

Das schweizerische HIV-Testkonzept – aktualisierte Übersicht über Technisches Konzept und Laborkonzept

Das Bundesamt für Gesundheit (BAG) führte 1985 in Zusammenarbeit mit der Eidgenössischen Kommission für Aids-Fragen (EKAF) ein HIV-Testkonzept ein, um für die schwerwiegende Diagnose einer HIV-Infektion landesweit ein Optimum an Zuverlässigkeit zu gewährleisten. Das HIV-Testkonzept umfasst zwei Bereiche, das Technische Konzept und das Laborkonzept. Das Technische Konzept regelt die Methoden, mit welchen die anfallenden diagnostischen Fragen optimal beantwortet werden. Das Laborkonzept regelt, welche Laboratorien sich mit den verschiedenen diagnostischen Fragen und Spezialaufgaben im Bereich der öffentlichen Gesundheit befassen (Meldewesen). Es umfasst drei Ebenen, Screeninglaboratorien, Bestätigungslaboratorien und, als Referenzlabor, das Nationale Zentrum für Retroviren (NZR). Seit dem 26. Juni 1996 verpflichtet die Verordnung über mikrobiologische und serologische Laboratorien die in der HIV-Diagnostik tätigen Laboratorien, sich an das Testkonzept des BAG zu halten (Anhang 1 der Verordnung).

Bereits 1985 wurde vom BAG eine Fachkommission bestellt mit der Aufgabe, für das BAG Richtlinien und Empfehlungen auszuarbeiten, welche geeignet sind, die hohe Qualität der HIV-Diagnostik aufrecht zu erhalten und gemäss dem aktuellen Stand der Forschung und Entwicklung laufend zu verbessern. Heute ist dies die *Fachkommission Labor und Diagnostik von HIV/AIDS* des BAG, kurz *FLD* genannt. Sie konstituiert sich aus den Leitern der Bestätigungslaboratorien und des NZR sowie einer adäquaten Vertretung des BAG. Ihre Empfehlungen betreffen sowohl das Technische Konzept als auch das Laborkonzept.

In Erfüllung dieser Aufgabe und im Einklang mit dem beträchtlichen technischen Fortschritt hat die FLD das HIV-Testkonzept in den vergangenen 20 Jahren immer wieder modifiziert. Alle Empfehlungen wurden im BAG-Bulletin kommuniziert. Naturgemäss wurden jeweils die Neuerungen hervorgehoben, das Unveränderte aber eher kurzweilig erwähnt. Dies war ausreichend, solange ein Personenkreis angesprochen wurde, der über den

bisherigen Stand des Konzepts gut orientiert war. Nachdem heute in den Laboratorien wie auch den Gesundheitsbehörden viele neue Kräfte nachgerückt sind, welche den Werdegang des Konzepts nicht von Anfang an miterlebt haben, erscheint eine aktualisierte Gesamtübersicht über die HIV-Diagnostik und ihre organisatorischen Strukturen in der Schweiz sinnvoll und notwendig.

TECHNISCHES KONZEPT – DIE DREI FRAGEN DER HIV-DIAGNOSTIK

Ging es vor 20 Jahren ausschliesslich um die Abklärung, ob jemand HIV-infiziert war (Frage 1), hat sich das Spektrum der Probleme, mit denen das HIV-Labor konfrontiert ist, seither um zwei weitere Kardinalfragen erweitert. Sobald die Diagnose einer HIV-Infektion zweifelsfrei etabliert ist, stellen sich sofort zwei weitere Fragen, nämlich nach der Identität des Virus, d.h. seinen genetischen und biologischen Eigenschaften (Frage 2), sowie der

Aktivität der Infektion, d.h. der Viruslast (viral load; Frage 3). Die Kenntnis der Virusidentität (HIV-1, HIV-2, Virus der Gruppe O von HIV-1) ist eine notwendige Voraussetzung für die Wahl des geeigneten Tests zur Bestimmung der Viruslast und, falls eine antiretrovirale Therapie (ART) erforderlich ist, auch für die Zusammenstellung einer optimal wirksamen Therapie. Dies, weil Medikamente aus der Gruppe der Non-Nucleosid Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) gegen Viren der Gruppe O und gegen HIV-2 generell unwirksam sind. Wichtig für die optimale Therapiewahl ist auch die genaue Kenntnis von allfälligen individuell vorhandenen Resistenzen des Virus eines Patienten gegen antiretrovirale Medikamente. Die Kenntnis der korrekten Viruslast schliesslich wird zusammen mit der CD4+ Zellzahl für die ärztliche Entscheidungsfindung bezüglich einer ART und für die Therapieüberwachung benötigt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über das aktuelle Technische Konzept, d.h. über die Tests, die für die Beantwortung der drei Fragen heute eingesetzt werden können. Dies im Sinne einer Testauswahl, aus welcher jedes Labor den für einen bestimmten Testauftrag optimalen Test bzw. die optimale Testkombination selbst zu bestimmen hat. Richtlinien dafür sind in den entsprechenden Kästen und den in diesen Kästen befindlichen Tabellen 2–6 vorgegeben.

Zusätzlich zu der primären diagnostischen Frage behandelt die HIV-Diagnostik heute also auch qualitative und quantitative virologische Aspekte. Es ist offensichtlich, dass diese zusätzlichen Untersuchungen, die ja eine Reihe weiterer Virusparameter erfassen, die Zuverlässigkeit der eigentlichen HIV-Diagnose nochmals wesentlich verbessern, d.h. sie erhöhen die diagnostische Spezifität. Die Sicherheit der initialen Diagnose «bestätigt HIV-positiv» wird durch die nachfolgenden positiven Resultate der Viruslastbestimmung beziehungsweise durch die Identifikation des Subtypen im Rahmen einer allfälligen Resistenztestung nochmals wesentlich gestärkt. Im umgekehrten Fall wird man sich bei einem frisch diagnostizierten Patienten mit nicht nachweisbarer Viruslast nicht nur überlegen müssen,

Tabelle 1

Aktuelles Technisches Konzept.

Die drei prinzipiellen Fragen der HIV-Diagnostik und die für ihre Beantwortung einsetzbaren Tests

Frage 1. Ist jemand mit HIV infiziert?

Screening-Stufe	Bestätigungsstufe (Bestätigungslaboratorien oder/und NZR)	
Tests, die am Erstmaterial (Serum oder Plasma) eingesetzt werden	Tests, die am Erstmaterial eingesetzt werden können	Tests, die am Zweitmaterial (EDTA-Blut) oder an Folgematerialien eingesetzt werden können
<ul style="list-style-type: none"> • In Labors: Screeningtest der 4. Generation (HIV-1/2-Kombinationstest; erfasst Antikörper und das p24-Ag) • In Arztpraxen: Schnelltest (erfasst nur Antikörper – ungeeignet bei Verdacht auf Primoinfektion!) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zweiter, anderer Screeningtest (3. oder 4. Generation) • Schnelltest • Line Immunoassay HIV-1/2 • (Western Blot) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zweiter, anderer Screeningtest (3. oder 4. Generation) • Schnelltest • Line Immunoassay HIV-1/2 • (Western Blot)
	<ul style="list-style-type: none"> • p24-Ag + Neutralisation 	<ul style="list-style-type: none"> • p24-Ag + Neutralisation • HIV-1 RNA quantitativ (Viruslast) • HIV-1 RNA (qualitativ) • HIV-1 DNA (qualitativ) • HIV-2 DNA (qualitativ) • PERT Assay • MEGA-PCR für HIV-1 DNA • Viruskultur + Virusidentifikation

Frage 2. Welche Eigenschaften hat das Virus?

Ist es HIV-1, HIV-2 oder HIV-1 Gruppe O?	Gibt es Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente?
<ul style="list-style-type: none"> • Line Immunoassay, (Western Blot) • DNA-PCR für HIV-1 bzw. HIV-2 • HIV-1 Gruppe O-erfassende Primer & Sonden & Sequenzierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetischer Resistenztest • Phänotypischer Resistenztest

Frage 3. Wie hoch ist die Viruslast?

Primär eingesetzter Test	Test-Alternative
<ul style="list-style-type: none"> • HIV-1 RNA quantitativ -> Konzentration der HIV-1-Viruspartikel im Plasma (ungeeignet für HIV-2 und HIV-1 Gruppe O) 	<ul style="list-style-type: none"> • RT-Aktivität mit PERT Assay (sequenzunabhängig) -> Konzentration aller Retroviruspartikel im Plasma

ob eine aberrante Virusvariante vorliegt, sondern sich auch nochmals ganz prinzipiell die Frage stellen müssen, ob denn die Kriterien für die Diagnose einer HIV-Infektion tatsächlich erfüllt sind.

Aus diesen Erörterungen geht auch hervor, dass der behandelnde Arzt dem klinischen Labor möglichst treffend Auskunft über die Zielrichtung der verlangten HIV-Untersuchung geben muss. Nur wenn Vorgeschichte und Fragestellung bekannt sind, kann die richtige Testwahl erfolgen. Diese Informationen müssen vom Screeninglabor unbedingt auch an das Bestätigungslabor weitergeleitet werden. Die FLD stellt ausdrücklich fest, dass es nicht die Aufgabe des Screeninglabors ist, dem Bestätigungslabor vorzuschreiben, welchen Test es für die Bestätigung durchführen soll und darf. Das Screeninglabor erteilt lediglich den Bestätigungsauftrag. Die Wahl des oder der für die Erfüllung des

Bestätigungsauftrags notwendigen Tests liegt im Ermessen des Bestätigungslabors.

Frage 1: Ist jemand mit HIV infiziert?

Mit dieser zentralen Frage befassen sich alle Ebenen des HIV-Laborkonzepts, also die klinischen Laboratorien auf der Ebene des HIV-Screenings (bzw. auch gewisse Praxislabors, die den HIV-Schnelltest durchführen), die HIV-Bestätigungslaboratorien und das Nationale Zentrum für Retroviren (NZR).

Bezüglich der einzusetzenden Testalgorithmen ist zu beachten, dass für die pädiatrische HIV-Diagnostik bei Neugeborenen und Säuglingen bis zu 18–24 Monaten andere Methoden zum Einsatz kommen als für Erwachsene oder ältere Kinder.

Diagnostik bei Erwachsenen und Kindern >24 Monate

Bei den Methoden, die für diese

primäre und zentrale Fragestellung eingesetzt werden, sind direkte und indirekte Tests zu unterscheiden. Die indirekten Tests machen sich die Immunantwort einer infizierten Person zunutze, insbesondere die Produktion HIV-spezifischer Antikörper. Direkte Tests weisen bestimmte Viruskomponenten nach, z.B. Virusproteine wie das p24 Antigen (p24-Ag), HIV-DNS oder -RNS oder die Aktivität bestimmter retroviraler Enzyme wie der in den Viruspartikeln enthaltenen Reversen Transkriptase.

In der Frühphase der HIV-Infektion findet in der Regel eine enorme Virusvermehrung statt. Innerhalb von Tagen werden sehr hohe Virustiter erreicht, die im Verlauf von wenigen Wochen in der Regel aber wieder abfallen. Die Viruspartikel können im Blutplasma mit der quantitativen RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*) oder anderen sequenzspezifischen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren nachgewiesen wer-

den. Auch der p24-Ag-Test wird in dieser Phase positiv. Wenig später zeigen sich dann die ersten Antikörper im Antikörpersuchtest.

Da das Risiko einer Übertragung in der Frühphase der Infektion infolge der hohen Virustiter und der völligen Abwesenheit von neutralisierenden Antikörpern oder anderen Abwehrelementen sehr hoch ist, muss dieses Stadium beim HIV-Screening unbedingt erfasst werden. Dies ist heute optimal gewährleistet durch die Verwendung eines kombinierten Antikörper/Antigen-Suchtests der vierten Generation, der sowohl p24-Ag als auch Antikörper erfasst (Kombinationstest). Die FLD empfiehlt daher seit dem 1. März 2004 für das Screening die Verwendung eines kombinierten Antikörper/Antigen-Suchtests der vierten Generation, wo immer dies technisch möglich ist, d.h. in allen diagnostischen Laboratorien (s. Kasten «Empfehlungen der FLD für das HIV-Screening in klinischen Laboratorien und Arztpraxen»). Da das Screening mit dem HIV-1/2 Schnelltest in der Arztpraxis das p24-Ag nicht erfasst, müssen Proben von Patienten mit klinischem oder anamnestischem Verdacht auf eine HIV-Primoinfektion unbedingt im Labor und mit einem Test, der das p24-Ag erfasst (am einfachsten mit dem Kombinationstest), untersucht werden.

Den Bestätigungslaboratorien stehen heute neben dem vor 20 Jahren einzig verfügbaren Test, dem Western Blot (WB), eine Reihe weiterer Tests zur Verfügung (Tabelle 1). Je nach Labor und Probengut kann ein bestimmter Test bzw. die Kombination bestimmter Tests sinnvoller sein als ein anderer Test oder eine andere Testkombination. Die FLD hat daher 1998 beschlossen, von der zuvor starren Regelung des Bestätigungsprozederes, welche zwingend einen Western Blot erforderte, abzurücken. Stattdessen wurden Kombinationen positiver Testresultate im Erst- und im Zweitmaterial definiert, welche für eine sichere Diagnose einer HIV-Infektion erfüllt sein müssen (s. Kasten «Empfehlungen der FLD für das Screening und die Bestätigung in den Bestätigungslaboratorien»). Solche eine HIV-Infektion bestätigenden Minimalkombinationen sind bei-

EMPFEHLUNGEN DER FLD FÜR DAS HIV-SCREENING IN KLINISCHEN LABORATORIEN UND ARZTPRAXEN

Screening in klinischen Laboratorien:

Da der kombinierte Antikörper/Antigen-Suchtest die Frühphase der HIV-Infektion besser erfasst als die ausschliesslich auf dem Antikörpernachweis basierenden Tests der dritten Generation, empfiehlt die FLD den klinischen Laboratorien, für das Screening generell einen Test der vierten Generation einzusetzen. Bei negativem Resultat einer Untersuchung trotz anamnestischem oder klinischem Verdacht auf eine Primoinfektion muss die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass der Test negativ war, weil er zu früh durchgeführt wurde. In diesem Fall sollte nach ein bis zwei Wochen eine Kontrolle durchgeführt werden (wiederum mit dem Kombinationstest). Zum endgültigen Ausschluss einer HIV-Infektion nach einem Expositionereignis ist zudem eine Nachtestung nach drei Monaten nötig. Beurteilung und weiteres Vorgehen in den klinischen Laboratorien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Screening in der Arztpraxis:

In Arztpraxen, in welchen die Tests der vierten Generation aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden können, kann weiterhin der HIV-Schnelltest eingesetzt werden, wenn es darum geht, eine seit längerer Zeit bestehende HIV-Infektion auszuschliessen (mehr als drei Monate nach potenzieller Exposition). Bei Verdacht auf Primoinfektion muss das Blut jedoch unbedingt an ein Labor gesandt werden, das routinemässig einen Kombinationstest (AK + p24) der vierten Generation durchführt (vor der Einsendung verifizieren!). Beurteilung und weiteres Vorgehen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Bei reaktivem Resultat eines HIV-Suchtests in einem klinischen Labor oder einer Arztpraxis muss ein neu entnommenes EDTA-Blut an ein Bestätigungslabor eingesandt werden. Der Vorteil eines frischen EDTA-Blutes liegt darin, dass im Bestätigungslabor nebst den serologischen Bestätigungstests auch eine Quantifizierung der HIV-1 RNS (Viruslastbestimmung) durchgeführt werden kann. Dies erhöht die Sicherheit der HIV-Diagnose nochmals wesentlich und ist für die Standortbestimmung bei HIV-positiven Patienten ohnehin unerlässlich.

spielsweise, aber keinesfalls abschliessend, (1) ein reaktiver Kombinationstest im Erstmaterial *und* ein positiver Line Immunoassay im Zweitmaterial; oder (2) ein reaktiver Kombinationstest *und* ein reaktiver zweiter Screeningtest im Erstmaterial *und* eine ausreichend hohe Viruslast >1000 HIV-1 RNA Kopien/mL im Zweitmaterial. Der Entscheid (und die Verantwortung) darüber, welche Kombination herangezogen wird, obliegt dem Bestätigungslabor.

Von ganz zentraler Bedeutung für die Sicherheit einer Diagnose «HIV-infiziert» ist der Grundsatz, dass für diese Diagnose *immer* übereinstimmende Untersuchungsergebnisse an mindestens zwei verschiedenen Untersuchungsmaterialien, also dem Erstmaterial und dem Zweitmaterial, notwendig sind. Wichtig ist ferner, dass bei einem reaktiven Resul-

tat des Kombinationstests und negativem oder unklarem Resultat eines zur Bestätigung durchgeführten Antikörpertests (Screeningtest der 3. Generation, Line Immunoassay oder Western Blot) immer auch ein Test für die Viruskomponente, am einfachsten ein separater p24-Ag Test, durchgeführt wird. Andernfalls werden Primoinfektionen im Stadium der Prä-Serokonversion verpasst.

Unweigerlich führen diese Testalgorithmen gelegentlich auch zu vorerst unklaren Situationen: Was, wenn zwei verschiedene Screeningtests mit dem Erstmaterial stark positiv waren (was ein starkes Indiz für eine HIV-Infektion ist), die Viruslast im Zweitmaterial aber nicht nachweisbar oder nur niedrig ist? In diesem Fall liegt *kein* bestätigt positives Resultat vor, und man wird weitere Tests einsetzen müssen,

Tabelle 2
Screening im klinischen Labor

TEST UND RESULTAT	BEURTEILUNG	WEITERES VORGEHEN
CE-zertifizierter HIV-1/2-Kombinationstest (AK + p24) der vierten Generation		
negativ	kein Hinweis auf HIV-Infektion	Bei Verdacht auf Primoinfektion in 1–2 Wochen wiederholen
grenzwertig	unklar	Wenn wiederholt grenzwertig: EDTA Blut in 1–2 Wochen direkt an Bestätigungslabor senden lassen. Resultat an AuftraggeberIn gemäss Befund des Bestätigungslabors
reaktiv	kein definitives Resultat	Entweder Material für die Bestätigung an Bestätigungslabor senden oder ein neu entnommenes EDTA-Blut direkt an ein Bestätigungslabor senden lassen. Resultat an AuftraggeberIn gemäss Befund des Bestätigungslabors

Tabelle 3
Screening in der Arztpraxis

TEST UND RESULTAT	BEURTEILUNG	WEITERES VORGEHEN
CE-zertifizierter Schnelltest		
negativ	kein Hinweis auf HIV-Infektion	Bei Verdacht auf Primoinfektion einsenden an Bestätigungslabor
grenzwertig	unklar	EDTA-Blut an Bestätigungslabor
reaktiv	kein definitives Resultat	EDTA-Blut an Bestätigungslabor

um die HIV-Infektion weiter abzuklären. Insbesondere gilt es abzuklären, ob tatsächlich eine Infektion mit HIV-1 der Gruppe M oder nicht allenfalls eine mit den sehr viel selteneren Viren des Typs HIV-2 oder der Gruppe O von HIV-1 vorliegt. In diesem Fall, wenn aufgrund der starken Reaktivität in zwei verschiedenen Screeningtests eine gute Antikörperantwort erwarten werden kann, ist der Line Immunoassay für HIV-1/2 von Innogenetics (Inno-Lia HIV-1/2 Score) sicher der einfachste und kostengünstigste Test, um eine HIV-2-Infektion auszuschliessen. Dieser Test ist eine Weiterentwicklung des Western Blot, welche rekombinante Proteine und/oder synthetische Peptide beider Virustypen, HIV-1 und HIV-2, verwendet.

HIV-2 wird durch die gegenwärtigen Standardassays für die Bestimmung der Viruslast in der Schweiz, den Roche HIV-1 Monitor™ bzw. dessen Nachfolger, den COBAS TaqMan-HIV-1-Test, nur schlecht erkannt, und Viren der Gruppe O von HIV-1 werden gar nicht erkannt. Auch andere in der Schweiz weniger gebräuchliche Tests für die

Quantifizierung von HIV-1 RNA wie der auf dem NASBA-Prinzip beruhende NucliSens® HIV-1 QT von Organon Teknika oder der VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) von Bayer erkennen diese Viren nicht [1]. Viren der Gruppe O von HIV-1 werden nur vom Abbott LCx HIV-1 erkannt, auch dieser Test erkennt aber HIV-2 nicht [2, 3]. Eine nicht nachweisbare oder niedrige Viruslast in solchen Tests bei eindeutig positivem Screeningtest ist daher vereinbar mit einer HIV-2-Infektion. Auch Viren der Gruppe M von HIV-1 werden von sequenzspezifischen Nukleinsäureamplifikationsverfahren gelegentlich schlecht erfasst. Seltenerweise gibt es gelegentlich auch Viren des Subtyps B, die in solchen Verfahren massiv unterschätzt werden. Schliesslich sind Patienten, deren Virus im Test schlecht erkannt wird, noch abzugrenzen von Patienten, deren Virus gut erkannt wird, die aber tatsächlich keine oder kaum Viruspartikel im Plasma aufweisen und trotzdem abfallende CD4-Zellzahlen zeigen.

In all diesen Fällen wird nebst dem Line Immunoassay mit Vorteil

ein PERT-Assay durchgeführt, um eine niedrige Viruskonzentration mit dieser Sequenz-unabhängigen Methode zu verifizieren. Treten dabei wesentliche Diskrepanzen zum Ergebnis des sequenzspezifischen Tests zu Tage, muss nach den Ursachen gesucht und eine optimale Lösung für die Virusquantifizierung bestimmt werden. Dies sind typische Spezialaufgaben für das NZR.

Für die Differenzierung zwischen HIV-1 und HIV-2 wird also am besten der Inno-Lia HIV-1/2 Score eingesetzt. Dieser Test ist besser als typenspezifische Western Blots geeignet, zwischen HIV-1 und HIV-2 zu unterscheiden. In gewissen Fällen kann er auch Hinweise auf das Vorliegen einer Infektion durch Gruppe O von HIV-1 geben.

Seltenerweise kann trotz starkem Verdacht auf eine HIV-1-Infektion, z.B. nach langdauernder ungeschützter Exposition durch einen bekannt HIV-1-positiven Partner, ein im Screeningtest wiederholt reaktives Resultat mit kommerziell erhältlichen Tests (inklusive kommerzielle PCR-Verfahren) nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Für solche Fälle,

in denen – falls überhaupt eine Infektion vorliegt – eine extrem niedrige Konzentration HIV-infizierter Zellen vermutet werden muss, hat das NZR eine ultrasensitive diagnostische PCR, die MEGA-PCR für HIV-1 entwickelt. Diese untersucht sehr grosse DNA-Proben (bis 500 µg anstelle von normalerweise 1–2 µg). Damit wird die Empfindlichkeit entsprechend um mehr als das Hundertfache gesteigert. Der Test ist ideal für die Abklärung von Personen mit persistent reaktivem Screening-Resultat, bei welchen der WB mit einer frühen Infektion vereinbar ist, es aber nicht zu einer vollständigen Serokonversion kommt [4].

Diagnostik bei Neugeborenen und Säuglingen

Da mütterliche IgG-Antikörper, und damit auch die HIV-spezifischen Antikörper, durch aktiven transplazentaren Transport in hoher Konzentration in den Foetus gelangen, werden alle Kinder HIV-positiver Mütter mit hohen Konzentrationen von HIV-Antikörpern geboren, sind also «HIV-positiv». Antikörpertests können für die Diagnose der pädiatrischen HIV-Infektion bis zum völligen Verschwinden dieser Antikörper, d.h. bis weit ins zweite Lebensjahr hinein, nicht eingesetzt werden.

Beweisend für eine HIV-Infektion sind in dieser Periode ausschliesslich Tests für den Nachweis von Viruskomponenten (HIV RNS oder DNS, p24-Ag). Diese Tests werden mit Vorteil im Alter von 1, 3 und 6 Monaten durchgeführt. Ein abschliessender Test erfolgt mit 24 Monaten; in diesem Fall wird ein HIV-Antikörpertest durchgeführt.

Zu beachten ist wiederum, dass Viren der Gruppe O von HIV-1 sowie HIV-2 durch die in der Schweiz am häufigsten eingesetzten Verfahren zum Nachweis von HIV-1 RNS oder DNS entweder gar nicht oder nur ungenügend erkannt werden. Negative Resultate dieser Routine-tests besagen in solchen Fällen also gar nichts! Wenn der HIV-Typ der Mutter unbekannt ist, empfiehlt es sich, bei der ersten Blutprobe des Neugeborenen einen Line-Immunoassay durchzuführen, damit dann der optimale Virustest eingesetzt werden kann. Mit Vorteil wird ein Labor mit Erfahrung in der pädiatrischen HIV-Diagnostik eingesetzt.

EMPFEHLUNGEN DER FLD FÜR DAS SCREENING UND DIE BESTÄTIGUNG IN DEN BESTÄTIGUNGSLABORATORIEN

Allgemeine Grundsätze:

Eine gesicherte Diagnose einer HIV-Infektion erfordert übereinstimmende positive Resultate verschiedener Tests, die teils am Erstmateriale, teils an einem Zweitmateriale durchgeführt werden müssen. Die Wahl der Methoden und Bestätigungsalgorithmen obliegt, unter Beachtung gewisser allgemeiner Vorgaben, die nachstehend und in den Tabellen 1, 4, 5 und 6 spezifiziert sind, dem Bestätigungslabor.

In einem Bestätigungslabor können direkt an der reaktiven Probe weitere Untersuchungen zur Bestätigung durchgeführt werden. Da das Erstmateriale in der Regel ein Serum ist, kommen insbesondere ein anderer Screeningtest, ein Line Immunoassay oder ein p24-Ag-Test inklusive Neutralisation in Frage. Eine Bestätigung des reaktiven Screeningbefundes und die Typendifferenzierung können also in vielen Fällen bereits am Erstmateriale erfolgen. Eine Zweitprobe (EDTA-Blut) zum Ausschluss einer Verwechslung oder Kontamination des Erstmateriales sowie zur Bestimmung und Beurteilung der Viruslast ist für die gesicherte und differenzierte Diagnose einer HIV Infektion jedoch unerlässlich. Die Bestätigung eines im Erstmateriale reaktiven Resultats kann aber auch vollständig am neu entnommenen Zweitmateriale (EDTA-Blut) erfolgen.

Die für die Bestätigung überhaupt verfügbaren Methoden sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Tabelle 4 zeigt das schematische Vorgehen bei verschiedenen Outcomes auf Screening- und Bestätigungsstufe. Tabellen 5 und 6 zeigen, welche Kombinationen positiver Resultate von Tests am Erst- und Zweitmateriale für die Bestätigung einer HIV-Infektion gemäss HIV-Testkonzept des BAG hinreichend sind.

Das Bestätigungsverfahren beantwortet nicht nur die Frage, ob ein Mensch HIV-infiziert ist, sondern identifiziert auch den Virustyp (HIV-1 oder/und HIV-2). Beim Vorliegen von HIV-1 sollen möglichst auch Angaben über die Virusgruppe (M oder O) gemacht werden können. Zudem sollen generell Virusvarianten identifiziert werden, die infolge ihrer abweichenden Genomsequenz mit den gängigen Viruslasttests nicht adäquat quantifiziert werden können.

Bei allen neudiagnostizierten PatientInnen soll zur optimalen Differenzierung von HIV-1 und HIV-2 ein Line Immunoassay, der Inno-Lia HIV-1/2 Score, durchgeführt werden. Dieser Test kann auch Hinweise auf eine Infektion mit einem Virus der Gruppe O liefern. Bei Personen mit HIV-Primo-Infektion muss für die Typendifferenzierung mit dem Line Immunoassay die Serokonversion abgewartet werden.

Es ist zu beachten, dass geringste Kontamination mit hochpositivem Serum beim Line Immunoassay (wie auch beim Western Blot) sehr leicht zu falsch-positiven Resultaten führen kann.

Bei allen neudiagnostizierten PatientInnen muss das Bestätigungslabor den ersten Viruslasttest unbedingt selber durchführen. Die Kenntnis der HIV-1-RNA-Konzentration im Plasma ist wichtig für die Erkennung von Viren, die mit den gängigen Viruslasttests schlecht erfasst werden.

Mehrere indeterminate Resultate addieren sich nie zu einem positiven Resultat auf.

Die Bestätigung muss kosteneffizient durchgeführt werden.

Ein reaktives Resultat eines HIV-1/2-Kombinations-Suchtests bedeutet, dass entweder HIV-spezifische Antikörper oder/und p24-Ag nachgewiesen wurden. Das Bestätigungsverfahren darf sich nicht auf den Antikörpernachweis beschränken, sondern muss insbesondere bei negativem Resultat eines separat durchgeführten Antikörpertests auch einen Test für Viruskomponenten enthalten (p24-Antigen, HIV-1 RNA). Andernfalls werden HIV-Primo-Infektionen im Stadium der Prä-Serokonversion verpasst.

Bei Fällen von HIV-Primo-Infektion oder «recent infection» (wahrscheinliche Ansteckung innerhalb der vergangenen 6 Monate) soll ausserdem in einem autorisierten Labor eine Resistenzprüfung durchgeführt werden.

Tabelle 4
Schematisches Vorgehen bei verschiedenen Outcomes von Screening und Bestätigung in den Bestätigungslaboratorien.
Für Details siehe die Tabellen 5 und 6!

Screening	Bestätigung (kann am Erst- oder Zweitmaterial erfolgen)			
	Beurteilung	Outcome der Bestätigungstests	Beurteilung	Weiteres Vorgehen
Kombinationstest (AK + p24) der vierten Generation	negativ	kein Hinweis auf HIV-Infektion		Bei Verdacht auf Primoinfektion: in 1–2 Wochen wiederholen; falls Plasma vorhanden allenfalls direkt Viruslast
	grenzwertig	unklar	positiv	Bei Erstmaterial: 2. Probe (EDTA) anfordern für Ausschluss einer Verwechslung, Bestimmung der Viruslast; bei bestätigter Primoinfektion Resistenzprüfung in einem autorisierten Labor Bei Zweitmaterial: Viruslast; bei bestätigter Primoinfektion Resistenzprüfung in einem autorisierten Labor
		unklar	unklar	Verdacht auf Primoinfektion
		negativ (Antikörper <u>und</u> Virus-Komponenten)	Suchtest falsch reaktiv	Kein Hinweis auf HIV-Infektion
reaktiv	Verdacht auf HIV-Infektion	positiv	HIV-Infektion bestätigt	Bei Erstmaterial: 2. Probe (EDTA) anfordern für Ausschluss einer Verwechslung, Bestimmung der Viruslast; bei bestätigter Primoinfektion Resistenzprüfung in einem autorisierten Labor Bei Zweitmaterial: Viruslast; bei bestätigter Primoinfektion Resistenzprüfung in einem autorisierten Labor
		unklar	unklar	→ NZR
		negativ (Antikörper <u>und</u> Virus-Komponenten)	Suchtest falsch reaktiv, Kontamination oder Probenverwechslung	Neue Probe verlangen

Auskunft geben die Bestätigungslaboratorien oder das NZR.

Bei älteren Kindern (über 24 Monate) kann der gleiche Testalgorithmus wie für Erwachsene eingesetzt werden. Zu beachten ist allerdings, dass gelegentlich im Line Immunoassay oder Western Blot bis zum Alter von 24 Monaten noch Spuren mütterlicher HIV-Antikörper gefunden werden können, die später verschwinden.

Frage 2: Welche Eigenschaften hat das Virus?

Die Abklärung bestimmter genetischer oder biologischer Eigenschaften des Virus kann für die Wahl von Tests für die Überwachung der Infektion oder die Zusammensetzung der antiretroviralen Therapie von

grosser Bedeutung sein. Einfachstes Beispiel ist die Differenzierung zwischen HIV-1 und HIV-2 (s. Tabelle 1). Diese Unterscheidung ist wichtig bezüglich der allgemeinen Prognose (HIV-2 ist weit weniger aggressiv als HIV-1), der Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der Infektion auf Dritte (inklusive Mutter-Kind-Übertragung), der Bestimmung der Viruslast, der Durchführung von Resistenztests und schliesslich der Zusammenstellung der antiretroviralen Therapie. Nicht alle gegen HIV-1 einsetzbaren Medikamente sind auch gegen HIV-2 wirksam. Insbesondere haben alle Non-Nucleosid RT-Inhibitoren (NNRTI) sowie Tenofovir gegen HIV-2 keine Wirkung. Diesbezüglich ähnlich verhalten sich auch Viren der Gruppe O von HIV-1.

Auch gegen diese sind NNRTI meist unwirksam, und die Viruslast kann ebenfalls nicht mit den Standardassays für HIV-1 RNA bestimmt werden. Im Gegensatz zu HIV-2 sind Gruppe-O-Viren jedoch ebenso aggressiv wie die Viren der Gruppe M von HIV-1.

Die Erkennung von Infektionen mit HIV-2 und HIV-1 der Gruppe O muss daher früh erfolgen und ist als ein obligater Bestandteil der Erstdiagnose einer HIV-Infektion zu verstehen.

Identifizierung von Infektionen mit HIV-2 oder HIV-1 der Gruppe O

Ein erhöhter Verdacht auf eine HIV-2-Infektion besteht bei Personen mit epidemiologischer Verbindung nach Westafrika (z.B. Elfenbein-

küste, Ghana, Senegal, Guinea-Bissau, Kamerun) oder dem mit dieser Region früher kolonial verbundenen Portugal. Die Abklärung erfolgt primär durch serologische Tests, insbesondere Line Immunoassay. HIV-2-positive Resultate in diesem Test sollten durch PCR für HIV-2 abgesichert werden; dieser Test ist auch bei Unklarheiten einzusetzen. HIV-2 RNA im Plasma ist auch in unbehandelten Patienten häufig nicht nachweisbar, vor allem bei noch asymptomatischen Personen. Für die Bestätigung der HIV-2-Infektion, bzw. deren Ausschluss mit PCR ist also unbedingt EDTA-Blut und nicht einfach Plasma einzusenden. Eine PCR-Abklärung ist insbesondere dann unerlässlich, wenn die Antikörper mit den Envelope Antigenen von sowohl HIV-1 als auch HIV-2 reagieren, sodass möglicherweise eine Doppelinfektion besteht.

PatientInnen, die mit HIV-1 der Gruppe O infiziert sind, werden auch in der Schweiz vereinzelt entdeckt und haben typischerweise einen epidemiologischen Bezug zu in Zentralafrika gelegenen Ländern (Kamerun, Gabun, Äquatorial-Guinea). Hinweise auf das Vorliegen einer Gruppe-O-Infektion kann der Line Immunoassay geben (überproportional starke Reaktivität gegen sgp120 im Vergleich zur Reaktivität gegen gp41) in Kombination mit einer nicht detektierbaren Viruslast (ausser im Abbott LCx HIV-1); die Bestätigung erfolgt durch sequenzspezifische PCR bzw. Sequenzierung des *gag* Gens (am NZR durchgeführt).

Bei HIV-2 und Gruppe O von HIV-1 kann die Viruslast also nicht mit den in der Schweiz gebräuchlichsten Tests für HIV-1 RNA bestimmt werden. Als Alternative hat sich der PERT (*Product-Enhanced Reverse Transcriptase*) Assay bewährt, der die Viruspartikel nicht aufgrund der in ihnen enthaltenen HIV-RNA, sondern der Aktivität der Reversen Transkriptase, also sequenzunabhängig, quantifiziert.

Bei Patienten mit schnell absinkender oder bereits niedriger CD4-Zellzahl trotz niedriger Viruslast in einem auf RT-PCR basierenden Test sollte nie eine Therapie begonnen werden, ohne dass zuvor eine Infektion mit HIV-2 oder einem Virus der Gruppe O von HIV-1 ausgeschlossen wurde!

Resistenztests

Die klinisch sicher häufigste und wichtigste Frage nach einer Viruseigenschaft ist, ob das Virus eines Patienten individuelle Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente aufweist. Die Resistenztestung ist indiziert bei (i) der HIV-1-Primoinfektion, (ii) vor Therapiebeginn bei einer nach 1997 infizierten Person, d.h. bei praktisch allen PatientInnen, bei denen heute eine Ersttherapie diskutiert wird, (iii) vor einer Salvage-Therapie oder vor einer anders begründeten Therapieumstellung, (iv) in der Schwangerschaft vor Beginn der antiretroviralen Prophylaxe, (v) bei einem Kind, welches trotz antiretroviraler Prophylaxe infiziert wurde und (vi) beim Indexpatienten bei einer Post-Expositions-Prophylaxe. Indikationen (i) – (iii) und (vi) gelten selbstverständlich nicht nur für Erwachsene, sondern auch für HIV-infizierte Kinder.

Die Resistenztestung wird meist als genetische Resistenztestung durchgeführt, bei welcher die HIV-1 RNA aus dem Plasma isoliert, revers transkribiert, amplifiziert und mittels Sequenzierung der relevanten Genomabschnitte (kodierend für RT, Protease, Transmembranprotein gp41, Integrase usw.) nach Mutationen gesucht wird, die auf der Proteinebene mit einer Resistenz gegen ein oder mehrere Medikamente verknüpft sind. Aufgrund dieser Daten wird dann durch computergestützte Algorithmen eine Beurteilung der zu erwartenden Wirksamkeit der verschiedenen gebräuchlichen antiretroviralen Medikamente erstellt. Bei der phänotypischen Resistenztestung wird dagegen, ähnlich wie bei der bakteriellen Resistenzprüfung, *in vitro* direkt untersucht, ob und wie stark die Vermehrung des Patientenvirus in der Anwesenheit individuell zugegebener antiretroviraler Medikamente im Vergleich zum Virus-Wildtyp gehemmt wird.

Bei der genetischen Resistenztestung wird gleichzeitig auch der HIV-1-Subtyp ermittelt. Kenntnis des Subtypen kann wichtig sein für die Einschätzung, ob die Viruslast eines Patienten mit einem sequenzabhängigen RT-PCR-Verfahren wohl korrekt ist. Gewisse Virusstämme von zirkulierenden rekombinante Formen (CRF) von HIV-1, z.B. CRF02_AG,

werden nämlich von den Roche RT-PCR-Tests unterdetektiert [5]. Die für jeden untersuchten Patienten verfügbare HIV-Sequenzinformation ermöglicht auch molekulare epidemiologische Untersuchungen. Die Sequenzdaten werden im Rahmen der Schweizerischen HIV-Resistenzstudie seit 2003 systematisch in einem zentralen Internet-gestützten anonymisierten Datenregister erfasst. Für SHCS-PatientInnen werden die Daten zudem automatisch in der SHCS-Datenbank deponiert. Bei einem rasch grösser werden Teil der SHCS-PatientInnen wird so künftig auch der HIV-Subtyp und die individuelle molekulare Identität der Viren in die Forschung einbezogen werden können.

Frage 3: Wie hoch ist die Viruslast?

Diese Frage ist wichtig für die individuelle Abschätzung der Prognose eines Patienten und, falls eine ART durchgeführt wird, für die Kontrolle der Wirksamkeit derselben. Sie wird durch die Messung der Konzentration von definierten Viruskomponenten beantwortet (Tabelle 1). In den letzten Jahren fest eingebürgert hat sich die quantitative Bestimmung der HIV-1 RNA im Plasma, der Viruslast. Die Kopienzahl/mL dividiert durch 2 entspricht dabei theoretisch der Konzentration der Viruspartikel. Der in der Schweiz für die Messung der Viruslast üblicherweise verwendete Test ist der Roche Amplicor HIV-1 Monitor™ bzw. dessen Nachfolger, der COBAS Ampliprep/TaqMan HIV-1 Test. In der Regel wird dieser Test in einer ultrasensitiven Variante mit einer unteren Quantifizierungsgrenze von 50 Kopien/mL eingesetzt (beim TaqMan 40 Kopien/mL).

Wie bereits erwähnt, sind die diagnostische Frage, die Frage nach Viruseigenschaften und die Frage nach der Viruslast häufig eng miteinander verknüpft: Da HIV-2 und die Gruppe O von HIV-1 vom HIV-1-Monitor™ bzw. dem TaqMan HIV-1-Test nicht erkannt werden, kann bei solchen Infektionen die Viruslast nicht mit diesen Tests bestimmt werden. Es ist daher wichtig, dass HIV-2 und Gruppe O schon bei der Diagnosestellung identifiziert werden.

Die FLD empfiehlt daher, dass bei allen neu diagnostizierten HIV-Infek-

tionen ein Inno-Lia HIV-1/2-Score-Test durchgeführt wird. Bei PatientInnen, die aufgrund positiver Virus-komponententests (HIV-1 RNS, HIV-DNS, p24-Antigen) im Stadium der Prä-Serokonversion oder Serokonversion diagnostiziert werden, soll zur Identifizierung des HIV-Typs die Serokonversion abgewartet und dann der Inno-Lia HIV-1/2 Score durchgeführt werden. Untersuchungen an HIV-2-infizierten PatientInnen haben ergeben, dass gewisse HIV-2-Isolate in den HIV-1-Viruslasttests von Roche fast ebensogut reagieren wie Subtyp-B-Isolate von HIV-1. Im Amplicor HIV-1-Monitor-Version 1,5 wurde beispielsweise bei einem HIV-2-Infizierten eine Viruslast von 55 000 Kopien/mL ge-

messen; in diesem Fall wurde die wahre HIV-2-Viruslast nur um 0,58 Log, also um einen Faktor 4, unterschätzt. Eine hohe Viruslast bedeutet also nicht zwingend, dass eine HIV-1-Infektion vorliegt! In anderen Fällen von HIV-2-Infizierten zeigte der Amplicor-HIV-1-Monitor jedoch eine Viruslast an, welche mindestens 2 Log unter der wahren Konzentration lag [6].

In Zweifelsfällen, insbesondere bei PatientInnen, bei denen die HIV-Diagnose bereits vor längerer Zeit gestellt wurde und unklar ist, ob die Frage einer möglichen HIV-2-Infektion je abgeklärt wurde, ist es daher sinnvoll, sicherheitshalber einen Line Immunoassay durchzuführen. Der Test muss auch durchgeführt

werden, wenn der Viruslasttest eine unerwartet niedrige, der klinischen Situation nicht angepasste Viruslast ergeben hat.

Trotz der allgemein guten Empfindlichkeit gegenüber Gruppe-M-Viren von HIV-1 gibt es auch bei dieser Gruppe Viren, deren Sequenz vom HIV-1 Monitor™ bzw. COBAS TaqMan HIV-1-Test schlecht erkannt werden [5]. Je nach der lokalen Dynamik der HIV-Epidemie kann die Häufigkeit solcher Problemfälle unterschiedlich sein. Bei der Kombination «niedrige oder abnehmende CD4-Zellzahl trotz stets niedriger Viruslast» sind immer Zweifel an der Gültigkeit des Viruslast-Resultats angebracht. Da die Viruslast alternativ auch sequenzunabhängig durch

Tabelle 5

Resultatekombinationen von HIV-Tests an Erst- und Zweitmaterial, welche für die Bestätigung einer HIV-Infektion hinreichend sind. Gilt für Bestätigungslaboratorien, die bereits am Erstmaterial Bestätigungstests durchführen.

Screening	Bestätigungstest		Bemerkungen	
HIV-1/2-Kombinationstest (AK + p24) der vierten Generation	Bestätigungstest am Erstmaterial (Serum)	Notwendiges Resultat am Erstmaterial	Notwendige Resultate am Zweit- oder späteren Material (EDTA-Blut)	
		reaktiv	Line Immunoassay positiv für HIV-1 HIV-1 RNA $\geq 1000^*$ Kopien/ml Line Immunoassay positiv für HIV-2 HIV-2 DNA PCR positiv (Test am NZR)	HIV-1-Infektion der Gruppe M HIV-2-Infektion: alternative Viruslastbestimmung am NZR
		Line Immunoassay HIV-1/2	HIV-Positiv/HIV-1 HIV-Positiv/HIV-2 HIV-Positiv/HIV-1; mit oder ohne serologischem Verdacht auf Gruppe O	HIV-1-Infektion der Gruppe M HIV-2-Infektion: alternative Viruslastbestimmung am NZR HIV-1-Infektion der Gruppe O: alternative Viruslastbestimmung am NZR
	p24-Ag Test	Reaktiv & Neutralisation positiv	HIV-1 RNA $\geq 1000^*$ Kopien/ml Line Immunoassay positiv für HIV-1 (Serokonversion abwarten!)	HIV-1-Infektion der Gruppe M
		Reaktiv & Neutralisation positiv	Line Immunoassay positiv für HIV-2 (Serokonversion abwarten!) HIV-2 DNA PCR positiv (Test am NZR)	HIV-2-Infektion: alternative Viruslastbestimmung am NZR

* bei nachweisbarer HIV-1 RNA in einer Konzentration von weniger als 1000 Kopien/ml besteht Verdacht auf eine mit der RT-PCR schlecht detektierte Virusvariante, und die Viruslast sollte am NZR mit dem PERT Assay überprüft werden. Auch bei höherer Viruslast bis 10 000 Kopien/ml sollte diese Möglichkeit überprüft werden, sofern die Viruslast im Vergleich zu der CD4 + Zellzahl als zu tief erscheint.

- Weist der Inno-Lia HIV-1/2 Score auf HIV-2 oder Gruppe O von HIV-1 hin, muss das betreffende Virus mit DNA-PCR bestätigt werden (Untersuchung am NZR; unbedingt EDTA-Blut und nicht einfach Plasma senden!)
- Bei Fällen von Primoinfektion oder wahrscheinlicher Ansteckung innerhalb der vergangenen sechs Monate («recent infection») soll eine Resistenzbestimmung in einem autorisierten Labor durchgeführt werden.

Messung der in den HIV-Partikeln eingeschlossenen Reversen Transkriptase bestimmt werden kann, sollte in solchen Fällen der PERT-Assay durchgeführt werden (am NZR). Dieser Test wird auch für die Viruslast-Bestimmung bei HIV-2 und HIV-1 der Gruppe O eingesetzt.

HIV-LABORKONZEPT - AUFGABENVERTEILUNG IM TESTKONZEPT

Die Qualität der HIV-Diagnostik in der Schweiz ist nicht nur davon abhängig, welche Tests für die verschiedenen diagnostischen Fragen eingesetzt werden, sondern bedarf auch einer vernünftigen Aufgabenverteilung. Daher besteht neben dem Technischen Konzept auch ein Laborkonzept. Es regelt die Anforderungen für die Laboratorien auf den drei Ebenen Screeninglaboratorien, Bestätigungslaboratorien und Nationales Zentrum für Retroviren sowie deren Aufgaben und Pflichten innerhalb des HIV-Testkonzepts und des Meldewesens im Bereich der Öffentlichen Gesundheit.

Gemäss dem HIV-Laborkonzept erfolgt das Screening in den vom BAG *anerkannten* klinischen Laboratorien inklusive den Bestätigungslaboratorien, in gewissen Situationen auch in Arztpraxen, ärztlich geleiteten Beratungszentren und Spitälern. Reaktive Proben leiten die Screeninglaboratorien an die vom BAG anerkannten Bestätigungslaboratorien weiter, denen, nebst ihrer eigenen Screeningtätigkeit, die Bestätigung der reaktiven Proben, die Typen- und Gruppenidentifizierung nach den in Tabellen 4–6 beschriebenen Tests und Algorithmen sowie die anonyme Meldung von neu diagnostizierten HIV-Infizierten an das BAG und den Kantonsarzt obliegt. Die Abklärung von weiterhin unklaren Fällen und Spezialfällen obliegt dem vom BAG ernannten Nationalen Zentrum für Retroviren, welches auch eine beschränkte Bestätigungstätigkeit unterhält, jedoch kein Screening (abgesehen vom Spezialfall pädiatrische HIV-Diagnostik).

Die zu Beginn der HIV-Diagnostik im Vergleich zu heute geringere Qualität der HIV-Screeningtests sowie die epidemiologische Notwen-

digkeit einer möglichst vollständigen und zuverlässigen Erfassung der HIV-Infektionen durch das BAG waren die Hauptargumente für die Einführung des Laborkonzeptes. Dieses Laborkonzept, anfänglich etwas umstritten, hat sich im Laufe der Jahre gut eingespielt und bewährt. Die Bestätigungslabors und das NZR haben breite Erfahrung gesammelt und diese auch an die Screeninglabors weitergegeben. Dies trägt wesentlich zum hohen Standard der HIV-Diagnostik in der Schweiz bei.

Mit der laufenden Entwicklung haben sich auch die Aufgaben auf den verschiedenen Ebenen des Laborkonzeptes erweitert und zum Teil verschoben. Wurden ursprünglich alle Bestätigungen vom NZR mit selbst hergestellten Western Blots durchgeführt, machten kommerziell erhältliche Western Blots Kits schon bald danach die Durchführung dieser Tests in den Bestätigungslaboratorien möglich. Beschränkte sich deren Tätigkeit ursprünglich auf die Bestätigung der im Screening reaktiven Proben und die Meldung der PatientInnen mit neu diagnostizierter HIV-Infektion an das BAG, müssen heute zusätzlich HIV-Typ und -Gruppe beurteilt und die Viruslast bestimmt werden. Die diagnostischen Laboratorien sind seit März 2004 gehalten, das Screening mit kombinierten Tests für HIV-1/2 Antikörper und p24-Ag durchzuführen. Andererseits wurde mit der Entwicklung zuverlässiger Schnelltests das Screening teilweise von den diagnostischen Laboratorien in Arztpraxen verlagert. Auf allen Ebenen des Laborkonzeptes sind die Aufgaben somit komplexer geworden und die Anforderungen gestiegen.

HIV-Meldung an das BAG

Die anonymisierte Meldung von bestätigten positiven Resultaten an das BAG erfolgt nach dem Bestätigungstest. Die Bestätigungslabors sind nach der Meldeverordnung verpflichtet, diese Resultate dem BAG und dem zuständigen Kantonsarzt zu melden. Ausserdem müssen sie dem ärztlichen Auftraggeber des Tests den «Fragebogen bei Personen mit positivem HIV-Test» sowie allfälliges zusätzliches Informationsmaterial zu Händen des Arztes oder des Patienten zusenden. Falls das

Untersuchungsmaterial von einem Screeninglabor eingesandt wurde, ist das Screeninglabor verpflichtet, diesen Fragebogen bzw. das Informationsmaterial an den ärztlichen Auftraggeber weiterzuleiten. Name und Adresse des ärztlichen Auftraggebers müssen dem Bestätigungslabor oder dem BAG mitgeteilt werden.

Das HIV-Meldewesen strebt eine möglichst lückenlose Erfassung aller Erstdiagnosen von HIV-Infektionen an. Meldungen von Wiederholungstests müssen vermieden werden, da sonst die epidemiologische HIV-Überwachung verfälscht wird. Der Ausschluss von Wiederholungsmeldungen setzt voraus, dass das meldende Bestätigungslabor über geeignete EDV-Strukturen verfügt, um laborintern diese Kontrolle durchführen zu können. Einsendungen von Blutproben desselben Patienten unter verschiedenen anonymen Namen an ein Bestätigungslabor sind unbedingt zu unterlassen, da die Duplizität in diesem Fall nicht erkannt werden kann.

Anforderungen an die Laboratorien

Tabellen 7 bis 9 zeigen die Anforderungen an die Laboratorien auf den verschiedenen Stufen des Laborkonzeptes.

Ein HIV-Screening kann unter Berücksichtigung der in Tabelle 7 genannten Anforderungen und Pflichten der Leistungserbringer durchgeführt werden, insbesondere von allen vom BAG in den Bereichen Virologie und/oder Serologie anerkannten diagnostischen Laboratorien und von Praxislaboratorien im Rahmen der Grundversorgung.

Für die Anerkennung einer Bestätigungstätigkeit (Bestätigungslaboratorien) durch das BAG ist zusätzlich zu den für das HIV-Screening geltenden Anforderungen die Erfüllung der in der Tabelle 8 aufgeführten Kriterien verbindlich. Insbesondere muss gewährleistet sein, dass jedes Bestätigungslabor über angemessene Infrastruktur, Geräte, Verfahren, usw. und über vertieftes Know-how für die Bestätigungstätigkeit verfügt. Daher muss dem Labor ein(e) FAMH-Titelträger(in) mit spezifischen Kenntnissen und dokumentierter permanenter Fortbildung im Bereich der HIV-Diagnostik und

Tabelle 6
Resultatekombinationen von HIV-Tests an Erst- und Zweitmaterial, welche für die Bestätigung einer HIV-Infektion hinreichend sind. Gilt für Bestätigungslaboratorien, die erst am Zweitmaterial Bestätigungstests durchführen

Screening (am Erstmaterial)	Bestätigungstests am Zweitmaterial (EDTA-Blut ≥ 7 ml, 7–10 Tage später)			
	1. Bestätigungstest	Weitere erforderliche Bestätigungstests		
HIV-1/2-Kombinationstest (AK + p24) der vierten Generation	Test	Erforderliches Resultat	Test und erforderliches Resultat	Bemerkungen
Reaktiv	HIV-1/2-Screeningtest (3. oder 4. Generation)	reaktiv	Line Immunoassay positiv für HIV-1	HIV-1-Infektion der Gruppe M
			HIV-1 RNA ≥1000* Kopien/ml	
			Line Immunoassay positiv für HIV-2	HIV-2-Infektion: alternative Viruslastbestimmung am NZR
	Line Immunoassay HIV-1/2	HIV-Positiv/HIV-1	HIV-1 RNA ≥1000* Kopien/ml	HIV-1-Infektion der Gruppe M
		HIV-Positiv/HIV-2	HIV-2 DNA PCR positiv (Test am NZR)	HIV-2-Infektion: alternative Viruslastbestimmung am NZR
		HIV-Positiv/HIV-1; mit oder ohne serologischem Verdacht auf Gruppe O	HIV-1 RNA (Roche) nicht nachweisbar HIV-1 RNA oder HIV-1 DNA positiv mit Primern/Probes, die HIV-1 der Gruppe O erkennen. Sequenzanalyse im gag Gen (Tests am NZR)	HIV-1-Infektion der Gruppe O: alternative Viruslastbestimmung am NZR
p24-Ag Test	Reaktiv & Neutralisation positiv	HIV-1 RNA ≥1000* Kopien/ml	HIV-1-Infektion der Gruppe M	
		Line Immunoassay positiv für HIV-1 (Serokonversion abwarten!)		
		Line Immunoassay positiv für HIV-2 (Serokonversion abwarten!)	HIV-2-Infektion: alternative Viruslastbestimmung am NZR	
		HIV-2 DNA PCR positiv (Test am NZR)		

* Bei nachweisbarer HIV-1 RNA in einer Konzentration von weniger als 1000 Kopien/ml besteht Verdacht auf eine mit der RT-PCR schlecht detektierte Virusvariante, und die Viruslast sollte am NZR mit dem PERT Assay überprüft werden. Auch bei höherer Viruslast bis 10 000 Kopien/ml sollte diese Möglichkeit überprüft werden, sofern die Viruslast im Vergleich zu der CD4+ Zellzahl als zu tief erscheint.

- Weist der Inno-Lia HIV-1/2 Score auf HIV-2 oder Gruppe O von HIV-1 hin, muss das betreffende Virus mit DNA-PCR bestätigt werden (Untersuchung am NZR; unbedingt EDTA-Blut und nicht einfach Plasma senden!)
- Bei Fällen von PHI oder wahrscheinlicher Ansteckung innerhalb der vergangenen sechs Monate («recent infection») soll eine Resistenzbestimmung in einem autorisierten Labor durchgeführt werden.

Verlaufsbeurteilung vorstehen. Um eine fehlerfreie Arbeit auch in der Einarbeitungszeit zu gewährleisten, erhalten Laboratorien, die eine Tätigkeit als HIV-Bestätigungslabor aufnehmen wollen und die die grundsätzlichen Voraussetzungen erfüllen, auf Gesuch hin vorerst eine auf zwei Jahre befristete Anerkennung für die HIV-Bestätigung. Sie müssen während dieser Zeit ihre Befähigung zur HIV-Bestätigung, insbesondere der Einhaltung des HIV-Testkonzepts, gegenüber dem BAG nachweisen. Hierzu werden ihre Entscheidungen in dieser Phase zu Händen von FLD und BAG vom NZR überprüft.

Um die geforderte Qualität der Bestätigungsroutine sicherzustellen, wird für eine etwaige Erneuerung der Anerkennung in der Regel ein Volumen von 20 HIV-Meldungen pro Jahr an das BAG vorausgesetzt. Dies gilt sowohl für neue als auch für etablierte HIV-Bestätigungslabors. Falls diese Anzahl nicht erreicht wird, muss das BAG prüfen, ob die Qualität der HIV-Bestätigung noch gesichert ist, bevor die Anerkennung als Bestätigungslabor erneuert wird.

Als weitere Massnahmen zur Sicherung der für die Bestätigungsarbeit erforderlichen Qualität deklarieren alle Bestätigungslaboratorien

ihre Bestätigungsalgorithmen und die dabei eingesetzten Testkits auf dem Intranet der FLD und halten sie permanent auf dem aktuellen Stand. Diese Algorithmen müssen sicherstellen, dass zwischen HIV-Viren der Gruppe M von HIV-1 und non-M Viren (Gruppe O von HIV-1, HIV-2) bestmöglich und mit möglichst geringem Kostenaufwand unterschieden wird, sodass Fälle mit non-M Viren zur Bestätigung und Viruslastbestimmung ans NZR überwiesen werden können. Zudem sollen auch in der Gruppe M Virusvarianten identifiziert und zur Abklärung an das NZR überwiesen werden, die mit den gängigen RT-PCR-Me-

thoden schlecht erkannt werden (potenziell die PatientInnen mit weniger als 1000 Kopien HIV-1 RNA per Milliliter). Für alle im HIV-Screening, der HIV-Bestätigung und dem HIV-Monitoring eingesetzten Tests nehmen die Bestätigungslaboratorien an externen Qualitätskontrollen teil, sofern solche verfügbar sind, weisen dies auf dem FLD Intranet aus und halten diese Informationen aktuell.

Bestätigungslaboratorien führen die zur Bestätigungsanalytik eingesetzten Tests mindestens 1 Mal pro Woche durch, leiten Fälle mit Verdacht auf non-M-Infektionen an das NZR weiter, machen die HIV-Meldung an das BAG und an den Kantonsarzt und leiten Fragebögen, Informationsmaterial und Ähnliches zuhänden des behandelnden Arztes oder Patienten weiter. Sie wirken aktiv in der FLD mit und kooperieren mit dem BAG.

Die Anforderungen und Pflichten

des Nationalen Zentrums für Retroviren (Bestätigungsstufe II) sind in Tabelle 9 aufgeführt. Anders als die Bestätigungslaboratorien ist das NZR vom BAG ernannt und muss einen direkten spezifischen Leistungsauftrag des BAG erfüllen, der periodisch überprüft und angepasst wird. Zusätzlich zu diesem Leistungsauftrag und den für die Bestätigungslaboratorien geltenden Anforderungen und Pflichten muss das NZR über sensitive und spezifische Methoden für die Erkennung und Typisierung sämtlicher existierender, auch aberranter, HIV-Stämme und für die korrekte Quantifizierung derselben verfügen. Es berät die Bestätigungslaboratorien und monitorisiert die neu anerkannten Bestätigungslaboratorien während der ersten zwei Jahre.

Da Screening und Routinebestätigungen nicht zu den Aufgaben des NZR gehören und die vom NZR bestätigten Fälle der Bestätigungs-

stufe II von den Bestätigungslaboratorien gemeldet werden, entfallen die Forderung von mindestens 20 HIV-Meldungen an das BAG pro Jahr und die geforderte wöchentliche Frequenz der analytischen Verfahren beim NZR.

Zusammenarbeit der verschiedenen Stufen und Verantwortlichkeit

Unabhängigbar für die Qualität des Bestätigungsprozesses ist auch eine optimale Zusammenarbeit der Akteure auf den verschiedenen Stufen. So ist unerlässlich, dass die Screeninglaboratorien den Bestätigungslaboratorien für die Bestätigung geeignetes Untersuchungsmaterial in genügender Menge zur Verfügung stellen. Ebenso wichtig ist, dass die verfügbaren klinischen Angaben und relevanten Fragestellungen sowie die Ergebnisse der im Screeninglabor durchgeführten HIV-Tests an das Bestätigungslabor wei-

Tabelle 7

Laborkonzept: Stufenziel, Anforderungen und Pflichten sowie Methoden für Screeninglabors

Stufenziel:	Das HIV-Screening erfasst selektiv alle ProbandInnen, die mit HIV-1 oder HIV-2 infiziert sind
Leistungserbringer	Klinisches Labor
Anforderungen und Pflichten	<ul style="list-style-type: none"> • Ist vom BAG als mikrobiologisches und serologisches Laboratorium anerkannt. • Qualifiziertes Personal für die Durchführung und die Interpretation der Tests ist jederzeit vorhanden. • Setzt nur CE-zertifizierte HIV-Tests ein. • Befolgt die Empfehlungen der Fachkommission Labor und Diagnostik von HIV/AIDS (FLD) des BAG. • Nimmt regelmässig an nationalen und/oder internationalen Ringversuchen zur Qualitätskontrolle teil. • Sorgt bei reaktiven Resultaten dafür, dass geeignetes Untersuchungsmaterial in genügender Menge an ein Bestätigungslabor gesandt wird. • Sendet zusammen mit dem Untersuchungsmaterial auch die verfügbaren klinischen Angaben, Fragestellungen und Ergebnisse des HIV-1/2 Screenings an das Bestätigungslabor. • Sendet vom Bestätigungslabor erhaltene Resultate, Meldeformulare und Informationsmaterial an den behandelnden Arzt weiter. • Teilt dem Bestätigungslabor für die Meldung neu diagnostizierter HIV-Infizierter den Namen und die Adresse des behandelnden Arztes mit.
Methoden	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendet einen CE-zertifizierten HIV-1/2-Kombinationstest (Antikörper + p24-Ag) der vierten Generation
Leistungserbringer	Arztpraxis
	Ärztlich geleitete anonyme HIV-Test- oder -Beratungsstelle, die Blutentnahmen durchführen
	Spital (z. B. zur Schnelldiagnose der Indexperson bei Stichverletzungen zur HIV-PEP-Abklärung)
Anforderungen und Pflichten	<ul style="list-style-type: none"> • Erfüllt die die Kriterien der QUALAB • Qualifiziertes Personal für die Durchführung und die Interpretation der Tests ist jederzeit vorhanden • Setzt nur CE-zertifizierte HIV-Tests ein • Befolgt die Empfehlungen der Fachkommission Labor und Diagnostik von HIV/AIDS (FLD) des BAG • Nimmt regelmässig an nationalen und/oder internationalen Ringversuchen zur Qualitätskontrolle teil. • Sendet bei Verdacht auf HIV-Primoinfektion Untersuchungsmaterial an ein Bestätigungslabor. • Sendet bei reaktivem Testresultat geeignetes Untersuchungsmaterial in genügender Menge an ein Bestätigungslabor. • Sendet zusammen mit dem Untersuchungsmaterial auch die relevanten klinischen Angaben, Fragestellungen und Ergebnisse des HIV-1/2 Schnelltests an das Bestätigungslabor.
Methoden	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendet einen CE-zertifizierten HIV-1/2 Schnelltest

tergegeben werden. Ebenso ist der Name und die Adresse des auftraggebenden behandelnden Arztes anzugeben, da diese Information für die BAG-Meldung benötigt wird. Da die Verantwortung für die Bestätigungsuntersuchungen ausschliesslich von den Bestätigungslabors getragen wird, liegt es allein in deren Ermessen, darüber zu entscheiden, welche Tests sie benötigen, um den Bestätigungsauftrag im Rahmen des HIV-Testkonzepts sicher und vollständig, aber auch kostengünstig zu erfüllen. Ein Auftrag für eine HIV-Bestätigung ist also nicht ein Auftrag, einen bestimmten Test durchzuführen und andere wegzulassen. Er ist vielmehr ein Pauschalaufttrag zur Beantwortung der drei zentralen Fragen, die sich bei der Neudiagnose

einer HIV-Infektion stellen (s. Technisches Konzept und Tabelle 1).

Damit die für die Beantwortung der drei Fragen benötigte Information vollständig zusammengetragen werden kann, muss ausserdem das Erst- und das Zweitmaterial eines Patienten unbedingt an dasselbe Bestätigungslabor eingesandt werden.

DIE FACHKOMMISSION LABOR UND DIAGNOSTIK VON HIV/AIDS DES BAG (FLD)

Neben den Laboratorien als den eigentlichen Leistungserbringern ist die Fachkommission Labor und Diagnostik von HIV/AIDS des BAG, kurz FLD genannt, von entscheidender Bedeutung für die Qualität der

HIV-Diagnostik in der Schweiz. Die FLD, welche im Jahr 2000 aus der ehemaligen Subkommission Immunologie und Virologie der EKAF hervorging, vereint die Leiter der Bestätigungslaboratorien und des Nationalen Zentrums für Retroviren mit Personen aus dem BAG und der Swissmedic, welche sich spezifisch mit der HIV-Epidemiologie bzw. der Prüfung bzw. Registrierung von kommerziellen HIV Tests befassen. Viele der FLD-Mitglieder sind überdies in der Schweizerischen HIV-Kohorte (SHCS) engagiert und betreiben aktive Forschung auf dem Gebiet von HIV und anderen Retroviren. So kommt ein sowohl HIV-spezifisches als auch allgemeines diagnostisches Fachwissen zusammen, welches für die Beurteilung

Tabelle 8

Laborkonzept: Stufenziele, Anforderungen und Pflichten sowie Methoden für die Bestätigungslaboratorien (Bestätigungsstufe I)

Stufenziele:	<ul style="list-style-type: none"> • Bestätigung einer HIV-Infektion als zentrale Grundlage für die Stellung der HIV-Diagnose durch den behandelnden Arzt • Erkennt Fälle mit Verdacht auf aberrante HIV-Stämme, die von den gängigen Messverfahren für HIV-RNA schlecht erfasst werden (HIV-2, HIV-1 Gruppe O usw.) und leitet solche Fälle an das NZR weiter • Bestimmung der Viruslast bei HIV-1 der Gruppe M • Meldung der HIV-Infektion und des HIV-Typs an die Gesundheitsbehörden • Mitarbeit in der FLD und aktive Teilnahme an den gemeinsamen FLD Projekten • Zusammenarbeit mit dem BAG
---------------------	--

Leistungserbringer	Bestätigungslabor (ist auch Screeninglabor)
Anforderungen und Pflichten	wie Screeninglabor; zusätzlich: <ul style="list-style-type: none"> • vom BAG als mikrobiologisches und serologisches Laboratorium und Bestätigungslabor anerkannt • Die Erst-Anerkennung wird auf zwei Jahre befristet. Während dieser Zeit werden alle HIV-Bestätigungen dem NZR zur Überprüfung vorgelegt. Werden weniger als 20 bestätigte HIV-Infektionen pro Jahr vorgelegt, muss die Sicherstellung der Qualität für die HIV-Bestätigung geprüft werden, bevor die Anerkennung erneuert wird. • Die Zahl der jährlich bestätigten HIV-positiven Fälle von 20 gilt für neue und für etablierte Bestätigungslaboratorien. Bei Unterschreitung dieser Frequenz muss die Sicherstellung der Qualität für die HIV-Bestätigung geprüft werden, bevor die Anerkennung erneuert wird. • FAMH-Titelträger/in mit spezifischen Kenntnissen und ausgewiesener Fortbildung im Bereich HIV-Diagnostik und Verlaufsbeurteilung leitet das Bestätigungslabor • Adäquate Voraussetzungen (Räume, Personal, Logistik und Verfahren) zur Durchführung von Nukleinsäure-Amplifikationstesten sind erfüllt • Deponiert den eingesetzten Bestätigungsalgorithmus und die dabei verwendeten Tests auf dem Intranet der FLD und hält diese Informationen aktuell. • Nimmt an externen Qualitätskontrollen für alle im HIV Screening, der Bestätigung und dem Monitoring eingesetzten Tests lückenlos teil. Deponiert alle relevanten Informationen wie Q-Kontrollzentren, Resultate, Erfüllungsgrad jeweils aktualisiert auf dem FLD Intranet. • Minimale Frequenz der zur HIV-Bestätigung eingesetzten Testverfahren beträgt 1 x pro Woche • Leitet Fälle mit Verdacht auf aberrante HIV-Stämme an das NZR weiter • HIV-Meldung an Kantonsarzt und BAG • aktive Mitwirkung in der FLD und ihren aktuellen Projekten • Kooperation mit dem BAG
Methoden	wie Screeninglabor; zusätzliche Tests, welche den Anforderungen für die HIV-Bestätigung gemäss Tabellen 6 und 7 genügen. Insbesondere sind dies <ul style="list-style-type: none"> • zweiter anderer CE-zertifizierter Screeningtest • CE-zertifizierter Line Immunoassay • Nukleinsäurenachweis und HIV-RNA Quantifizierung mit kommerzieller CE-zertifizierter Standardmethode

Tabelle 9

Laborkonzept: Stufenziele, Anforderungen und Pflichten sowie Methoden für das NZR (Bestätigungsstufe II)

Stufenziele:	<ul style="list-style-type: none"> • Bestätigung oder Ausschluss einer HIV-Infektion auch in komplizierten Fällen • Identifikation aberranter HIV-Stämme • Adäquate Messung der Viruslast auch bei aberranten HIV-Stämmen • Lösung weiterer Spezialfragen • Meldung der HIV-Infektion und des HIV-Typs an die Gesundheitsbehörden • Mitarbeit in der FLD und aktive Teilnahme an deren gemeinsamen Projekten • Zusammenarbeit mit dem BAG
Leistungserbringer	Nationales Zentrum für Retroviren
Anforderungen	wie Bestätigungslabor (ohne das Screening)*; zusätzlich <ul style="list-style-type: none"> • vom BAG zum Nationalen Zentrum für Retroviren ernannt • erfüllt die spezifischen Vorgaben des Leistungsauftrags des BAG
Verfügbare Methoden	<ul style="list-style-type: none"> • sensitive und spezifische serologische und molekularbiologische Methoden zur Erkennung und Typisierung sämtlicher HIV-Stämme (umfasst auch Methoden ohne CE-Zertifizierung) • Quantifizierung von HIV-Stämmen, die nicht mit dem Standardassay quantifiziert werden können (umfasst auch Methoden ohne CE-Zertifizierung)
Pflichten	<ul style="list-style-type: none"> • HIV-Meldung an Kantonsarzt und BAG • Beratung der Bestätigungslaboratorien • Monitoring von neu anerkannten Bestätigungslaboratorien • aktive Mitwirkung in der FLD und ihren aktuellen Projekten • Kooperation mit dem BAG

* Die minimalen jährlichen Zahlen für Bestätigungen gelten nicht, da ein Screening und die daraus resultierenden routinemässige Bestätigungen nicht primäre Aufgaben des NZR sind und selbst die im NZR bestätigten Fälle von den Bestätigungslaboratorien gemeldet werden.

der Probleme der HIV-Diagnostik und das Suchen nach optimalen Lösungen geeignet ist.

Die zentrale Aufgabe der FLD als einer beratenden Kommission des BAG ist es, Richtlinien und Empfehlungen zu erarbeiten, welche die hohe Qualität der HIV-Diagnostik gewährleisten und stetig weiter verbessern. Dies betrifft einerseits die laufende Aktualisierung des Technischen Konzepts, aber auch allfällige Änderungen am Laborkonzept. Wichtige Aufgaben der FLD sind ferner die Förderung der Vernetzung und Zusammenarbeit unter den Bestätigungslaboratorien sowie zwischen diesen und dem NZR, durch regelmässige Sitzungen und gemeinsame Projekte, die Verbesserung des Flusses von relevanten Informationen an das BAG, die Fachkommission Klinik und Therapie von HIV/AIDS (FKT) und die EKAF sowie das Einbringen des diagnostischen Fachwissens der FLD in diese Gremien. Die FLD berät das BAG insbesondere auch bei der Anerkennung von Bestätigungslaboratorien, deren Leiter nehmen Einsitz in der FLD und verpflichten sich zu besonderem Engagement im Rahmen der FLD-Aktivitäten.

Mitglieder der FLD

M^{me} Dr ès sc C. Andreutti (Lausanne), Dr. Ph. Bürgisser (Lausanne), Dr. phil. R. Dubs (Zürich), Frau Dr. med. I. Steffen (Basel), Dr. phil II M. Gebhardt (BAG Bern), Frau Dr. med. M. Gorgievski (Bern), Dr. B. Güntert (Luzern), Frau Dr. G. Martinetti (Bellinzona), PD Dr. med. L. Matter (Basel), Dr. phil. nat. Chr. Niederhauser (Bern), Mme Dr S. Yerly (Genf), Dr. A. Schlegel (Swiss-medical Bern), Dr. med. dipl. biol. D. Schultze (St. Gallen), Prof. Dr. med. J. Schüpbach (NZR Zürich; Präsident). ■

Bundesamt für Gesundheit
 Direktionsbereich Öffentliche Gesundheit
 Abteilung Übertragbare Krankheiten
 Sektion Infektionskrankheiten
 Telefon 031 323 87 06

Literatur

1. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/adult/AA_032304.pdf, 2004.
2. Plantier JC, Gueudin M, Damond F, Braun J, Mauclore P, Simon F. Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 33: 1–7.

3. Katsoulidou A, Petrodaskalaki M, Sypsa V, et al. Evaluation of the clinical sensitivity for the quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Comparison of the new COBAS TaqMan HIV-1 with three current HIV-RNA assays-LCx HIV RNA quantitative, VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) and COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor v1.5. *J Virol Methods* 2005.
4. Boni J, Shah C, Flepp M, Luthy R, Schupbach J. Detection of low copy numbers of HIV-1 proviral DNA in patient PBMCs by a high-input, sequence-capture PCR (Mega-PCR). *J Med Virol* 2004; 72: 1–9.
5. Swanson P, de Mendoza C, Joshi Y, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and Nucli-Sens HIV-1 QT. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3860–8.
6. Schutten M, van der Ende ME, Niesters HGM, Osterhaus ADME. Cross-reactivity of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.5 Quantitative Plasma HIV-1 RNA Assay with HIV-2. Abstract Nr. 959. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, CA, 2004.