



**Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und klinische Immunologie der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. A. Borkhardt

**Impfspezifische humorale und zelluläre Immunität HIV infizierter Kinder mit
Langzeitimmunrekonstitution unter HAART**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Ahmad Fasel Jebran

2007

**Als Inauguraldissertation
gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf**

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Niehues

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hengel

Abkürzungen	
3TC	Lamivudin
ABC	Abacavir
AIDS	Aquired immunodeficiency syndrom
Ak	Antikörper
ARP	Age related percentage
ART	Antiretrovirale Therapie
AZT	Zidovudin
CD4	Rezeptor von T-Lymphozyten
CDC	Center of disease control
CMV	Cytomegalie Virus
CPM	Counts per minute
D4T	Stavudin
DDI	Didanosin
DTaP	Diphtherie-, Tetanus-, azelluläre Pertussisimpfung
EBV	Epstein-Barr Virus
EFV	Efavirenz
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Eq	Equivalent
FCS	Fötales Kälberserum
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
Hb	Hämoglobin
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSV	Herpes simplex Virus

IE	Internationale Einheit
IFN-Gamma	Interferon Gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LIP	Lymphoide interstitielle Pneumonie
LPV/r	Lopinavir
LTT	Lymphozytentransformationstest
MMR	Mumps Masern Röteln
Mo.	Monate
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Studienteilnehmer
NNRTI	Nichtnukleosidische rev. Transkriptaseinhibitor
NRTI	Nukleosidische reverse Transkriptaseinhibitor
OKT3	monoklonaler Antikörper gegen CD3
PCP	Pneumocystis Pneumonie
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
RTV	Ritonavir
RPMI	Medium zum Züchten von Leukozyten
SAC	Staphylokokkenantigen Cowan I
STIKO	Ständige Impfkommision
TMB	Tetramethylbenzidin
T-Toxoid	Tetanus-Toxoid
VL	Viruslast
Wo.	Wochen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
1.1.	Entdeckung und Klassifizierung des HIV.....	7
1.2.	Molekularbiologie des HIV.....	8
1.3.	Übertragungswege und Verbreitung.....	8
1.4.	Diagnostik, klinische Manifestation und Therapie.....	10
1.5.	Immunrekonstitution unter kombinierter antiretroviraler..... Therapie.....	12
1.6.	Impfung und HIV Infektion im Kindesalter.....	12
2.	Fragestellung, Materialien und Methoden	14
2.1.	Fragestellung.....	14
2.2.	Patienten.....	16
2.3.	Laboruntersuchungen.....	19
2.3.1.	Lymphozytentransformationstest (LTT).....	19
2.3.2.	Zu den Mitogenen.....	20
2.3.3.	Bestimmung der Tetanus-Antikörper.....	22
3.	Resultate	23
3.1.	Immunrekonstitution unter HAART.....	23
3.1.1.	CD4 Zellzahl.....	25
3.1.2.	Die Viruslast.....	25
3.1.3.	Zwischenzusammenfassung.....	25
3.2.	LTT mit den Mitogenen PHA, OKT3, PWM, SAC.....	26

3.2.1.	LTT mit dem Mitogen PHA.....	26
3.2.2.	LTT mit dem Mitogen OKT3.....	28
3.2.3.	LTT mit dem Mitogen PWM.....	30
3.2.4.	LTT mit dem Mitogen SAC.....	32
3.2.5.	Zwischenzusammenfassung.....	34
3.3.1.	LTT mit dem Tetanus-Toxoid.....	34
3.3.2.	Induktion spezifischer Antikörper nach Boosterung.....	36
3.3.3.	Zwischenzusammenfassung.....	39
4.	Diskussion	40
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literatur	50
7.	Lebenslauf	54
8.	Anhang	57
9.	Erklärung	59
10.	Danksagung	60

1. Einleitung

1.1. Entdeckung und Klassifizierung

Das Human Immunodeficiency Virus wurde erstmalig im Jahre 1983 von Montagnier und seinen Mitarbeitern am Pariser Institut Pasteur entdeckt. Bei dieser Entdeckung handelte es sich um das HIV Typ 1 (HIV-1). Drei Jahre später (1986) wurde ein zweites HI-Virus (HIV-2) in Westafrika bei asymptomatischen Patienten beschrieben (Clavel 1986). Das HIV-2 ist durch sein Genom ein näherer Verwandter des affenspezifischen Simian Immunodeficiency Virus (SIV) und scheint bislang weniger aggressiv zu sein als das HIV-1. Das HI-Virus ist ein RNA Virus aus der Gruppe der Retroviren und gehört speziell zu den Lentiviren. Die Retroviren verfügen über folgende Eigenschaften:

Tabelle 1: Bestandteile des HIV	
Nukleinsäure	Einzelstrang RNA Plus-Strang, 2 identische Moleküle, 7-11 Kb
Kapsidtyp	Ikosaeder oder konisch
Virusgröße	80-100 nm
Hülle	Ja

1.2. Molekularbiologie des HIV

HIV besteht aus zwei identischen einzelnen RNA Strängen, der Reversen Transkriptase, Core Proteinen (p24 Kapsid Protein, p18 Matrix Protein) und wird von einer doppelten Lipidmembran umgeben, in die Hüllproteine gp 120 und gp 41 eingebettet sind.

1.3. Übertragungswege und Verbreitung

Eine HIV Infektion kann auf folgende vier Wege, die alle mit einer unterschiedlichen Übertragungswahrscheinlichkeit behaftet sind und mit unterschiedlicher regionaler Häufigkeit in der Welt vorkommen, übertragen werden:

1. Sexualverkehr (vaginal, anal, oral)
2. Blut und Blutprodukte
3. Injektionsnadeln und Instrumente
4. Vertikale Übertragung von einer HIV infizierten Mutter auf das Kind (während der Schwangerschaft, unter der Geburt oder durch die Muttermilch)

Der überwiegende Anteil der Kinder (>95%) wird durch eine vertikale Übertragung des Virus von der Mutter auf das Kind infiziert (vertikale Infektion). Die Transmissionswahrscheinlichkeit bei der vertikalen Infektion wird im Wesentlichen von der Viruslast der Mutter beeinflusst (Mofenson 1999; Garcia 1999). Außer der Viruslast spielen HLA-B Antigentypen der Mutter eine Rolle bei der vertikalen Transmission. Bei Trägerinnen von HLA B 1302, 3501, 3503, 4402, 5001 wurde bei geringer Viruslast eine vertikale Transmission bei ca. 48 % festgestellt (Winchester 2004). Die Übertragung des HI Virus kann präpartal, intrapartal oder postpartal erfolgen (Mofenson 1997; Rouzioux 1995). Die

Mehrzahl der vertikalen Transmissionen (bis zu 90%) erfolgt peri- oder intrapartal (Mofenson 1997). Das Risiko für eine vertikale Transmission kann durch eine elektive Sectio caesarea und eine effektive intra- und postpartale medikamentöse Transmissionsprophylaxe in den entwickelten Ländern auf <2% gesenkt werden. (The European Mode of Delivery Collaboration 1999; The International Perinatal HIV Group 1999; Grosch-Wörner 2000). Die Transmissionswahrscheinlichkeit bei unbehandelten Mutter-Kind-Paaren liegt in Europa bei 15-20% (Grosch-Wörner 1993). Das Risiko einer HIV Infektion durch kontaminierte Kanülen ist sehr gering, ca. 0,3% (Henderson 1990). Schwieriger einzuschätzen ist das Risiko der HIV Übertragung durch Sexualverkehr. Generell liegt das Risiko für einen einmaligen Sexualkontakt bei 0,1% (Gray 2001). Die unterschiedlichen Häufigkeiten der Übertragungswege einer HIV Infektion in Afrika und in den Industriestaaten stellen die folgenden Abbildungen 1 und 2 (www.aids-kampagne.de) dar.

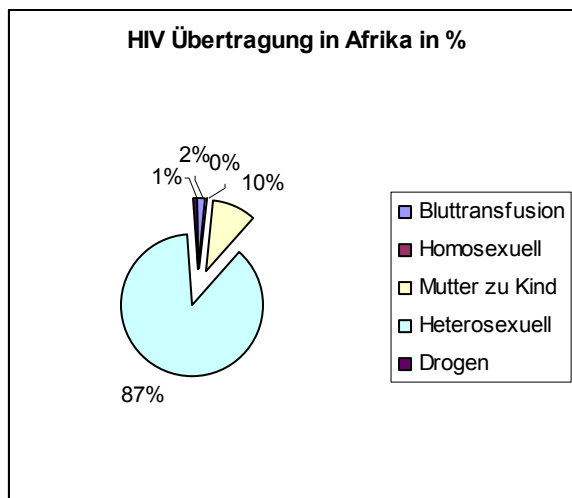


Abbildung 1

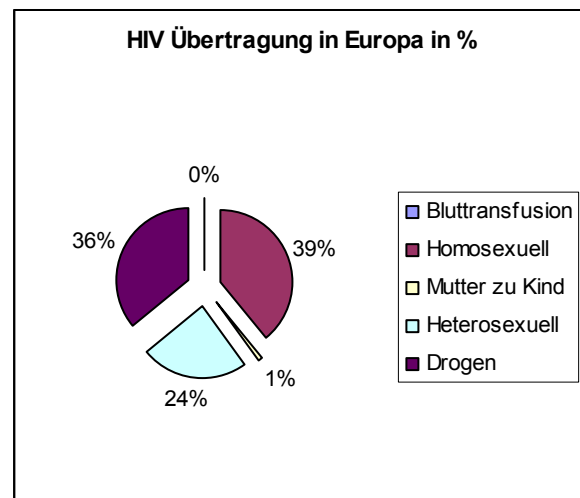


Abbildung 2

Die HIV-Konzentration in Tränen, Schweiß und Speichel sind so niedrig, dass sie als Übertragungsmedium kaum in Betracht kommen. Auch eine Übertragung durch Insektenstiche oder durch Tröpfcheninfektion wurde bisher nicht beobachtet. (Greten 2002).

1.4. Diagnostik, klinische Manifestation und Therapie

Von HIV-1 sind mehrere Subtypen bekannt, die regional in unterschiedlicher Häufigkeit auftreten. Der Subtyp B ist stärker in Europa und Nordamerika verbreitet. Die Subtypen A, C, D und E sind für die meisten Infektionen in Afrika und Südostasien verantwortlich. HIV-2 tritt vorwiegend in Westafrika auf und scheint nach den bisherigen Untersuchungen weniger aggressiv zu sein als HIV-1. Eine HIV-Infektion lässt sich mittlerweile durch verschiedene Untersuchungsmethoden nachweisen:

- Zum direkten Nachweis des Virus im Blut steht die PCR zur Verfügung, die bereits 1-2 Wochen nach der Infektion reagiert.
- Nach durchschnittlich 6-8 Wochen können beim indirekten Nachweis spezifische Antikörper gegen HIV im Blut nachgewiesen werden. Beim Neugeborenen einer HIV infizierten Mutter ist der HIV-Antikörpernachweis positiv, da das Neugeborene intrauterin HIV-Antikörper von der Mutter übertragen bekommt, welche zum Teil erst nach 18 Monaten beim Neugeborenen nicht mehr nachgewiesen werden können (Sison 1992; Schupbach 1994).

Die Manifestationen der HIV Infektion im Kindesalter unterscheiden sich von den Manifestationen beim Erwachsenen. Bei den Erwachsenen zeigt sich bei der HIV Primärinfektion ein mononukleoseähnliches Krankheitsbild, das nach ein bis sechs Wochen abklingt. Das typische Bild der HIV-Manifestation mit grippeähnlicher Symptomatik fehlt im Kindesalter (Niehues 2001). Die Manifestation der konnatalen HIV Infektion kann unterschiedliche klinische Symptome wie Frühgeburtlichkeit, Dystrophie, kraniofasziale Dysmorphie, ZNS Schäden (kortikale Atrophie und Verkalkung der Stammganglien mit Ataxie), opportunistische Infekte sowie die lymphoide interstitielle Pneumonie aufweisen (Herold2007). Bei Kindern stehen Infektionen im Vordergrund der klinischen Manifestation

(Principi 1991). Insbesondere sind bei Säuglingen fulminante Verläufe im Rahmen von Primärinfektionen beobachtet worden. Dagegen ist das Erregerspektrum der sekundären Infektionen im Kindes- und Erwachsenenalter vergleichbar. Bei AIDS definierenden Erkrankungen stehen opportunistische Infektionen im Vordergrund (Turner 1995). Vor der Einführung der PCP Prophylaxe und der antiretroviralen Therapie war die Pneumocystis Jirovecii Pneumonie mit 40 % die häufigste sekundäre Infektion in beiden Altersgruppen. Im Kindesalter folgten schwere rezidivierende bakterielle Infektionen (17%), die Kryptosporidiose (11%), die CMV Erkrankung, ösophageale Candidiasis oder lymphozytäre interstitielle Pneumonie (jeweils 8%) und die HIV-Enzephalopathie (The European Collaborative Study Group 1994). Im Kindesalter sind HIV assoziierte Malignome (Kaposi-Sarkom, Non-Hodgkin Lymphome) sehr selten, wohingegen sie bei Erwachsenen mit 20% die zweithäufigsten AIDS definierenden Erkrankungen darstellen.

Es ist sinnvoll, kurz den HIV Lebenszyklus darzustellen, um die Wirkprinzipien der antiretroviralen Medikamente zu verstehen. In der ersten Phase des Replikationszyklus fusioniert das HI-Virus mit der Wirtszelle über deren HIV-Rezeptoren (CD4) und Korezeptoren (Chemokinrezeptoren). Genau an dieser Stelle greifen so genannte Fusionshemmer, die seit Mai 2003 zugelassen sind, hemmend in den Replikationszyklus ein. Die HIV-RNA wird im Zytoplasma der Wirtszelle durch das virale Enzym Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Genau dieser Vorgang wird durch Medikamente aus zwei Substanzklassen, die Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) und die Nicht Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) unterbunden. Die NRTI werden nach Aufnahme in die Wirtszelle durch zelleigene Enzyme phosphoryliert und führen so nach Einbau in die DNA-Kette zum Kettenabbruch, während die NNRTI direkt an die HIV Reverse Transkriptase binden und dadurch die Umschreibung der HIV-RNA in die DNA verhindern.

In der zweiten Phase der Virusreplikation werden nach Replikation des Virusgenoms neue Viren an der wirtseigenen Zellmembran zusammengesetzt („Assembly“) und aus der Zellmembran herausgestülpt („Budding“). Um infektiöse Viren zu erzeugen, ist während dieser Prozesse die proteolytische Spaltung von viralen Polyproteinen notwendig und hierfür benötigt HIV die virale Protease. Hierin liegt der Angriffspunkt der Protease-Inhibitoren, die in der antiretroviralen Kombinationstherapie eingesetzt werden.

1.5. Immunrekonstitution unter kombinierter antiretroviraler Therapie

Bei HIV positiven Patienten ohne adäquate Therapie kommt es mit zunehmender Krankheitsdauer zum Anstieg der Viruslast und zur Abnahme der CD4 T-Zellzahl. Dies macht sich klinisch durch gehäuftes Auftreten opportunistischer Infektionen bemerkbar. Unter der antiretroviralen Kombinationstherapie wird bei den Patienten allmählich eine Immunrekonstitution erreicht, weshalb seit Einführung dieser Therapie in Westeuropa die Zahl opportunistischer Infektionen bei HIV positiven Patienten deutlich zurückgegangen ist und das Überleben verbessert worden ist (Resino 2006).

Entscheidend für die Immunrekonstitution ist die Therapieintensität, wobei die Dreifach-Kombination eindeutig der Zweifach-Kombination überlegen ist (Niehues 2001). Die Patienten unserer Untersuchungsgruppe wurden zunächst mit einer zweifachen Kombination behandelt, die dann im Verlauf auf eine Dreifach-Therapie umgestellt wurde. Eine konsequente HAART, die mit einer guten Immunrekonstitution einhergeht, stellt die Basis für eine gute Impfantwort bei HIV positiven Kindern dar.

1.6. Impfung und HIV Infektion im Kindesalter

Es ist wichtig, HIV infizierte Kinder durch rechtzeitige Impfung vor Infektionskrankheiten, die ggf. letal enden können, zu schützen. Allerdings ist es nicht so einfach, den Zeitpunkt und

den Impfstoff auszuwählen. Die STIKO stuft die inaktivierten Impfstoffe und die Toxoide als unbedenklich ein und empfiehlt diese sowohl bei asymptomatischen als auch bei symptomatischen HIV Patienten (STIKO 30/2007). Die Empfehlung der ständigen Impfkommission von Juli 2007 für Impfung bei HIV Infektion lautet folgender Maßen: (symptomatisch heißt klinisches Stadium A-C, während asymptomatisch klinisches Stadium N bedeutet.)

- Inaktivierte Impfstoffe/Toxoide sind sowohl bei symptomatischer als auch bei asymptomatischer Infektion empfohlen.
- Masern Impfung wird bei asymptomatischer Infektion (klinisches Stadium N) empfohlen, jedoch nicht bei symptomatischer Infektion. Im Falle einer Maserninfektion bei symptomatischer Infektion (klinisches Stadium A-C) wird Gabe von polyvalentem IgG empfohlen.
- Ebenso werden die Impfungen mit Mumps und Röteln und anderen Lebendimpfstoffen bei symptomatischer Infektion nicht empfohlen, während sie bei der asymptomatischer Infektion empfohlen sind.
- Die Varizellen-Impfung wird bei asymptomatischer Infektion als möglich bezeichnet, wobei sie an eine relative altersbezogene CD4 Zellanteil von ≥ 25 % gekoppelt sein soll. Bei symptomatischer Infektion ist die Varizellen-Impfung kontraindiziert.
- Die BCG Impfung ist sowohl für symptomatische als auch für asymptomatische Infektion kontraindiziert.

Es gibt wenig Langzeitdaten, wie Kinder zu impfen sind, die einmal in fortgeschrittenen Stadien der HIV Infektion waren, aber jetzt unter HAART eine Immunrekonstitution erfahren haben.

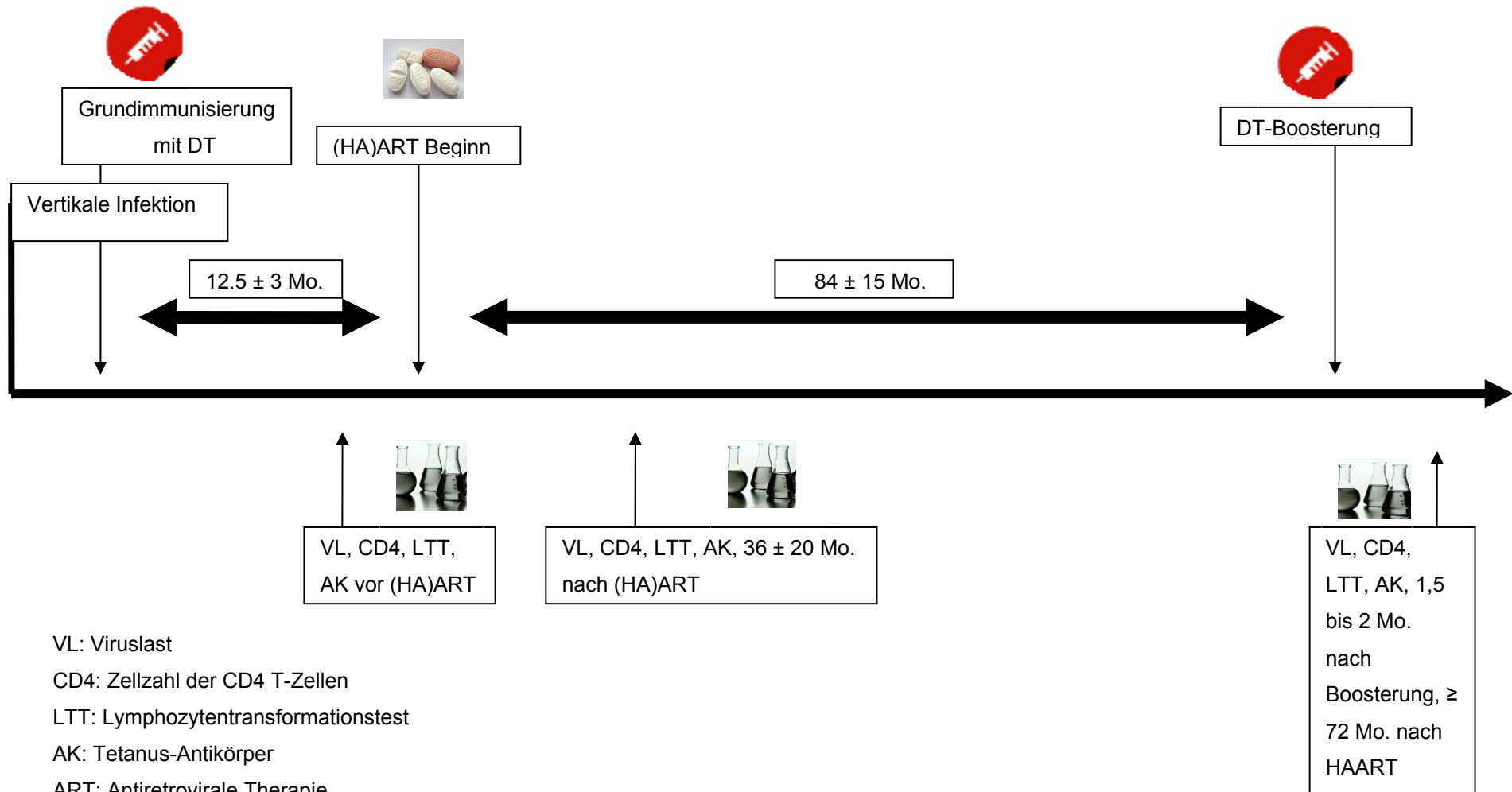
2. Fragestellung, Patienten, Materialien und Methoden

2.1. Fragestellung

In dieser Dissertation werden HIV infizierte Kinder beschrieben, bei denen zunächst durch eine effektive antiretrovirale Therapie (Zweifach-Kombination) und später durch eine hochaktive antiretrovirale (Dreifach-Kombination) Therapie eine Immunrekonstitution erfolgt ist. Hierbei interessieren uns insbesondere folgende Fragen:

- Kommt es überhaupt zu einer langfristigen Viruslastsuppression und wie ist die numerische Immunrekonstitution, insbesondere in Bezug auf altersbezogene CD4 Zellzahlen?
- Wie ist die funktionelle Rekonstitution der Lymphozyten in Bezug auf ihre Gesamtstimulierbarkeit im Lymphozytentransformationstest (LTT)?
- Wie ist die funktionelle Rekonstitution in Bezug auf das Recall-Antigen Tetanus-Toxoid?
- Ist eine Rekonstitution des B-Zellkompartments in Bezug auf die Erkennung von Recall-Antigenen erfolgt, das heißt, sind auch ohne Boosterung spezifische Antikörper nachweisbar?
- Ist bei HIV infizierten Kindern ohne nachweisbare Impf-Antikörpertiter durch eine Booster-Impfung eine Induktion spezifischer Antikörper gegen Tetanus möglich?

Abbildung 3: **Untersuchungsschema**



VL: Viruslast

CD4: Zellzahl der CD4 T-Zellen

LTT: Lymphozytentransformationstest

AK: Tetanus-Antikörper

ART: Antiretrovirale Therapie

HAART: Hochaktive antiretrovirale Therapie

DT: Diphtherie, Tetanus

Mo.: Monate

2.2. Patienten

In dieser Dissertation führen wir eine retrospektive Analyse in einem Gesamtkollektiv von 50 HIV positiven Kindern über den Zeitraum von 1995 - 2004 durch, die in der HIV Ambulanz der Universitätskinderklinik Düsseldorf betreut wurden.

Einschlußkriterien waren:

- Vertikale HIV Infektion
- Grundimmunisierung mit Diphtherie und Tetanus *vor* Therapiebeginn
- (HA)ART Therapie

Ausschlußkriterien waren:

- Horizontale HIV Infektion
- Grundimmunisierung mit Diphtherie und Tetanus *nach* Therapiebeginn
- Keine LTT und Antikörpermessung vor Therapiebeginn

Bei 9 Kindern waren die Einschlußkriterien erfüllt. Alle Patienten haben vor Beginn der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) eine Grundimmunisierung gegen Tetanus erhalten (Abb. 3).

In dem Zeitabschnitt nach der Grundimmunisierung und vor Beginn der HAART Therapie wurden bei diesen Kindern Lymphozytentransformationstests durchgeführt und Antikörper gegen Tetanus bestimmt (s. Kap. 3). Die gleichen Untersuchungen wurden bei den Patienten durchgeführt, nachdem sie mindestens zwei Jahre lang eine HAART Therapie erhalten hatten (s. Abb. 3).

Für den LTT wurde 10 ml venöses heparinisiertes Blut (ebenso 10 ml heparinisiertes Blut von einer gesunden Kontrollperson) und zur Antikörperbestimmung 3 ml Humanserum bei jedem Kind entnommen. Die Patienten waren am Ende der Untersuchung im Durchschnitt 12,1 ($\pm 5,5$) Jahre alt.

Die Patienten/innen erhielten im Rahmen der antiretroviralen Therapie zunächst eine Zweifach-Kombinationstherapie, die im Verlaufe der Behandlung auf ein Dreifach-Therapieregime (siehe nachfolgende Tabelle 2) umgestellt wurde. Die Patienten wiesen beim Einschleusen in die Studie folgende klinische und immunologische Stadien auf: Klinisches Stadium A = 5, Stadium B = 3, Stadium C = 1, Immunologisches Stadium 1 = 5, Stadium 2 = 1, Stadium 3 = 3. Während der Studie war eine intravenöse Gabe von Immunglobulinen nicht notwendig.

Tabelle 2: Patientencharakteristik (n=9)

Patienten	Alter	Geschlecht	Infektionsmodus	klinisches Stadium	Immunolog. Stadium	Therapiedauer mit Zweifach-Kombination (in Jahren)	Zweifach-Kombination	Therapiedauer mit Dreifach-Kombination (in Jahren)	Dreifach-Kombination
L C	9	w	vertikal	B	1	3	3TC, AZT	4	D4T, DDI, NFV
T K	15	w	vertikal	A	1	4	3TC, AZT	2	LPV/r, EFV
A R	14	w	vertikal	B	3	4	3TC, AZT	3	LPV/r, EFV
M K	13	w	vertikal	B	1	3	3TC, AZT	4	D4T, DDI, NFV
B K	12	m	vertikal	A	2	3	3TC, AZT	4	D4T, DDI, NFV
J H	13	w	vertikal	A	3	4	3TC, AZT	3	D4T, DDI, NFV
Y F	12	w	vertikal	C	3	1	3TC, AZT	5	3TC, D4T, RTV
J F	8	w	vertikal	A	1	5	3TC, AZT	3	LPV/r, EFV
T E	7	w	vertikal	A	1	2	3TC, ABC	3	3TC, ABC, NFV

2.3. Laboruntersuchungen

2.3.1. Lymphozytentransformationstest (LTT)

Für den LTT werden ca. 10 ml venöses heparinisiertes Blut (ebenso 10 ml heparinisiertes Blut von einer gesunden Kontrollperson) bei jedem Kind entnommen.

Die Lymphozyten werden aus heparinisiertem Vollblut von Patienten mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und in ein serumhaltiges Medium überführt. Für die Bestimmung der Lymphozytenfunktion werden diesen Lymphozytenkulturen Mitogene zugesetzt, wie z. B. Phytohämagglutinin (PHA) oder poke weed mitogen (PWM), die relativ unspezifisch T- und B-Zellen aktivieren (im Folgenden wird diese Methode auch als „unspezifischer oder Mitogen LTT“ bezeichnet). Zum Nachweis einer spezifischen Sensibilisierung (im Folgenden als „spezifischer oder Recall-Antigen LTT“ bezeichnet) wird den Lymphozytenkulturansätzen das Tetanus-Toxoid in verschiedenen Verdünnungen (z. B. 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/ml) zugesetzt, als interne Kontrolle wird statt des Antigens nur Medium zugegeben (Spontanproliferation). Diese Verdünnungsreihen sind notwendig, um das optimale Verhältnis zwischen Lymphozytenmenge und Antigenkonzentration in der Kultur herauszufinden, bei dem die höchste Proliferationsrate zu beobachten ist. Der Test wird in einem Parallelansatz mit Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen durchgeführt. Sowohl beim unspezifischen als auch beim spezifischen LTT werden die Zellen für 6 Tage bei 37 °C inkubiert und 18 Stunden vor Kulturende mit radioaktivem ³H-Thymidin markiert, das proportional zur Proliferation der Lymphozyten in deren DNA eingebaut wird. Die Radioaktivität des radioaktiv markierten Thymidins wird dann als counts per minute (cpm) gemessen. Die Radioaktivität der mit Medium stimulierten Zellen wird von der Radioaktivität

der jeweils mit unterschiedlichen Mitogenen (PHA, PWM, OKT3, SAC) stimulierten Lymphozytenkulturansätzen subtrahiert.

2.3.2. Zu den Mitogenen:

Allgemeine Charakterisierung

Phytohämagglutinin (PHA):

Eine unter anderem aus der gewöhnlichen Bohne *Phaseolus vulgaris* gewonnene Polysaccharidsubstanz, die die Trennung roter und weißer Blutzellen beschleunigt. Nowell (1960) entdeckte ihre Fähigkeit, in Lymphozyten eine blastische Transformation (s. Transformation) und Zellteilungen zu induzieren.

Pokeweed Mitogen (PWM):

Es ist ein pflanzliches komplexes Molekül (Lektin) ohne enzymatische Eigenaktivität, das aus der Pflanze *Phytolacca americana* isoliert wird. PWM stimuliert sowohl T- als auch B-Lymphozyten.

Staphylococcal aureus Cowan-I (SAC):

Das SAC Mitogen ist ein Zellwandprotein (Protein A) vom *Staphylococcus aureus* Typ Cowan-I. Es stimuliert die B-Lymphozyten.

OKT3:

Das OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper, der mit dem Membranmolekül CD3 der T-Zelle reagiert und führt zu einer Aktivierung der T-Zelle.

Durchführung: Separation der mononukleären Zellen per Ficoll. Einstellen der Zellzahl auf 2×10^6 Zellen/ml in RPMI.

Mitogenplatte: 100 µl Zellsuspension pro well. 3 Tage Inkubationszeit

Antigenplatte: 50 µl Zellsuspension pro well. 7 Tage Inkubationszeit.

Nach der Inkubationszeit erfolgt der Thymidineinbau.

- **MEDIUM**

40ml RPMI⁺ + 10ml FCS

2x für 12 Platten

- **PHA Phythämagglutinin** (HW/30852701; Genzyme Virotec; 45mg)

Stammlösung (SL):

5ml NaCl + PHA stehen lassen, bis es gelöst ist (→ 5mg/ml)

bei -20°C einfrieren (à 500µl)

① 10ml RPMI⁺ + 100µl PHA SL (100µg/ml)

② 9ml RPMI⁺ + 1ml von ① (10µg/ml)

Endkonzentration: 90µg/ml und 9µg/ml

- **OKT3 antiCD3** (30111A Pharmingen; 0,5mg/ml = 500µg/ml)

Stammlösung (SL):

200µl OKT3 + 10ml RPMI (→10µg/ml)

bei -20°C einfrieren (à 500µl)

① 10ml RPMI⁺ + 100µl OKT3 SL (100ng/ml)

② 9ml RPMI⁺ + 1ml von ① (10ng/ml)

Endkonzentration: 50ng/ml und 5ng/ml

- **PWM (Pokeweed Mitogen)** (Sigma; L9379; 5mg)

Stammlösung:

bei -20°C einfrieren (à 200µl)

① 10ml RPMI⁺ + 20µl PWM (1:500)

② 9ml RPMI⁺ + 1ml von ① (1:5000)

Endkonzentration: 1µg/ml und 0,1µg/ml

- **SAC** (Staphylococcus aureus cells) (Calbiochem; #507858)

① 10ml RPMI⁺ + 20µl SAC (1:500)

② 9ml RPMI⁺ + 1ml von ① (1:5000)

Endverdünnung: 1:1000 und 1:10000

2.3.3. Bestimmung der Tetanus-Antikörper

Für die Antikörperbestimmung wurde 3 ml Humanserum bei jedem Kind entnommen. Imunozytom Tetanus ist ein Zweischnitt-ELISA nach dem Sandwich-Prinzip. Vertiefungen der ELISA-Teststreifen sind mit Tetanus-Toxoid beschichtet. Verdünnte Serum- bzw. Plasmaproben werden in den Vertiefungen der ELISA-Teststreifen inkubiert (Probeninkubation). Während der Inkubationszeit werden spezifische Tetanus-Toxoid-Antikörper an die Festphase gebunden. Unspezifische Probenbestandteile werden in einem Waschschnitt entfernt. Im zweiten Inkubationsschnitt erfolgt die Konjugatreaktion. Das Tetanus-Toxoid-POD-Konjugat markiert spezifisch die gebundenen Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper.

In einem weiteren Waschschnitt wird ungebundenes Konjugat entfernt. Im dritten Inkubationsschnitt erfolgt die Substratreaktion, wobei die Peroxidase des Konjugats das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einer blau gefärbten Substanz umsetzt. Durch anschließende Zugabe von Schwefelsäure wird diese Reaktion gestoppt und es erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Die Farbintensität ist der Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper-Konzentration der Probe direkt proportional. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wird die Extinktion in einem ELISA-Reader gemessen. Über eine Bezugskurve oder die Einpunktkalibrierung wird die Anti-Tetanus-Toxoid-Antikörper-Konzentration in der Probe quantitativ bestimmt.

3. Resultate

3.1. Immunrekonstitution unter HAART

Alle unsere Patienten haben unter HAART Therapie eine gute Immunrekonstitution erreicht. Nach einer mittleren Beobachtungsdauer von 7 Jahren ist bei 6 von 9 Patienten die Viruslast durch die (HA)ART Therapie unter die Nachweisgrenze gesunken, bei 7 von 9 ≤ 117 Eq/ml. Nur zwei Patienten (LC 1744 Eq/ml und BK 15803 Eq/ml) zeigten ein unvollständiges Ansprechen, aber dennoch eine CD4-Zellrekonstitution bei BK von 26,9 % auf 132 % und bei LC von 76 % auf 118 % der altersnormalen CD4 Zellzahlen.

Tabelle 3: CD4 Zellzahlen und Viruslast vor und nach Kombinationstherapie

Patienten	Vor Therapie CD4-Zahl pro μl , (ARP*in%)	$\geq 24^{**}$ Mo. nach Therapie CD-4-Zahl pro μl , (ARP*in%)	$\geq 72^{***}$ Mo. nach Therapie CD-4-Zahl pro μl , (ARP*in%)	Viruslast vor Therapie (Eq/ml)	Viruslast $\geq 24^{**}$ Mo. nach Therapie (Eq/ml)	Viruslast $\geq 72^{***}$ Mo. nach Therapie (Eq/ml)
L C	1656 (76,6 %)	812 (82,9 %)	812 (118,5%)	425	<50	1744
T K	2016 (140 %)	644 (65,7 %)	828 (141 %)	0	2720	117
A R	1048 (75,9 %)	736 (75,1 %)	420 (71,5 %)	115	<50	<50
M K	620 (44,9 %)	540 (55,1 %)	1323 (225 %)	71000	<50	<50
B K	582 (26,9 %)	648 (66,1 %)	780 (132,8%)	28000	5600	15803
J H	388 (28,1 %)	1023 (121,8 %)	928 (158 %)	14000	<50	78
Y F	126 (9,1 %)	1122 (114,5 %)	894 (152,2 %)	73000	<50	<50
J F	2161 (80,9 %)	1680 (200 %)	1360 (198,5%)	2200	<50	<50
T E	2755 (137,6 %)	1488 (154 %)	1260 (183,9%)	21000	112	<50

* Altersbezogene Prozentzahl (ARP) der peripheren CD4 Zellen im Vergleich zum Blut gesunder

Kinder (Schearer et al, Journal of Allergy and Clinical Immunology Nov. 2003). ** Mittlere

Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate. *** Mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

3.1.1. CD4 Zellzahl

Betrachtet man die CD4 Zellzahl als altersbezogenen Prozentsatz der CD4 Zellen (ARP), so stellt man fest, dass 3 Jahre (mittlere Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate) nach Therapiebeginn bei 7 von 9 Patienten/innen der ARP ansteigt ($p=0,06$). Auch 7 Jahre (mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate) nach Therapiebeginn ist im Vergleich zum ARP vor Therapie der ARP bei 7 von 9 Patienten/innen erhöht ($p=0,002$), (s. Tab. 3).

3.1.2. Die Viruslast

3 Jahre nach Behandlungsbeginn sinkt die Viruslast bei 8 von 9 Patienten/innen, bei 5 von ihnen unter die Nachweisgrenze < 50 Eq/ml. 7 Jahre (mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate) nach Therapiebeginn ist die Viruslast bei 3 Patienten/innen angestiegen, bei 4 Patientinnen unter der Nachweisgrenze < 50 Eq/ml geblieben und bei einer Patientin (T E) unter die Nachweisgrenze gesunken und bei einer weiteren Patientin (T K) von 2720 Eq/ml auf 117 Eq/ml gesunken (s. Tab. 3).

3.1.3. Zwischenzusammenfassung

Der Verlauf der altersbezogenen CD4 Zellzahlen und der Viruslast zeigt, dass es unter der antiretroviralen Therapie zu einer langfristigen Viruslastsuppression und CD4 Zellrekonstitution bei der Mehrzahl der Kinder kommt.

3.2. LTT mit den Mitogenen PHA, OKT3, PWM, SAC

Wir haben die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit den Mitogenen (PHA, OKT3, PWM, SAC) im Lymphozytentransformationstest getestet, um die Rekonstitution der Lymphozyten diesbezüglich zu überprüfen.

3.2.1. LTT mit dem Mitogen PHA

Die Tabelle 4 und die Abbildung 4 stellen LTT Ergebnisse mit dem Mitogen PHA bei den 9 Patientinnen/en dar, die jeweils vor HAART-Beginn, nach ≥ 2 Jahren HAART Therapie (mittlere Beobachtungsdauer 36 ± 20 Jahre) und ≥ 6 Jahren (mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate) nach HAART Therapie gesammelt wurden. In der Messreihe vor HAART-Beginn liegen die LTT Werte zwischen 7600 cpm und 188400 cpm, wobei der Mittelwert 82468 ± 60470 cpm beträgt.

Nach HAART Beginn kommt es zu einem deutlichen jedoch nicht signifikanten Anstieg des Mittelwertes von 82468 cpm auf 108355 ± 52774 cpm ($p = 0,14$). Unter HAART kommt es bei 6 von 8 Kindern zu einem Anstieg der PHA Stimulierbarkeit von Lymphozyten. Im weiteren Verlauf ≥ 6 Jahre nach HAART Beginn liegen die LTT Ergebnisse zwischen 7800 cpm und 98500 cpm, der Mittelwert beträgt 58900 ± 30665 cpm.

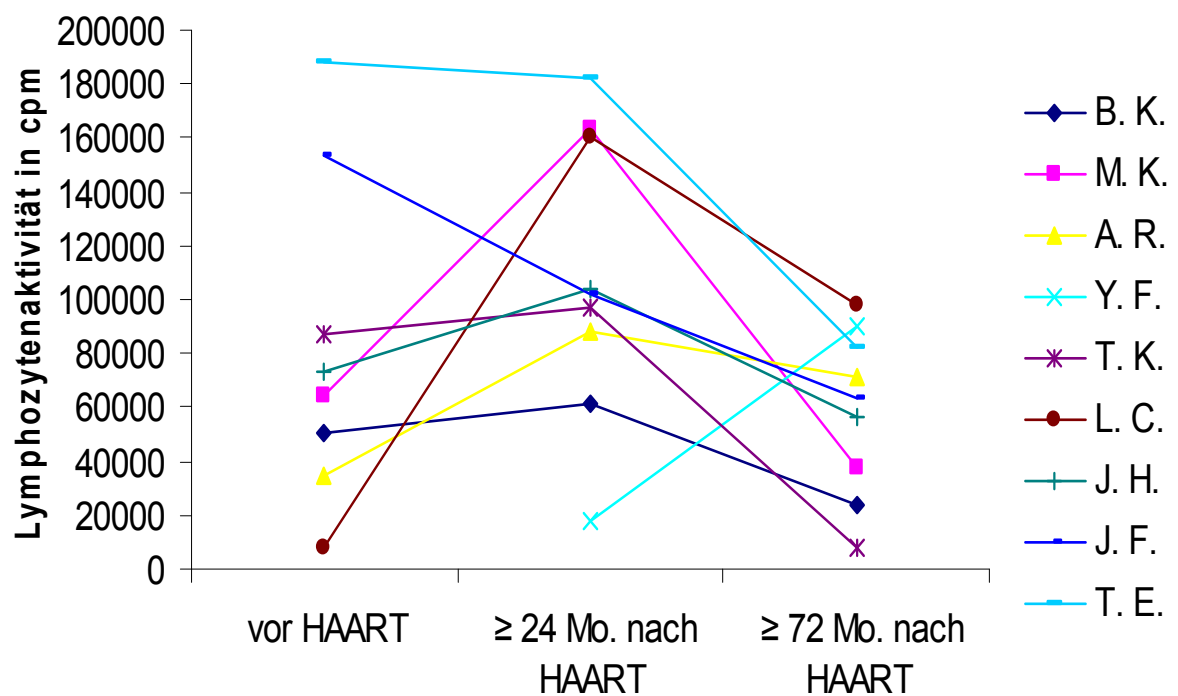
Tabelle 4: LTT mit dem Mitogen PHA vor, ≥ 24 und ≥ 72 Mo. nach Beginn der HAART (n=9)

Patienten	B K	M K	A R	Y F	T K	L C	J H	J F	T E	Mittel- werte
Vorher	50300	64190	35100	n. g.	86900	7600	73660	153600	188400	82468 ± 60470
$\geq 24^*$ Mo.	61300	163500	87800	17400	96800	160300	104200	101800	182100	108355 ± 52774
$\geq 72^{**}$ Mo.	23700	37400	70800	89700	7800	98500	56700	63700	81800	58900 ± 30665

Werte sind dargestellt in cpm (counts per minute). n. g. = nicht gemessen. *Mittlere

Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate. ** Mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

Abb. 4: LTT mit dem Mitogen PHA (n=9)



3.2.2. LTT mit dem Mitogen OKT3

Die Tabelle 5 und die Abbildung 5 stellen LTT Ergebnisse mit dem Mitogen OKT3 bei 9 Patientinnen/en dar. In der Messreihe vor HAART-Beginn liegen die LTT Werte zwischen 8500 cpm und 68800 cpm, wobei der Mittelwert 41213 ± 26356 cpm beträgt. Nach HAART-Beginn kommt es zu einem diskreten Anstieg des Mittelwertes von 41213 cpm auf 45766 ± 31767 cpm ($p = 0,55$). Unter HAART kommt es bei 4 von 8 Kindern zu einem Anstieg der OKT3 Stimulierbarkeit von Lymphozyten. Im weiteren Verlauf ≥ 6 Jahre (mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate) nach HAART-Beginn liegen die LTT Ergebnisse zwischen 24400 cpm und 104700 cpm, der Mittelwert beträgt 60011 ± 24241 cpm.

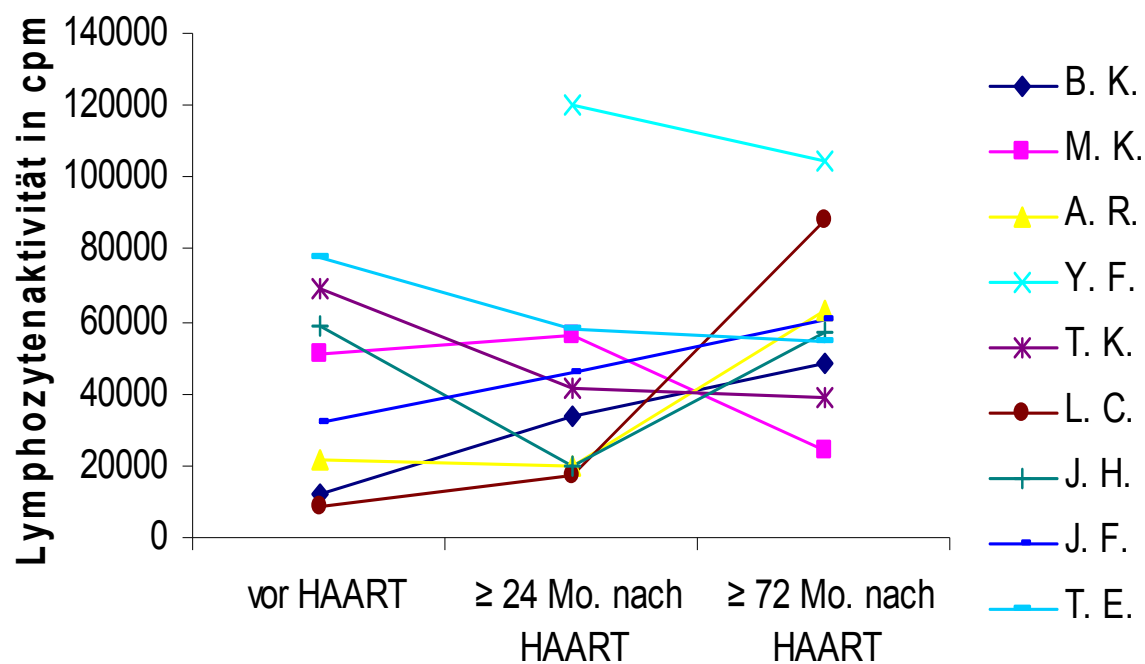
Interessanterweise zeigt nur die Hälfte des Kollektivs eine verbesserte T-Zellstimulierbarkeit. Auch im weiteren Verlauf nach ≥ 72 Monate bessert sich die Stimulierbarkeit nur bei einer Patientin im Vergleich zu der Messung nach ≥ 24 Monaten HAART Therapie.

Tabelle 5: LTT mit dem Mitogen OKT3 vor, ≥ 24 und ≥ 72 Mo. nach Beginn der HAART (n=9)

Patienten	B K	M K	A R	Y F	T K	L C	J H	J F	T E	Mittel- werte
Vorher	12100	51060	21700	n. g.	68800	8500	58450	31600	77500	41213 ± 26356
$\geq 24^*$ Mo.	33300	56200	19800	119800	41500	17500	19700	45800	58300	45766 ± 31767
$\geq 72^{**}$ Mo.	48700	24400	62800	104700	38800	88500	56700	60700	54800	60011 ± 24241

Werte sind dargestellt in cpm (counts per minute). n. g. = nicht gemessen. * Mittlere Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate. ** Mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

Abb. 5 : LTT mit dem Mitogen OKT3 (n=9)



3.2.3. LTT mit dem Mitogen PWM

Die Tabelle 6 und die Abbildung 6 stellen LTT Ergebnisse mit dem Mitogen PWM bei 9 Patientinnen/en dar. In der Messreihe vor HAART-Beginn liegen die LTT Werte zwischen 5000 cpm und 119600 cpm, wobei der Mittelwert 29128 cpm beträgt. Nach HAART Beginn kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Mittelwertes von 29128 ± 37134 cpm auf 48622 ± 38658 cpm ($p = 0,15$).

Im weiteren Verlauf ≥ 72 Monate nach HAART Beginn liegen die LTT Ergebnisse zwischen 2700 cpm und 46700 cpm, der Mittelwert beträgt 27455 ± 16399 cpm. Unter HAART kommt es zunächst zu einer Verbesserung der Lymphozytenstimulierbarkeit mit PWM bei 6 von 9 Kindern. Im weiteren Verlauf der Therapie (zwischen 2 und 6 Jahren nach HAART) nimmt jedoch die Lymphozytenstimulierbarkeit bei 7 von 9 Kindern ab ($p = 0,09$).

Tabelle 6: LTT mit dem Mitogen PWM vor, ≥ 24 und ≥ 72 Mo. nach

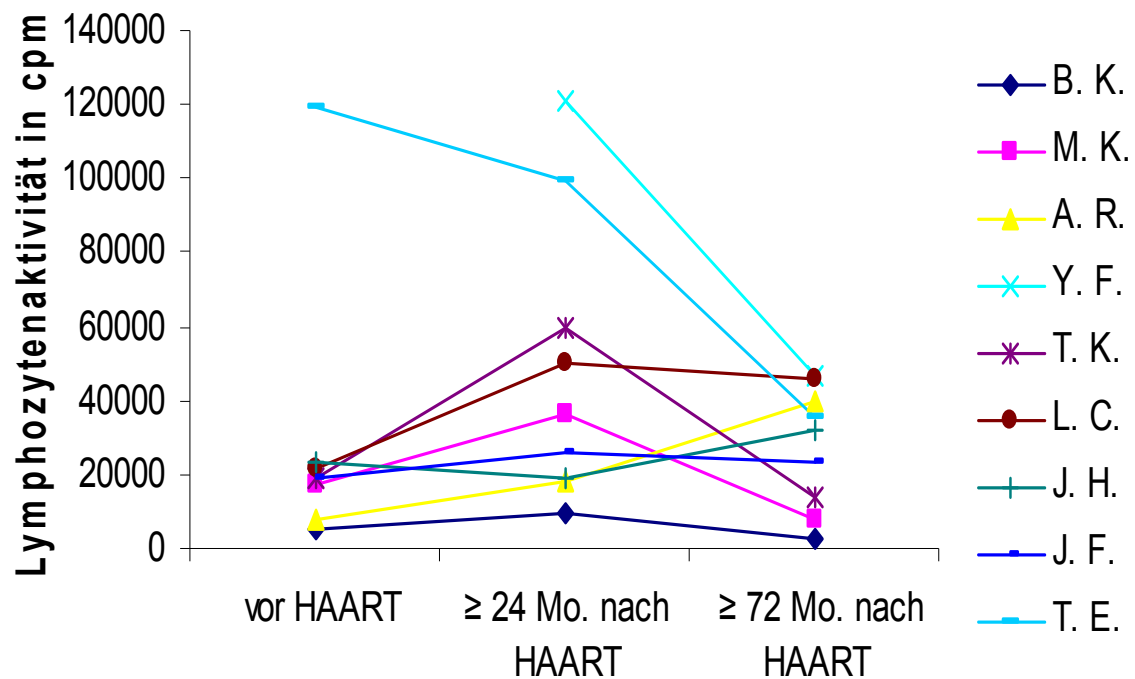
Beginn der HAART (n=9)

Patient	B K	M K	A R	Y F	T K	L C	J H	J F	T E	Mittel- werte
Vorher	5000	17660	7500	n. g.	19400	21300	23170	19400	119600	29128 ± 37134
$\geq 24^*$ Mo.	9100	35900	18300	120900	59200	49900	18800	26100	99400	48622 ± 38658
$\geq 72^{**}$ Mo.	2700	7400	39800	46700	13800	45500	31700	23700	35800	27455 ± 16399

Werte sind dargestellt in cpm (counts per minute). n. g. = nicht gemessen. * Mittlere

Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate. ** Mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

Abb. 6 : LTT mit dem Mitogen PWM (n=9)



3.2.4. LTT mit dem Mitogen SAC

Die Tabelle 7 und die Abbildung 7 stellen LTT Ergebnisse mit SAC bei 9 Patientinnen/en dar. In der Messreihe vor HAART-Beginn liegen die LTT Werte zwischen 300 cpm und 11800 cpm, wobei der Mittelwert 3482 ± 3851 cpm beträgt. Mindestens 2 Jahre nach HAART Beginn kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Mittelwertes von 3482 ± 3851 cpm auf 7366 ± 9076 cpm ($p = 0,26$) Allerdings liegt dies hauptsächlich an 2 Individuen (MK, TE), die einen sehr deutlichen Anstieg zeigen. Bei 6 von 8 Kindern kommt zu einem Anstieg der SAC Stimulierbarkeit von Lymphozyten. Im weiteren Verlauf ca. 7,2 Jahre nach HAART-Beginn liegen die LTT Ergebnisse zwischen 0 cpm und 20700 cpm, der Mittelwert beträgt 7222 ± 6916 cpm.

Tabelle 7: LTT mit dem Mitogen SAC vor, ≥ 24 und ≥ 72 Mo. nach

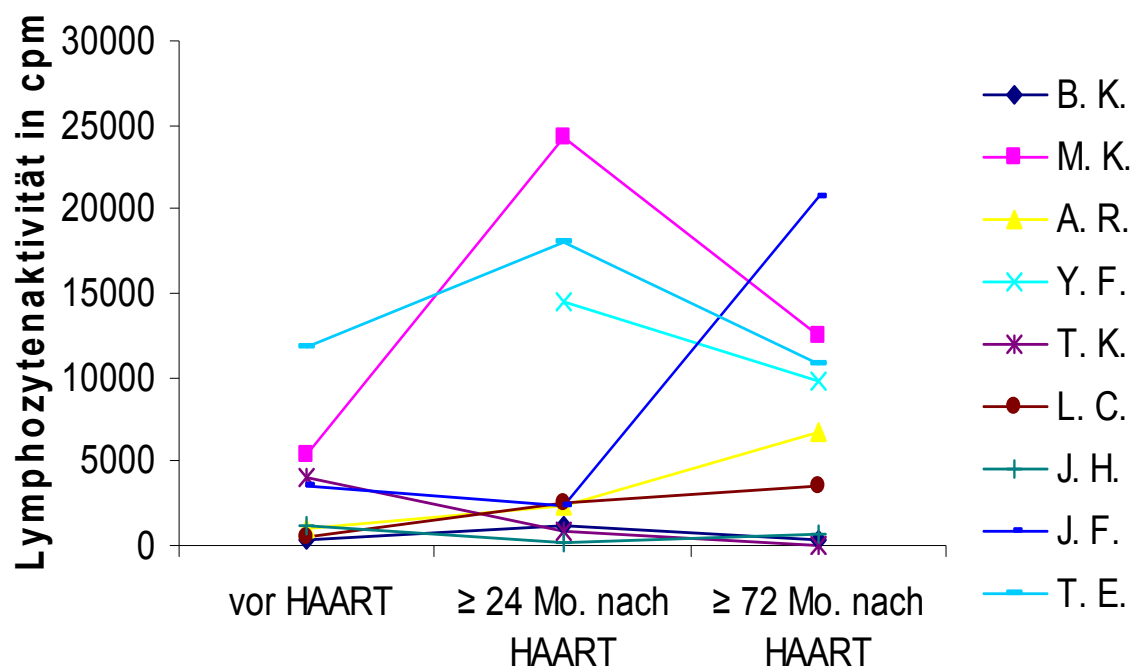
Beginn der HAART (n=9)

Patient	B K	M K	A R	Y F	T K	L C	J H	J F	T E	Mittel- werte
Vorher	300	5400	1000	n. g.	4100	500	1160	3600	11800	3482 ± 3851
$\geq 24^*$ Mo.	1200	24300	2300	14500	900	2500	200	2300	18100	7366 ± 9076
$\geq 72^{**}$ Mo.	400	12400	6800	9700	0	3500	700	20700	10800	7222 ± 6916

Werte sind dargestellt in cpm (counts per minute). n. g. = nicht gemessen. * Mittlere

Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate. ** Mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

Abb. 7 : LTT mit dem Mitogen SAC (n=9)



3.2.5. Zwischenzusammenfassung

Insgesamt zeigen sich erhebliche interindividuelle Schwankungen in der Stimulierbarkeit. Auffallend ist, dass die Stimulierbarkeit der Lymphozyten nach einer mittleren Beobachtungsdauer von 3 Jahren nach Therapiebeginn bei allen vier Mitogenen (PHA, OKT3, PWM, SAC) steigt. Nach einer mittleren Beobachtungsdauer von 7 Jahren nimmt die Stimulierbarkeit für die T-Zellmitogene PWM, PHA und das B-Zellmitogen SAC wieder ab (für PWM stärker als für PHA und SAC) im Vergleich zu der Messung nach 3 Jahren. Nur für das T-Zellmitogen OKT3 steigt die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit zunehmender Therapiedauer. Allerdings erreicht keiner der beobachteten Unterschiede statistische Signifikanz.

3.3.1. LTT mit Tetanus-Toxoid

Neben der Frage der Gesamtstimulierbarkeit der Lymphozyten interessiert uns die spezifische Lymphozytenstimulierbarkeit mit Recall-Antigenen vor HAART Therapie, nach HAART-Beginn und im weiteren Verlauf der Therapie. Dies haben wir in unserer Gruppe für das Impf-Antigen Tetanus-Toxoid untersucht. Die Tabelle 8 stellt die LTT Ergebnisse mit dem spezifischen Antigen Tetanus-Toxoid bei insgesamt 7 Patientinnen/en dar. Die LTTs wurden jeweils vor Beginn der HAART Therapie sowie mindestens 2 Jahre (mittlere Beobachtungsdauer 36 ± 20 Jahre) danach und im weiteren Verlauf der HAART Therapie mit anschließender Tetanus Boosterimpfung gemessen.

Die Ergebnisse der LTT vor Beginn der HAART Therapie liegen zwischen 0 cpm (4 mal) und 100 cpm (3 mal) mit einem Mittelwert von $43 \text{ cpm} \pm 53$. Nach HAART Therapie und erfolgter

Tetanus Boosterung findet sich eine signifikant gesteigerte Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit dem Tetanus-Toxoid ($p = 0,01$), die LTT Ergebnisse liegen zwischen 300 cpm und 29900 cpm mit einem Mittelwert von 13800 cpm ± 10398 , während der Durchschnitt aus der Messreihe vor HAART-Beginn bei 43 cpm lag.

Tabelle 8: LTT mit Tetanus-Toxoid (n=7)

Patienten	L C	T K	A R	M K	B K	J H	J F	Mittelwert
vor HAART	100	0	0	0	100	0	100	43 $\pm$ 53
Nach HAART+ Boosterung*	15100	300	22300	29900	7800	4400	16800	13800 $\pm$ 10398

Werte sind dargestellt in cpm (counts per minute). * Mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

Um auszuschließen, dass die gesteigerte Stimulierbarkeit unspezifisch als Folge der allgemeinen Rekonstitution durch HAART anzusehen ist, wurden die Daten von 3 Kindern analysiert, bei denen vor und nach Boosterung ein LTT durchgeführt wurde (Tabelle 9). Diese LTT wurden nach der HAART Therapie (mindestens 2 Jahre) jedoch vor der Durchführung der Tetanus Boosterung durchgeführt.

Tabelle 9: LTT mit Tetanus-Toxoid (n=3)

Patienten	B K	M K	L C	Mittelwert
vor HAART	100	0	100	67 ±57
vor Boosterung*	400	8500	0	2967 ±4796
nach Boosterung**	7800	29900	15100	17600 ±11260

Werte sind in dargestellt in cpm (counts per minute). * Mittlere Beobachtungsdauer 36±20,2 Monate.

** Mittlere Beobachtungsdauer 84±16 Monate.

Bei allen 3 Patienten zeigt sich, dass eine Tetanus-Toxoid Boosterung der zellulären Immunität möglich ist. Bei einem Patienten (MK) war interessanterweise auch schon vor Boosterung eine tetanustoxoidspezifische zelluläre Immunität nur durch Immunrekonstitution nachweisbar.

3.3.2. Induktion spezifischer Antikörper nach Boosterung

Es wurde untersucht, wie die Produktion spezifischer Antikörper eines HIV positiven Kindes auf Impfung mit Antigenen (hier das Tetanus-Toxoid) ist. Die Tabelle 10 enthält die Tetanus-Antikörpertiter vor Therapiebeginn, mindestens 2 Jahre nach HAART Beginn (Ohne Boosterung), weitere 6 Jahre später 6 bis 8 Wochen nach einer Tetanus-Boosterimpfung. Dabei kann man sehen, dass es 3 Jahre nach HAART-Beginn bei 5 Kindern auch ohne Boosterung und nur durch Immunrekonstitution zu einem Anstieg von Impftitern kommt (0,25

$\pm 0,3$; $0,67 \pm 0,9$; $p = 0,07$). Nach der Boosterung kommt es zu einem weiteren signifikanten Anstieg der Impftiter bei 8 Kindern ($3,3 \pm 1,8$; $p = 0,05$) im Vergleich zu den ersten beiden Messungen.

Tabelle 10: Tetanus-Antikörper Spiegel (in IE/ml)

Patienten	L C	T K	A R	M K	B K	J H	Y F	T E	J F	Mittelwerte
vor HAART	0,1	0,03	0,5	0,1	1	0,1	0,1	0,1	n. g.	$0,25 \pm 0,3$
nach HAART*	2,8	0,1	0,1	0,77	n. g.	0,4	0,1	1	0,1	$0,67 \pm 0,9$
nach Boosterung**	1,7	0,8	0,7	5	3,7	5	2,4	5	5	$3,3 \pm 1,8$

n. g. = nicht gemessen. * Mittlere Beobachtungsdauer $36 \pm 20,2$ Monate. ** Mittlere

Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate.

Die Tabelle 11 stellt den Impfschutz zu den oben genannten Zeitpunkten dar. Vor HAART wurde bei 1 von 8 Kindern nach der Grundimmunisierung mit Tetanus kein ausreichender Impfschutz erreicht. 6 von 8 Kindern wiesen noch ausreichenden Impfschutz (Auffrischung erforderlich) und nur bei 1 von 8 Kindern wurde ein sicherer Impfschutz als Antikörpertiter im Serum gemessen. Bei einer Patientin (J F) fehlt die Messung vor Beginn der HAART. 3 Jahre nach Beginn der Therapie kommt es bei 4 Kindern zu einer Verbesserung des Impfschutzes allein durch die Immunrekonstitution, wovon 3 eine sichere Immunität (Auffrischung nach 3-5 Jahren) und eines Impfschutz (Auffrischung erforderlich) erreichen. Nach einer Boosterimpfung erreichen alle Kinder eine sichere Immunität.

Tabelle 11: Impfschutz der Patienten/innen

Patienten	L C	T K	A R	M K	B K	J H	Y F	T E	J F
Vor HAART	+	-	+	+	++	+	+	+	n. g.
Nach HAART*	++	+	+	++	n. g.	+	+	++	+
Nach Boosterung**	++	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++

n. g. = nicht gemessen. * Mittlere Beobachtungsdauer 36±20,2 Monate. ** Mittlere Beobachtungsdauer 84±16 Monate.

Impfschutz und Antikörperspiegel

- = < 0,1 IE/ml : Grundimmunisierung erforderlich

+ = 0,1-0,5 IE/ml : Impfschutz z. Zt. Noch vorhanden (Auffrischung erforderlich)

++ = 0,5-5 IE/ml : sichere Immunität (Auffrischung nach 3-5 Jahren)

+++ = > 5 IE/ml : sichere Immunität (Auffrischung nach 8-10 Jahren)

3.3.3. Zwischenzusammenfassung

Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit dem spezifischen Recall-Antigen (Tetanus-Toxoid) nimmt nach Boosterung und HAART Therapie bei 7 von 7 Kindern deutlich zu. Die Induktion von Tetanus-Antikörpern nach Boosterimpfung mit Tetanus ist deutlich zu sehen. Bereits ohne Boosterung mit Tetanus kommt es bei 4 von 7 Kindern zu einer Impfschutzverbesserung und eine weitere Steigerung des Impfschutzes ist bei 7 von 8 Kindern zu sehen. Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit dem spezifischen Recall-Antigen (Tetanus-Toxoid) nimmt nach Boosterung und HAART Therapie bei 7 von 7 Kindern deutlich zu. Alle Kinder haben unter Boosterung einen sicheren Impfschutz erreicht.

4. Diskussion

Immunität beschreibt die Eigenschaft des Organismus, Schutz vor Infektionserkrankungen zu gewährleisten. Der Mensch verfügt über natürliche unspezifische und erworbene spezifische Abwehrmechanismen. Wegen der Unfähigkeit, eine immunologische Gedächtnisantwort aufzubauen, bietet die natürliche unspezifische Abwehr keine Ansatzmöglichkeiten für eine Immunisierung durch Impfung. Die spezifische Immunantwort wird durch B-Lymphozyten und Antikörper (humoral) sowie durch T-Lymphozyten (zellulär) vermittelt. Die bedeutendste Eigenschaft der spezifischen Immunität liegt darin, nach der ersten Auseinandersetzung mit dem Pathogen eine immunologische Gedächtnisantwort auszubilden, um bei erneutem Antigenkontakt sofort spezifisch reagieren zu können. Das immunologische Gedächtnis ist die Grundlage von Infektionsschutz durch erworbene Immunität und stellt die Voraussetzung für die Infektionsprävention durch Impfungen dar. Um einen Krankheitserreger erkennen zu können, müssen die Zellen des spezifischen Immunsystems zwischen körpereigenen Strukturen und körperfremden Substanzen, den so genannten Fremdanthogenen (z.B. Bakterien oder Viren), unterscheiden. B- oder T-Lymphozyten besitzen dafür spezifische Rezeptormoleküle. Die Rezeptoren der B-Zellen sind die auf der Zelloberfläche exprimierten Antikörpermoleküle. B-Zellen erkennen das Antigen als komplexe dreidimensionale Strukturen. Die aktivierte B-Zelle differenziert zu einer IgM-produzierenden Plasmazelle (Primärantwort). Um eine suffiziente humorale Antwort und einen dauerhaften Schutz zu gewährleisten, ist die Umschaltung der Antikörperproduktion auf IgG (Isotypen-Switch) und die Entwicklung von B-Gedächtniszellen erforderlich. Diese wichtigen Entwicklungsschritte werden durch T-Helferzellen kontrolliert.

Bei der HIV-Erkrankung wird das T-zelluläre Immunsystem beschädigt, wobei die T-Helfer-Zellen (CD4-Zellen) besonders betroffen sind. Unter HAART wird bei Kindern und Jugendlichen eine Immunrekonstitution des T-zellulären Immunsystems erreicht (Niehues 2001). Eine Arbeit von Autran et al. zeigt, dass die konsequente HAART Therapie unabhängig von Infektionsstadium zu einer numerischen Rekonstitution der CD4 Zellzahl führt (Autran 1999). Die durch HAART induzierte Rekonstitution des Immunsystems bei HIV positiven Kindern scheint durch abnehmende Aktivierung des Immunsystems und die T-Zellrekonstitution verursacht zu sein (Resino 2004). Über die rein numerische Rekonstitution hinaus stellt sich die Frage nach einer Rekonstitution der spezifischen Immunität. Es ist unklar, ob die spezifische Immunität gerade bei Kindern wieder hergestellt werden kann und inwieweit über die rein numerische quantitative Rekonstitution der CD4-Zellzahl hinaus eine qualitative Rekonstitution in Bezug auf die Erkennung von Recall-Impfantigenen (z. B. Tetanus-Toxoid) und auf die Gesamtstimulierbarkeit der Lymphozyten (mit Mitogenen) erfolgt. Außerdem interessiert uns, ob bei HIV infizierten Kindern mit T-zellulärer Rekonstitution eine Induktion spezifischer Antikörper gegen Tetanus möglich ist. Ein Test für die spezifische Immunität sind Impfungen. Jedoch besteht Skepsis gegenüber Impfungen bei HIV positiven Kindern, vor allem Lebendimpfungen, da die Kinder aufgrund des HIV induzierten Immundefektes nicht adäquat auf Impfung reagieren können oder sogar durch Lebendimpfstoffe gefährdet werden könnten.

Folgende Eigenschaften unserer Untersuchungsgruppe schränken die Aussagekraft unserer Studie ein: Die Gruppe ist heterogen bezüglich Geschlecht und Alter der Patienten. Darüber hinaus ist die Gesamtzahl der Patienten mit n=9 relativ klein. Zu den Vorteilen unserer Untersuchungsgruppe zählt, dass die Patienten mit einer einheitlichen Strategie bei der antiretroviralen Kombinationstherapie behandelt wurden und eine deutliche Reduktion der Viruslast sowie signifikante Immunrekonstitution erreicht wurde. Neben der numerischen und funktionellen Rekonstitution der Lymphozyten wird bei den Patienten die spezifische

Immunität auf Tetanus-Toxoid verfolgt und es liegen LTT-Tests zu verschiedenen Zeiten des Immunstatus vor.

Die erste Frage dieser Arbeit ist, ob es überhaupt unter HAART zu einer langfristigen Viruslastsuppression kommt und wie die numerische Immunrekonstitution bezüglich der altersbezogenen CD4 Zellzahlen sein wird? Hierzu weist unsere Untersuchung mit mindestens 72 Monaten eine sehr lange Beobachtungsdauer HIV infizierter Kinder unter HAART auf. Die altersbezogene CD4 Zellzahl konnte bei 8 von 9 Kindern im Verlauf der Therapie gesteigert werden und lag nach 72 Monaten Therapiedauer im Normbereich >100%. Auch die Viruslast blieb bei vier Kindern supprimiert, bei weiteren zwei konnte sie massiv gesenkt werden und bei 3 Kindern ist sie leicht gestiegen.

Die zweite Frage unserer Arbeit war, wie die funktionelle Rekonstitution der Lymphozyten in Bezug auf ihre Gesamtstimulierbarkeit im Lymphozytentransformationstest (LTT) und insbesondere in Bezug auf das Recall-Antigen Tetanus-Toxoid ist? Was die Stimulierbarkeit der Lymphozyten betrifft, so stellten wir fest, dass zwar die Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch die Mitogene PHA, OKT3, PWM und SAC nach mindestens zweijähriger HAART Therapie im Trend deutlich höher liegt als vor Beginn der HAART Therapie, jedoch im weiteren Verlauf trotz HAART Therapie und Immunrekonstitution abnimmt. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit dem Recall-Antigen Tetanus-Toxoid nach durchschnittlicher 7 jähriger Therapie und Tetanus-Boosterung signifikant gesteigert war ($p=0,01$). Wir haben zum Ausschluss größerer Schwankungen Tageskontrollen mitgeführt, dennoch können LTT-Werte tagesabhängige Schwankungen zeigen. Inwieweit das Alter der Kinder einen Einfluss auf die Gesamtstimulierbarkeit der Lymphozyten hat, können wir aus dieser Untersuchung nicht abschätzen, da uns keine systematisch erhobene altersangepaßte Kontrolldaten vorliegen.

Die dritte Frage unserer Arbeit war, ob eine Rekonstitution des B-Zellkompartments in Bezug auf die Erkennung von Recall-Antigenen erfolgt, das heißt, sind auch ohne Boosterung spezifische Antikörper nachweisbar? Hierbei konnten wir zeigen, dass bei 5 von 7 Kindern nach 3 jähriger HAART ohne Boosterung zu einem Anstieg des Tetanus-Impftiters kam. Zusätzlich war bei drei Patienten eine stufenweise Besserung der Stimulierbarkeit mit Tetanus-Toxoid vor HAART Beginn, mindestens zwei Jahre nach erfolgter HAART Therapie und nach Boosterung zu beobachten. So liegt hier insgesamt ein Hinweis dafür vor, dass nach konsequenter HAART Therapie die Lymphozyten durch Impfantigene in vitro (hier Tetanustoxoid) spezifisch zur Proliferation stimuliert werden. In wieweit damit auch Effektorfunktionen durch die Stimulation mit Tetanustoxoid induziert werden, war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die letzte Frage unserer Arbeit war, ob bei HIV infizierten Kindern mit schlechtem Impfschutz (Auffrischung gemäß aktuellem Impftiter erforderlich) durch eine Booster-Impfung eine Induktion spezifischer Antikörper gegen Tetanus und somit eine weitere Steigerung der Impftiter und damit Verbesserung des Impfschutzes möglich ist? Bei allen 9 Kindern konnte nach der Booster-Impfung mit Tetanus-Toxoid der Status der sicheren Immunität erreicht werden.

Wir haben in unserer Untersuchung gezeigt, dass eine Induktion spezifischer Antikörper gegen ein Recall-Antigen (hier Tetanus-Antikörper) nach einer Boosterimpfung bei HIV infizierten Kindern mit vertikalem Infektionsmodus, langjähriger HAART Therapie und erreichter Immunrekonstitution sehr gut möglich ist. Bei allen neun Patienten unserer Untersuchungsgruppe konnte nach einer Tetanus Boosterimpfung 6 Wochen später ein ausreichender Impfschutz nachgewiesen werden (Mindest-Titer 0,1 IE/ml, s. Tab. 11).

Rosenblatt hat bei 37 HIV infizierten Kindern, die bei der Grundimmunisierung mit DTaP keinen ausreichenden Tetanus-Antikörpertiter erreicht hatten, 16 und 18 Wochen nach HAART Beginn eine Boosterimpfung mit Tetanustoxoid durchgeführt (Rosenblatt 2005). 4 bis 8 Wochen nach der Boosterung stellte Rosenblatt einen Titeranstieg um das 27 fache des Basistiters fest. In weiteren Kontrollen 18 und 32 Wochen nach Boosterung fiel eine Abnahme des Antikörpertiters auf das 3 bis 9 fache des Basistiters auf. Wir haben in unserer Untersuchung keine Tendenz zur Senkung des Tetanusantikörpertiters nach der Grundimmunisierung mit Tetanustoxoid im weiteren Verlauf nach durchschnittlich 3 Jahren festgestellt. Nach 3 Jahren HAART in unserer Untersuchungsgruppe ist ein Anstieg des Basistiters ohne Boosterung bei 3 Kindern (L C, M K, T E) in den Bereich der sicheren Immunität (s. Tab. 11) und bei einem Kind (T K) in den Bereich des temporären Impfschutzes (s. Tab. 11) zu beobachten. Am ehesten hängt diese Beobachtung mit der längeren Dauer der antiretroviralen Therapie und der damit verbundenen effektiveren Immunrekonstitution in unserer Gruppe im Vergleich zu den Daten von Rosenblatt zusammen. In unserer Untersuchungsgruppe wurde ein Tetanustiteranstieg bis maximal um das 50 fache 6 Wochen nach der Boosterung gemessen.

Ching untersuchte 15 HIV1 infizierte Kinder, die mindestens zwie Jahre lang eine HAART erhalten hatten, in Bezug auf humorale und zelluläre Immunität nach Boosterung mit Tetanus-Toxoid. Sie stellte fest, dass durchschnittlich 2,4 Monate nach Boosterung lediglich 92 % der Patienten einen Tetanusimpfschutz entwickelt hatten, wobei dieser nach durchschnittlich 11,8 Monaten nur noch bei 83 % der Patienten vorhanden war. In unserer Untersuchungsgruppe zeigten alle Kinder einen Anstieg des Tetanus-Antikörperspiegels nach Boosterung ($p = 0,05$). Eine zweite Kontrolle des Impftiters nach Boosterung erfolgte in unserer Gruppe nicht. Allerdings zeigte sich ein Anstieg des Impftiters bei fünf Kindern allein nach drei Jahren HAART. Ching stellte außerdem eine mäßige Stimulierbarkeit der Lymphozyten mittels Tetanus-Toxoid nach erfolgter Boosterung fest. In unserer

Untersuchung zeigte sich nach Tetanus-Boosterung eine gesteigerte Stimulierbarkeit bei allen Patienten ($p = 0,01$). Als Ursache dieser Unterschiede ist die effektivere Immunrekonstitution unserer Patientengruppe anzusehen.

Weinberg zeigte bei der Hepatitis-A-Impfung bei HIV infizierten Kindern mit Immunrekonstitution unter HAART, dass die Kinder auf eine dritte Impfung ohne Impfkomplicationen mit gesteigerter Immunantwort reagiert haben (Weinberg 2006). Auch wir haben in unserer Untersuchungsgruppe bei 8 von 9 Kindern eine Steigerung des Antikörpertiters durch eine Boosterung erzielt. Daraus kann man schließen, dass eine wiederholte Impfung bzw. Boosterimpfung mit toten Impfstoffen zu verbesserten Impftitern führt, ohne dass die Rate von Impfkomplicationen erhöht ist. Es ist allerdings nicht bekannt, wie die Kinetik der Impftiter nach Boosterung verläuft. Möglicherweise fallen die Titer bei HIV infizierten Kindern schneller wieder ab. Systematische Untersuchungen hierzu fehlen. Dass der Status der Immunrekonstitution als Basis für eine Immunisierung mit Tot-Impfstoffen auch bei Erwachsenen wichtig ist, belegt folgende Untersuchung. Pasricha zeigte, dass die Impfantwort auf Hepatitis B Impfung bei HIV Patienten mit $CD4 \text{ Zellzahl} > 200 / \text{mm}^3$ um ca. 20 fache höher lag als bei Patienten mit $CD4 \text{ Zellzahl} < 200 / \text{mm}^3$, wobei beide Gruppen eine schwächere Impfantwort im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe zeigten (Pasricha 2006).

Es stellt sich die Frage, ob HIV infizierten Kindern unter HAART auch Lebendimpfstoffe gegeben werden können. Die MMR Impfung (Lebendimpfung) ist laut STIKO Empfehlung bei asymptomatischen (klinisches Stadium N) HIV positiven Kindern indiziert (STIKO 2006). Für Kinder in schlechteren klinischen Stadien als Stadium N ist die MMR Impfung laut STIKO kontraindiziert. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die spezifische Immunantwort gegen Lebendimpfstoffe unter T-zellulärer Immunrekonstitution durch HAART Therapie und supprimierte Viruslast weitgehend erhalten bleibt. Eine Untersuchung von Lima zur

Rötelnimmunisierung bei 15 HIV positiven Kindern im Alter von 15 Monaten hat gezeigt, dass die spezifische Immunantwort der Kinder auf die Rötelnimpfung vom immunologischen Stadium der Infektion abhängig war: abnehmende Immunantwort im fortgeschrittenen Infektionsstadium (Lima 2004). Dies deutet daraufhin, dass auch Lebendimpfstoffe bei HIV positiven Kindern mit einer guten T-zellulären Rekonstitution und einer konsequenten Viruslastsupprimierung eine effektive spezifische Immunantwort induzieren können. Berkelhamer verglich die Impfantwort einer Masern-Boosterimpfung zwischen 14 HIV positiven Kindern mit HAART (Therapiedauer 4-21 Monate) und 14 Kindern ohne HAART (Berkelhamer 2001). Die Patienten mit HAART zeigten eine deutlich bessere Impfantwort auf die Masern-Boosterimpfung als die Kinder ohne HAART. Levin untersuchte die Varizellenimpfung bei 41 HIV infizierten Kindern (mittleres Alter 4,5 Jahre), die asymptomatisch oder im klinischen Stadium A waren (Levin 2001). Dabei hatten 60 % der Kinder (n=41) nach zweimaliger Impfung Anti-Varizellen Antikörper im Serum und 83 % hatten eine positive Antwort im LTT mit Varizellen-Antigen. Hierbei konnte er feststellen, dass die Wiederholung der Impfung zu einer Verbesserung der Impfantwort führte. Impfreaktionen, wie Fieber oder lokale Reaktion waren ähnlich häufig, wie in der Gruppe der gesunden Kinder.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse zu Impfungen bei HIV infizierten Kindern unter HAART:

1. Eine langfristige numerische CD4 Rekonstitution und Viruslastsuppression 7 Jahre (mittlere Beobachtungsdauer 84 ± 16 Monate) nach Therapiebeginn sind möglich.
2. Funktionell bleibt die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit Mitogenen über diesen Zeitraum weitgehend erhalten.
3. Schon allein durch die Immunrekonstitution wird eine Verbesserung der Immunität am Beispiel von Tetanus-Toxoid erreicht. So kommt es bei 5 von 7 Kindern zu einem Anstieg des Antikörpertiters ohne Boosterung unter HAART. Eine Erkennung von

Tetanus-Toxoid als Recall-Antigen in vitro war bei 8 von 9 Kindern im LTT möglich.
Durch Boosterung erreichen alle 9 Kinder eine sichere Immunität.

Zu Beginn unserer Analyse (2002) waren laut STIKO inaktivierte Impfstoffe und Toxoide für HIV Infektion in jedem Stadium empfohlen. Die MMR Lebendimpfung wurde nur für Infektion im Stadium N empfohlen. Die Varizellenimpfung wurde für Stadium N als möglich bei altersentsprechender CD4 Zellzahl mit einem Anteil der CD4 Zellzahl an den Gesamtlymphozyten $\geq 25\%$ und für alle andere Stadien (A-C) als nicht empfohlen erklärt. In den STIKO Empfehlungen vom Juli 2006 gibt es keine weiteren Änderungen zu den oben genannten Empfehlungen. Aufgrund der hier vorliegenden und anderer Untersuchungen ist zu klären, welche HIV positive Kinder, die eine ausreichende Immunrekonstitution erreicht haben, auch im Spätstadium mit Lebendimpfstoffen vor potentiell gefährlichen Infektionen geschützt werden können. Zweitens ist systematisch zu untersuchen, wie nachhaltig der Impfschutz ist, das heißt, ob bei HIV infizierten Kindern der Impfschutz schneller verloren geht als bei gesunden Kindern. Die STIKO empfiehlt die Varizellen Impfung abhängig von CD4 Zellzahlen in unterschiedlichen Altersklassen (Epidemiologisches Bulletin 2005 / 2006). Gemäß aktueller Impfempfehlungen der STIKO dürften die Kinder unserer Untersuchungsgruppe Lebendimpfungen nicht erhalten, da sie alle im schlechteren klinischen Stadium als Stadium N sind.

Tabelle 12: Synopsis der Arbeiten zu Schutzimpfungen mit Tot- und Lebendimpfstoffen bei HIV infizierten Kindern unter HAART

Autor und Journal	N	Studienaufbau	Fragestellung	Ergebnisse
Ching 2007	N = 15	prospektiv nicht kontrolliert	Wie ist die zelluläre und humorale Immunantwort auf Tetanus-Boosterung in HIV1 infizierten Kindern und Erwachsenen?	1. HIV1 infizierte Kinder und Erwachsene hatten eine mäßige LTT Antwort nach Tetanus-Boosterung. 2. Durchschnittl. 2,4 Mo. nach Tetanus-Boosterung hatten 92% einen Tetanusimpfschutz. Nach durchschnittl. 11,8 Mo. hatten noch 83% Impfschutz.
Weinberg 2006	n = 235	prospektiv, nicht kontrolliert	Wie ist die Sicherheit und Immunogenität einer HAV Totimpfung gefolgt von einer Boosterungsdosis?	1. HAV Impfung zeigte keine Nebenwirkungen. 2. Impftiter ist besser, wenn HIV-RNA nicht messbar ist. 3. Die Standardimpfung mit 2 Dosen generierte niedrigere Antikörpertiter als 3 Impfdosen.
Rosenblatt 2005	n = 37	prospektiv, nicht kontrolliert	Wie ist die Fähigkeit auf DTP Boosterung mit einem Recall-Antigen (Tetanus) einen Impftiter zu entwickeln?	1. Anstieg des Impftiters für Tetanus 4 bis 8 Wo. nach Boosterung. 2. Deutliche Abnahme des Impftiters nach 18 bis 32 Wo. 3. Eine DtaP Impfung hatte keinen negativen Effekt auf Viruslast oder CD4-Zahl.
Berkelhamer 2001	n = 14 HAART n = 14 Kontrolle	prospektiv, kontrolliert	Welchen Effekt hat HAART auf die Impftiterentwicklung durch Masern Lebend-Boosterimpfung?	HAART und die damit einhergehende Immunrekonstitution verbessern die Antwort auf eine Masern Boosterimpfung.
Lima 2004	n = 15 HAART n = 20 serorevertiert n = 18 Kontrolle	prospektiv, kontrolliert	Röteln Immunisierung von HIV positiven Kindern unter HAART mit Röteln Lebendimpfstoffen im Vergleich zu serorevertierten und gesunden Kindern	1. HIV positive Kinder im immunologischen Stadium 2 oder 3 hatten einen niedrigeren Impftiter (Mittelwert 33 IU/ml) als die Gruppe nach Seroreversion (Mittelwert 236 IU/ml) und die gesunde Kontrollgruppe (Mittelwert 125 IU/ml). 2. Der Ak-Spiegel war positiv mit der CD4 Zellzahl und negativ mit der Viruslast assoziiert.
Levin 2001	n = 41	prospektiv, nicht kontrolliert	Immunisierung mit Varizella Lebendimpfung	2 Monate nach der Varizellenimpfung hatten ca. 60 % der Kinder Ak gebildet und bei 83 % war der LTT mit Varizellenantigen positiv.

5. Zusammenfassung

Es ist unklar, ob unter einer mehrjährigen Langzeittherapie mit HAART bei vertikal HIV infizierten Kindern die spezifische Immunität gegenüber Impf-Antigenen vollständig wiederhergestellt wird. Wir untersuchten die langfristige Immunrekonstitution unter HAART, die funktionelle Rekonstitution der Lymphozyten in Bezug auf ihre Gesamtstimulierbarkeit und Stimulation mit Tetanustoxoid und die Rekonstitution des Impfschutzes für Tetanus anhand spezifischer Antikörper und Tetanus Boosterimpfung. Methoden: 8 vertikal mit HIV infizierte Kinder hatten im Alter von 6 bis 12 Monaten und 1 Kind (T K) mit 5 Jahren eine Grundimmunisierung mit DT erhalten. Durchschnittlich 1 Jahr nach der Grundimmunisierung wurde mit antiretroviraler Therapie begonnen. 7 Jahre nach HAART und erreichter Immunrekonstitution erfolgte eine Tetanus-Boosterimpfung. VL, CD4 Zellzahl, Tetanus AK sowie LTT wurden vor Therapiebeginn, 3 Jahre nach Therapiebeginn und 7 Jahre nach Therapiebeginn gemessen. Resultate: 7 Jahre nach Therapiebeginn kam es zur langfristigen VL Suppression und CD4 Zellzahlrekonstitution. 3 Jahre nach Therapiebeginn zeigte sich bereits ein Anstieg in der Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit PHA, OKT3, PWM und SAC. Nach 7 Jahren fiel die Stimulierbarkeit für PWM, PHA und SAC ab, während sie für OKT3 kontinuierlich anstieg. Allerdings blieben diese Unterschiede ohne statistische Signifikanz. Bereits ohne Boosterung mit Tetanustoxoid kam es bei 4 von 7 Kindern zur Impfschutzverbesserung. Nach Boosterung erreichten alle Kinder einen sicheren Impfschutz. Schlussfolgerung: Über 7 Jahre Viruslastsuppression und numerische CD4 Rekonstitution sind unter HAART möglich. Über diesen Zeitraum bleibt die Stimulierbarkeit der Lymphozyten erhalten. Allein durch die Immunrekonstitution kommt es zur Wiederherstellung des Impfschutzes bei bereits erfolgter Grundimmunisierung. Die Boosterung führt zur signifikanten Steigerung der Produktion von spezifischen Antikörpern und tetanustoxoidspezifischer Proliferation von Lymphozyten. Diese Arbeit zeigt, dass Kinder unter langjähriger HAART zur Induktion spezifischer humoraler und zellulärer Immunität gegen Recall-Antigen (Tetanus-Toxoid) fähig sind.

6. Literatur

1. Autran B. Effects of antiretroviral therapy on immune reconstitution. *Antivir Ther.* 1999;4 Suppl 3:3-6. Review.
2. Berkelhamer S, Borock E, Elsen C, Englund J, Johnson D. Effect of highly active antiretroviral therapy on the serological response to additional measles vaccinations in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Infect Dis.* 2001 1;32:1090-4. Epub 2001.
3. Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* 1986. 18-31;324 : 691-5.
4. Chearskul P, Chokephaibulkit K, Chearskul S, Phongsamart W, Plipat N, Lapphra K, Vanprapar N. Effect of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected children. *J Med Assoc Thai.* 2005;88 Suppl 8:S221-31.
5. Ching N, Deville JG, Nielsen KA, Ank B, Wei LS, Sim MS, Wolinsky SM, Bryson YJ. Cellular and humoral immune responses to a tetanus toxoid booster in perinatally HIV-1-infected children and adolescents receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *Eur J Pediatr* (2007) 166:51-56.
6. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, Kornegay J, Jackson B, Moya J, Hanson C, Zorrilla C, Lew JF. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission study Group. *N Engl J Med.* 1999 5;341:394-402.
7. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, Lutalo T, Li X, vanCott T, Quinn TC; Rakai Project Team. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet.* 2001 14;357:1149-53.
8. Greten H, Gotthard S. *Innere Medizin* 2002. Buch 11. Aufl. Thieme Verlag. S. 1039.
9. Grosch-Wörner I, Schäfer A, Obladen M, Maier RF, Seel K, Feiterna-Sperling C, Weigel R. An effective and safe protocol involving zidovudine and caesarean section to reduce vertical transmission of HIV-1 infection. *AIDS.* 2000 22;14:2903-11.
10. Grosch-Wörner I, Belohradsky BH, Debatin KM, Enenkel-Stoodt S, Hoger P, Landwehr-Dobberstein C, Wahn V, Wintergerst U. Zwischenergebnisse einer multizentrischen Studie zur

- Langzeitbetreuung HIV-exponierter und infizierter Kinder. Monatsschr. Kinderheilkd. 1993 ;141:227-36.
11. Henderson DK, Fahey BJ, Willy M, Schmitt JM, Carey K, Koziol DE, Lane HC, Fedio J, Saah AJ. Risk for occupational transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) associated with clinical exposures. A prospective evaluation. Ann Intern Med. 1990 15;113:740-6.
 12. Hereold, Gerd und Mitarbeiter. Innere Medizin 2007, S. 802
 13. Kroon FP, van Tol MJ, Jol-van der Zijde CM, van Furth R, van Dissel JT. Immunoglobulin G (IgG) subclass distribution and IgG1 avidity of antibodies in human immunodeficiency virus-infected individuals after revaccination with tetanus toxoid. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 ;6:352-5.
 14. Levin MJ, Gershon AA, Weinberg A, Blanchard S, Nowak B, Palumbo P, Chan CY; AIDS Clinical Trials Group 265 Team. Immunization of HIV-infected children with varicella vaccine. J Pediatr. 2001 ;139:305-10.
 15. Lima M, De Menezes Succi RC, Nunes Dos Santos AM, Weckx LY, De Moraes-Pinto MI. Rubella immunization in human immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies. Pediatr Infect Dis J. 2004 ;23:604-7.
 16. Mannhardt-Laakmann W, Habermehl P, Knuf M, Schaaf F, Zepp F, Ehl S. Impfungen bei Immundefizienz. Kinderärztliche Praxis 2004 Nr. 4.
 17. Mofenson LM, Lambert JS, Stiehler ER, Bethel J, Meyer WA 3rd, Whitehouse J, Moye J Jr, Reichelderfer P, Harris DR, Fowler MG, Mathieson BJ, Nemo GJ. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. N Engl J Med. 1999 5;341:385-93.
 18. Mofenson LM. Interaction between timing of perinatal human immunodeficiency virus infection and the design of preventive and therapeutic interventions. Acta Paediatr Suppl. 1997 ;421:1-9.
 19. Niehues T. HIV Infektion im Kindesalter. T-Zellrekonstruktion nach antiretroviraler Therapie. Habilitationsschrift. Pabst Verlag, 2001 S. 12 und 48.
 20. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 1960 ;20:462-6.

21. Pasricha N, Datta U, Chawla Y, Singh S, Arora SK, Sud A, Minz RW, Saikia B, Singh H, James I, Sehgal S. Immune responses in patients with HIV infection after vaccination with recombinant Hepatitis B virus vaccine. *BMC Infect Dis.* 2006 30;6:65.
22. Principi N, Marchisio P, Tornaghi R, Massironi E, Onorato J, Picco P, Libretti C. Occurrence of infections in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J.* 1991 ;10:190-3.
23. Resino S, Resino R, et al. Clinical outcomes improve with highly active antiretroviral Therapy in vertically HIV type-1-infected children. *Clin Infect Dis.* 2006 15;43:243-52.
24. Resino S, Galan I, Perez A, Leon JA, Seoane E, Gurbindo D, Munoz-Fernandez MA. HIV-infected children with moderate/severe immune-suppression: changes in the immune system after highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol.* 2004 ;137:570-7.
25. Rosenblatt HM, Song LY, Nachman SA, Stanley KE, Krogstad PA, Johnson GM, Wiznia AA; Tetanus immunity after diphtheria, tetanus toxoids, and acellular pertussis vaccination in children with clinically stable HIV infection. *Pediatric Aids Clinical Trials Group 377 Study Team. J Allergy Clin Immunol.* 2005 ;116:698-703.
26. Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, Blanche S, Mayaux MJ, Griscelli C, Valleron AJ. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. *The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. Am J Epidemiol.* 1995 15;142:1330-7.
27. Schupbach J, Tomasik Z, Jendis J, Boni J, Seger R, Kind C. IgG, IgM, and IgA response to HIV in infants born to HIV-1 infected mothers. *Swiss Neonatal HIV Study Group. J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994 ;7:421-7.
28. Sison AV, Campos JM. Laboratory methods for early detection of human immunodeficiency virus type 1 in newborns and infants. *Clin Microbiol Rev.* 1992 ;5:238-47.
29. The European Collaborative Study. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatrics.* 1994 ;94:815-9.
30. The European Mode of Delivery Collaboration. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet.* 1999 27;353:1035-9.

31. The international Perinatal HIV Group. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1-a meta-analysis of prospective cohort studies. *N Engl J Med.* 1999 1;340:977-87.
32. Turner BJ, Markson L, Hauck W, Cocroft J, Fanning T. Prenatal care of HIV-infected women: analysis of a large New York State cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995 1;9:371-8.
33. Weinberg A, Gona P, Nachman SA, Defechereux P, Yogev R, Hughes W, Wara D, Spector SA, Read J, Elgie C, Cooper M, Dankner W; Pediatric AIDS Clinical Trials Group 1008 Team. Antibody responses to hepatitis A virus vaccine in HIV-infected children with evidence of immunologic reconstitution while receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2006 15;193:302-11.
34. Winchester R, Pitt J, Charurat M, Magder LS, Goring HH, Landay A, Read JS, Shearer W, Handelsman E, Luzuriaga K, Hillyer GV, Blattner W. Mother-to-child transmission of HIV 1: strong association with certain maternal HLA-B alleles independent of viral load implicates innate immune mechanism. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 1;36:659-70.
35. www.aids-kampagne.de/l8mimages/pdf/verlauf_uebertrag.pdf
36. <http://www.hiv.net/2010/haart.htm>
37. www.rki.de/clin_049/nn_196436/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/30_07,templateId=r aw,property=publicationFile.pdf/30_07.pdf. Empfehlung der STIKO 2007.
38. www.rki.de/clin_049/nn_196436/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2006/30_06,templateId=r aw,property=publicationFile.pdf/30_06.pdf. Empfehlung der STIKO 2006.
39. www.rki.de/clin_049/nn_196438/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2005/30_05,templateId=r aw,property=publicationFile.pdf/30_05.pdf. Epidemiologisches Bulletin 2005.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Ahmad Fasel Jebran
Geburtsdatum:	04.07.1978
Geburtsort:	Kabul / Afghanistan
Nationalität:	deutsch
Konfession:	Islam
Adresse:	Thomas-Mann Str. 4 47608 Geldern
Telefon:	0176-20845330 02831-9776703
e-mail:	ahmadfasel@web.de

Schulischer Werdegang:

1984- 1991	Grundschule und Mittelschule in Kabul/ Afghanistan
1991- 1992	Intensivkurs der deutschen Sprache in Wuppertal
1992- 1998	Gesamtschule Else Lasker Schüler in Wuppertal,
Abitur	

Studium:

10/1998- 12/2004	Humanmedizin Heinrich Heine Universität Düsseldorf
08/2000	Ärztliche Vorprüfung
08/2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
15.11.2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Die Approbation wurde am 26.11.2004 erteilt.)

Studiumbegleitende Nebentätigkeiten:

• *Famulaturen:*

03/2001	Chirurgische Ambulanz, St. Antonius Kliniken in Wuppertal
03/2002	Anästhesie, Fabricius Klinik in Remscheid
08/2002	Dermatologie, HHU Düsseldorf
02/2003	Orthopädie, HHU Düsseldorf
03/2003	Allgemeinmedizin, Gemeinschaftspraxis Dres. med. Gummersbach in Duisburg

• *Praktisches Jahr:*

13.10.2003- 30.01.2004	Chirurgie, HHU Düsseldorf
02.02.2004- 19.05.2004	Kinderheilkunde, HHU Düsseldorf
21.05.2004- 21.09.2004	Innere Medizin, HHU Düsseldorf

- *Nebentätigkeiten:*

1999- 2001	Helfer im Pflegedienst, HHU Düsseldorf
2001- 2003	Studentische Hilfskraft, Kinderklinik HHU Düsseldorf

Berufliche Tätigkeit:

Februar 2005 – März 2007 Assistenzarzt der
Inneren Medizin in Marienhospital Kevelaer
April-Juni 2007 Assistenzarzt der Inneren Medizin
Vinzenz Krankenhaus Düsseldorf
Seit Juli 2007 Assistenzarzt der Inneren Medizin,
Maria-Hilf Krankenhaus Krefeld

Sonstiges:

Ultraschalldiagnostik:	Abdomenonographie, Doppler- und Duplexsonographie extrakranieller und peripherer Arterien
Endoskopoie:	Erste Erfahrungen in ÖGD und Coloskopie mit Polypektomie
Strahlenschutz:	abgeschlossen im März 2007
Fremdsprachen:	Englisch Persisch (Muttersprache)

8. Anhang

Tabelle 1. Klinische Stadien gemäß der CDC-Klassifikation für die HIV-Infektion im Kindesalter (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00032890.htm>)

Klinische Stadien gemäß der CDC	Klassifikation für die HIV
Stadium N: Keine Symptomatik	Kinder, die keine Symptome oder klinischen Zeichen einer HIV-Infektion oder nur eines der unter Stadium A aufgeführten Symptome haben
Stadium A: Frühsymptome	Kinder, die zwei oder mehr der folgenden Symptome haben, aber keine der in Stadium B und C aufgeführten Symptome - Lymphadenopathie, Hepatomegalie, Splenomegalie - Dermatitis - Parotitis - Rezidivierende Infekte der oberen Atemwege, Sinusitiden oder Otitiden
Stadium B: Mäßig schwere Symptome	Kinder, die andere als die in Stadium A und C aufgeführten Symptome haben Beispiele für Symptome des Stadiums B sind: - Anämie (Hb < 8 g/dl), Neutropenie ($<1000/\text{mm}^3$), Thrombozytopenie ($<100000/\text{mm}^3$) über > 30 Tage - Bakterielle Meningitis, Pneumonie, Sepsis (eine Episode) - Oropharyngeale Candidiasis, über > 2 Monate persistierend, bei Kindern > 6 Monate - Kardiomyopathie - CMV-Infektion mit Beginn im 1. Lebensmonat - Durchfälle, rezidivierend oder chronisch - Hepatitis - Herpes simplex (HSV)-Stomatitis, mehr als zwei Episoden pro Jahr - HSV-Bronchitis, -Pneumonitis oder -Ösophagitis im 1. Lebensmonat - Herpes zoster (> 2 Episoden an > 1 Dermatom), disseminierte Varizellen - Leiomyosarkom

	- Lymphoide interstitielle Pneumonie (LIP)* - Nephropathie - Persistierendes Fieber > 1 Monat Dauer - Toxoplasmose im 1. Lebensmonat; Nokardiose
Stadium C: Schwere Symptome, AIDS	- Mehr als eine schwere kulturell nachgewiesene Infektion mit gewöhnlichen Bakterien innerhalb von 2 Jahren - HIV-Enzephalopathie - Wasting-Syndrom, Kachexie - Pneumocystis jiroveci (vormals "carinii")-Pneumonie (PCP) - ZNS-Toxoplasmose bei Kindern im Alter > 1 Monat - Kryptosporidiose mit Durchfällen > 1 Monat Dauer - Isosporidiasis mit Durchfällen > 1 Monat Dauer - Verschiedene Lymphome inkl. ZNS-Lymphome - Kaposi-Sarkom - Progressive multifokale Leukenzephalopathie - HSV-bedingte mukokutane Ulzera (Dauer > 1 Monat) oder Bronchitis, Pneumonie, Ösophagitis durch HSV bei Kindern im Alter > 1 Monat - Lymphoide interstitielle Pneumonie durch EBV - CMV: u.a. Retinitis, Ösophagitis, Kolitis bei Kindern im Alter >1 Monat - Candidiasis des Ösophagus, des Tracheobronchialsystems - Extrapulmonale Kryptokokkose - Disseminierte oder extrapulmonale Histoplasmose - Tuberkulose, atypische Mykobakterien

9. Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Impfspezifische humorale und zelluläre Immunität HIV infizierter Kinder mit
Langzeitimmunrekonstitution unter HAART

unter der Leitung von PD Dr. med. T. Niehues

aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und –Immunologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

10. Danksagung

GOTT sei Dank.

Wie schnell sich das Lebensrad dreht und die Zeit vergeht, sehe ich an meinem Leben. Vom Kindergarten in Kabul/Afghanistan bis jetzt kommt es mir wie ein Augenblick vor. Doch dieses Vergehen ist in meinen Augen ein Werden. Als kleiner Teil dieses Prozesses gilt diese Arbeit, bei der mich einige liebe Menschen unterstützt haben. Hierbei muß ich meine Eltern, Dr. med. Ahmad Farid und Maryam Jebran, erwähnen und ihnen unter anderem dafür danken, dass sie mich durch unaufhörliches Nachfragen immer wieder motiviert haben, diese Arbeit zu Ende zu führen. Ich danke auch meiner Frau, Ariana Jebran, die mich im Alltag unterstützte und mir den Freiraum für diese Arbeit bereitete. Besonderer Dank gilt Tim Niehues, meinem Betreuer, ohne ihn diese Dissertation nicht möglich wäre. Seine fachlichen und menschlichen Kompetenzen sind von unschätzbarem Wert. Ich danke ebenfalls den Mitarbeitern der Kinderambulanz und des Labors der Universitätskinderklinik Düsseldorf für ihre freundliche Unterstützung.

Geldern, den 30.08.2007

A. F. Jebran