

Diagnostik und antivirale Therapie von Herpes-simplex-Virus-Infektionen

A. Sauerbrei

Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena, Konsiliarlabor für HSV und VZV

Diese Übersicht wurde im Rahmen der Aufgaben der Kommission für Antivirale Therapie der Gesellschaft für Virologie e.V. und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. erstellt.

1. Erreger, Epidemiologie und Infektion

Virus. Das Herpes-simplex-Virus (HSV) ist ein umhülltes, wenig umweltresistentes DNA-Virus mit einer Größe von 150-200 nm. Das doppelsträngige DNA-Genom besitzt 152 kb und kodiert für mehr als 70 Proteine. Das Nukleokapsid besteht aus 162 Kapsomeren (ca. 100 nm). Die Replikation der Herpesviren ist ein komplexer kaskadenartig regulierter Prozess, bei dem sequentiell α -, β - und γ -Gene des Virus exprimiert werden und der im Wesentlichen im Zellkern abläuft. Es existieren zwei Typen: HSV-1 (humanes Herpesvirus 1, HHV-1) und HSV-2 (humanes Herpesvirus 2, HHV-2). Die DNA-Sequenzhomologie zwischen den beiden Typen beträgt ca. 85%. Typspezifische Epitope finden sich auf den Oberflächen-Glykoproteinen gG (HSV-1 und HSV-2) und gC (HSV-1).

Epidemiologie. Die nur beim Menschen natürlich vorkommenden Infektionserreger HSV-1 und HSV-2 sind weltweit verbreitet. Die Übertragung erfolgt durch Schleimhaut-/Hautkontakt. Wichtigste Quelle für Primärinfektionen mit HSV-1 sind der rezurrenente Herpes labialis sowie asymptomatische Virusausscheidungen über den Speichel. Die Durchseuchung mit HSV-1 beginnt schon im frühen Kindesalter. Herpes-simplex-Virus Typ 1 kann auch durch Sexualkontakt übertragen werden, die entscheidende Rolle spielt hier jedoch das HSV-2, dessen Durchseuchung damit deutlich später beginnt. Risikogruppen sind junge sexuell aktive Menschen mit häufigem Partnerwechsel, Prostituierte und Homosexuelle ohne Gebrauch von Kondomen. Neugeborene werden in der Regel über den Geburtstrakt bei klinisch manifester oder asymptomatischer mütterlicher Infektion infiziert. Ein hohes Risiko für schwere Infektionen haben Neugeborene, deren Mütter in der Spätschwangerschaft an einem primären Herpes genitalis erkranken. Wegen der geringeren Virusproduktion ist der rezidivierende Herpes genitalis weniger gefährlich. Infektiosität ist bei klinisch manifester Infektion gegeben, solange Läsionen noch nicht vollständig eingetrocknet sind (bei oralen Läsionen i.d.R. etwa eine Woche, bei genitalen Läsionen z.T. länger). Entsprechend dem Übertragungsmodus besteht für HSV eine typenabhängige Durchseuchungskinetik. Die HSV-1-Seroprävalenz ist abhängig von sozioökonomischen Faktoren und beträgt in entwickelten Industrieländern bei Erwachsenen 75-95%, während etwa 15-20% der Erwachsenen Antikörper gegenüber HSV-2 besitzen.

Zwischen HSV-1 und HSV-2 besteht eine partielle klinische Kreuzimmunität, weshalb bei bestehender HSV-1-Immunität eine genitale HSV-2-Primärinfektion auch asymptomatisch verlaufen kann.

Infektionsformen. Das HSV ist bei produktiver Infektion zytopathogen und wird im Anschluss an die Primärinfektion in Ganglienzellen latent. Nach axonalem Transport persistiert die virale DNA in zirkulärer Form in den sensiblen Neuronen. Die Viren verbleiben latent im Trigeminalganglion (meist HSV-1) sowie in den Sakralganglien (überwiegend HSV-2). Von dort aus können sie reaktiviert werden und nach neuralem zentrifugalem Transport rezidivierende Manifestationen auf Haut und Schleimhaut auslösen. Reaktivierungen treten etwa in 50% aller latent Infizierten auf, die Häufigkeit und vor allem der Schweregrad sind aber bei Immundefizienten deutlich größer. Auch subklinische Reaktivierungen des HSV tragen zur Boosterung der Immunität bei. Ausgelöst durch hormonellen oder psychischen Stress, sind bei immungenetischer Disposition klinisch manifeste HSV-Rezidive nach der Pubertät häufig. Ihre Zahl nimmt im Alter deutlich ab. Die HSV-Latenz wird derzeit noch nicht ausreichend verstanden. Von entscheidender Bedeutung scheinen die so genannten Latency-Associated Transcripts (LAT) zu sein, die als einzige Region des HSV-Genoms während der Latenz transkribiert werden. Sie kommen in großen Mengen in latent infizierten Neuronen vor, kodieren aber nicht für ein bislang bekanntes Protein. Eine Schlüsselfunktion für die Virusreaktivierung kommt vermutlich dem viralen immediate early (IE)-Gen ICPO zu. Es wird angenommen, dass LAT-RNA als Antisense-RNA zu den Transkripten des ICPO wirkt und auf diese Weise zur Aufrechterhaltung der Latenz beiträgt.

Pathogenese. Bei der Primärinfektion (Inkubationszeit 2-12 Tage) dringt das Virus über Haut- und Schleimhautläsionen in den Organismus ein und vermehrt sich lokal in Keratinozyten der Haut und in den Epithelzellen der Schleimhaut sowie in den regionären Lymphknoten. Es schließt sich eine kurzzeitige Virämie an, die nur schwer diagnostizierbar ist. Nach einer HSV-1-Primärinfektion zeigen 99% der Infizierten einen inapparenten Verlauf, und nur bei circa 1% kommt es zu Erkrankungen, die sich vorwiegend am Eintrittsort mit typischen Herpesbläschen manifestieren. Für HSV-2 wird eine Häufigkeit asymptomatisch verlaufender Primärinfektionen von $\geq 70\%$ ange-

nommen. Im Stadium der Viruslatenz kann durch verschiedene Provokationsfaktoren wie fieberhafte Infekte, intensive Sonnen- bzw. UV-Bestrahlung, Menstruation, mechanische und psychische Traumen, Stress u.a. das HSV endogen reaktiviert werden. Als Folge kommt es zu einem klinisch manifesten Herpesrezidiv oder einer asymptomatischen Virusausscheidung.

Krankheitsbilder. Im Kindesalter verläuft die Mehrzahl der klinisch manifesten HSV-1-Primärinfektionen als Gingivostomatitis herpetica. Circa 15-30% der Bevölkerung erkranken an der mit Abstand häufigsten rezidivierenden HSV-Erkrankung, dem Herpes labialis. Eine mit Hornhautgeschwüren einhergehende herpetische Keratokonjunktivitis kann durch Vernarbung der Infektionsherde auf der Kornea zur Beeinträchtigung des Sehvermögens führen. Auf der Grundlage eines endogenen Ekzems ist die Entstehung eines Eczema herpeticatum möglich. Der Herpes genitalis ist eine der häufigsten sexuell übertragenen Infektionen. Die Erkrankung wird vorwiegend durch HSV-2 hervorgerufen. In entwickelten Industrieländern wurde im letzten Jahrzehnt über die Zunahme genitaler Infektionen durch HSV-1 berichtet, das zumindest die Hälfte aller genitalen Primärinfektionen verursachen soll. Prinzipiell können der Erstinfektion regelmäßige Rezidive folgen, wobei genitale Infektionen durch HSV-1 weniger gravierend sind bzw. nur selten zu Rezidiven neigen. Der Herpes genitalis ist ein starker Risikofaktor für eine HIV-Infektion. Das Vorkommen intrauteriner HSV-Infektionen ist umstritten. Es existieren nur unzureichend dokumentierte Einzelfallberichte über Spontanaborte im Zusammenhang mit einer HSV-Primärinfektion sowie über kongenitale Infektionen mit Hautläsionen, Chorioretinitis, Mikrozephalie und anderen Stigmata. Klar dokumentiert und zahlenmäßig wesentlich bedeutender ist die perinatale Infektion (Herpes neonatorum), die ascendierend oder bei der Passage durch den infizierten Geburtskanal akquiriert wird. Der Schweregrad kann von leichten auf die Haut oder Schleimhäute beschränkten Infektionen bis zur generalisierten sepsisähnlichen Erkrankung mit hoher Letalität reichen. Die Herpesenzephalitis, eine hämorrhagisch-nekrotisierende Entzündung im frontomedio-basalen und temporalen Bereich des Gehirns, ist mit einer Letalität von 70% bei unbehandelten Patienten die folgenschwerste HSV-Erkrankung. Sie stellt eine zentripetale Infektion des ZNS dar und tritt in circa zwei Drittel der Fälle bei einer Reaktivierung und zu einem Drittel im Rahmen einer Primärinfektion auf, insbesondere wenn diese nicht frühkindlich durchgemacht wird. Die Erkrankungshäufigkeit liegt bei circa 1:200.000 pro Jahr. Problematisch sind HSV-Infektionen bei Patienten mit gestörter Immunabwehr. Bei diesen Personen kommt es häufig zu ausgedehnten, schlecht heilenden Haut- und Schleimhautläsionen, und es kann ein viszeraler Herpes mit Pneumonie, Ösophagitis oder Hepatitis auftreten.

2. Labordiagnostik

Probeneinsendung. Herpes-simplex-Virus-haltige Proben müssen als gefahrgutrechtliche Stoffe der Kategorie B, Risikogruppe 2 nach UN 3373 versendet werden. Dazu muss das Primärgefäß mit der Patientenprobe in einem Umverpackungsröhrchen und mit adsorbierendem Material in einem gekennzeichneten Transportbehältnis (Kartonbox) verschickt werden. Der Versand ist bei Raumtemperatur möglich. Kühlung wird nur empfohlen,

wenn das Material für die Virusisolierung vorgesehen ist.

Virusnachweis. Die Diagnose der akuten HSV-Infektion erfolgt über den direkten Virusnachweis (Tab. 1). Methode der Wahl, insbesondere bei zeitlich dringender Fragestellung, ist der Nachweis von Virusgenomen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in Bläscheninhalt, Genitalabstrich, Liquor, Gewebe, bronchoalveolärer Lavage, Fruchtwasser, Serum oder EDTA-Blut. Die PCR soll zwischen HSV-1 und HSV-2 unterscheiden. Alternativ kann man akute Infektionen über die Virusanzucht in der Gewebekultur diagnostizieren, wobei eine Typisierung der Virusisolate zweckmäßigerweise unter Verwendung von Fluoreszein-markierten HSV-typspezifischen monoklonalen Antikörpern mittels Immunfluoreszenz vorgenommen wird. Prinzipiell stellt die Virusisolierung eine empfindliche Methode zum Nachweis des HSV dar, da HSV in vielen Zelltypen gut repliziert. Der Direkt-nachweis von HSV-Antigenen mittels kommerzieller Nachweissysteme auf der Basis der Immunfluoreszenz ist eine häufig eingesetzte und preiswerte Methode, die innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis liefert, aber eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität besitzt. Zu beachten ist, dass Methoden zum direkten Virusnachweis keine Unterscheidung von Primär- und rezidivierender Infektion erlauben.

Antikörpernachweis. Die serologische HSV-Diagnostik (Tab. 2) hat vor allem mit der Bestimmung von IgG zum Nachweis der Serokonversion nach Primärinfektion Bedeutung, bei der sich regelmäßig IgM-Antikörper nachweisen lassen. Dies kann insbesondere für den Nachweis von HSV-2-Infektionen im Rahmen der Betreuung von Schwangeren von Wert sein. Der Nachweis einer Serokonversion kann auch mittels Bestimmung typenspezifischer IgG-Antikörper erfolgen, die aufgrund der sehr engen Verwandtschaft von HSV-1 und HSV-2 nur mit einem ELISA bzw. Immunoblot auf der Basis der Glykoproteine G (gG-1) oder C (gC-1) von HSV-1 und der Glykoproteine G (gG-2) von HSV-2 möglich ist. Bei der Interpretation der Befunde ist zu beachten, dass zwischen HSV-1 und HSV-2 eine partielle Kreuzimmunität besteht. Liegt eine Erstserumprobe aus der Frühphase der Erkrankung vor, kann durch den Virustyp-spezifischen DNA-Nachweis mittels PCR in Kombination mit Virustyp-spezifischem IgG-Nachweis zwischen Primärinfektion und Rezidiv unterschieden werden. Für die Unterscheidung zwischen Primärinfektion und Rezidiv kann auch der Aviditätsnachweis eingesetzt werden, wozu bislang aber nur wenige Erfahrungen existieren. Ein negativer HSV-IgG-Nachweis schließt eine rezidivierende HSV-Infektion aus. Der Nachweis intrathekalen HSV-spezifischer IgG-Antikörper kann für die retrospektive Diagnostik von ZNS-Infektionen genutzt werden. Die Bestimmung von HSV-IgM hat prinzipiell nur eine geringe Bedeutung für die frühzeitige Sicherung einer akuten HSV-Infektion. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten mit anderen Herpesviren (Varicella-Zoster-Virus) kann der IgM-Nachweis falsch positive Werte ergeben. Eine Unterscheidung zwischen primärer und rezidivierender HSV-Infektion ist mittels IgM-Antikörper nicht möglich, da IgM auch bei rezidivierenden Infektionen unabhängig von der klinischen Symptomatik positiv ausfallen kann. Auf den wenig zuverlässigen Nachweis HSV-typenspezifischer IgM-Antikörper sollte in der Praxis verzichtet werden.

Tab. 1: Methoden zum Nachweis des HSV bzw. von viraler Nukleinsäure (DNA)

| Prinzip | Methode | Untersuchungsmaterial |
|-----------------------|--|--|
| Virus-DNA-Nachweis | Polymerasekettenreaktion (PCR) Basisdiagnostik | Bläscheninhalt in Virustransportmedium mit Spezialtupfer, Liquor, Gewebe, bronchoalveoläre Lavage, EDTA-Blut, Fruchtwasser |
| Virusisolierung | Anzüchtung in der Zellkultur, Nachweis mittels monoklonaler Antikörper Spezialdiagnostik | Bläscheninhalt in Virustransportmedium mit Spezialtupfer, Gewebe, bronchoalveoläre Lavage |
| Virusantigen-Nachweis | Immunfluoreszenztest mit monoklonalen Antikörpern Eingeschränkte Sensitivität und Spezifität Basisdiagnostik | Zellreicher Bläscheninhalt in Virustransportmedium mit Spezialtupfer, Gewebe |
| Virustypisierung | Immunfluoreszenz mittels typspezifischer monoklonaler Antikörper Basisdiagnostik | Virusisolat |
| Genotypisierung | Restriktionsenzymanalyse, Sequenzierung der Virus-DNA Spezialdiagnostik | Virus-DNA |

Tab. 2: Methoden zum Nachweis HSV-spezifischer Antikörper

| Methode | Anmerkungen |
|---|---|
| Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) | Bestimmung und Differenzierung der Ig-Klassen (IgG, IgM), in Serum, Plasma und Liquor Bestimmung von Virustyp-spezifischen Antikörpern gegen die viralen Glykoproteine (gG-1, gC-1, gG-2) Bestimmung von Virustyp-übergreifenden Antikörpern mit viralem Gesamtantigen aus HSV-1 oder HSV-2-infizierten Zellkulturen Einfache Durchführung, kommerziell vertrieben, automatisiert, Basisdiagnostik |
| Indirekter Fluoreszenzantikörpertest (IFAT) | Bestimmung und Differenzierung der Ig-Klassen (IgG, IgM), in Serum, Plasma und Liquor Einfache Durchführung, kommerziell vertrieben, erfordert Erfahrung bei der Auswertung, Spezialdiagnostik |
| Immunoblot | Qualitative Bestimmung von Virustyp-spezifischen IgG-Antikörpern gegen die viralen Glykoproteine (gG1, gG2) in Serum Einfache Durchführung, sensitiv, kommerziell vertrieben, z.T. automatisierte Durchführung und Auswertung, Spezialdiagnostik |
| Neutralisationstest | Nachweis von HSV-1- und HSV-2-neutralisierenden Antikörpern in Serum, schwierig, Spezialdiagnostik |

3. Antivirale Therapie

3.1. Zugelassene antivirale Therapeutika

Für die Behandlung von HSV-Infektionen stehen in erster Linie die Nukleosidanaloga Aciclovir/Valaciclovir und Penciclovir/Famciclovir zur Verfügung (Tab. 3). Die Spezifität ihrer antiviralen Wirkung beruht darauf, dass diese Hemmstoffe durch die virale Thymidinkinase (TK) zum Monophosphat phosphoryliert werden, während die weiteren Phosphorylierungsschritte über das Di- zum Triphosphat von zellulären Enzymen vorgenommen werden. Das Wirkungsspektrum der Präparate wird somit durch das Vorhandensein des Schlüsselenzyms, der viralen TK, vorgegeben. Die Triphosphate der Nukleosidanaloga hemmen und fixieren die viralen DNA-Polymerasen (Pol) bzw. werden als „falsches“ Substrat des Enzyms in die wachsende DNA-Kette eingebaut, was bei Aciclovir/ Valaciclovir zum Kettenabbruch führt, da die zur weiteren Verknüpfung notwendige Hydroxygruppe in der 3'-Position fehlt. Bei den anderen Nukleosidanaloga ist eine Inkorporation in die DNA möglich.

Aciclovir. Es stellt das Standard-Therapeutikum bei HSV-Infektionen dar. Allerdings beträgt die orale Bioverfügbarkeit lediglich 15-30%. Haut- und Schleimhautinfektionen bei immunkompetenten Personen können oral behandelt werden. Schwere HSV-Infektionen, insbesondere bei Immundefizienten, werden mit Aciclovir i.v. behandelt. Bei der Keratokonjunktivitis herpetica, Herpes labialis und facialis ist eine lokale Therapie mit Salben bzw. Cremes möglich. Seit wenigen Jahren sind für die topische Behandlung des Herpes labialis auch Aciclovir-Cremes mit Zusatz von Hydrocortison als Entzündungshemmer auf dem Markt. Der primäre und rezidivierende Herpes genitalis wird meist oral behandelt, wobei bei über 6 Rezidiven pro Jahr auch eine Suppressions-Dauertherapie möglich ist. Bei Verdacht auf Herpesenzephalitis ist sofort nach Asservierung der Proben

für die Diagnostik eine intravenöse (i.v.) Therapie einzuleiten. Nach i.v. Applikation von Aciclovir sind gelegentlich zentralnervöse Nebenwirkungen beschrieben worden, während die orale Gabe insbesondere mit gastrointestinalen Nebenwirkungen einhergehen kann. Nierentoxische Substanzen sollten nicht gleichzeitig mit Aciclovir gegeben werden. Nieren- und Leberwerte sind zu überwachen.

Valaciclovir. Es handelt sich um das oral applizierbare Prodrug, einem L-Valylester, von Aciclovir. Nach oraler Aufnahme wird es über ein hepatisches Enzym, die Valaciclovir-Hydrolase, in Aciclovir umgewandelt. Für Valaciclovir beträgt die orale Verfügbarkeit 54%. Dadurch werden drei- bis vierfach höhere Wirkstoffkonzentrationen als nach oraler Gabe von Aciclovir erreicht. Daraus resultieren eine Verlängerung der Dosierungsintervalle sowie eine bessere Compliance. Valaciclovir wird vor allem zur Therapie des Herpes genitalis eingesetzt. Mögliche Nebenwirkungen ähneln denen nach der Gabe von Aciclovir.

Penciclovir. Abgeleitet von Ganciclovir durch den Austausch des Ethersauerstoffatoms in der azyklischen Seitenkette durch eine Methylbrücke. Die orale Resorption ist sehr gering, weshalb Penciclovir nur in Form von Cremes zur lokalen Therapie des Herpes labialis oder facialis zum Einsatz kommt.

Famciclovir. Es handelt sich um das inaktive Diacetyl-ester-Prodrug von Penciclovir, das durch Abspaltung von zwei Estergruppen im Dünndarm und in der Leber entsteht. Nach oraler Applikation besitzt Famciclovir eine Bioverfügbarkeit von 77%. Wie Valaciclovir wird Famciclovir vor allem zur Therapie des Herpes genitalis eingesetzt. In seltenen Fällen kann die Einnahme von Famciclovir zu Kopfschmerzen, Verwirrheitszuständen und Übelkeit führen.

Tab. 3: Antivirale Chemotherapeutika gegen HSV

| Chemotherapeutikum | Applikation | Indikation |
|---------------------------|-------------|--|
| Aciclovir | i.v. | Schwere und generalisierte HSV-Infektionen (Herpesenzephalitis, Herpes neonatorum, Herpes simplex bei Immunsuppression, Eczema herpeticatum) |
| | oral | Herpes genitalis |
| | lokal | Herpes labialis, Herpes facialis, Herpeskeratitis |
| Valaciclovir ¹ | oral | Herpes genitalis |
| Penciclovir | lokal | Herpes labialis, Herpes facialis |
| Famciclovir ² | oral | Herpes genitalis |
| Brivudin | oral | HSV-1-Infektionen |
| Foscarnet | i.v. | Infektionen durch TK-negative HSV-Stämme |
| | lokal | Herpes labialis, Herpes facialis |
| Trifluridin | lokal | Herpeskeratitis |

¹ oral applizierbares Prodrug von Aciclovir

² oral applizierbares Prodrug von Penciclovir

Brivudin ((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine). Bei Brivudin, einem zyklischen Nucleosidanalogon, erfolgt sowohl die Monophosphorylierung als auch die Diphosphorylierung durch die virale TK. Allerdings bestehen Unterschiede bezüglich HSV-1 und HSV-2. Die HSV-1-spezifische TK unterscheidet sich von der zellulären TK dadurch, dass eine zusätzliche Thymidylatkinaseaktivität eine Umwandlung von Desoxythymidinmonophosphat in Desoxythymidindiphosphat möglich macht. In HSV-2-infizierten Zellen findet zwar eine Phosphorylierung zum Brivudinmonophosphat statt, es werden aber keine Diphosphatderivate gebildet. Deshalb ist Brivudin nur bei HSV-1- und nicht bei HSV-2-Infektionen wirksam, was eine Typendifferenzierung in der Diagnostik voraussetzt. Von Vorteil ist die orale Applikation mit einer Bioverfügbarkeit von etwa 40%. Bei allgemein guter Verträglichkeit können gastrointestinale Störungen, Einschränkung der Nierenfunktion, Anstieg der Leberenzyme und reversible Veränderungen des Blutbildes auftreten. Eine gleichzeitige Gabe von 5-Fluorouracil oder anderer 5-Fluoropyrimidine führt zu einer verstärkten und u.U. gefährlichen Toxizität.

Trifluridin. Halogeniertes Nucleosid mit ähnlicher Struktur wie Idoxuridin und Thymidin. Es hemmt die Virussynthese infolge eines kompetitiven Antagonismus zu Thymidin und durch den Einbau abgeänderter Nucleotidbasen. Trifluridin kommt wegen seiner Toxizität nur in Form von Augentropfen zur lokalen Therapie der Keratokonjunktivitis herpetica (Herpes corneae) zum Einsatz. Es ist im Vergleich zu dem in Deutschland nicht mehr erhältlichen Idoxuridin stärker und rascher wirksam.

Foscarnet (Phosphonoformat). Das Pyrophosphatanalogon Foscarnet hemmt die virale DNA-Pol zahlreicher DNA- und RNA-Viren durch Unterbindung des Pyrophosphataustausches. Da diese Substanz für die Hemmung der Virusreplikation nicht metabolisiert werden muss, wirkt sie auch gegen TK-negative HSV-Stämme, die gegenüber Nucleosidanaloga resistent sind. Aus diesem Grund gilt Foscarnet i.v. als Alternativtherapeutikum im Falle einer Aciclovir-Resistenz bei schwer verlaufenden Erkrankungen durch HSV, vorwiegend bei immunsupprimierten Patienten. Darüber hinaus wird Foscarnet auch als Creme zur topischen Behandlung des Herpes labialis oder facialis eingesetzt. Als wesentliche Nebenwirkungen treten Nierenfunktionsstörungen und toxisch bedingte Ulzera der Urogenitalschleimhaut auf.

3.2. Nicht zugelassene antivirale Therapeutika (Einsatz im off-label-use)

Cidofovir. Nucleotidanalogon zu Cytidin-Monophosphat. Es ist primär nur für die Cytomegalievirus-Retinitis zugelassen, prinzipiell aber auch gegen HSV wirksam. Allerdings fehlen noch umfangreiche klinische Erfahrungen beim Einsatz zur Therapie von HSV-Infektionen. Da gegenüber Cidofovir resistente klinische HSV-Stämme bislang eine große Rarität sind, bietet es sich zur alternativen Therapie beim Vorliegen Aciclovir- und/oder Foscarnet-resistenter HSV-Stämme an. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber Foscarnet besteht darin, dass die Substanz in größeren Abständen i.v. appliziert werden muss. Die häufigsten Nebenwirkungen bestehen in einer Schädigung der Nierenfunktion.

3.3. Antitherpetika in Entwicklung

Helikase-Primase-Komplex-Inhibitoren (Helikase-Blocker). Es handelt sich um eine neuartige Substanzklasse, die sich derzeit in klinischer Entwicklung und Erprobung befindet. Bislang konnte eine effektive Hemmung der HSV-Replikation in Zellkulturen, Tiermodellen und ersten klinischen Studien nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass Helikase-Blocker sich an den Helikase-Primase-Komplex, einer für die Virusreplikation essenziellen Proteinkomponente, binden und auf diese Weise die virale DNA-Synthese und somit die Virusreplikation effektiv inhibieren. *In vitro* und *in vivo* konnten bisher bessere Ergebnisse im Vergleich zu Aciclovir und Valaciclovir erreicht werden. Da die Gene für den Helikase-Primase-Komplex in den konservierten Regionen des Genoms mehrerer Vertreter der Herpesviridae liegen, besitzen die Substanzen das Potenzial, gegenüber einem breiten Spektrum von Herpesvirus-Infektionen wirksam zu sein. Es ist wahrscheinlich, dass sich nach einer Monotherapie Resistenzen, vergleichbar den Nucleosidanaloga, entwickeln können. Unklar ist bislang, ob durch Helikase-Blocker auch rezidivierende HSV-Infektionen verhindert werden können.

4. Prophylaxe

Eine wirksame Immunprophylaxe gibt es bislang gegenüber HSV-Infektionen noch nicht. Ein bereits am Menschen getesteter Glykoprotein-basierter Impfstoff zeigte eine ungenügende Wirksamkeit. Bei Impfstoffen auf der Basis rekombinanter Viren war bisher von Nachteil, dass es zur Etablierung einer latenten Infektion sowie zur Entstehung von Rekombinanten nach Koinfektion mit einem Wildtyp-HSV kam. Derzeit wird an der Entwicklung eines sicheren und effektiven Impfstoffes auf der Basis eines rekombinanten HSV gearbeitet. Zur Prävention der neonatalen Infektion werden Schwangere mit genitalen Herpesläsionen und/oder mit positivem Virusnachweis zum Entbindungstermin mittels Sectio entbunden. Im Falle eines Rezidivs kann eine vaginale Entbindung unter der Gabe von Aciclovir vorgenommen werden. Eine Chemoprophylaxe mit Aciclovir, Valaciclovir oder Famciclovir kommt bei immunsupprimierten Patienten in Betracht, wie z.B. nach Hochdosis-Chemotherapie, Knochenmarktransplantation oder Transplantation solider Organe. Auch zur Rezidivprophylaxe bei häufig rekurrendem Herpes genitalis ist die Gabe von Aciclovir, Valaciclovir oder Famciclovir wirksam.

5. Resistenzentwicklung

Bei immunkompetenten Personen hat eine Resistenzentwicklung von HSV bislang keine klinische Relevanz. Für den Herpes labialis liegt die Prävalenz resistenter HSV-Stämme bei <1%. Dies ist vor allem mit der effektiven Immunantwort zu begründen, wobei aber auch eine geminderte Virulenz resistenter Stämme und die Unfähigkeit, rekurrende Infektionen auszulösen, eine wichtige Rolle spielen. Ausnahmen bilden der rezidivierende Herpes corneae sowie der Herpes genitalis mit Prävalenzen resistenter HSV-Stämme zwischen 0 und 8%. Ein hohes Risiko bezüglich Infektionen durch resistente HSV-Stämme haben immunsupprimierte Patienten mit multiplen rekurrenden Herpesläsionen, die wiederholt antiviral behandelt wurden. Insgesamt besteht bei immundefi-

zienten Patienten eine durchschnittliche Prävalenz resistenter HSV-Infektionen von 4 bis 7%. Bei Patienten mit allogener Knochenmarktransplantation werden die höchsten Prävalenzen von 25-30% beschrieben. Von entscheidender Bedeutung dabei ist die Selektion der spontan entstehenden resistenten Virusmutanten (längere Dauer der Virusreplikation) durch die antivirale Therapie sowie deren gestörte Elimination durch das Immunsystem.

Resistenzen treten nach Mutation in dem Gen des jeweiligen Targetmoleküls oder dem Gen eines Proteins auf, das für die Metabolisierung des Wirkstoffs in die aktive Form verantwortlich ist. Für Aciclovir und den verwandten Nucleosidanaloga beruht eine Resistenz zu circa 95% auf Mutationen des TK-Gens (*UL-23*) und zu circa 5% auf Mutationen im DNA-Pol-Gen (*UL-30*). Während die TK für die Replikation des HSV zellabhängig nicht absolut notwendig ist, stellt die DNA-Pol ein für die Virusreplikation essenzielles Enzym dar. Aciclovir-resistente HSV-1-Stämme mit Mutationen in der viralen TK sind nahezu immer kreuzresistent gegen Brivudin. Eine Resistenz sowohl gegenüber Nucleosidanaloga als auch Foscarnet kann durch Mutationen der viralen DNA-Pol bedingt sein, wird aber bis heute nur sehr selten beobachtet. Herpes-simplex-Virus Typ 1-Stämme mit einer Kreuzresistenz von Aciclovir und Foscarnet, die durch Mutationen in der DNA-Pol hervorgerufen werden, können gegenüber Brivudin sensitiv sein. Dies stellt eine wichtige Alternative für die Therapie schwer verlaufender HSV-1-Infektionen bei immungestörten Patienten dar.

Thymidinkinase-Gen. Das 1.130 bp umfassende TK-Gen codiert für 376 Aminosäuren (AS). Dieses Gen ist reich an natürlichen Polymorphismen, die sich meist außerhalb aktiver oder konservierter Genregionen befinden, aber von Resistenz-Mutationen unterschieden werden müssen. In HSV-1-Stämmen treten im Mittel 5 und in HSV-2-Stämmen durchschnittlich mindestens 3 natürliche Polymorphismen auf. Resistenzmutationen konzentrieren sich vor allem auf so genannte „Hot-spot“-Regionen (homopolymere Sequenzen von Guanin und Cytosin: z.B. Codons 92 und 146) bzw. aktive oder konservierte Genbereiche (Tab. 4).

Tab. 4: Aktive und konservierte Bereiche des TK-Gens von HSV-1 und HSV-2

| TK-Region | Lokalisation im TK-Gen (Aminosäuren) | |
|-------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| | HSV-1 | HSV-2 |
| ATP-Bindungsstelle | 51-63 | 51-63 |
| Nucleosidbindungsstelle | 168-177 | 169-178 |
| Konservierte Regionen | 83-88, 162-164, 216-222, 284-289 | 84-89, 163-165, 217-223, 285-290 |
| Hochkonservierte Cysteinreste | 336 | 337 |

Mutationen des TK-Gens werden in drei Phänotypen eingeteilt:

- TK-negativ (TK-, keine TK-Aktivität nachweisbar)
- TK-reduziert (TKr, verringerte TK-Aktivität, 1-15% der normalen Aktivität)
- TK-altered (TKa, veränderte TK-Substratspezifität, keine Phosphorylierung von Aciclovir bzw. Nucleosidanaloga)

In den meisten Fällen treten TK-negative Mutanten auf. Thymidinkinase-Mutanten mit veränderter Substratspezifität sind mit circa 5% relativ selten.

Etwa die Hälfte aller Aciclovir-Resistenzen ist durch Basen-Deletionen oder Insertionen innerhalb homopolymere Sequenzen von Guanin und Cytosin bedingt. Die daraus entstehenden Frameshifts führen meist zu einem vorzeitigen Stopp der AS-Translation, was in einem Verlust der TK-Aktivität resultiert. Die andere Hälfte der Aciclovir-Resistenzen ist mit AS-Substitutionen assoziiert, die sich meist in aktiven oder konservierten Genregionen befinden. Eine AS-Substitution außerhalb aktiver oder konservierter Genbereiche schließt jedoch eine Resistenzassoziation nicht aus. Gegenwärtig kann man davon ausgehen, dass die überwiegende Anzahl an Resistenz- und Polymorphismus-assoziierten Substitutionen des TK-Gens in der Literatur beschrieben ist. Neue Resistenzmutationen werden jedoch immer wieder beobachtet.

DNA-Polymerase-Gen. Dieses Gen mit einer Größe von 3.707 bp (HSV-1) bzw. 3.722 (HSV-2) codiert für 1.235 AS (HSV-1) bzw. 1.240 AS (HSV-2). Es besitzt neun konservierte Regionen mit den Bezeichnungen I bis VII, Exo I und Delta C (Tab. 5). Auch dieses Gen ist hochpolymorph, wobei sich in HSV-1-Stämmen durchschnittlich 6 und in HSV-2-Stämmen im Mittel 5 natürliche Polymorphismen überwiegend in N- und C-terminalen Regionen außerhalb konservierter Genbereiche nachweisen lassen. Resistenz-assoziierte AS-Substitutionen sind fast immer in

Tab. 5: Konservierte Bereiche des DNA-Pol-Gens von HSV-1 und HSV-2

| Konservierter Genbereich | Lokalisation im DNA-Pol-Gen (Aminosäuren) | |
|--------------------------|---|---------|
| | HSV-1 | HSV-2 |
| I | 881-896 | 886-901 |
| II | 694-736 | 699-741 |
| III | 805-845 | 810-850 |
| IV (Exo II) | 437-479 | 438-480 |
| V | 953-963 | 959-969 |
| VI | 772-791 | 777-796 |
| VII | 938-946 | 943-951 |
| Exo I | 363-373 | 364-374 |
| Delta C (Exo III) | 531-627 | 532-628 |

konservierten Genregionen lokalisiert. Nahezu die Hälfte aller ist in den konservierten Regionen II und III nachweisbar, die wenigsten in der Region I, welche die katalytische Funktion des Enzyms bestimmt. Natürliche Polymorphismen und Resistenzmutationen des DNA-Pol-Gens von HSV-1 und HSV-2 sind noch nicht umfassend untersucht, weshalb weitere wissenschaftliche Studien an klinischen HSV-Stämmen erforderlich sind.

6. Resistenztestung

Bei HSV-Infektionen, die innerhalb von mindestens 10 Tagen nicht auf die Therapie mit dem eingesetzten antiviralen Therapeutikum (meist Aciclovir) ansprechen, wird von einem klinischen Therapieversagen gesprochen, d.h. es besteht der Verdacht auf resistente Virusstämme. In diesen Fällen sollte eine phänotypische und/oder genotypische Resistenztestung erfolgen. Im Falle einer Resistenz ist eine Alternativtherapie mit Foscarnet angezeigt. Da insbesondere phänotypische Resistenzteste mit einem relativ hohen Zeitaufwand von mindestens 7-10 Tagen verbunden sind, sollte bei ausgeprägter klinischer Resistenz das Ergebnis der Resistenztestung nicht abgewartet werden.

Phänotypisierung. Für die phänotypische Resistenztestung werden in der Literatur Plaquereduktions- bzw. cpE-Hemmteste, Dye-Uptake-Assays und DNA-Hybridisierungsassays beschrieben, wobei der Plaquereduktions-test die am häufigsten eingesetzte Methode darstellt. Anhand der Hemmung morphologisch induzierter viruspezifischer Zellveränderungen, sogenannter zytopathischer Effekte (cpE) kann die Sensitivität von HSV gegenüber Virostatika bestimmt werden. Es ist möglich, die Auswertung mit Hilfe von Zellstoffwechseltesten, wie z.B. dem Tetrazoliumreduktionstest, zu erleichtern und zu objektivieren. Hierbei kann die Anzahl der stoffwechselfähigen bzw. lebenden Zellen spektrophotometrisch bestimmt werden. Mittels Testung des Virostatikums in einer absteigenden geometrischen Verdünnungsreihe wird die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des zu prüfenden Virostatikums bestimmt, welche zu einer 50%igen Hemmung der Virusreplikation führt. Bislang gibt es noch keine internationale Standardisierung des Cut-off für eine Resistenz, was vor allem auf die Störgröße „Zellkultur“ zurückzuführen ist. Es ist deshalb notwendig, in jedem Versuchsansatz einen TK-positiven Referenzstamm als Kontrolle mitzuführen. Am gebräuchlichsten und zuverlässigsten ist es, für Nukleosidanaloga und Cidofovir von einer Resistenz auszugehen, wenn die IC_{50} des betreffenden HSV-Stammes die IC_{50} des sensitiven Kontrollstammes 3 bis 5fach überschreitet. Für die Testung von Foscarnet hat sich die Zugrundelegung eines Cut-off von 330 μ M bewährt.

Die Vorteile der Phänotypisierung bestehen vor allem in der zweifelsfreien Interpretation der Ergebnisse, weshalb diese Methode bis heute noch als Goldstandard zur Resistenztestung des HSV angesehen wird. Von Nachteil sind der hohe Zeit- und Materialaufwand, was durch die Isolierung und Testung der HSV-Stämme in der Zellkultur bedingt ist, sowie die fehlende Standardisierung. Eine phänotypische Resistenztestung ist praktisch nur möglich, wenn Bläschen- oder respiratorische Abstriche des Patienten vorliegen, aus denen das HSV gut isoliert werden kann. Aus Liquor, Blut oder Proben des Auges ist in den allermeisten Fällen eine Virusisolierung nicht erfolgreich.

Genotypisierung. Beim genotypischen Resistenztest werden meist das TK-Gen und das DNA-Pol-Gen amplifiziert und sequenziert. Anschließend werden die Daten mit einem sensitiven Referenzstamm aus der Genbank (z.B. HSV-1 Stamm 17 Accession No. X14112, HSV-2 Stamm HG52 Accession No. Z86099) abgeglichen. Zum schnellen Auffinden spezieller bekannter Mutationen ist vereinzelt auch die PCR mit modifizierten Primern gebräuchlich. Für eine Resistenz sprechen das Auffinden von Frameshift-Mutationen, zusätzliche Stopp-Codons sowie nicht-synonyme Nukleotidsubstitutionen in konservierten und funktionell wichtigen Genbereichen. Die Interpretation von AS-Substitutionen außerhalb aktiver oder konservierter Genregionen erfordert den Zugriff auf eine Datenbank, in der alle in der Literatur beschriebenen Resistenzmutationen zusammengefasst werden sollten. Die derzeit zuverlässigste und praktikabelste Methode, um die Resistenzassoziation neuer, bislang unbekannter AS-Substitutionen zu belegen, ist der Abgleich von Resistenzphäno- und Resistenzgenotyp bei HSV-Isolaten. Thymidinkinase-Funktionsassays mittels Massenspektrometrie, Chromatographie oder enzymatischer Tests können unterschiedliche Ergebnisse aufweisen. Der wesentliche Vorteil der Genotypisierung besteht in der direkten Testung von Patientenproben, was eine Virusisolierung in der Zellkultur überflüssig macht. In Abhängigkeit von der Höhe der Viruslast, können die Ergebnisse frühestens innerhalb von zwei Tagen vorliegen, was für eine Therapieentscheidung des Kliniklers von großer Bedeutung ist. Limitierend kann sich bei der Analyse des DNA-Pol-Gens die begrenzte Menge an viraler DNA auswirken, wenn ein Virusisolat fehlt. Beim Auffinden bislang unbekannter nicht-synonymer Nukleotidsubstitutionen, insbesondere außerhalb aktiver und konservierter Genbereiche, kann die Befundinterpretation deutlich erschwert sein. Um die Genotypisierung als Methode der Wahl für die Resistenztestung des in breitem Maße HSV zu etablieren, ist noch ein erheblicher Studienaufwand notwendig.

7. Ausgewählte weiterführende Literatur

- Balfour et al. Management of acyclovir-resistant herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994;7:254-260.
- Bohn et al. Gene polymorphism of thymidine kinase and DNA polymerase in clinical strains of herpes simplex virus. *Antiviral Ther* 2011;16:989-997.
- Burrel et al. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010;54:4833-4842.
- Larder and Darby. Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. *Virology* 1986;146:262-271.
- Liermann et al. Evaluation of commercial HSV IgG and IgM enzyme immunoassays. *J Virol Methods* 2014;199:29-34
- Morfin and Thouvenot. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* 2013;26:29-37.
- Safrin et al. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991;325:551-555.
- Sandherr et al. Antiviral prophylaxis in patients with haematological malignancies and solid tumours: Guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Oncol* 2006;17:1051-1059.
- Sauerbrei and Wutzler. Serological detection of type-specific IgG to herpes simplex virus by novel ELISAs based on recombinant and highly purified glycoprotein G. *Clin Lab* 2004;50:425-429.

- Sauerbrei et al. Virological diagnosis of herpes simplex encephalitis. *J Clin Virol* 1999;17:31-36.
- Sauerbrei and Wutzler. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy – current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: Herpes simplex virus infections. *Med Microbiol Immunol* 2007;196:89-94.
- Sauerbrei et al. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Res* 2010;86:246-252.
- Sauerbrei et al. Novel resistance-associated mutations of the thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 and type 2. *Antiviral Ther* 2011;16:1297-1308.
- Sauerbrei et al. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro Surveill* 2011;16:pii=20005.
- Sauerbrei et al. Significance of amino acid substitutions in the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 for resistance. *Antiviral Res* 2012;96:105-107.
- van Velzen et al. Latent acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in trigeminal ganglia of immunocompetent individuals. *J Infect*

Dis 2012;205:1539-1543.

Weller and Kuchta. The helicase-primase complex as a target for herpes viral infection. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:1119-1132.

Zhu et al. HSV-2 vaccine: current status and insight into factors for developing an efficient vaccine. *Viruses* 2014;6:371-390.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Andreas Sauerbrei
Institut für Virologie und Antivirale Therapie
Universitätsklinikum Jena
Konsiliarlabor für HSV und VZV
Hans-Knöll-Straße 2
07745 Jena
Tel. 03641 - 9395700
Fax 03641 - 9395702
E-Mail: Andreas.Sauerbrei@med.uni-jena.de