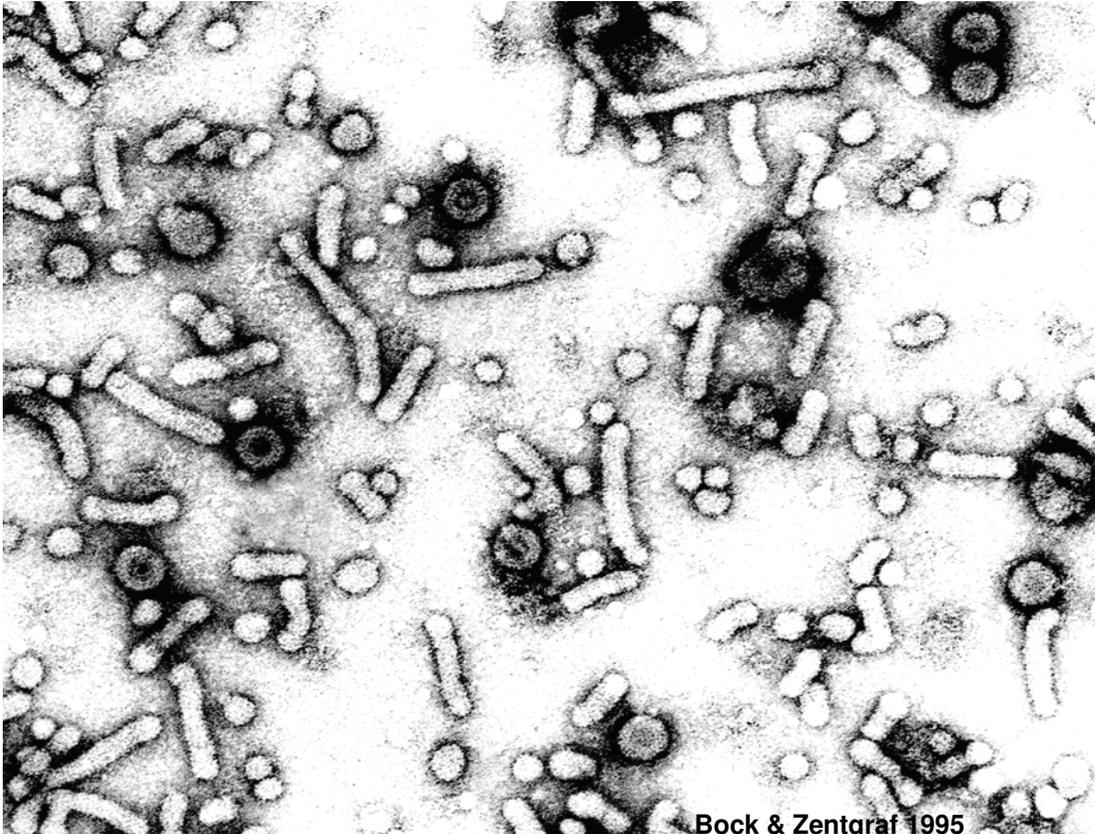




Relevanz von Virusvarianten für Diagnostik, Therapie und Krankheitsverlauf am Beispiel der Hepatitis B



Thomas Bock, PhD
Robert Koch-Institut, Berlin
FG15, Molekulare
Epidemiologie viraler
Erreger

*Fortbildung für den Öffentlichen Gesundheitsdienst
Berlin, 24. – 26. März 2010*

Virus Hepatitis

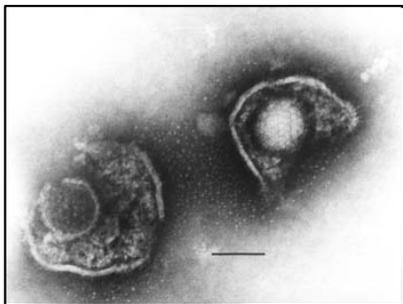
Hepatitis-Viren:



Bock & Zentgraf 1995

- Hepatitis A Virus (HAV, Picornaviren)
- Hepatitis B Virus (HBV, Hepadnaviren)**
- Hepatitis C Virus (HCV, Flaviviren, Hepaciviren)
- Hepatitis D Virus (HDV, Viroid)
- Hepatitis E Virus (HEV, Caliciviren)
- Hepatitis G Virus (GBV-C, Flaviviren)
- TT-Virus (Circoviren)
- SENV-D/H-Virus (Circoviren)
- NonA-nonG Viren

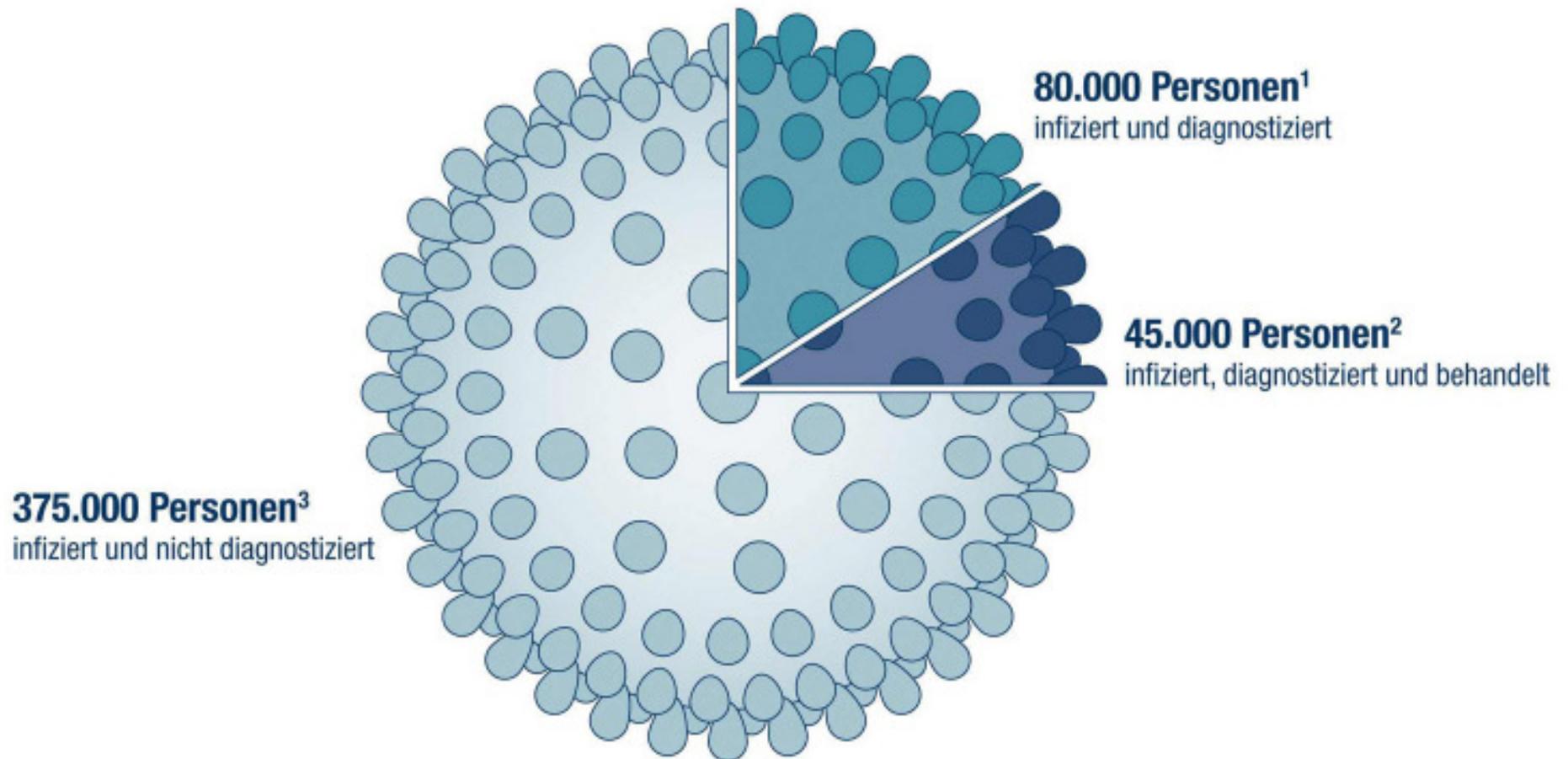
Andere Virusinfektionen mit Folge Hepatitis:



http://www.clinical-virology.org/gallery/cvn_em_01.html

- Humanes Cytomegalie Virus (HCMV, HHV5, Beta-Herpesvirus)
- Herpes simplex Virus (HSV1, [HSV2], Alpha-Herpesvirus)
- Epstein Barr Virus (EBV, HHV4, Gamma-Herpesvirus)
- Gelbfieber Virus (Yellow fever virus, YFV, Flaviviren)

Hepatitis B in Deutschland: unterdiagnostiziert und unterbehandelt.



Insgesamt sind in Deutschland schätzungsweise bis zu 500.000 Menschen chronisch mit Hepatitis B infiziert. Lediglich 25 Prozent wissen von ihrer Erkrankung. Weniger als 9 Prozent werden behandelt.

¹Potthoff A, Schüler A, Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiologie der Virushepatitis A, B und C. In: Selmair H, Manns MP (eds): Virushepatitis als Berufskrankheit. Landsberg: ecomed 2003; 13-22.

²Rychlik R. Gutachten über die Unterversorgung mit Arzneimitteln in Deutschland für den Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. Addendum Juli 2007. Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V.

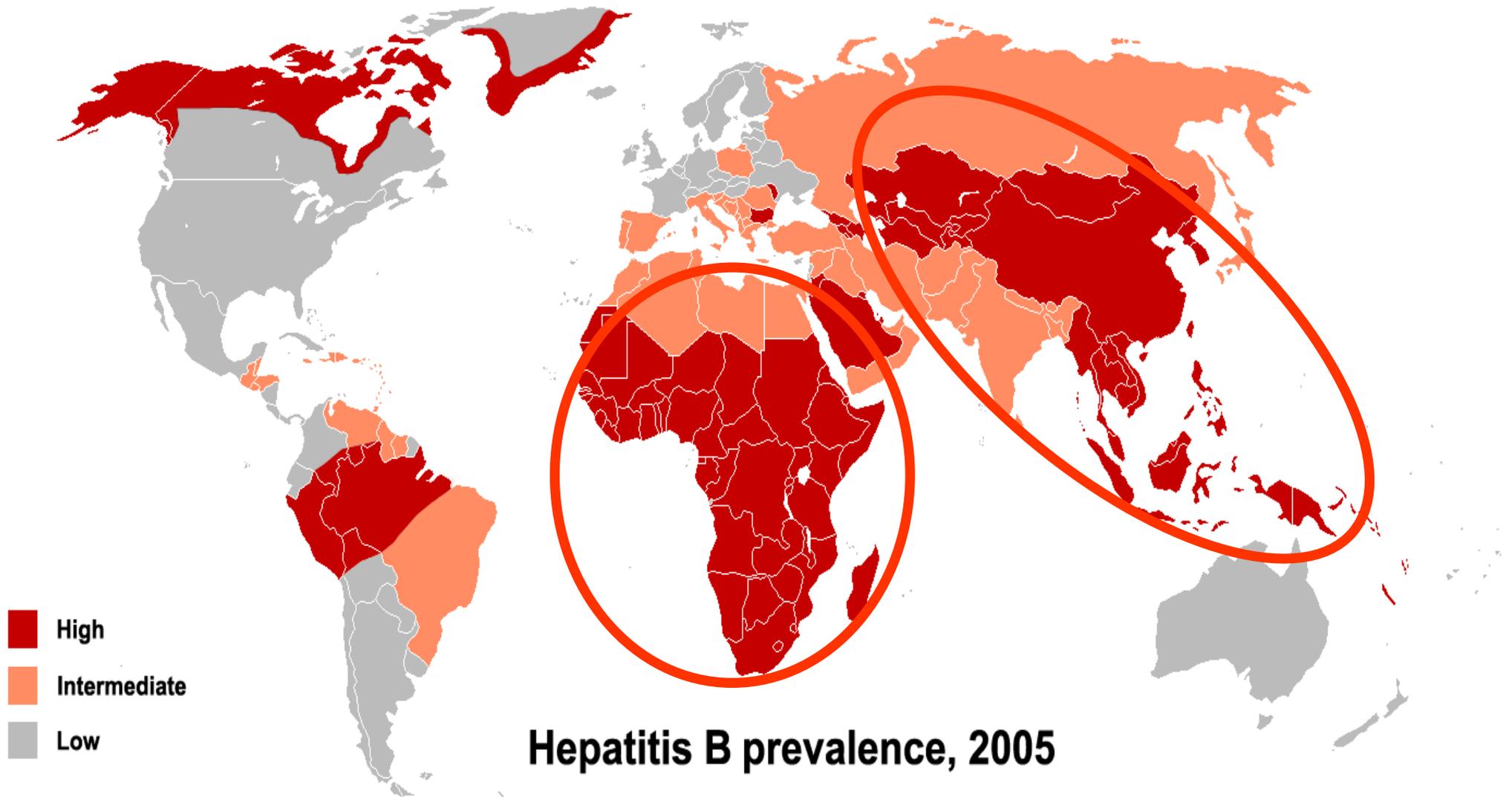
³Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 46, 14. November 2008

Epidemiologie der Hepatitis B Virus Infektion

WHO und Robert Koch-Institut, Berlin (Epidem. Bulletin 2009, 20:189-202)

- **ca. 2 Milliarden** von derzeit ca. 6,5 Milliarden Menschen aktuell mit HBV infiziert
- **> 420 Millionen** Menschen = 5%-7% der Weltbevölkerung chronisch HBV infiziert
- **> 1 Million/Jahr** Todesfälle (HBV-induzierten Leberzirrhose [57% aller Fälle], hepatozellulären Karzinom (HCC) [53% aller HCC])
- In Europa sind zwischen <0,1% (Nordeuropa) und 8% (Ost- und Südeuropa) der Bevölkerung chronisch mit HBV infiziert
- In der Bundesrepublik Deutschland wurden im Jahre 2008 **1.850 akuter** HBV-Neuerkrankungen an das RKI gemeldet, wobei etwa 5% Virusträger bleiben

Hepatitis B Virus Verbreitung



Pressefoto zum Start der Kampagne Hepatitis B 2009 Welt-Hepatitis Tag 19.05.2009

Eine Initiative von:

Deutsche
Leberstiftung

Deutsche
Leberhilfe e.V.

Bristol-Myers Squibb

Das Virus wartet, wo man es nicht erwartet.

HEPATITIS B? AM BESTEN TESTEN!

Hepatitis B
• wird durch Körperflüssigkeiten und Blut übertragen und kann die Leber schädigen
• kann aus gemeinsam genutzten Gegenständen wie einem Rasierer und Gefährquelle machen
• bleibt oft über Jahrzehnte ohne Beschwerden und Symptome
• kann erfolgreich behandelt werden, wenn es durch einen Test erkannt wird

Das Virus wartet, wo man es nicht erwartet.

HEPATITIS B? AM BESTEN TESTEN!

Hepatitis B
• wird durch Körperflüssigkeiten und Blut übertragen und kann die Leber schädigen
• kann aus gemeinsam genutzten Gegenständen wie einer Tätowiernadel, eine Gefährquelle machen
• bleibt oft über Jahrzehnte ohne Beschwerden und Symptome
• kann erfolgreich behandelt werden, wenn es durch einen Test erkannt wird

Das Virus wartet, wo man es nicht erwartet.

HEPATITIS B? AM BESTEN TESTEN!

Hepatitis B
• wird durch Körperflüssigkeiten und Blut übertragen und kann die Leber schädigen
• kann deshalb auch Geschlechtsverkehr zu einem Risiko machen
• bleibt oft über Jahrzehnte ohne Beschwerden und Symptome
• kann erfolgreich behandelt werden, wenn es durch einen Test erkannt wird

Weitere Informationen sowie eine Risikoprüfung erhalten Sie bei Ihrem Hausarzt oder in der Testambulanz der Deutschen Leberstiftung unter der Telefon-Nummer: 01800 / 45 00 80 80 – Di, 14.00 – 18.00 Uhr, € 0,14/Min. aus dem deutschen Festnetz, abweichende Preise aus dem Mobilfunk oder auf www.hepbtl.de

Eine Initiative von: Deutsche Leberstiftung, Deutsche Leberhilfe e.V., Bristol-Myers Squibb

Das Virus wartet, wo man es nicht erwartet.

HEPATITIS B? AM BESTEN TESTEN!

Hepatitis B
• wird durch Sex, Körperflüssigkeiten und Blut übertragen und kann die Leber schädigen
• kann aus gemeinsam genutzten Gegenständen wie einem Rasierer, eine Gefährquelle machen
• bleibt oft über Jahrzehnte ohne Beschwerden und Symptome
• kann erfolgreich behandelt werden, wenn es durch einen Test erkannt wird

Weitere Informationen sowie eine Risikoprüfung erhalten Sie bei Ihrem Hausarzt oder in der Testambulanz der Deutschen Leberstiftung unter der Telefon-Nummer: 01800 / 45 00 80 80 – Di, 14.00 – 18.00 Uhr, € 0,14/Min. aus dem deutschen Festnetz, abweichende Preise aus dem Mobilfunk oder auf www.hepbtl.de

Eine Initiative von: Deutsche Leberstiftung, Deutsche Leberhilfe e.V., Bristol-Myers Squibb

Das Virus wartet, wo man es nicht erwartet.

HEPATITIS B? AM BESTEN TESTEN!

Hepatitis B
• wird durch Sex, Körperflüssigkeiten und Blut übertragen und kann die Leber schädigen
• kann aus gemeinsam genutzten Gegenständen wie einer Tätowiernadel, eine Gefährquelle machen
• bleibt oft über Jahrzehnte ohne Beschwerden und Symptome
• kann erfolgreich behandelt werden, wenn es durch einen Test erkannt wird

Weitere Informationen sowie eine Risikoprüfung erhalten Sie bei Ihrem Hausarzt oder in der Testambulanz der Deutschen Leberstiftung unter der Telefon-Nummer: 01800 / 45 00 80 80 – Di, 14.00 – 18.00 Uhr, € 0,14/Min. aus dem deutschen Festnetz, abweichende Preise aus dem Mobilfunk oder auf www.hepbtl.de

Eine Initiative von: Deutsche Leberstiftung, Deutsche Leberhilfe e.V., Bristol-Myers Squibb



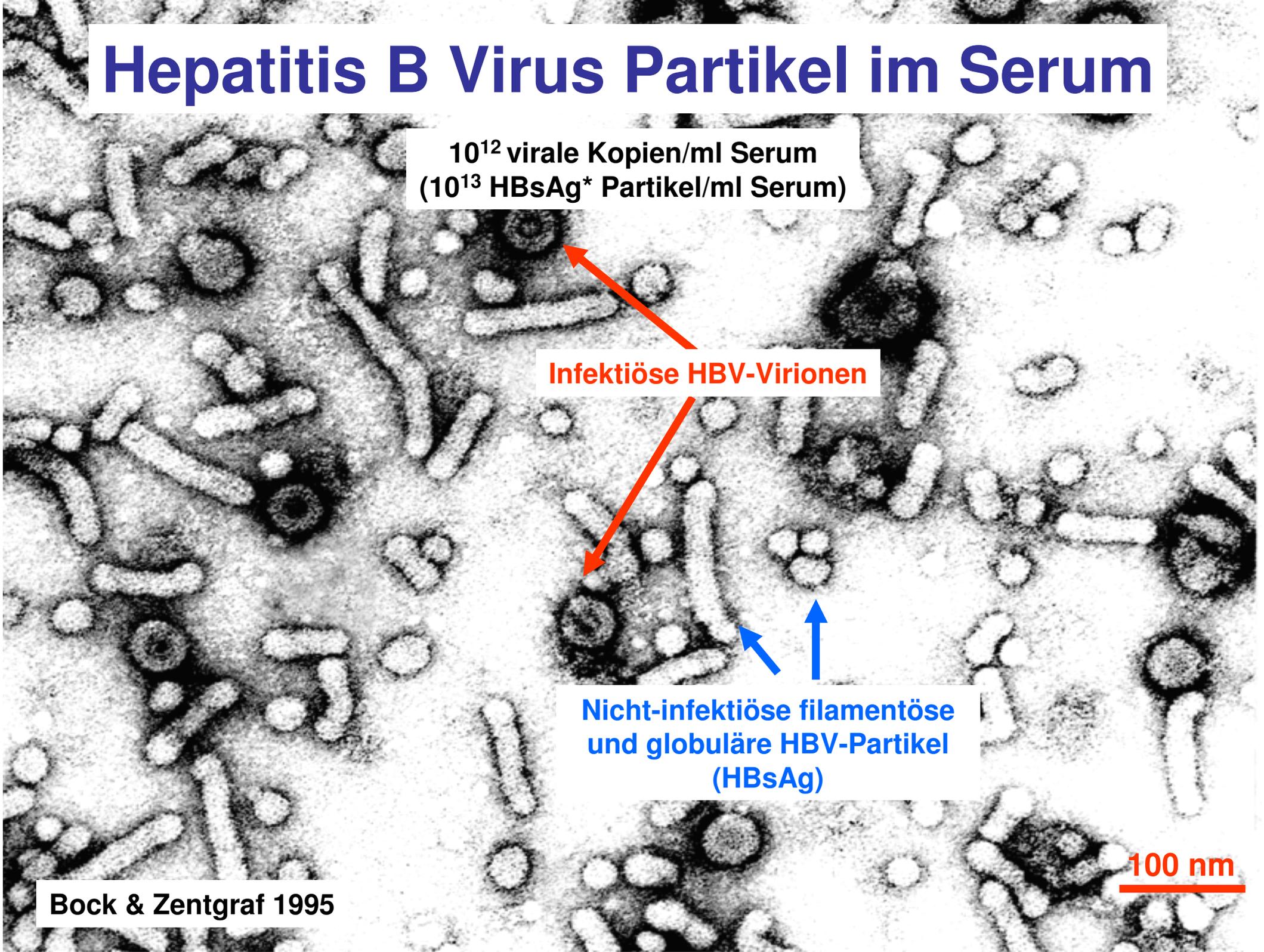
Hepatitis B Virus Partikel im Serum

10^{12} virale Kopien/ml Serum
(10^{13} HBsAg* Partikel/ml Serum)

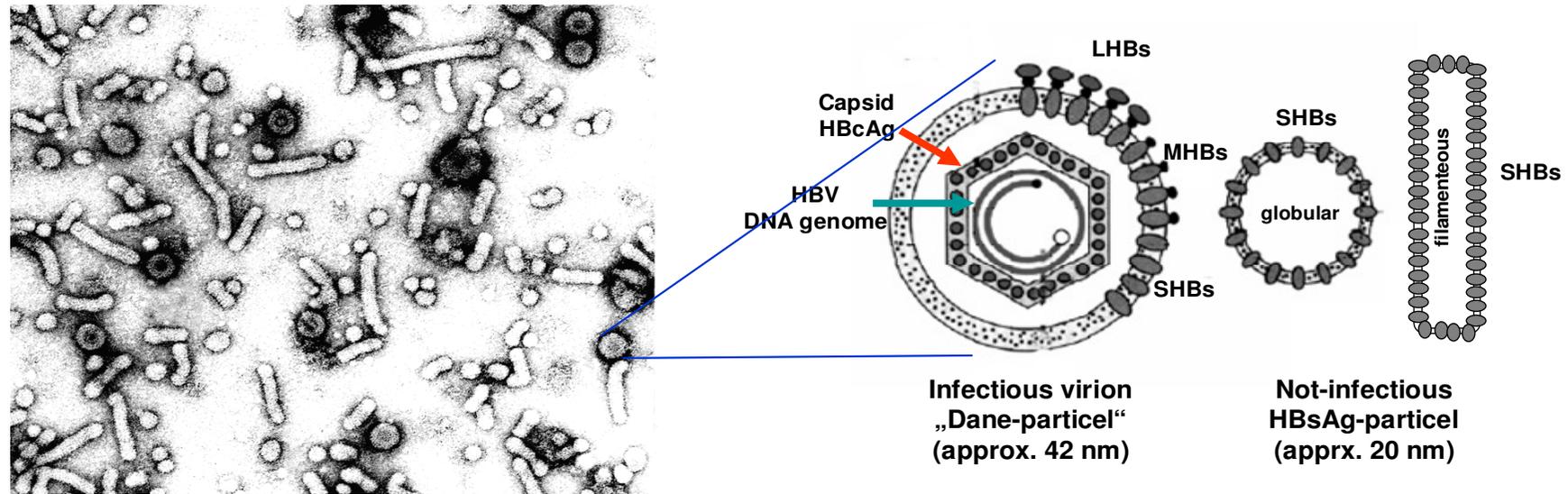
Infektiöse HBV-Virionen

Nicht-infektiöse filamentöse
und globuläre HBV-Partikel
(HBsAg)

100 nm

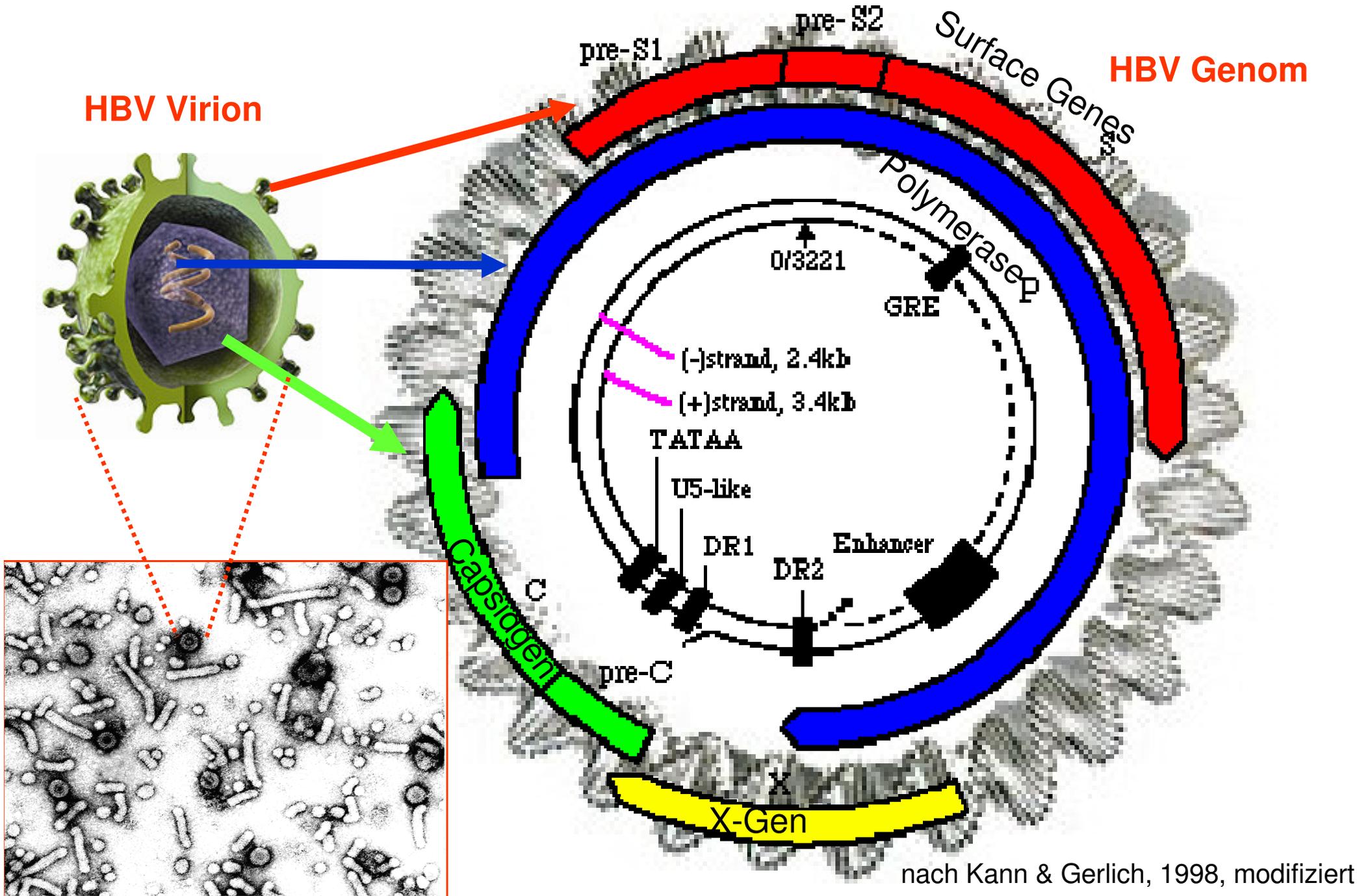


Hepatitis B Virus

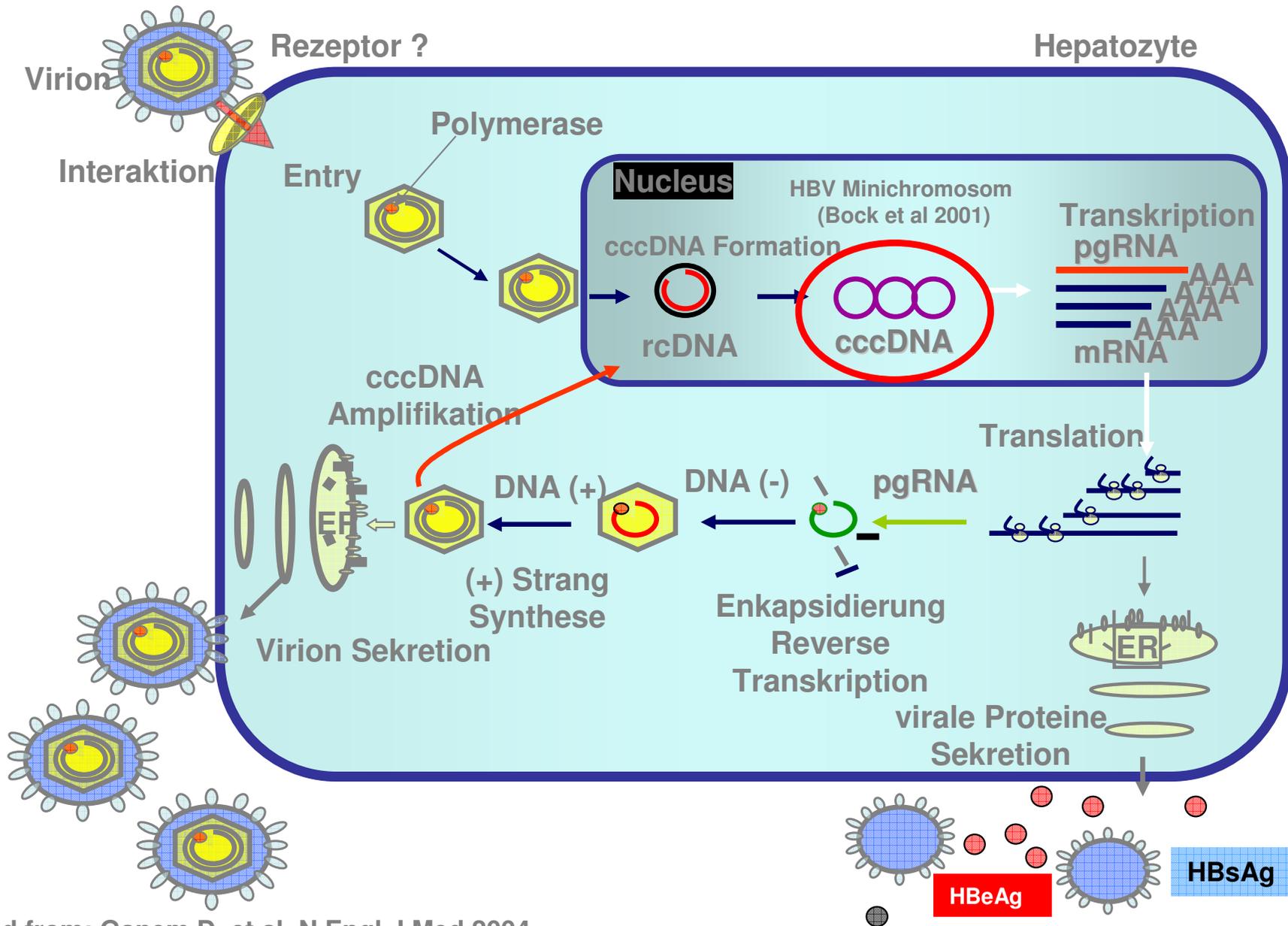


- umhülltes ~40 nm DNA-Virus; ~20 nm Kapsid
- Hepadnavirus, Pararetrovirus
- pdDNA, ca. 3200 bp
- 4 überlappende Leserahmen (ORF)
- preC/Core, preS/surface, RT-Polymerase, X-Protein
- Promotoren: pg/Core, S and X-Promotor; Enh 1 und Enh 2
- 8 Genotypen
- strikt hepatotroph

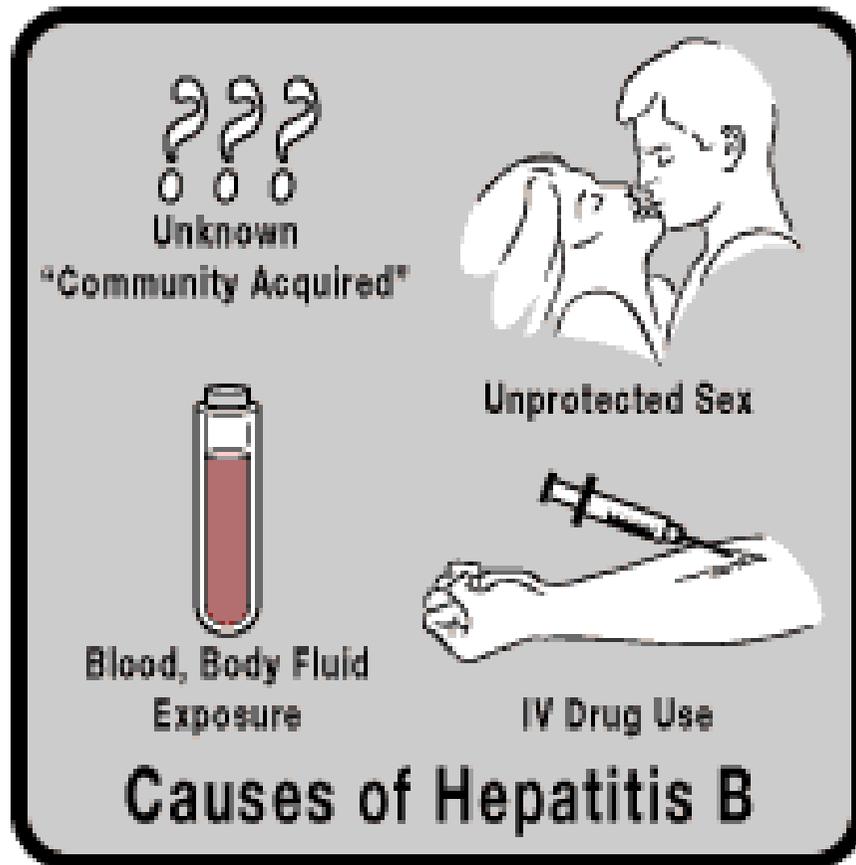
Hepatitis B Virus Genom



Hepatitis B Virus Lebenszyklus



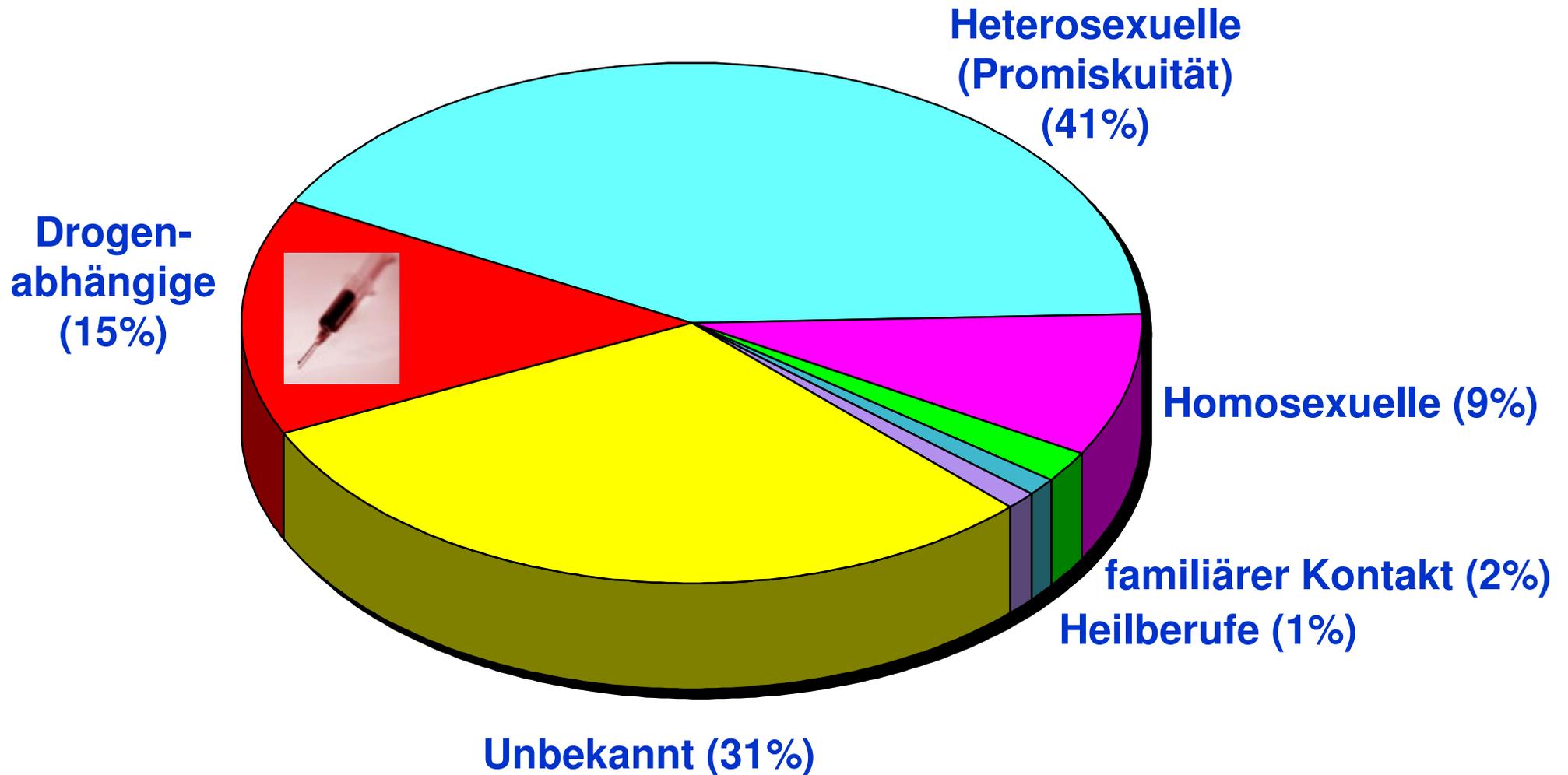
Übertragungswege des Hepatitis B Virus



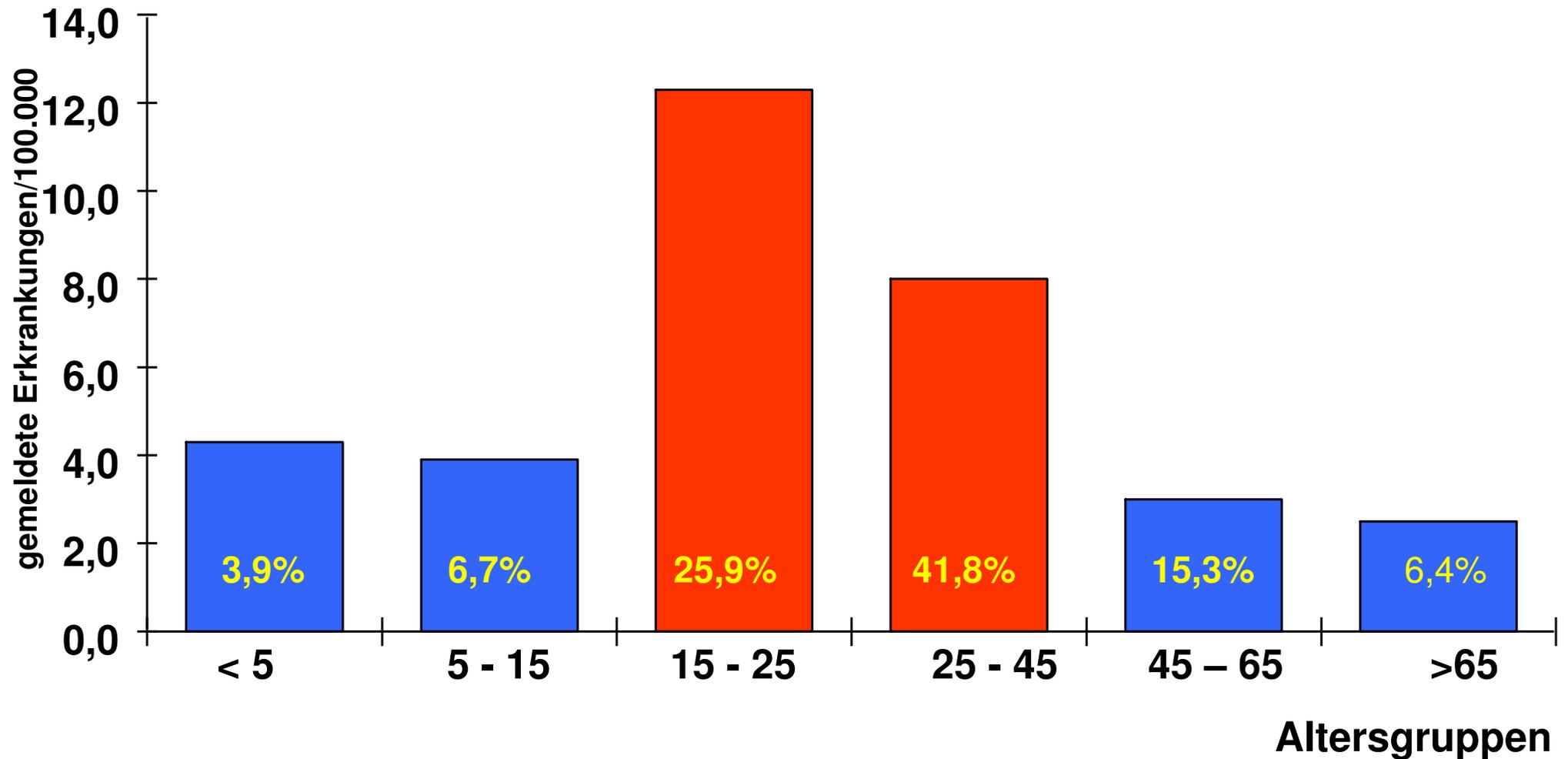
Quelle: www.endowsec.com/pated/gifs/elv0010.gif

- **parenteral**
(Blut/-produkte)
(Dialyse)
kontaminierte Instrumente
kontaminierte Spritzen
- **sexuell**
- **perinatal**

Risikogruppen der Hepatitis B Virus-Infektion

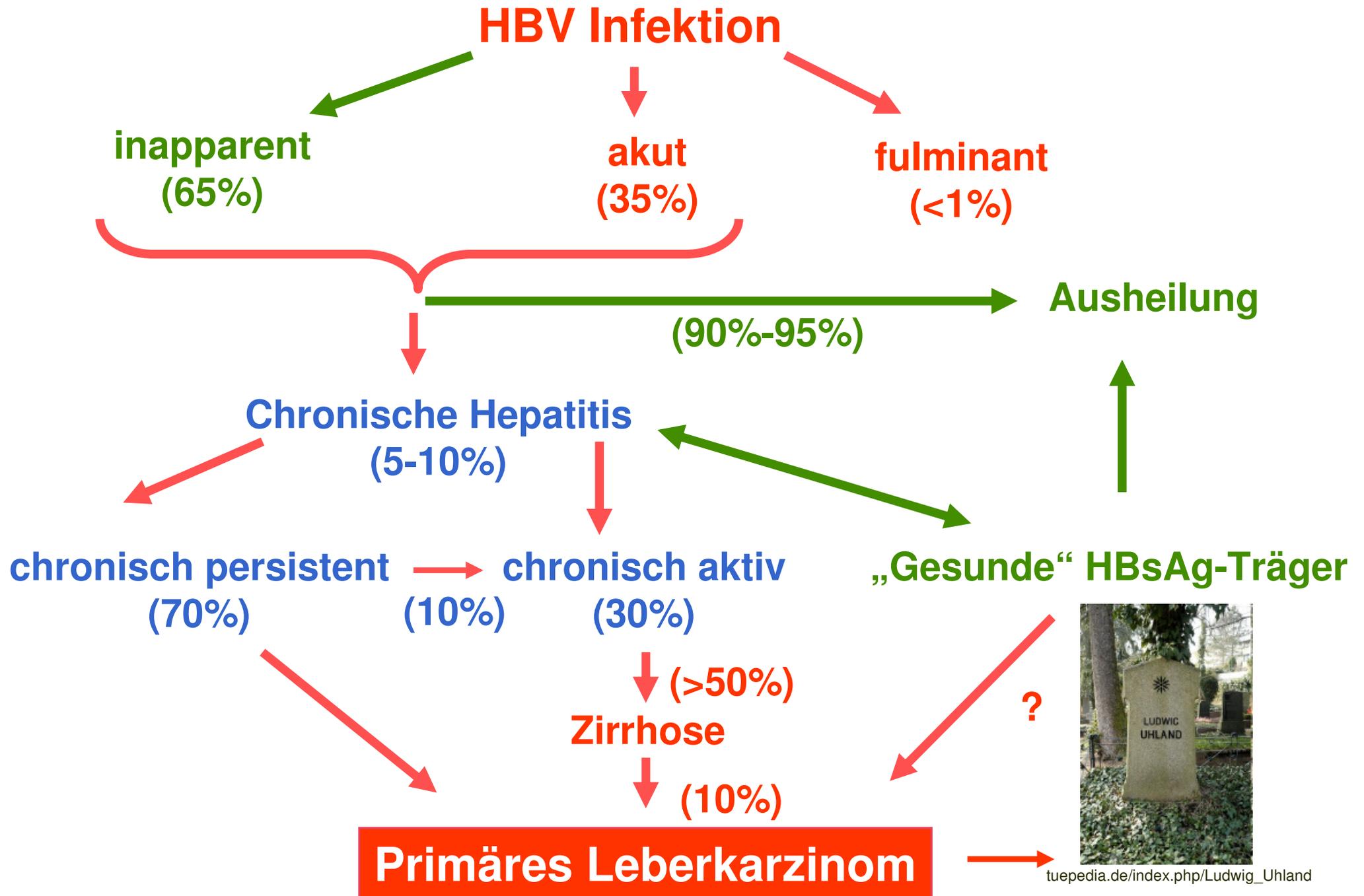


Alterspezifische Verteilung von HBV Infektionen

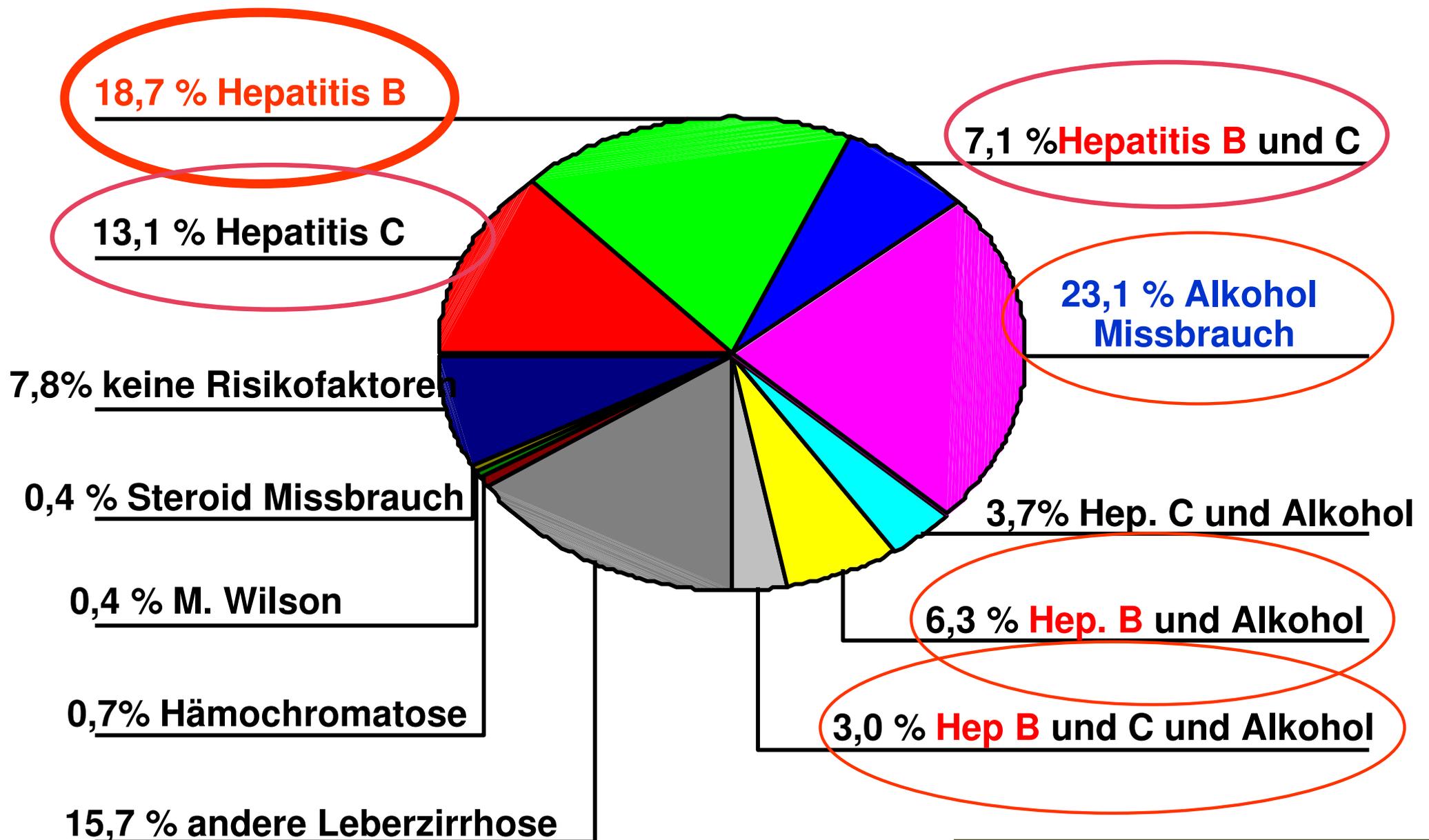


Altersspezifische Inzidenz der Hepatitis B,
Jilg; Dt. Ärzteblatt 1996

Klinischer Verlauf der Hepatitis B Virus Infektion



Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms in Hannover 1995-1998 / n= 268



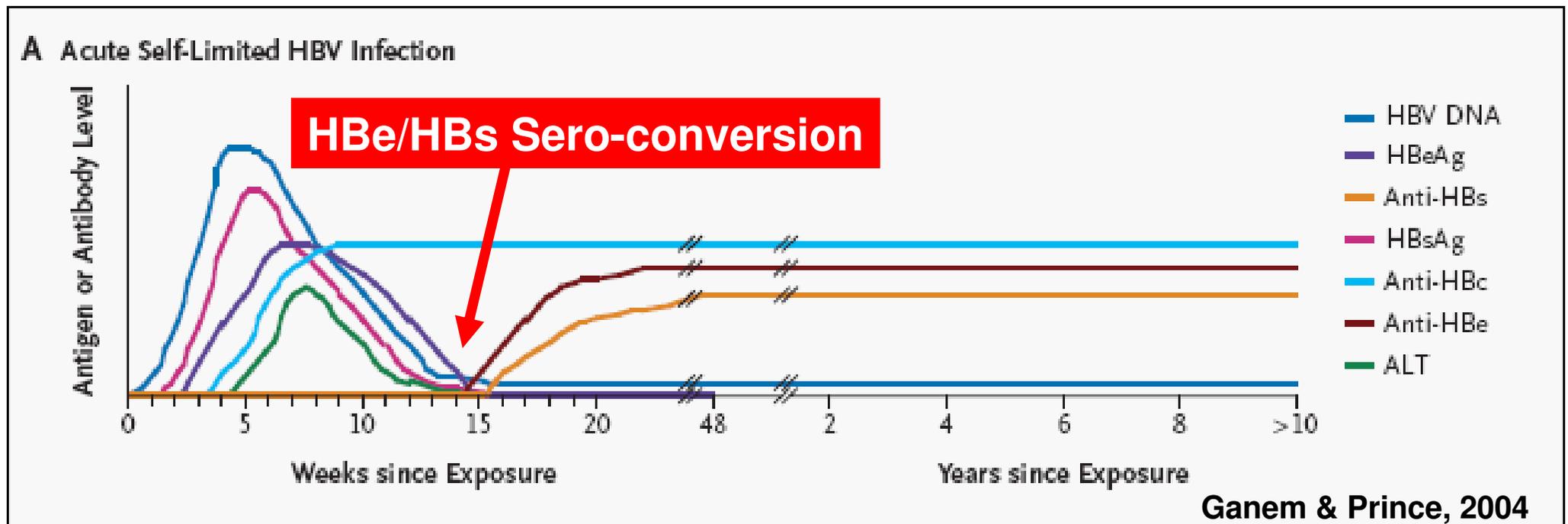
Akute Hepatitis B: Diagnostik

Serologie:

- HBsAg, anti-HBc (total und IgM)
- HBeAg, (anti-HBe)

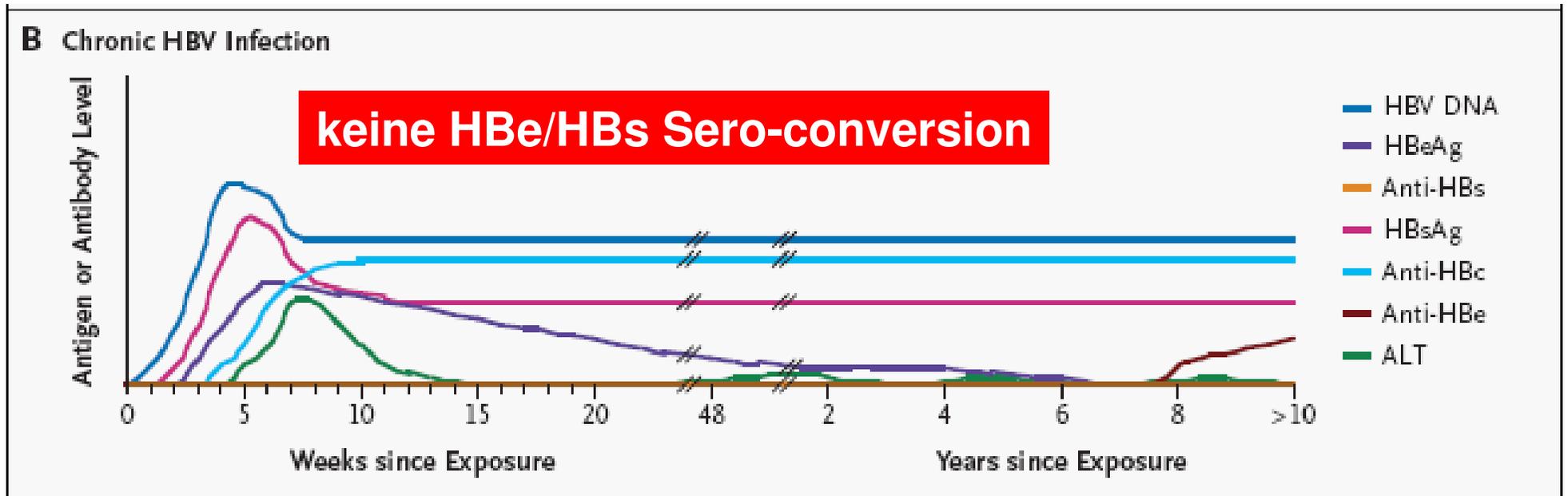
Weitere Methoden:

- HBV-DNA (quantitativ)
- Transaminasen

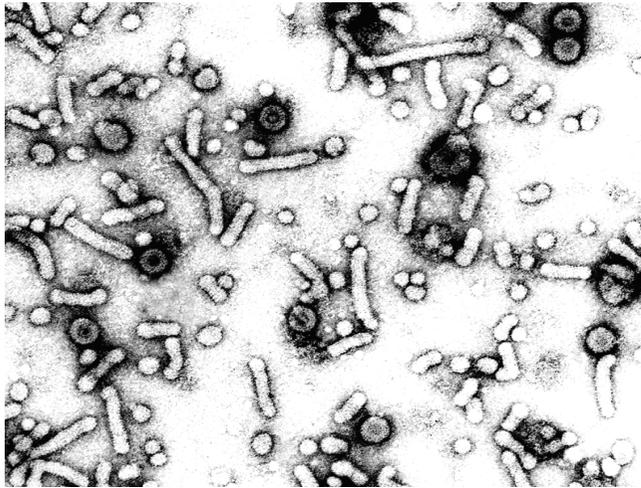


Chronische Hepatitis B: Diagnostik

- **Zusätzlich zur Akut-Diagnostik:**
 - **Sonographie der Leber**
 - **zusätzliche biochemische Marker (Albumin, ChE, Quick, AFP)**
 - **Ausschluss anderer Infektionen (HIV, HDV, HCV)**
 - **Leberhistologie**



Diagnostik der HBV Infektion



HBsAg positiv



anti-HDV



HBeAg, HBV-DNA



+

(hoch-replikativ)

>10⁵ IE/ml



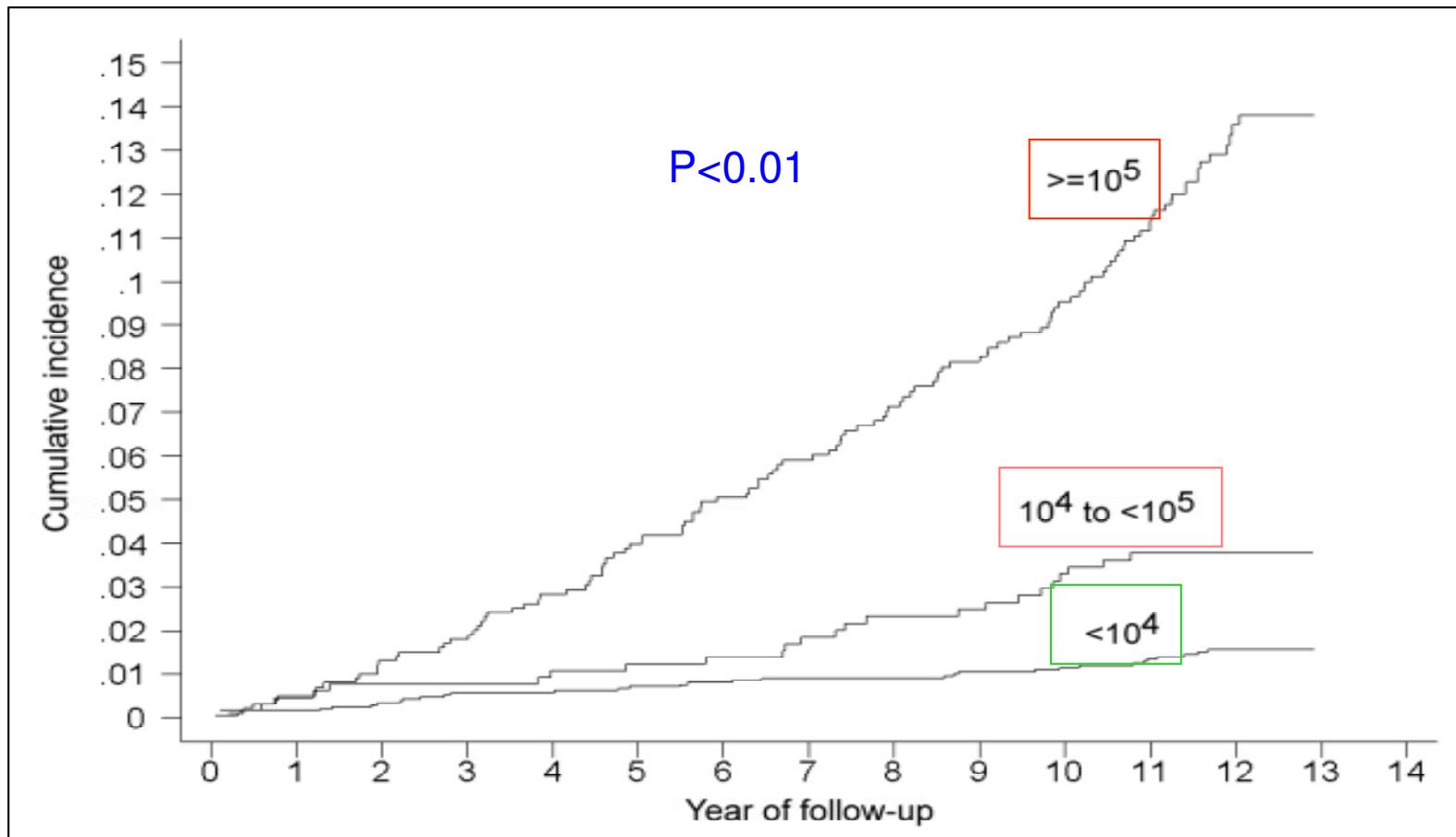
-

(niedrig-replikativ)

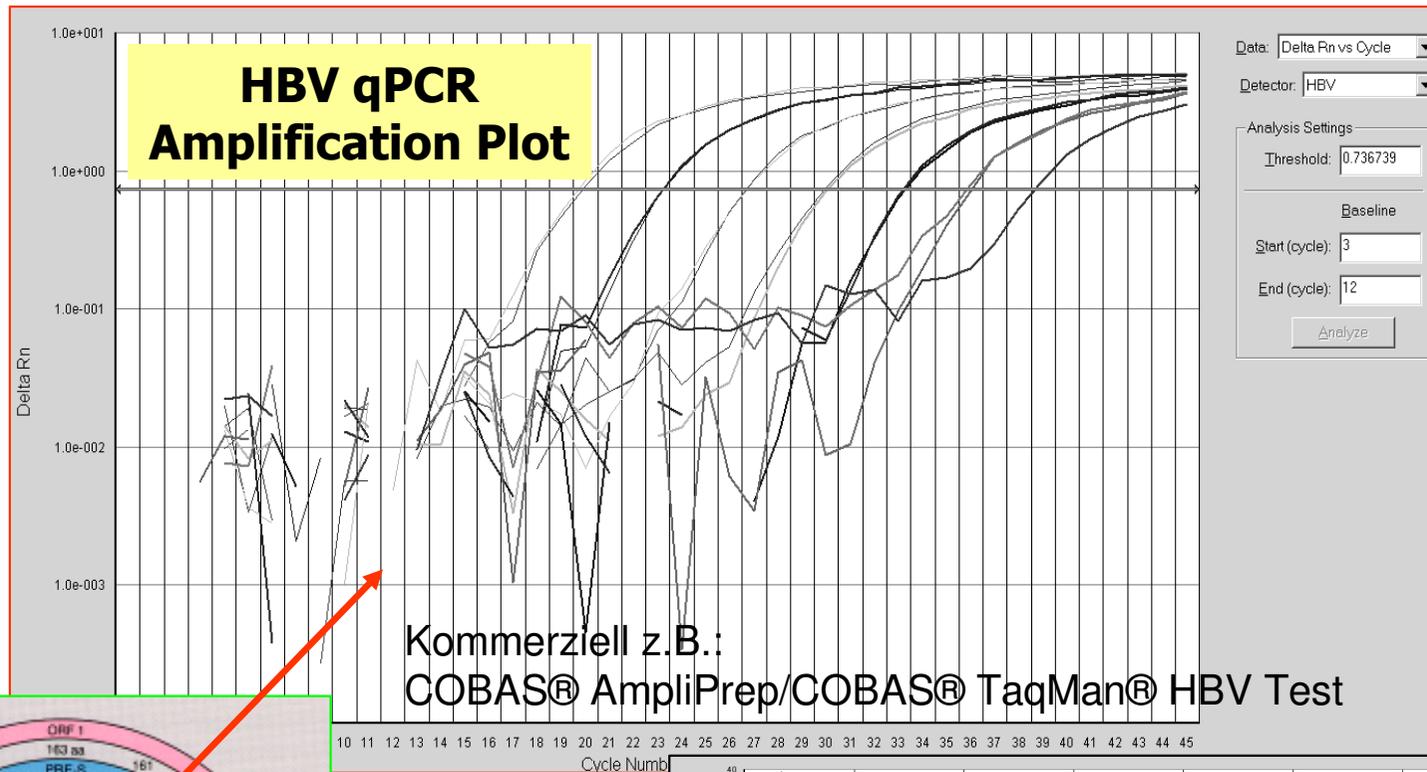
<10⁵ IE/ml

HBV Viruslast und HCC-Risiko

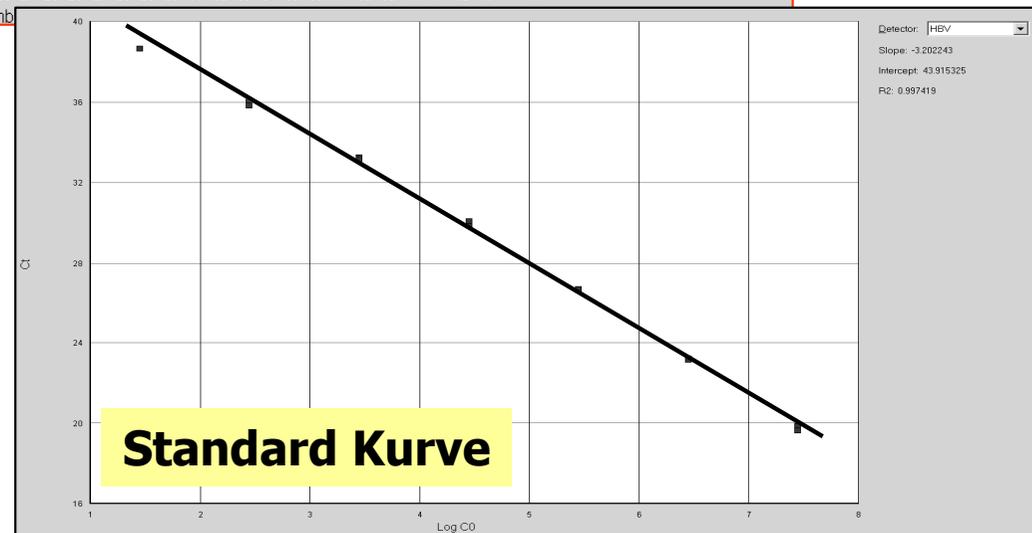
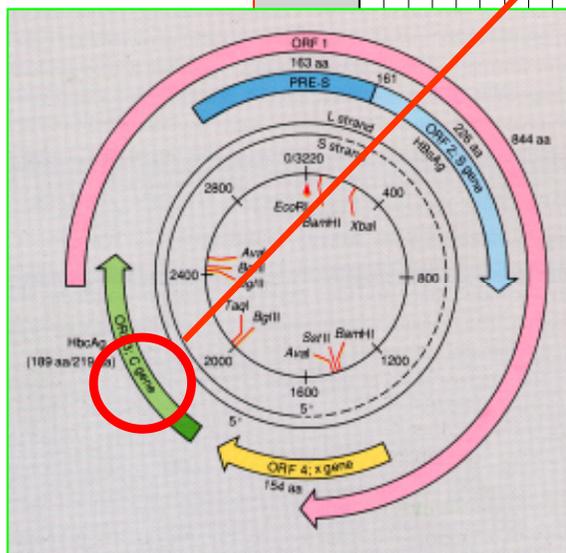
kumulative Inzidenz des HCC
abhängig der "baseline" HBV DNA (n=3851)



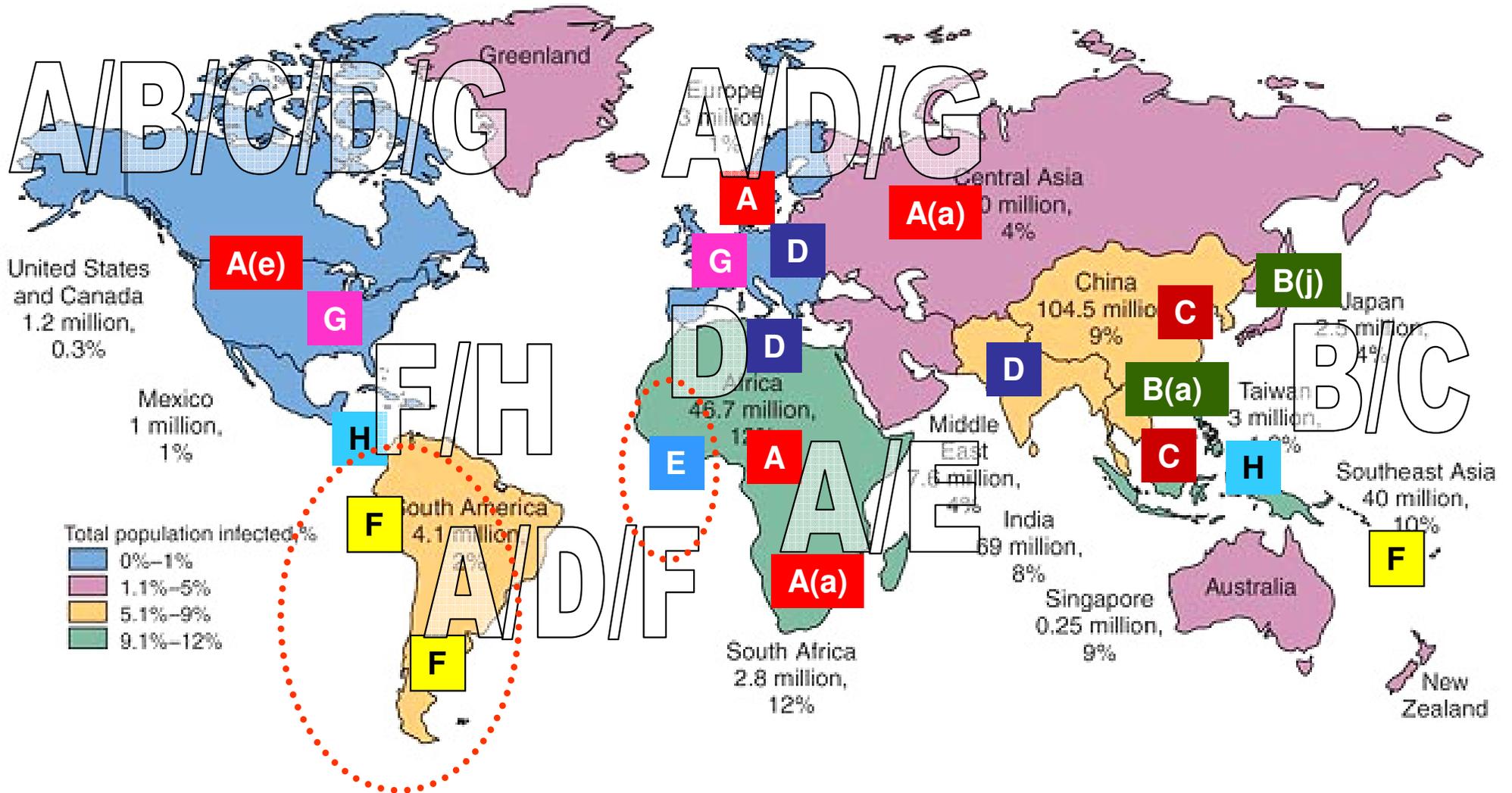
HBV-Core-spezifische Quantitative Real Time Taqman PCR



Kommerziell z.B.:
 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test



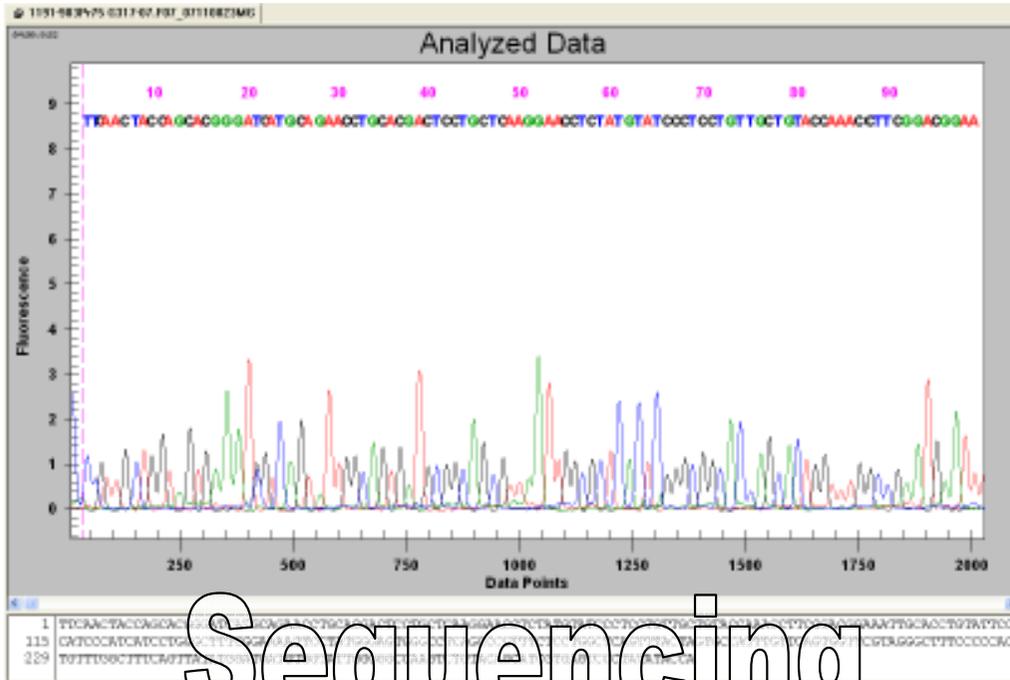
Weltweite HBV-Genotyp Verteilung



HBV Genotypen und Suszeptibilität zu antiviralen Substanzen

- **Interferon alpha:** Genotyp A und B sprechen relativ gut an
Genotyp D und C sprechen nur moderat an
- **Lamivudine:** Resistenzrate höher bei A als in D
kein Unterschied zwischen B und C
- **Adefovir:** keine Genotyp-spezifischen Unterschiede
- **andere Nukleoside:** bislang nicht bestimmt

Methoden zur HBV Genotyp Bestimmung



Sequencing

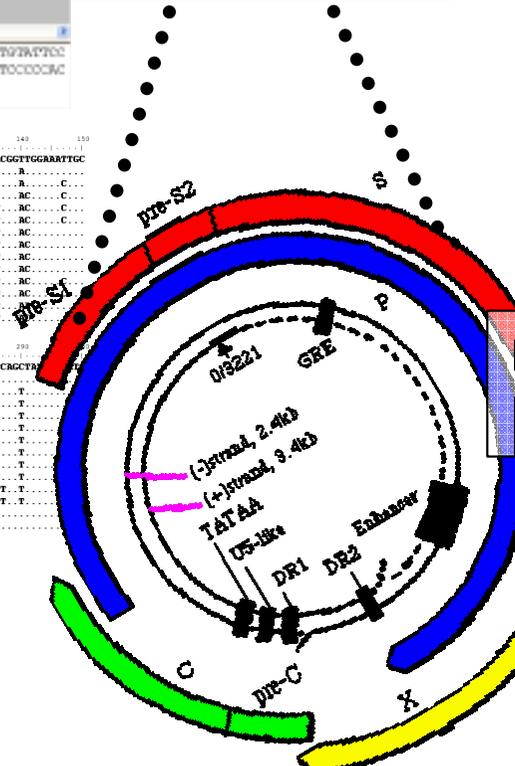
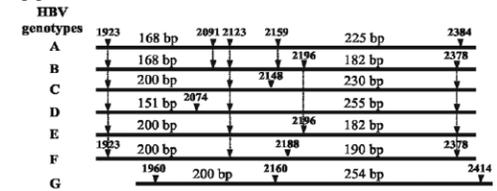
Accession	Sequence
HBV A 212478	CTGGATATCAGGTATATCTGCCCTTTCTCTTARTCC...TCACACACACAGCTACGGGACATCCAGAACCTGCACGCTCTCTCTCAGGGCAGCTCTATGTTTCTCTAGTCTGTACACACCTACGGTGGARRTTGC
HBV A adh2T.....C.....A.....A.....C.....A.....C.....
HBV B D00330C.....T.....C.....C.....A.....C.....A.....C.....T.....AC.....C.....
HBV B AB033554C.....A.....T.....C.....C.....G.....T.....A.....C.....T.....AC.....C.....C.....
HBV C RF040627C.....CA.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....G.....T.....AA.....C.....T.....AC.....C.....C.....
HBV C adh X52939C.....C.....CA.....C.....C.....A.....T.....T.....C.....G.....T.....AA.....C.....T.....AC.....C.....C.....
HBV D ayw GaliberC.....C.....CT.....C.....CGG.....T.....A.....A.....C.....A.....C.....C.....T.....AC.....
HBV D ayw RY23329C.....C.....CT.....C.....CGG.....T.....A.....A.....C.....A.....C.....C.....T.....AC.....
HBV E XT5657C.....T.....C.....C.....CG.....T.....A.....C.....T.....AC.....T.....AC.....C.....
HBV F AB032431C.....C.....T.....C.....CG.....T.....A.....C.....T.....AC.....T.....AC.....C.....
HBV F AB036920C.....C.....C.....C.....C.....C.....A.....T.....A.....C.....C.....C.....CT.....AC.....
HBV F AB036910C.....C.....C.....C.....C.....C.....A.....T.....A.....C.....C.....C.....CT.....AC.....
HBV G AB056515C.....C.....G.....CT.....G.....C.....C.....C.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....AC.....
HBV G RF405706C.....C.....G.....CT.....G.....C.....C.....C.....A.....T.....A.....C.....T.....T.....AC.....

INNO-LiPA HBV Genotyping

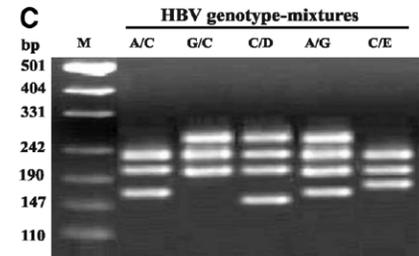
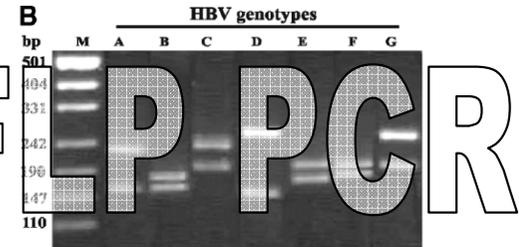
Reverse hybridization



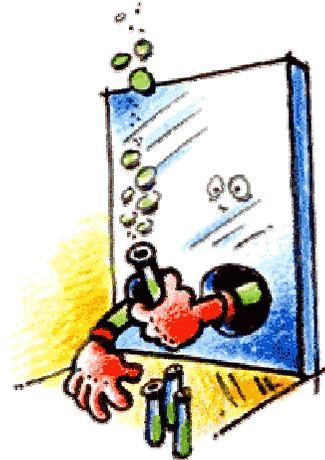
Variable preS/S-region zur HBV Genotypisierung



RF-PCR



Therapie der chronischen Hepatitis B Virus Infektion



- **(PEG)-Interferon- α**
- **Nucleoside Analoga (Lamivudine, Entecavir, Telbivudine)**
- **Nucleotide Analoga (Adefovir dipivoxil, Tenofovir)**
- **Hepatitis B Hyperimmunoglobulin (HBIG)**



Prophylaxis des Hepatozellulären Karzinoms

Wirkung Antiviraler Substanzen

Inhibition der Reversen Transkription

Inhibitoren der viralen Polymerase durch Nucleos(t)idanaloga:

- Herpesvirus Polymerase:
Aciclovir, Ganciclovir

Inhibitoren der Reversen Transcriptase:

- HIV: AZT (Zidovudine)
- **HBV Polymerase:**

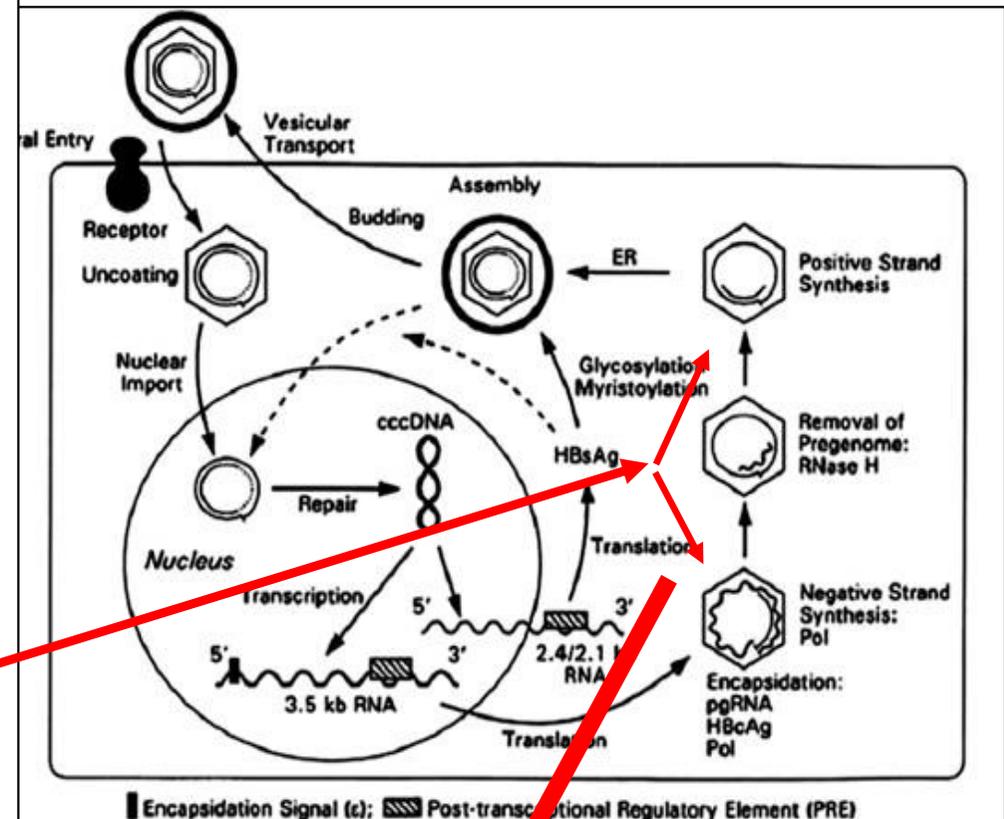
Lamivudin (Zeffix™)

Adefovir (Hepsera™)

Entecavir (Baraclude™)

Telbivudine (Sebivo™)

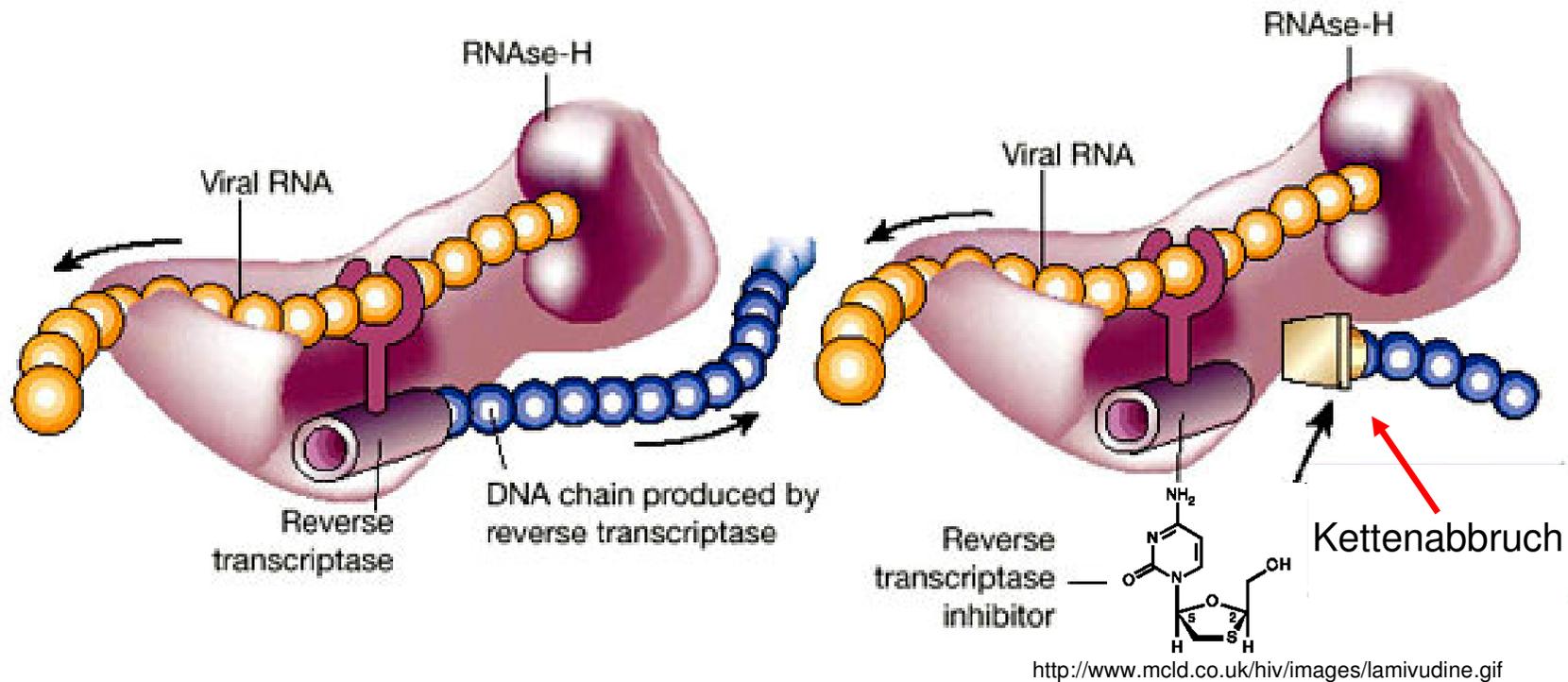
Tenofovir (Viread®)



Adapted from: Ganem D, et al. N Engl J Med 2004

**Selektion von Therapie-
resistenten Mutationen**

Schema der Nucleos(t)idanalogue-Wirkung



wt HBV Polymerase-Funktion

Nucleotidanalogue-Wirkung auf die HBV Polymerase Funktion führt zu Kettenabbruch

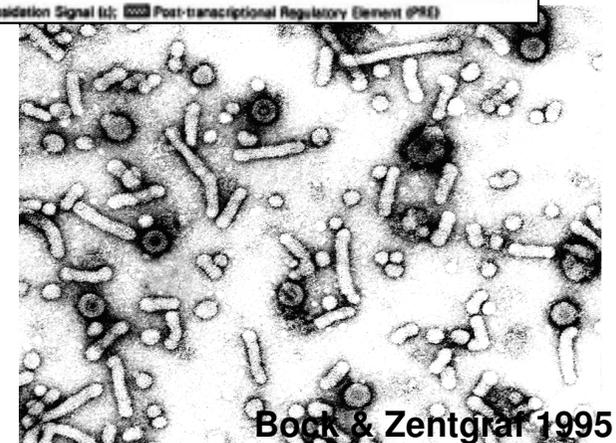
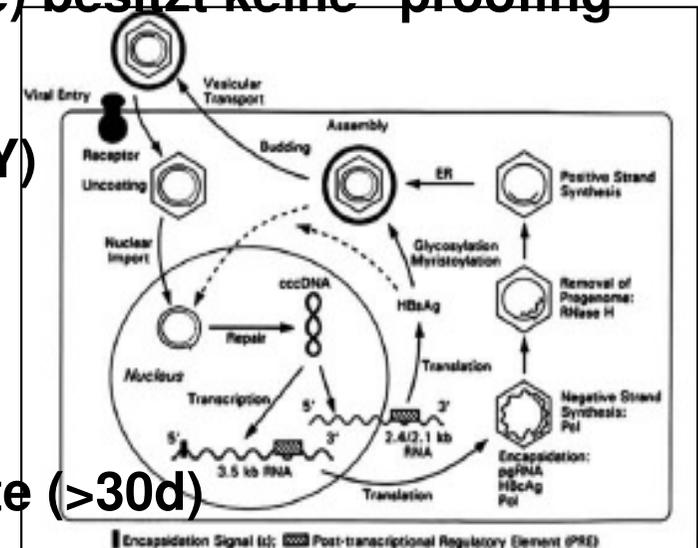
Hepatitis B: Problem der antiviralen Resistenz

- **Nur ein virales *Target*** - die HBV Polymerase
- **Nur eine Substanzklasse** (Nucleos(t)id-Analoga)
- **Antivirale Substanzen:**
 - Lamivudine / Telbivudine (L-NUCLEOSID)
 - Adefovir / Tenofovir (ACYCLISCHES PHOSPHONAT)
 - Entecavir (CYCLOPENTEN RING GRUPPE)

Selektion von Hepatitis B Virus Varianten Mutanten und Genotypen

Virale Faktoren:

- HBV ist ein hoch replizierendes Virus (10^{12} IE/ml)
- Die virale Polymerase (Reverse Transcriptase) besitzt keine “proofreading” Aktivität
- $1 - 5 \times 10^{-5}$ Substitutionen/Position/Jahr (S/P/Y)
= $>10^7$ Fehler/Tag/Patient
- 10^4 fach höher im Vgl. zum humanen Genom
- Lange Halbwertszeit der cccDNA (6-10 d)
- Lange Halbwertszeit der infizierten Hepatozyte (>30 d)



Wirt Faktoren:

- Selektionsdruck des Immunsystems
- Selektionsdruck einer antiviralen Therapie
- Andere selektive Einflüsse

Einfluss von HBV Mutanten auf die Virus Replikation

Mutationen im HBV Genom führen zur:

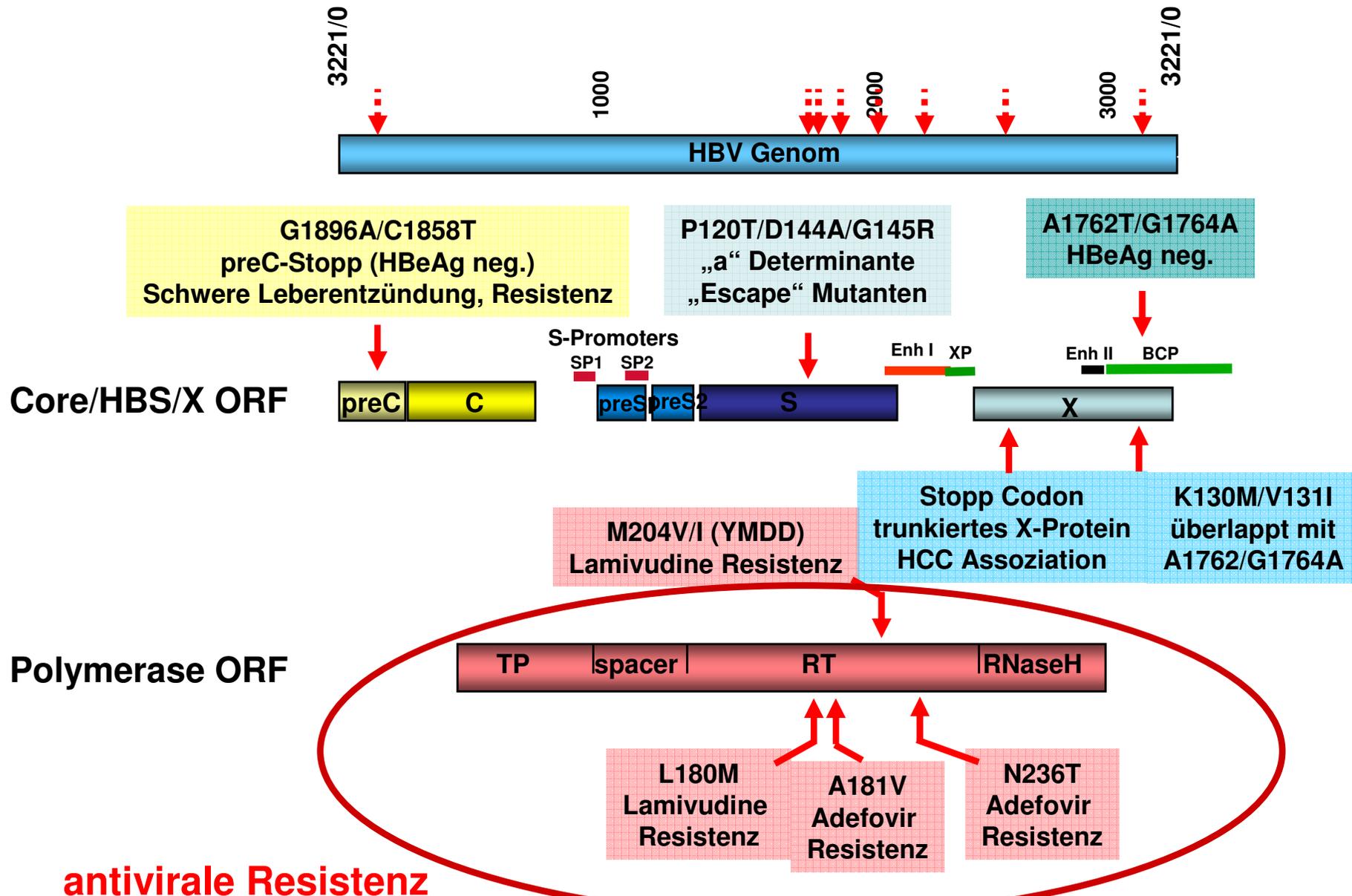
- **Modulation der HBV Replikation**
- **Beeinflussen die Wirtszell-Suszeptibilität**
- **Maskieren gegen das Immunsystem**
- **oder haben keinen Einfluss**

Klinische Relevanz von HBV Mutanten

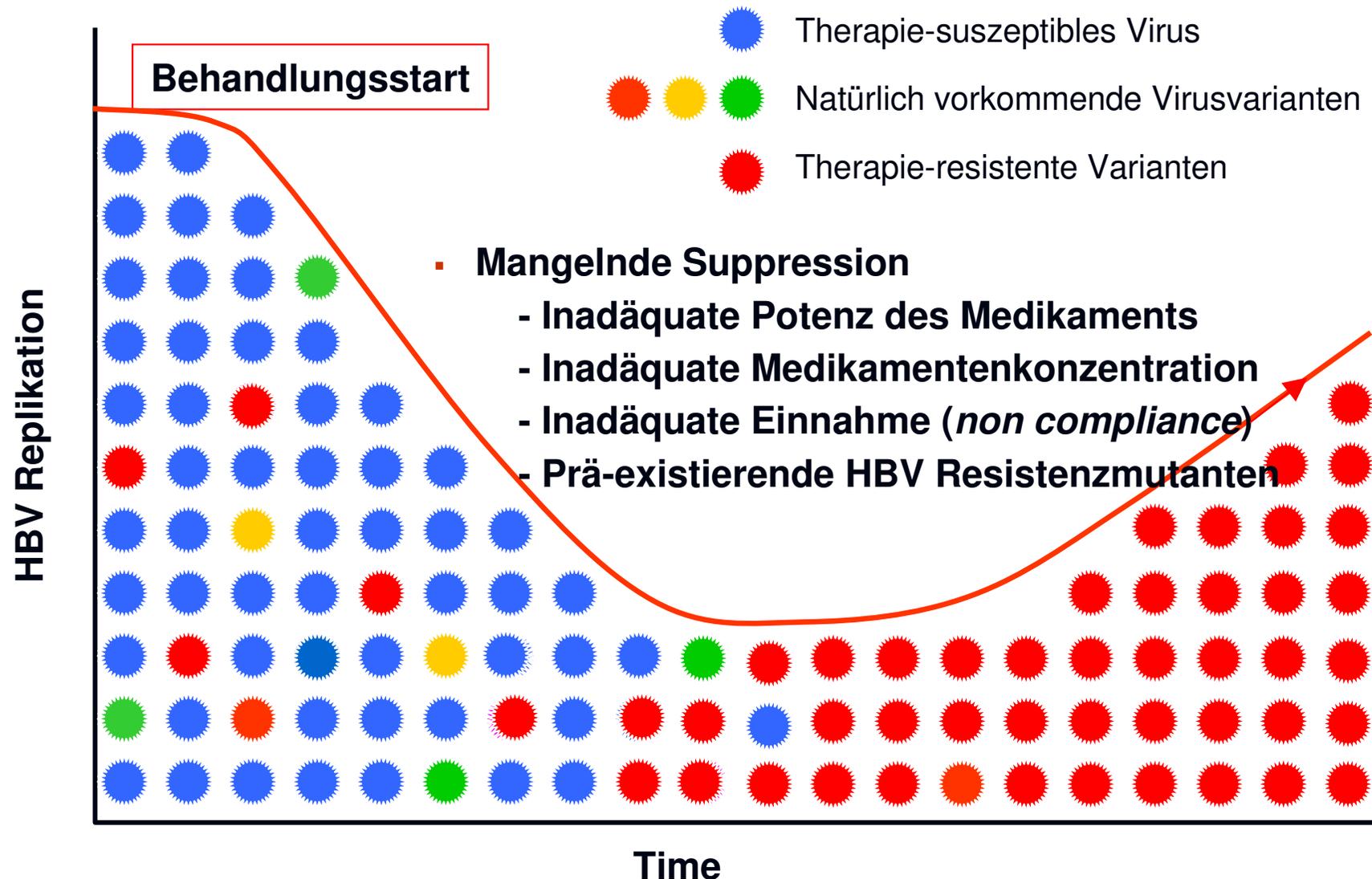
Mutationen im HBV Genom können assoziiert sein mit:

- **schweren Leberentzündungen**
- **fulminanter Hepatitis**
- **Leberzirrhose**
- **HCC (Leberzellkarzinom)**
- **Resistenz gegen eine antivirale Therapie**

Häufige Mutationen im HBV Genom

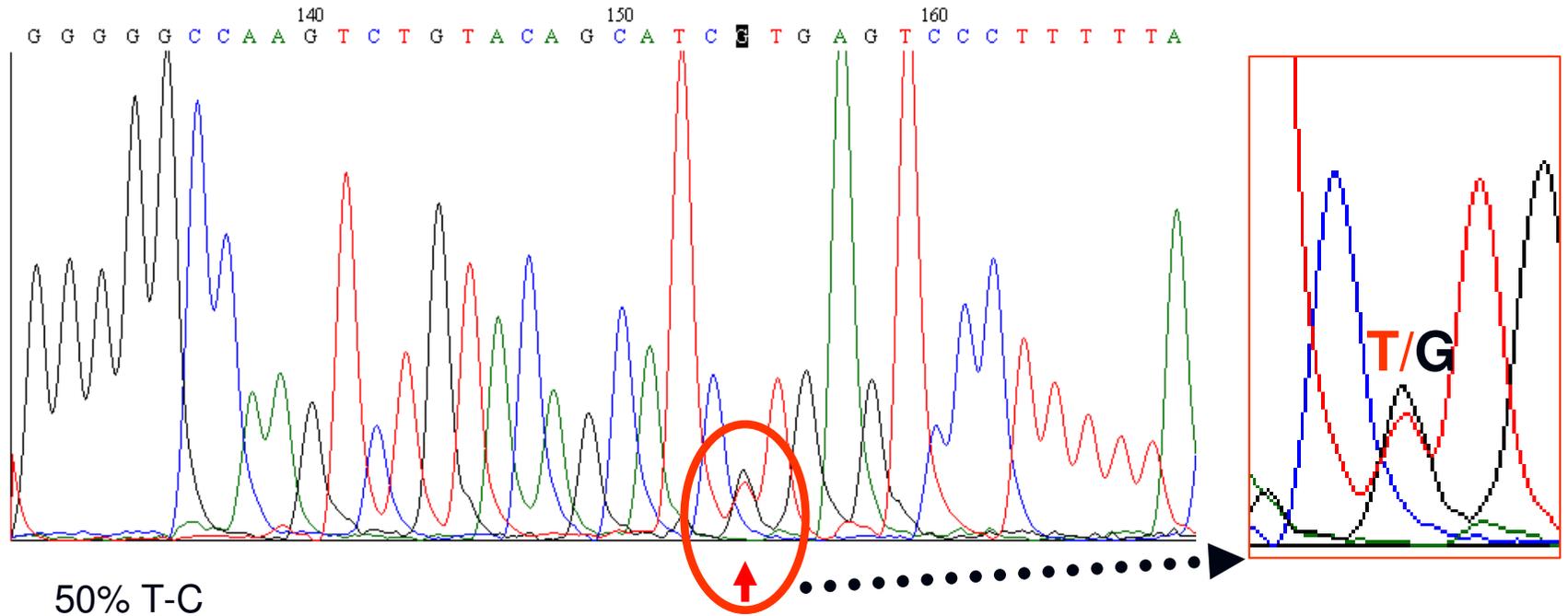


Mangelnde Suppression der viralen Replikation fördert die Selektion von resistenten Viren

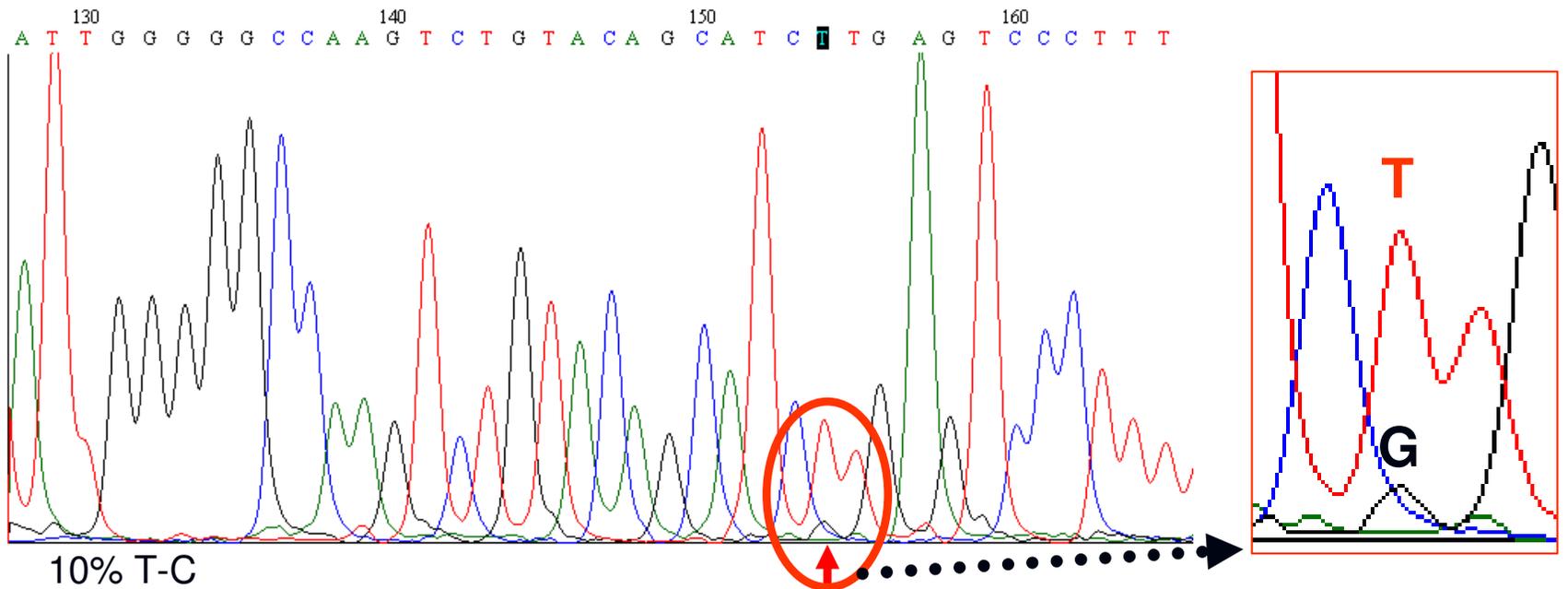


Nachweis von Hepatitis B Virus Quasi-Spezies (YMDD vs YIDD)

50% YMDD/YIDD



10% YIDD



Definition der Therapie-Resistenz

- **Genotypische Resistenz:** Mutationen im HBV Genom welche sich aufgrund der antiviralen Therapie entwickeln
- **Virologischer Durchbruch:** Rückfall der HBV Serum DNA Spiegel während der antiviralen Therapie
- **Klinischer Durchbruch:** Virologischer Durchbruch mit erhöhten ALT Spiegeln oder verschlechterter Histologie
- **Phänotypische Resistenz:** Verringerte Suszeptibilität (*in vitro*) der antiviralen Therapie assoziiert mit genotypischer Resistenz
- **Kreuzresistenz:** Virusmutanten, die durch eine Substanz selektioniert werden und auch mit einer Resistenz gegen eine andere Substanz einhergehen

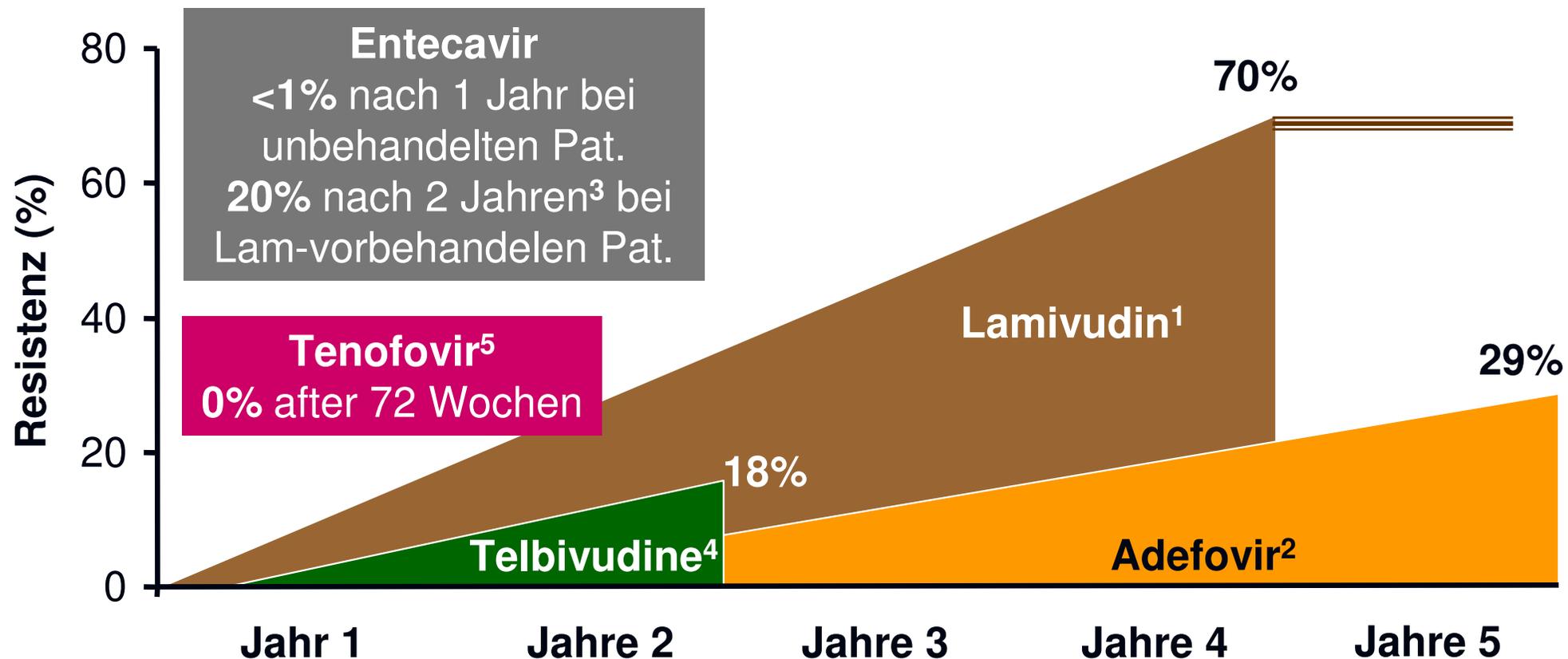
Definition der Therapie-Resistenz

Leitlinien der „Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlicher
Medizinischer Fachgesellschaften“

Cornberg, Wedemeyer et al., Z. Gastroenterologie 2007; 45:525-57

- **Klinisch ausreichendes Ansprechen**: nach 6 Monaten antiviraler Therapie ist die Viruslast unter < 200 HBV-IE/ml gesunken
- **Primär virologisches non/bad-response**: nach 3 Monaten antiviraler Therapie kein Abfall der Viruslast um mindestens >1 log
- **Sekundäre Resistenz**: nach initialem Ansprechen auf eine antivirale Behandlung konsekutiver Anstieg der Viruslast um mehr als >1 log über dem Detektionslimit

Entwicklung einer antiviralen Resistenz unter Nukleos(t)id-Analog Behandlung



¹Lai et al. Clin Infect Dis. 2003;36:687-96

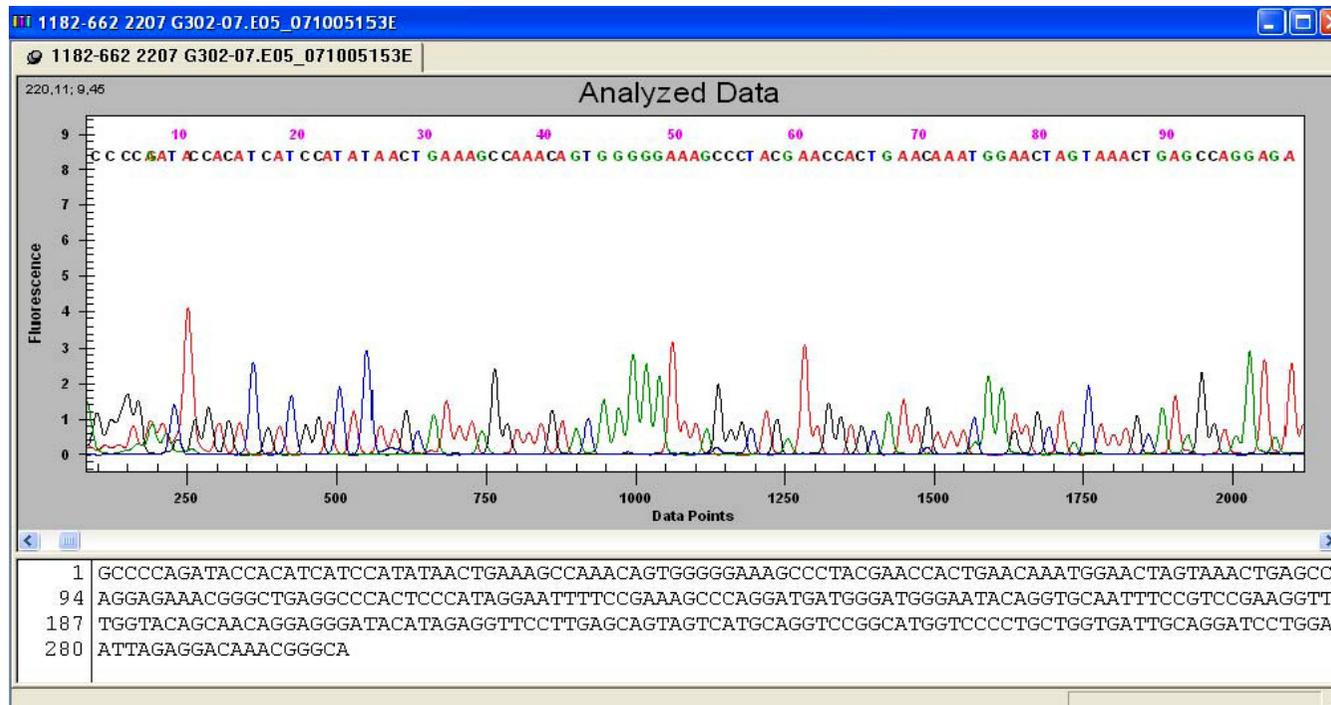
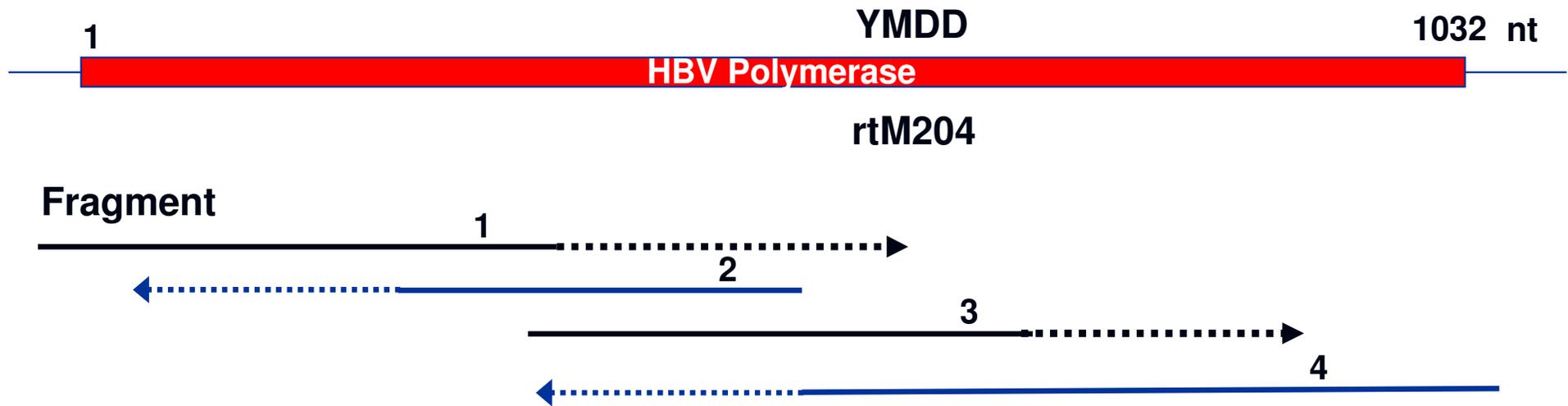
²Hadziyannis et al. Gastroenterology 2006;131:1743-1751,

³Sherman et al. Hepatology 2008

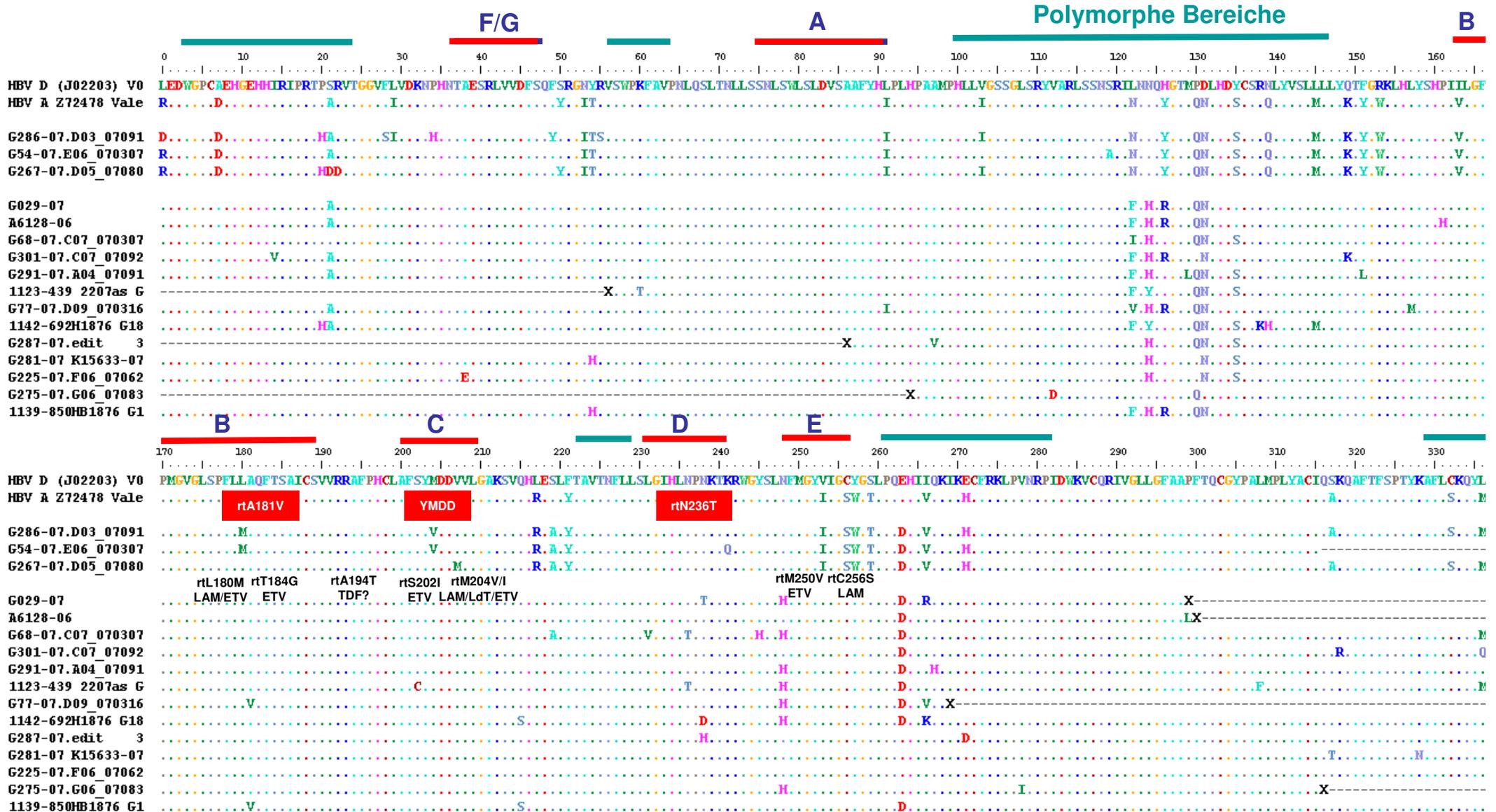
⁴Lai et al. AASLD 2006

⁵Heathcote et al. AASLD 2007, Marcellin et al. AASLD 2007

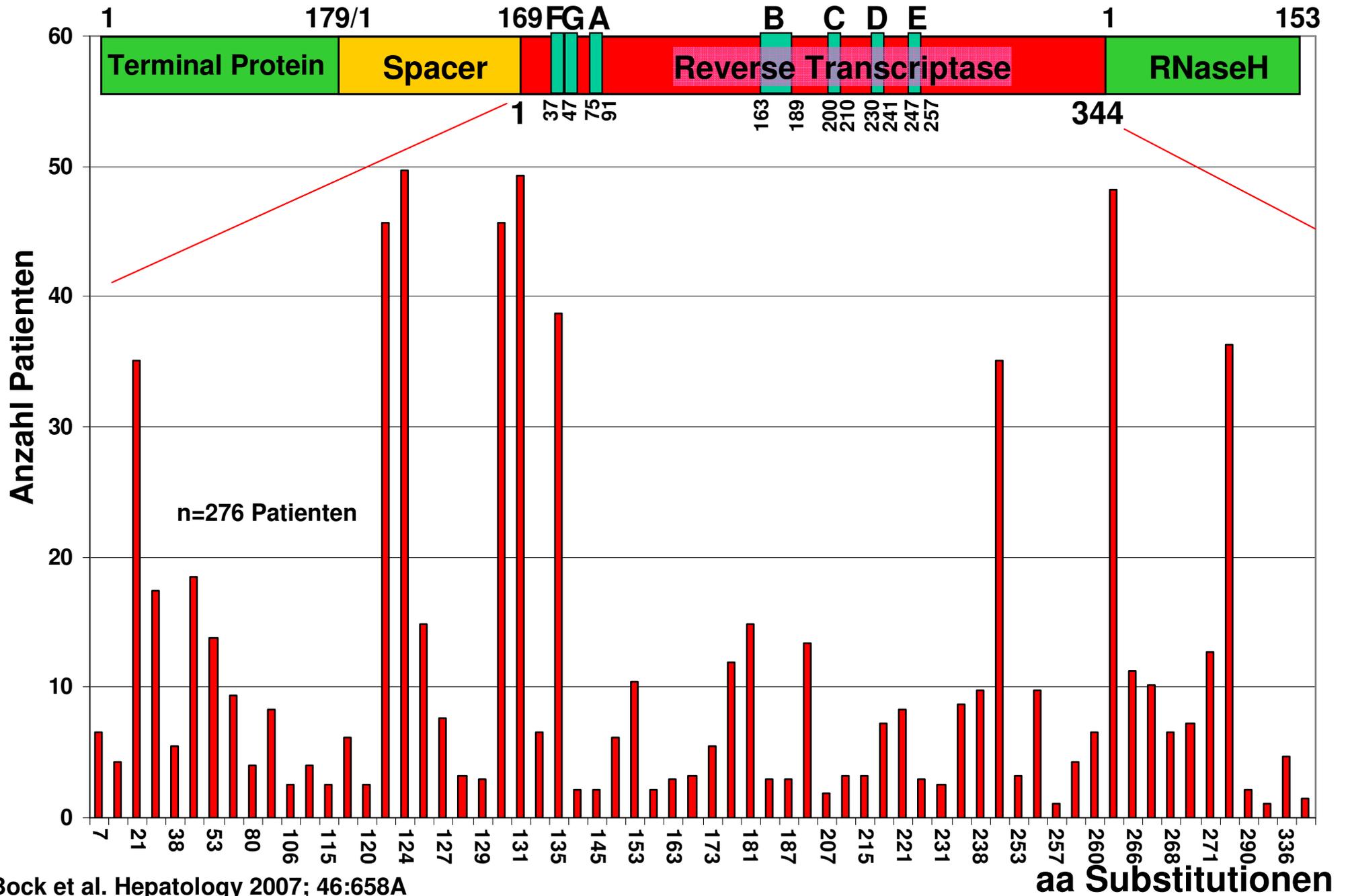
Schema PCR/Sequenzierungsmethode zur Mutationsanalyse von Hepatitis B Virus Resistenzmutationen



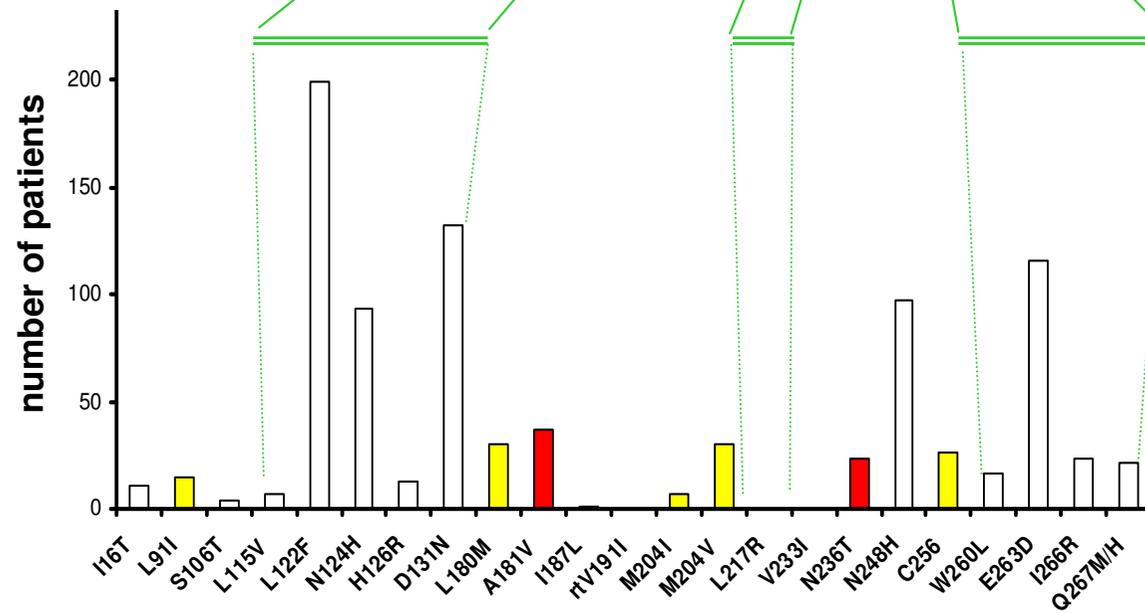
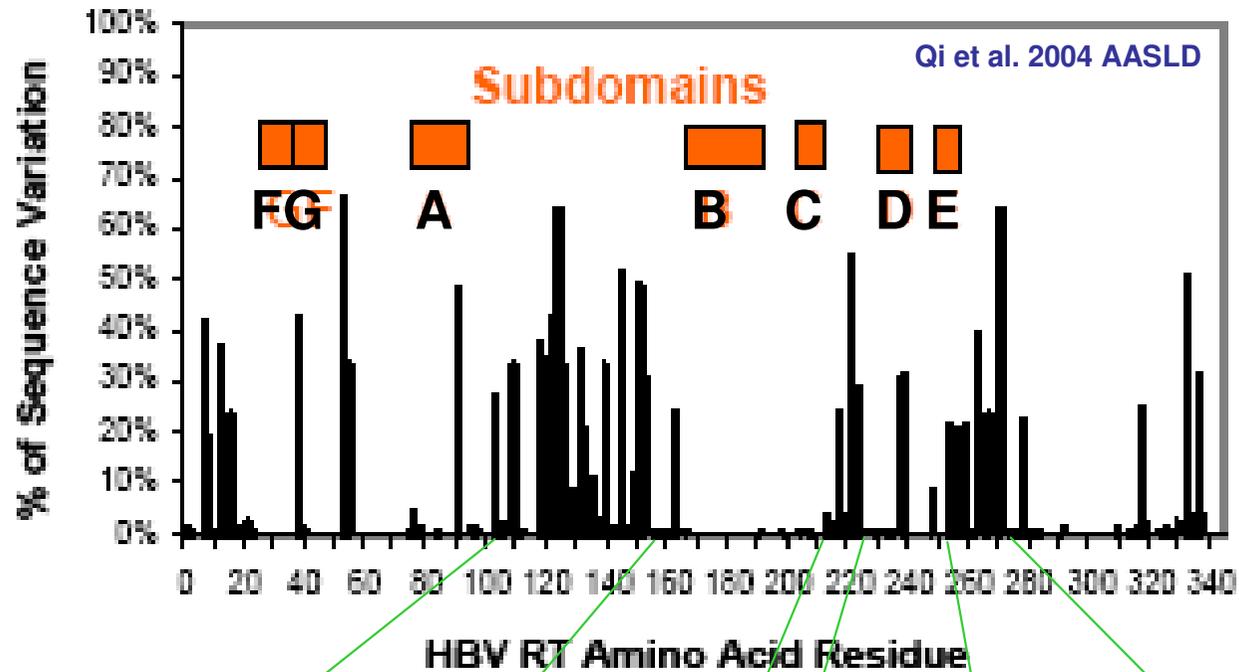
Molekulargenetische Analyse der HBV Polymerase von HBV-infizierten Patienten bei Adefovir Behandlung



Häufigkeitsverteilung von HBV Polymerase-Mutationen unter Adefovir Therapie



Polymorphe Bereiche der HBV RT-Domäne



Polymorphe Bereiche

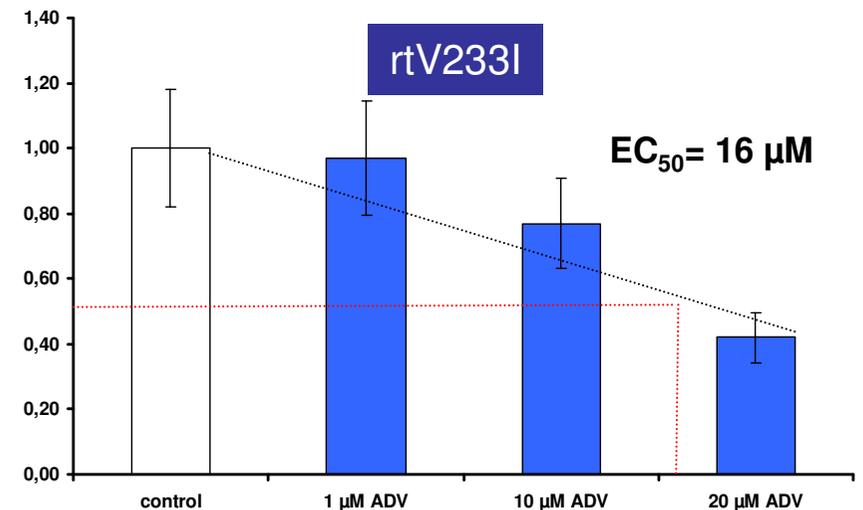
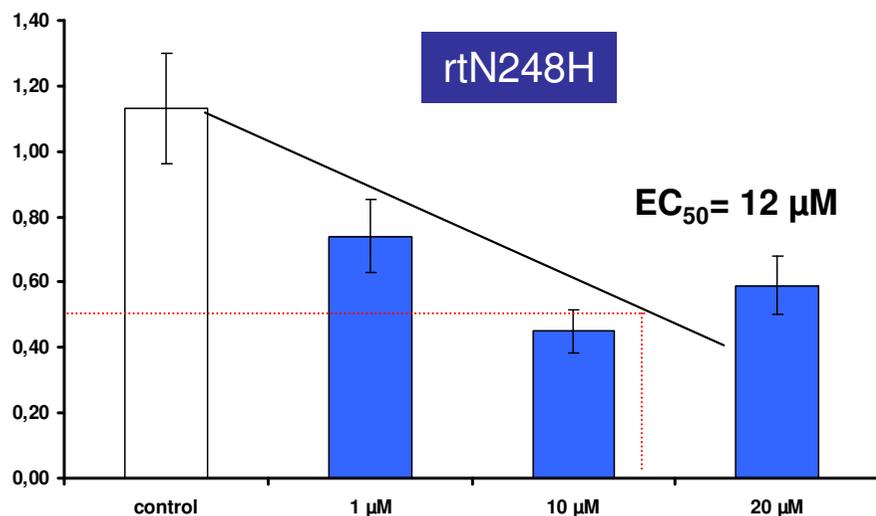
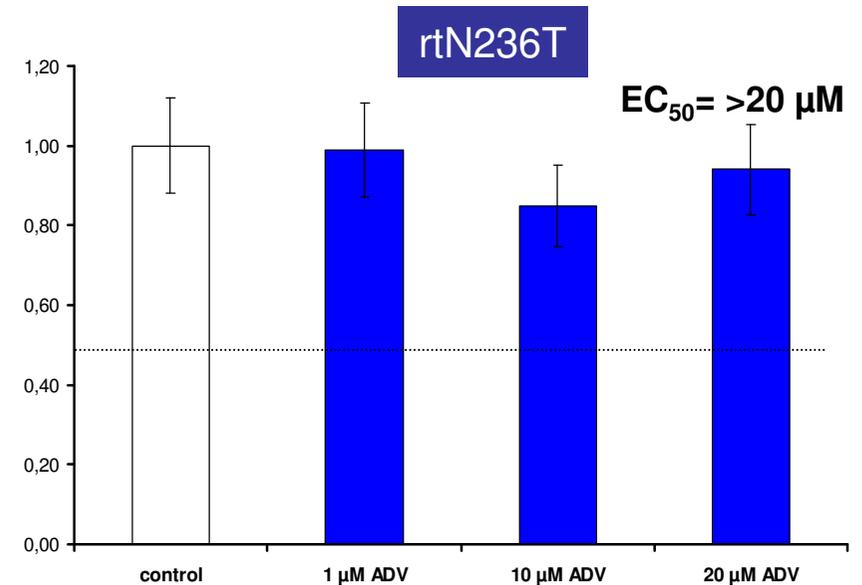
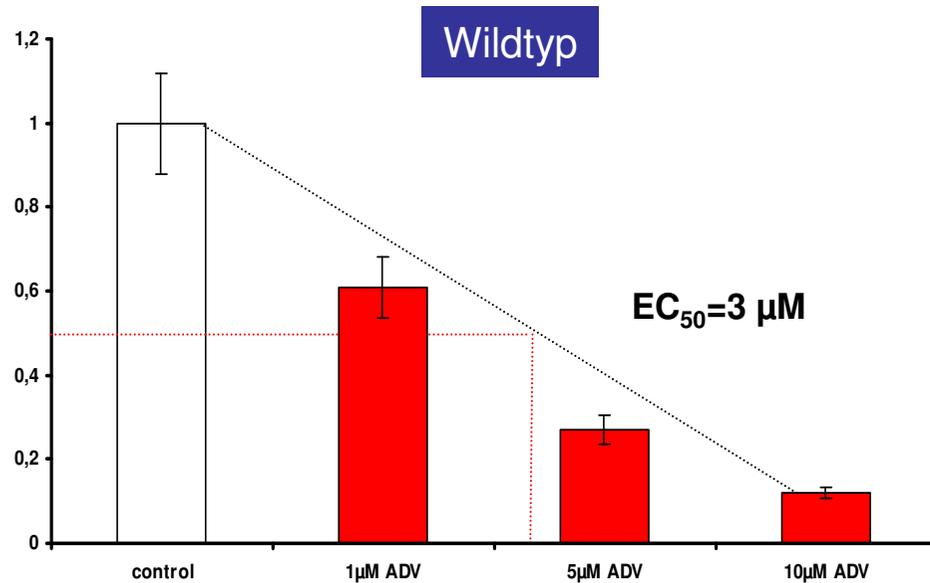
Polymorphe Stellen (>1% Sequenz Variation) in der HBV RT-Domäne

59 (17%) der 344 HBV-RT Reste zeigen >1% Sequenzvariation bei HBeAg+ Patienten

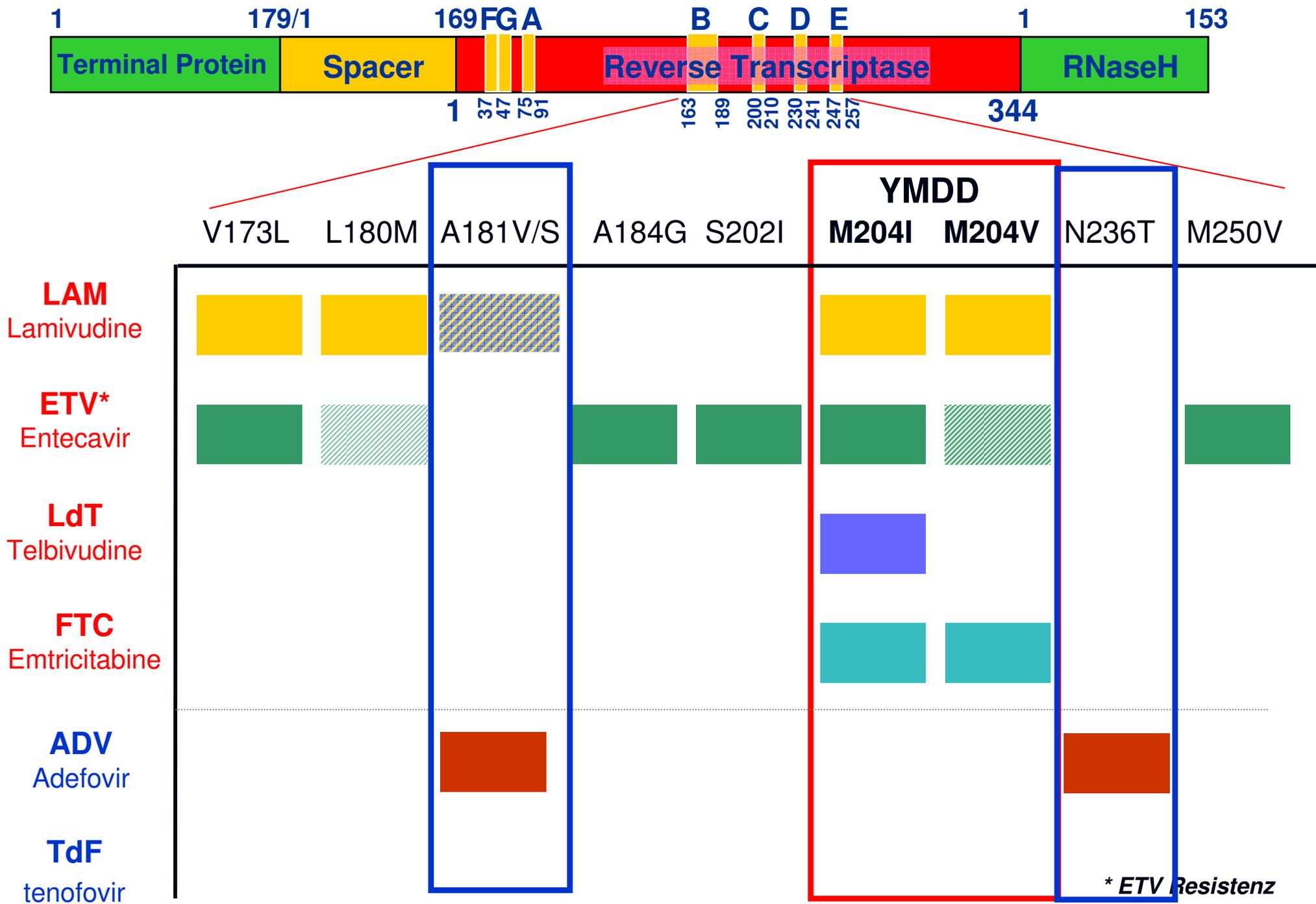
n=276

aa Substitution

Suszeptibilität von HBV Polymerase Mutanten gegenüber Adefovir Dipivoxil in funktionellen phänotypischen Assays



Kreuzresistenz bei HBV Therapeutika



Selektion kompensatorischer Mutationen unter sequentieller antiviraler Behandlung



GASTROENTEROLOGY 2002;122:264-273

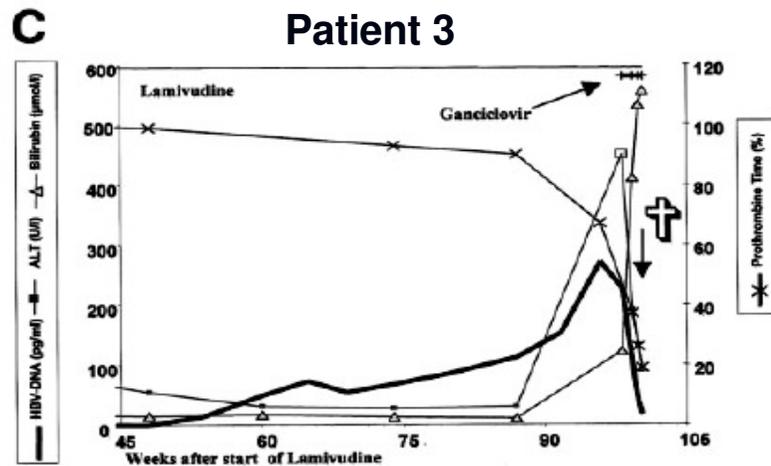
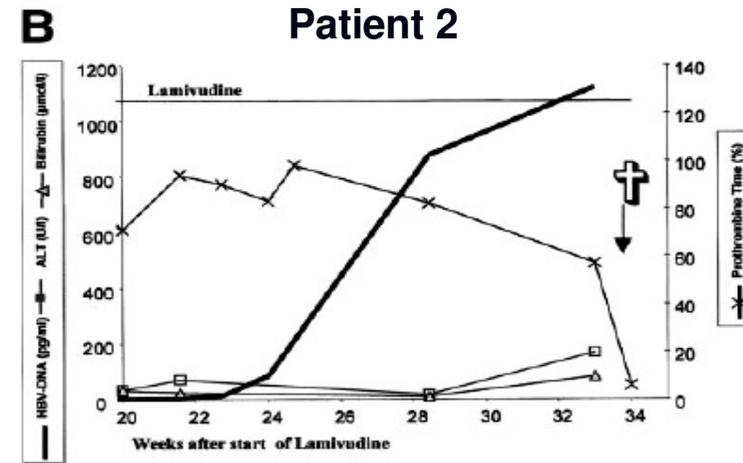
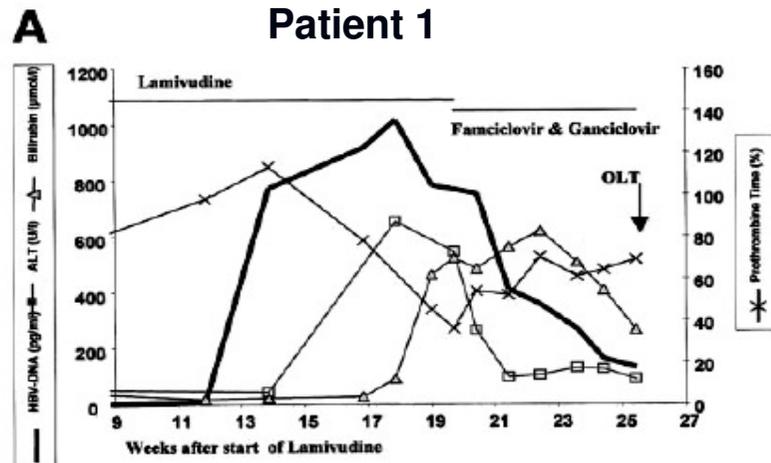
CLINICAL RESEARCH

Selection of Hepatitis B Virus Polymerase Mutants With Enhanced Replication by Lamivudine Treatment After Liver Transplantation

C.-THOMAS BOCK,* HANS L. TILLMANN,* JOSEPH TORRESI,† JÜRGEN KLEMPNAUER,§
STEPHEN LOCARNINI,‡ MICHAEL P. MANNS,* and CHRISTIAN TRAUTWEIN*

*Department of Gastroenterology and Hepatology, †Department of Surgery, Medical School of Hannover, FRG; ‡Victorian Infectious Disease Reference Laboratory Melbourne, Victoria, Australia; and §Department of Medicine, University of Melbourne, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia

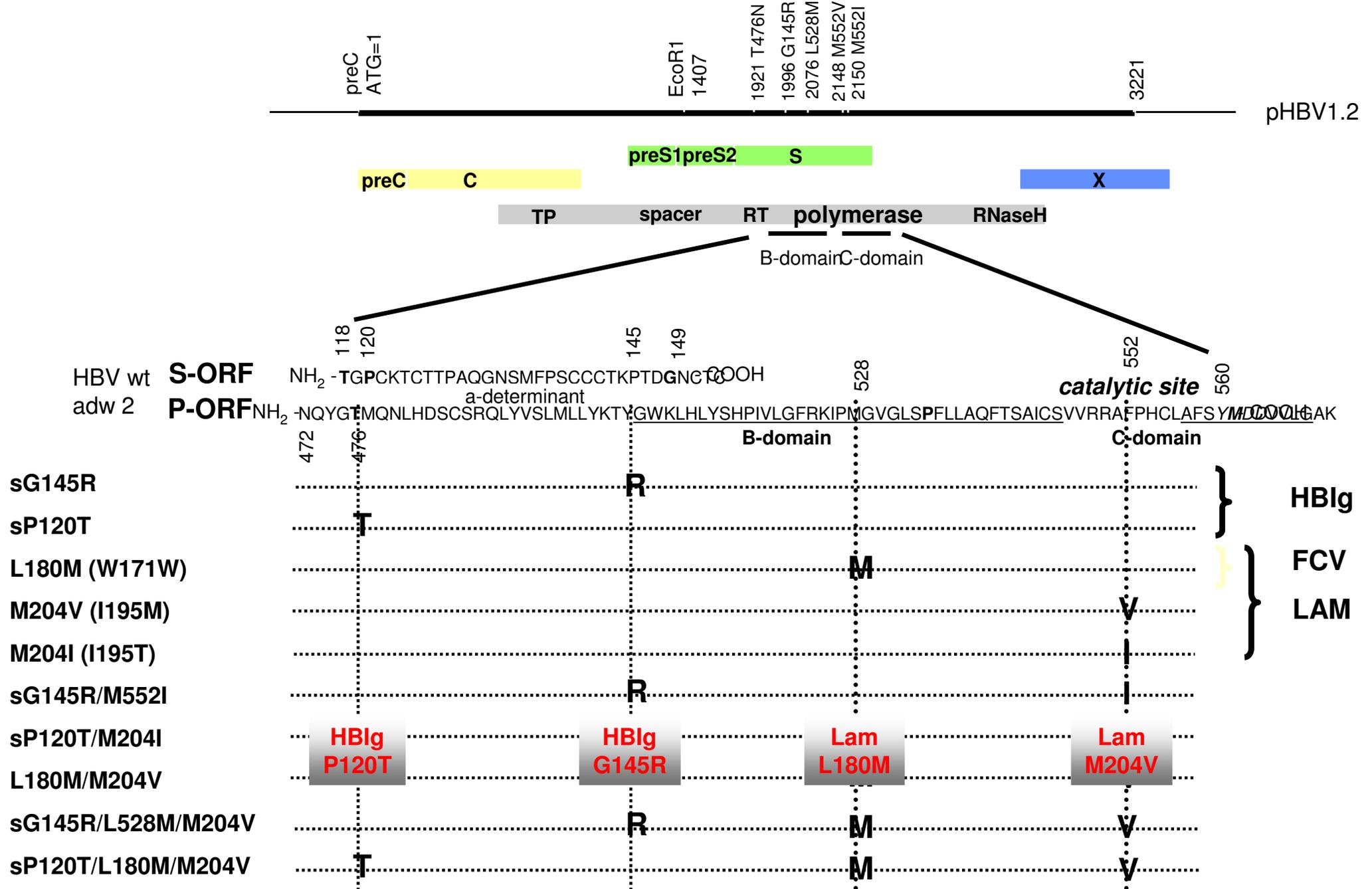
Selektion kompensatorischer Mutationen unter antiviraler Behandlung: Patienten



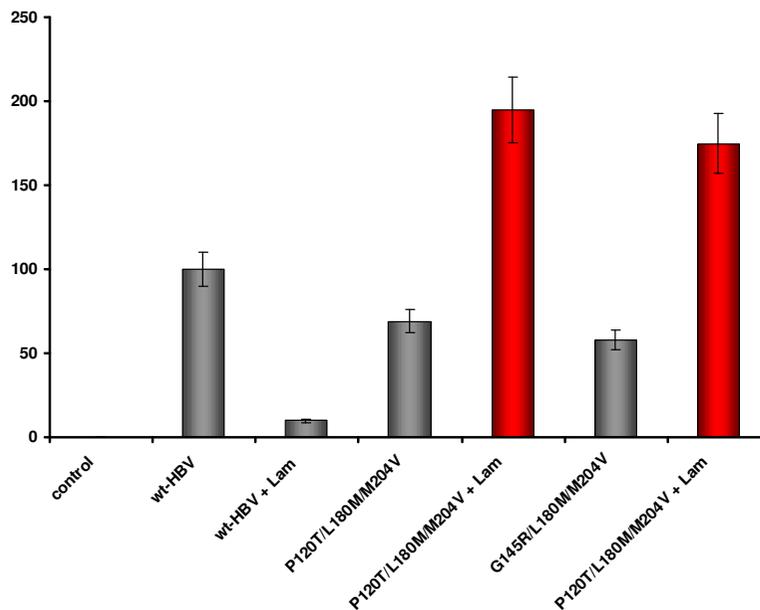
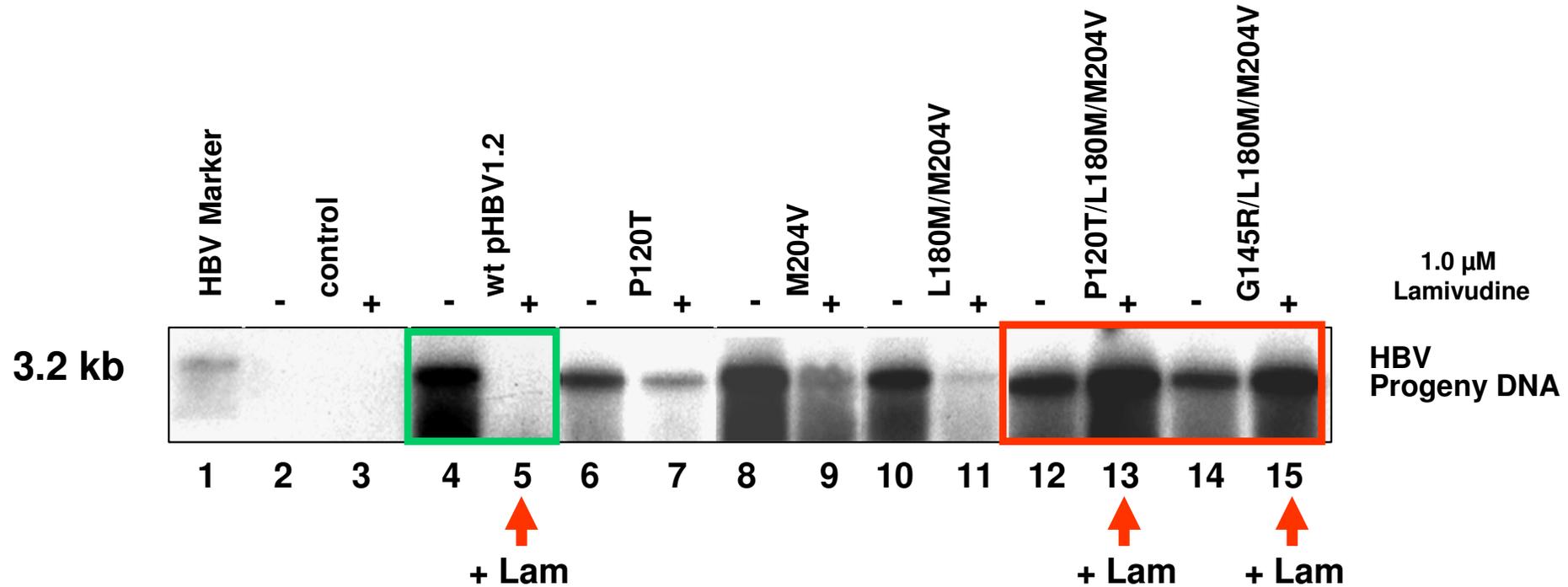
D

AA of the Polymerase	422	464	471-473	474	475	526	550	565
Corresponding aa of HBsAg	68	109/110	117-119	120	120	171	195	210
Wild type	N	N	QYG	T	M	L	M	S
Pat. A pre-Lam	K*	D		N				A
Patient A BK	K*	D		N		M	V*	A
Patient B pre-Laa		T*			V			A
Patient B BK		T*			V	M	V*	A
Patient C pre-Lam			del	N				A
Patient C BK			del	N		M	V*	A

Muster von HBV Polymerase Mutanten



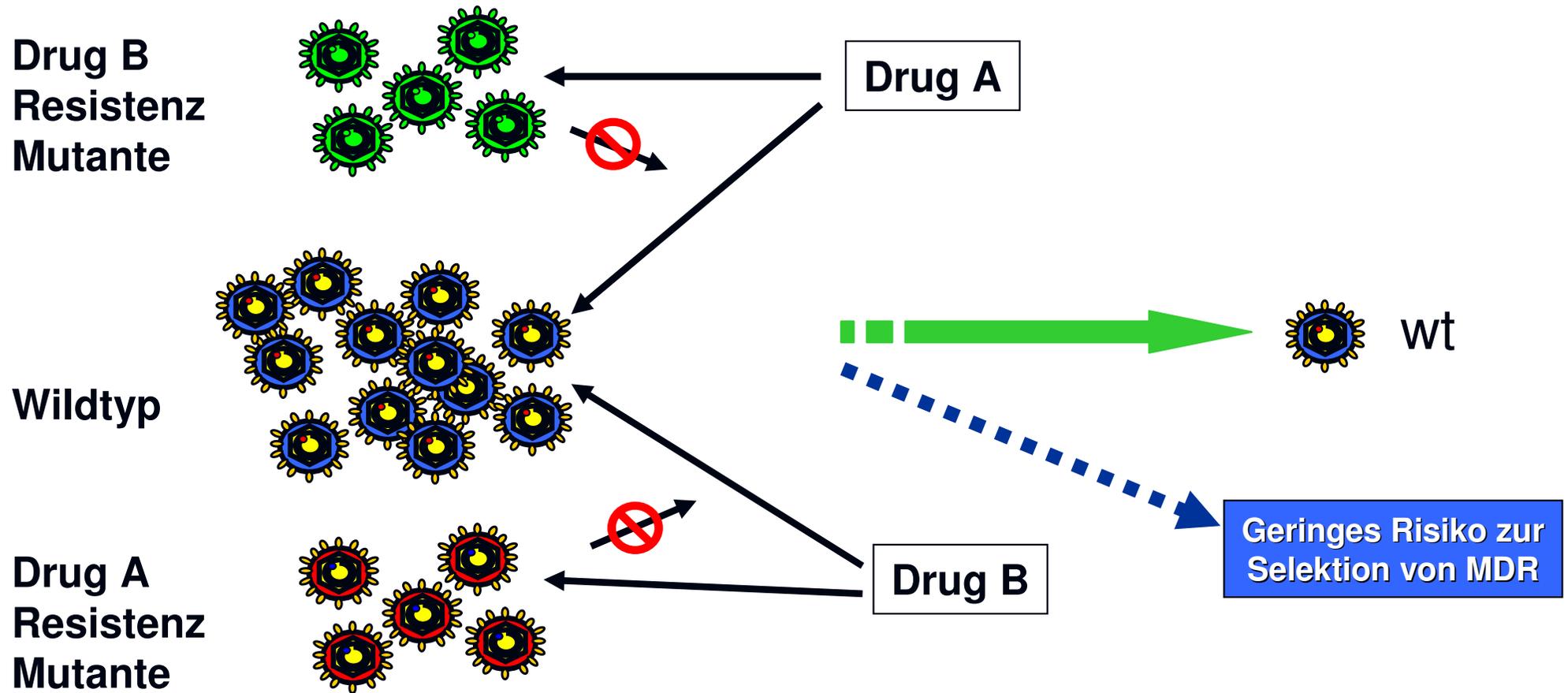
Sensitivität von Polymerase Mutanten gegenüber Lamivudine



- Keine Sensitivität
- erhöhte Replikation unter LAM Behandlung

Rational für eine *De Novo* Kombinations-Therapie

→ Kombination von Therapeutika ohne Kreuzresistenz



Wege zur Resistenzvermeidung

Maximieren der antiviralen Aktivität

- Wahl von Präparaten mit hoher antiviraler Potenz
- Vorgegebene Dosierung einhalten
- Leichte Einnahme, hohe Resorption (Nahrungsunabhängig)
- Für maximale Therapie-Adhärenz sorgen (*Compliance*)

Maximieren der Resistenzbarriere

- Vermeidung sequentieller Monotherapie
- Auswahl von Nukleos(t)idanaloga mit einer hohen Resistenzbarriere
- Kombination komplementärer Resistenzprofile

Resistenz: Zusammenfassung der Leitlinie 2007

- **Die neuen Leitlinien unterstreichen die Wichtigkeit der Resistenzvermeidung und adäquatem Resistenzmanagement**
 - Bei >1 Mio Kop/ml Einsatz hochpotenter Substanzen
 - HBV-DNA Monitoring alle 3 Monate, Intensivierung der Therapie bei unvollständigem Ansprechen nach 6-12 Monaten
 - Rasche Intervention nach sekundärem Therapieversagen (>1 log Viruslastanstieg)
 - Vermeidung sequenzieller Monotherapie
 - „Add-on“ Therapie mit komplementärem Resistenzprofil

University of Tübingen
Department of Molecular Pathology

Prof. Dr. Reinhard Kandolf
Dr. Bernd Köberlein
Dr. Anja Düchting
Dr. Stefanie Simonovic
Dipl. Biol. Agnes Bryniok
Dipl. Biol. Friedericke Utta
cand. med. Christine Walker
cand. med. Martin Wolf
cand. med. Christian Wollboldt
Rosa Mamato
Heike Kaiser

Acknowledgments

Medical School of Hannover

Prof. Dr. Heiner Wedemeyer
Prof. Dr. Michael Manns

Charité Universitätsmedizin
Berlin, Benjamin Franklin,
Virchow

Prof. Dr. Thomas Berg
Prof. Dr. Carsten Tschöpe

Robert Koch-Institut, FG15:

Dr. Marina Höhne
Dr. Sabine Diedrich
Dr. Meike Chevillotte
Dr. Sandra Niendorf
Dr. Andreas Mas Marques
Fr. Tina Dittmann
Fr. Daniela Gutt
Fr. Roswitha Lorenz
Fr. Ute Obst
Fr. Christin Kellner
Fr. Kathrin Stanossek
Fr. Jenny Thiele
Fr. Sonja Zimmermann

German Cancer Research Center,
DKFZ, Heidelberg

Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf
Prof. Dr. Frank Rösl

Duke University, Durham, USA

Prof. Dr. Hans Tillmann

Tran Hung Dao Hospital,
Hanoi, Viet Nam

Prof. Dr. Nguyen T. Binh
Dr. Song Le Huu
Dr. Nguyen Toan

Albert Schweitzer Hospital,
Lambarene, Gabon

Prof. Dr. Peter Kremsner

Royal Melbourne Hospital, Australia

Prof. Dr. Joseph Torresi
Prof. Dr. Stephen Locarnini

5 000 km

Kartographie: Andreas Birken

www.a-birken.de/welt.gif