

Viral Load

und die

PCR

warum sie nicht zum Nachweis der HIV-Infektion dienen können

von Christine Johnson

(aus "Continuum" Vol. 4, No. 4, Nov/Dec. 1996, S. 32 - 37)
übersetzt von Bernd Hauser, Im Rauhmaier 1, D-71717 Beilstein

"Die biotechnische Ausföhrung der Xerox-Maschine (eines Kopiergerätes)" – so nannte das *Forbes - Magazine* die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction – PCR). Diese revolutionäre Technik ermöglicht es einem Wissenschaftler, eine Probe, die nur eine minimale Menge an DNS enthält, zu nehmen und diese DNS-Sequenz zu vervielfachen, bis er eine Million Kopien anstelle von einer oder zwei hat.

Kary Mullis, Erfinder der PCR, erhielt 1993 den Nobelpreis für seine Milliarden-Dollar-Erfindung, die für jedes Genetik-Labor unverzichtbar geworden ist. Es ist eine Ironie, daß eine der ersten Anwendungen der PCR zur Feststellung des HIV diente, wenn man in Betracht zieht, daß Mullis selbst es nicht für möglich hält, daß seine Erfindung dazu geeignet ist. Mullis sagt, das Problem bestehe darin, daß die PCR zur Gründung sei – sie vermehre jede DNS in der Probe, ob sie nun vom HIV herröhre oder von einer Verunreinigung. Wie will man dann wissen, wieviel des vervielfältigten Materials vom HIV stammt und wieviel von Verunreinigung (-en), wenn man ohne die PCR kein HIV in der Probe entdeckte?

Es ist eines der Hauptargumente gegen die HIV/AIDS-Hypothese, daß HIV bei Patienten mit AIDS nie in signifikanten (bedeutsamen) Mengen gefunden wurde, wenn traditionelle Methoden zum Virusnachweis eingesetzt wurden. Viruskultivierung zum Beispiel war hinreichend zum Auffinden anderer Viren, aber nicht von HIV. Warum nicht? Wenn die Viruskultivierung eingesetzt wird, um das HIV zu festzustellen, wird HIV in der Kultur nie gesehen, ja, man schaut nicht einmal danach. Sein Vorhandensein wird mit ganz indirekten Methoden gemessen: Tests zum Nachweis von Reverser Transkriptase oder eines p24-Proteins, die beide nicht spezifisch sind für das HIV. Indirekte Methoden wären nicht nötig, wenn man es von vorneherein mit einer bedeutsamen Menge HIV zu tun hätte.

Mit anderen Worten, wenn eine bedeutende Menge HIV zugegen wäre, müßten die bewährten Labor-Techniken sie aufspüren können. Sie können es aber nicht. Daher brauchen wir nicht nur

die PCR, sondern immer neue Modifikationen (Abänderungen) und Verbesserungen der PCR, durch die versucht wird, das HIV zu finden.

So kam man auf die Idee mit der "viral load" (zu Undeutsch "Viruslast"), angeregt durch zwei Fluten wissenschaftlicher Arbeiten, die behaupteten, HIV repliziere sich fleißig milliardenfach: anfänglich behaupteten gewisse Arbeiten, das HIV "verberge sich in den Lymphknoten"^{1,2}, und in jüngerer Zeit waren es die Ho- und Wei-Arbeiten^{3,4}. Die letzteren versuchten, die "viral load" zu einem gegebenen Zeitpunkt zu messen, wonach dem Patienten dann "antivirale" Medikamente verordnet wurden. Die Medikamente sollten angeblich die

Replikation von neuem HIV verhindern, und entsprechend würde die viral load abnehmen. In wenigen Tagen jedoch würde das verbleibende Virus in eine gegen die Medikamente resistente Form mutieren, und in einigen Wochen würde die viral load wieder zu ihrem ursprünglichen Spiegel vor der Behandlung ansteigen. Indem man diese Dynamik in eine mathematische Formel faßte, wurde angeblich die Vermehrungsrate des Virus bestimmt.

So wurde geboren, was ich "Dr. Ho's Küchen-Ausguß- (oder Wasserbeckenabfluß-) Theorie" nenne. Nach Dr. Ho werden jeden Tag Milliarden HIV-Kopien produziert, die Milliarden von T-Zellen infizieren. Diese T-Zellen würden zerstört nicht durch die HIVs, sondern vom Immunsystem. Sie würden jeden Tag wieder aufgefüllt, aber über die Jahre verliere das Immunsystem an Boden und schließlich gewinne das HIV. Dieser Prozeß wurde mit einem Wasserbecken mit offenem Abfluß verglichen, in das Wasser aus einem Hahn (die nachgelieferten T-Zellen) in einem ein wenig schwächeren Maß strömt, als unten durch den Abfluß wegläuft (infizierte T-Zellen, die zerstört und ausgeschieden werden).

Es ist höchst interessant zu beachten, daß alle viral load-Studien sich völlig auf die PCR und auf ihr verwandte Techniken verlassen. Dieser Artikel wird die PCR als akkurate (zutreffende, richtige) Methode zur Bestimmung der HIV-Infektion

diskreditieren, wodurch wiederum Zweifel auf jede Schlußfolgerung über das HIV fallen, die aufgrund von PCR-Techniken gezogen wurde.

Einige Grundlagen zur DNS

Die PCR nutzt gewisse wesentliche Eigenschaften der DNS. Die DNS (wie auch die RNS [englisch *DNA* und *RNA*]) ist eine Nukleinsäure, und Nukleinsäuren setzen sich aus Nukleotid-"Bausteinen" zusammen. Die DNS besteht aus zwei komplementären Strängen, die in einer Doppelhelix-Formation (zwei ineinander geschlungene Spiralen) angeordnet sind. Diese Stränge bilden sich aus vielen Nukleotiden, die miteinander verbunden eine lange DNS-Kette bilden.

Das Nukleotid-Molekül hat drei verschiedene Teile: eine Phosphorsäuregruppe und einen Zuckerrest (die zusammen das Gerüst, eine bandähnliche Struktur, bilden) und die Base. Es gibt vier verschiedene Basen: A, T, C und G (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin). Diese Basen sind an das Gerüst geheftet, das sich zu der bekannten Doppelhelix (oder -Spirale) windet.

Die Basen des einen Stranges verbinden sich mit den Basen des anderen Stranges, wodurch die DNS ihre stabile Doppelspiralstruktur erhält. (Man kann sich die beiden Stränge wie einen geschlossenen Reißverschluß vorstellen.) Die unverkennbare Eigenart des DNS-Codes eines Lebewesens hängt ab von der Ordnung oder Sequenz der Basen entlang der DNS-Kette.

Die Basen gehen nach festen Regeln chemische Verbindungen mit den anderen Basen ein: A bindet sich nur an T, und C bindet sich nur an G. Eine Base aus dem einen Strang, die mit einer Base aus dem anderen Strang verbunden ist, nennt man ein "komplementäres Basenpaar". Diese Regel der komplementären Basenpaarung gibt der DNS die Fähigkeit, sich selbst genau zu reproduzieren.

Jedesmal wenn sich eine Zelle teilt, muß sie eine Kopie ihrer DNS für die neue Zelle anfertigen. Der DNS-Doppelstrang trennt sich zuerst auf in zwei separate Stränge. Jeder Strang wirkt dann als Vorlage oder Schablone, nach der eine neue Kopie seines komplementär-Stranges gefertigt wird. (Strang Nr. 1 dient also als Schablone zur Fertigung einer neuen Kopie von Strang Nr. 2, und umgekehrt.) Der einfache Strang fügt zu diesem Zweck entsprechend der Regel der komplementären Basenpaarung neue Nukleotidbausteine aus dem umgebenden Material ein. Mit anderen Worten: ein vorhandenes A im einfachen Strang ergreift ein T-Nukleotid, ein C nimmt sich ein G, und so weiter, bis der ganze komplementäre Strang aufgebaut ist. Am Ende dieses Prozesses verbinden sich die beiden ursprünglichen Stränge wieder und die beiden Kopien dienen als DNS für eine neue Zelle.

wie die



funktioniert

Die HIV-Theorie besagt, es enthalte RNS wie andere vermeintliche Retroviren auch, aber keine DNS. Wenn gesagt wird, HIV infiziere eine Zelle, meint man, das Reverse Transkriptase-Enzym transformiere die RNS in komplementäre DNS, die dann in die DNS der Wirtszelle eingebaut wird.

Wenn nun die PCR eingesetzt wird, um humanes Gewebe auf die Anwesenheit von HIV zu untersuchen, so sucht sie nach einem recht kurzen Segment aus dem ganzen zellulären DNS-Strang. Dieses kurze Segment repräsentiert dem HIV zugeschriebenes genetisches Material, das der Theorie nach in die Zell-DNS eingebaut ist. (Viral load-Studien versuchen, zellfreies HIV aufzuspüren. Doch selbst dabei sucht die PCR nur nach einem Teil der ganzen dem HIV zugeschriebenen genetischen Masse [oder des ganzen HIV-Genoms], nicht nach einem vollständigen Virus.)

Die PCR funktioniert in der folgenden Weise:

1. Schritt: Erwärmen der Vorlage (template = Schablone)

Ein langes Stück DNS, welches das kleinere, zu kopierende Fragment enthält, wird erwärmt. Die beiden Stränge können bei erhöhter Temperatur auseinander "geschmolzen" werden; sie kommen beim Kühlen wieder langsam zusammen ("annealing" = Vergüten, Ausglühen; Kühlen; Härten). Die beiden Stränge sind komplementär zu einander. Sie dienen als Vorlagen (Schablonen) für die neuen Stränge.

2. Schritt: Zufügen des Starters (primer)

Etwas, das Primer (Zünder, Anlasser, Starter) genannt wird, ist für den nächsten Schritt erforderlich. Primer sind Nukleotide, die eine kurze Sequenz des neuen Stranges formen. Primer werden gestaltet als Komplementär zu einer bekannten Sequenz, die in einer größeren Sequenz vorhanden ist, und so weiß man, wo sich die Primer anbinden (oder hybridisieren = einkreuzen) werden.

Die Primer heften sich an jedes Ende des DNS-Segmentes, das kopiert werden soll (des Segmentes, welches das als angeblich zum HIV gehörige genetische Material darstellen soll). Die Primer dienen zweierlei Zwecken: a) sie markieren jedes Ende des anvisierten (gesuchten, angezielten) Segmentes, so daß nur dieses Segment vermehrt wird und nicht der ganze Strang, und b) sie sollen den Vervielfältigungsprozeß starten. Die neuen Stränge werden Stück für Stück aufgebaut durch das Wirken eines Polymerase genannten Enzymes. Die Polymerase baut einen neuen Strang entlang einem vorhandenen Strang auf. Sie wirkt aber erst, wenn der alte Strang (die Vorlage) schon ein paar Nukleotide angelagert hat, die eine kurze Sequenz des neuen Stranges (den Primer) bilden. (Wenn Sie je

einen Verweis auf "Template-primers" = "Starter-Vorlage" sehen, dann geht es um diese Sache.)

Mit anderen Worten: die Polymerase kann nur einen neuen Strang bilden, wenn der neue Strang schon ansatzweise geformt wurde. In der Natur, wenn sich z.B. Ihre eigene DNS verdoppelt, wirken andere Enzyme, DNS-Primase genannt, und bauen einen Primer an den alten Strang.

Wenn die Polymerase einmal in Aktion getreten ist, kriecht sie am einfachen DNS-Strang (der Vorlage) entlang und fügt die Nukleotidbausteine einen um den anderen hinzu. Dabei wird der Primer zu einem Teil des neugefertigten Stranges.

In der Natur ziehen die Polymerasen die DNS-Stränge auseinander, solange sie die neuen DNS-Stränge formen. So werden Duplikate der DNS gefertigt, damit die Zellen z.B. im Blut oder in der Haut sich zu zwei neuen Zellen teilen können – ein lebenswichtiger Prozeß.

3. Schritt: Vermehren (Verstärken, Amplifizieren)

Noch einmal: Nach dem "Auseinanderschmelzen" und folgenden Abkühlen ("annealing", Vergüten) der Primer kopiert das Polymerase-Enzym die DNS und beginnt dabei beim Primer; es macht eine Kopie von jedem angezielten Segment. Dieser Prozeß wird in bis zu 30 oder 40 Runden wiederholt. Während jedem Zyklus wird die vorhandene Anzahl an Segmenten verdoppelt – zwei Segmente werden zu vier, vier werden zu acht, dann 16, usw. Am Ende des Prozesses hat man Millionen Kopien des ursprünglichen Segmentes, eine ganze Menge DNS, während man zu Beginn nur einen winzigen Betrag hatte. Daher wird gesagt, die PCR sei fähig, eine "Nadel im Heuhaufen" zu finden.

Offensichtlich kommt es darauf an, daß die Primer HIV-spezifisch sind. Ob die PCR ein amplifiziertes (verstärktes) Ergebnis liefert, hängt davon ab, ob die zugefügten Primer einem Stück der DNS im Prüfgut entsprechen.

Wir werden unten sehen, daß die Spezifität der Primer auf HIV zweifelhaft ist. Selbst wenn die Primer HIV-spezifisch wären, es wären aber

ähnliche Sequenzen im Prüfgut vorhanden, dann würden die Primer unter nicht so strengen Kontrollbedingungen mit verwandten Sequenzen hybridisieren (sich kreuzen oder verbinden), die ihnen weniger als perfekt entsprechen.

Sie werden dann die Polymerase veranlassen, die Vervielfältigungs-Prozedur zu starten, selbst wenn ursprünglich kein HIV vorhanden war.

Einsatz der PCR zum Auffinden von HIV

Ein Problem der HIV-Hypothese bestand darin, daß die Forscher selbst beim Einsatz der Standard-PCR nicht viel HIV (wenn überhaupt welches) in Personen finden konnten, die als AIDS-Fälle diagnostiziert waren. Um dieses Paradox zu lösen, traten die Autoren der neuen "viral load"-Arbeiten mit zwei Modifikationen der PCR hervor, von denen sie behaupteten, daß sie viel effektiver seien im Auffinden von HIV. Es handelt sich dabei um die QC-PCR (oder Q-PCR) und den



Diesen Test verwenden Anthony Fauci (Pantaleo) und Ashley Haase (Embretson) in ihren oben erwähnten Arbeiten. Sie waren der Ansicht, das HIV

verberge sich in den Lymphknoten. Diese Arbeiten wurden als Tatsachen akzeptiert, obwohl die QC-PCR eine nicht validierte (eine unbestätigte) Technik war und bleibt.

Mark Craddock von der Universität Sidney (Australien) erklärte die Grundsätze und Probleme der QC-PCR folgendermaßen:

"Die PCR erzeugt massenweise DNS-Fragmente. Man beginnt mit einer winzigen Menge an DNS, und nach jedem PCR-Zyklus ist die vorhandene DNS-Menge zwischen ein- und zweimal der zu Beginn des Zyklus vorhandenen Menge. Die zu erforschende DNS-Menge vermehrt sich also exponentiell. Die Tatsache, daß es sich bei der PCR um einen exponentiellen

"branched DNA"-Test (bDNA). Und plötzlich – heureka! – wurden Milliarden Kopien von angeblichem HIV gefunden. Der darin bestehende Widerspruch scheint den Autoren dieser Arbeiten entgangen zu sein: Warum braucht man überhaupt solche kräftigen neuen Tests, um eine Mikrobe zu finden, die zu Milliarden vorhanden ist? Da sollten die traditionellen Methoden doch genügen!

Wachstumsprozeß handelt, bedeutet, daß Experimentierfehler sich auch exponentiell vermehren. Daher muß man sehr vorsichtig sein beim Einsatz dieses Prozesses.

Eine Anzahl Leute haben die Überzeugung gewonnen, daß es möglich sein müßte, die in einer Probe vorhandene DNS-Menge durch den Einsatz der PCR abzuschätzen. Das ist die sogenannte "quantitative competitive" PCR (= mengenmäßige Konkurrenz-PCR). Der Grundgedanke besteht darin, zur einzuschätzenden Probe eine bekannte Menge ähnlicher, aber unterscheidbarer DNS hinzuzufügen und beide zusammen zu vermehren. Man nimmt nun an, dabei bleibe das Mengenverhältnis der beiden Produkte gleich und man könnte daher die Größe der ursprünglichen Probe berechnen, wenn man das Verhältnis der beiden verschiedenen DNS zueinander mißt, sobald die PCR meßbare Mengen erzeugt hat, und das dann entsprechend der zugefügten Menge an Kontroll-DNS umrechnet.

Es ist dabei absolut entscheidend, daß die relativen Mengen der zu

testenden DNS und der bekannten Kontrollsubstanz genau gleich bleiben. "Nahezu" ist nicht gut genug. Die geringste Variation wird exponentiell vergrößert und kann massive Fehleinschätzungen hervorrufen.

Die Schwierigkeiten beim quantitativen Einsatz der PCR wurden von Luc Raeymaekers im Journal *Analytical Biochemistry* im Jahr 1993 aufgezeigt. Er bemerkte, daß die veröffentlichten Arbeiten über die QC-PCR Daten enthalten, die zeigen, daß die grundlegende Annahme, die relative Größe der Proben bleibe gleich, sich in der Praxis nicht bestätigen. Trotzdem fahren die HIV-Forscher fort mit dem Einsatz der PCR zur Quantifizierung der viral load (Viruslast). Es gibt einfach keine Möglichkeit zu erfahren, ob eine gemachte Schätzung korrekt oder 100 000-fach zu hoch ist!"

Todd Miller nannte die QC-PCR die "neueste Marotte in der Wissenschaft" und stimmt zu, daß wenn die relativen Mengen der Test-DNS und der bekannten Kontroll-DNS nicht gleich sind, daß man dann eine ganz sichere Aussagemachen könne über die Einschätzung der Ausgangs-

probe (also die Menge an angeblicher HIV-RNS in der ursprünglichen Blutprobe eines Patienten): *Sie wird falsch sein.*

Wie wurde die QC-PCR, trotz allen ihren Mängeln, zu einem akzeptierten HIV-Test? Miller erklärt:

"Die Art und Weise, wie sich diese Situation in der modernen Wissenschaft ergab, ist folgende: Zuerst verbrauchen einige Leute eine Menge Zeit beim Versuch, einen Test zum Funktionieren zu bringen, und wenn sie Erfolg haben, veröffentlichen sie Arbeiten über Einwände gegen die Prozedur. Als Zweites geraten andere an den Test und sie benutzen ihn, um eine Antwort zu erhalten, die "einen Sinn ergibt", und auch sie veröffentlichen ihre Daten als bedeutenden Beitrag auf diesem Gebiet. Drittens, wegen seiner relativen Neuigkeit und geheimnisvollen Natur, verbleibt er als quasi-akzeptiert mit vielen passiven Skeptikern und einigen wenigen Anwendern. Die meisten, die ihn anwenden, sind jedoch mehr an ihrem eigenen Lieblings-Phänomen interessiert als an der Wirkungsweise der Reaktion."



BRANCHED DNA PCR

Diesen Test verwendet Ho in seiner Arbeit. Obwohl es sich genau genommen nicht um eine PCR handelt, wird er als solche bezeichnet, weil es eine PCR-artige Technik einschließt. Der Unterschied besteht darin, daß bDNA das Signal verstärkt, und nicht das Zielobjekt. Das heißt, die übliche PCR vermehrt das Zielobjekt, so daß man es finden kann, während bDNA sozusagen einen hellen Scheinwerfer darauf richtet, so daß man es besser sehen kann. "Project Inform" war so freundlich und sandte mir diese Erklärung über die Funktionsweise von bDNA:⁹

"Kopien einer DNS-(Fang-)Sonde" (Untersuchungs-Vorlage, engl. probe) werden an die Wand eines kleinen Laborgefäßes geheftet. Dann wird die zu testende Probe hineingegeben. (Eine DNS-Sonde ist ein kleines Stück DNS, das zur Ziel-DNS-Sequenz komplementär ist.) Diese "Sonde" bindet sich an eine bestimmte Stelle der HIV-RNS, wenn sie in der Probe vorhanden ist, und hält so die RNS im Gefäß fest. Dann wird eine andere DNS-Sonde hineingegeben. Ein Ende davon hängt sich an eine andere Stelle der HIV-RNS. Das andere Ende der zweiten Sonde hat viele Zweige (branches) und jeder Zweig endet mit einem chemischen "Reporter"-Präparat, welches unter gewissen Bedingungen Licht erzeugt, das wiederum durch ein Laborgerät wahrgenommen werden kann. Jedes HIV-RNS-Molekül kann sich an eine dieser Zweigstrukturen heften und eine kleine Anzahl solcher Lichtquellen festhalten, nicht nur eine einzige. Auf diese Weise können sehr kleine Mengen der Ziel-RNS wahrgenommen werden, ohne daß die PCR-Vervielfältigung nötig wäre."

In seiner ursprünglichen Arbeit gab Ho keine Daten über die Protokolle für diesen Test, oder ob die Sache zuverlässig wäre. Der Leser wurde auf zwei andere Arbeiten verwiesen, die sich "im Druck" befänden. Es waren

also zu jenem Zeitpunkt keine Daten erhältlich für einen, der diese Methode verifizieren wollte. Zur Bestätigung der durch bDNA erhaltenen Daten wurde die QC-PCR herangezogen, wobei die Einzelheiten der QC-PCR in einer von vier Co-Autoren der Wei-Studie verfaßten Referenz dargelegt wurden – und diese Leute können kaum als unabhängige oder objektive Forscher bezeichnet werden. In der Tradition der HIV-Forschung werden unbestätigte Theorien und fehlerhafte Studien ohne zu fragen angenommen und dem "Konventionellen Wissen" einverleibt, bevor sie bewertet (validiert) sind, wie es sich gehört. Dann ist der Schaden angerichtet, und wenn nachträgliche Mängel entdeckt werden, wird das nicht weiter beachtet.

Die Technik der bDNA ist komplex: Fünf verschiedene Hybridisierungs-Reaktionen laufen ab. Hybridisierung ist eine Standard-Technik, wobei eine DNS-Sonde (oder Vorlage) in eine Probe gegeben wird, wo sie sich an jedes komplementäre Segment, das sie findet, anbindet. Es handelt sich um einen weiteren indirekten Test, der mit einer Menge an Problemen verknüpft ist. Nach dem Molekularbiologen Bryan Ellison "funktioniert Molekularbiologie nur dann, wenn die Stoffe zuerst gereinigt werden. Es besteht immer die Möglichkeit von Kreuzreaktionen, besonders dann, wenn man die Sonden (Vorlagen) in eine dicke Suppe aus Proteinen hängt" (was die zu untersuchende Blutprobe ja in Wirklichkeit ist).

Duesberg verweist auf folgendes: Nachdem Ho die angemessenen Berichtigungen in seinen Kalkulationen vorgenommen hatte, fand er schließlich selbst, daß die mehr als 10 000 Viren, auf die er aufgrund des bDNA-Tests (assay) in seiner in *Nature* veröffentlichten Arbeit geschlossen hatte, in Wirklichkeit weniger als einem infektiösen Virus entsprachen! Da wundert man sich, was denn überhaupt in diesen Tests gemessen wird.¹⁰ Doch diese spekulativen und nicht bewerteten (unvalidierten) Arbeiten wurden als absolute Wahrheit akzeptiert!

Nach Ellisons Meinung ist Ho's Studie "reine Phantasie. Es gibt keine Arbeit, welche die viral load glaubhaft macht."

Die Probleme mit der PCR



DIE GENAUIGKEIT DER PCR WURDE NIE DURCH EINEN ANGEMESSENEN GOLDSTANDARD VERIFIZIERT

Um festzustellen, ob irgendein diagnostischer Test auf die HIV-Infektion überhaupt funktioniert, ist es erforderlich, daß der Test durch einen unabhängigen Goldstandard verifiziert (oder geeicht) wird. Der einzige diesem Zweck angemessene Goldstandard ist das HIV selbst. Mit anderen Worten: die Ergebnisse eines experimentellen Testes, sei es die PCR oder eine andere Testart, muß mit dem Ergebnis einer Virus-Isolation von jeder Probe verglichen werden. Wenn Virus wirklich in jedem Patienten mit einem positiven PCR-Test gefunden wird, und bei jedem Patienten mit negativer PCR kein Virus zu finden ist, dann könnte man sagen, die PCR sei äußerst genau im Aufspüren von HIV.

Das Konzept der Virusisolation als Goldstandard ist im Fall des HIV besonders wichtig, da das HIV äußerst schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, in genetischer oder molekularer Hinsicht zu definieren war. Selbst wenn irgend jemand irgendwann eine Isolation des HIV ausgeführt hätte¹¹, so wurde sie doch nie als Goldstandard für irgendeinen diagnostischen HIV-Test einschließlich der PCR eingesetzt. Beim jetzigen Stand verwendet die bDNA die QC-PCR als Goldstandard; die QC-PCR gebraucht die reguläre PCR als Goldstandard; die reguläre PCR gebraucht Antikörpertests als Goldstandard; und die Antikörpertests setzen sich gegenseitig dazu ein. Ich habe ein ums andere Mal festgestellt, daß Studien, die einen HIV-Antikörpertest "verifizierten", ausnahmslos erklärten, daß sie die Wirksamkeit ihres Tests anhand von Proben bewerteten, die als ECHT-POSITIV oder als ECHT-NEGATIV *bekannt* waren. Woher wußten sie das? Es ist einfach: Ohne Goldstandard wußten sie es nicht!

Manchmal wird argumentiert mit "Studien haben gezeigt", daß diese Tests miteinander übereinstimmten, oder die Befunde bestätigten sich gegenseitig, und daher müßten sie doch korrekt sein. Das ist kein streng wissenschaftliches Denken. Manchmal kann man die Ergebnisse verschiedener Tests miteinander in Einklang bringen, aber das *beweist* nichts – nichts mehr als was bewiesen wäre, wenn fünf Verbrecher darin übereinstimmten, daß sie sich irgendwo anders befanden, als die Bank ausgeraubt wurde.

Eleni Papadopulos-Eleopulos sagt folgendes zur Wichtigkeit des Goldstandards: "Der Einsatz der Virus-Isolation als ein unabhängiges Mittel zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit des Virus ist unter dem Fachausdruck "Goldstandard" bekannt; sie ist ein essentielles Element für die Legalisierung jedes diagnostischen Testes. Ohne Goldstandard bewegt sich der Forscher hoffnungslos in der Irre, weil er keinen selbständigen Maßstab hat, mit dem er den Test bewerten kann, den er entwickeln will... Nur mit diesem Mittel können wir die Patienten versichern, daß eine positive HIV-PCR nur bei Anwesenheit einer tatsächlichen HIV-Infektion gefunden wird, d. h. daß die Tests wirklich hoch spezifisch für die HIV-Infektion sind."

Sogar der bekannte AIDS-Forscher William Blattner hat zugegeben, daß "die eine Schwierigkeit beim Eichen (Prüfen) der Spezifität und der Sensitivität der Untersuchungstests (Assays) auf menschliche Retroviren (einschließlich des HIV) das Fehlen eines unwiderruflichen 'Goldstandards' ist. Durch das Fehlen von Goldstandards für sowohl HTLV-I als auch HIV-1 bleiben die wirkliche Sensitivität und Spezifität für das Aufspüren viraler Antikörper ungenau."¹²

Mark Craddock erklärt, daß die QC-PCR nicht verifiziert wurde und wahrscheinlich auch nicht verifizierbar ist. Er fragt: "Wenn die PCR die einzige Weise ist, auf die das Virus ermittelt werden kann, wie will man dann die genaue viral load unabhängig von der PCR feststellen, so daß man sicher sein kann, daß die von der PCR gelieferten Zahlen korrekt sind?" Solche Überlegungen sind wohl nicht zu den AIDS-Forschern durchgedrungen, wenn sie regelmäßig empfehlen, daß die PCR und besonders die QC-PCR als Goldstandard für andere HIV-Tests verwendet werden sollen.^{9,13}



DIE SPEZIFITÄT DER PCR WURDE NIE ERMITTELT

Spezifität bedeutet, wie oft ein Test negative Ergebnisse liefert bei Personen, die nicht infiziert sind. Die Spezifitätsrate eines Tests zeigt auf, wieviel falsch positive Ergebnisse beim Einsatz dieses Tests zu erwarten sind. Ohne eine Virus-Isolation als Goldstandard wird die wirkliche Spezifität nie bekannt. Selbst bei Verwendung einer Übereinstimmung mit Antikörpertests als Goldstandard wurde die PCR nicht als besonders spezifisch für HIV befunden.⁶

Indem er eine Leistungsfähigkeits-Studie zitierte, die fünf Labors mit großer PCR-Erfahrung umfaßte, erklärte Sloand, die mittlere Spezifität sei 94,7% gewesen.¹⁴ Zum Teil hätte sie nur 90% betragen. Zahlen in den 90ern mögen gut klingen, das ist aber in Wirklichkeit nicht der Fall. Die Anzahl der falsch Positiven verglichen mit den echt Positiven hängt ab von der Verbreitung der HIV-Infektion in einer zu testenden Population¹⁵ – je niedriger die Verbreitung, um so viel mehr falsch Positive.

Sloand kommentiert: Wenn die in dieser Studie erreichten Spezifitäts-Niveaus auf die Population der potentiellen Blutspender Anwendung fände (Blutspender gehören zur allgemeinen Bevölkerung mit niedriger Infektionsrate), dann würden "...für jede entdeckte verborgene Infektion 1800 nicht infizierte Spender als PCR-positiv klassifiziert und 3500 als PCR-ungewiß (unbestimmt). Die PCR ist also ganz klar ungeeignet für die Routineuntersuchung von gespendetem Blut" und folglich auch von jeder Population mit niedriger Verbreitungsrate. Bei einer Spezifität von 90% würde ich sagen, daß sie überhaupt nicht zum Testen irgendeiner Population geeignet ist.

In einem Fax, das ich 1994 von den Centers for Disease Control (CDC) bekam, mit Bezug auf die PCR, erklärten sie, "weder ihre Spezifität noch ihre Sensitivität ist bekannt", und "die PCR wird nicht empfohlen und ist auch nicht lizenziert für diagnostische Routine-Zwecke."¹⁶

In aller Kürze: "Die Spezifität jeder Art von PCR für das HIV-Genom wurde nicht bestimmt."²⁵



PCR -PRIMER SIND NICHT SPEZIFISCH

Nach Papadopulos-Eleopulos, Turner und Papadimitriou ist "...das Minimum-Erfordernis für[die Interpretation, daß ein positives PCR-Signal, oder Hybridisation im allgemeinen, eine HIV-Infektion nachweist] ist der vorherige Beweis, daß die PCR-Primer und die Hybridisierungs-Sonden (Vorlagen, "probes") zu einem speziellen Retrovirus namens HIV gehören, und daß die PCR und die Hybridisierungsreaktionen HIV-spezifisch sind." Turner sagte mir: "Die Argumente (Folgerungen, Behauptungen) über das Genom aufgrund der PCR, erfordern unbedingt die Isolierung des HIV. Wie sonst will irgend jemand den Ursprung der Nukleinsäure kennen?"

Papadopulos-E. bestreitet das Vorhandensein eines unverkennbaren HIV-Genoms. Indem sie seine Existenz zwecks Erörterung der Streitfrage einmal annimmt, bringt sie folgendes Beweismaterial vor, um zu zeigen, daß die PCR nicht-spezifisch für HIV ist:¹⁷

- Es gibt keinen Weg, um sicher zu gehen, daß die "HIV"-Nukleinsäure-Vorlagen (Sonden) und PCR-Primer spezifisch für HIV sind, weil die meisten, wenn nicht alle Vorlagen (Sonden), die für Hybridisierungs-Versuche Verwendung finden, einschließlich der PCR-Vorlagen und Primer, von "HIV" gewonnen wird, das in Gewebekulturen gezüchtet wurde unter Verwendung von Zellen (sie werden als Zell-Linie bezeichnet), die von einem Patienten mit T4-Zell-Leukämie stammen, einer Krankheit, von der Gallo behauptet, sie werde von einem dem HIV ähnlichen Retrovirus – HTLV-1 – verursacht. Und kürzlich wurde behauptet, ein Retrovirus sei isoliert worden aus einer nicht HIV-infizierten Zellkultur unter Verwendung einer anderen Zell-Linie. Es wurde also gezeigt, daß die Standard-Zell-Linien, die man zur Anzucht von HIV verwendet, andere Retroviren aufweisen. Da selbst die anerkannte Methode der Retroviren-Isolation (die beim HIV bis heute noch nicht ausgeführt wurde) das eine Retrovirus nicht von einem anderen unterscheiden kann, so kann man auch nicht darauf vertrauen, daß "HIV"-Nukleinsäure-Vorlagen (Sonden) und PCR-Primer wirklich HIV-spezifisch sind.

- Angebliche HIV-Gene hybridisieren mit den strukturellen Genen von HTLV-I und HTLV-II, zwei anderen humanen Retroviren. Das bedeutet, daß die Vorlagen (Sonden), wenn sie genetisches Material von diesen anderen Retroviren finden, sich daran heften und ein Signal abgeben, als hätten sie HIV gefunden. Da angenommen wird, daß 10% der als AIDS-Fälle diagnostizierten Patienten HTLV-I-Träger sind und daß das normale humane Genom dem HTLV-I und dem HTLV-II verwandte Sequenzen enthält, kann man diese Art von Kreuzreaktion erwarten.

- Normale menschliche Zellen enthalten hunderte oder tausende von retrovirenähnlichen Sequenzen, also kleine Abschnitte von DNS, die kleinen Stücken des angeblichen HIV-Genoms oder anderer Retroviren entsprechen. Und, da die PCR oft nur einen kleinen Teil des ganzen Genoms, wonach sie auch immer sucht, verstärkt oder vermehrt, wie will man wissen, ob das, was sie findet, nicht eine normale Gensequenz der Zelle ist, die zufällig einem Teil dessen entspricht, was als HIV angenommen wird?

- Ein weiterer Beweis dafür, daß die PCR nicht-spezifisch ist, liegt darin, daß man positive PCR von Zellen ohne Nukleinsäuren erhalten kann. Wenn keine Nukleinsäure da ist, ist auch keine DNS oder RNS da, und wo DNS und RNS fehlen, ist ganz gewiß auch kein HIV vorhanden.

- Auch die in den Labors zur Präparation von Gewebekulturen verwendeten Chemikalien (Puffer und Reagenzien genannt) können Signale auslösen, die eine HIV-positive PCR vortäuschen.¹⁸



DIE PCR NIMMT NUR EIN KLEINES FRAGMENT DES GANZEN VIRUS WAHR

Die PCR nimmt höchstens einzelne Gene wahr, meistens aber nur Stücke eines Gens. Wenn die PCR zwei oder drei Genfragmente aus einem möglichen Dutzend kompletter Gene findet, dann ist das kein Beweis, daß alle Gene (das ganze Genom) vorhanden sind. Ein Teil eines Gens entspricht nicht einem kompletten Viruspartikel.

HIV-Experten geben zu, daß die Mehrheit der angeblichen HIV-

Genome unvollständig sind; sie konnten damit nie die Synthese einer Virus-Partikel ausführen.

Turner erklärt: "Selbst wenn alle Genome komplett wären – der Besitz der Pläne bedeutet noch nicht, daß man das Haus gebaut hat. Man kann ein ganzes Retrovirusgenom in seinen Zellen ein Leben lang mit sich herumtragen, ohne je eine Viruspartikel auszubilden." Diese beiden Probleme machen die Bedeutung einer positiven PCR noch ungewisser.

DAS AUFFINDEN VON "HIV-RNS" MITTELS PCR BEDEUTET NICHT DIE ANWESENHEIT VON HIV

In diesen Tagen hört man immer wieder den Ausdruck "HIV-RNS-PCR". Was für ein Unterschied besteht zwischen dieser und der alten regulären DNS-PCR? Die reguläre PCR sucht nach der DNS-Version dessen, was als das HIV-Genom betrachtet wird; die RNS-PCR sucht nach der RNS-Version, das heißt nach freiem Virus, das noch keine Zelle infiziert hat.

Bei der neuen Idee, daß das HIV sich eifrig milliardenweise vermehre, fand man es wichtig zu wissen, wieviel freies Virus zu irgendeinem Zeitpunkt vorhanden ist. Freies Virus würde nur RNS enthalten. Wenn also die PCR eine Menge "HIV-RNS" ermittelte, so glaubte man, Milliarden Kopien an freiem Virus schwärmten durch das Gewebe des Patienten. Mit anderen Worten: Wenn man RNS findet, hat man auch das HIV gefunden. Da man meint, das HIV enthalte zwei RNS-Stränge, lautet die Formel: Zwei RNS = ein Virus.

In der Wirklichkeit sind die Dinge nicht so einfach. 1993, während der "HIV verbirgt sich in den Lymphgefäßen"-Phase der viral load-Theorie, gaben Piatak und seine Kollegen einschließlich Shaw zu, daß man, um die Menge der HIV-Partikeln zu bestimmen, zuvor wissen muß, ob die RNS wirklich zu einer HIV-Partikel gehört.⁵ Kein derartiger Nachweis wurde erbracht. Keine Beziehung wurde bis jetzt nachgewiesen zwischendem Betrag an RNS und der Anzahl von Partikeln, die vorhanden oder auch nicht vorhanden sein mögen. Und niemand hat nachgewiesen, ob die RNS von einer Viruspartikel oder von irgendwo anders her stammt. Wie will man ohne Virus-Isolation wissen, woher die Nukleinsäure (RNS) kommt?

ZELLFREIES VIRUS IST NICHT GLEICH INFEKTIÖSES VIRUS

Selbst wenn Ho recht hätte mit den Milliarden von zellfreiem HIV im Blutkreislauf, so ist zellfreies Virus per definitionem nicht-infektiöses Virus; es ist irrelevant (es hat keine Bedeutung) als Pathogen. Damit HIV eine Zelle infizieren kann, muß sein Hüllprotein, gp120, an den CD4-Rezeptor auf der Zelloberfläche andocken. Jedoch schon 1983 hat Gallo darauf hingewiesen, daß "die Virushülle, die zur Infizierung unbedingt erforderlich ist, sehr zerbrechlich (instabil) ist. Sie neigt zur Auflösung, sobald das Virus aus infizierten Zellen ausknospt, und macht so die Partikeln unfähig, neue Zellen zu infizieren." Daher sei, so sagte Gallo, "wohl ein Kontakt von Zelle zu Zelle erforderlich" für retrovirale Infektion. Da gp120 "entscheidend ist für die Fähigkeit des HIV, neue Zellen zu infizieren" und da gp120 bei den zellfreien Partikeln nicht gefunden wird, so wären selbst große Mengen freies HIV, wenn sie im Blut vorhanden sind, nicht-infektiös.¹⁷

DIE PCR IST NICHT STANDARDISIERT UND NICHT REPRODUZIERBAR

In einer neueren Arbeit kommentieren Teo und Shaunak die "in situ"-PCR: "Trotz erheblicher Anstrengungen ist dieses Verfahren technisch immer noch schwierig; es hat sich noch nicht als zuverlässig oder reproduzierbar erwiesen."¹⁹

In einer Studie, die PCR-Ergebnisse mit Ergebnissen von Antikörpertests verglich, wurde die PCR als nicht reproduzierbar befunden und "falsch positive und falsch negative Ergebnisse wurden in allen Laboren beobachtet (die Übereinstimmung mit den Antikörper-testen bewegte sich zwischen 40% und 100%)."²⁰

DIE PCR IST ANFÄLLIG FÜR KREUZ-KONTAMINATION

Winzige Mengen an Nukleinsäuren von vorhergehenden Proben können leicht die im Augenblick getestete Probe verunreinigen und zu einem falsch positiven Resultat führen.²¹ Sogar mikroskopische Spuren von Haut oder Haar des Labortechnikers kann dieses Problem auslösen. Es gibt viele Quellen für Kreuzkontamination, und es kann "bei jedem Schritt der Prozedur geschehen, vom Besorgen der Proben bis zur letzten Vervielfältigung (Amplifikation)..."²²

Es werden noch andere Ursachen für falsch positive Ergebnisse von Teo und Shaunak aufgezählt: "Wir haben jetzt eine Anzahl Faktoren identifiziert, die beitragen können zu mangelhafter Vervielfältigung der Ziel-DNS und zur Erzeugung falsch positiver Signale. Diese Faktoren schließen ein die Einwirkung der Fixierung, die Absonderung des Reagens (reagent abstraction), die DNS-Auftrennung, das Markieren der DNS-Enden und product diffusion (? ich weiß nicht, was damit gemeint ist, d. Übers.)... Wir meinen, daß eine Menge Vorsicht angebracht ist bei der Interpretation von Ergebnissen aus der Anwendung der PCR *in situ*."¹⁹

FALSCH POSITIVE ERGEBNISSE KOMMEN OFT VOR BEI DER PCR

- Eine Studie zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der HIV-PCR beim Ermitteln zellfreier DNS ergab "eine beunruhigend hohe Rate nicht-spezifischer Positivität" bei Verwendung der gewöhnlich eingesetzten Primer (SK38/39 für das gag oder p24 Gen). Es wurden in der Tat ähnliche Raten von Positivität sowohl für Antikörper-negative wie für Antikörper-positive Proben gefunden (18% gegen 26%).²¹
- Von 30 nicht infizierten Kindern hatten 6 "gelegentlich" positive PCR Resultate.²⁴
- An nicht infizierten Kleinkindern (unter einem Jahr alt) durchgeführte PCR ergaben bei 9/113 (=9 von 113); 15/143; 13/137; 7/87 und 1/63 Kindern einen positiven PCR-Test.²⁵
- Aus 117 nicht infizierten Kindern von HIV-infizierten Müttern hatten 6 (5%) eine falsch positive PCR im Nabelschnur-Blut.²⁶
- Bei einer PCR-Leistungsfähigkeits-Studie hatten 54% der betreffenden Labors Probleme mit falsch positiven Ergebnissen; 9,3% aller nicht infizierten Proben wurden als positiv gemeldet.²²
- Einer aus 69 AK-negativen, Nicht-Serokonvertierten war PCR-positiv.²⁷
- Eine Person mit hohem Risiko war zuerst PCR-positiv, bei mit derselben Probe in zwei verschiedenen Laboren wiederholten PCR-Tests jedoch negativ.²⁷
- Die PCR-Arbeitsgruppe der WHO wies hohe Raten falsch positiver Resultate nach, die bei "blinden" HIV-PCR-Studien gewonnen wurden.²²
- Sheppard *et al.* erklärten in ihrer Studie: "Dieser Versuch demonstrierte, daß falsch positive Ergebnisse selbst bei strengen Test-Algorithmen mit solcher Häufigkeit unter nicht infizierten Individuen auftreten, daß sie ein ernstes Problem bilden."²⁸
- Von 327 im Gesundheitsdienst Beschäftigten, die durch Nadelstichverletzungen mit HIV in Berührung kamen, hatten 4 ein oder mehrere positive PCR-Ergebnisse und 7 ein unbestimmtes Ergebnis. Spätere Proben waren bei allen negativ und keiner serokonvertierte oder entwickelte p24-Antigen-Ämie, was zur Folgerung führte, daß "falsch positive Resultate sich selbst unter den strengsten Testbedingungen ergeben."²⁹

Schlußfolgerung

Wesentlich für Dr. Ho's Theorie ist die Vorstellung, das HIV würde so schnell mutieren, daß es innerhalb von Tagen oder Wochen resistent werde gegen ein antivirales Medikament, das der Patient einnimmt. Um das zu vermeiden, wird empfohlen, daß der Patient eine aus drei Mitteln zusammengesetzte "Kombi-Therapie" nimmt, die das HIV theoretisch von allen Seiten gleichzeitig angreift und so die Chance reduziert, daß eine resistente HIV-Linie überlebt. Inzwischen soll die "viral load" regelmäßig durch Tests kontrolliert werden, die 200 \$ das Set kosten. Nachdruck wird gelegt auf frühzeitigen Einsatz, ja, am besten gebe man den Patienten die Mehrfach-Therapie, sobald sie serokonvertieren (vorausgesetzt, daß überhaupt jemand weiß, wann dieses Ereignis geschieht), und halte sie bei diesen Drogen für den Rest ihres Lebens.

Obwohl niemand bewiesen hat, daß sie zutreffend und genau sind, wird kräftig für viral load-Messungen geworben als dem Stand der Wissenschaft entsprechende Notwendigkeit für PWA's (People with AIDS = AIDS-Patienten), und es fällt nicht schwer, sich vorzustellen, warum. In der *Washington Post* (2.06.96) offenbarte David Brown versehentlich den Grund: "Aggressive HIV-Behandlung wird möglicherweise noch teurer als bisher. Das Messen der viral load wird etwa 200 \$ pro Test kosten, und die neue Generation der HIV-Medikamente wird wahrscheinlich mindestens so teuer sein wie jene, die sie ersetzt."

U.S. News and World Report (2.12.96) ging mehr in die Einzelheiten. Sie schätzen die jährlichen Kosten für einen Protease-Inhibitor auf 6000 \$, und die Kosten einer Dreierkombination auf 12 000 bis 18 000 \$. Kombinationen von drei oder vier Mitteln werden jetzt verordnet, wo bisher eines (AZT) genügte. Da mehr und mehr Mittel als notwendig erachtet werden zur "Behandlung" der Leute, von denen vielen gar nichts fehlt, ist es offensichtlich, was für ein Goldesel das für die pharmazeutische Industrie darstellt.

Die viral load-Theorie hat eine neue Sorge hervorgerufen, die unerträglich Streß im Leben verzweifelter Leute erzeugt. Es wurde gesagt, ein Betroffener habe nur einen Versuch mit den neuen "antiviralen" Drogen, vor allem bei den Protease-Inhibitoren. Werden sie nicht zur genau richtigen Zeit genommen, in der genau richtigen Kombination und Dosierung, oder wenn man dummerweise nur eine Droge aufs Mal nimmt, oder die Dosis verringert, weil die verordnete Menge einen krank macht, dann wird das Virus resistent und die Drogen werden nie mehr wirken. Und aus demselben Grund darf man auch nicht einfach aufhören, selbst wenn sie einen todkrank machen.

Bisher vertritt jeder Artikel über dieses Thema eine andere Expertenmeinung darüber, wie dieses ganze

Programm funktionieren soll. Niemand weiß, ob es Heilung bringen oder einen nur gerade so am Leben erhalten kann. Niemand kennt die Langzeit-Prognose für die Teilnehmer dieser dreifach giftigen "Kombi". (Protease-Inhibitoren haben bei vielen Patienten extreme Nebenwirkungen hervorgerufen, daher kann man sich das unschwer ausrechnen.) Wer immer dumm genug ist, sich dafür zu melden, wird ein Versuchstier für Leute, die "nicht wissen, was sie tun".

Wann werden wir aufhören zu erlauben, daß wir als Versuchskaninchen gebraucht werden für jedes verrückte Projekt, das unsern Weg entlang kommt? Wann strzen wir einen Riegel an unseren Geldbeutel und weigern uns, für das Privileg, vergiftet zu werden, auch noch zu bezahlen? Und wann werden wir damit aufhören, die am meisten entarteten menschlichen Wesen, die es gibt, zu unterstützen – diejenigen, die vom Leiden anderer profitieren?

Mit Dank an: Paul Philpott, vormals Forschungsassistent in Immunologie und jetzigem Herausgeber von "Reappraising AIDS" und Todd Miller, Ph.D. in Biochemie und Molekularbiologie, von der Universität Miami.

REFERENCES

1. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, et al. 1992. "Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS." *Nature*. 362:359-362.
2. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest J, et al. 1993. "HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease." *Nature*. 362:355-358.
3. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. 1995. "Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection." *Nature*. 373:123-126.
4. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. 1995. "Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection." *Nature*. 373:117-122.
5. Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou J. 1995. "Turnover of HIV-1 and CD4 lymphocytes." *Reappraising AIDS*. 3(6):2-4.
6. Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou J. Letter to *Nature*. 1994. "Is HIV really hiding in the lymph nodes?"
7. Duesberg P, Bialy H. "Responding to 'Duesberg and the new view of HIV'" in *AIDS: Virus- or Drug-Induced*. Kluwer Academic Publishers, Boston (1996).
8. Craddock M. 1995. "HIV: Science by Press Conference." *Reappraising AIDS*. 3(5):4.
9. Project Inform Fact Sheet: PCR Tests. August 1, 1995.
10. Duesberg P, Bialy H. 1995. "HIV an illusion." *Nature*. 375:197.
11. Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF and Papadimitriou JM. 1993. "Is a positive Western Blot proof of HIV infection?" *BioTechnology*. 11:696-707.
12. Blattner WA. 1989. Retroviruses. pp545-592. In *Viral Infections in Humans*, third edition, edited by A Evans. Plenum Medical Book Company, New York.
13. Macy E, Adelman D. 1988. Letter to *New England Journal of Medicine*. December 15.
14. Sloand E, Pitt E, Chiarello R, et al. 1991. "HIV Testing: State of the art." *JAMA*. 266:2861.
15. Maver, Robert. April 1993. "Testing AIDS Tests." *Rethinking AIDS*. 1(4):4.
16. Centers for Disease Control Faxback document #320320, January 1993.
17. Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou J, Casner D. 1995. "Factor VIII, HIV, and AIDS in hemophiliacs: An analysis of their relationship." *Genetica*. 95(1-3):25-50.
18. Conway B. 1990. "Detection of HIV-1 by PCR in Clinical Specimens," p40-45, in *Techniques in HIV Research*, edited by A Aldovini and BD Walker, MacMillan, New York.
19. Teo IA, Shaanak S. 1995. "PCR in situ: aspects which reduce amplification and generate false-positive results." *Histochem. J.* 27:660.
20. Defer C, Agut H, Garbarg-Chenon A, et al. 1992. "Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA." *AIDS*. 6:659.
21. Bootman JS, Kitchin PA. 1994. "Reference preparations in the standardization of HIV-1 PCR: An international collaborative study." *J. Vir. Meth.* 49:1-8.
22. Bootman JS, Kitchin PA. 1992. "An international collaborative study to assess a set of reference reagents for HIV-1 PCR." *J. Vir. Meth.* 37:23.
23. Busch MP, Henrard DR, Hewlett IK, et al. 1992. "Poor sensitivity, specificity, and reproducibility of detection of HIV-1 DNA in serum by polymerase chain reaction." *J. AIDS*. 5:872.
24. Garbarg-Chenon A, Segondy M, Conge A, et al. 1993. "Virus isolation, polymerase chain reaction and in vitro antibody production for the diagnosis of pediatric human immunodeficiency virus infection." *J. Vir. Methods*. 42:117.
25. Pau MO, Tetali S, Lesser ML, et al. 1996. "Laboratory diagnosis of infection status in infants perinatally exposed to human immunodeficiency virus type 1." *J. Inf. Dis.* 173:68.
26. Simonon A, Lepage P, Karita E, et al. 1994. "An assessment of the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 by means of polymerase chain reaction." *J. AIDS*. 7:952.
27. Celum CL, Coombs RW, Lafferty W, et al. 1991. "Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western Blots: Seroconversion risk, specificity of supplemental tests, and an algorithm for evaluation." *J. Inf. Dis.* 164:656.
28. Sheppard HW, Ascher MS, Busch MP, et al. 1991. "A multicenter proficiency trial of gene amplification (PCR) for the detection of HIV-1." *J. AIDS*. 4:277.
29. Gerberding JL. 1994. "Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: Final report from a longitudinal study." *J. Inf. Dis.* 170:1410.