einer Löwenstein-Jensen-Kultur eine deutliche Kreuzreaktion mit einer anderen Mykobakterienspezies (*M. celatum*) registriert.

Tabelle 2. Korrelation zwischen Accu-Probe-Tests und konventionellen Methoden bei der Identifizierung von Mykobakterien (n = 224 Stämme)

Konventionelle Methoden	DNA-Sonde			Gesamt
	negativ	fraglich	positiv	
MTBC positiv	2*	1*	85	88
MTBC negativ	35	2**	2***	39
MAC positiv	1*	0	49	50
MAC negativ	15	2**	0	17
MKA positiv	2	0	11	13
MKA negativ	17	0	0	17

*1 x bei Wiederholung positiv

**1 x Blut, 1 x Pleurapunktat

***1 x Blut, 1 x *M. celatum*

Die Gen-Sonde für *M. avium*-Komplex zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit den klassischen Differenzierungsmethoden, wobei jedoch auch hier zweimal schwach falsch-positive Ergebnisse aus Bactec-Flüssigkulturen festgestellt wurden. Bei der Testung von *M. kansasii* hingegen wurden zwei von 13 gesicherten MKA-Kulturen auch nach wiederholter Prüfung von der DNA-Sonde nicht erkannt.

In Tabelle 3 ist die errechnete Leistungsfähigkeit der Accu-Probe-Tests für die drei häufigsten Mykobakterien-Typen zusammengestellt. Hierbei wurden auch Ergebnisse als korrekt eingeordnet, die erst bei wiederholter Testung mit den Resultaten konventioneller Methoden übereinstimmten.

Anhand von 99 mit *M. tuberculosis*, *M. avium*-Komplex oder *M. kansasii* bewachsenen Bactec-Kulturen, bei denen die Gensonden-Tests direkt zur Anwendung kamen, wurde überprüft, inwieweit die Ergebnisse mit dem Wachstumsindex (Growth index, GI) korrelieren (Abb. 1). 46,5 % der Werte lagen bei einem GI von 999, alle ande-

ren Wachstumsindices verteilten sich unregelmäßig über eine Skala zwischen 60–999 GI. Falsch-negative Ergebnisse in den drei Gensonden-Tests traten in vier von fünf bei Bactec-Flaschen mit niedrigem Wachstumsindex (GI < 500) auf. Eine einzige Flüssigkultur mit *M. kansasii* wurde von der spezifischen Sonde trotz hohem GI von 999 nicht erkannt.

Diskussion

Bei weltweiter Zunahme der Mykobakteriosen ist es besonders wichtig geworden Mykobakterien, insbesondere *M. tuberculosis*, so rasch wie möglich nachzuweisen [3, 7, 8]. Die Accu-Probe-Technik ist die erste kommerziell erhältliche Methode, mit der man Mykobakterien (nach primärer Anzucht) innerhalb von 1–2 Stunden identifizieren kann [9, 10].

In Übereinstimmung mit anderen Autoren fanden auch wir in dieser Untersuchung eine hohe Sensitivität der MTBC- und MAC-Sonden (s. Tabelle 3) [2, 4, 9, 10, 11, 12]. Bei bluthaltigen Materialien muß allerdings mit schwach falsch-positiven Reaktionen gerechnet werden, die trotz EDTA-Vorbehandlung der Proben auftreten können [8, 13]. Solche Befunde kann man nur durch Erfahrung erkennen und einordnen. Meist liegen falsch-positive LE-Werte innerhalb eines Unsicherheitsbereichs von nur 10 % über dem cut-off, während echt positive Reaktionen in der Regel bei über 2000 LE liegen [12]. Bei grenzwertigen Ergebnissen (600–900 LE) sollte der Test wiederholt werden. Als wirksamer „Labortrick“ hat sich die vorherige kurze Subkultivierung eines 0,5 ml-Aliquots aus der primären Bactec-Flasche in ein neues 7H9-Medium erwiesen, wodurch es zu einem Verdünnungseffekt und damit zu einer Verringerung der Hintergrund-Lumineszenz kommen kann. Auch nach dieser Vorbehandlung zeigen bluthaltige Proben im Mittel höhere luminometrische Werte als Proben, die kein sichtbares Blut enthalten [8].

Kreuzreaktionen der TBC-Sonde mit anderen Mykobakterienspezies, z. B. mit *M. terrae*, *M. avium*-intracellulare oder mit der relativ neu beschriebenen Spezies *M. celatum* (nicht chromogenes Mykobakterium, Runyon-Gruppe III), wie wir sie in einem Fall beobachteten, wurden auch von anderen Autoren dokumentiert [14, 15, 16]. *M. celatum* Typ 1, das selten, insbesondere bei AIDS-Patienten auftritt, weist eine Basenhomologie mit *M. tuberculosis* in der 16rRNA-Gensequenz auf. Phänotypisch ist jedoch diese Mykobakterienart eher dem *M. avium* ähnlich [14]. Im späteren Verlauf wurde von Seiten des Herstellers zur Vermeidung derartiger Diskrepanzen die Trennzeit, die zur Abgrenzung hybridisierter und nicht hybridisierter DNA nötig ist, von 5 auf 10 Minuten verlängert [16]. Wir konnten dies überprüfen, indem wir den *M. celatum* mittels MTBC-Sonde unter Einhaltung dieser veränderten Bedingungen erneut untersuchten. Die LE-Werte waren nun unter dem cut-off-Wert gesunken, so daß der Test als negativ abgelesen wurde.

Tabelle 3. Vergleich der Leistungsfähigkeit von Accu-Probe-Tests

Accu-Probe	Sensitivität	Spezifität
<i>M. tuberculosis</i> -Komplex	96,5 %	94,8 %
<i>M. avium</i> -Komplex	98,0 %	100,0 %
<i>M. kansasii</i>	84,6 %	100,0 %

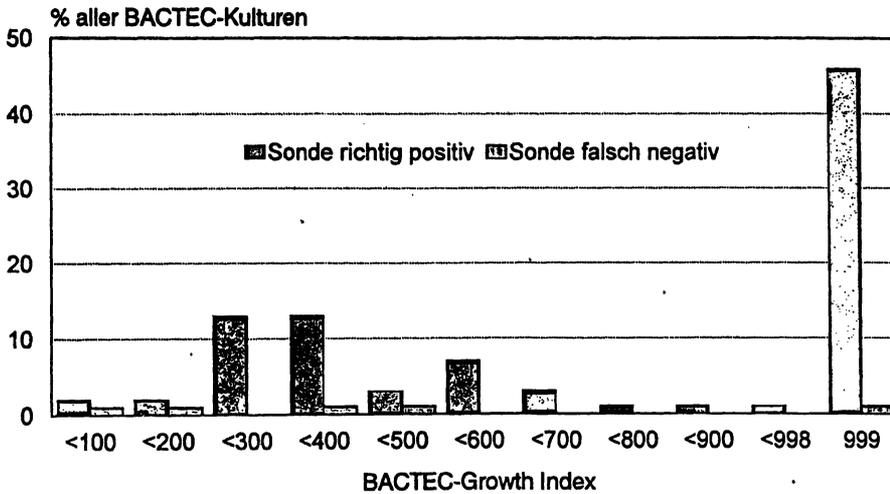


Abb. 1. Korrelation der Wachstumsindizes in bewachsenen Bactec-Kulturen mit dem Ergebnis der Gen-Sonden (n = 99) Bactect-Kulturen = Anzahl der getesteten Bactec 460 TB-Flaschen mit *M. tuberculosis*, *M. avium* oder *M. kansasii* Bactec-Growth Index = Wachstumsindex, gemessene Radioaktivität in 7H9-Bouillon (Bactec 460 TB)

Während die Gen-Sonden für *M. avium* und *M. tuberculosis* äußerst sensitiv sind, sieht es mit der *M. kansasii*-Sonde anders aus. Obwohl die Anzahl der getesteten Stämme nicht sehr groß ist, erscheint sie doch eindeutig weniger zuverlässig als die MTBC- und die MAC-Sonden. Ähnliche Schwierigkeiten mit der MKA-Sonde wurden auch von Lebrun et al. berichtet, die bei 5 von 9 MKA-Isolaten auf Löwenstein-Jensen falsch-negative Ergebnisse erhielten und deshalb diesen Accu-Probe-Test als nicht sicher genug für den Einsatz in der Routine betrachten [9]. Reisner et al. [11] und Yang et al. [17] fanden eine deutlich höhere, aber noch immer nicht ausreichende Sensitivität für die MKA-Sonde (91,7 % bzw. 88 %). Möglicherweise lassen sich diese Resultate durch die Existenz einer genetischen Subgruppe von *M. kansasii* erklären,

die von den z. Zt. verfügbaren DNA-Sonden nicht erkannt wird [17, 18]. Dieser zweite Biotyp kommt offenbar häufiger bei Isolaten von AIDS-Patienten vor, was eine geringere Virulenz gegenüber dem klassischen *M. kansasii*-Typ vermuten läßt [18].

Für die Beurteilung der *M. gordonae*-Sonden kamen zu wenig Kulturen zum Einsatz, aber in Anbetracht der geringen Pathogenität dieser Spezies erscheint die Anwendung eines Schnellidentifizierungs-Systems allenfalls zum Ausschluß anderer Mykobakterienarten gerechtfertigt [11].

Der Vergleich zwischen Wachstumsindex (GI) in Bactec-Flüssigkulturen und Sondenergebnis zeigte in unserer Untersuchung kein lineares Verhältnis (Abb. 1). Auch bei niedrigen GI-Werten im Bactec 460TB können positive Reaktionen vorkommen. Umgekehrt aber wur-

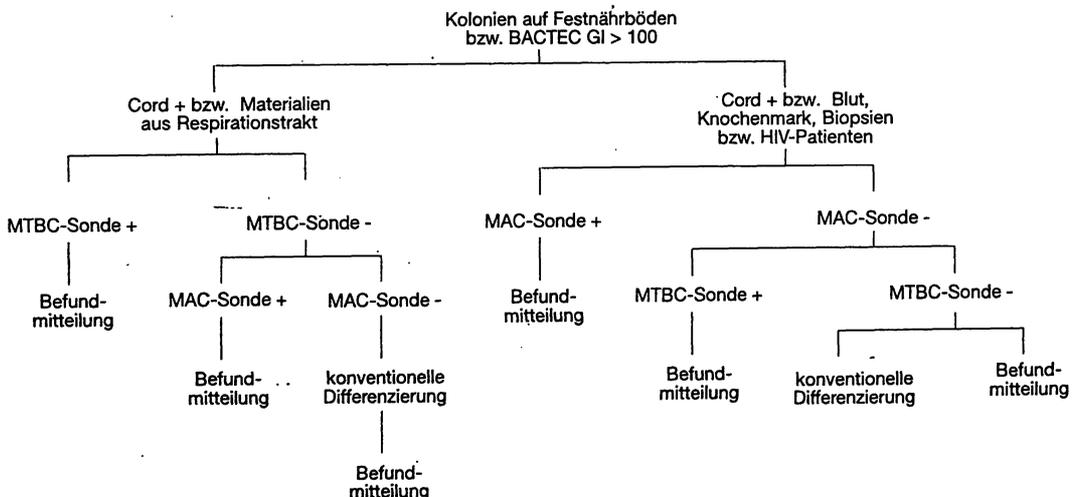


Abb. 2. Rationaler Einsatz von DNA-Sonden zur Identifizierung von Mykobakterien

den falsch-negative Ergebnisse der MTBC- und der MAC-Sonden nur bei GI < 500 beobachtet.

Gegenüber den zeitaufwendigen Standardmethoden erbringen die Gen-Sonden eine erhebliche Zeiteinsparung in der Diagnostik von MTBC und MAC auf ca. zwei bzw. drei Wochen [4]. So betrug die Zeit von der Einsendung einer Patientenprobe bis zur Erregeridentifizierung bei Verwendung des Bactec 460 TB-Systems und der Gen-Sonden im Mittel 16 Tage (M. tuberculosis) bzw. 21,8 Tage (M. avium). Auch die Durchführung der Technik geht einfach und schnell, ohne Einsatz von Radioaktivität, so daß sie schon heute als unverzichtbarer Bestandteil der Mykobakterien-Diagnostik gilt. In Kombination mit dem Bactec 460 TB-System ist der Kulturbestätigungstest mit Gen-Sonden derzeit der schnellste und zuverlässigste diagnostische Weg zum Nachweis von Mykobakterien [3, 7, 11, 19]. Ein Vorschlag für ein rationales Arbeiten mit DNA-Sonden ist in Abbildung 2 dargestellt. Falls bereits auf Löwenstein-Jensen die für M. tuberculosis typischen eugonen Kolonien sichtbar sind, die mikroskopisch die charakteristische Cordbildung zeigen, erübrigt sich für den geübten Mikrobiologen die Untersuchung mittels Gen-Sonden auch heute noch.

Schließlich ist zu vermerken, daß gentechnologische Verfahren die klassische Mikrobiologie nicht ersetzen, sondern nur ergänzen sollen. Subkulturen und konventionelle Typendifferenzierung sind auch in der Mykobakteriendiagnostik weiterhin sowohl für Resistenzbestimmungen als auch zur Erkennung von Mischkulturen und selteneren Spezies unerlässlich [20].

Danksagung

Wir danken Herrn Prof. Dr. K. Feldmann, Gauting, für die Typisierung von M. celatum.

Literatur

1. Brodt H-R, Staszewski S, Enzensberger R, Keul H-G, Buhl R, Hübner K, Helm EB (1993) Epidemiologie der Tuberkulose bei Patienten mit HIV-Infektion der Universitätsklinik Frankfurt. *Med Klin* 88, 279–286
2. Horsburgh JF (1991) Mycobacterium avium complex in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 324, 1332–1338
3. Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M (1988) Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 26, 1349–1352
4. Bull TJ, Shanson DC (1992) Evaluation of a commercial chemiluminescent gene probe system „Accu Probe“ for the rapid differentiation of mycobacteria, including „MAIC X“, isolated from blood and other sites, from patients with AIDS. *J Hosp Inf* 21, 143–149
5. Body BA, Warren NG, Spicer A, Henderson D, Chery M (1990) Use of Gen-Probe and Bactec for rapid isolation and identification of mycobacteria. *Amer J Clin Path* 93, 415–420
6. Roberts GD, Koneman EW, Kim YJ: Mycobacterium In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (1991) *Manual of Clinical Microbiology* 5th ed., American Society for Microbiology, Washington DC, pp 304–339
7. Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K (1991) Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex in culture. *J Clin Microbiol* 29, 2473–2476
8. Evans KD, Nakasone AS, Sutherland PA, Maza LM dela, Peterson EM (1992) Identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-M. intracellulare directly from primary Bactec cultures by using acridinium-ester-labeled DNA probes. *J Clin Microbiol* 30, 2427–2431
9. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Levy-Frebault V (1992) Evaluation of non-radioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 30, 2476–2478
10. Peterson EM, Lu R, Floyd C, Nakasone A, Friedly G, Maza LM dela (1989) Direct identification of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, and Mycobacterium intracellulare from amplified primary cultures in Bactec media using DNA probes. *J Clin Microbiol* 27, 1543–1547
11. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL (1994) Use of Gen-Probe Accu-Probes to identify Mycobacterium avium complex, Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium kansasii, and Mycobacterium goodii directly from Bactec TB broth cultures. *J Clin Microbiol* 32, 2995–2998
12. Sherman I, Harrington N, Rothrock A, George H (1989) Use of a cutoff range in identifying mycobacteria by the Gen-Probe rapid diagnostic system. *J Clin Microbiol* 27, 241–244
13. Enzensberger R, Schneider C, Brade V (1994) Stellenwert der DNA-Sonden für die schnelle Identifizierung von Mykobakterien. *Fortschritte in der Hygiene und Mikrobiologie*. Pechstein Verlag, S. 66–77
14. Butler WR, O'Connor SP, Yakus MA, Gross WM (1994) Cross-reactivity of genetic probe for detection of Mycobacterium tuberculosis with newly described species Mycobacterium celatum. *J Clin Microbiol* 32, 536–538
15. Ford EG, Snead SJ, Todd J, Warren NG (1993) Strains of Mycobacterium terrae complex which react with DNA probes for M. tuberculosis complex. *J Clin Microbiol* 31, 2805–2806
16. Stockman L, Springer B, Bottger EC, Roberts GD (1993) Mycobacterium tuberculosis nucleic acid probes for rapid diagnosis (Letter). *Lancet* 341, 1486
17. Yang M, Ross BC, Dwyer B (1993) Isolation of a DNA probe for identification of Mycobacterium kansasii, including the genetic subgroup. *J Clin Microbiol* 31, 2769–2772
18. Tortoli E, Tullia Simonetti M, Lacchini C, Penati V, Urbano P (1994) Tentative evidence of AIDS-associated biotype of Mycobacterium kansasii. *J Clin Microbiol* 32, 1779–1982
19. Rüscher-Gerdes S (1992) Kombination des Bactec-Systems und der Gen-Sonden für die Isolierung und Identifizierung von Mykobakterien. *Klin Lab* 38, 330–332
20. Heifets L (1989) Gen-probe tests should not be considered final in Mycobacterium tuberculosis identification. *J Clin Microbiol* 27, 229 (letter)

VDGH-Workshop „HIV-Antikörper-Testung“ – Bericht und Zusammenfassung der Vorträge¹

Dr. Francesco Dati², Marburg

Einleitung

Es ist allgemein anerkannt, daß die HIV-Antikörperdiagnostik einen sehr hohen Standard hat. Es gibt keinen weiteren serologischen Labortest, der eine derart hohe diagnostische Sensitivität und Spezifität erreicht. Da der Nachweis von HIV-Antikörpern und dadurch von HIV-Infektionen ein sehr wichtiger Aspekt der Sicherheit von Blut und Blutprodukten ist, wird in letzter Zeit in der Öffentlichkeit eine Diskussion über die Abschätzung des HIV-Restrisikos und über Grenzen der HIV-Antikörper-Testung geführt.

Der VDGH Verband der Diagnostica-Industrie hat dies zum Anlaß genommen, in einem Workshop unter Beteiligung von Experten die aktuelle Situation der HIV-Antikörper-Testung sowie die zukünftigen Anforderungen an die Tests diskutieren zu lassen und für den 2. Mai 1995 zu einem Workshop in das Advance Hotel am Flughafen Frankfurt eingeladen.

Am Workshop nahmen ca. 90 Vertreter von Behörden, Blutbanken, Universitäten und Diagnostica-Firmen teil. Der Workshop wurde von Prof. Laufs/Hamburg geleitet, die anschließende Diskussion von Prof. Habermehl/Berlin moderiert.

Wissenschaftler aus verschiedenen Bereichen gingen auf unterschiedliche Aspekte der HIV-Diagnostik mit folgenden Ausführungen ein:

- Überblick über den aktuellen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse bezüglich HIV-Epidemiologie und -Diagnostik
- Bericht über den politischen Sachstand seitens des Arbeitskreises „Blut“ des Bundesgesundheitsministeriums besonders im Hinblick auf Virussicherheit von Blut und Blutprodukten
- Darstellung der Anforderungen an die HIV-Antikörper-Testung aus der Sicht der Anwender in Blutbanken und Kliniken

- Übersicht über die Einsatzgebiete der HIV-Serodiagnostik, u. a. Screening, Bestätigung, Befundinterpretation und Verlaufsbeurteilung einer HIV-Infektion
- Erläuterungen der geltenden Anforderungen bzw. Kriterien für die Zulassung von HIV-Diagnostika durch die deutschen und österreichischen Behörden
- Zusammenfassung der Spezifikationen für Screeningtests zum Nachweis von HIV-Antikörpern, die aus der Sicht der Diagnostika-Hersteller bei der Testentwicklung berücksichtigt werden soll.

Vorträge

Prof. L. Gürtler

Epidemiologie von HIV

Seit 1960 sind Infektionen mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV) in der menschlichen Bevölkerung bewiesen. Zentralafrika ist der Ursprungsherd von HIV, das sich sehr rasch seit Beginn der 80er Jahre verbreitet hat, so daß die Infektion mit diesem Virus zu einer der weltweit bedeutendsten übertragbaren Krankheiten geworden ist.

Während in Europa die Situation bezüglich Neuinfektionen mit HIV als gleichbleibend beurteilt werden kann, ist die HIV-Verbreitung in Lateinamerika, Zentralafrika und insbesondere Asien sehr rasant.

Die HIV-Infektion ist im wesentlichen eine sexuell übertragbare Krankheit, so daß Bevölkerungsgruppen mit vielen Sexualpartnern besonders betroffen bzw. gefährdet sind. Da aber HIV auch durch Blut übertragen wird, sind heute besonders Drogenabhängige eine große Risikogruppe geworden, während die iatrogene Übertragung durch Blut oder Blutprodukte sowie Organtransplantationen nur ein geringes Restrisiko darstellt.

HIV besteht aus dem Typ HIV-1 mit den Subtypen A-H und dem neuen Subtyp O sowie aus dem Typ HIV-2 mit den Subtypen A-E.

Die HIV-1 Subtypen A-H, die sich untereinander sehr ähneln, haben eine unterschiedliche geographische Verbreitung, wobei der B-Subtyp am stärksten verbreitet ist. HIV-2 wird im wesentlichen in Westafrika, Indien und Europa nachgewiesen, wobei die HIV-2 Subtypen nicht epidemiologisch sondern nur bei der Diagnostik von Bedeutung sind.

¹ Vom VDGH Verband der Diagnostica-Industrie autorisierter zusammenfassender Bericht

² Korrespondenzadresse:
VDGH Verband der Diagnostica-Industrie
Münchener Straße 49, 60329 Frankfurt/Main

Bei der Diagnostik der HIV-Infektion, die hauptsächlich auf der Testung von HIV-Antikörpern mittels Immunoassays beruht, konzentriert man sich in Deutschland auf die Frühphase der HIV-Infektion und insbesondere auf die sogenannte HIV-Serokonversion, d. h. auf den frühestmöglichen Nachweis von Antikörpern gegen HIV im Blut als Beweis für eine vorliegende HIV-Infektion. Da die für diesen Zweck entwickelten Tests ihre beste Sensitivität für HIV-1 Subtyp B haben, können einige Assays Schwächen in Hinblick auf andere Subtypen im Verlauf der Serokonversionsphase aufweisen, besonders für den Subtyp O.

Die Diagnostika-Industrie hat aber angesichts der sich aufzeigenden Probleme bei einigen Proben mit HIV-1 Subtyp O sofort reagiert und die HIV-Antikörper-Immunoassays entsprechend modifiziert bzw. angepaßt. Allerdings sind die HIV-Bestätigungstests bezüglich Erkennung des Subtyps O noch nicht soweit, was bei ihrer Bewertung berücksichtigt werden muß.

Prof. G. Pauli

Ergänzende Anmerkungen zur HIV-Epidemiologie aus der Sicht des Bundesgesundheitsamtes

Zum Zeitpunkt 31. März 1995 waren in der Bundesrepublik 12.808 AIDS-Fälle registriert, von diesen 7.917 mit tödlichem Ausgang. Darunter waren 11.526 Personen männlichen Geschlechts (insbesondere Homosexuelle) und 1.282 weiblichen Geschlechts (insbesondere Drogenabhängige). Die Anzahl der als bestätigt gemeldeten bestätigten HIV-Infektionen beträgt 67.893, darunter 359 vom Typ HIV-2.

In Deutschland wird zur Zeit nur eine HIV-Antikörper-Testung mittels eines Enzymimmunoassays und weiterhin eine Bestätigung mit einem Western Blot empfohlen. Es ist sehr wichtig, bei einem Patienten mit Verdacht auf eine HIV-Infektion mindestens eine zweite Blutabnahme vorzunehmen, um zu überprüfen, ob die Reaktivität zunimmt bzw. ob der verwendete Enzymimmunoassay eine bestimmte HIV-Variante erkennt. Es gibt aktuell keine Kombination von zwei Enzymimmunoassays, die besser funktioniert als die Kombination von einem Enzymimmunoassay und einem Western Blot.

Prof. W. Gerlich

Probleme der Anti-HIV-Testung von Blutspendern und der Virussicherheit von Blutprodukten aus der Sicht des Arbeitskreises „Blut“

Der Arbeitskreis „Blut“ ist ein gesundheitspolitisches Gremium, das aus 30 Mitgliedern (Fachgesellschaften,

Verbände der Pharmazeutischen Industrie, Ämter, Bundes- und Landesministerien) besteht. Der Arbeitskreis „Blut“ ist als Einrichtung des Bundesministeriums für Gesundheit etabliert worden; die Geschäftsführung liegt beim Robert-Koch-Institut in Berlin.

Der Arbeitskreis „Blut“ diskutiert alle aktuellen Fragen und Probleme, die die Verfügbarkeit, Wirksamkeit, Verträglichkeit, Sicherheit und Kosteneffizienz von Blut und Blutprodukten betreffen. Dieser Arbeitskreis berät durch verabschiedete Voten das Bundesgesundheitsministerium, die zuständigen Bundes- und Landesbehörden sowie alle Einrichtungen, die die Qualität von Blutprodukten sicherstellen müssen. Diese Voten/Publicationen werden im „Bundesgesundheitsblatt“, zum Teil auch im „Deutschen Ärzteblatt“ veröffentlicht. Diese veröffentlichten Texte sind keine Rechtsvorschriften, sie sollten aber als Empfehlungen verstanden werden, deren Inhalt den Stand anerkannten und aktuellen Wissens widerspiegelt.

Im Rahmen der aktuellen Diskussion bezüglich Anti-HIV-Testung von Blutspenden hat der Arbeitskreis „Blut“ sich besonders mit der Problematik der „diagnostischen Lücke“ in der Frühphase einer HIV-Infektion auseinandergesetzt.

Das Risiko einer HIV-Übertragung durch zelluläre Blutprodukte in der Bundesrepublik ist heute nicht höher als 1 : 1.000.000, eher noch niedriger. Die Auswahl der Blutspender ist von zentraler Bedeutung für die Sicherheit einer Bluttransfusion in bezug auf HIV. Der anschließende HIV-Antikörper-Test kann die Wahrscheinlichkeit einer Infektion zwar sehr stark vermindern, aber nicht ganz ausschließen, da solche HIV-Antikörper-Tests erst drei bis sechs Wochen nach der Infektion positiv werden. Es geht darum, HIV-Infizierte besonders in der Antikörper-negativen Frühphase der Infektion zu identifizieren, wenn sie besonders infektiös sind.

Der Arbeitskreis „Blut“ ist der Auffassung, daß sich die „diagnostische Lücke“ in der Frühphase der HIV-Infektion zur Zeit nicht durch den Einsatz von weiteren Ersatztests neben dem HIV-Antikörper-Test eliminieren läßt.

Eines der ersten vom Arbeitskreis „Blut“ intensiv diskutierten Probleme war die Einführung des HIV-p24-Antigen-Tests für alle Blut- bzw. Plasmaspenden.

Bereits auf der zweiten Sitzung hat der Arbeitskreis sich gegen die Einführung des HIV-p24-Antigen-Tests wegen mangelnder Kosteneffizienz und hoher Unspezifitätsrate ausgesprochen. Auf der Basis dieses ablehnenden Votums haben inzwischen einige Länder ihre Verordnung zur Einführung des HIV-p24-Antigen-Tests zurückgenommen.

Zum Thema HIV-Antikörper-Testung hat der Arbeitskreis „Blut“ empfohlen, auf die erwogene Doppeltestung von allen Blutspenden mit Enzymimmunoassays zweier verschiedener Hersteller zu verzichten, da der zu erwartende Sicherheitsgewinn als marginal zu betrachten ist.

Die Einbeziehung weiterer Labortests (indirekte Tests) zwecks besserer Erkennung möglicher HIV-infizierter

Spender wurde durch den Arbeitskreis generell nicht befürwortet. Tests wie Neopterin-Messung seien nicht zufriedenstellend, Leukozytenzahl zu schwankend, Opiat-Testung zu unspezifisch. Lediglich die Temperaturmessung wird empfohlen. Der oft erwähnte Anti-HBc-Test als Surrogat-Test gibt eine zu geringe Korrelation zum Vorhandensein einer HIV-Infektion, er scheint aber hinsichtlich des Nachweises einer atypischen HBV-Infektion (HBV-Varianten) interessant zu sein.

Die Einführung der vom BGA vorgeschlagenen Quarantäne für nicht inaktiviertes Plasma wurde vom Arbeitskreis „Blut“ empfohlen. Dieses Verfahren sieht eine Lagerung des Plasmas und eine Testung auf Anti-HIV und Anti-HCV bei der ersten Entnahme und nach 6 Monaten vor, sowie eine Freigabe nur bei erneuter negativer Testung. Allerdings ist dieses Verfahren bei nicht lagerfähigen zellulären Produkten nicht anwendbar.

Bei der Beurteilung, welche HIV-Antikörper-Assays für die Testung von Blutspenden geeignet seien, verläßt sich der Arbeitskreis „Blut“ auf das Zulassungsverfahren durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI), das unter anderem folgende Kriterien berücksichtigt: Sensitivität in der Frühphase, Serokonversionspanels, Erkennung aller bekannten HIV-Subtypen insbesondere HIV-1 Subtyp 0, Vergleich aller zugelassenen Tests, Rückmeldung durch Spendedienste.

Als das PEI Ende 1994 die Zulassung verschiedener HIV-Antikörper-Testkits widerrief bzw. aussetzte, hat der Arbeitskreis „Blut“ in einem Votum jedoch klargestellt, daß ein Rückruf der mit den betroffenen Tests vorher geprüften Blutprodukte sowie eine erneute Testung der Spender/Spende nicht notwendig sei. Aus jenem aktuellen Anlaß wurde innerhalb des Arbeitskreises „Blut“ ein Komitee gebildet, das die Kriterien für Änderung der Zulassung und für Neuzulassungen erörterte.

Zur Erhöhung der Sicherheit der Transfusion von Blut und Blutprodukten hat der Arbeitskreis „Blut“ in einem Votum die Rückverfolgung von früher HIV-Antikörper-negativen Spendern, die bei einer erneuten Spende in einem HIV-Antikörper-Test ein positives Ergebnis aufweisen, empfohlen. Allerdings soll, bevor das Rückverfolgungsverfahren eingeleitet wird, das zweite Ergebnis im Western Blot bzw. in einer weiteren Blutprobe eindeutig bestätigt werden.

In diesem Zusammenhang hat sich der Arbeitskreis „Blut“ auch mit der Spezifität der HIV-Serokonversion, d. h. mit dem spezifischen Auftreten von HIV-Antikörpern als Beweis einer vorhandenen HIV-Infektion beschäftigt. Wichtig sei eine Bestätigung durch einen Western Blot und, wenn dieser nicht klar positiv ist, die HIV-Antikörper-Testung mit einem Enzymimmunoassay eines zweiten Herstellers bzw. ein HIV-p24-Antigen-Test oder sogar ein Test auf HIV-Genome.

Das Votum zur Rückverfolgung gilt auch für Anti-HCV- und HBsAg-Serokonversionen bei Blutspendern, wobei in solchen Fällen andere zusätzliche Tests verwendet werden müssen.

Der Arbeitskreis „Blut“ hat eine generelle Einführung von Gensonden-Verfahren für einzelne Blut- bzw. Plasmaspenden nicht in Erwägung gezogen. Allerdings wird zur Zeit diskutiert, ob die Virussicherheit von Plasmaproteinpräparaten durch Untersuchungen auf Abwesenheit von HIV-, HCV- und HBV-Genomen im Plasmapool oder sogar im Endprodukt nicht verbessert werden kann. *

Prof. W. Sibrowski

Anforderungen an die HIV-1/2-Antikörper-Tests aus der Sicht einer Blutbank

Die routinemäßige Untersuchung jeder Blutspende auf Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 hat in der Bundesrepublik dazu geführt, daß das Restrisiko transfusionsassoziiert HIV-Infektionen auf etwa 1 : 1.400.00 gesenkt werden konnte. Da die Sensitivität der verwendeten HIV-Antikörper-Tests sehr hoch ist (95–100 %), sind die Gründe einer HIV-Infektion durch Transfusion eher auf menschliche Fehler zurückzuführen, z. B. fehlerhafte Ausgabe HIV-infizierter Produkte.

Seit Einführung der HIV-Antikörper-Testung im Jahre 1985 sind in Deutschland 7 HIV-Infektionen auf eine Bluttransfusion zurückzuführen.

Wichtige Faktoren, die die HIV-Sicherheit von Blutspenden beeinflussen, sind die Sensitivität und Spezifität der HIV-Antikörper-Tests sowie die sogenannte „diagnostische Lücke“, die bis zur sicheren Nachweisbarkeit von HIV-Antikörpern im Spenderblut besteht. Diese „diagnostische Lücke“ konnte nach Einführung des ersten HIV-Antikörper-Tests in 1985 von 56 auf 22 Tage im Jahre 1994 durch die kontinuierliche Verbesserung der Tests verkürzt werden. Eine weitere Verkürzung der negativen serologischen Fensterphase wäre durch den Einsatz des HIV-p24-Antigen-Tests oder der HIV-DNA-PCR auf 16 Tage, durch HIV-RNA-PCR bestenfalls auf 11 Tage denkbar. Allerdings sind diese Methoden, die eine sehr geringe diagnostische Spezifität besitzen, im Blutspendewesen nicht praktikabel und mit sehr hohen Kosten verbunden (Schätzkosten: 10 Mio. US \$ bei routinemäßiger PCR-Testung auf HIV-RNA zur Verhütung einer einzelnen HIV-Infektion durch Blutprodukte).

Bei dieser Kostenrechnung müßte auch bedacht werden, daß bereits zum jetzigen Zeitpunkt etwa 20 % aller Blutspenden (HIV-negativ) wegen positiver Ergebnisse von weiteren Labortests wie Anti-HBc und ALT nicht freigegeben werden.

Aus der Sicht einer Blutbank lassen sich folgende Anforderungen an einem optimalen HIV-Antikörper-Test stellen: Hohe Sensitivität und Spezifität sowie Erfassung aller HIV-Subtypen; hohe Zuverlässigkeit bei einfacher Handhabung; einheitliche und vergleichbare Qualität; geringer Zeit- und Kostenaufwand.

Prof. F.-D. Goebel

Anforderungen an die HIV-Antikörper-Tests aus der Sicht der Klinik

Im klinischen Bereich sind die Probleme der HIV-Antikörper-Testung anderer Natur als im Blutspendewesen, wo es besonders um die Minimierung des Übertragungsriskos einer HIV-Infektion geht.

Trotz niedrigen Virämie-Titers besteht in den meisten Stadien der HIV-Krankheit ein enormer Virus-Umsatz. Deswegen ist es wichtig, sobald als möglich mit der antiviralen Therapie anzufangen. Der Kliniker strebt die Identifikation des HIV-Patienten möglichst in der Frühphase an, um eine normale Therapie zu sichern und eine Virusproduktion soweit wie möglich auf Null zu unterdrücken. Man weiß inzwischen, daß nach der Anfangsvirämie die HIV-Viren nicht verschwinden. Sie vermehren sich weiterhin auf der Ebene der Lymphozyten.

Besonders wichtig für den Kliniker ist die Verfügbarkeit einer schnellen HIV-Diagnostik z. B. bei Nadelstichverletzungen beim medizinischen Personal wegen entsprechender Prophylaxe und Prävention der Erkrankung und in der Schwangerschaftsvorsorge bei HIV-Positivität für die Entscheidung bezüglich Schwangerschaftsabbruch, Kaiserschnitt bzw. pränataler Therapie.

Ein Schnelltest für HIV wird von Klinikern wegen sinnvoller Aussage und effektiver Prophylaxe befürwortet. Die Prophylaxe mit antiviraler Therapie muß innerhalb von 2 Stunden eingeleitet werden, um effektiv zu sein. In diesem Zusammenhang kann ein HIV-Schnelltest sehr hilfreich sein.

Prof. P. J. Grob

Einsatzgebiete der HIV-Serodiagnostik

HIV-bezogene, spezifische Tests finden ihre Anwendung im Rahmen einer HIV-Diagnostik im Bereich des Blutspendewesens bzw. der Klinik sowie zur HIV-Verlaufsbeurteilung.

Zur Diagnose einer HIV-Infektion im klinischen Bereich gehören sowohl ein Screeningtest als auch dessen Bestätigung durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen wenigstens drei HIV-Konstituenten in jeweils zwei separat entnommenen Blutproben.

Für ein HIV-Screening wird der Einsatz zweier verschiedener kommerziell erhältlicher Enzymimmunoassays der dritten Generation (anti-HIV-1/2/0) befürwortet, um die Sensitivität zu erhöhen und keine Infektionen zu verpassen. Das akzeptierte Verfahren für den Bestätigungstest ist der Western Blot, wobei je nach Definition verschiedener Institutionen 3–4 HIV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden müssen. Die Bestätigung soll zunächst mit einem HIV-1 Western Blot, und danach, falls erforderlich, mit Western Blots für HIV-2 bzw. HIV-1

Subtyp 0 erfolgen. Bei Diskrepanzen soll eine Testung auf HIV-p24-Ag durchgeführt werden.

Bei jeder Art von unklarem Befund (wie z. B. Diskrepanzen, unklarem Western Blot usw.) wird empfohlen, die Untersuchungen in mindestens einem weiteren Serum in einem gebührenden zeitlichen Abstand zu wiederholen, um soweit wie möglich die „diagnostische Lücke“ abdecken zu können.

Zur Absicherung des Ausschlusses einer HIV-Infektion wird die Bestimmung folgender Laborparameter als gerechtfertigt betrachtet: lösliches-p24-Antigen (s-p24), immunkomplexiertes p24-Antigen (ICD-p24), Nachweis spezifischer HIV-RNA und HIV-DNA mittels Hybridisierungstechniken, sowie Neopterin bzw. β_2 -Mikroglobulin. Die zwei letzten Parameter sind lediglich Hilfstests, die als Hinweise für die Weiterführung der HIV-Diagnostik gelten.

Im diagnostischen Alltag ergeben sich hinsichtlich der HIV-Serodiagnostik wenig Probleme, sofern entsprechende Erfahrung vorhanden ist und ausreichende Qualitätskontrollmaßnahmen vorgenommen werden.

Die größeren Probleme bzw. Fehler kommen sowohl durch Probenverwechslungen als auch durch Interpretationsunsicherheiten sowie Übermittlungsfehler zwischen dem Labor und dem auftraggebenden Arzt bzw. dem Arzt und dem Patienten zustande. Besonders bei komplexen und unklaren Resultaten sind Ärzte und Patienten oft überfordert. Hier könnten Informationsschriften durch die Diagnostika-Hersteller in Form von leicht verständlichen Grafiken für die Zielgruppen von Nutzen sein.

Sobald die Diagnose einer HIV-Infektion feststeht, steht dann die Verlaufsbeurteilung der Infektion mit verschiedenen Fragestellungen im Vordergrund, wie z. B. Stadium der HIV-Infektion, prognostische Aussage über die Progression der Erkrankung, Festlegung einer geeigneten Therapie, Ansprechen auf die gewählte Therapie oder Resistenzentwicklung. Die Laborparameter, die in der Schweiz zur Entscheidung des Einsatzes einer antiviralen Therapie beitragen, sind besonders HIV-RNA, HIV-DNA und ICD-p24, da sie den „viral load“ wenigstens teilweise widerspiegeln.

Als prognostischer Parameter für die Verlaufskontrolle stehen die HIV-p24-Antikörper-Testung und die quantitative Messung von HIV-RNA bzw. HIV-DNA im Vordergrund. Besonders für die HIV-RNA/DNA-Messung werden einfache und robuste Methoden benötigt.

Ein Appell wurde an die Zulassungsbehörden gerichtet, damit bald eine Standardisierung der verschiedenen HIV-Tests vorgenommen wird.

Dr. M. Nübling

Anforderungen an Tests aus der Sicht des Paul-Ehrlich-Instituts

Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) ist in Deutschland für die Zulassung von HIV-Tests sowie für die Freigabe der entsprechenden Produktionschargen zuständig.

Zum Zeitpunkt des Workshops waren 12 HIV-1/HIV-2 -Antikörper-Suchtests, 2 HIV-Antigen-Tests, 8 HIV-Bestätigungstests, 8 Differenzierungstests, 8 Tests für Verlaufsuntersuchungen sowie ein Anti-HIV-Schnelltest zugelassen.

Je nach Verwendungszweck eines Tests gelten für dessen Zulassung unterschiedliche Anforderungen.

Die Mindestanforderungen an die diagnostische Erprobung von HIV-1/HIV-2-Antikörper-Suchtests beinhalten derzeit die Testung von 2.000 Blutspendern (sowie möglichst 300 Seren von klinischen Patienten) und 50 potentielle kreuzreaktive Proben („Problemseren“, wie z. B. Rheumafaktoren-, Bilirubin-, Hämoglobin-, Triglyzerid- bzw. Autoantikörper-haltige Proben) zwecks Spezifitätsprüfung, sowie 300 Anti-HIV-1 positive Seren, 200 Anti-HIV-2 positive Seren und 15–20 HIV-1 Serokonversionen zwecks Sensitivitätsprüfung.

Alle diese Untersuchungen müssen im direkten Vergleich zu einem bereits zugelassenen Test erfolgen.

Im Rahmen des Zulassungsverfahrens werden dann im PEI bei einer internen Laborprüfung analoge Studien besonders im Hinblick auf Verhalten bei Problemseren (Anti-HIV negativ) und bei Serokonversionen (Anti-HIV-positiv) durchgeführt.

Bei Chargenprüfungen finden sowohl Anti-HIV-positive und -negative Seren als auch Verdünnungsreihen von Anti-HIV-positiven Proben Anwendung. Die Zulassung eines Tests ist für 5 Jahre gültig; sie kann verlängert werden.

Aufgrund der insbesondere bei den HIV-Diagnostika zu beobachtenden raschen Entwicklung werden alle 2 Jahre experimentelle Testungen auf Validität der zugelassenen Tests vorgenommen. Eine derartige Untersuchung der Testsensitivität führte im Jahre 1992 zur Rücknahme von drei, im Jahre 1994 zur Rücknahme von neun HIV-Antikörper-Suchtests.

Zur Zeit werden Studien mit einem Panel durchgeführt – bestehend aus 203 aus Kamerun stammenden Seren (138 Anti-HIV-1/HIV-2-positiv, 52 negativ, 13 diskrepant, darunter 7 Anti-HIV-1 Subtyp O)- durchgeführt, um einerseits die Sensitivität der Tests bei einer im Vergleich zu Europa unterschiedlichen Verteilung von HIV-1-Genotypen der Gruppe M kennenzulernen und andererseits HIV-1 Subtyp O-Seren zu identifizieren.

Entscheidungen über definierte Zulassungskriterien sind noch nicht getroffen worden, auch weil die entsprechenden Proben, – insbesondere Serokonversionspanels – nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Gerade die HIV-Serokonversionen sind besser geeignet, um die Sensitivität eines HIV-Antikörper-Suchtests zu überprüfen. Bei solchen Überprüfungen durch das PEI spielt besonders das Verhalten bei Serokonversionen und weniger eine mögliche mangelnde Reaktivität gegenüber dem HIV-1-Subtyp O eine wichtige Rolle.

Anmerkung:

Im Rahmen der Diskussion des Vortrages von Herrn Dr. Nübling wurde von einigen Experten besonders be-

mängelt, daß eine ausführliche Absprache zwischen europäischen Zulassungsbehörden bezüglich Vereinheitlichung von Zulassungskriterien für HIV-Antikörper-Tests noch nicht stattgefunden hat. Diese Absprache sei notwendig, um auf europäischer Ebene gleiche Verhältnisse schaffen zu können.

Dr. F. Lackner

Anforderungen an HIV-Diagnostika – Ergänzenden Anforderungen aus der Sicht der österreichischen Behörde

Die Qualitätssicherung der HIV-Diagnostika wird in Österreich von „Bundesstaatlichen Serumprüfungsanstalt (BSPI)“ in Wien geregelt. Die Chargenprüfung und Freigabe bei erwiesener Qualität erfolgt am BSPI. Diagnostika-Hersteller müssen die Qualität ihrer Testkits durch eine umfangreiche Dokumentation nachweisen.

Die Prüfung der klinischen Sensitivität von HIV-Antikörper-Tests erfolgt an 500 Anti-HIV-positiven Seren in Vergleichsstudien mit einem Referenztest, die Prüfung der klinischen Spezifität an 5.000 Anti-HIV-negativen Seren. Die Qualitätskontrolle am BSPI umfaßt neben der Prüfung der Sensitivität mit Serokonversionspanels auch die Prüfung der Spezifität mit hämolytischen, lipämischen und möglichen kreuzreaktiven Proben sowie die Prüfung der Präzision und Reproduzierbarkeit. Diese letzte Prüfung wird sowohl mit polyklonalen Serumpools als auch mit Cocktails humaner monoklonaler Antikörper gegen HIV (besonders gegen HIV-1-gp 24) durchgeführt.

Dr. S. Knapp

Anforderungen und Möglichkeiten der HIV-Tests aus Sicht der Diagnostika-Hersteller

Seit 1985 werden von den Diagnostika-Herstellern Tests zum Nachweis von Infektionen mit dem „Humanen Immunschwäche Virus“ (HIV) angeboten.

Das Marktsegment der HIV-Diagnostik ist durch verschiedene Besonderheiten charakterisiert wie: starke Konkurrenz, große Innovationen, kurze Produktzyklen und hohe Anforderungen.

Seit der Verfügbarkeit der ersten HIV-Antikörper-Tests haben die Diagnostika-Hersteller verschiedene Verbesserungen im Hinblick auf Leistungsfähigkeit der Tests eingeführt, u. a. gleichzeitiger Nachweis von Antikörpern gegen HIV-1 und HIV-2, Steigerung der Sensitivität in der Serokonversionsphase (Verkürzung der „diagnostischen Lücke“ auf 22 Tage), Erkennung verschiedener Subtypen, Verbesserung der Spezifität bei der Initialtestung, Verbesserung der Testbearbeitung und Praktika-

bilität im Hinblick auf einfache Durchführbarkeit und hohe Testrobustheit sowie Gerätekompatibilität.

Verglichen mit anderen Parametern aus dem Bereich der mikrobiologischen und virologischen Diagnostik muß festgestellt werden, daß die HIV-Diagnostik heute aufgrund der hohen Anforderungen und der Konkurrenzsituation auf einem außerordentlich hohen Niveau steht. Zum Standard gehört, daß die auf dem Markt vorhandenen Testsysteme HIV-Proben von Patienten in verschiedenen Stadien einer HIV-Infektion (asymptomatisch, symptomatisch) sowie auch regional prävalente HIV-Subtypen mit hoher Sicherheit erkennen.

Auch im Hinblick auf die Erkennung von HIV-Proben aus der sog. „diagnostischen Lücke“ haben die im Markt verfügbaren Tests einen sehr hohen Stand erreicht. Seit Einführung der ersten HIV-Antikörper-Tests konnte diese Lücke in der Frühphase der HIV-Infektion mit jeder neuen Testgeneration ein weiteres Stück geschlossen werden. Das Bestreben der Testhersteller, die aktuell verfügbaren HIV-Antikörper-Tests zu verbessern, richtet sich in erster Linie auf dieses Leistungsmerkmal.

Obwohl sich die Diagnostika-Industrie die moderne Methodik der gentechnischen und synthetischen Herstellung der HIV-Antigene seit Jahren zunutze macht, sind aus heutiger Sicht im Hinblick auf die Steigerung der Nachweisempfindlichkeit der HIV-Antikörper-Testsysteme in der diagnostischen Lücke nur marginale Erfolge zu erwarten: Eine neue Testgeneration wird diese Lücke allenfalls um weiter 2–3 Tage schließen können.

Neben dem Leistungsmerkmal Sensitivität in der Serokonversion steht aber auch die Erkennung von neuen serologisch wichtigen HIV-Varianten und -Subtypen im Vordergrund des Interesses. Ziel ist es, dem Anwender der HIV-Antikörper-Tests die größtmögliche Sicherheit bei der Beurteilung einer Probe zu geben.

Berücksichtigt man, daß ein HIV-Antikörper-Test ca. 3–5 Jahre im Markt ist, bevor er durch einen neuen, verbesserten Test abgelöst wird, so ist der zeitliche Aufwand von 2–3 Jahren für die Entwicklung eines neuen marktreifen Tests, beginnend mit ersten Versuchen zur Machbarkeit, über die Phasen der Testentwicklung, Zulassung und Ausbietung enorm hoch. Dieser Aufwand und die damit verbundenen Kosten (im Durchschnitt 3–5 Mio. DM) können unabhängig von der Zielsetzung bei der Neuentwicklung eines HIV-Antikörper-Tests nur unwesentlich reduziert werden. Die Erfahrung hat gezeigt, daß z. B. für die Einbindung eines neuen HIV-Antigens, etwa zum Zweck der Erkennung eines weiteren HIV-Subtyps, mit einem ähnlich hohen Aufwand gerechnet werden muß.

Die Diagnostika-Hersteller sind bestrebt, die Leistungsfähigkeit ihrer HIV-Tests immer auf dem aktuellen Wissensstand zu halten. Aufgrund der relativ langen Entwicklungszeit eines HIV-Tests ist dies nicht immer sofort möglich. Geplante Änderungen der Zulassungsanforderungen sollten diesen Aspekt unbedingt berücksichtigen.

Diskussion und Zusammenfassung der Kernaussagen

Prof. K.-O. Habermehl

Round-table-Diskussion

Es wäre wichtig, HIV-1-Seren systematisch im Hinblick auf die vorhandenen Subtypen zu analysieren.

Die Kombination HIV-1/HIV-2 in den Screeningtests hat sich nicht unbedingt bewährt, da dadurch die Sensitivität gegenüber HIV-1 gelitten hat. In Europa ist HIV-2 vornehmlich besonders bei Schwarzen und bei Patienten mit einer bestimmten Symptomatik anzutreffen.

Es wurde vorgeschlagen, für HIV-Antikörper-Tests Consensus-Sequenzen und -epitope unter Berücksichtigung der genetischen Variabilität aber auch der unterschiedlichen Reaktivität im Western Blot festzulegen.

Screening-Algorithmen müssen entsprechend der klinischen Fragestellung entwickelt werden, z. B. bei Organtransplantation.

Die Überprüfung der Qualität der HIV-Antikörper-Tests soll u. a. im Rahmen von Ringversuchen vorgenommen werden. Dabei muß allerdings das Auftreten von Pannen in Kauf genommen werden, da die Ringversuchproben (Einzelseren und Panels) unter Umständen anders als die nativen Proben reagieren.

Bei den Screeningtests auf Basis von Oligopeptiden werden keine Unterschiede mehr betreffend Reaktivität im Vergleich zu Tests mit Antigenen aus Zellkulturen bzw. auf rekombinanter Basis beobachtet. Die Unterschiede unter den verschiedenen in Europa erhältlichen HIV-Antikörper-Tests sind besonders ersichtlich, wenn HIV-Serokonversionspanels für die Überprüfung eingesetzt werden.

Die Rückverfolgung („look-back“) von bestätigten HIV-positiven Spenden ist sehr wichtig, um weitere Erkenntnisse zu sammeln und eventuell an wichtige Proben (z. B. Serokonversionsproben) heranzukommen.

Eine Standardisierung der Western Blots und die Verfügbarkeit von entsprechenden Serum- und Konjugatkontrollen für diese Technik wäre wünschenswert, unter Beachtung der Feststellung, daß der Western Blot nicht die einzige Bestätigung für eine HIV-reaktive Probe sein kann.

Prof. R. Laufs

Workshop zum Thema: „HIV-Antikörper-Testung“ – Überblick über Fragen und Antworten zu aktuellen Problemen

Die Testung von HIV-Infizierten und die HIV-Sicherheit von Blut und Blutprodukten ist ein fortwährend ak-

tuelles Thema, das immer höchstes medizinisches und öffentliches Interesse findet. Die Maßnahme des Paul-Ehrlich-Institutes Ende 1994 hinsichtlich des Widerrufs bzw. Aussetzung der Zulassung von zehn HIV-Antikörper-Tests bedeutet nicht, daß bis dahin keine guten Tests vorhanden waren, sondern es bedeutet, daß es – wahrscheinlich – noch bessere Tests gibt. In der Medizin gibt es keinen weiteren diagnostischen Test, der eine solche hohe Sensitivität und Spezifität aufweist wie die HIV-Antikörper-Suchtests. Die HIV-Diagnostik ist aber nicht absolut perfekt und wird sich – wahrscheinlich besonders wegen der sich verändernden HIV-Situation in Europa – ständig dem jeweiligen Erkenntnisstand anpassen müssen.

Im Verlauf der Präsentationen bzw. Diskussionen gelangte man hinsichtlich bestimmter Kernpunkte zu Ergebnissen, die im folgenden vorgestellt werden.

- ▷ Entscheidung über Priorität bezüglich zweier wichtiger Anforderungen an aktuelle HIV-Tests: Steigerung der bereits sehr hohen Sensitivität der HIV-Antikörper-Tests, um die „offene Lücke“ in der serologischen HIV-Diagnostik noch weiter zu verkleinern oder Entwicklung neuer Tests, die auch alle inzwischen bekannten und noch zu erwartenden HIV-Varianten mit größter Sicherheit erfassen.

Die Experten waren der Meinung, daß eine weitere Verkleinerung der „diagnostischen Lücke“ in der Frühphase der HIV-Infektion (zur Zeit 22 Tage) in Europa das wichtigste Problem ist. Die besondere Beachtung der neuen HIV-Subtypen steht derzeit erst an der zweiten Stelle.

- ▷ Verwendung unterschiedlicher HIV-Antikörper-Suchtests in einzelnen Ländern entsprechend dem unterschiedlichen Auftreten von HIV-Varianten.

Da in Europa der HIV-1 Subtyp B überwiegt, scheint es derzeit nicht erforderlich zu sein, die Tests für Europa auf einen anderen Subtyp aufzubauen, nachdem die gegenwärtigen HIV-Antikörper-Tests neben HIV-1 Subtyp B (und HIV-2) inzwischen auch HIV-1 Subtyp 0 erkennen.

- ▷ Stellenwert der verschiedenen HIV-Tests (Enzymimmunoassays zum Antikörper- bzw. Antigen-Nachweis, Immunoblot, HIV-Genom-Nachweis mittels Nukleinsäuren-Hybridisierungstechniken) bei der Diagnostik einer HIV-Infektion und deren Reihenfolge zur Absicherung der Befunde.

Die Reihenfolge bei der Verwendung verschiedener Tests im Rahmen der HIV-Diagnostik muß den besonderen Fragestellungen angepaßt werden. Als Screening-Verfahren soll nach wie vor der HIV-Antikörper-Suchtest mittels Enzymimmunoassay (Reaktivität für HIV-1, HIV-2 sowie HIV-0) eingesetzt werden. Dieses Verfahren könnte dadurch verbessert werden, daß – wie in der Schweiz –

parallel zwei HIV-Antikörper-ELISA-Tests unterschiedlicher Diagnostika-Hersteller eingesetzt werden. [jedoch wurde die Effizienz in Frage gestellt!].

Keine Zustimmung konnte für den zusätzlichen HIV-p24-Antigen-Nachweis im Screening-Verfahren besonders in den Blutbanken gefunden werden. Die Kosten für einen mit diesem Screening-Test zusätzlich entdeckten HIV-Infizierten würden ca. 15 Millionen DM betragen. Auch der HIV-Genom-Nachweis mittels Nukleinsäuren-Hybridisierungstechniken wird aus technischen Gründen und wegen der hohen Kosten derzeit als Screening-Test nicht befürwortet.

Der Immunoblot wird als erster Bestätigungstest eingesetzt, obwohl dieser Test nicht die einzige Bestätigung darstellen kann. In der Tat spielen besonders die Nukleinsäure – Hybridisierungstechniken (wie z. B. PCR) bei der Differenzierung von HIV-1 und HIV-2 sowie für die HIV-Diagnostik bei Neugeborenen von HIV-positiven Müttern eine wichtige Rolle.

Der HIV-p24-Antigen-Test (lösliches bzw. immunkomplexiertes p24-Antigen) kann ebenso wie der HIV-Genom-Nachweis, sowohl in der Frühphase bei Verdacht auf eine HIV-Infektion insbesondere bei unklaren Befunden bzw. bei Diskrepanzen, als auch bei der Verlaufsbeurteilung der Infektion von Bedeutung sein.

- ▷ Restrisiko einer HIV-Übertragung bei der Transfusion von Blut und Blutprodukten.

Im Blutspendewesen haben Transfusionszwischenfälle, die durch menschliche Fehler bei der Ausgabe von Blutkonserven und bei der Bluttransfusion sowie durch ABO-Unverträglichkeiten verursacht werden, eine größere Bedeutung als das Risiko einer HIV-Übertragung durch eine Bluttransfusion. Ein solches Risiko liegt in Deutschland bei ca. 1 : 1.400.000 (abhängig von der Region zwischen 1 : 500.000 und 1 : 3.000.000)

- ▷ Probleme außerhalb des diagnostischen Bereichs wie z. B. bei der Übermittlung von Befunden vom Labor zum Arzt und vom Arzt zum Patienten.

Fachliche und oft schwerwiegende psychologische Probleme ergeben sich bei fraglichen / diskrepanten Befunden bezüglich HIV-Diagnostik besonders durch Interpretationsunsicherheiten bzw. Vermittlungsfehler. Hier wird eine Hilfestellung durch die Diagnostika Industrie in Form von Informationsmaterialien und Graphiken erwartet.

- ▷ Aufwand für die Entwicklung neuer HIV-Tests durch die Diagnostika-Hersteller und Möglichkeiten zur Erhöhung der Sensitivität der Tests bei gleichzeitiger höchster Spezifität.

Bei der Entwicklung moderner HIV-Tests bieten sich als Antigene sowohl einzelne HIV-Antigene als auch

Antigenmischungen an. Einzelne HIV-Antigene werden aus der Zellkultur gewonnen oder auf rekombinanter Basis bzw. als synthetische Peptide hergestellt. Die Antigenmischungen bestehen entweder aus synthetischen Peptiden und rekombinanten Antigenen oder aus rekombinanten Antigenen und gereinigten Virusantigenen.

Die Anforderungen an einen HIV-1/HIV-2-Antikörper-Suchtest beinhalten:

- a) für die Sensitivität: hohe Sensitivität in der Phase der HIV-1 Serokonversion, bei der Erkennung aller HIV-Varianten sowie bei der Erkennung von Proben aus der asymptomatischen und symptomatischen Phase der Erkrankung.
- b) für die Spezifität: hohe Spezifität bei der Initialtestung
- c) für die Praktikabilität: einfache Durchführbarkeit und Robustheit des Tests sowie Gerätekompatibilität.

Die Neuentwicklung eines HIV-Tests mit allen damit verbundenen Phasen Machbarkeit/Forschungsstudie, Testentwicklung, diagnostische Erprobung, Zulassung und Ausbietung dauert insgesamt 2 1/2 bis 3 Jahre und verursacht Kosten in Höhe von 3 bis 5 Millionen DM.

Schlußfolgerung

Der Workshop „HIV-Antikörper-Testung“ stellte die erste Etappe im Prozeß der Diskussion zwischen Vertretern/Experten aus Zulassungsbehörden und Wissenschaftlern aus verschiedenen Institutionen sowie Diagnostikafirmen über die aktuelle Situation der HIV-Diagnostik dar. Da aufgrund der neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse zu erwarten ist, daß die Anforderungen an die HIV-Tests sich kontinuierlich ändern werden, ist ein ständiger Dialog unter den Beteiligten notwendig, um gemeinsame Anstrengungen im Hinblick auf eine noch weitere Erhöhung des hohen Standards der HIV-Diagnostik vornehmen zu können.

Hinsichtlich Zulassung neuentwickelter HIV-Tests wäre zumindest auf europäischer Ebene eine Vereinheitlichung der Zulassungskriterien wünschenswert. Für diesen Zweck wäre die Etablierung anerkannter HIV-Referenzmaterialien bzw. HIV-Serokonversionspanels – vorhanden in ausreichender Menge für alle Testhersteller und Zulassungsbehörden – anzustreben.

Es ist zu hoffen, daß die neue EG-Richtlinie über in-vitro-Diagnostika zu einer Harmonisierung der Bewertungskriterien für die Leistungsdaten neuer bzw. bereits kommerziell erhältlicher HIV-Tests beitragen wird.

Raum	Freitag, 24. November 1995		Samstag, 25. November 1995	
	9.15-12.30 Uhr	14.30-18.00 Uhr	9.15-12.30 Uhr	14.30-18.00 Uhr
01	Inmuntherapie (Spezifische Hypo-sensibilisierung) heute Prof. Dr. G. Fork, Münster Prof. Dr. Dr. J. Ring, Hamburg	Osteoporose des Mannes Prof. Dr. P. Burckhardt, Lausanne Prof. Dr. J. D. Ring, Leverkusen	Neurolinguistisches Programmieren als erfolgreiche Kommunikationsmethode Karin Diehl, Dortmund Ingrid Blessing, Rheinleiten-Mörsch	Die Mitralklappe - Aktuelle Diagnostik und Therapie Prof. Dr. A. Both, Stuttgart
02	Adipositas - moderne Behandlung eines alten Problems PD Dr. H. Hauner, Düsseldorf	Wirksamkeit von Azaroprosol in der Rückfallprophylaxe der Alkoholabhängigkeit PD Dr. S. Soyka, München	Rheumalorum '95 Nutzen und Risiken der Rheumatherapie Prof. Dr. V. Hemsch, Damp	Periphere Schmerzsyndrome in der Neurologie Prof. Dr. J. Jörg, Wuppertal
03	Gesundheitswissenschaften/Public Health Public Health Studiengänge: Inhalte und Schwerpunkte Prof. Dr. J. Siegnist, Düsseldorf	Umweltliga in Bezug auf Kanzerogenität - Diagnose und Therapie mit der Elektroakupunktur nach Dr. Voll Prof. Dr. K. U. Benner, München		
04	Diagnostik und Therapie der erektilen Dysfunktion PD Dr. K. P. Jünemann, Mannheim	Umfassende Betreuung der Hochdruck-kranken in der täglichen Praxis Prof. Dr. I.-W. Franz, Todtmoos	Die Selbsthilfegruppen auf dem Weg zu einem Selbstverständnis (Beginn: 10.00 Uhr) Moderation: Dr. B. Wegener, Berlin	Quantitative Ultraschallkostendensitometrie (QUS): Alternative zu konventionellen Verfahren zur Osteoporose-Risikobestimmung? Prof. Dr. R. Ziegler, Heidelberg
1	AIDS '95 Prof. Dr. F. D. Gosbel, München	Gesundheitswesen 2000 - krank oder gesund? Journalisten fragen Ärzte - Ärzte fragen Politiker Moderation: Sabine Christiansen NDR, Hamburg	Damirala in Symbiose und Pathogenität - therapeutische Konsequenzen Prof. Dr. L. Deming, Schlusfeld Prof. Dr. B. Wiedemann, Bonn	Azt-/Patientensymposium Wechseljahre - da muß man durch Beginn 15.30 Uhr Moderation: Iris Bettray, SAT 1, Essen
2	Vergiftung durch Spurenelemente Tagungspräsidentin: Prof. Dr. Ingrid Lornbeck, Düsseldorf	11. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente Bedarf von Spurenelementen	Neuere Meßmethoden - Spurenelemente und ihre Wechselwirkung MEDICA Ärzte- und Apotheker-Forum 1995	Das Konzept mit dem Doppelhütchen für Arzt und Patient Dr. Jur. F. A. Steiner, Bielefeld
3	Endoskopische Chirurgie: Welche Operationen ambuliert, welche stationär? Prof. Dr. G. Bueß, Tübingen	Endoskopische Chirurgie: Hygiene und isologische Entwicklung Prof. Dr. G. Bueß, Tübingen	MEDICA Ärzte- und Apotheker-Forum 1995 Moderation: Dr. H. Morck, Frankfurt	Der Ischiobulbäre Fall: Das obstruktive Schiefenack-Syndrom Prof. Dr. Dr. H. Koch, Mönchengladbach
4	Harninkontinenz im Alter Prof. Dr. H. Melchior, Kassel	Gesundheitswissenschaften/Public Health Vorstellung des Forschungsverbundes NRW Prof. Dr. B. Baduar, Bielefeld	Qualitätszirkel u. Qualitätsmanagement in der ambulanten Versorgung Dr. Gerlach, Bremen, Dr. Szecsenyi, Göttingen Dr. Bahrs, Hannover	Einführung in die UWB/HT Dr. M. Feldmann, Essen
5	Erreger und Antibiotika Dr. Th. Fenner, Hamburg	Aktuelle Themen der Augenheilkunde PD Dr. J. Kammann, Dortmund	Ozon als Therapeutikum Prof. Dr. E. G. Beck, Glefen Dr. rer. nat. Renate Wehahn, Iflzheim	Psychosomatische Erkrankungen: Über den Umgang mit sexual gestörten Patienten V. van den Boom, Aachen
6	Diagnosekurs zu Funktionsstörungen (Inkontinenz und Obstipation) des Enddarms bei Kindern und Jugendlichen Prof. Dr. G. H. Willig, Münster	Einführung in die Neuraltherapie - Therapeutische Lokalanästhesie - Schmerztherapie Dr. E. Klaus, Würzburg	Aktuelle Proktologie PD Dr. K. Arnold, Wiesbaden	Arbeitsmedizin in Klinik und Praxis Dr. H. W. Christe, Köln Prof. Dr. Dr. F. Hoffmann, Freiburg
7	Morbus Parkinson Prof. Dr. P. A. Fischer, Frankfurt Dr. B. Regler, Bad Nauheim	Aktuelle Diabetologie in der Praxis Dr. K. H. Bergis, Bad Mergentheim	Qualität sichern - vor Spätschäden bewahren - Rationale Therapie diabetischer Begleitkrankungen Prof. Dr. G. Sachse, Wiesbaden	LASER Eingriffe in der Kopf- und Halschirurgie Prof. Dr. K. Terrah, Stuttgart
8	Aktuelle Kindernephrologie - Urologie Prof. Dr. H. Obting, Essen Prof. Dr. H. Rübben, Essen	Koronare Herzkrankung - Diagnostik und Therapie (medikamentös, interventionell, operativ) Prof. Dr. H. D. Schulte, Düsseldorf Prof. Dr. B. E. Strauer, Düsseldorf	Sportverletzungen des Kniegelenkes - Konservative und operative Behandlung Prof. Dr. U. Holz, Stuttgart	Regulationstherapie - die Basisdiagnostik chronischer Krankheiten Prof. Dr. A. Rost, Rottach-Egern
12	MEDICA Oeconomica: Weiterentwicklung des Gesundheitswesens Prof. Dr. H. R. Vogel, Frankfurt	Praxis-Management-Forum Wege aus der Kostenkrise Dipl.-Kfm. O. Henker, Reutlingen	Unternehmen Arztpraxis - Strategien zum Erfolg Dr. W. Kölling, Mandelbach, Dr. F. H. Mader, Nittendorf, Dr. K. Wahle, Münster	Der Arzt als Unternehmer - Finanzstrategien zum Aufbau einer sicheren Altersversorgung Dipl.-Bw. H. Nentwig, Köln
26	Allgemeinmedizin Block 13 Betreuungskonzepte für Patienten mit rheumatischen Erkrankungen Dr. med. Dipl. Psych. H. Seelbach, Neuss	Umweltmedizin Block I Grundlagen und Anwendungsformen des Humanbiomonitorings, Aspekte der klinischen Umwelttoxikologie Dr. H. Istad, Dr. W. Müller, Akademie für öffentliches Gesundheitswesen, Düsseldorf	Allgemeinmedizin Block 13 Betreuung von Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen Dr. H. Schläger, Düsseldorf, Prof. Dr. W. Widmayer, Kempen Erkennen und Behandeln von Arterien Verschlusskrankheiten PD Dr. H.-D. Klimm, Kuppenheim	Umweltmedizin Block I PCB - toxiskologisches Profil - Belastungsmonitoring und - Expositionsabschätzung - Gesundheitsliche Bewertung und - Handlungsoptionen Dr. H. Istad, Dr. W. Müller, Akademie für öffentliches Gesundheitswesen, Düsseldorf
27	Gynäkologie/Geburtshilfe Prof. Dr. Th. Somville, Düsseldorf	Interdisziplinäres Fortbildungsturnier der Nordrheinischen Akademie für ärztliche Fort- und Weiterbildung Dermatologie Prof. Dr. H. F. Merk, Aachen	Koloproktologie PD Dr. P. Prohm, Wuppertal Prof. Dr. Th. Ghaoghlu, Köln	Pharmakologie Dr. G. Hopf, Düsseldorf
60	Kolposkopie I + II - Wiederholung des Mittwoch-Kurses Dr. St. Seidl, Hamburg, Dr. P. Schomann, Lüneburg		Kolposkopie II - Wiederholung des Donnerstag-Kurses Dr. St. Seidl, Hamburg, Dr. P. Schomann, Lüneburg	
61/62	Koloskopischer Untersuchungskurs mit Videodemonstration und Übungen am Phantom (Stuttgarter Koloskopiekurs) Prof. Dr. U. v. Gaisberg und Mitarbeiter, Stuttgart		Koloskopischer Untersuchungskurs - Forts. Prof. Dr. U. v. Gaisberg u. Mitarbeiter	Diagnostik von Autoimmun- u. Infektionskrankheiten durch indirekte Immunfluoreszenz Beginn: 13.30 Uhr Dr. W. Stöcker, Lübeck, Dr. H. Schute, Oberkochen
63	Platteneithel im Zervixausstrich PD Dr. V. Schneider, Freiburg	Drüsenepithel im Zervixausstrich Dr. Ehrentraud Bayer-Pietsch, Siegen	Hämatologiekurse für Fortgeschrittene - Myelo- u. Lymphoproliferative Erkrankungen (Beurteilung von Blut- und Knochenmarksausstrichen einsch. Zytochemie) Prof. Dr. P. Lorbacher, Wiesbaden	
64	Informationskurs für Manuelle Medizin Dr. H.-J. Petersohn, Düsseldorf	Informationskurs für Manuelle Medizin - Fortsetzung Dr. H.-J. Petersohn, Düsseldorf	Informationskurs für Manuelle Medizin - Fortsetzung Dr. H.-J. Petersohn, Düsseldorf	
65	Einführung in die Akupunktur Doz. Dr. H. Becke, Ludwigshafen	Akupunktur bei Migräne und Kopfschmerzen sowie bei Erkrankungen des Bewegungsapparates Dr. G. Stux, Düsseldorf	Akupunktur in Geburtshilfe und Frauenheilkunde Dr. K.-H. Junghanns, Tilsen-Neustadt	Abrechnungseminar für Akupunkturärzte Dr. A. Polimann, Baden-Baden
66	Bronchologischer Untersuchungskurs - Fortsetzung Dr. D. Greschuchna, Essen, Prof. Dr. J. A. Nakhosteen, Bochum	Drüsenepithel im Zervixausstrich Dr. Ehrentraud Bayer-Pietsch, Siegen	Bronchologischer Untersuchungskurs - Fortsetzung Dr. D. Greschuchna, Essen, Prof. Dr. J. A. Nakhosteen, Bochum	
67	ABDM-Experten/Fortgeschrittenen Seminar: 24-Stunden-Blutdruckmessung Prof. Dr. M. Anlauf, Bremerhaven Prof. Dr. M. Mödcke, Burg	Doppler-Kurs und Kompressionstherapie (untere Extremitäten) mit Patientendemonstrationen Dr. H. Altenkämpfer, Plettenberg	Ergonomie-Seminar Teil I + II Prof. Dr. H. Läßgen, Remscheid	
68	Hygieneüberprüfungen Doz. G. P. Riewow, Neuss	Strategie und Wirtschaftlichkeit im Krankenhaus - Kosten senken durch Organisationsstruktur O. C. Trilling, Olsbach	Fertig studiert und trotzdem kein Arzt? Andere Berufswege für Mediziner Dipl.-Ing. M. Heymann, Düsseldorf	Einführung von integrierten Umwelt/Qualitätsmanagementsystemen in Krankenhäusern Dipl.-Ing. (ur) M. Manz, Hamburg Dipl.-Ing. Susanne Wolhagen, Hamburg
69	Arzt im Rettungsdienst - Teil B Dr. H. Purmann, Wuppertal, Dr. G. Platen, Düsseldorf	Arzt im Rettungsdienst - Teil A Dr. H. Purmann, Wuppertal, Dr. G. Platen, Düsseldorf	Arzt im Rettungsdienst - Teil B Dr. H. Purmann, Wuppertal, Dr. G. Platen, Düsseldorf	
70	Informationsdienste und Datenbanken Dr. R. Engelbrecht, Neuhberg Prof. Dr. C. Ohmann, Düsseldorf	Diagnoseverschlüsselung nach der ICD 10 in der vertragsärztliche Versorgung Dr. G. Brenner, Zl. Köln	G O A - Abrechnungseminar W. M. Lamers, Billerbeck	Ärztliche Entscheidungsunterstützung Prof. Dr. C. Ohmann, Düsseldorf
71	Labor-Management-Forum Dipl.-Kfm. O. Henker, Reutlingen	EDV-gestützte Dokumentation und Kommunikation mit Kartensystemen Teil 1 Dr. O. P. Scheeler, Zl. Köln	EDV-gestützte Dokumentation und Kommunikation mit Kartensystemen Teil 2 Dr. O. P. Scheeler, Zl. Köln	Tumorzentren/Tumoregister Prof. Dr. J. Dudaek, Glefen
72	"Tips und Tricks" (Wiederholung) für MedStar-Anwender EDV-Trainings-Akademie	Schnupperkurs zum Kennenlernen der MedStar-Praxis-EDV EDV-Trainings-Akademie	Schnupperkurs zum Kennenlernen der MedStar-Praxis-EDV (Wiederholung)	Das kartentragende Arbeiten mit Hilfe... (Wiederholung) Dr. B. Vogel, Stuttgart
L	Notfallmedikamente - medikamentöse Notfalltherapie - Experten beantworten Ihre Fragen Prof. Dr. P. Selrin, Würzburg	Die spontane Subarachnoidalblutung - Neuropharmakien, Diagnostik und Therapie Prof. Dr. P. Selrin, Würzburg	Der präklinische HNO-Notfall Dr. G. Feuchtinger, München	Ärztliche und rechtliche Aspekte bei unklaren Todesfällen Prof. Dr. M. Staak, Köln
M	Kardiale Notfall-situationen (mit praktischen Übungen) Dr. A. Dorsch, Sigmaringhausen	Pädagogische Notfall-situationen (mit praktischen Übungen) Dr. A. Dorsch, Sigmaringhausen	Der gerontologische Patient in der Intensiv- und Anästhesiepflege G. Meyer, Münster Andrea Kötter, Stuttgart	Akutes Nierenversagen in der Intensivpflege Katrin Blanch, Düsseldorf Maria Könen, Bonn
R	Der herznähe Patient in der Intensivpflege und Anästhesie U. Gokinski, Bad Homburg Dr. Maria Stein-Konertz, Berlin	Resanimation Angelika Stockinger, Stuttgart G. Meyer, Münster		
Kliniken	Krankenhausbefehle, Mönchengladbach Aufbaukurs der Ultraschall-diagnostik im Kopf-Hals-Bereich - Fortsetzungen - Abschlusskurs der Ultraschall-diagnostik im Kopf-Hals-Bereich PD Dr. Dr. R. Schmetschen, Hannover		Krankenhausbefehle, Mönchengladbach Aufbaukurs - Fortsetzung - Abschlusskurs - Fortsetzung - PD Dr. Dr. R. Schmetschen, Hannover	
	Klinikum Barmen, Med. Klinik B Farbdoppler-Echokardiographie Prof. Dr. H. Gültzer, Dr. W. Krahwinkel, Wuppertal		Klinikum Barmen, Med. Klinik B Farbdoppler-Echokardiographie - Forts. Prof. Dr. H. Gültzer, Dr. W. Krahwinkel, Wuppertal	
	Einführung in die Strahl-Echokardiographie - Theoretische Grundlagen und praktische Demonstration Dr. W. Krahwinkel, Wuppertal		Universalität: Fraunhofer, Düsseldorf - Mammasonographie PD Dr. Ulrike Nitz, Düsseldorf	

CCD - Süd

Halle 6, Eingang Nord

CCD - Ost

uständliches Programm, Versand ab 1. September 1995.
eranstalter und Auskunft: MEDICA e.V. Postfach 700 149, 70571 Stuttgart, Tel: 07 11/7 65 14 54, Fax 07 11/7 65 14 54, Fax 07 11/76 92. Änderungen vorbehalten.