



Zusammenfassung

Challenge in Virology

Saanen, 14.-16. Januar 2005

von Pietro Vernazza, St. Gallen

Inhaltsverzeichnis

Saanen Meeting unter besten Voraussetzungen	2
Impfungen	2
Geschichte und Zukunft der Entwicklung von Impfstoffen.....	2
Persistenz der lebenslangen Immunität bei Impfungen.....	4
Interaktive Session	5
HIV	7
Angeborene Immunantwort gegen HIV	7
Wie sich HIV dem Immunsystem anpasst	9
Antivirale Therapie, Resistenz und Pharmakokinetik	10
Interaktive Session	10
Kontroversen im Reiche der HIV-Impfung	11
Influenza.....	13
Pathogenese.....	13
Impfstrategien gegen Influenza	14
Influenza Pandemie: Eine weltweite Herausforderung	15
Einsatz von Virostatika in einer Pandemie	16
Ist die Schweiz für eine Pandemie vorbereitet?.....	17
Interaktive Session	17

Disclaimer

Die hier wiedergegebene Zusammenfassung ist eine persönliche Notiz. Als solche hat sie weder den Anspruch auf Korrektheit, Vollständigkeit oder gar einer Behandlungsempfehlung. Korrekturvorschläge bitte an: saanen@infekt.ch

Saanen Meeting unter besten Voraussetzungen

Bei schönstem Wetter haben sich auch dieses Jahr gut 80 Schweizer Infektiologen mit einer Handvoll Internationalen Experten getroffen und aktuelle Themen der Virologie diskutiert. Das Meeting fand genau zu Beginn der diesjährigen Grippe-Epidemie statt, passend zum Thema Influenza, neben den beiden weiteren Themen HIV und Impfungen. Dem Scientific Committee der neuen Fortbildungs-Stiftung (**SAFE-ID, Swiss Academic Foundation for Education in Infectious Diseases**) darf man ein Kränzchen widmen für die sorgfältige Auswahl der hervorragenden Referenten. Einen grossen Dank auch an GSK Schweiz, welche durch ihren unrestricted Grant die Durchführung dieser Veranstaltung ermöglicht und auch dieses Jahr wieder mit ausgezeichnetem technischem Support den reibungslosen Ablauf der Vorträge organisiert hat.

Impfungen

Geschichte und Zukunft der Entwicklung von Impfstoffen

Mit Stan Plotkin war wohl einer der Personen mit der grössten Erfahrung im Bereiche des Impfwesens überhaupt die richtige Person für das erste Referat. In seiner Einführung hat Manuel Battegay neben weiteren grossen Verdiensten des Vater der Röteln-Impfung auch erwähnt, dass er der Herausgeber der „Bibel“ der Vaccinologie, dem Lehrbuch „Vaccine“ ist. Stan Plotkin war nicht verlegen und entgegnete sofort: „I hope the textbook *Vaccine* is more coherent than the bible“.

Plotkin gab einen Überblick über die wichtigsten Aspekte der Impfstoffentwicklung. Zunächst unterschied er die Möglichkeiten bei **Lebendimpfstoffen** und Tot-Impfstoffen. Erstere können hergestellt werden durch

- ⇒ Verwendung eines ähnlichen Virus von Tieren (Bsp. Kuh-Pocken)
- ⇒ Chemische Attenuierung
- ⇒ Passage in vitro und in vivo
- ⇒ Passage in Zellkulturen
- ⇒ Ausotrophy
- ⇒ Reassorting

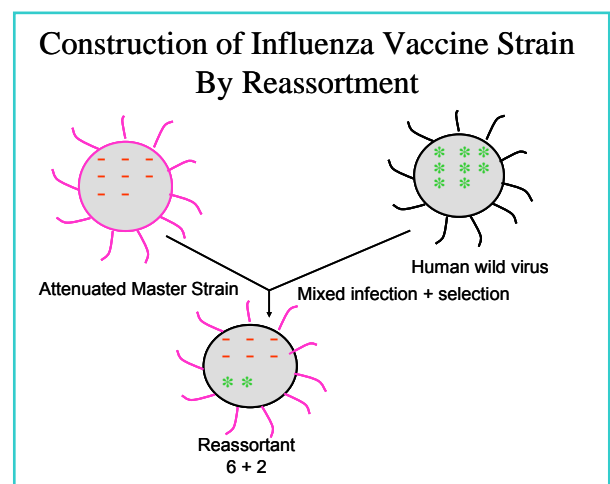
Letztere Methode ist die modernste und dürfte vermutlich die Methode der Zukunft werden.

Bei den **Tot-Impfstoffen** sind folgende Methoden gebräuchlich:

- ⇒ Inaktivierung des ganzen Erregers
- ⇒ Extrakte und Untereinheiten
- ⇒ Toxoide
- ⇒ Kapsel-Polysaccharide
- ⇒ Aufgereinigte Proteine

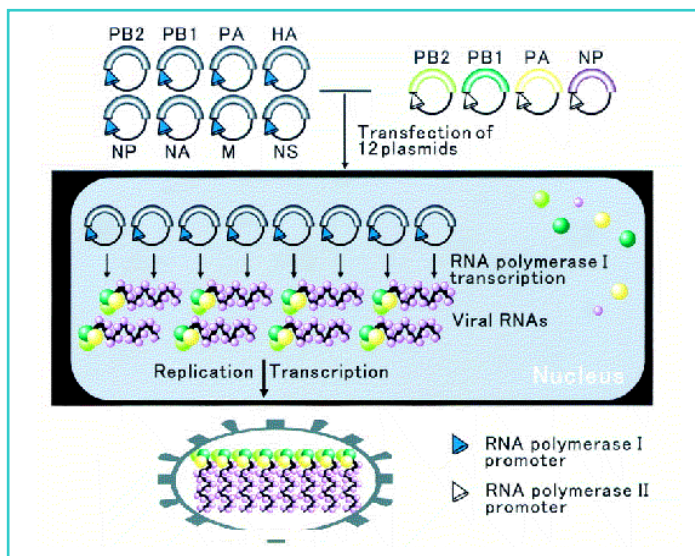
Als Beispiele erwähnte er den Polysaccharid-Impfstoff für Meningokokken (A, C, W135/Y). Dieser wurde antigenetisch verbessert durch die Peptid-konjugierung. oder als Beispiel für die Reassortment –Impfstoffe die Entwicklung der neuen Influenza-Impfstoffe (s. Bild und auch unten). Dabei ist das Prinzip einfach: man fügt einem gut bekannten, adaptierten „Master-Strain“ eines Impfvirus neue antigen-Komponenten bei.

Eine wichtige Verbesserung der Immunantwort kann im Weiteren durch einen alternativen Applikationsweg als die parenterale Gabe erreicht werden. Dies ist ja bereits seit der Polioimpfung bestens bekannt. Auch die Pocken-Impfung hat vermutlich nicht zuletzt von der kutanen Applikation profitiert. Ein aktuelles Beispiel ist die Intranasale Gabe eines attenuierten Influenza-Impfstoffes. Lee et al konnten zeigen (PIDJ *in press*) dass in eine Influenza Epidemie mit einem anderen Virus als dem im Impfstoff verwendeten Virus immer noch eine fast e-



benötigte Vaccine-Efficacy erreicht werden kann (86% vs. 96% bei Epidemien mit gleichem Stamm in Zirkulation wie Impfung), was bei der konventionellen Impfung kaum je der Fall ist. Ein interessantes Beispiel ist auch die Geschichte mit den Rotavirus-Impfungen. Dieser sehr gute Impfstoff musste wegen einer seltenen Nebenwirkung, Darminvagination, zurückgezogen werden. Man ging davon aus, dass dies etwas mit dem Kultursystem zu tun hatte. Der Impfstoff wurde in Affenzelllinien kultiviert. In der Folge wurde nun ein quadrivalenter bovin-humaner Reassortant Impfstoff hergestellt. Dieser zeigte eine 75% Vaccine efficacy und verhinderte zu 100% schwere Erkrankungen. Natürlich kamen auch hier Invaginationen vor, doch in dieser Studie mit fast 70'000 Geimpften war die Häufigkeit unter der Impfung gleich häufig wie unter Placebo.

Neuere Strategien der Impfstoffentwicklung nutzen die genetische Information des Erregers



als Grundlage. Dazu gehören die Reverse Genetics, die rekombinanten Protein-Produkte, aber auch die „naked“ DNA-Plasmide. Die Reverse-Genetics dürfte die Impfforschung revolutionieren, sie wird zur Zeit auch in der Influenza-Entwicklung rasch vorangetrieben (Bild). Dabei werden Plasmide, die ein Protein oder ein virales Genom exprimieren in eine Zelle gebracht, welche dann die durch die Plasmide definierten Produkte (insbesondere die Virushülle und die antigenetisch wichtigen Eiweiße) produziert. Wichtig ist, dass sich die Zelllinie, welche für die Impfstoffproduktion verwendet wird, für

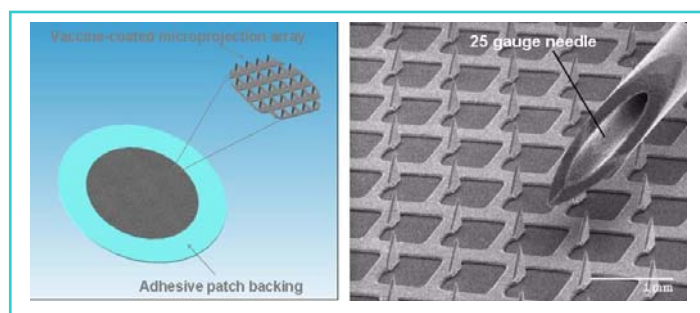
Impfungen eignet. Gut etabliert ist der Einsatz von Vero Zellen.

Eine erfolgsversprechende Impfung, die bereits in klinischen Studien ist und mit solchen virus-ähnlichen Partikeln funktioniert, ist die Impfung gegen HPV-16. Nach 18 Monate Beobachtungszeit hatte die Impfung einen 100% Schutz vor Infektion und nach 4 Jahren immer noch von 94%, wobei auch nach 4 Jahren bei keiner der geimpften Frauen eine intraepitheliale Neoplasie fand (CIN).

Plotkin sprach auch noch über mögliche Vorteile einer DNA-Plasmid Impfung. Diese könnte bei Neugeborenen als priming eingesetzt werden. Sie bewirkt, dass sich das Immunsystem richtung Th1 Antwort entwickelt um einer Allergie-Entwicklung vorzubeugen. Man geht davon aus, dass die Entwicklung einer Th2 basierten Immunantwort, wie dies z.B. bei Parasiten und einigen Impfungen vorkommt, die Entwicklung von Atopien begünstigt. Die Th1 Immunantwort führt auch zu einer starken Ausprägung des Immunologischen Gedächtnisses. Allerdings müssen DNA-Impfungen immer in einer Prime-Boost-Strategie appliziert werden. Für den boost braucht es eine Impfung mit einem Protein vom selben Gen-Produkt wie die DNA-Impfung.

Weitere interessante Ideen zur Impfstoffentwicklung sind die „Reverse Vaccinology“. Hier werden durch Computeranalyse eines Genoms die möglichen Open-Reading Frames (die einzelnen Gene, welche ein Protein kodieren) für Oberflächenproteine vorausgesagt. Diese werden dann produziert und im Mausmodell auf deren neutralisierende Wirkung hin geprüft (Capecchi et al. Curr. Iss. Biol., 2004).

Schon erwähnt wurden die alternativen Applikationswege. Ein wichtiges immunogenes Organ ist die Haut mit



den zahlreichen Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen. Verschiedene Methoden werden entwickelt um Antigen über die Haut zu applizieren. Sicher findet eine solche Methode auch eine höhere Akzeptanz bei Müttern von Kleinkindern. Zum Schluss zeigte Plotkin eine Applikation eines Pflasters mit ganz feinen Nadel, sog. Microneedles. Mit einem solchen Applikator wurde zum Beispiel die Immunantwort (Antikörper-Titer) gegen Hepatitis B, massiv verbessert. So zeigten praktisch alle Immunisierten schon nach der 2. Impfung einen Titer von >1000 (Mittel ca. 3000) während der mittlere Titer nach der 2. im. Impfung auf gut 100 anstieg (Nature Medicine, 8(4):415-419, 2002).

Persistenz der lebenslangen Immunität bei Impfungen

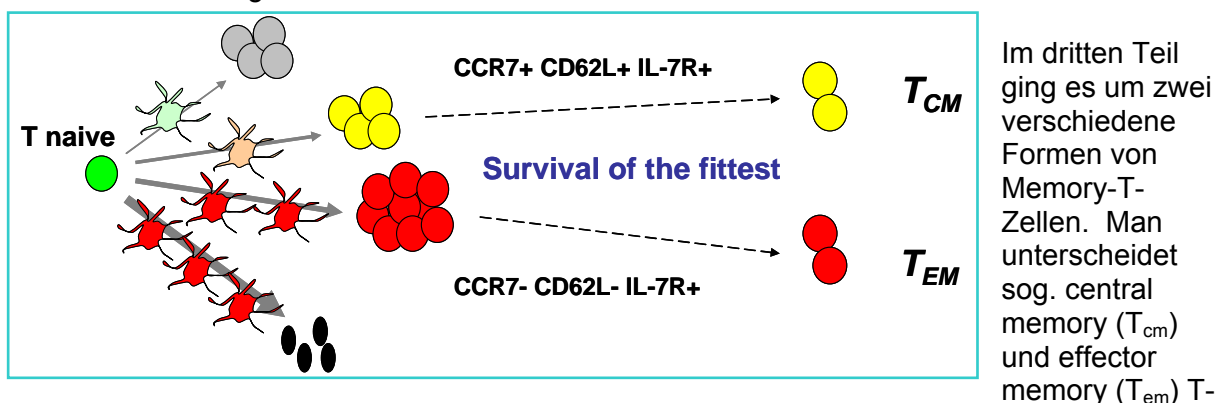
Adriano Lanzavecchia behandelte in seinem Vortrag die Rolle der Toll-like Rezeptoren (TLR) für die Aktivierung von B-Zellen. TLR sind Zellmembran-Proteine, welche für die natürliche Immunität verantwortlich sind (s. dazu auch [Vortrag von D. Trono](#)). Sie erkennen mit ganz einfachen Sequenzen gewisse Pathogene.

Naive B-Zellen exprimieren keine TLR. Sobald diese aber stimuliert werden, werden die TLR induziert und auf der Oberfläche präsentiert. Die Memory-B Zellen, hingegen exprimieren immer gewisse TLR (2,6,7,9,10). Lanzavecchia hat nun die Rolle der TLR bei der B-Zellaktivierung untersucht.

Damit eine naive B-Zelle aktiviert wird, braucht sie drei Signale: T-Help, anti-Ig, und ein Signal für den TLR (z.B. CpG). Die Gruppe hat nun schön gezeigt, dass zuerst mit der Antigenpräsentation durch die T-zelle mit dem Costimulationssignal die TLR aufreguliert werden. Erst wenn dann der TLR auch noch aktiviert wird, kommt es zur effizienten Proliferation der B-Zelle. Da heisst, die Aktivierung der TLR auf menschlichen B-zellen kommt erst nach der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors.

Im gegensatz dazu ist für die Aktivierung einer Memory-B-Zelle nur noch ein Signal nötig, es genügt eine Aktivierung des TLR: Dies erklärt die polyklonale Stimulation durch B-Zellen.

In einem zweiten Teil des Vortrages hat der Referent gezeigt, dass Dendritische Zellen (DC), welche auch durch TLR-agonisten aktiviert werden, durch das zusammenwirken mehrerer TLR-Agonisten stärker aktivierbar sind (synergistische Stimulation). Dies haben sie untersucht, indem sie pathogene TLR verwendeten, welche LPS und solche, welche CpG-sequenzen erkennen. Diese Co-Stimulation führt zu sehr hoher IL-12 produktion der DC, selbst ohne T-Cell-Help. Die synergistische Stimulation führt zu einer Polarisierung der T-Zellantwort richtung Th1.



Zellen. Erstere finden sich in den T-zell arealen von LK und Milz. T_{em} finden sich im peripheren Gewebe. Welcher Typ von Zelle nun aus einer naiven T-Zelle entsteht, ist nun nach der Meinung des Referenten eine Frage der Stimulation durch DC. Ein schwaches signal führt zum absterben der T-zelle durch „neglect“. Ein sehr starkes Signal führt auch zum Zelltod durch Antigen-induzierten Zelltod. Dazwischen gibt es nun zwei Möglichkeiten, eine schwächere Stimulation macht aus der Zelle eine T_{cm} (CCR7+), die in die lymphatischen Organe wandert und eine etwas stärkere Stimulation dann eine T_{em} , (effektor Zelle) welche in das entzündliche Gewebe wandert (CCR7-). Der Referent präsentierte dann die Hypothese, dass die nicht gezielt in ihre Zielgewebe abwandern, sondern dass sie durch reine Selektionsme-

chanismen genau dort bleiben, wo sie, aufgrund ihrer Oberflächenmarker am besten hinpassen (Sallusto & Lanzavecchia, Science 2000). Die Hypothese soll nun noch verifiziert werden durch dein Einsatz von CCR7 depletierten Mäusen.

Im vierten Teil des Referates hat er gezeigt, wie man erfolgreich monoklonale Antikörper von memory B-Zellen produzieren kann. Antikörper-Therapien sind ein altes Prinzip in der Medizin. Die ersten Serumtherapien wurden im 19. Jahrhundert mit verschiedenen Pferde-Antisera (z.B. Tetanus) durchgeführt. Seit 1960 wurden dann spezifische Immunsere von Blutspendern eingesetzt. 1975 wurde die hybridom-Technik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAK) eingeführt. 1998 wurde mit Palvizumab der erste therapeutische mAK eingeführt. Zur Zeit sind mehr als 12 mAK für nicht infektiöse Krankheiten registriert. Doch der beste Produzent von mAK ist der Mensch. Auch bei HIV sind alle breit neutralisierenden AK menschlichen Ursprungs, jedoch in geringer Konzentration und Potenz. Die bisherigen Klonierungstechniken durch Fusion mit immortalisierten B-Zellen führen nur zu sehr geringer mAK Produktion. Die Autoren haben nun eine Klonierungstechnik entwickelt, mit der mAK in hoher Konzentration produziert werden. Der Resultaten des ersten Teils des Referates folgend, haben sie bei der EBV-Immortalisierung von menschlichen Zellen einen TLR-agonisten (CpG) verwendet. Durch diesen einfachen Trick liess sich die Immortalisierungsrate von <1% auf 100% steigern. Die Gruppe hat diese Technik mit Erfolg für die Produktion eines Sars-CoV Immunsere angewandt. Im Mausmodell war dieser mAK in kleinen Dosen (200µg) protektiv (Traggiai et al. *Nature Medicine* 2004; 8: 871-875).

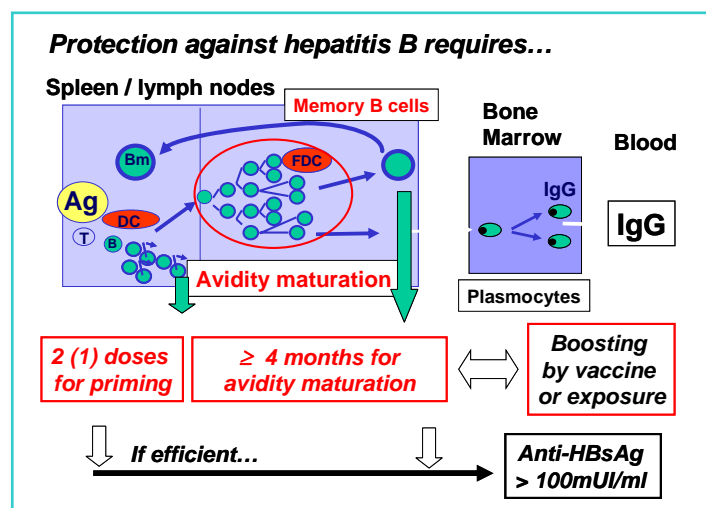
Interaktive Session

Diese interaktive Session über den Einsatz von Impfungen bei Erwachsenen war sehr gut vorbereitet und hat war hoch interessant, weil sehr praktische Aspekte, welche allgemein zu wenig bekannt sind, diskutiert wurden.

Einige Take-home messages aus dieser Session sind:

Hepatitis-Impfung (A und B)

Was soll man tun, wenn eine unvollständige Impfung (A und B) schon Jahre zurückliegt. Eine Serologische Abklärung ist sinnlos. Die unvollständige Impfung ist sicher ungenügend. Man muss also auf jeden Fall wieder impfen (falls Impfschutz erforderlich, Beruf, Reisen). Nach der Booster-Impfung (bei unvollständiger Basisimpfung) sollen die HbsAk gemessen werden. Sind diese > 100, kann davon ausgegangen werden, dass genügend Memory-Funktion vorhanden war. Ist die Konzentration <100, muss die Impfung in 4-6 Monaten wiederholt werden. So lange dauert es, bis es zur „affinity maturation“ kommt. HAV soll auf jeden Fall und ohne AK-Testung ein zweites Mal wiederholt werden.



Was tun, wenn **anti-HBsAg negativ** ist: Hier gibt es folgende Möglichkeiten: das wichtigste ist eine durchgemachte HBV infektion vor der Impfung, somit muss anti-HBc getestet werden. Falls wirklich ein non-responder vorliegt, erneute Impfung in 6 Monaten mit kombinierten HAB/A Impfstoff.

Claire-Anne Siegrist hat hier auch erwähnt, dass low-responder vermutlich genügend geschützt sind. Es gibt bis heute gar keine Falldokumentation eines chronischen Verlaufes einer HBV-Infektion bei Infektion eines Non-Responders

MMR-Impfung und Schwangerschaft

Die Impfung ist kontraindiziert. Das Problem ist die Angst vor einer Rubella Embryopathie. Man findet nach MMR-Impfung während SS IgM im Nabelschnurblut. Allerdings fand sich bei mehr als 1000 geimpften Schwangeren in keinem Fall eine fötale Anomalie oder ein congenitales Rubella Syndrom. Aus diesem Grunde wird nicht empfohlen, vor einer Impfung einen SS-Test durchzuführen. Auch wenn es einmal passiert, ist kein SS-Abbruch indiziert. (MMWR 1998;47(RR-8):1-57. WER 2000;75:161-9. MMWR 1990;39(RR-15):1-18. BAG Suppl. XII, 2003.)

Kombination von Lebendimpfstoffen

Grundsätzlich sollte zwischen zwei Lebendimpfstoffen ein Abstand von 28 Tagen eingehalten werden. Auch bei Yellow-Fever und MMR wird gelegentlich der Abstand jedoch bis 2 Wochen ohne Probleme reduziert.

VZV-Impfung

Die neuste Empfehlung des BAG rät zur VZV-Impfung im Adoleszentenalter wegen der relativ hohen Morbidität und Mortalität (1:3000) der Erkrankung im Erwachsenenalter. Gemäss einer Schweizer Untersuchung haben von allen mit negativer Anamnese 26% eine negative Serologie (Baer G & al. ICAAC 2001; Abstr G 1549). Die positive Anamnese stimmt in 98%. Eine serologische Testung bei negativer oder fraglicher Anamnese ist zwar etwas umständlicher aber günstiger. Die Kosten pro verhinderte Infektion belaufen sich für die Schweiz auf 630 Fr., wenn vor der Impfung die Serologie gemacht wird (1010.- wenn nur anamnestisch).

Das VZV-Impfvirus wird NICHT übertragen.

Es kann, ja soll sogar geimpft werden auch wenn Gefährdete Personen in Familie sind (Diaz PS & al. Pediatrics 1991; 87:166). Die VZV Impfung ist kontraindiziert, wenn eine veränderte T-zell-Immunität besteht oder bei systemischer (>0.3mg/kg, NICHT inhalativer!) Steroid-Therapie. Nach Absetzen der Steroide, 1-3 Monate warten.

Ein Kind mit ALL soll in der Remission (>12 Monate) und Lymph>0.7 dennoch geimpft werden (1 dosis). Bei HIV-Infektion kann geimpft werden, wenn CD4>500.

Ein vesikulärer Ausschlag kann mit Acyclovir behandelt werden (5 Tage p.os).

Varizellen sollte vor der Schwangerschaft geimpft werden. In der CH rechnet man mit 32 Fällen von Varizellen während der SS. Dies hat ein relevantes Risiko für die Neugeborenen.

Während der SS ist die VZV-Impfung kontraindiziert. Bei Exposition einer Seroneg. Schwangeren muss sofort **passiv immunisiert** (Varitect, 0.2-1.0 mg/kg iv) werden.

Swiss Recommendations for VZV vaccination

Routine: All youngsters aged 11 to 15 years **with no precise history*** of chicken pox

Catch up: All adults **with no precise history*** of chicken pox particularly non pregnant women of child-bearing age, HCWs and people professionally in contact with children *Serology (IgG) control acceptable in this setting

Selective: Seronegative subjects at high risk of developing complications:

- Patients bound to receive an immunosuppressive therapy or a transplantation
- Children with ALL and HIV infected children (fulfilling specific criteria)

Cocooning: Seronegative household contacts of seronegative high risk subjects

Gelbfieber

Am wenigsten wussten die Teilnehmer über die Gelbfieberimpfung. Auch diese Impfung ist natürlich kontraindiziert während der SS. Wenn nicht anders möglich, kann geimpft werden.

Es gibt ein mögliches Risiko von Spontabort. Nur sehr selten lassen sich nach Impfung IgM im Nabelschnurblut nachweisen (Nasidi A et al. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:337, Tsai TF et al. *J Infect Dis* 1993;168:520, Nishioka S et al. *Trop Med Int Health* 1998;3:29). Ein Problem ist das schlechtere Ansprechen der Impfung während der SS. Daher muss nach der SS allenfalls wieder nachgeimpft werden (Nasidi A et al. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:337).

Eine Encephalitis kommt relativ häufig vor, besonders bei Säuglingen (s. Abbildung). Die Inkubationszeit ist 7-21 Tage.

Postvaccinal meningoencephalitis following 17D YF vaccine

Years	Age (m)	No. vaccinations	No. Encephalitis cases	Incidence/1000
1952-1953 ¹	< 6 7-12	1000 800	4 1	4 1.25
1958-1979 ²	<1	1830	1	0.5
1991-2003 ³	adults	3'046'007	4	0.0013

¹Stuart G in Smithburn KC et al. *Yellow Fever Vaccination. WHO, 1956*

²Louis JJ et al. *Pediatrics* 1981;36:539

³Kitchener S. *Vaccine* 2004;22:2103

- 25 cases reported worldwide; 17 cases in infants < 6 months of age.
- 70% in male patients.
- Incubation period was 7-21 days.
- presents with fever, signs of meningeal irritation, convulsions, altered mental state.

HIV

Angeborene Immunantwort gegen HIV

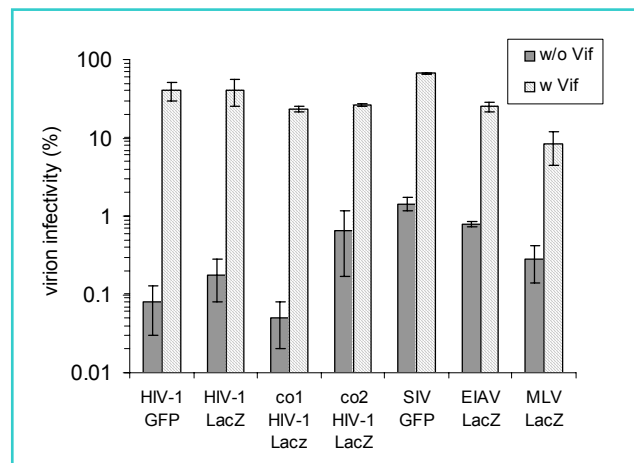
Didier Trono aus Genf hielt einen hochinteressanten Vortrag über die angeborene Resistenz gegenüber Retroviren. In den letzten Jahren spricht man mehr über diese Form der Immunabwehr. Die Entdeckung der Toll-Like Receptors ([s. Referat Lanzavecchia](#)) ist nur ein Baustein der jüngsten Entdeckungen auf diesem Gebiet. In früheren Jahren haben wir viel über die erworbene Immunantwort bei HIV gelernt. Es ist Zeit, dass wir uns auch Gedanken über die viel grundlegendere natürliche Immunantwort machen. Diese angeborene Form der Immunantwort ist verantwortlich für die Abwehr der überwiegenden Mehrheit von Erregern. Diese grundlegende Immunantwort ist entwicklungsgeschichtlich viel älter, als die spezifische zelluläre und humorale Immunität.

Vor knapp 30 Jahren hat Baltimore die Retroviren erstmals beschrieben. Die Beobachtung ging davon aus, dass eine Virusinfektion (HTLV-1) die genetische Information eines Lymphozyten so verändern kann, dass dieser sein Programm ändert und zum Lymphom wird. Dies wurde möglich, indem das RNA Virus seine Erbinformation in die menschliche Erbinformation integriert. Doch dieser Schritt, ist in der Eukariontazelle nicht möglich, den damit würde ja das Produkt einer Erbinformation (tRNA) plötzlich wieder neue Erbinformation schreiben können. Heute wissen wir, dass Retroviren das hierzu verwendete Enzym, die reverse Transkriptase selber in ihrem Rucksack mittragen und damit diese Informationsänderung bewirken können. Diese Idee der Natur hat sich offenbar auch positiv ausgewirkt. Denn heute wissen wir, dass 40% unserer Erbsubstanz in den Jahrmillionen Jahren unserer Entwicklungsgeschichte durch reverse Transkription, also durch Retroviren entstanden ist und sich mittels Selektionsprozess etabliert hat.

Wenn die Auseinandersetzung mit Retroviren aber ein entwicklungsgeschichtlich altes Phänomen ist, so muss man doch postulieren, dass sich das angeborene Immunsystem relativ effizient gegen eine Invasion von Retroviralen Elementen schützen muss, sonst werden wir plötzlich nur noch Virus, oder wie Didier Trono treffend bemerkte: *There is more viurs in us than us in us.*

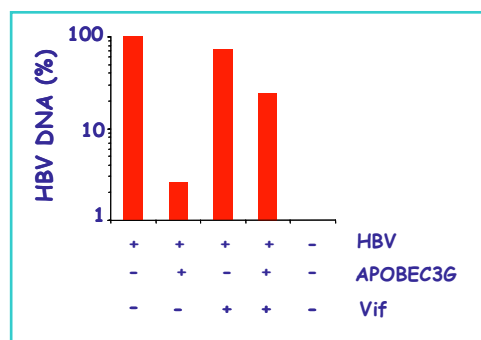
Trono untersuchte ein Element der angeborenen Immunantwort, das sogenannte **APOBEC**-System. Es handelt sich dabei um eine Familie von Enzymen, sogenannte Cytidin Deaminasen. Diese Enzyme interferieren direkt bei der reversen Transkription indem sie beim Vorliegen gewisser Nukleotid-Sequenzen der neu entstehenden DNA die Cytidin elemente in Uracil überführen (durch Deaminierung). Offenbar schützt diese Form gegen eine Vielzahl von retroviralen Angriffen. HIV seinerseits muss natürlich gegen diese Deaminase eine Waffe entwickelt haben. Diese Waffe ist das *vif*-Protein. HI-Viren, welche kein *Vif* haben (Δ -*vif*), können sich in der Zielzelle nicht etablieren. Offenbar ist *vif* wichtig. Doch wenn eine Zelle kein APOBEC3G hat, dann kann auch ein Δ -*vif* Virus eine Infektion hervorrufen. Trono hat dann gezeigt, dass dieses *vif* Protein tatsächlich das APOBEC System blockiert, also diese Form der „alten“ natürlichen Resistenz austrickst.

Das Studium dieses APOBEC Systems ist hoch faszinierend. Es zeigt sich, dass APOBEC, im Speziellen APOBEC3G zahlreiche Retroviren inhibiert. In der nebenstehenden Abbildung wurde die Virusreplikation einiger Retroviren (HIV-1, SIV, EIAV, MLV) in Gegenwart von APOBEC3G gemessen (als % der Infektiosität ohne APOBEC, dunkle Säulen). Wenn nun diesen Viren noch *vif* begefügt wird, dann ist die Hemmung des APOBEC3G fast vollständig aufgehoben (getreiftete Säulen).



Ferner konnte Trono auch zeigen, dass das APOBEC3G (und -3F) die Infektiosität von HTLV-1 blockieren können. Diese Funktion geht auf eine gemeinsame Sequenz im Virusgenom dieser Retroviren (wie auch SIV) zurück. APOBEC erkennt die „fremden“ Nukleotidsequenzen an einer spezifischen Sequenz. Allerdings verwendet das HTLV-1 Virus eine andere Strategie zur Umgehung der Degradation durch das APOBEC System. Für APOBEC 3G z.B. TGGG oder TGGA. Das HTLV-1 Virusgenom weist nun deutlich weniger solche Sequenzen auf (ca. 60, verglichen mit ca. 150 bei HIV und SIV).

Das APOBEC System erklärt auch einen Teil der Speziesbarriere für Retroviren. Es ist gut bekannt, dass sich Affen nicht mit HIV und umgekehrt menschliche Zellen nicht mit SIV (simian immunodeficiency virus) infizieren lassen. Jede Spezies hat ihre eigenen, spezifischen APOBEC. Es ist nun genau die Spezifität des APOBEC systems, welche für diese Blockade der Infektion verantwortlich ist. Effektiv ist es eine einzige Punktmutation in der spezifischen Sequenz, welche diese Spezies-Barriere zwischen SIV und HIV erklärt. Trono hat auch gezeigt, dass das Murine Virus MLV durch das menschliche APOBEC3G jedoch nicht durch das analoge murine APOBEC3 gehemmt wird.



Trono hat auch gezeigt, dass das APOBEC System auch bei HBV wirksam ist. Auch HBV hat eine Retrovirusfunktion. Ein intermediäres RNA-Transkript wird durch diese rT-Funktion wieder in DNA überführt. Eine Zelle, die kein APOBEC hat, produziert massenhaft HBV-DNA und diese Produktion wird durch APOBEC3G wieder gehemmt. Der Kreis schliesst sich dann wieder mit der Beobachtung, dass die Beigabe von *vif* in diesem System die Funktion von APOBEC weitgehend aufhebt (Abbildung links).

Wir Menschen unterscheiden uns ja nicht nur durch die Haarfarbe. Die Heterogenität unserer Erbsubstanz ist eine wichtige Grundlage für unsere Adaptationsfähigkeit und schliesst

sicherlich auch das APOBEC-System mit ein. Es ist daher sehr gut denkbar dass es Menschen mit APOBEC-Formen gibt, welche für durch das *vif*-Protein nicht blockiert werden. Dies könnte erklären, weshalb viele Menschen resistent gegenüber einer HIV-Infektion sind. Durch diese Heterogenität der Erbsubstanz wird sichergestellt, dass eine Spezies durch eine Virusattacke nicht gleich ausgerottet wird. APOBEC sei Dank.

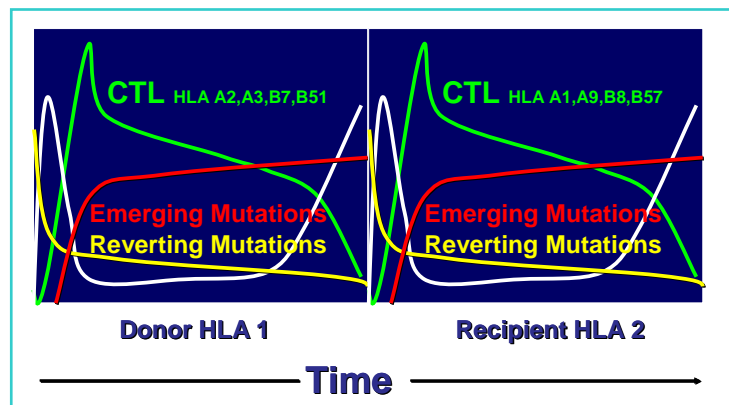
Wie sich HIV dem Immunsystem anpasst

Die im letzten Abschnitt gelobte Heterogenität unseres Genoms ist vermutlich ein äusserst wichtiges Instrument unserer Adaptationsfähigkeit gegen Viren überhaupt. Dass es einem Virus wie HIV nun gelungen ist, diese Waffe auszutricksen ist möglicherweise nur ein vorübergehendes Phänomen, sicherlich aber Folge dessen hoher Adaptationsfähigkeit. Unsere Spiesse im Kampf gegen HIV sind ungleich lang. Unser Generationenewechsel, die Gelegenheit für den Genwechsel, dauert gut 20 Jahre, während HIV dies in einem Tag schafft. Solange wir also unsere APOBEC (und andere) waffen nicht auf die neue Umgebung ausgerichtet haben, bleibt HIV für uns ein Problem. Rolf Zinkernagel hat in seinem Referat postuliert, dass dies vermutlich noch 200 Jahre dauern dürfte ([s. unten, Impfkontroverse](#)).

Jeder Mensch ist also anders. Das hat auch Folgen für das HI-Virus. Simon Mallal hat in seinem Referat die Frage beleuchtet, wie sich HIV nach der Infektion an die veränderte Umgebung anpasst. Mallal hat in den letzten Jahren untersucht, wie sich das Virus dem „Finetuning“ des Immunsystems anpasst. Wie schon oben erwähnt, ist die spezifische, auf unseren HLA-Unterscheiden basierende Immunität ein relativ junges Abwehrsystem. Es wird vermutlich nur für den kleinsten Teil der Abwehr verantwortlich sein. Dennoch, das Virus muss sich auch mit diesem System auseinandersetzen. Nun erkennt man tatsächlich, dass die meisten Menschen, kurz nach der HIV-Infektion eine relativ starke, spezifische Immunantwort gegen HIV entwickeln. Gegen welche Aminosäuresequenzen diese Antwort ausgerichtet ist, wird durch unseren HLA-Typus bestimmt. Unsere Immunzellen erkennen also gewisse Sequenzen an der Oberfläche eines Virus.

Mallal hat nun in seiner Kohorte in Perth gezeigt, dass sich jedes HI-Virus nach der Infektion eines Menschen mit einem neuen Immunsystem konfrontiert sieht und seine Oberflächenmarker der neuen Umgebung anpasst. Es entstehen im Verlauf der ersten Monate der Infektion regelmässig sogenannte „Escape“-Mutanten, welche durch das soeben aufgebaute spezifische Immunsystem (CD4, CD8) nicht mehr erkannt werden. Mit der Zeit wird das Repertoire des Immunsystems erschöpft und das Virus hat sich optimal an die neue Umgebung angepasst. Das Resultat ist, dass jeder HIV-Infizierte ein Virus trägt, welches optimal an seine HLA-Marker angepasst ist. Mallal kann für viele HLA-Marker genau sagen, welche Sequenz des Virus erkannt wird. Die prädominante Sequenz beim chronisch Infizierten hat dann eben diese Sequenzen nicht mehr.

Die führt dazu, dass sich das Virus bei jeder neuen HIV-Infektion anpassen muss. Die Entstehung von neuen Mutationen und das verschwinden des ursprünglichen Virus aus der Zirkulation ist ein aktiver Prozess der nach jeder Virusübertragung erneut ablaufen muss (s. Abbildung) Dies dürfte auch erklären, weshalb bei einer chronischen Infektion eine Superinfektion mit einem neuen Virus praktisch nie beobachtet wird, denn es ist sehr unwahrscheinlich, dass ein neues Virus so gut auf das Immunsystem adaptiert ist wie das „alte“ Virus. Damit hat ein neues, superinfizierendes Virus kaum die Chance das Rennen gegen den „Insider“ zu machen.



Die Adaptationsfähigkeit des HIV hat aber auch seine Limiten. So hat Mallal sehr schön gezeigt, dass die Mutationshäufigkeit auf einzelnen Positionen im HIV-Genom beschränkt ist, während andere Regionen weitgehend konserviert bleiben (z.B die Region um die RT-Position 150). Jede Änderung des Virus kann auch eine Reduktion der Replikationsfähigkeit des Virus bewirken. Somit wird das Virus nur solche Veränderungen vornehmen, für welche der Nutzen durch die Immune-Escape nicht vom Schaden vom Fitness-Verlust aufgehoben werden. Das Verhältnis dieser beiden Wirkungen hat Mallal als Odds-Ration ausgedrückt und ferner gezeigt, dass Mutationen, die eine negative Odds ratio bewirken, deutlich seltener auftreten, als solche, welche eine positive (aus der Sicht des Virus günstige) Odds ratio aufweisen. Dies bedeutet, dass HIV Infizierte höhere Viruskonzentrationen aufweisen, wenn ihr Virus optimal an deren HLA-Typ angepasst ist.

Diese Beobachtung einer maximalen individuellen Adaptation des HIV an das menschliche Immunsystem (HLA-Typen) hat natürlich Konsequenzen für die Entwicklung von Impfstoffen. Eine Impfung muss ein möglichst breites Spektrum von Virustypen abdecken. Doch wenn es eine Impfung gegen das ankommende Virus bereits einen Schutz aufgebaut hat, dann dürfte das Virus eigentlich keine Gelegenheit mehr haben, escape mutationen aufzubauen. Die bedeutet dann auch, dass das eine wirksame Impfung je nach breite der Immunantwort einen Teil der Menschen wirksam gegen HIV schützen sollte.

Antivirale Therapie, Resistenz und Pharmakokinetik

Diese Session war aus meiner Sicht vielleicht die am unergiebigste Session. Johnathan Schpiro hat zwar sehr schön die wichtigsten Regeln zur Interpretation von genetischer Resistenztests erklärt. Doch insgesamt war die Kochbuchartige Anleitung vor allem deswegen wenig hilfreich, weil nicht darauf eingegangen wurde, wann sich eine Resistenztestung eigentlich lohnt und worauf man bei der Resistenztestung noch achten soll. Was auch fehlte war ein Vergleich der Interpretation von Phänotypischer und Genotypischer Resistenztestung.

Eine wichtige Take-home message ist jedoch die Tatsache, dass sich die cut-offs für die Interpretation einer Resistenz verschieben, insbesondere bei den Protease-Hemmern. Dort ist auch wichtig zu wissen, dass man noch oft eine Infektion mit intermediär resistentem Virus gut behandeln kann, wenn die Dosis genügend hoch gewählt wird.

Dies führt auch gleich zum zweiten Teil, zum Pharmakokinetik-Vortrag von Laurent Decosterd. Doch auch hier waren die Informationen relativ alt. Die Take home message auch hier in Kürze: Blutspiegelbestimmungen sollten vermehrt durchgeführt werden, sicher bei komplexen Interaktionen mit anderen Medikamenten, aber auch zur Optimierung von Wirksamkeit und Nebenwirkungen (gut gezeigt für Efavirenz).

Interaktive Session

Diese Interaktive Session hatte zum Ziel, die wichtigsten Prinzipien bei der HIV-Resistenztestung zusammenzufassen. Im Weiteren wurden auch Unterschiede zwischen der phänotypischen und der genotypischen Resistenzbestimmung diskutiert.

Einigkeit besteht heute eigentlich nur in einem Punkt: Eine HIV-Resistenzbestimmung sollte vor der ersten Therapie gemacht werden. In dieser Situation ist die Resistenzbestimmung am hilfreichsten, weil auch keine frühere Medikamentenanamnese weiter hilft (es sei denn, man kenne die Infektionsquelle). Da sich resistente HI-Viren mit der Zeit auch wieder dank Gewinn an Replikationsfähigkeit in nicht resistente Form zurückmutieren können, sollte die HIV-Resistenzbestimmung so früh wie möglich veranlasst werden. Entweder man testet den Patienten gleich bei der ersten HIV-Diagnose oder man behält von dieser Plasma-Probe ein Aliquot, welches später bei Bedarf für die HIV-Testung eingesetzt werden kann.

Kontroversen im Reiche der HIV-Impfung

Persönlich muss ich sagen, dass ich mir von der pro/kontra Präsentation durch Giuseppe Pantaleo (pro) und Rolf Zinkernagel etwas mehr Kontroverse erwartet habe. Es bleibt bei einer Vorstellung der beiden Positionen, ohne dass es wirklich um einen Disput ging. Und beide Kontrahenten haben auch relativ wenig über die HIV-Impfung selbst berichtet.

Dennoch, die beiden Präsentationen waren jede für sich sehr interessant. Pantaleo (Lausanne) hat sich in seinem Referat mit grossem Engagement dafür eingesetzt, dass aufgrund der massiven weltweiten Problematik durch die HIV-Infektion eine HIV-Impfung nun wirklich in klinischen Studien erprobt werden müsse. In Lausanne läuft nun eine erste Placebo-Kontrollierte klinische Studie mit einem Impfstoff der Firma Aventis Pasteur (s. Bild).



Zunächst ging Pantaleo auf die Möglichkeiten der Immunität ein. HIV wird sowohl zell-frei, wie auch zell-assoziiert (Provirus) übertragen. Eine Impfung müsste somit beide Formen verhindern können. Freie Virus-Partikel müssten durch virus-spezifische neutralisierende Antikörper blockiert werden, virus-infizierte Zellen müssten durch eine virus-spezifische zytotoxische Immunantwort (CTL) eliminiert werden. Somit müsste eine gute Impfung beide Formen der Immunantwort blockieren können. Andererseits kann man wohl kaum erwarten, dass es gegen HIV eine sterilisierende Impfung geben wird (Impfung, die jegliche Infektion verhindert). Doch es wäre schon gut, wenn eine Impfung eine chronische HIV-Infektion verhindern oder mindestens limitieren könnte.

Die Tatsache dass es Menschen gibt, die erfolgreich die HIV-Replikation trotz Infektion verhindern können, dass eine spezifische Immunantwort gegen HIV beobachtet wird, dass eine gute Immunantwort zu einer tieferen Viruslast führt (was einen besseren Verlauf bedeutet) wertet Pantaleo als Argumente, dass eine Impfung möglich sein wird. Doch er bekennt auch, dass die virale Diversität, die Escape-Mutanten, die Beobachtung von Superinfektionen schwierige Hürden auf diesem Weg darstellen.

Pantaleo zeigt dann zwei Beispiele von Patienten, die unmittelbar während der Primoinfektion behandelt wurden und anschliessend nach Absetzen der Therapie eine vollständige, spontane Suppression der Viruslast über mehrere Jahre aufwiesen. Diese beiden Patienten, wie auch andere long-term non-Progressoren haben eine sehr gute HIV-spezifische CD8 Immunantwort. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass die spezifisch auf HIV-Peptide reagierenden Zellen relativ häufig sowohl Interferon-Gamma wie auch IL-2 sezernieren. Pantaleo postuliert, dass solche polyfunktionellen CD8 Zellen ein Mass sein dürften für die Beurteilung eines protektiven Impfstoffes.

Im Rahmen der „Kontra“ Position hat sich Rolf Zinkernagel auf sehr allgemein gültige immunologische Prinzipien berufen und mit dieser Darstellung – ohne sich nun speziell um die Frage der HIV-Impfung kümmern zu müssen – relativ elegant Zweifel gesetzt, ob eine HIV-Impfung je einmal möglich wäre. Er hat sich auch in seiner Einleitung dahingehend geäussert, dass wir uns, nachdem nun in den letzten 10 Jahren wenig Innovatives im Impfsektor lief, vielleicht eher besinnen sollten, ob wir nicht mit ganz anderen Denkmodellen die Sache anpacken sollten.

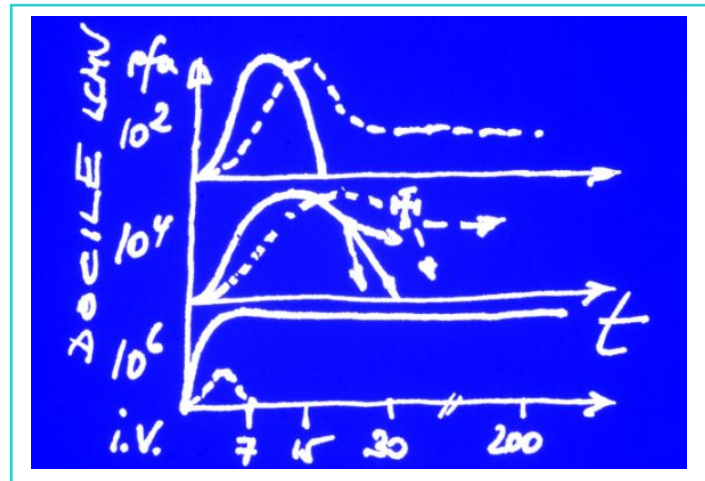
Zinkernagel leitete sein Referat ein mit der Feststellung, dass wir es bei HIV mit einem nicht-zytopathischen Virus zu tun haben. Die Eigenschaft solcher Viren ist es eben, dass sie ihre Wirtszelle nicht zerstören (im Gegensatz zum zytopathischen Virus). Sie können jedoch im Rahmen der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem zu einem immunologisch bedingten Schaden führen. Je besser ein Virus sich an den Wirt angepasst hat, desto geringer wird dieser Zytopathische Schaden. Zinkernagel wies dabei immer wieder darauf hin, dass diese Adaptation, die aber mindestens 200 Jahre dauern dürfte, vermutlich längerfristig die einzige Waffe des Menschen sein wird, mit der wir uns gegen HIV wehren können (s.dazu auch den Abschnitt über die [natürliche Immunität](#)).

Im Zentrum seiner Ausführungen sind dann auch Überlegungen – ausgehend vom LCMV-Modell – zur humoralen Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern. Zytotoxische Viren werden mit cytotoxischen Zellen (CTL) und neutralisierenden Antikörpern (nAK) eliminiert. Dies gelingt nur, wenn die Infektionsdosis gering ist. Bei non-cytopathischen Viren verhält es sich anders: Hohe Virusdosen führen zu einer Ausschaltung der CTL. Tiefe Dosen führen zu einer sehr guten CTL-Antwort, welche die Virusreplikation kontrolliert. Dies ist die Situation des Long-term non-Progressors (LTNP). Bei HIV gibt es kaum etwas dazwischen, entweder LTNP oder chronische Virämie.

Bei LCMV gibt es nun sehr interessante Experimente: nach der primären Kontrolle durch die CTL gibt es escape mutanten. Doch obwohl in diesen Experimenten alle Mäuse genetisch identisch sind, kommt es bei einigen Mäusen zum Virus-Anstieg. Dies ist ein zufälliges Ereignis. Die Mäuse entwickeln escape Mutanten, doch es ist nicht ein Unterschied in der CTL. Diese Mäuse haben ein Virus, welches den nAK durch die Latten ging. Interessant ist, dass jedes Serum der anderen Mäuse, nur nicht das eigene, die Viruslast bei ihr senken kann. Damit nAK entstehen (und persistieren) können, braucht es Antigen. Je mehr Antigen da ist, desto besser die nAK-Stimulation. Doch bei HIV ist es bereits zu viel und die CTL wird erschöpft.

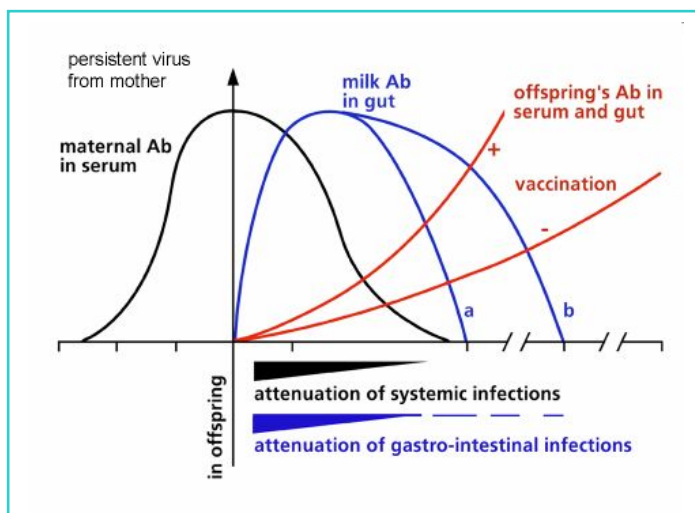
Im LCMV-Modell konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen einer CTL-Antwort (durch anti-CD8) die Hypergammaglobulinämie, welche im Rahmen der ersten CTL-Antwort auftritt, auch gehemmt wird. Interessanterweise kommen dann auch die nAK früher (n. 20 Tagen statt nach 100-200 Tagen) und der Immunschaden (Bsp. Milz) bleibt aus.

Es scheint so, dass sich die Virus-Wirt-Interaktion über Jahrzehnte so balancieren muss, damit genau die richtige Menge Antigen entsteht, welche die rechtzeitige Bildung von neutralisierenden Antikörpern zulässt.



Zinkernagel stellt dann die Frage, weshalb alle wirksamen Impfstoffe via nAK wirken. Als Beispiel zeigt er ein Vesicular-Stomatitis-Virus-Modell: Hier zeigt er, dass nur das Immuneserum (nAK) nicht aber T+B-Zellen von immunen Mäusen frisch infizierte Tiere schützen können.

Abschliessend stellt er dann noch sein interessantes Modell der Auseinandersetzung mit



non-cytopathischen Viren nach der Geburt dar. Diese Viren infizieren uns in der Regel während oder kurz nach der Geburt aus unserer unmittelbaren Umgebung oder über die rasch sich ausbildende Darmflora. Die ausgewogene Balance zwischen protektiven neutralisierenden mütterlichen Antikörpern, dem langsamen Anstieg der kindlichen Antikörperproduktion führt zu einer optimalen Abdeckung der Immunantwort und zu einer sich kontinuierlich entwickelnden eigenen Abwehr. Diese wohl balancierte Antwort ist ideal für die optimale Immun-

antwort. gegen diese Erreger (s. Abbildung). So gesehen, ist eine Krankheit wie Polio ein Problem der Hygiene. Wären wir weiterhin dem Antiegen ausgeliefert gewesen, hätte Polio sich gar nie im epidemischen Ausmass manifestieren können.

Influenza

Pathogenese

Der Vortrag "Why Influenza Kill and Will Kill Again?" vom eigens aus Japan eingeflogenen Yoshihiro Kawaoka war ein Feuerwerk und didaktisch hochstehende Einführung in die Pathogenese der Influenza. Er hat über die neusten Erkenntnisse zur Spanischen Grippe und zur Antiviralen Resistenz berichtet.

Spanische Grippe, 1918/19

Während der Spanischen Grippe-Epidemie sind viele junge Menschen an Pneumonien gestorben, sicher auch durch Superinfektion aber mehr noch an viraler Pneumonie selbst, wie man erst seit kurzem weiss. Die Untersuchungen zur Spanischen Grippe konnten ganz neu aufgerollt werden durch das Studium von Lungenproben, welche von an Grippe verstorbenen und im Permafrost begrabenen Soldaten gewonnen wurden (Reid et al, PNAS, 1999, Reid PNAS, 2000). Seit diesen Arbeiten weiss man, dass es sich dabei um ein H1N1 Virus gehandelt hat. Mittels reverse genetics können Kawaoka und sein Team Influenza-Viren herstellen (Produktion von Plasmiden, welche die viralen RNA exprimieren und solchen welche die viralen Proteine exprimieren, diese werden in Verozellen zu infektiösen Viren gemacht, [s. oben](#)). Die Autoren haben nun Influenza-Viren produziert, welche das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA) der Spanischen Grippe tragen.

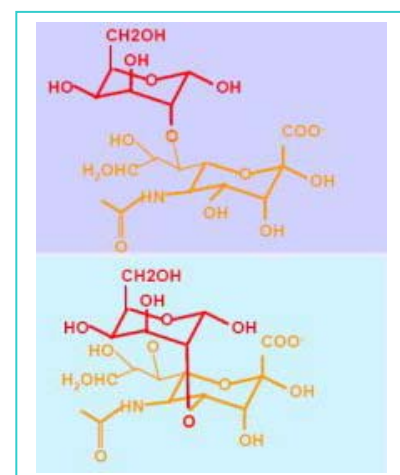
Werden nun Mäuse mit diesem Virus infiziert, (nicht aber bei Infektion mit einem gewöhnlichen Grippevirus, Memphisstamm), dann sterben die Mäuse an Pneumonie. Es genügt sogar das HA der Spanischen Grippe alleine für diesen Effekt. Die Pneumonie die man dabei fand war ein deutliches lymphocytäres Infiltrat mit Hämorrhagien, im Sinne einer viralen Pneumonie. Dies konnte auch bei einer Färbung der Lungenschnitte mit einem Antikörper gegen virale Proteine gezeigt werden. Die Lungen der Mäuse, die mit 1918-HA infiziert wurden waren voll Virusprotein, hingegen fand sich praktisch kein Protein bei den (Memphis-) Kontrollmäusen.

Die Infektionen mit dem 1918-HA Virus zeigten auch eine viel stärkere Sekretion von Zytokinen (MCP1, MIP-1, MIP-3, MIP-2, diverse Interleukine und G-CSF) welche Makrophagen, Leukocyten und Neutrophile aktivieren respektive ins Gewebe rekrutieren. Dies erklärt die auffälligen zellulären Infiltrate in diesen Lungen und die rasch letal verlaufende Klinik der Spanischen Grippe.

Von Influenza wissen wir, dass sich die Viren, die bei Vögeln vorkommen, von denjenigen des Menschen unterscheiden. Und habe diese Viren eine unterschiedliche Affinität zur Sialinsäure, dem eine Oberflächenmarker der Wirtszelle an welchen das Virus mit der HA andockt. Die Verkettung der Sialinsäure mit der Galaktose der Zelloberfläche kann grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen, die α 2-6 oder die α 2-3 Bindung. Erstere (Abbildung rechts, oben) kommt bei den Primaten vor, letztere (Abb. Unten) bei den Vögeln Mehr darüber auch im [Vortrag](#) von Dr. G. Eich anlässlich des [9. St. Galler Infekttages](#))

Die Schweine haben beide Verbindungen, weshalb sie sich als Zwischenwirt anbieten.

Die Influenza Viren der Vögel, sind schlecht an die α 2-6 Bindung adaptiert. Dies ist der Grund, weshalb diese Viren sich schlecht von Mensch zu

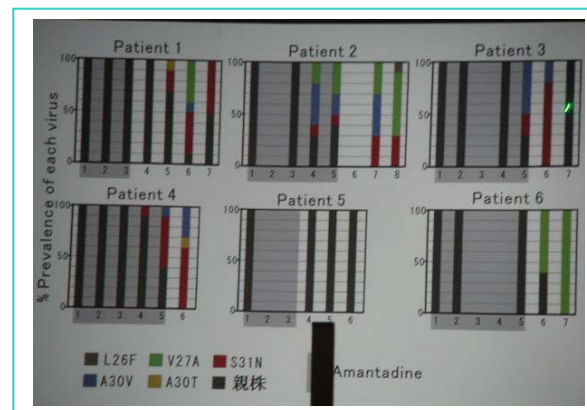


Mensch übertragen lassen. Auch das H5N1 Virus der aktuell zirkulierenden Vogelgrippe ist (noch) in der α 2-3 Formation. Kawaoka hat nun gezeigt, dass das 1918 Virus auch wie erwartet die α 2-6 Bindung bevorzugt.

Weiter hat die Gruppe noch untersucht, wie gut die heutige Bevölkerung das Virus der Spanischen Grippe neutralisieren würde. Tatsächlich findet sich nur bei Personen, die vor 1925 geboren sind ein hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern. Dass alle untersuchten aus jener Generation aber noch deutliche Titer an neutralisierenden Antikörpern aufweisen, ist bemerkenswert. Wenn man nun der o.g. Theorie von Rolf Zinkernagel glaubt ([s. oben](#)), wonach man nur AK macht, wenn man auch mit Antigen konfrontiert wird, dann wäre dies ja schlecht erklärbar. Doch das Phänomen wird als **antigenic sin** bezeichnet. Wenn Menschen mit Influenza konfrontiert werden (was praktisch jährlich der Fall ist) dann machen diese eine stärkere Immunantwort gegen ähnliche, früher erworbene Antigene als gegen das aktuell vorhandene Antigen. Diese „antigenic sin“ hat für mehr als 80 Jahre persistiert, was schon bemerkenswert ist!

Virostatika

In diesem Teil seines Referates hat Kawaoka eine Übersicht über die Antiviralen Substanzen gegen Influenza gegeben. Dabei ist er speziell der Frage nachgegangen, wie es sich mit der Viralen Resistenz verhält während einer Behandlung. Es ist bekannt, dass nach einer Therapie mit Amantadin ca. 30% der Virustämme resistent sind. Die Autoren haben nun aber die Resistenz während der Infektion gemessen und gefunden dass rund 80% aller Patienten während der Therapie Resistenzen gegen Amantadin entwickeln, die dann später wieder verschwinden. In einem Patienten könne 2-3 verschiedene Resistenzmutationen entstehen. Die nebenstehende Abbildung zeigt eine Reihe von untersuchten Kindern in einer solchen Untersuchung mit den über die Zeit beobachteten Resistenzmutationen.



Anders ist die Situation mit den Neuraminidasehemmern. Hier treten Resistenzen bedeutend seltener auf, 5.5% bei Kindern und 0.4% bei Erwachsenen. Analog zur o.g. Untersuchung haben die Japanischen Autoren bei 50 Kindern unter Oseltamivir-Therapie Viruskulturen vor und nach der Therapie vorgenommen. Insgesamt hatten 18% (n=9) der Kinder Resistenzen. Was bisher unbekannt ist, ist die Frage, wie ansteckend diese resistenten Viren sind.

Impfstrategien gegen Influenza

John Wood hat zunächst einmal die gängigen Impfstoffe zusammengefasst. Heute werden vor allem inaktivierte subunit-Vaccine verwendet oder inaktiviertes ganzes Virus. Die Technik von Berna mit den virosomalen Vakzinen (Lipidhüllen mit eingebetteten Oberflächenproteinen).

Bei der Virusentwicklung wird jedes Jahr der gleiche Fahrplan abgewickelt. Im Januar werden weltweit die zirkulierenden Viren überwacht, im Februar wird entschieden, gegen welches Virus man in der nächsten Saison impfen will und dann geht die Produktion los bis dass der Impfstoff im Juni in konzentrierter Form vorliegt, im Juli in die Endfassung gebracht und in klinischen Studien geprüft wird. Im September ist dann die erste Charge zum Versand bereit.

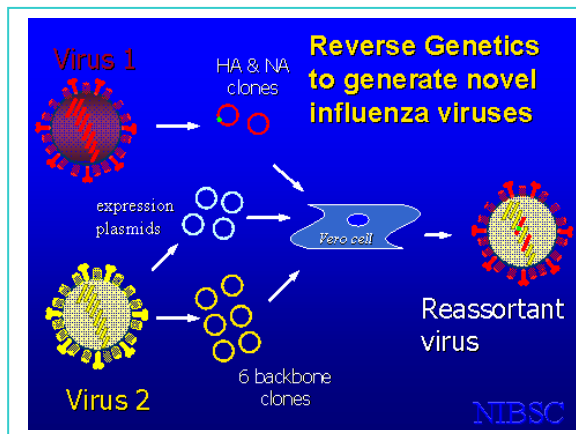
Dieses lange Prozedere sollte wenn immer möglich abgekürzt werden, doch dies ist nicht so trivial. Als neue Wege für eine Influenza-Vaccine bieten sich insbesondere die Reverse Genetik an ([s. oben](#)). Ein grosses Problem bei der Impfstoffherstellung ist die Verfügbarkeit von genügend (sterilen!) Hühnerembryonen. Daher versucht man heute, einen Impfstoff auf Zel-

Linien zu züchten. Dies wäre in mancher Hinsicht einfacher. Zur Zeit werden verschiedene Ansätze geprüft, zwei Methoden (auf MDCK-Zellen, Fa Solvay, resp. Vero-Zellen der Fa. Baxter) sind bereits lizenziert. Weitere Entwicklungen (MDCK in Suspension, GSK und PER.C6 in suspension, Aventis) sind weit fortgeschritten.

Eine weitere wichtige Entwicklung betrifft die Adjuvantien. Hier werden neben verschiedenen Salzen, auch Virosomen, Proteosomen und andere bakterielle Komponenten getestet. Entscheidend wäre, wenn das Adjuvans auch eine mukosale Applikation ermöglicht. Dies verspricht eine sehr viel bessere Immunität.

Ein interessanter Ansatz ist die Impfung gegen ein anderes Protein des Influenza Virus, das M2 Protein, da dieses keinen antigenic drift durchmacht. Dies würde bedeuten, dass mit einem Impfstoff eine über mehrere Jahre stabiler Impfschutz erreicht werden könnte.

Tatsächlich ist ein solcher Impfstoff erfolgversprechend, wie die ersten Tierexperimente zeigten ([Neiryck et al., 1999](#)). In diesen Experimenten wurden 11/12 geimpften Tieren geschützt (11/12 Kontrolltieren starben) und das Immenserum der geimpften Tiere schützte auch wieder 12/12 Mäusen und 1/12 Kontrollen.



Die aktuell gerade zugelassenen neuesten Impfstoffe sind Lebendimpfstoffe. Diese scheinen eine Vaccine-Efficacy von über 90% gegen homologes und 86% gegen "drifted" Viren zu haben ([Treanor et al., 1999](#) oder [Belshe 2000](#)).

Auch Wood ging wieder auf die "reverse genetics" ein. Diese (Abbildung links) wurde schon oben erklärt. Diese Methode ist besonders erfolgversprechend wenn es darum geht, gegen einen Pandemie-Influenza-Stamm möglichst rasch eine wirksame Impfung zu erzeugen.

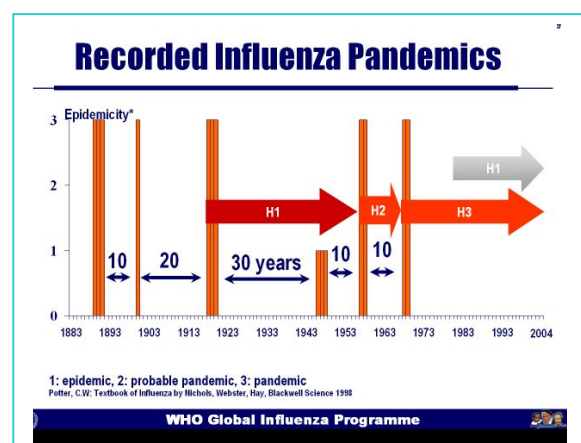
Ebenfalls unter Entwicklung sind weitere Adjuvantien, welche die Immunantwort verbessern sollten.

Influenza Pandemie: Eine weltweite Herausforderung

Damit sind wir bereits beim nächsten Thema: der Influenza Pandemie. Klaus Stöhr vertritt die WHO und hat in seinem Referat die aktuelle Bedrohungslage einer Influenza-Pandemie beschrieben. Pandemien treten eigentlich in regelmäßigen Intervallen von 10-30 Jahren auf. Die letzte Pandemie (1968) ist nun aber auch schon wieder 36 Jahre her.

Ein weiteres Argument, dass die nächste Pandemie vor der Tür steht, ist die Tatsache, dass sich in den letzten Jahren die neuen Fälle von Infektionen mit neuen Genotypen (H5N1, H7N1) beim Menschen gehäuft haben. Die Hälfte aller seit 1968 aufgetretenen Infektionen beim Menschen mit neuen Virustypen ist in den letzten 2 Jahren aufgetreten. Noch fehlt diesen Viren das Potential um rasch von Mensch zu Mensch übertragen zu werden ([s. oben, a2-6 Bindung](#)). Eine Pandemie wird in mehreren Wellen über wenige Wochen einen grossen Teil der Weltbevölkerung treffen. Die letzte Pandemie hat sich innert 8 Wochen auf der ganzen Welt ausgebreitet.

Die aktuelle rasche Ausbreitung von H5N1 Viren bei Vögeln in Asien ist ein Alarmzeichen. Die Hühner sind ungeschützt vor der Infektion. In 2 Ländern (Thailand, Vietnam) sind bisher



50 Personen an dieser Infektion erkrankt, 37 starben. Man vermutet, dass noch viel mehr Menschen in China an dieser Infektion erkrankt sind, ohne dass die Fälle entdeckt oder gemeldet wurden.

Wir müssen uns sicherlich gegen eine Pandemie vorbereiten.

Einsatz von Virostatika in einer Pandemie

Frederick Hayden ist schon ein mehrfacher Gast des Saanen-Meetings. Dieses Jahr sprach er über den Einsatz von Virostatika während einer Pandemie. Dabei behandelte er die verschiedenen Substanzen, deren Einsatz für Prophylaxe oder Therapie, Fragen der Resistenzentwicklung und natürlich auch der Verfügbarkeit dieser und allfälliger neuer Substanzen.

Bisher registriert sind die (alten) M2 Inhibitoren Amantadin und Rimantadine (letzteres in der CH nicht verfügbar) sowie die neueren NA-Inhibitoren Zanamivir (Relenza®) und Oseltamivir (Tamiflu®). Ein neuer Neuraminidasehemmer, Peramivir ist noch in klinischen Studien.

Alle registrierten Substanzen sind für die Prophylaxe etabliert mit ähnlicher Wirkung (Abbildung). Der therapeutische Effekt der Virostatika ist für alle Substanzen nur nachgewiesen bei frühzeitigem Einsatz (max 36h nach Symptombeginn). Diese zeitliche Abhängigkeit wurde auch im Mausmodell bestätigt ([Leneva et al., 2000](#)). Für die NA-Hemmer ist gezeigt, dass sie Hospitalisationen verhindern ([Kaiser et al., 2003](#)), führen eindeutig zur Verkürzung der Hospitalisation. Die Neuraminidase-Hemmer, nicht aber die M2 Hemmer, können auch die durch Influenzaviren erhöhte Adhäsion von Pneumokokken an den Lungenepithelien verhindern ([Peltola and McCullers, 2004](#)). Dieser Effekt scheint sich im Mausmodell auch auf das Überleben auszuwirken ([McCullers, 2004](#)).

Das grösste Problem für den Einsatz der billigen M2-Hemmer ist die aktuelle Bedrohung mit H5N1 Viren ([s. oben](#)). Dieses Virus hat eine durch mehrere Laboratorien bestätigte Resistenz gegen M2 Hemmer, welche durch eine Punktmutation im M2 Gen (S31N) bedingt ist. Offenbar hat diese Mutation zu keiner Einbusse an viraler Fitness geführt, sodass mit der Persistenz derselben zu rechnen ist.

Das gegenüber der M2-Hemmer deutlich geringere Resistenzpotential von Neuraminidasehemmern ist ein weiterer Grund, sich für letztere zu entscheiden. Auch lassen sich durch Behandlung mit NA-Hemmern deutlich mehr Erkrankungen bei Haushaltkontakten verhindern (Abbildung).

Antiviral (Study)	Season (Virus)	Reduction in 2 ^o influenza illness	Resistance transmission
Amantadine (Galbraith et al, 1969)	1968-69 (A/H3N2)	6%	?
Rimantadine (Hayden et al, 1989)	1987-89 (A/H3N2, A/H1N1)	3%	Yes
Zanamivir (Hayden et al, 2000)	1998-99 (A/H3N2, B)	82%*	No
Oseltamivir (Hayden et al, 2004)	2000-01 (A/H3N2, B)	85%*	No

müsste der Einsatz sehr gezielt auf wenige Gruppen eingeschränkt werden. Hayden empfiehlt diesbezüglich folgende Populationen (prophylaktisch) zu behandeln (absteigende Priorität):

- Pflege- und ärztliches Personal am Krankenbett
- Öffentliche Angestellte im Bereich Sicherheit (Polizei, Feuerwehr, Rettungswesen)
- Patienten, die mit Grippe hospitalisiert werden (therapeutisch)

Strategy	Efficacy (vs placebo/ no drug)		
	AM/RM	ZNV	OSEL
Seasonal			
Non-immunized adults	85-91%	84%	84%
Immunized NH elderly	58-75%	?	92%
Post-contact / post-exposure			
Households	3-100%	82%	73-89%
Nursing homes	Variable	Yes	Yes
? = No controlled study or not reported			

Das Hauptproblem beim Einsatz der NA-Hemmer für den Pandemiefall dürfte jedoch die Verfügbarkeit der Substanz sein. In dieser Situation

- Wichtigste Personen im öffentlichen Dienst
- Pflegeheimpatienten
- Ambulante Patienten mit Influenza

Für die USA rechnet man mit ca. 10 Mio med Personal (1:3 Prophylaxe: Therapie), 2.4 Mio öffentliche Sicherheit (1:2), 80 Mio Hochrisikopatienten (3:2), 1 Mio Hospitalisierte.

Die Kosten für diese Behandlung dürfte bei Behandlung von 10% der US-Population ca. 800 Mio USD betragen. Eine Idee, wie man relativ günstig die grossen Mengen an Medikament lagern könnte wäre mit einem „Stockpiling“ der Grundsubstanz. Diese ist über 8 Jahre in 7kg-Kontainern (Bild) haltbar und kann unmittelbar vor dem Gebrauch mit Wasser (+0.1% Na-Benzoeate, unangenehmer Geschmack!) angesetzt werden. Ein Kontainer reicht für gut 7000 Therapien. Die akuten Lagergrößen von Oseltamivir reichen in der Schweiz für eine Behandlung von ca. 2% der Population. Gewünscht wären 25%.



Die akuten Lagergrößen von Oseltamivir reichen in der Schweiz für eine Behandlung von ca. 2% der Population. Gewünscht wären 25%.

Als neue Medikamente erwähnenswert ist lediglich noch ein neuer oral verfügbarer NA-Hemmer, Peramivir und ein lange aktiver NA-Hemmer (R-118958), welcher einmal pro Woche eingenommen werden kann, was sicher für die Prophylaxe dankbar wäre. Die Substanz hat im Tiermodell 100% Schutzwirkung gezeigt, wenn sie 4 Tage vor Infektion 1x angewandt wurde.

Ist die Schweiz für eine Pandemie vorbereitet?

Pierre-Alain Raeber, im BAG für die Grippe-Pandemie verantwortlich, hat über die Vorbereitungen der Schweiz gesprochen. Wir rechnen in der Schweiz (worst case) mit 4.5 Mio Erkrankten, 2 Mio Arztbesuchen, 42'000 Toten und insgesamt mit Kosten von 2.5 Milliarden Fr. bei einer Attack-Rate (der ersten Grippe-Welle) von 25 %.

Raeber hat im wesentlichen die gleichen Populationen genannt, die primär geschützt werden sollten. In der Schweiz ist die Pandemieverordnung sorgfältig vorbereitet. Sie wird voraussichtlich im März ratifiziert. Die aktualisierte Version findet sich [online](#) auf der BAG-homepage. Sie regelt auch die Entscheidungen, die für die Priorisierung von Zielgruppen getroffen werden müssen. Die Schweiz hat mit Roche ein Abkommen unterzeichnet, wonach Roche bis im Jahr 2006 genügend Oseltamivir an Lager haben sollte, dass damit 25% der Schweizer Bevölkerung behandelbar wären.

Auffallend ist, dass in der Arbeitsgruppe Influenza Pandemie neben dem Virologen Werner Wunderli kein Infektiologe sitzt!

Interaktive Session

In der Interaktiven Session zum Thema Influenza wurde im Wesentlichen das Wissen um die Neuraminiidasehemmer aufgefrischt. Die meisten Informationen sind in diesem Bericht schon enthalten. Eine interessante, lediglich als Abstract publizierte Studie wurde noch erwähnt: Dabei ging es um den Zusammenhang Pneumonie und Oseltamivir-Exposition (in den letzten 30 Tagen vor Influenza-Diagnose) bei über 60-Jährigen. Patienten, die Oseltamivir erhalten hatten, hatten ein ca. 60% geringeres Risiko eine Pneumonie zu erleiden (Nordstrom et al, ICAAC, 2004, V1260)