



Universität Potsdam
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biochemie und Biologie

Masterarbeit

Primärresistenz und Vorkommen von HIV-Subtypen bei spät diagnostizierten HIV-1-Infektionen in Deutschland

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M.Sc.)**

**Sina Girra
Matrikelnummer: 755335**

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Norbert Bannert
Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Katja Arndt

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Berlin, den 01.12.2015

Sina Girra

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	5
2 Abstract.....	6
3 Einleitung.....	7
3.1 Humanes Immundefizienzvirus.....	7
3.2 Vorkommen und Verbreitung von HIV.....	7
3.3 Infektionswege und Krankheitsverlauf von HIV.....	8
3.4 HIV-Diagnostik.....	9
3.5 Inzidenztestung.....	10
3.6 Antiretrovirale Therapie von HIV-Infektionen.....	11
3.7 Antiretrovirale HIV-Resistenz unter Therapie.....	12
3.8 Übertragene Resistenz.....	13
3.9 Genotypische Resistenzbestimmung.....	13
3.10 Molekulare Surveillance von HIV.....	14
3.11 Zielstellung.....	16
4 Material und Methoden.....	17
4.1 Material.....	17
4.1.1 Klinische Proben und Probenpanel.....	17
4.1.2 Poweranalyse.....	17
4.1.3 Reagenzien.....	18
4.1.3.1 Test Kits.....	19
4.1.3.2 Kontrollen.....	19
4.1.3.3 Primer.....	20
4.1.4 Technische Geräte.....	21
4.2 Methoden.....	22
4.2.1 Testung rezenter Infektionen.....	22
4.2.1.1 BED-CEIA.....	22
4.2.1.2 BioRad Aviditätstest.....	23
4.2.1.3 Multi Assay Algorithmus.....	23
4.2.1.4 Entwicklung eines Dual Assay Algorithmus.....	24
4.2.2 Genotypische Resistenzbestimmung.....	25
4.2.2.1 RNA-Extraktion.....	25
4.2.2.2 Amplifikation der <i>pol</i> -Region (Protease und Reverse Transkriptase).....	26

4.2.2.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	27
4.2.2.4	Quantifizierung der aufgereinigten PCR-Produkte	28
4.2.2.5	Sequenzierung nach Sanger	28
4.2.2.6	Subtypbestimmung und Resistenzvorhersage	29
4.2.3	Bestimmung der Viruslast	29
4.2.4	Statistische Analysen	30
5	Ergebnisse.....	31
5.1	Powerberechnung, Probenausfall und Repräsentativität	31
5.2	Charakterisierung des Probenpanels	34
5.3	Subtypverteilung	35
5.4	Prävalenz der übertragenen Resistenz in 2013-2014.....	40
5.5	Vergleich der Ergebnisse von lang bestehenden und rezenten HIV-1-Infektionen	43
5.6	Vergleich der Klassifikationen von lang bestehenden HIV-Infektionen durch den BED-CEIA und den Dual Assay Algorithmus.....	50
6	Diskussion	52
6.1	Studienpanel und Repräsentativität	52
6.2	Charakteristika der Studienpopulation	52
6.3	HIV-Subtypen und übertragene Resistenzen bei spät diagnostizierten HIV-Infektionen	53
6.4	Gegenüberstellung von kürzlich erworbenen und länger bestehenden HIV-Infektionen	54
6.5	Bewertung der Ergebnisse unterschiedlicher Ansätze zur Inzidenztestung (BED-CEIA vs. DAA)	55
7	Ausblick.....	56
	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>57</i>
	<i>Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>63</i>
	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>65</i>
	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>67</i>
	<i>Anhang</i>	<i>68</i>
	<i>Danksagung.....</i>	<i>71</i>

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Molekulare Surveillance von HIV liefert wichtige Informationen zum Vorkommen und zur Verbreitung zirkulierender HIV-Varianten. Während die Identifikation von übertragenen Resistenzen (TDR) für die Initialtherapie von großer Bedeutung ist, ist die Kenntnis um seltene HIV-Varianten/Subtypen insbesondere zur Anpassung der Nachweismethoden in der Diagnostik wichtig. Im Rahmen des Projekts Master HIV/HEP werden dem RKI seit 2013 von ca. 60% aller gemeldeten HIV-Neudiagnosen filtergetrocknete Serumproben für die molekulare Surveillance zugesandt. Mit Hilfe eines kommerziellen Tests (BED-CEIA) werden die Proben zunächst als rezente oder chronische Infektion (≤ 140 Tage bzw. >140 Tage Infektionsdauer) klassifiziert. Der BED-CEIA hat eine Sensitivität und Spezifität von 80% bzw. 86% und ist daher lediglich für epidemiologische Studien zugelassen.

Zielstellung: Ziel dieser Arbeit war es die TDR- und Subtypverteilung beider Subpopulationen (rezente/Langzeit-Infektionen) zu vergleichen. Zudem sollte ein im Labor etablierter dualer Testalgorithmus (DAA) mit verbesserter Sensitivität und Spezifität auf die Studienproben angewandt werden, um die Ergebnisse, die dem BED zu Grunde liegen, mit denen des DAA zu vergleichen. Damit sollte das Ausmaß an Fehlklassifikationen durch den BED (insbesondere für einige non-B Subtypen) sowie die damit potentiell verbundenen Verzerrungen in den Subpopulationen beurteilt werden.

Material und Methoden: Mit Hilfe einer Poweranalyse wurde der Probenumfang zur repräsentativen Analyse der chronischen Infektionen unter allen Neudiagnosen 2013/2014 ermittelt (Untersuchungszeitraum: 15.10.-31.12.2014). Virale RNA wurde aus DSS extrahiert, in einer in-house *2pol*-PR/RT-PCR amplifiziert und sequenziert. Anhand der Populationssequenz (Sanger) wurde eine genotypische Resistenzbestimmung durchgeführt und der Subtyp ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Verbindung mit den klinischen und epidemiologischen Meldedaten ausgewertet. Zudem wurden die Filterproben des Untersuchungszeitraums mit einem BioRad-Aviditätsassay getestet, dessen Ergebnisse in dem in-house DAA zur erneuten Analyse in rezente und chronische Infektionen in Hinblick auf TDR und Subtyp verwendet wurden.

Ergebnisse: Aus 225 Proben konnten virale Sequenzen bestimmt werden. Im Vergleich zu den rezenten HIV-1-Infektionen zeichnet sich die Gruppe der länger bestehenden Infektionen durch einen signifikant höheren Anteil an Frauen, an heterosexuellen Transmissionen und an Personen nicht deutscher Herkunft aus. Es konnten bei fast 40% der späten Diagnosen Subtyp non-B Infektionen festgestellt werden. Dies überstieg den Anteil bei den rezenten Infektionen (ca. 24%) deutlich. Keine signifikanten Unterschiede waren bei den Anteilen der TDR in den beiden Gruppen zu beobachten. 21 Proben wurden durch die Anwendung des DAA unterschiedlich im Vergleich zum BED-CEIA klassifiziert. Während die Gruppe der BED-CEIA klassifizierten chronischen Infektionen 225 Proben umfasste, bestand die Gruppe der DAA klassifizierten chronischen Infektionen aus 219 Proben. Die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Gruppen hatte jedoch keine signifikante Auswirkung auf die Verteilung der Subgruppen (Geschlecht, Transmissionsgruppe, Herkunftsland, Infektionsland) oder in der Subtypzusammensetzung.

Schlussfolgerung: Im Vergleich zu rezenten Infektionen sind für Individuen mit späten HIV-Diagnosen folgende Merkmale charakteristisch: höheres Alter, weibliches Geschlecht, heterosexueller Transmissionsweg, Herkunft aus dem Ausland sowie Subtyp non-B Infektionen. Vergleichende Untersuchungen mit BED-CEIA und DAA sollten mit einer größeren Probenzahl durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede bei einigen HIV-Subtypen erkennbar zu machen bevor es zur Einführung des kosten- und zeitaufwendigeren DAA kommt.

2 Abstract

Background: Molecular surveillance of HIV provides important information about the presence and distribution of circulating HIV variants. The identification of transmitted drug resistance (TDR) is relevant for first-line therapy and knowledge of rare HIV variants/subtypes is critical for keeping HIV diagnostic tests up-to-date. Within the project 'Master HIV/HEP', samples from approximately 60% of all reported new HIV diagnoses are sent to the Robert Koch-Institute (RKI) in the form of filter dried serum spots (DSS) for molecular surveillance. The commercially available BED-CEIA capture ELISA allows classification of the samples as 'recent' or 'long-term' infections (≤ 140 days or >140 days duration of infection). Due to its low sensitivity and specificity (80% and 86%, respectively) this recency test is only suitable for epidemiological studies.

Aims: The aim of this work was to compare the TDR and subtype distribution of both subpopulations (recent and long-term infections). In addition, a dual test algorithm (DAA) established in the laboratory that has improved sensitivity and specificity should be applied to the study panel. These results should then be compared to those of the BED-CEIA test. Finally, the degree of misclassification from the BED-CEIA (particularly for some non-B subtypes) and the potential correlating bias between the subpopulations should be evaluated.

Material und methods: Power analysis was applied to determine the sample size for a representative analysis of long-term infections from all new HIV diagnoses in 2013/2014. The time period for sample tracking was defined as the 15th October to the 31st December, 2014. Viral RNA was isolated from DSS, amplified in an in-house *2pol*-PR/RT-RT-PCR and sequenced. Population-based sequencing (Sanger) allowed resistances to be predicted and HIV-subtypes to be determined. The results were linked to the reported clinical and epidemiological data and analyzed. Furthermore, DSS were tested using the BioRad avidity assay and these results were integrated using the in-house test algorithm (DAA) into a new classification of the samples as 'recent' and 'long-term' infection with regard to TDR and subtype.

Results: In total, 225 DSS were successfully genotyped and yielded viral sequences for analysis. In comparison to recent infections, the group of long-term infections was characterized by a significantly higher proportion of women, persons with heterosexual transmission route and persons with a country of origin other than Germany. Almost 40% of late diagnoses were determined to be subtype non-B infections, clearly a higher proportion than within recent infections (24%). No significant differences in the rates of TDR were observed between the groups. Twenty-one samples were classified differently using the DAA than with the BED-CEIA. The group of long-term infections classified with BED-CEIA comprised 225 samples, compared with 219 samples for the DAA. However, these differences in the composition of the two long-term groups did not significantly affect the proportion of the subgroups (gender, transmission group, origin, place of infection) or the subtype distribution.

Conclusion: In contrast to recent infections, persons with late HIV-diagnoses tend to have the following characteristics: older, female, heterosexual transmission route, foreign country of origin and subtype non-B infection. Before introducing the more costly and lengthy DAA for recency testing, additional testing with the BED-CEIA and DAA of a larger sample size should be carried out to determine whether there are significant differences for some HIV-subtypes.

HIV-Infektionen sind jedoch noch unentdeckt. Die Gruppe der Menschen, die sich bereits einer antiretroviralen Therapie (ART) unterziehen, umfasste 54.000 Personen (Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 44, 3. November 2014).

Im Jahr 2014 wurden insgesamt 3.525 HIV-1-Neudiagnosen für Deutschland an das RKI gemeldet. Dies bedeutet eine Zunahme zum Vorjahr 2013 von 7% (2013: 3.288 Neuinfektionen). Der höchste Anteil der Neudiagnosen kann der Risikogruppe der MSM (Männer, die Sex mit Männern haben) zugeordnet werden (54%; n=1.904). 22% der Neuinfektionen (n=780) lassen sich auf ein heterosexuelles Transmissionsrisiko (HET) zurückführen und 3% (n=111) wurden beim Konsum von intravenös verabreichten Drogen (PWID) erworben. Der Infektionshintergrund bei den restlichen 20% (n=704) ist unbekannt (Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 27, 6. Juli 2015).

3.3 Infektionswege und Krankheitsverlauf von HIV

Eine Infektion findet aufgrund des Austausches von Körperflüssigkeiten statt. Zu den häufigsten Übertragungswegen von HIV zählen ungeschützter Geschlechtsverkehr mit einer bereits infizierten Person, das Teilen von Injektionsmaterialien bei Drogenkonsumenten, Kontakt mit Blut eines HIV-Infizierten (z.B. durch Bluttransfusion) und die Transmission während der Schwangerschaft von einer HIV-positiven Mutter auf ihr Kind.

HIV infiziert und schädigt das menschliche Immunsystem; hauptsächlich seine zellulären Bestandteile wie die CD4-T-Zellen. Der Infektionsverlauf von HIV umfasst drei Stadien (Abb. 2).

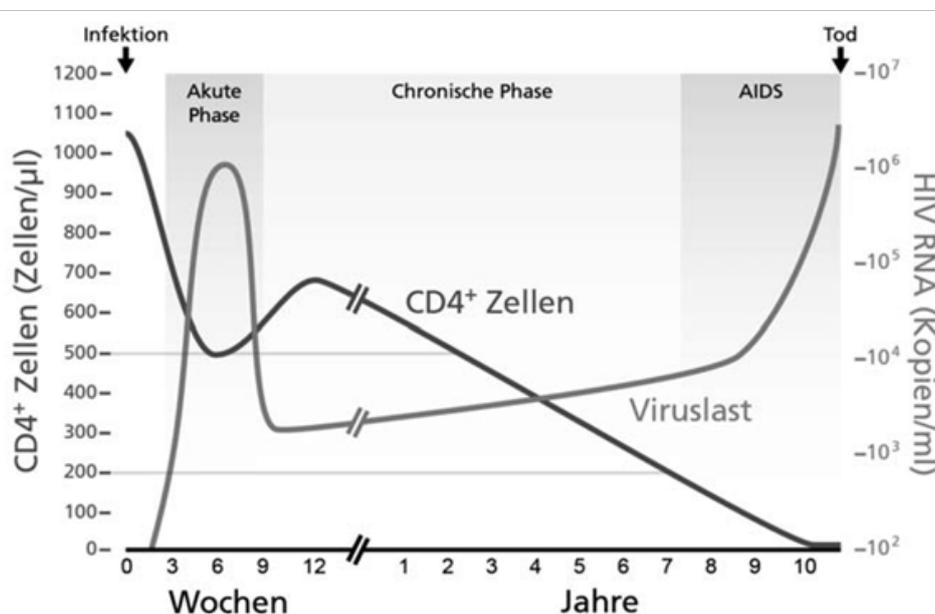


Abb. 2. Verlauf einer HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie.

Gekennzeichnet ist der Kurvenverlauf der CD4-T-Zellzahl und der Viruslast (HIV-Buch 2014/2015).

Die erste (akute) Phase beginnt 10 bis 14 Tage nach der Infektion und ist gekennzeichnet durch die Virämie von bis zu 1 Milliarde Viruspartikel pro ml Blutplasma und gleichzeitig einer sinkenden CD4-T-Zellzahl, sowie einem Anstieg der cytotoxischen CD8-T-Zellen. In dieser Anfangszeit ähneln die Symptome wie z.B. Fieber, Unwohlsein, Kopfschmerzen usw. einem grippalen Infekt und werden daher oft nicht als HIV-Infektion diagnostiziert. Das beschriebene akute retrovirale Syndrom tritt zudem auch nur bei ca. 30% der Infizierten auf.

In der folgenden zweiten Phase werden spezifische humorale IgG- und IgM-Antikörper (Ig- Immunglobulin) vom Immunsystem hergestellt. Dieser Prozess wird Serokonversion genannt. Anschließend kommt es zur massiven Produktion hoch spezifischer Antikörper gegen die viralen Antigene. Durch diese adaptive Immunantwort steigt die CD4-T-Zellzahl wieder an und somit verringert sich die Viruslast im Blut auf einen für das Individuum charakteristischen Wert. In der nun folgenden chronischen, asymptomatischen Phase der Infektion steigt sowohl Titer als auch die Bindungsstärke der Antikörper (Zunahme der Avidität). Zudem repliziert sich das Virus kontinuierlich auf einem Level, das „viral Setpoint“ genannt wird. Die Dauer dieser Latenzphase ist abhängig von der Höhe des viral Setpoints und dem damit verbundenen zeitlichen Abfall der CD4-T-Zellzahl im weiteren Krankheitsverlauf.

Ist schließlich die Anzahl der CD4-T-Zellen auf unter 200 Zellen pro μl gesunken, hat der Patient das AIDS-Stadium erreicht. Verbunden mit der niedrigen CD4-T-Zellzahl kommt es zu einem Abfall der HIV-spezifischen Antikörper. Die Viruslast hingegen steigt enorm an und das geschwächte Immunsystem ist nicht mehr im Stande die Infektion unter Kontrolle zu halten. Das AIDS-Stadium ist außerdem geprägt durch Erkrankungen mit verschiedenen Erregern und/oder neurologischen Symptomen, wie der HIV-bedingten Enzephalopathie. Ohne Behandlung beläuft sich die Lebenserwartung nach Beginn der letzten Phase auf weniger als zwei Jahre. Ausnahmen bilden die „Non-Progressors“ und „Elite-Controllers“ (HIV-Buch 2014/2015).

HIV-Infektionen werden mit Hilfe der vom amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention (CDC) festgelegten Kriterien eingestuft. Zum Einen werden drei Kategorien, die mit bestimmten klinischen Symptomen assoziiert sind, definiert: A für asymptomatische HIV-Infektion, B für Krankheitssymptome oder Erkrankungen, die nicht in die Kategorie C fallen, dennoch aber der HIV-Infektion ursächlich zuzuordnen sind, oder auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hinweisen und C für AIDS-definierende Erkrankungen. Zum Anderen gibt es die Einteilung in drei Stadien, die anhand von Laborwerten (CD4-T-Zellzahl) erfolgt (Tab. 1).

Tab. 1. Einteilung der HIV-Infektion des CDC in Bezug auf Laborparameter seit 2008. (HIV-Buch 2014/15)

Stadium	AIDS-Erkrankung	CD4-T-Zellzahl
1	keine	$> 500/\mu\text{l}$ oder $\geq 29\%$
2	keine	$200-499/\mu\text{l}$ oder $14-28\%$
3	AIDS-Erkrankung	$< 200/\mu\text{l}$ oder $<14\%$

3.4 HIV-Diagnostik

Die Diagnose einer HIV-Infektion beruht in Deutschland auf einer Stufendiagnostik. Dafür wird in einem ersten reaktiven Antikörper-Suchtest der 4. Generation nachgewiesen, ob sich HIV-spezifische Antikörper der Immunglobulinklassen A, M und G und/oder virales Antigen im Blutserum des Patienten befinden. Bei einem positiven Ergebnis soll in einem nachfolgenden, hochspezifischen Test (Immunoblot/Westernblot) das Resultat bestätigt

werden. Alternativ oder zusätzlich kann die virale Nukleinsäure mittels Reverse Transkription und anschließender PCR nachgewiesen werden (NAT- Nukleinsäureamplifikationstest). Vor der finalen Diagnose wird eine zweite, unabhängige Probe des Patienten untersucht, um beispielsweise eine Verwechslung oder Kontamination auszuschließen (Bundesgesundheitsblatt, 2015).

Die Antikörper-Suchtests unterscheiden sich in der Art und Zusammensetzung der eingesetzten Antigene: Die Tests der 1. Generation beruhen auf lysierten, partiell gereinigten Viren aus einer humanen CD4-T-Zelllinie. Bei der 2. Generation wurden gentechnisch bzw. synthetisch hergestellte Kern- und Hüllproteine (Gag/Env) verwendet, während sich Tests der 3. Generation auch synthetische Peptide der Kern- und Hüllproteine als Antigene zu Nutze machten. Schließlich ermöglichen die Tests der 4. Generation sowohl den Nachweis virusspezifischer Antikörper, als auch die Detektion des HIV-p24-Antigens (Kapsidprotein). Anhand der Ergebnisse aus der HIV-Diagnostik lassen sich keine Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Infektion ziehen.

3.5 Inzidenztestung

Zur Unterscheidung von kürzlich erworbenen und bereits länger bestehenden HIV-1-Infektionen existieren serologische Methoden (ELISA-Formate), die in einer Reihe von Assays zum „Testing for Recency“ (engl. tests for recent infection, TRI) Anwendung finden. Mit den Inzidenztesten wird entweder der Anstieg des HIV-spezifischen Antikörper-Titers (BED-CEIA), oder die Zunahme der Antikörper-Avidität während der Antikörperreifung gemessen. Es kann auch eine Kombination aus den vorher genannten Markern verwendet werden (Curtis et al., 2012; Layendecker, Brookmeyer et al., 2013; Layendecker, Kulich et al., 2013). Die Einteilung in kürzlich erworbene bzw. länger bestehende Infektion basiert auf definierten Cut-Off-Werten im ELISA.

Der erste Inzidenztest wurde von Janssen et al. im Jahr 1998 beschrieben. Es handelt sich dabei um einen modifizierten, kommerziellen HIV-1 Suchtest der 1. Generation (HIV-ELISA 3A11, Abbott Laboratories), mit dem durch eine starke Vorverdünnung der Proben, niedrige von hohen Antikörpertitern unterschieden werden können. Der Test beruht also auf der Tatsache, dass die Menge der HIV spezifischen Antikörper im Verlauf des ersten Jahres nach der Infektion ansteigt.

Seit 2002 ist der BED-IgG-capture ELISA (BED-CEIA) auf dem Markt erhältlich. Bei dieser Methode wird das Verhältnis der Menge an HIV-1-spezifischen IgG-Antikörpern (anti-gp41) in Bezug zu den gesamten IgG-Antikörpern im Serum bestimmt (Parekh et al., 2002). Der BED-CEIA war lange Zeit der einzig kommerziell erhältliche Test, der von der Food and Drug Administration (FDA) zwecks epidemiologischer Studien zugelassen war. Aus diesem Grund fand er in einer Reihe von Studien Anwendung (Hu et al., 2003; Loschen et al., 2008; Batzing-Feigenbaum et al., 2009; Kim et al., 2010; Scheer et al., 2013). Da in einigen Publikationen (UNAIDS, 2005; Hallett et al., 2009) von einem hohen Anteil an falsch rezent klassifizierten Proben im BED-CEIA berichtet wurde, geriet der Test in die Kritik. Dieser Anteil, also die „Falsch-Rezentrate“ (FRR), beschreibt den Fehler, mit dem Proben von lang bestehenden Infektionen fälschlicherweise als „kürzlich erworben“ klassifiziert werden. In der Folge die HIV-Inzidenz überschätzt. Besonders oft geschieht dies bei Patienten mit geringen Antikörpertitern in einem späten Infektionsstadium (AIDS) oder unter einer

antiretroviralen Therapie, sowie bei Infektionen mit einigen „non-B“ Subtypen, was sich in einer hohen FRR widerspiegelt.

Im Jahr 2002 wurde ebenfalls ein TRI, dessen Methode auf der Bestimmung der Avidität der Antikörper basiert, beschrieben (Suligoj et al. 2002). Auch der Test von Masciotra et al. (2010) beruht auf diesem Prinzip. Dabei wurde der kommerzielle BioRad HIV-1/2 Plus O mit modifiziertem Protokoll durchgeführt. Für einen Aviditätstest wird eine Serumprobe parallel in An- und Abwesenheit eines chaotropen Agens in einem ELISA gemessen werden. Das chaotrope Agens sorgt dafür, dass wenig avide Bindungen wieder gelöst werden. Aufgrund der Reaktionsunterschiede in den zwei Messungen (Aviditätsindex) kann eine Klassifikation der Proben vorgenommen werden.

Eine verbesserte, also kleinere FRR wurde für einen „Multiassay algorithm“ (MAA) berichtet, bei dem Ergebnisse von klinischen Daten (CD4-T-Zellzahl und Viruslast) und serologische TRIs (BED-CEIA und BioRad Aviditätstest) nacheinander durch entsprechende Cut-Offs bewertet werden und schließlich zur Klassifizierung der Probe führen (Laeyendecker et al., 2012).

3.6 Antiretrovirale Therapie von HIV-Infektionen

Der Einsatz von antiretroviralen Medikamenten zur Verbesserung des Gesundheitszustandes HIV-Infizierter Personen ist seit 1987 möglich. Mit einer solchen Behandlung soll die Replikation des Virus gehemmt und somit eine Verringerung der Viruslast unter die Nachweisgrenze von 40-50 Viruskopien/ml Plasma erzielt werden.

Für die Behandlung existieren inzwischen Medikamente aus fünf verschiedenen Wirkstoffklassen:

- Eintritts-Inhibitoren (Korezeptorantagonist und Fusionsinhibitor)
- Nukleosidische bzw. Nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)
- Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)
- Integrase-Inhibitoren (INI)
- Protease-Inhibitoren (PI)

Die verschiedenen Wirkstoffe hemmen an unterschiedlichen Stellen, dargestellt in Abbildung 3, des viralen Replikationszyklus.

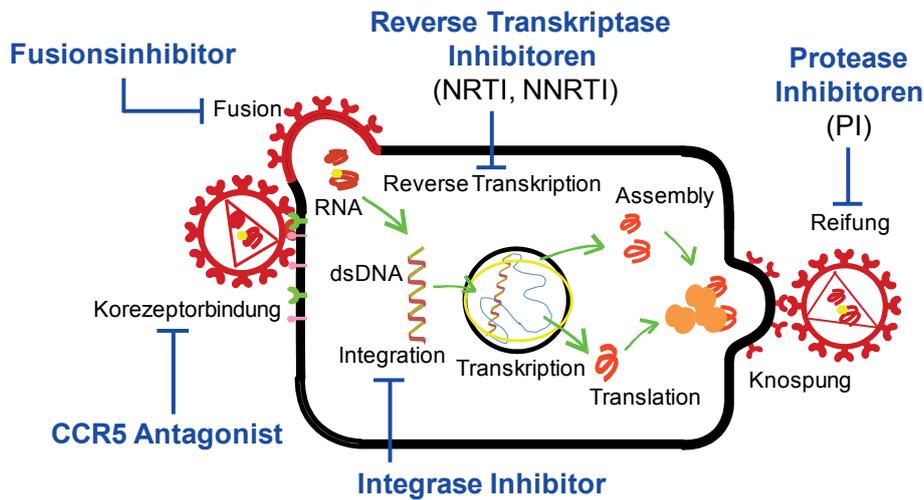


Abb. 3. Angriffsstellen verschiedener Wirkstoffklasse der ART im Replikationszyklus von HIV. Modifizierte Darstellung von AG Kücherer.

Eintrittsinhibitoren verhindern bereits das Eindringen des Virus in die Zelle, indem sie entweder als Korezeptorantagonisten die CCR5-Korezeptoren der Zielzelle blockieren oder als Fusionsinhibitoren durch die Bindung an die Transmembranuntereinheiten (gp41) der insgesamt 72 Glykoprotein-Komplexe in der Virushülle eine Fusion von Virushülle und Zellmembran unterbinden.

Das Umschreiben von viraler RNA in cDNA (komplementäre DNA) wird durch Reverse Transkriptase-Inhibitoren (RTI) unterbrochen. Integraseinhibitoren verhindern die Integration der viralen cDNA in das Wirtsgenom. Bei den Proteaseinhibitoren kommt es zu einer Konkurrenzsituation mit den eigenen Proteasen des Virus um die dazugehörigen Substrate (Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine), so dass die Prozessierung zu funktionsfähigen Proteinen beeinträchtigt ist. Dem zu Folge entstehen keine infektiösen Partikel und es gibt keine vollständige „Virusreifung“.

Seit Oktober 2015 wird der Therapiebeginn bereits direkt nach der HIV-Diagnose angeraten. Die Initialtherapie (first-line) besteht aus einer mit mindestens drei verschiedenen Medikamenten aus zwei unterschiedlichen Wirkstoffklassen (engl. combined antiretroviral therapy = cART). Derzeit wird als Initialtherapie eine Kombination aus zwei NRTI und einem INI, NNRTI oder PI empfohlen (EACS Treatment guidelines version 8.0, 2015; http://www.eac-society.org/files/2015_eacsguidelines_8.0-english_revised-20151104.pdf). Weitere Kombinationen werden, nach Therapieversagen durch Resistenz, mit geeigneten Folgetherapien eingesetzt. Aufgrund einer inzwischen großen Anzahl verfügbarer antiretroviraler Medikamente und der genotypischen Resistenzbestimmung, ist es trotz vorhandener Resistenzmutation(-en) möglich eine wirksame Kombinationstherapie für Betroffene zu erstellen.

3.7 Antiretrovirale HIV-Resistenz unter Therapie

Der hohe Turnover von HIV (10 Milliarden Viruspartikel/Tag) (Perelson et al., 1996), die hohe Fehlerrate der RT (statistisch ca. eine Mutation/neuem Viruspartikel) sowie die normalen Prozesse der Rekombination und Selektion führen zu einer hohen Diversität an Virusvarianten (Quasispezies) in HIV-Infizierten. Bei einer suboptimalen Dosierung von antiretroviralen Medikamenten, bei der die Virusreplikation fortschreitet, unterliegen die verschiedenen Virusvarianten einem Selektionsdruck. Varianten, die unter diesen Bedingungen einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp entwickeln, können sich zu einer dominanten

(resistenten) Population entwickeln (Coffin, 1995 / Metzner et al., 2009). Die Ursachen einer zu geringen Wirkstoffmenge sind vielfältig: Es kann aus einer schwachen Resorption oder gesteigerten Umsatzrate bei dem Patienten selbst resultieren. Weitere Gründe liegen potentiell in einer mangelnden Medikamentenadhärenz und durch unterschiedliche Halbwertszeit der Medikamente; besonders in der Abklingphase bei Therapieabbruch oder nach temporärer Medikamenteneinnahme. Begünstigt wurde diese Resistenzselektion zu Beginn der Geschichte der ART durch die Einnahme eines einzelnen Medikamentes einer Wirkstoffklasse (Monotherapie) über einen längeren Zeitraum. Schon seit geraumer Zeit darf diese Art der Therapie nicht mehr Anwendung finden.

Teilweise reicht bereits ein Nukleotidaustausch im viralen Genom aus, um eine neue Resistenz gegenüber einer oder mehrerer antiretroviralen Substanz/-en einer gemeinsamen Wirkstoffklasse zu erhalten (Kreuzresistenz). Bei dieser raschen Art der Resistenzentstehung wird von einer „geringen genetischen Resistenzbarriere“ gesprochen.

3.8 Übertragene Resistenz

Neben der Selektion von resistenten Virusvarianten, kann es auch zu einer Übertragung von Resistenzen (engl. transmitted drug resistance; TDR) kommen. Ohne Gegenwart des selektierenden Medikamentes können resistente Varianten im Laufe der Zeit wieder zum Wildtyp revertieren. Übertragene Resistenzmutationen können aber auch jahrelang persistieren, insbesondere die K103N und die T215-Reversionen (de Ronde et al., 2001 / Brenner et al., 2004 / Pao et al., 2004 / Neifer et al., 2006). Ob eine solche Mutation bestehen bleibt, hängt vom genetischen Background des Virus ab und davon inwieweit die virale Fitness dadurch verringert wird (Martinez-Picado und Martinez, 2008; Yang et al., 2015). Alternativ persistieren sie als Proviren in der Wirtszelle, in der sogenannten Latenzphase (Loubser et al., 2006 / Siliciano et al., 2003 / Palmer et al., 2006 / Flys et al., 2007 / Alexaki et al., 2008), einem Ruhestadium, um bei Aktivierung des Immunsystems aktiv zu werden. Resistente Varianten können bei einem späteren Einsatz von antiretroviralen Medikamenten zum Scheitern der Therapie führen (Charpentier et al., 2004 / Lecossier et al., 2005 / Johnson et al., 2008 / Simen et al., 2009 / MacLeod et al., 2010).

Weltweit herrscht eine große Varianz der TDR-Prävalenz, wobei besonders hohe Raten in Ländern mit einer bereits lange zurückliegenden Einführung von ART zu beobachten sind. Nach einer Erhebung vom SPREAD (Strategy to Control the Spread of HIV-1) Programm für den Analysezeitraum 2002-2007 betrug die Prävalenz für 26 europäische Staaten und Israel 8,9% (Abecasis et al., 2013). Nach der Serokonverterstudie der Arbeitsgruppe Kübercherer (Robert Koch-Institut) erfolgte die Übertragung resistenter HIV in Deutschland mit einer Häufigkeit von ca. 12% (Analysezeitraum von 1997 bis 2010) (Poggensee et al., 2007 / Bartmeyer et al., 2010 / Zu Knyphausen et al., 2014).

3.9 Genotypische Resistenzbestimmung

Für die genotypische Resistenzbestimmung werden resistenzassoziierte Regionen der Protease, Reversen Transkriptase, Integrase der Hüllproteine gp120 und gp40 mit PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Routinemäßig wird die klassische Sanger Sequenzierung für das Monitoring von HIV-1-Infizierten durchgeführt.

Hiermit können resistente Virusvarianten jedoch nur detektiert werden, sofern sie einen Anteil von mindestens 20% der Gesamtpopulation ausmachen (Schuurman et al., 1999).

Die aus PCR-Fragmenten resultierende Konsensussequenz wird mit Vorhersagetools wie

z.B. das der Stanford-University (USA), geno2pheno-D, GRADE-D und ANRS-F auf resistenzassoziierte Mutationen bzw. Mutationsmuster hin analysiert. Hintergründe dieser Tools sind aktuelle Literaturdaten d.h. wissensbasierte, genotypische Interpretationssysteme wie bei HIV-GRADE oder datenbasierte Interpretationssysteme aus paarweise durchgeführten Geno- und Phänotypisierungen wie bei „geno2pheno“. Bei Letzterem wird einem individuellen, genotypischen Resistenzmuster ein Phänotyp zugeordnet und das virologische Ansprechen ermittelt.

Alle aktuellen resistenzassoziierten Mutationen sind in der „Stanford University HIV Drug Resistance Database“ sowie der Mutationsliste der Internationalen AIDS-Gesellschaft aufgeführt und werden bei Bedarf aktualisiert (Johnson et al., 2014). Für epidemiologische Analysen wird TDR nach der Resistenzmutationsliste der WHO (Bennet et al., 2009) beurteilt. In dieser Mutationsliste sind häufig vorkommende Subtyp spezifische Polymorphismen aus resistenzassoziierten Regionen eliminiert, damit es nicht zu einer Überschätzung der Resistenz kommt.

3.10 Molekulare Surveillance von HIV

Molekulare Surveillance von HIV bedeutet allgemein die Überwachung des Infektionsgeschehens auf virus-genetischer Ebene. Sie liefert wichtige Informationen zu Vorkommen und Verbreitung der zirkulierenden Virusvarianten in Hinblick auf Resistenzen und Subtyp. Es existiert eine Vielfalt von Resistenzen und sie stellen weltweit ein ernstzunehmendes Problem für die Behandlung von HIV-Infizierten dar. Um trotzdem bzw. weiterhin eine erfolgreiche Therapie zu gewährleisten, müssen Leitlinien für Therapieansätze erarbeitet werden z.B. bei bereits vorhandenen Resistenzen oder aber auch zu ihrer Vermeidung. Die Identifikation resistenter Viren ist daher von großer Bedeutung für das Therapiemanagement. Aus diesen Gründen wird die Durchführung einer Genotypisierung zur Aufdeckung etwaiger übertragener Resistenzen vor dem ersten Therapiebeginn empfohlen (EACS Guidelines Version 7.1, 2014 / Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, Version 1.0, 2014).

Die Kenntnis über das Auftreten und die Ausbreitungsdynamik von HIV-Varianten ist für die Diagnostik wichtig, da die HIV-Nachweismethoden dahingehend anzupassen sind, sodass auch ein erfolgreiches Testergebnis bei seltenen Virusvarianten sichergestellt ist. Subtypen spielen ebenfalls für den Krankheitsverlauf und bei der Entwicklung eines Impfstoffs eine bedeutende Rolle. Außerdem können mit Hilfe von phylogenetischen Analysen Transmissionsnetzwerke identifiziert werden, mit denen Präventionsmaßnahmen gezielt angepasst werden können.

In Deutschland erfolgt die molekulare Surveillance für HIV-1-Infektionen am RKI seit 2013 in dem Projekt Master HIV/HEP.

In den Jahren 2013 und 2014 wurden insgesamt 6.371 Filterproben (engl. serum spots; DSS) aus den Restseren von HIV-Neudiagnosen zusammen mit dem dazugehörigen, anonymen Meldebogen nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG, Abschnitt 3, §7) von 64 Laboren deutschlandweit an das RKI gesandt. Diese machten ca. 60% aller HIV-1-Neudiagnosen aus. DSS-Proben wurden zunächst einer Klassifikation in die Kategorien rezente (≤ 140 Tage) und lang bestehende (≥ 140 Tage) Infektion mit dem BED-CEIA unterzogen.

DSS aus rezenter Infektionen wurden für die Molekulare Surveillance weiter untersucht. Unter Einbeziehung der soziodemographischen Angaben aus dem Meldebogen (zur Verfügung gestellt durch FG34 „HIV/AIDS und andere sexuell oder durch Blut übertragbare Infektionen“ des RKIs) können somit Aussagen zu den Virusvarianten getroffen werden, die am aktuellen Infektionsgeschehen in den verschiedenen Transmissionsgruppen beteiligt sind.

Ergebnisse aus der molekularen Surveillance der Jahre 2013 und 2014 werden zurzeit vom RKI veröffentlicht (Hauser et al., 2015). Insgesamt wurden 881/1963 Proben aus rezenter Infektionen in die Auswertungen mit einbezogen. Im Median hatten die rezent Infizierten ein Alter von 35 Jahren (IQR 27-45 Jahre). Ein Großteil des Studienpanels war männlich (88,5%; n=780) und 10,9% (n=96) weiblich, sodass ein geringer Anteil unbekanntes Geschlechts die restlichen 0,6% (n=5) ausmachte. Die Verteilung für die verschiedenen Transmissionsgruppen stellte sich wie folgt dar: 61,6% (n=543) bei Männern, die Sex mit Männern haben (MSM), 9,0% (n=79) über einen heterosexuellen Kontakt, 2,6% (n=23) durch Personen, die intravenöse Drogen konsumieren (PWID), 0,7% (n=6) durch Mutter zu Kind Übertragung (PPI) und für die verbleibenden 26,1 % (n=230) war entweder (größtenteils) keine Angabe verfügbar oder es handelte sich um einen noch selteneren Transmissionsweg (Bsp. berufliches Risiko u.a.) als von den hier bereits genannten. Im Studienpanel gab es 61,4% (n=541) deutsche Personen, 19,6% (n=173) kamen aus anderen Ländern und bei 19,0% (n=167) war das Herkunftsland unbekannt. Infiziert haben sich die meisten in Deutschland (65,4%; n=576), 12,0% (n=106) in anderen Ländern und bei 22,0% (n=199) wurde Infektionsland unbekannt angegeben. Von 1.154 Proben konnte die Viruslast bestimmt werden und es ergab sich ein Median von 82.269 Kopien/ml (IQR 14,038-463,775).

Das Review von Adler et al. (2009) fasste Veröffentlichungen zusammen, die von späten HIV-1-Diagnosen handeln. Darin wurden viele europäische Studien über HIV Spät Diagnosen seit 1997 betrachtet und Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten in der Definition aber ebenfalls Risikofaktoren für eine späte Diagnose aufgezeigt. Aufgrund von unterschiedlichen Definitionen des Begriffs und die damit verbundene, schwierige Vergleichbarkeit von Daten wurden die späten Diagnosen bei HIV-1 über drei verschiedene Kategorien (Zeit zwischen HIV-Infektion und Ausbruch von AIDS, CD4-T-Zellzahl mit unterschiedlichen Cut-Offs und klinische Daten) bestimmt. Daraus wurden Risikofaktoren für eine spät diagnostizierte HIV-1-Infektion identifiziert. Dazu zählten: Migration, Alter, heterosexuelles Transmissionsrisiko, Geschlecht (Männer erhöht) und Herkunft aus Gegenden mit relativ geringer HIV-1-Prävalenz (Adler et. al, 2009).

Studien für Deutschland zu dem Thema späte Diagnosen von HIV-1 hinsichtlich Subtypen oder TDR und insbesondere im Vergleich zu den rezenter Infektionen sind noch nicht publiziert.

3.11 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Population der länger bestehenden HIV-1-Infektionen (> 140 Tage mit BED-CEIA) in Hinblick auf übertragene Medikamentenresistenz und die Subtypverteilung zu charakterisieren. Dabei sollte auch auf die Subgruppen wie unterschiedliche Transmissionswege, Herkunft und Infektionsland eingegangen werden. Anschließend sollten diese Ergebnisse (im Labor ermittelte und soziodemografische Daten aus dem Meldebogen) mit denen der Gruppe der rezenter Infektionen (Hauser et al., 2015) verglichen werden. Schließlich sollte anhand der erhaltenen Ergebnisse bewertet werden, ob eine dauerhafte Untersuchung der länger bestehenden HIV-Infektionen notwendig ist und eingeführt werden muss. Außerdem sollten die Proben des untersuchten Studienpanels, die bisher ausschließlich mit dem BED-CEIA klassifiziert worden sind, mit dem BioRad Aviditätstest untersucht werden, um einen dualen Assay Algorithmus (DAA) anwenden zu können. Grund dafür ist die bei einigen Subtyp non-B Infektionen bekannte recht hohe Rate an Falschklassifikationen des BED-CEIA (durch eine spätere Serokonversion), sodass es zu einer Überschätzung in der Gruppe der rezenter Infektionen kommen kann. Um etwaige Abweichungen in der Zusammensetzung der Probenpanel aufgrund der unterschiedlichen Klassifikationen sichtbar zu machen, sollen jeweils die Gruppen der länger bestehenden Infektionen beider Testverfahren (BED-CEIA vs. DAA) gegenübergestellt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Klinische Proben und Probenpanel

In den Jahren 2013 und 2014 gingen 6.371 filtergetrocknete Serumproben (DSS) (Restseren aus der HIV-Diagnostik auf Whatman 903 Filterpapier getropft) zusammen mit dem anonymen Meldebogen (nach § 7(3) des IfSG) beim RKI ein. Im Fachgebiet 34 „HIV/AIDS und andere sexuell oder durch Blut übertragbare Infektionen“ erfolgte die Registratur der Meldedaten (klinische und soziodemografischen Daten), während die Filterproben durch das Fachgebiet 18 „HIV und andere Retroviren“ hinsichtlich der Infektionsdauer serologisch untersucht wurden. Insgesamt sendeten deutschlandweit 64 verschiedene Labore Filterproben zum Institut, womit ca. 60% aller HIV-Neudiagnosen Deutschlands im Untersuchungszeitraum abgedeckt waren. Die Klassifikation aller Proben durch den BED-CEIA lieferte ein Verhältnis von ungefähr 1:2 rezente zu lang bestehenden HIV-1-Infektionen. Rezenten Infektionen wurden im Rahmen von Master HIV/HEP und die chronischen Infektionen in dieser Arbeit untersucht.

4.1.2 Poweranalyse

Um eine repräsentative Stichprobe zu erhalten, wurde eine Poweranalyse via OpenEpi Poweranalyse (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.html>) durchgeführt. Für das Gesamtstudienpanel (n=6.371) ergab sich eine zu analysierende Probenmenge von 136 bzw. 237 Proben bei einer angenommenen Häufigkeit von 10% (+/- 5%) für TDR bzw. 20% (+/- 5%) für eine Subtyp non-B-Infektion mit einem jeweils 95% Konfidenzintervall. Es wurde der Zeitraum vom 15. Oktober bis zum 31. Dezember des Jahres 2014 gewählt.

4.1.3 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien für die Bearbeitung der Proben sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2. Reagenzienliste.

Reagenz	Zusammensetzung	Firma	
PBS	NaCl	8,00 g	Merck, Darmstadt
	KCl	0,20 g	Merck, Darmstadt
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,15 g	Merck, Darmstadt
	KH ₂ PO ₄	0,20 g	Merck, Darmstadt
	Ad 1L mit acqua bidest., autoklaviert		
Elutionspuffer	PBS	500 ml	Fluka, Buchs (Schweiz)
	0,05% Tween 20	2,5 ml	
	3% FKS	15 ml	
50x TAE	Tris	242 g	Roth, Karlsruhe
	0,5 M Na ₂ EDTA (pH=8,0)	100 ml	Merck, Darmstadt
	Essigsäure 99-100 %	57,1 ml	Roth, Karlsruhe
	Ad 1L mit acqua bidest., autoklaviert		
Platinum qPCR Super Mix UDG		Invitrogen, Carlsbad (USA)	
Rnasin		Promega, Fitchburg (UK)	
MgCl ₂ (50 mM)		Invitrogen, Carlsbad (USA)	
peqGOLD UniversalAgarose		peqlab, Erlangen	
Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml)		Roth, Karlsruhe	
Wasser		Sigma Aldrich, St. Louis (USA)	
99,8% Ethanol		Roth, Karlsruhe	
TE Buffer 1x Molecular Biology Grade		Promega, Fitchburg (UK)	
5x Sequencing Buffer		Life Technologies, Carlsbad (USA)	
Big Dye Terminator v3.1		Life Technologies, Carlsbad (USA)	
Wasser für die Chromatographie		Life Technologies, Carlsbad (USA)	
Diethylamin		Merck, Darmstadt	
6x Loading Dye		Sigma Aldrich, St. Louis (USA)	
GeneRuler 1 kb DNA plus Ladder		Fermentas, St. Leon-Rot	
		Fermentas, St. Leon-Rot	

4.1.3.1 Test Kits

Eingesetzte Test Kits sind in Tab. 3 dokumentiert.

Tab. 3. Liste der Test Kits.

Test kit	Firma
BED EIA HIV-1 Incidence Test	Calypte Biomedical Corporation (USA)
GS HIV-1/-2 Plus O EIA	BioRad Laboratories (USA)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Agencourt® AMPure XP PCR Purification	Beckman Coulter (USA)
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit	Thermo Scientific (Hanau)
Superscript SII Kit	Invitrogen (USA)

4.1.3.2 Kontrollen

Für die Extraktionen, die *pol*-PCR und die Bestimmung der Viruslast wurden jeweils folgende Kontrollen mitgeführt.

Positivkontrolle: HIV-Laborstamm HTLVIII B (1×10^4 Kopien/mL) aus Virusstock in H-9 Zellen vermehrt, Tag 21.

Negativkontrolle: HIV-negatives Plasma, Pool aus 26 Einzelspenden, Paul-Ehrlich-Institut.

4.1.3.3 Primer

In Tab. 4 wurden die verschiedenen Primer, die in diesem Projekt zum Einsatz kamen, aufgelistet.

Tab. 4. Bezeichnung, Sequenzen, Hersteller und Versuche aller verwendeten Primer.

Versuch	Bezeichnung	Firma	Sequenz
PR-/RT-PCR	A	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CCCTCARATCACTCTTTggCARCgA-3'
	B	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CCTAATTgAACYTCCCARAARTCYTgAgT-3'
	Lc	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-AAACAATggCCATTRACAgARgA-3'
	D	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CTAAYTTYTgTATRTCATTgACAgTCCA-3'
Sequenzierung	A1	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CCTCARATCACTCTTTgg-3'
	B4	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CYTCCCARAARTCYTgAgTTC-3'
	B5 Seq.	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-RTATggATTTTCaggYCC-3'
	Lc Seq.	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-ggRCCTgAAAATCCATAY-3'
	C2	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CCTgAAAATCCATAYAAYACYCC-3'
	D2	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-CTAAYTTYTgTATRTCATTg-3'
Viruslast	AS Primer R6	TIB MOLBIOL, Berlin	5'-NNNNNN-3'
	LTR 524 s	metabion, Planegg	5'-CTCAATAAAGCTTGCCTTG-3'
	LTR 625 as	metabion, Planegg	5'-GCGCCACTGCTAGAGAT-3'
	Sonde: TM3_LTR_BHQ	metabion, Planegg	5'-6-Fam-TCTGAGGGATCTCTA- GYTACCAGA-BHQ-1-3'

4.1.4 Technische Geräte

Zur Durchführung der Versuche wurden von allen Geräten in Tabelle 5 Gebrauch gemacht.

Tab. 5. Geräteliste.

Gerät	Firmensitz
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Microzentrifuge Modell SD	Roth, Karlsruhe
Dry Block Heating Thermostat	A. Havenstein
Master Cycler pro S	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Microzentrifuge Modell IR	Roth, Karlsruhe
PowerPacBasic (Gelelektrophorese)	BioRad Laboratories, Hercules (USA)
NavigatorTM (Waage)	OHAUS, Nänikon (Schweiz)
Videodokumentationssystem E.A.S.Y RH-3	Herolab GmbH, Wiesloch
Perfect Spin P (Plattenzentrifuge)	peqlab, Erlangen
Stratagene MX 3000TM	Stratagene, Basel (Schweiz)
ALPSTM 50 V (Folienschweißgerät)	Thermo Scientific, Hanau
NucliSense® easyMAGTM (Extraktor)	BioMérieux, Nürtingen
BioHit e line e 1200 (Pipette)	BioHit, Helsinki/BioMérieux, Nürtingen
IKA-Schüttler MTS 2	IKA Labortechnik, Staufen
Whatman 903TM (Filterkarten)	GE Healthcare, Westborough (USA)
Vortex Mixer 7-2020	Neolab, Zug (Schweiz)
Vortexer D-6012	Neolab, Zug (Schweiz)
Tischzentrifuge D-6020	Neolab, Zug (Schweiz)
MagnetoPURE-96 (Magnetständer)	chemicell, Berlin
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific, Hanau
Multiskan Go (ELISA-Reader)	Thermo Scientific, Hanau
Hydro Flex (ELISA-Waschgerät)	Tecan, Grödig
Mini THERM CTT (Inkubator)	Sartorius Group, Göttingen
Pipetus (Pipettboy)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

4.2 Methoden

4.2.1 Testung rezenter Infektionen

4.2.1.1 BED-CEIA

Der BED-CEIA ist ein Assay, der zur Inzidenztestung bei einer HIV-1-Infektion Anwendung findet. Er wurde erstmals von Parekh et al. in 2002 beschrieben und ist vor allem auf die Subtypen B, E und D zugeschnitten. Es handelt sich bei diesem Immunoassay um einen Sandwich-ELISA, der sich ein Charakteristikum der Virusinfektion zu Eigen macht. Gemessen wird das Verhältnis von HIV-1 spezifischen anti-gp41-IgG-Antikörpern zu den gesamten IgG-Antikörpern im Blutserum. Dies ist möglich, da mit dem Voranschreiten der HIV-Infektion der Titer an spezifischen Antikörpern, welche im Test über einen Ziegen-Anti-Human-IgG-Fangantikörper gebunden werden, steigt. Der Nachweis der Antikörper erfolgt über das spezifische Antigen gp41 und der damit gekoppelten enzymatischen Reaktion. In Abb. 4 ist der Ablauf des Assays schematisch dargestellt. Eingesandte Proben von HIV-1-Neudiagnosen werden routinemäßig dem BED-CEIA unterzogen. Mit Hilfe der OD-Messung (optische Dichte) und der festgelegten Cut-Offs (rezente HIV-Infektion: ODn <0,8 nach Loschen et al. 2008) werden die Proben entsprechend als „rezent“ für eine kürzlich erworbene (≤ 140 Tage) oder als „long term“ für eine bereits länger bestehende (>140 Tage) Infektion eingestuft.

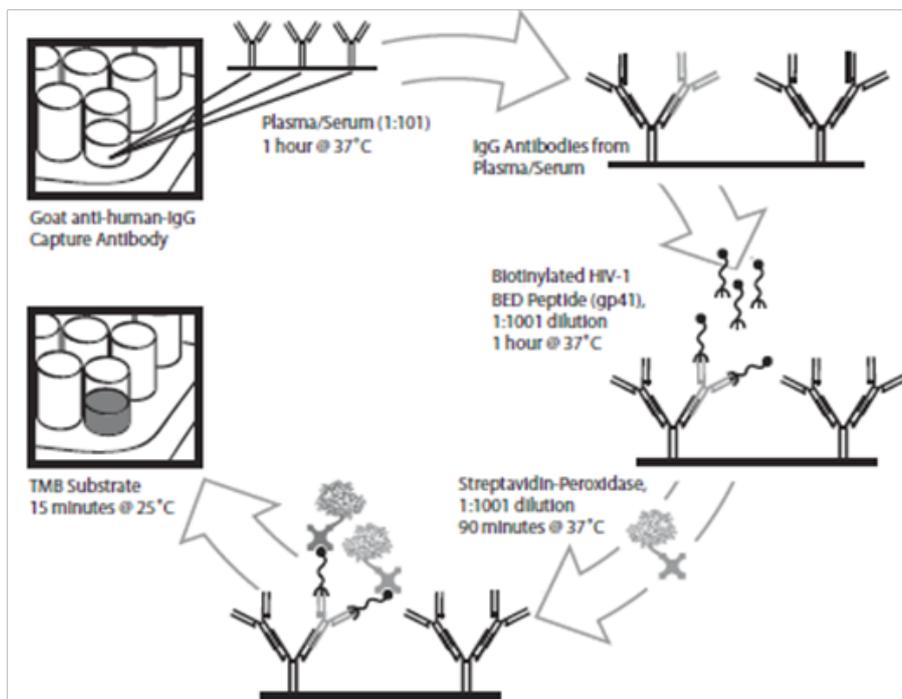


Abb. 4. Schematischer Ablauf des BED-CEIA.

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; BED-CEIA= BED-IgG-capture ELISA. Abbildung laut Kitprotokoll.

Das „Consortium for the Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays“ (CEPHIA) hat gezeigt, dass der BED-CEIA die Proben mit einer FRR von 7,4% klassifiziert. Bei Betrachtung bestimmter Subtypen ist die FRR sogar noch höher: Für Subtyp A mit 18,9% und auch bei Subtyp D mit 18,2%. (Kassanje et al., 2014).

4.2.1.2 BioRad Aviditätstest

Avidität beschreibt die spezifische Bindungsstärke zwischen einem Antikörper und seinem Antigen. Die Bindungsstärke der HIV-spezifischen Antikörper nimmt in den ersten 1-2 Jahren der HIV-Infektion zu. Mit Hilfe des BioRad Aviditätstests wird die Avidität der HIV-spezifischen Antikörper zu den Antigenen aus dem Testkit (IgM, gp120, gp160) mit und ohne Zugabe eines denaturierenden, chaotropen Salzes (DEA- Diethylamin) gemessen.

Vom CDC wurde das Protokoll von Masciotra (Masciotra et al., 2010) für den modifizierten BioRad GS HIV-1/-2 Plus O EIA zur Verfügung gestellt: Nach der Elution der Antikörper aus den Filterproben (1:10 Verdünnung der Probe) im Probenpuffer, werden die Proben in einem „two-well“-Testformat getestet. Das heißt, dass nach dem ersten Inkubationsschritt (Probe wird auf die Platte mit dem immobilisierten Fangantigen gegeben) je ein Well einer Probe nur mit Waschpuffer (WP) und eine mit in WP gelösten chaotropen Salz (DEA) versetzt wird. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe dissoziieren in Gegenwart von Diethylamin, sofern sie nur durch eine geringe Avidität gekennzeichnet sind. Stärker avide Bindungen lassen sich dadurch nicht beeinflussen und bleiben somit bestehen. Ein Aviditätsindex wurde für alle Proben nach Durchführung des Tests mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$AI(\%) = \frac{(\text{Cutoff-OD mit denaturierendem Agenz})}{(\text{Cutoff-OD ohne denaturierendem Agenz})} \cdot 100$$

Der Cut-Off für inzidente Proben liegt bei einem Aviditätsindex von 30% und 220 Tage für Subtyp B bzw. 209 Tage für andere Subtypen (persönliche Mitteilung von Silvina Masciotra, Division of HIV/AIDS prevention, CDC). Proben, die einen AI von +/- 10% um den Cut-Off lagen wurden in Doppelbestimmung wiederholt und der Mittelwert der Wiederholungsmessung verwendet.

In dieser Arbeit wurde das kommerzielle Kit von Bio-Rad HIV-1/2 Plus O mit einem in Anlehnung an Masciotra et al. modifizierten Protokoll verwendet.

4.2.1.3 Multi Assay Algorithmus

Der Multi Assay Algorithmus ist ein Ansatz, der sich für die Klassifikation von HIV-1-Infektionen mehrerer Parameter bedient. Unterschiedliche Varianten für einen solchen Multi Assay Algorithmus wurden publiziert (Layendecker et al., 2012 und 2013). Ziel dabei war es vor allem die FRR zu verbessern.

Am RKI wurde aus diesem Grund im Rahmen einer Bachelorarbeit (Orjin Han, Titel: Evaluation neuer Methoden zur HIV-Inzidenztestung, 2014) Untersuchungen zum Multi Assay Algorithmus durchgeführt. Allgemein kombiniert ein MAA Ergebnisse z.B. von verschiedenen Inzidenztests und weiteren klinische Daten.

Alle Kriterien werden nacheinander bewertet mit Hilfe eines definierten Cut-Offs. In Abb. 5 ist eine Variante mit je zwei serologischen und zwei klinischen Parametern veranschaulicht. Sie führte zu einer verbesserten FRR.

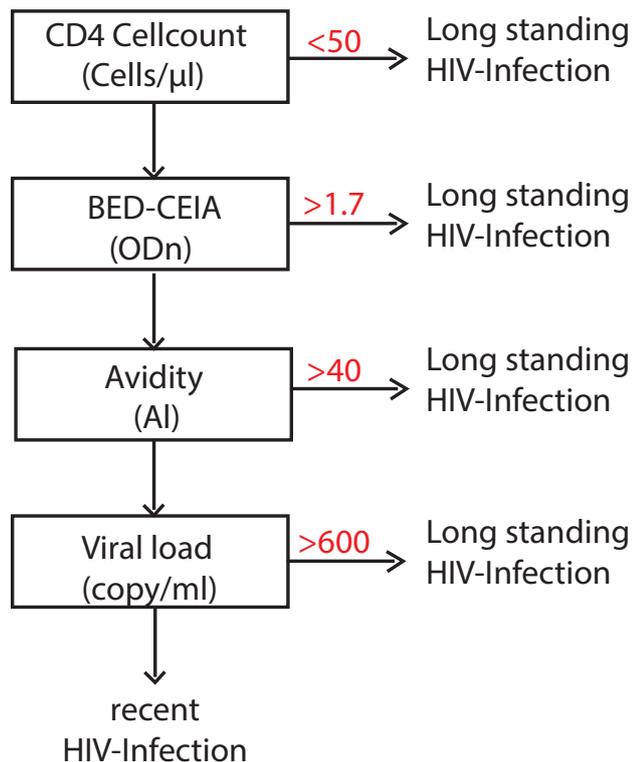


Abb. 5: Schematischer Aufbau des MAA nach Brookmeyer et al., 2012. Vier Kriterien zur Klassifikation einer HIV-Infektion in rezent und länger bestehend: CD4-T-Zellzahl, Ergebnisse des BED-CEIA und BioRad Aviditätstests und Viruslast.

4.2.1.4 Entwicklung eines Dual Assay Algorithmus

Aufgrund der Tatsache, dass die CD4-T-Zellzahl und die Viruslast nur selten auf den Meldebögen vorhanden sind, wurden nur noch die Ergebnisse von zwei Rezenttests verwendet: des BED-CEIA und des BioRad Aviditätstest. Zur Validierung des DAA wurde ein Trainingsset (n=136) und ein Validierungsset (n=475) therapie-naiver Proben aus der deutschen Seroconverterstudie (rezent bei ≤ 155 Tage oder länger bestehend bei > 220 Tage nach Infektion) zusammengestellt. Alle Proben wurden dem BED-CEIA und dem Genscreen HIV-1/2 EIA Aviditätsassay (European Genscreen [BioRad] HIV-1/2 EIA avidity-assay mit dem Protokoll beschrieben von Masciotra et al., 2010) unterzogen und anhand der Ergebnisse der serologischen Tests (BED-CEIA: ODn; BioRad Aviditätstest: AI) nacheinander bewertet. Die Anzahl an länger bestehenden (n=90) und rezenten (46/139, 33.8%) Infektionen in Trainingsset und die Verteilung der HIV-Subtypen wurden entsprechend der Situation in Deutschland ausgewählt. Nach der Evaluation von 352.000 verschiedenen Cut-Offs im Trainingsset, wurde der resultierende Cut-Off mit der genauesten Testrichtigkeit auf das Validierungsset angewendet (195 rezente Infektionen, 281 länger bestehende Infektionen, 409 B und 64 non-B Subtypen). Der DAA mit der besten Richtigkeit für das Trainingsset (93,4%) wurde mit den Cut-Offs ODn=1,7 und AI=70 erreicht. Bei Anwendung dieser Cut-Offs auf das Validierungsset, sank die FRR für den DAA (bestehend aus Testergebnissen vom BED-CEIA und

BioRad Aviditätstest) signifikant im Vergleich zu der des BED-CEIA (BED-CEIA: 8,9% vs. DAA: 2,5%; $p=0,002$) während sich für die FLTR (false long term rate) nur eine leichte Verbesserung durch den DAA zeigte (BED-CEIA: 19,1% vs. DAA: 15,5%; $p=0,421$) (Abb. 6).

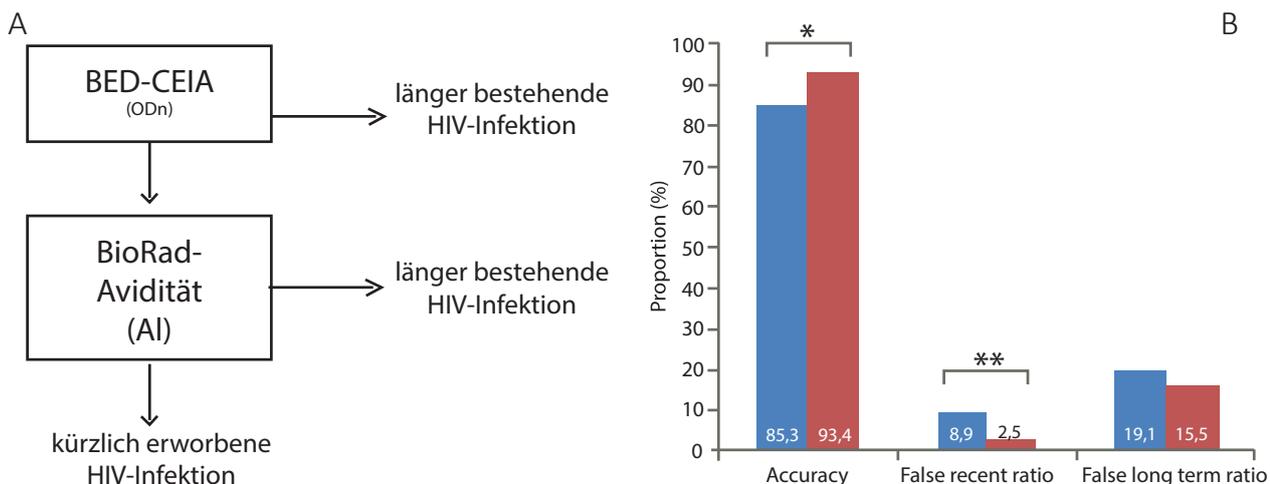


Abb. 6. Dual Assay Algorithmus zur Klassifikation von HIV-1-Infektionen nach Orjin Han (Bachelorarbeit, 2014).

A: Parameter und Cut-Off-Werte des angewandten DAA.

B: Vergleich des BED-CEIA und des DAA in Bezug auf Testrichtigkeit, FRR und FLTR.

Unterschiede sind als „*“, „**“ und „***“ für signifikant ($p \leq 0,05$), sehr signifikant ($p \leq 0,001$) und hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

4.2.2 Genotypische Resistenzbestimmung

4.2.2.1 RNA-Extraktion

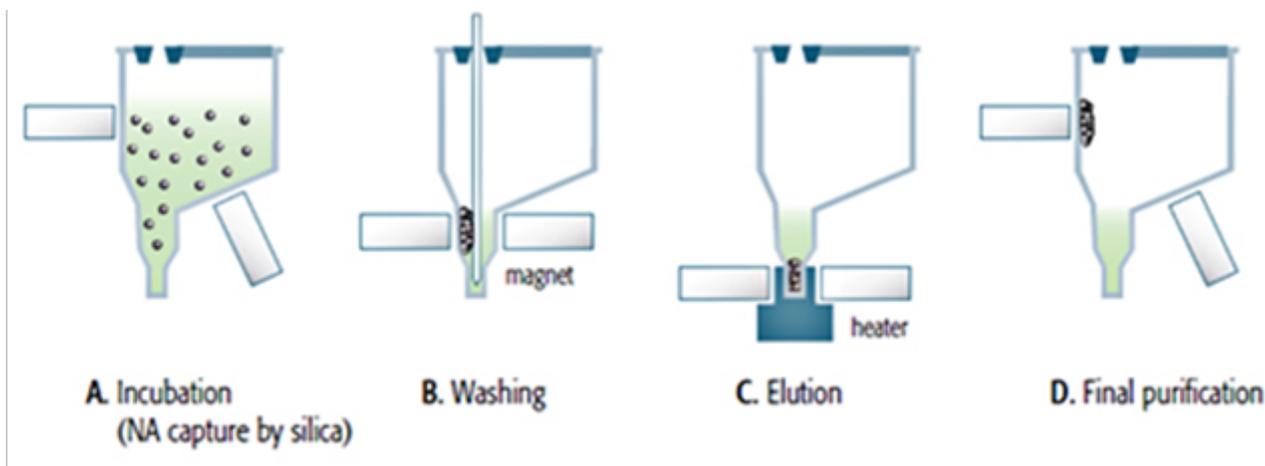


Abb. 7. Schema der RNA-Extraktion mittels NucliSense® easyMAG.

(<http://www.biomerieux-diagnostics.com/nuclisensr-easymag>)

Die Extraktion der RNA von den Filterspots erfolgte mit Hilfe des NucliSense® easyMAG™ und dem dazugehörigen Protokoll von der Firma bioMérieux. In Abb. 7 sind die verschiedenen Schritte des Prinzips veranschaulicht. Für die Durchführung der Extraktion wurden vier getrocknete Filterspots verwendet. Auf einem Spot ist jeweils 100 µl Serum von der entsprechenden Probe getropft und getrocknet worden. Somit ergibt sich ein Gesamtvolumen von 400 µl Serum pro Probe. Der erste Schritt (Punkt A in Abb. 7) erfolgte außerhalb des Gerätes (Off-board Lyse). Dafür werden 3,6 ml Lysispuffer sowie ein Ausgangsvolumen

von 400 µl eingesetzt und eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Lyse der Proben kann die freie virale RNA (engl. Ribonucleic Acid; Ribonukleinsäure) an die zugegebenen Magnetpartikel binden. Im Gerät erfolgen dann mehrere Waschschrte (siehe Punkt B in Abb. 7), indem die Magnetpartikel mit der gebundenen Nukleinsäure über einen Magneten immobilisiert werden. Für die Elution wird das Reaktionsgefäß auf 60°C erhitzt, sodass sich die RNA magnetischen Silikapartikeln lösen kann. Das Elutionsvolumen beträgt 60 µl. Zuletzt werden die Magnetpartikel wiederum über einen Magneten gesammelt, um sie von dem Eluat zu isolieren. Außerhalb des NucliSense® easyMAG™ können die Eluate in neue Gefäße zur Lagerung bei -80°C überführt werden.

4.2.2.2 Amplifikation der *pol*-Region (Protease und Reverse Transkriptase)

Mit einem in-house *pol*-RT-PCR Assay (*pol*-PCR) wurden zwei überlappende DNA-Fragmente amplifiziert, die die Bereiche von Protease (PR; AS 9-99) und Reverse Transkriptase (RT; AS 1-252) abdecken. Zunächst erfolgte die Denaturierung der RNA (10 µl) für 10 min bei 65°C. Die Transkription der RNA in cDNA erfolgte in einem Reaktionsansatz (Tab. 6). Eine Übersicht der einzelnen Schritte des PCR-Programms ist in Tab. 7 zu finden. PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (1% Agarose in 1x TAE-Puffer) und unter UV-Licht detektiert.

Tab. 6. Reaktionsansätze für die Reverse Transkription und Amplifikation der *pol*-Fragmente. PR-PCR (links) und für die RT-PCR (rechts).

Reagenz	Konz. Stocklsg.	finale Konz.	µl/Ansatz	Reagenz	Konz. Stocklsg.	finale Konz.	µl/Ansatz
H ₂ O	-	-	4,95	H ₂ O	-	-	3,57
5x RT-Puffer	5x	1x	5	5x RT-Puffer	5x	1x	5
MgCl ₂	50 mM	0,5 mM	0,25	MgCl ₂	50 mM	0,5 mM	0,25
dNTPs	10 mM	400 µM	1	dNTPs	10 mM	400 µM	1
Primer A	25 µM	0,6 µM	0,6	Primer A	25 µM	0,6 µM	1,5
Primer B	25 µM	1,2 µM	1,2	Primer B	25 µM	1,2 µM	1,5
RNasin	40 U/µl	40 U	1	RNasin	40 U/µl	40 U	1
Enzym-Mix	200 U/µl	200 U	1	Enzym-Mix	200 U/µl	200 U	1
Gesamt- volumen			15	Gesamt- volumen			15

Tab. 7. Protokolle für die Reverse Transkription und Amplifikation der *pol*-Fragmente. PR-PCR (links) und für die RT-PCR (rechts).

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	50°C	30 min		1	50°C	30 min	
2	95°C	15 min		2	95°C	15 min	
3	94°C	30 sec	55 x	3	94°C	30 sec	55 x
4	58°C	45 sec	55 x	4	59°C	45 sec	55 x
5	72°C	60 sec		5	72°C	90 sec	
6	72°C	10 min		6	72°C	10 min	
7	4°C	∞		7	4°C	∞	

Abbildung 8 zeigt das virale Genom und die in der PCR amplifizierten Fragmente der *pol*-Region. Das PCR-Produkt der Protease weist eine Länge von 574 bp (AS 9-99) und das der Reversen Transkriptase von 720 bp (AS 1-252) auf. Die beiden überlappenden Amplikons umspannen eine 1026 bp lange Sequenz, die alle Positionen beinhaltet, die mit potentiellen Resistenzen assoziiert sind. Die Nachweisgrenze der PCRs liegt bei 6×10^2 Kopien/ml.

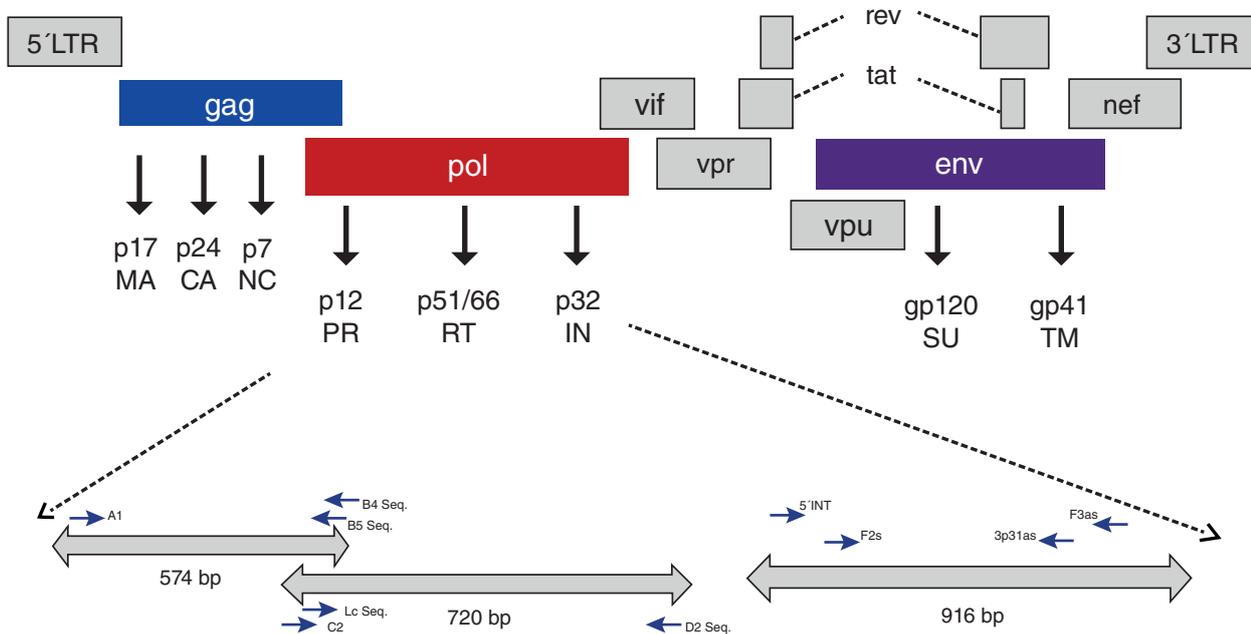


Abb. 8. Schematischer Aufbau des HIV-Genoms.

Gekennzeichnet sind die zwei *pol*-Fragmente Protease (574 bp) und Reverse Transkriptase (720 bp) mit den entsprechenden Sequenzierprimern.

4.2.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das Agencourt® AMPure® XP PCR Purification System verwendet. Als erstes werden den PCR-Produkten paramagnetische Partikel zugegeben (Verhältnis 1:1,8); diese binden dann die DNA-Fragmente. Mit Hilfe eines Magneten können die Magnetpartikel mit der DNA von den restlichen Bestandteilen der vorangegangenen

PCR separiert werden. Bei den zwei Reinigungsschritten werden die Partikel ebenfalls mittels Magneten von dem Ethanol getrennt. Nach der Elution der aufgereinigten PCR-Produkte, können diese in eine neue Platte transferiert werden. Die beschriebenen Schritte dieser Aufreinigung sind nochmals als Übersicht in Abb. 9 dargestellt. Für die Aufreinigung wurden jeweils 20 µl PCR-Produkt eingesetzt und dementsprechend 36 µl des Magnetpartikelreagenz. Die Waschschritte wurden entgegen dem Protokoll von Agencourt mit 80%-igen Ethanol statt mit 70% EtOH durchgeführt, da sich in einer Reihe vorangehender Tests in der Arbeitsgruppe eine bessere Ausbeute gezeigt hatte. Zuletzt wird die DNA in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen.

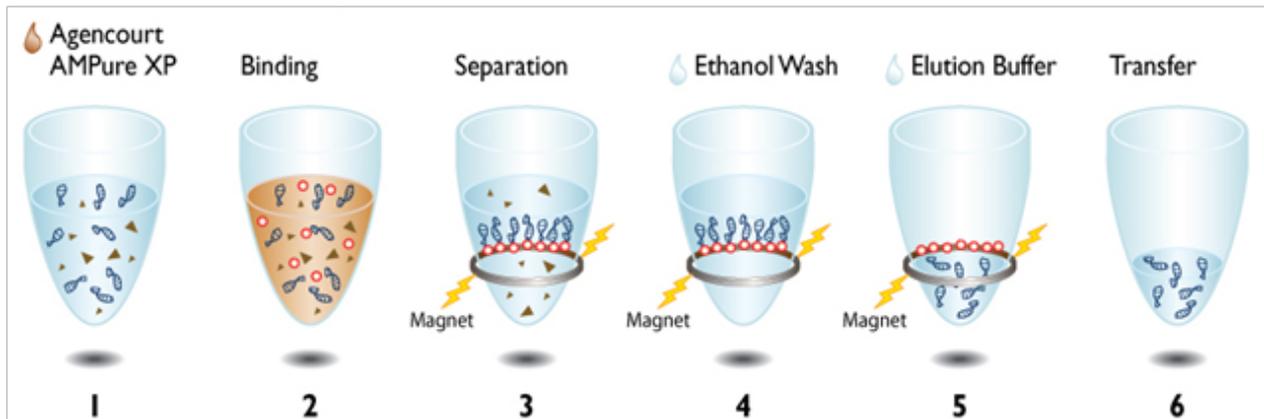


Abb. 9. Schema der Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Agencourt® AMPure XP. Abbildung aus dem Kitprotokoll entnommen.

4.2.2.4 Quantifizierung der aufgereinigten PCR-Produkte

Die Quantifizierung der aufgereinigten PCR-Produkte wurde mit dem Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit und dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Das Auslesen der Platte erfolgte an einem Tecan-Reader mit der Software Magellan (Version 7.1).

4.2.2.5 Sequenzierung nach Sanger

Populationsbasierte Sequenzierung für die PCR-Fragmente wurde jeweils mit drei Primern - für die Protease-Region: A1, B4 und B5 Seq. und die Reverse Transkriptase-Region: Lc Seq., C2 und D2 (Anhang 3) - und dem Sequenzierautomaten 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) vom Sequenzierlabor des RKIs durchgeführt. Um Verwechslung der Proben auszuschließen wurde innerhalb eines Ansatzes eine phylogenetische Analyse (Neighbour joining method; Bioedit 7.0.9) angewandt.

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion ist in Tab. 8 zu sehen.

Reagenz	Konz. Stocklsg.	finale Konz.	µl/Ansatz
DNA	*	25 ng	*
Abi Puffer	5x	0,5x	1 µl
Big Dye	-	-	1 µl
Primer	10 µM	1 µM	0,5 µl
H ₂ O	-	-	ad 10 µl

Tab. 8. Reaktionsansatz für die Sequenzierung. Ergebnis der Quantifizierung war für jede Probe unterschiedlich, somit erfolgte eine Anpassung des Volumens zur finalen Konzentration von 25 ng.

4.2.2.6 Subtypbestimmung und Resistenzvorhersage

Zur Ermittlung des Subtypes einer Probe wurde die *pol*-Sequenz mit den Webtools REGA Version 3.0 und Comet Version 1.0 analysiert. Das Prinzip solcher Vorhersagetools beruht auf einer phylogenetischen Analyse, bei welcher die hochgeladene Konsensussequenz mit einer Reihe von Referenzsequenzen verglichen wird, um sie einem Subtyp bzw. einem CRF zuzuordnen. Konnte keine eindeutige Zuordnung über die genannten Webtools erfolgen, wurde eine phylogenetische Analyse in PHYLIP Version 3.6 (Distanz-basierte Neighbour joining Methode mit Bootstrap-Werten >70%) mit einem erweiterten Referenzpanel der Los Alamos HIV Sequenz-Datenbank durchgeführt. Primärresistenzen wurden über die Liste der Resistenzmutationen (engl. surveillance drug resistance mutations, SDRM) für epidemiologische Studien der WHO (Bennett et al., 2009) und die entsprechenden Medikamentenresistenzen über das Vorhersagetool der Stanford University bestimmt (siehe Anhänge 2 und 3).

4.2.3 Bestimmung der Viruslast

Die Messung der Viruslast wurde in einer in-house LTR-RT-TaqMan PCR nach einem modifizierten Protokoll (Cleland et al., 2001) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Denaturierung der RNA (10 µl) für 10 min bei 65 °C. Im nächsten Schritt wurde die RNA umgeschrieben mittels Reverse Transkriptase in cDNA (Protokoll siehe Tab. 10; Ansatz siehe Tab. 9), damit diese in einer anschließenden PCR (Protokoll siehe Tab. 12; Ansatz siehe Tab. 11) eingesetzt werden konnte.

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe des humanen T-lymphotrophen Virus (Typ III B) eingesetzt. Dafür wurde ein HIV-negatives Plasmas mit einer definierten Menge an HTLVI-II B versetzt. Danach erfolgte eine serielle Verdünnung (log 10), sodass sich die Kopienzahl um je 10 Viruskopien/ml Plasma verringerte (1×10^6 bis 1×10^1). Von jeder Verdünnungsstufe der Serumproben wurden jeweils 100 µl auf einen Spot einer Filterkarte (Whatman 903TM, GE Healthcare) getropft und getrocknet. Zur Lagerung wurden diese in verschließbare, luftundurchlässige Plastiktüten zusammen mit Silica-Trockenmittel verpackt und bei -20 °C aufbewahrt.

Tab. 9. Reaktionsansatz für die Reverse Transkription der RNA.

Reagenz	Konz. Stocklsg.	finale Konz.	µl/Ansatz
5x RT-Puffer	5x	1x	4
DTT	100 mM	5 mM	1
dNTPs	2,5 mM	0,5 mM	4
AS Primer R6	25 µM	0,5 µM	0,4
Rnasin	40 U/µl	20 U	0,5
RT (Superscript 2, BRL)	200 U/µl	100 U	0,5
Gesamtvolumen			10

Tab. 10. Protokoll für die Reverse Transkription.

Schritt	Temperatur	Dauer
1	42°C	60 min
2	93°C	7 min
3	4°C	∞

Tab 11. Reaktionsansatz für die Taq-Man PCR.

Reagenz	Konz. Stocklsg.	finale Konz.	µl/Ansatz
H ₂ O	-	-	4,125
SuperMix-UDG	2x	1x	12,5
MgCl ₂	50 mM	5,5 mM	0,9
Primer 1 (524 s)	25 µM	1,1 µM	1,1
Primer 2 (625 as)	25 µM	1,1 µM	1,1
Sonde (TM3)	10 µM	110 nM	0,275
Gesamtvolumen			20

Tab. 12. Protokoll für die Taq-Man PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	50°C	5 min	
2	94°C	7 min	
3	94°C	15 sec	45 x
4	55°C	30 sec	
5	4°C	∞	

4.2.4 Statistische Analysen

Für die statistischen Auswertungen der Laborergebnisse zusammen mit den epidemiologischen Daten (Geschlecht, Alter, Nationalität bzw. Herkunftsland sowie Land, in dem die HIV-Infektion erworben wurde) wurde der zweiseitige Fisher's Exakt-Test (GraphPad; <http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>) und der Mann-Whitney U-Test (PASW Statistics 20; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) angewendet.

5 Ergebnisse

5.1 Powerberechnung, Probenausfall und Repräsentativität

Im Untersuchungszeitraum, 15. Oktober bis 31. Dezember 2014, gingen 422 Filterproben von HIV-Neudiagnosen ein, die durch den BED-CEIA als länger bestehende HIV-1-Infektion eingestuft wurden. Von 286 Proben konnte die RNA isoliert und aus diesen 226 Sequenzen erzeugt werden. Insgesamt sind 225 Proben in die nachfolgenden Berechnungen eingegangen, da sich zwei Proben bei der phylogenetischen Analyse als identisch erwiesen hatten und somit nur einmal in der Auswertung berücksichtigt werden konnte. Gründe für den Probenausfall waren: zu wenig Ausgangsmaterial (gemeint ist die nicht ausreichende Anzahl an Filterspots; n=136), zu geringe Viruslast, zu wenig PCR-Produkt, nicht auswertbare Sequenzen (n=61) und Doppelmeldungen (n=1). Demzufolge reichte die Größe des Studienpanels in Bezug auf die TDR für ein 95%-iges KI; bei den non-B Subtypen für ein 90%-iges KI.

Die Repräsentativität der Stichprobe war 1) im gewählten Untersuchungszeitraum (15. Okt.-31. Dez.) (Abb. 10) und 2) für die bearbeiteten und untersuchten Proben (Abb. 11) hinsichtlich der Verteilung der Risikogruppen in beiden Subgruppen (rezent und länger bestehende HIV-Infektion) gegeben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

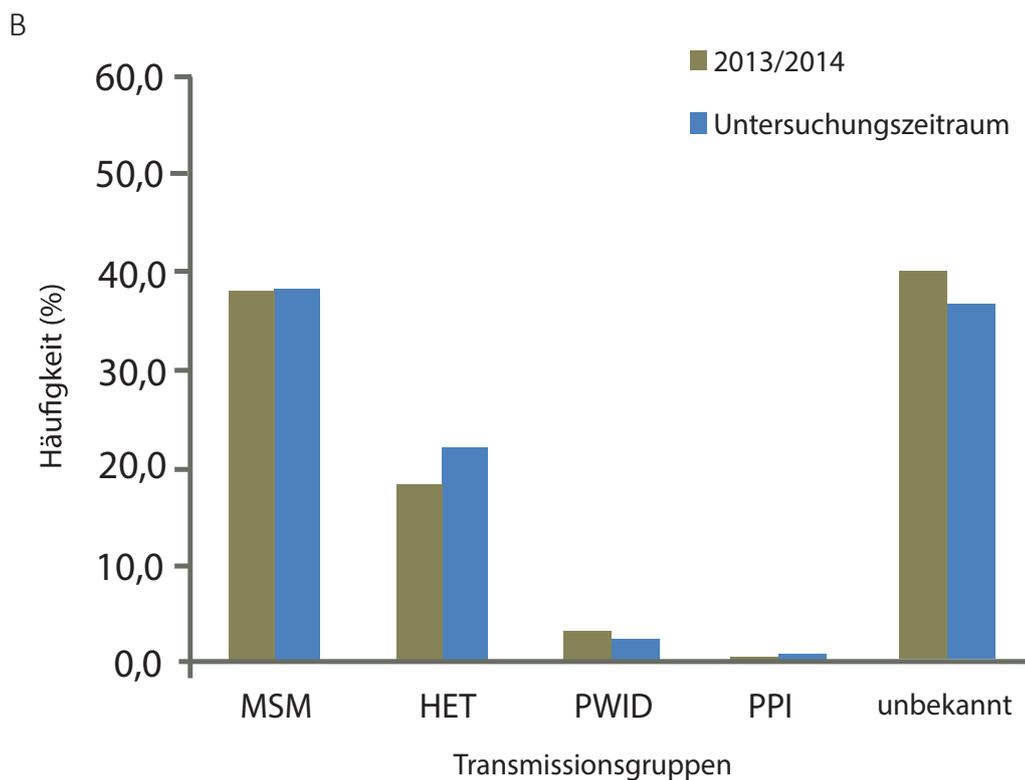
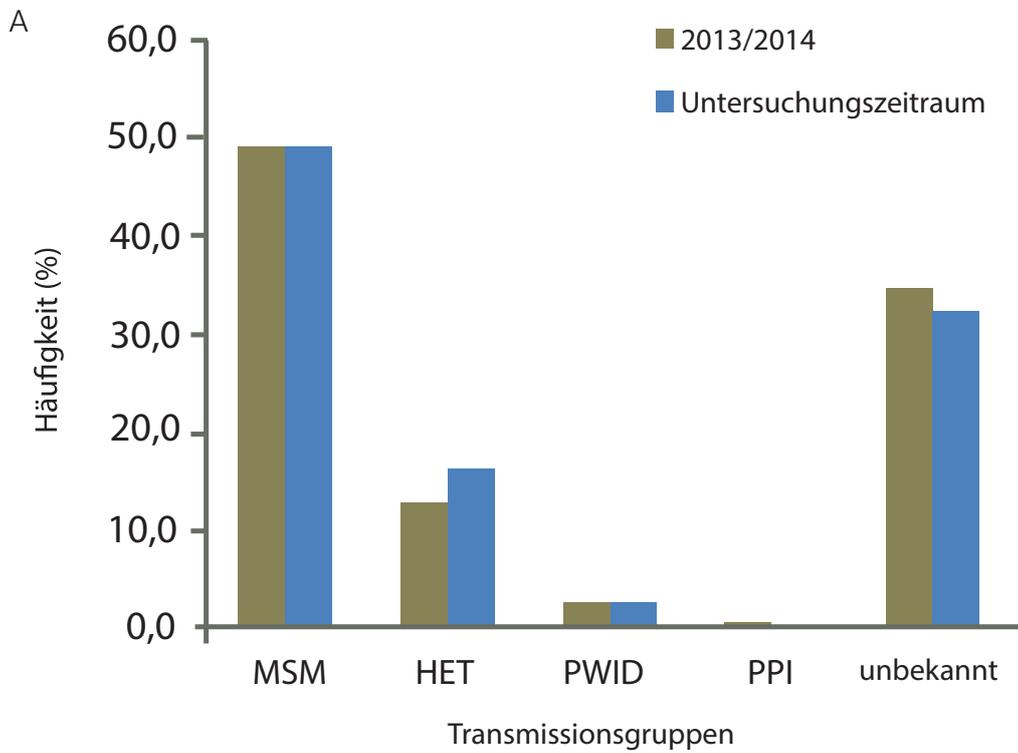


Abb. 10. Vergleich der Häufigkeit der Transmissionsgruppen im gesamten Studienpanel zu dem Untersuchungspanel.

A) bei rezenten Infektionen

Die Angaben beziehen sich auf 2.034 rezente Neudiagnosen in 2013/14 bzw. 881 im Untersuchungszeitraum (15.10.-31.12.2014).

B) bei länger bestehenden Infektionen

Die Angaben beziehen sich auf 6.337 länger bestehende Neudiagnosen in 2013/14 bzw. 422 im Untersuchungszeitraum (15.10.-31.12.2014).

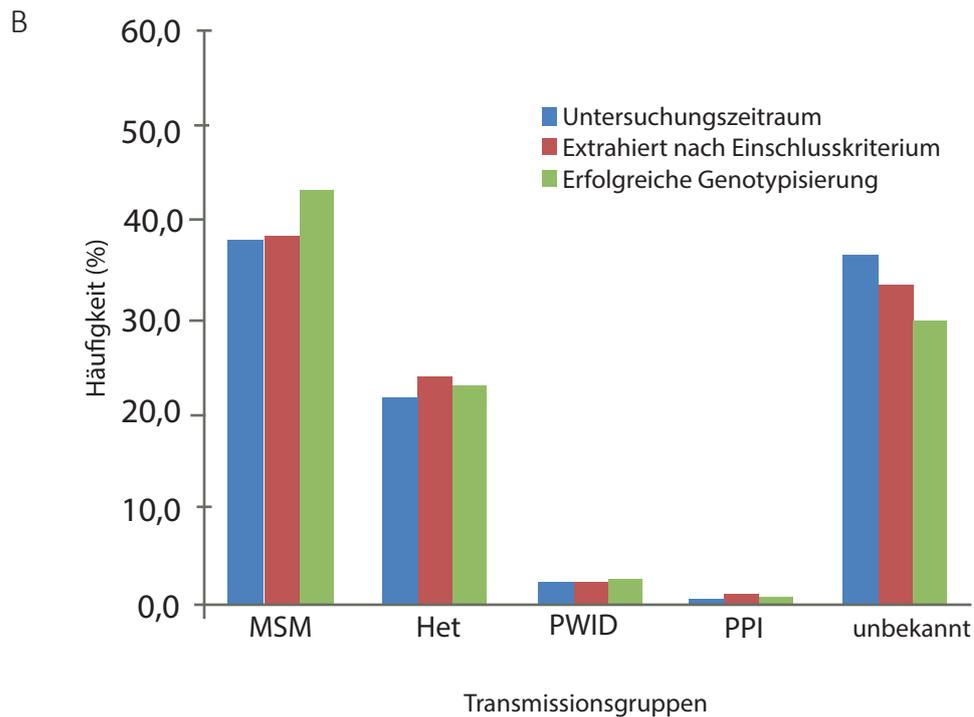
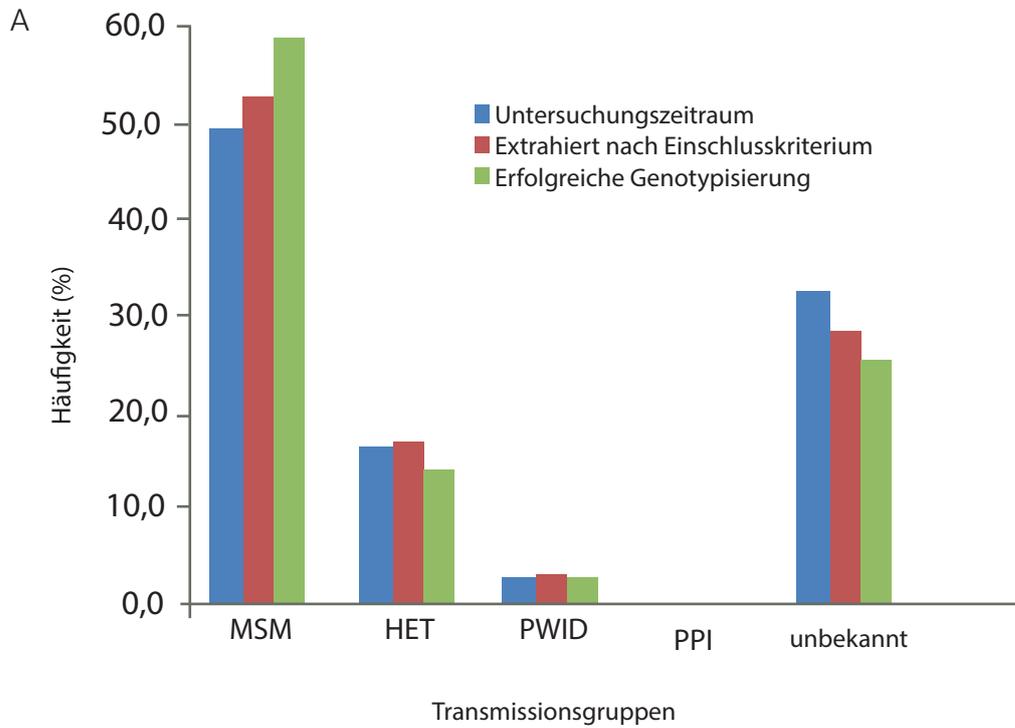


Abb. 11. Vergleich der Häufigkeit der Transmissionsgruppen für das Probenpanel des Untersuchungszeitraumes, das Probenpanel mit durchführbarer Extraktion und das Probenpanel nach erfolgreicher Genotypisierung.

A) bei rezenten Infektionen

Die Angaben beziehen sich auf 186 Proben im gesamten Untersuchungszeitraum (15.10.-31.12.2014), 170 Proben mit den notwendigen Kriterien, welche eine Extraktion ermöglichten, sowie 111 Proben, aus denen eine Sequenz hervorging.

B) bei länger bestehenden Infektionen

Die Angaben beziehen sich auf 422 Proben im gesamten Untersuchungszeitraum (15.10.-31.12.2014), 286 Proben mit den notwendigen Kriterien, welche eine Extraktion ermöglichten, sowie 225 Proben, aus denen eine Sequenz hervorging.

5.2 Charakterisierung des Probenpanels

Das Studienpanel (n=225) bestand mit 78% (n=176) hauptsächlich aus männlichen HIV-Spät-diagnosen; gut ein Fünftel der Proben stammten von weiblichen Personen (n=49) (Abb. 12).

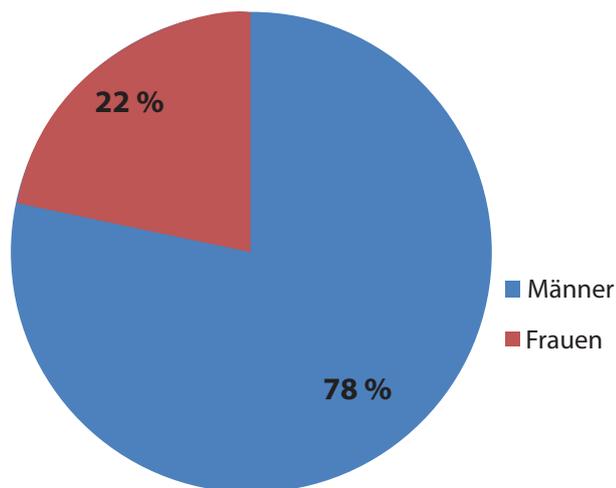


Abb. 12. Geschlechterverteilung im Probenpanel der länger bestehenden Infektionen (N=225). Die Angaben beziehen sich auf 225 Proben, aus denen eine Sequenz resultierte.

In Abb. 13 sind die Häufigkeiten der verschiedenen Transmissionsgruppen dargestellt. Die meisten Proben stammten von Männern, die Sex mit Männern haben (43%; n=98). Die wenigsten von einer Mutter zu Kind Übertragung (PPI). 23% (n=52) der eingesandten Spots sind auf ein heterosexuelles Transmissionsrisiko und 3% (n=6) durch intravenöse Drogenkonsumenten (PWID) zurückzuführen. Bei knapp einem Drittel (30%; n=67) aller Proben ist die Risikogruppe unbekannt.

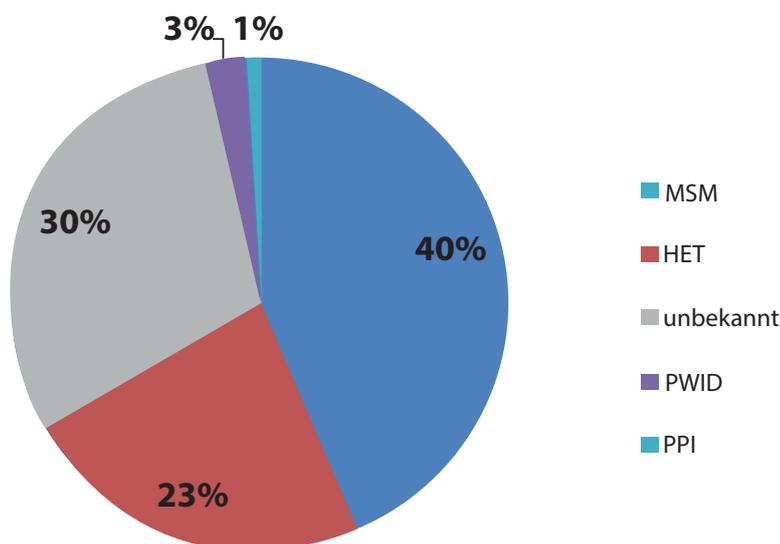


Abb. 13. Anteile der Risikogruppen im Studienpanel der länger bestehenden Infektionen (N=225). Die Angaben beziehen sich auf 225 Proben, aus denen eine Sequenz resultierte.

Eine Übersicht über die Herkunft der HIV-Infizierten ist in Abb. 14 (A) zu sehen. Fast die Hälfte der untersuchten Proben kam von deutschstämmigen Personen (49%; n=111). Die restlichen Filterspots stammten vor allem von Afrikanern (17%; n=38) oder waren unbekannter Herkunft (20%; n=41). Wenige Proben wurden von Personen, die in anderen europäischen Staaten (Osteuropa 4%; n=8 / Westeuropa 2%; n=5 / Zentraleuropa 4%; n=10) sowie Amerika (3%; n=6) oder Asien (1%; n=3) geboren wurden, eingesandt. Bei 3 Proben (1%) wurde „Ausland“ als Herkunft angegeben, d.h. es kann nur davon ausgegangen werden, dass es sich um keine deutschstämmigen Personen handelt.

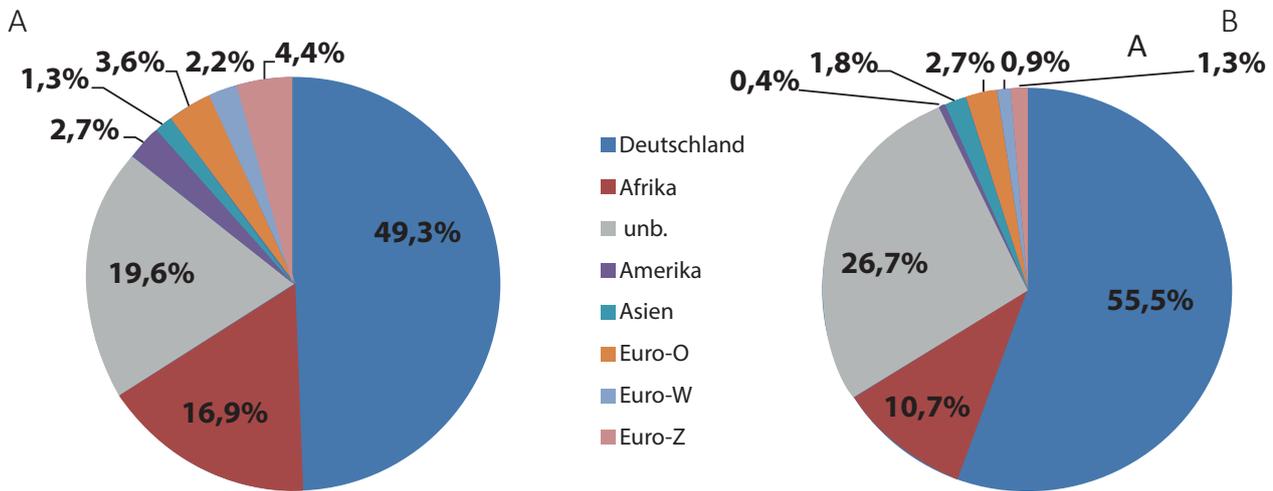


Abb. 14. Herkunft (A) und Land der Infektion (B) HIV-Infizierter Personen im Studienpanel (N=225). Die Legende bezieht sich auf beide Abbildungen.

Herkunftsland und Infektionsland stimmen nicht unbedingt bei den späten HIV-Neudiagnosen überein; aus diesem Grund sind in Abb. 14 (B) die Proben nochmals nach dem Ort der Infektion aufgeteilt. Über die Hälfte des Studienpanels hat sich in Deutschland (55%; n=125) infiziert und bei einem weiteren großem Teil war das Infektionsland unbekannt (27%; n=59). 11% (n=24) der Infektionen geschahen in Afrika, 5% (n=11) in Europa (Osteuropa 3%; n= 6 / Westeuropa 1%; n=2 / Zentraleuropa 1%; n=3) und 2% (n=4) in Asien. Eine Probe (0,4%) kam aus einem unbekanntem ausländischen Land.

5.3 Subtypverteilung

Innerhalb des Studienpanels konnten 137/225 der auswertbaren Sequenzen (61%) dem Subtyp B zugeordnet werden. Die non-B Subtypen (39,1%; n=88) wurden weiter unterteilt, wobei sehr seltene, sowie einzigartige rekombinante Formen als „seltene CRF/URF“ zusammengefasst wurden. Den größten Anteil unter den non-B Subtypen bildet die Gruppe der CRF02_AG mit knapp 10% (n=15), gefolgt von Subtyp C (8,4%), „seltene CRF/URF“ (7,6%), Subtyp A (6,7%), Subtyp G (3,6%), sowie Subtyp F und CRF01_AE (je 1,3%). Die wenigsten (0,4%; n=1) konnten als Subtyp D definiert werden (Abb. 15).

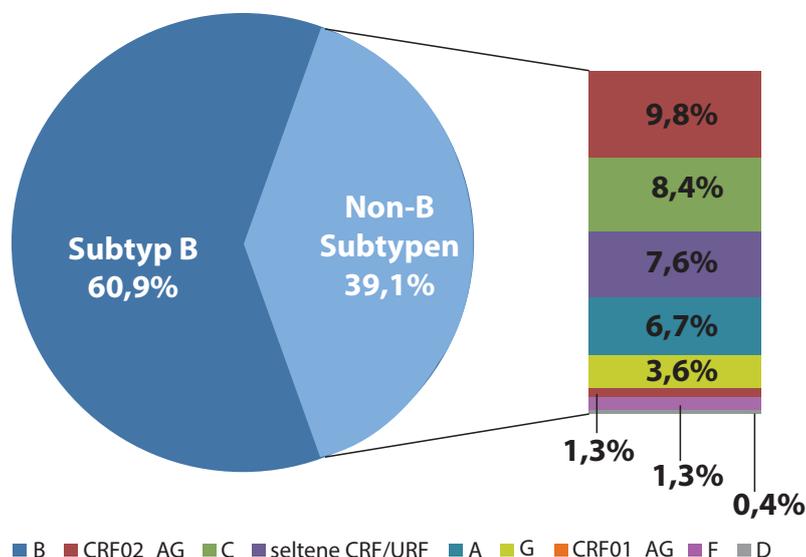


Abb. 15. Subtypverteilung im Studienpanel (N=225).

Im Kreisdiagramm ist nur die Unterscheidung in Subtyp B bzw. Subtyp non-B Infektionen demonstriert. Im Balken daneben wurden die non-B Subtypen weiter aufgegliedert.

Abb. 16 zeigt hoch signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von Subtyp non-B Infektionen zwischen den Geschlechtern: Frauen des untersuchten Studienpanels haben häufiger einen non-B Subtypen als Männer. Bei den Transmissionsgruppen treten unter den Heterosexuellen signifikant weniger Subtyp B Infektionen auf als bei der Gruppe der MSM (hoch signifikant). Außerdem unterscheiden sich die MSM auch signifikant von den intravenösen Drogengebrauchern (PWID). Späte HIV-Neudiagnosen, die aus dem Ausland stammen oder sich im Ausland angesteckt haben, weisen deutlich höhere Anteile an non-B Infektionen auf als Personen, mit deutscher Herkunft oder mit Infektionsort Deutschland (hoch signifikanter Unterschied). Abb. 17 zeigt, dass von Subtyp non-B Infektionen betroffene Frauen größtenteils aus Afrika kamen (n=23) während die Männer am häufigsten deutscher Herkunft (n=17) waren.

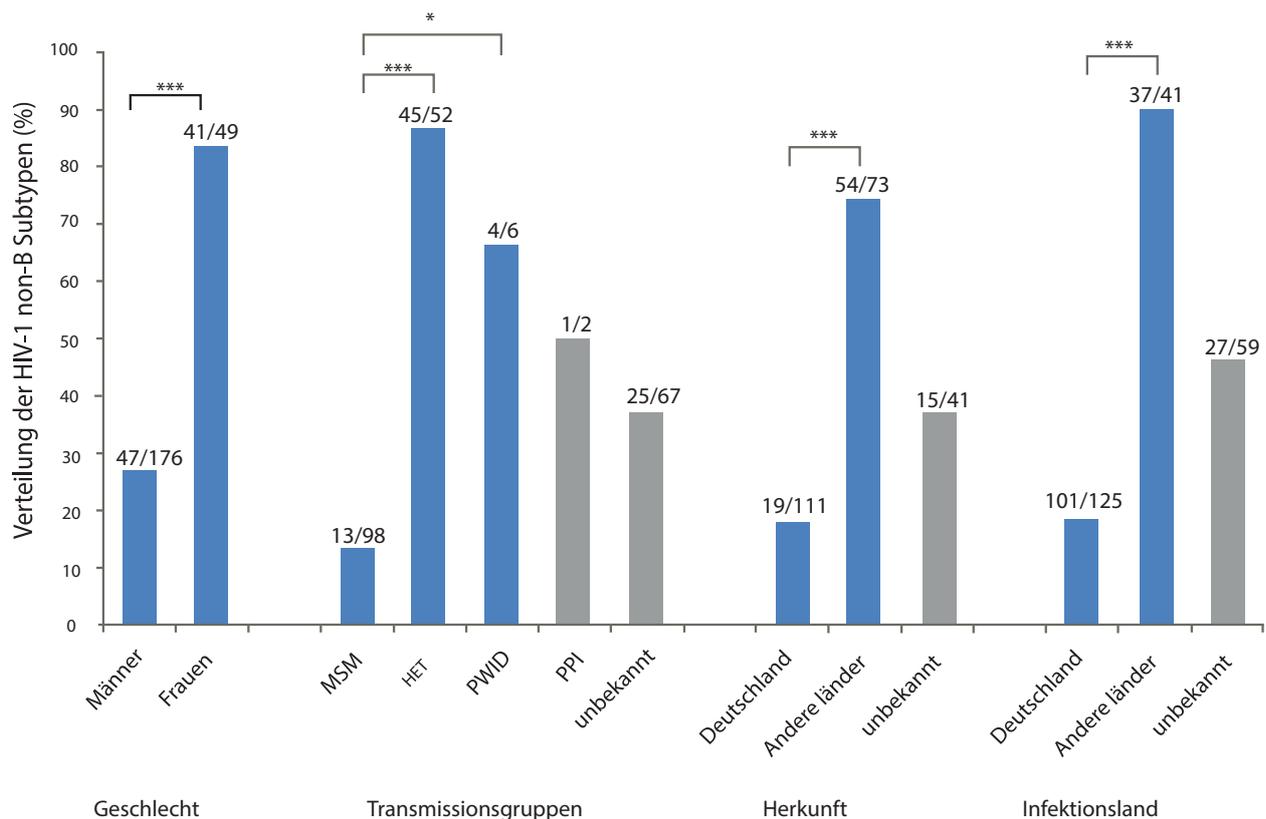


Abb. 16. Verteilung innerhalb der non-B Subtypen (n=88) in Bezug auf Geschlecht, Transmissionsgruppe, Herkunfts- sowie Infektionsland.
 Die absoluten Zahlen für die Subgruppen und die Anzahl der non-B Subtypen innerhalb einer Subgruppe sind über den Balken angegeben.
 Unterschiede sind als „*“, „***“ und „****“ für signifikant ($p \leq 0,05$), sehr signifikant ($p \leq 0,01$) und hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

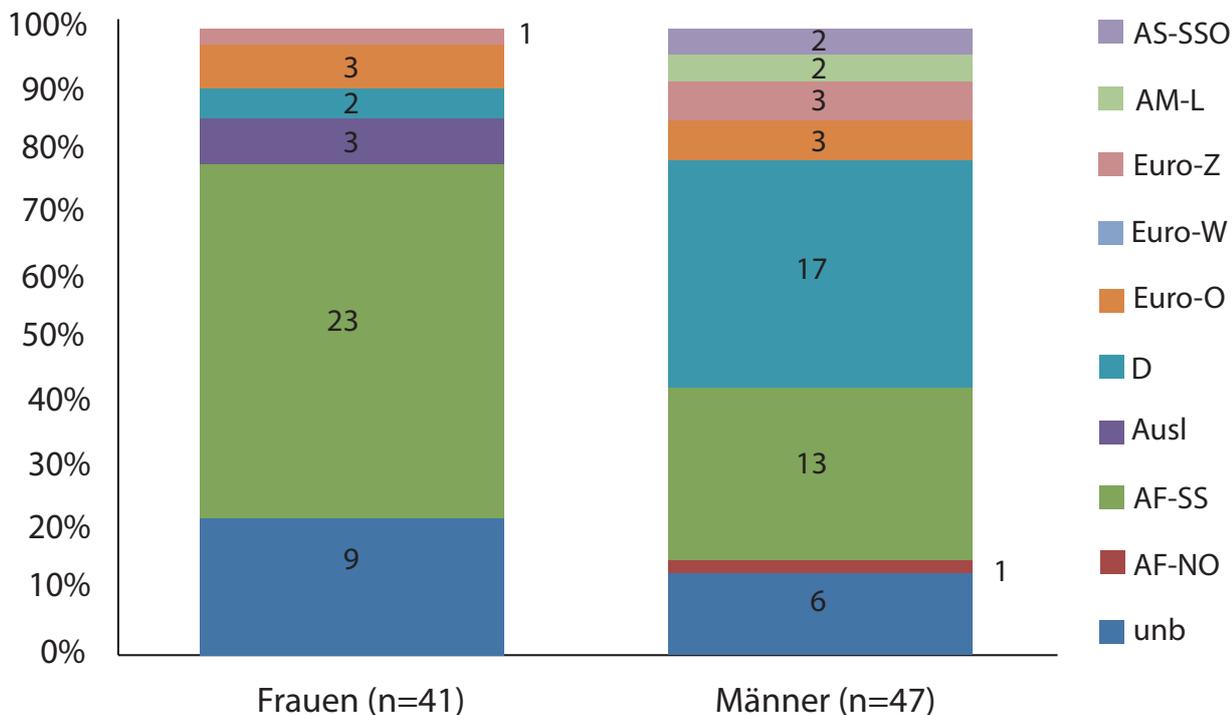


Abb. 17. Herkunft von Frauen und Männern mit Subtyp non-B-Infektionen.

Absolute Ns sind als Zahlen im Diagramm angegeben.

HIV non-B-Infektionen zogen sich 13 Frauen in Afrika und 8 Frauen in Deutschland zu. Bei Männern ist das häufigste Infektionsland für non-B Infektionen Deutschland (n=16) und weniger häufig Afrika (n=10) (Abb. 18).

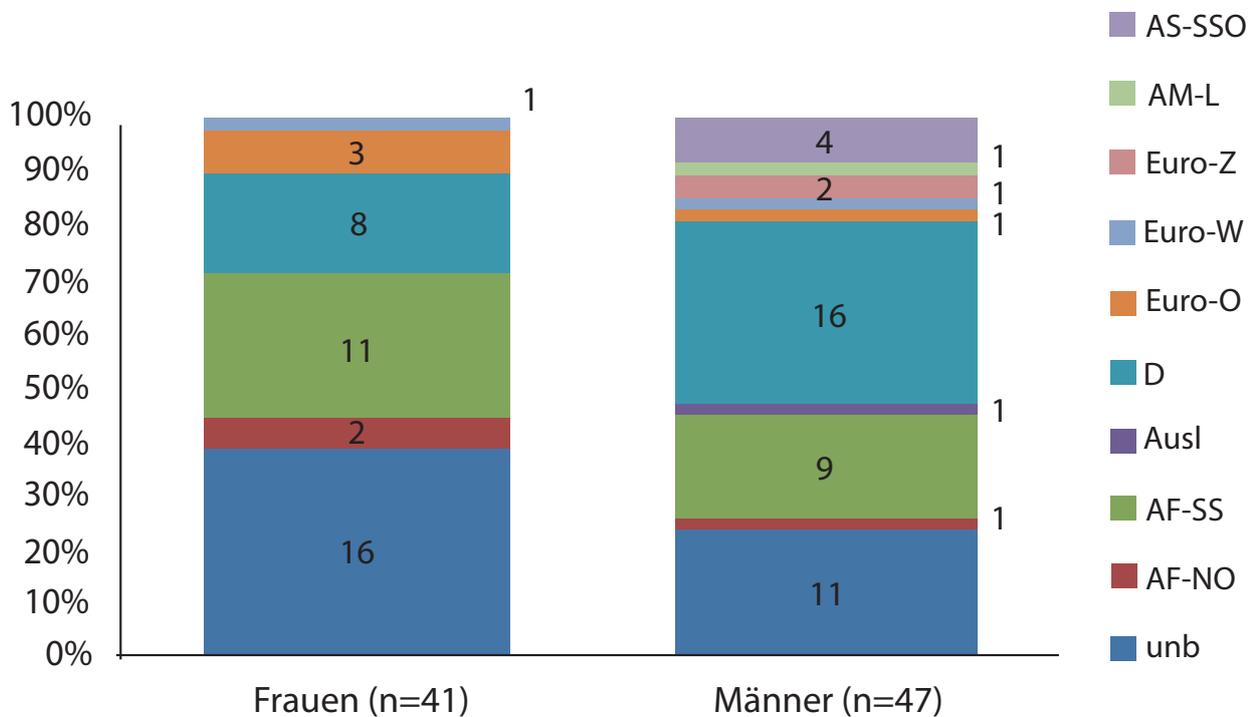


Abb. 18. Infektionsort von Frauen und Männern mit Subtyp non-B-Infektionen.

Absolute Ns sind als Zahlen im Diagramm angegeben.

Non-B-Infektionen werden bei Frauen größtenteils über heterosexuellen Kontakt übertragen (n=28) Bei Männern ebenfalls, wobei da der relative Anteil (n=17) geringer ist und nur etwas weniger durch MSM (n=13) (Abb. 19).

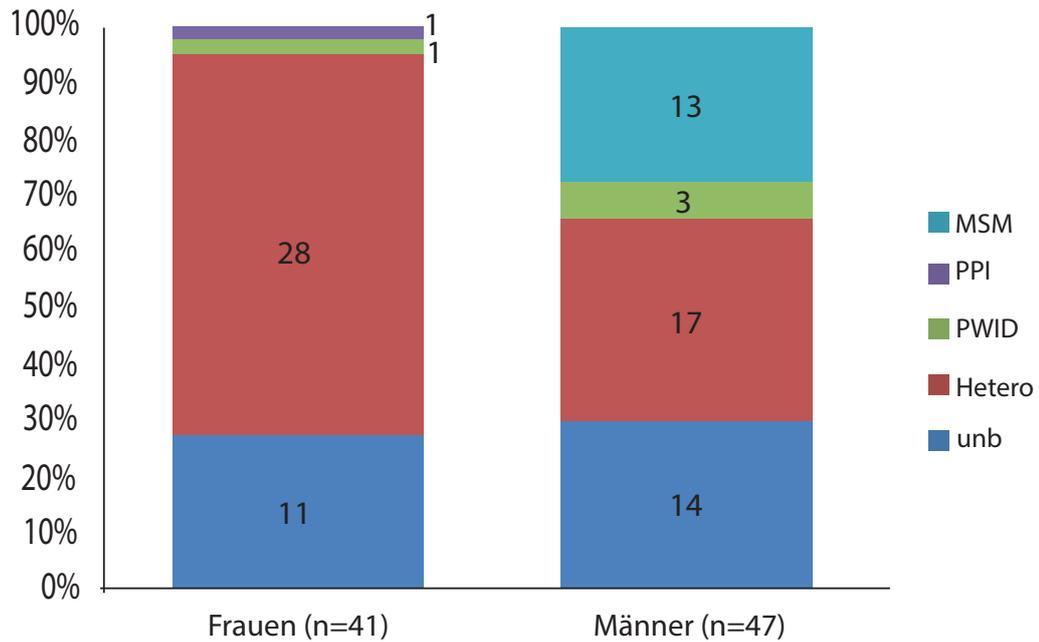


Abb. 19. Anteile der Transmissionsgruppen bei Frauen und Männer mit Subtyp non-B-Infektionen. Absolute Ns sind als Zahlen im Diagramm angeben.

In Abb. 20 sind Anteile der einzelnen Subtypen für Männer und Frauen sowie die Risikogruppen dargestellt. Auffällig sind die Ähnlichkeiten bei den relativen Anteilen der Subtypen zwischen Frauen und Heterosexuellen. Auch zwischen Männern und MSM ist die Zusammensetzung der einzelnen Subtypen vergleichbar, jedoch gibt es insgesamt etwas mehr non-B-Infektionen bei den Männern als bei den MSM.

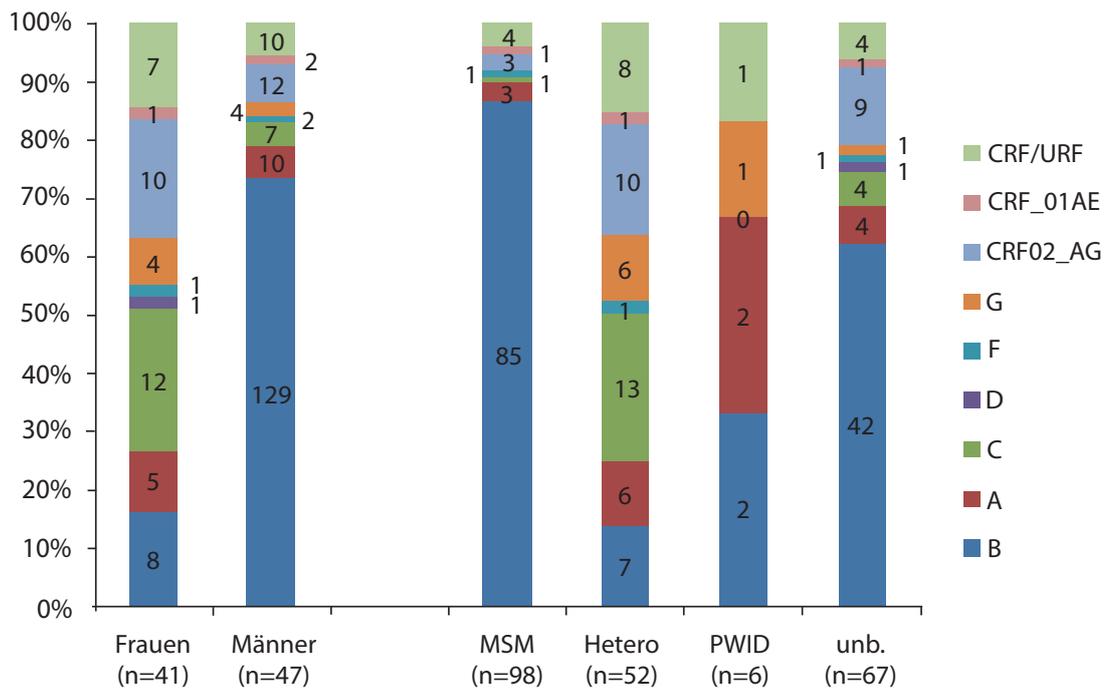


Abb. 20. Subtypverteilung innerhalb der Geschlechter und Transmissionsgruppen. PPI wurde aufgrund des kleinen N von der Betrachtung ausgeschlossen. Für jeden Subtyp in einer Subgruppe ist die absolute Zahl angegeben.

Abb. 21 zeigt, dass die unterschiedlichen Subtypen auf verschiedenen Transmissionswegen verbreitet werden: Während Subtyp B größtenteils nur innerhalb der MSM übertragen wird, werden die Subtypen C und AG größtenteils durch heterosexuelle Kontakte übertragen. Die Subtypen A und G zirkulieren am häufigsten unter den PWID oder werden durch heterosexuelle Kontakte weitergegeben.

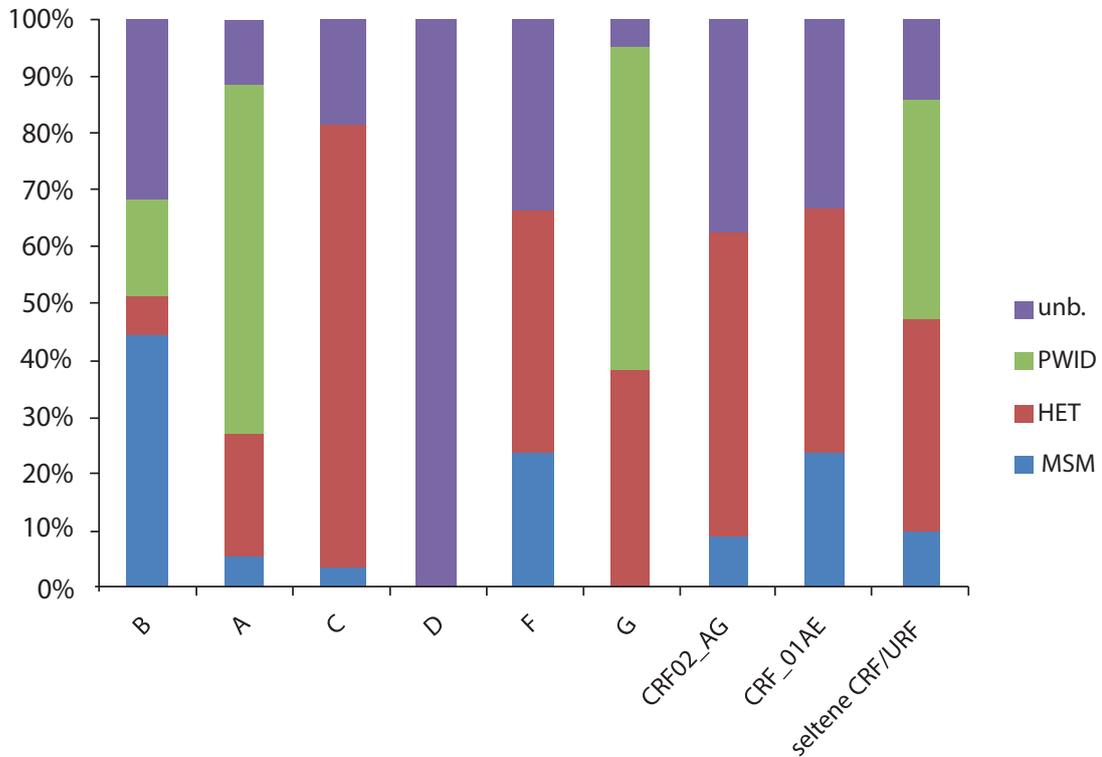


Abb. 21: Anteile Risikogruppen innerhalb der einzelnen Subtypen.
PPI wurde aufgrund des kleinen N von der Betrachtung ausgeschlossen.

Bei dem Vergleich der Subtypverteilung der bekannten und unbekanntem Transmissionswege ist eine ähnliche Zusammensetzung zu erkennen, wobei sich die absoluten Anzahlen unterscheiden (Abb. 22).

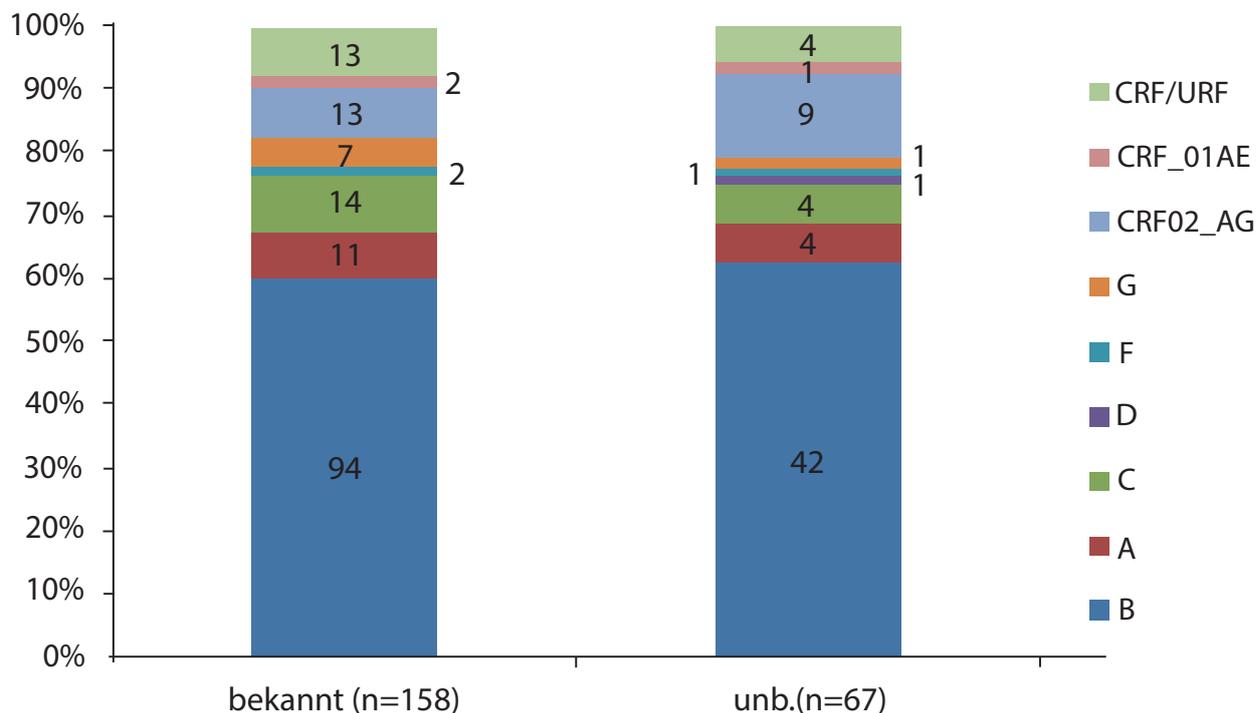


Abb. 22. Subtypverteilung für alle bekannten und unbekanntem Transmissionswege. Für jeden Subtyp in einer Subgruppe ist die absolute Zahl angegeben.

5.4 Prävalenz der übertragenen Resistenz in 2013-2014

Insgesamt konnten mit der Liste für Resistenzmutationen der WHO (Bennett et al., 2009) 19/225 Sequenzen mit mindestens einer übertragenen Medikamentenresistenz identifiziert werden. Dies entspricht 8,4% der Gesamtzahl aller untersuchten Proben. In Abb. 23 wurden sie noch in die Untergruppen NRTI (nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren), NNRTI (Nicht nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren), PI (Proteaseinhibitoren), dual für zwei bzw. multi für mehr als zwei Primärresistenzen aufgespalten. Am häufigsten traten Resistenzen der Typen NRTI und NNRTI (je 3,1%; n=7) auf. Multi-resistente Formen konnten nicht innerhalb des Studienpanels nachgewiesen werden. In 1,3% (n=3) der Fälle konnten allerdings zwei verschiedene Resistenzen für eine Probe festgestellt werden.

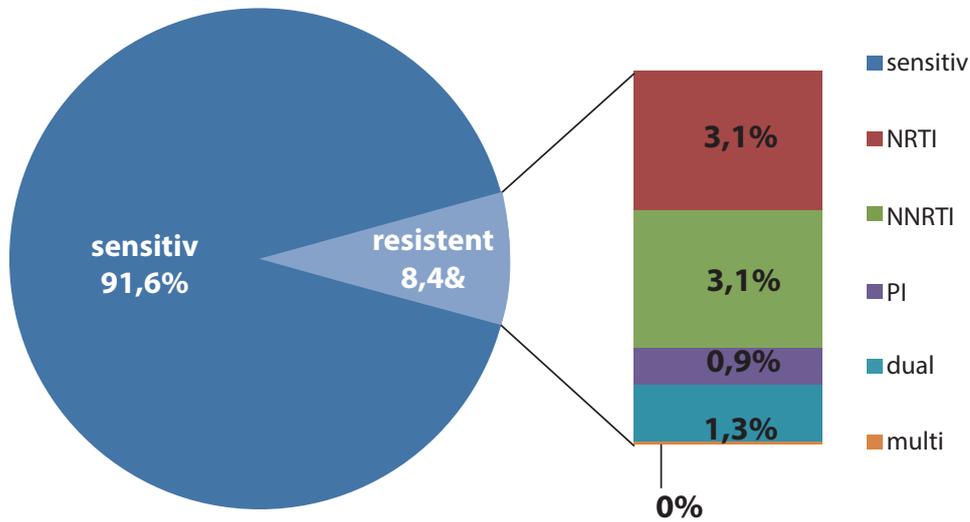


Abb. 23. Verteilung der Primärresistenzen im Studienpanel (N=225).
 Im Kreisdiagramm ist nur die Unterscheidung in sensitiv bzw. resistent vorgenommen. Im Balken daneben wurden die Resistenztypen genauer betrachtet.

Die aufgetretenen TDR wurden nach ihrer Häufigkeit in den einzelnen Subgruppen in Abb. 24 aufgetragen. Ein signifikanter Unterschied ist nur bei dem Infektionsland zu verzeichnen. Es gibt mehr Resistenzen bei Infizierten, die sich außerhalb Deutschlands mit HIV angesteckt haben.

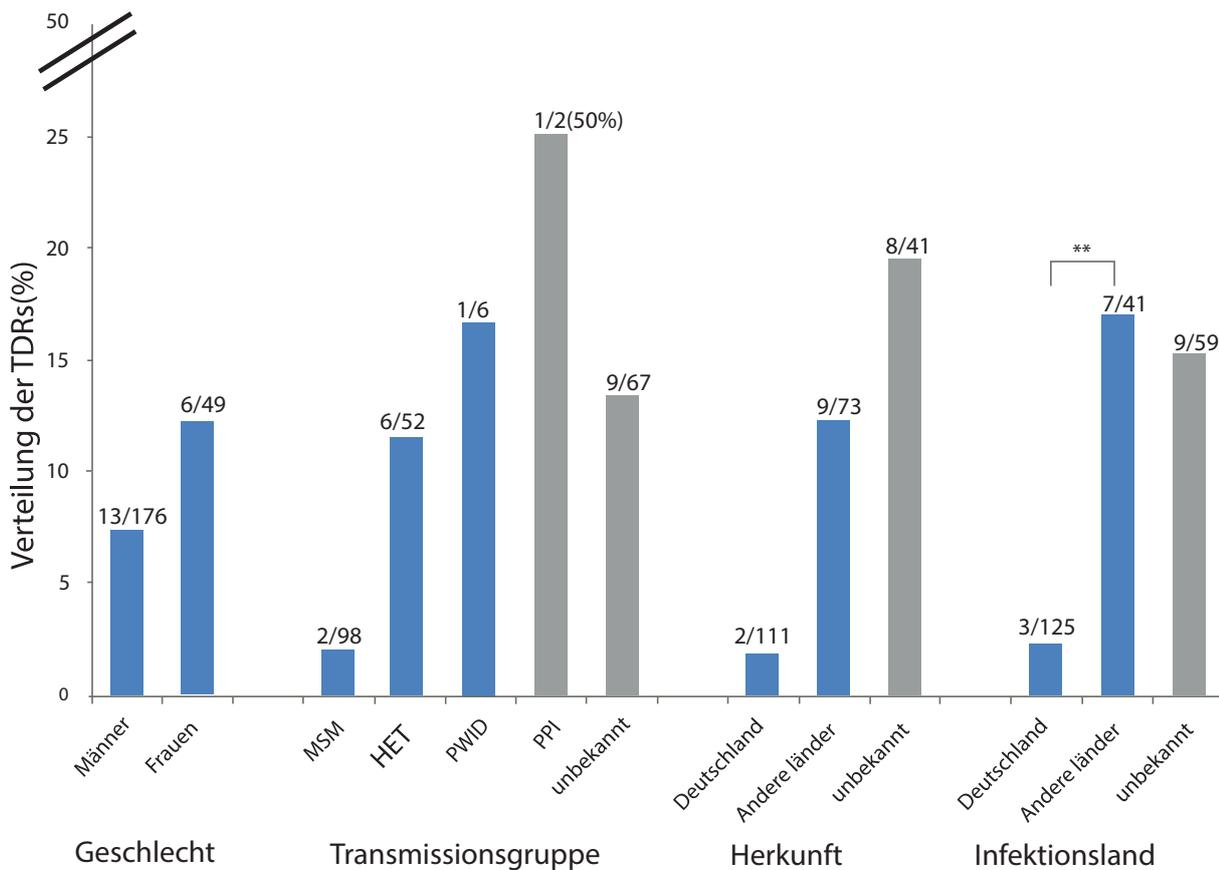


Abb. 24. Häufigkeit der Resistenzen in den Subgruppen Geschlecht, Transmissionsgruppe, Herkunft und Infektionsland.

Die absoluten Zahlen für die Subgruppe und die Anzahl der TDR innerhalb einer Subgruppe sind über den Balken angegeben. Unterschiede sind als „*“, „**“ und „***“ für signifikant ($p \leq 0,05$), sehr signifikant ($p \leq 0,01$) und hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

Abbildung 25 zeigt alle aufgetretenen Resistenzmutationen und ihre Häufigkeiten geordnet nach den Wirkstoffklassen NRTI, NNRTI und PI.

Die häufigste Resistenzmutation innerhalb der NNRTI ist die K103 NS. Die PI-Resistenzmutationen sind diejenigen, die mit den geringsten Anteilen vertreten sind. Eine vollständige Auflistung aller Resistenzmutationen nach Bennett befindet sich in Anhang 2.

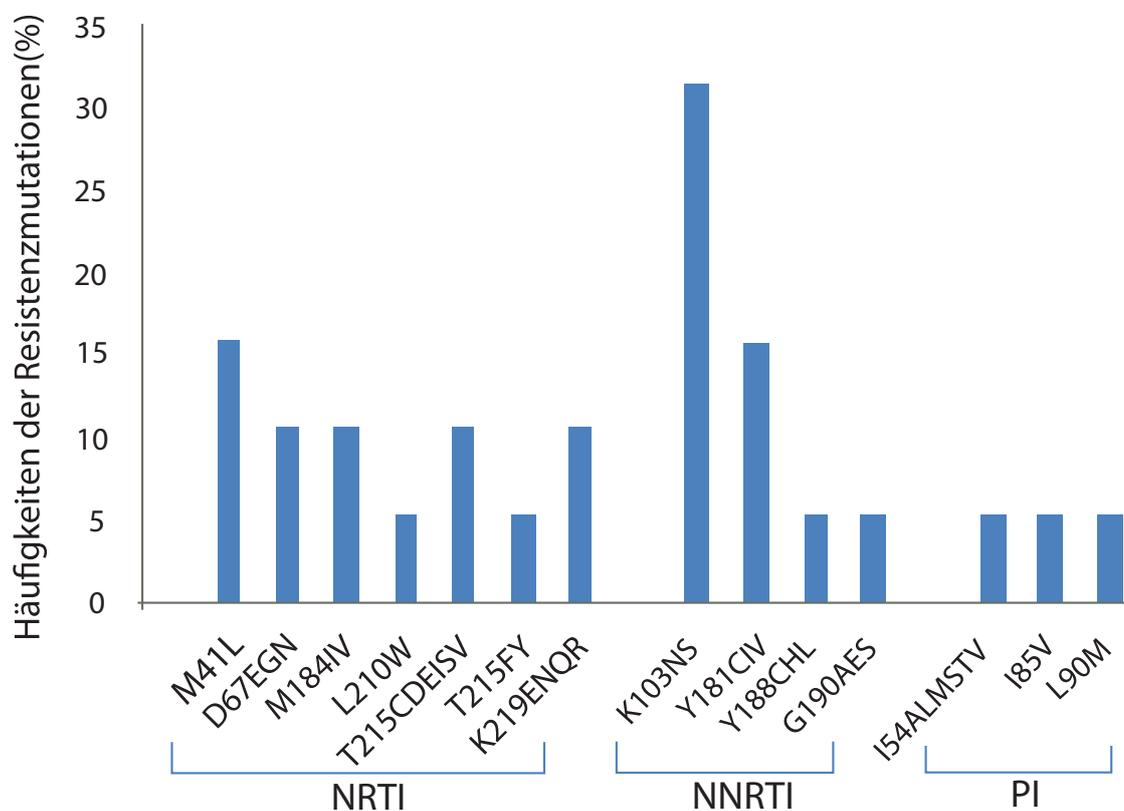


Abb. 25. Häufigkeiten der Resistenzmutationen pro Patient selektiert durch NRTI, NNRTI und PI. Gesamtzahl der Resistenzmutationen n= 27 (NRTI: 13, NNRTI: 11, PI: 3).

In Abb. 26 sind die aus den Resistenzmutationen resultierenden Medikamentenresistenzen aufgetragen. Auch hier wurden die Medikamente in die Untergruppen NRTI, NNRTI und PI gegliedert. Außerdem ist entsprechend dem SIR-Algorithmus der Stanford Universität gekennzeichnet, um zu zeigen ob es sich bei der Resistenz um eine schwaches bzw. mittleres („intermediär“; hellblau) oder hohes („hoch“; dunkelblau) Resistenzlevel handelt. Bei den NNRTI und den NRTI sind mehr Medikamente mit hohen Resistenzleveln zu erkennen (n=4 bzw. 5) als bei den PI (n=1), bei denen auch die prozentualen Häufigkeiten niedriger sind als bei den Reverse Transkriptase Inhibitoren. Höchste Anteile an Resistenzen sind gegen die Medikamente Rilpivirin (RPV), Efavirenz (EFV) bzw. Nevirapin (NVP) der Klasse der NNRTIs vorhanden. Eine Liste zu den Abk. der Medikamentenresistenzen ist im Anhang 3 aufgeführt.

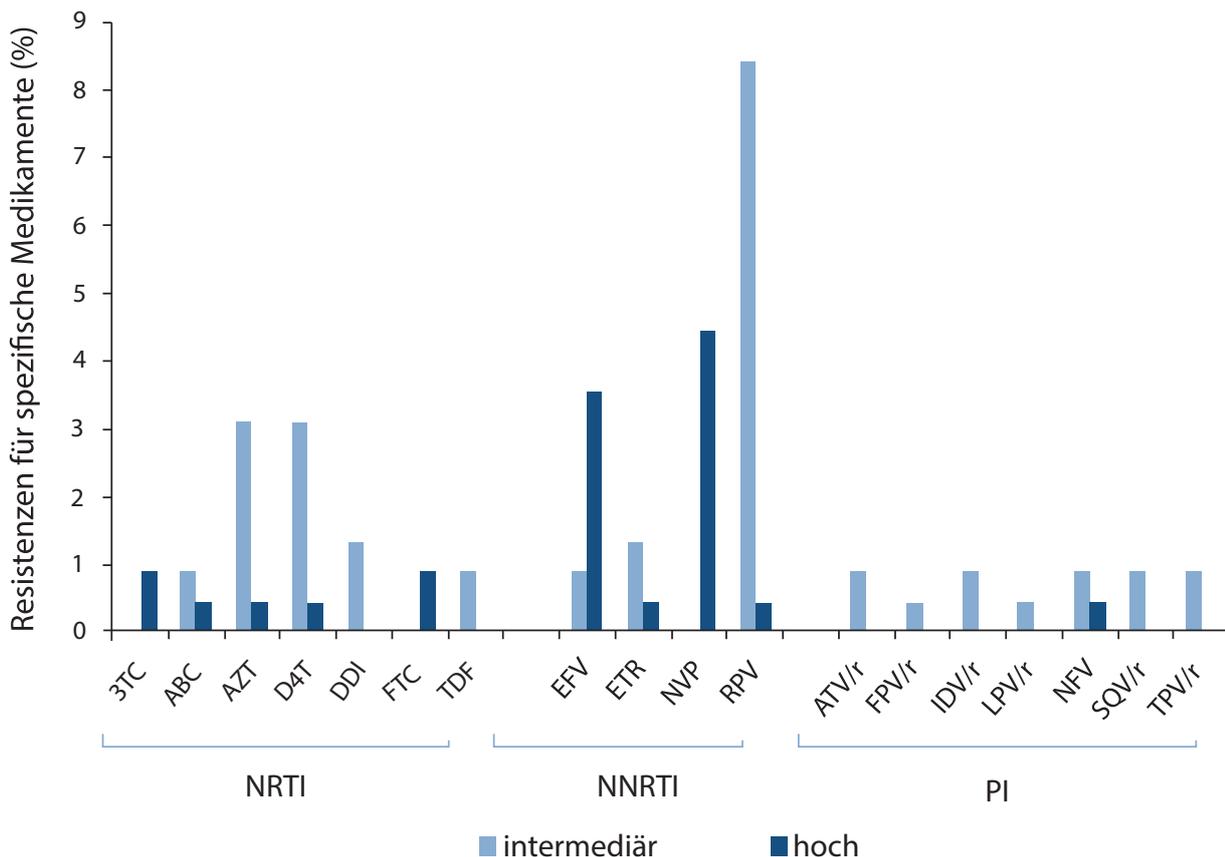


Abb. 26. Häufigkeiten der Resistenzen gegen spezifische Medikamente unterteilt nach Wirkungsgrad. Resistenzvorhersage entsprechend dem SIR-Algorithmus der Stanford University: intermediäre Resistenzlevel (hellblau) und hohe Resistenzlevel (dunkelblau). Schwache und potentiell schwache Level sind nicht angegeben.

5.5 Vergleich der Ergebnisse von lang bestehenden und rezenten HIV-1-Infektionen

Für den Vergleich der Gruppe der länger bestehenden HIV-1-Infektionen mit der Gruppe der erst kürzlich erworbenen wurden die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der rezenten (bereits durch das RKI veröffentlicht) gegenübergestellt.

In Tabelle 13 sind das Alter, die CD4-T-Zellzahl sowie die Viruslast von den kürzlich erworbenen und den länger bestehenden HIV-1-Infektionen gegenübergestellt. Rezente HIV-1-Infektionen haben tendenziell ein geringeres Alter (34 Jahre) im Vergleich zu länger bestehenden (36 Jahre); jedoch sind die CD4-T-Zellzahl und die Viruslast (Zahl der Viruskopien/ml) signifikant höher als bei Infektionen, die bereits länger zurückliegen.

Tab. 13. Gegenüberstellung von Alter, CD4-T-Zellzahl und Viruslast bei rezenten und länger bestehenden HIV-1-Infektionen.

N ist die Anzahl der Proben, bei denen diese Angabe aus dem Meldebogen verfügbar war. P steht für p-Wert.

	rezent			long term			p
	Median	IQR	n	Median	IQR	n	
Alter (in Jahren)	34	27-45	781	36	29-47	225	0,06
CD4-T-Zellzahl	421	181-558	280	225,5	54-484	56	0,002
Viruslast	177000	34680-843000	364	50950	14570-219166	82	0,0001

Bei der Gegenüberstellung von den relativen Anteilen der Subgruppen für die rezenten und die länger bestehenden Infektionen sind signifikant mehr Frauen, mehr Personen mit heterosexuellem Transmissionsweg und dafür weniger MSM bei dem Studienpanel zu erkennen. Außerdem sind in der Gruppe der chronischen Infektionen signifikant mehr HIV-Infizierte nicht deutscher Herkunft. Bezüglich des Infektionslandes sind keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen sichtbar (Abb. 27).

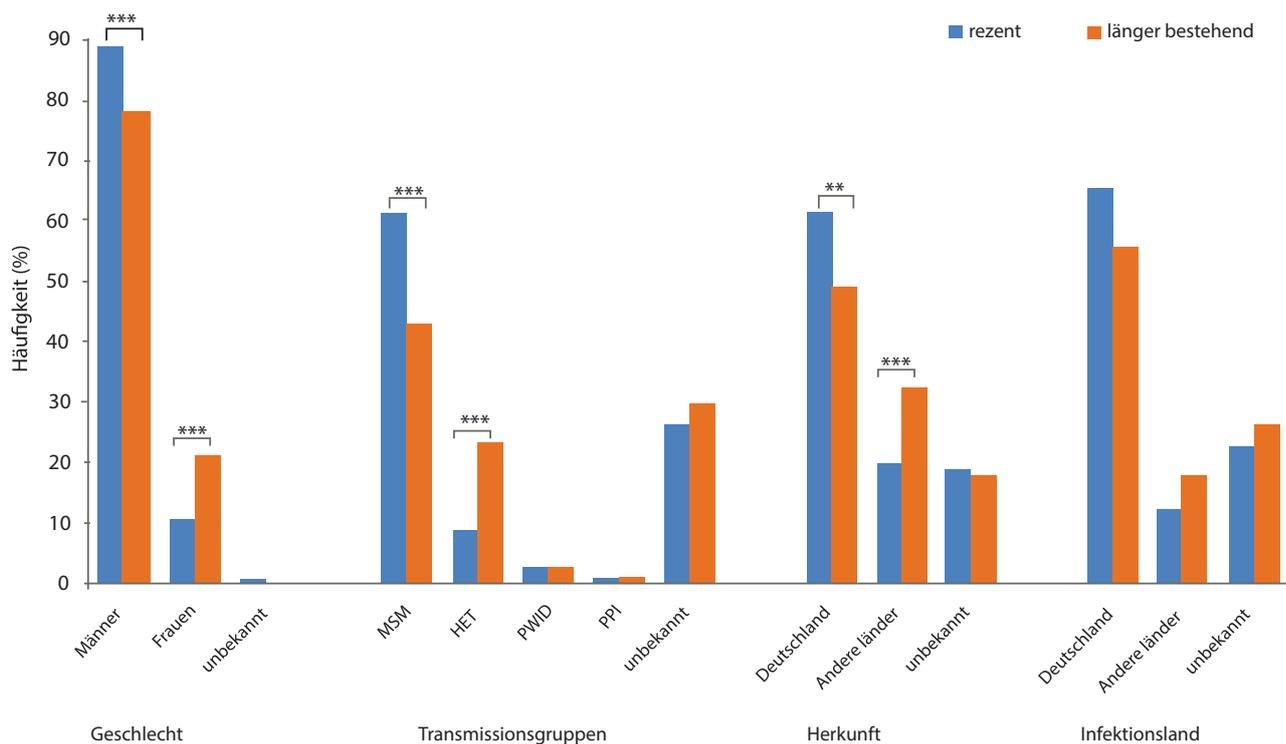


Abb. 27. Charakterisierung rezenter und länger bestehender HIV-Infektionen in Bezug auf die Verteilung der Geschlechter, Transmissionsgruppen, Herkunfts- und Infektionsländer.

Gekennzeichnet sind Unterschiede mit „*“, „**“ und „***“ für signifikant ($p \leq 0,05$), sehr signifikant ($p \leq 0,01$) und hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

Eine detaillierte Gegenüberstellung von Geschlecht, Transmissionsweg, Herkunft und Infektionsland ist in den Kreisdiagrammen der Abb. 28-30 zu sehen.

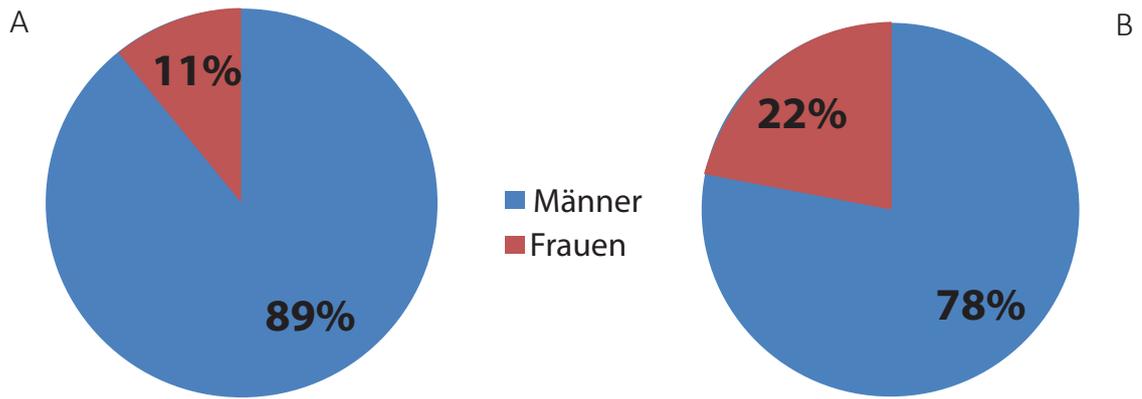


Abb. 28. Vergleich der Geschlechterverteilung von rezenten (A) und long term (B) HIV-1-Infektionen. Die Legende bezieht sich auf beide Abbildungen.

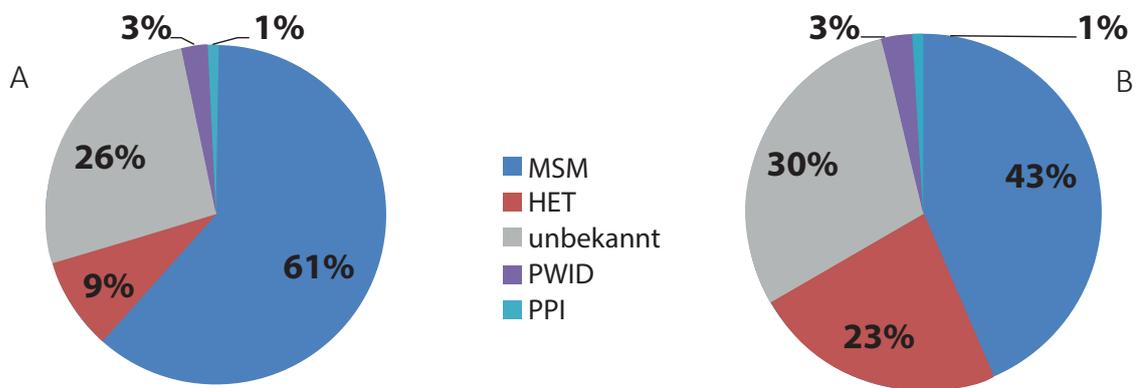


Abb. 29. Vergleich der Anteile der Risikogruppen von rezenten (A) und long term (B) HIV-1-Infektionen. Die Legende bezieht sich auf beide Abbildungen.

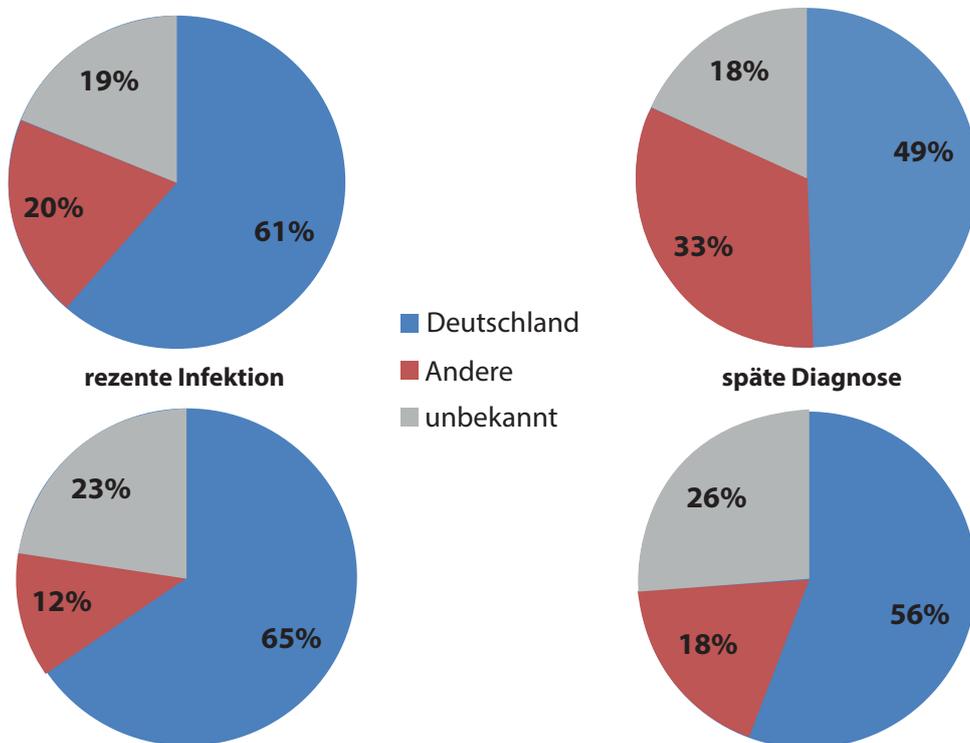


Abb. 30. Gegenüberstellung der Herkunftsländer (oben) und der Infektionsländer (unten) der rezenten und long term HIV-1-Infizierten. Die Legende bezieht sich auf alle Abbildungen.

In Abb. 31 ist die Subtypverteilung der kürzlich erworbenen und bereits länger bestehenden HIV-Infektionen dargestellt. In der Gruppe der chronischen Infektionen sind signifikant ($p=0,0001$) mehr Subtyp non-B-Infektionen (39,1%) vorhanden als bei den rezenteren Infektionen (23,8%). Innerhalb der non-B Subtypen variiert die Verteilung ebenfalls. Die größte Gruppe bilden bei den chronischen Infektionen die CRF02_AG mit 9,8% und bei den rezenteren der Subtyp A mit 5,6%. Bei den kürzlich erworbenen Infektionen folgen dann seltene CRF/URF (4,2%), Subtyp C (3,5%), CRF02_AG (3,2%), Subtyp G (3,1%), CRF01_AE (2%) und Subtyp F (1,5%). Für die länger Infizierten: Subtyp C (8,4%), seltene CRF/URF (7,6%), Subtyp A (6,7%), Subtyp G (3,6%) sowie CRF01_AE und Subtyp F (je 1,3%). Der niedrigste Prozentsatz ist bei beiden Gruppen jeweils Subtyp D mit 0,8% bei den rezenteren und 0,4% bei den chronischen Infektionen.

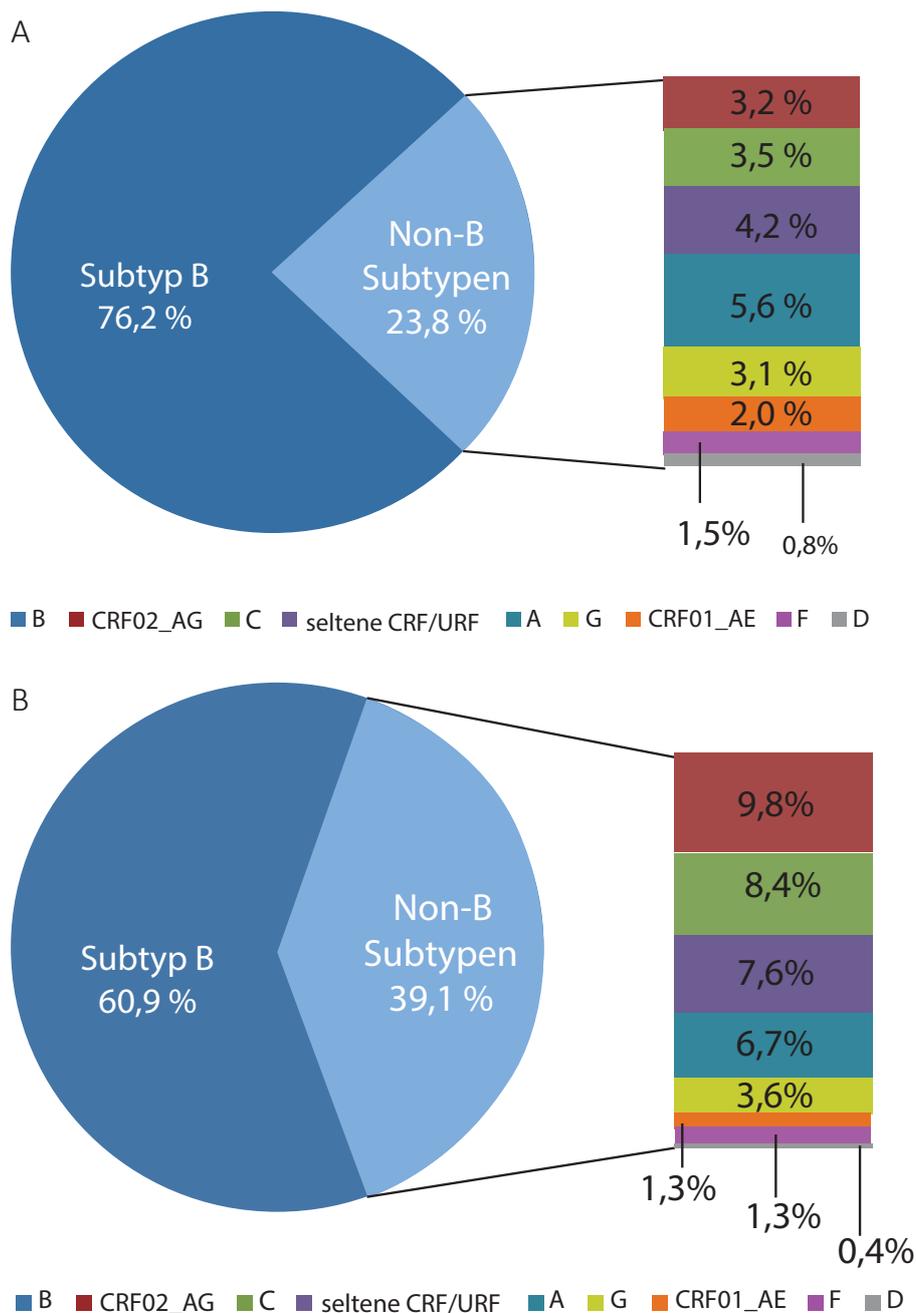


Abb. 31. Gegenüberstellung der Subtypverteilung innerhalb der Populationen der rezenteren (A) und der long term (B) HIV-Infektionen.

In den Kreisdiagrammen ist nur die Unterscheidung in Subtyp B bzw. Subtyp non-B-Infektionen demonstriert. In den jeweiligen Balken daneben wurden die non-B Subtypen weiter aufgliedert.

Abb. 32 zeigt, dass die Unterschiede in den Anteilen für Subtyp B und non-Bs signifikant sind; d.h. länger bestehende HIV-1-Infektionen haben weniger oft Subtyp B bzw. häufiger einen non-B Subtypen als rezente. Keine signifikanten Unterschiede waren bei den TDR zu beobachten (Anhang 1). Zusätzlich sind die einzelnen non-B Subtypen betrachtet worden. Das Studienpanel beinhaltet signifikant mehr Subtyp A und C sowie CRF02_AG und die seltenen CRF/URF.

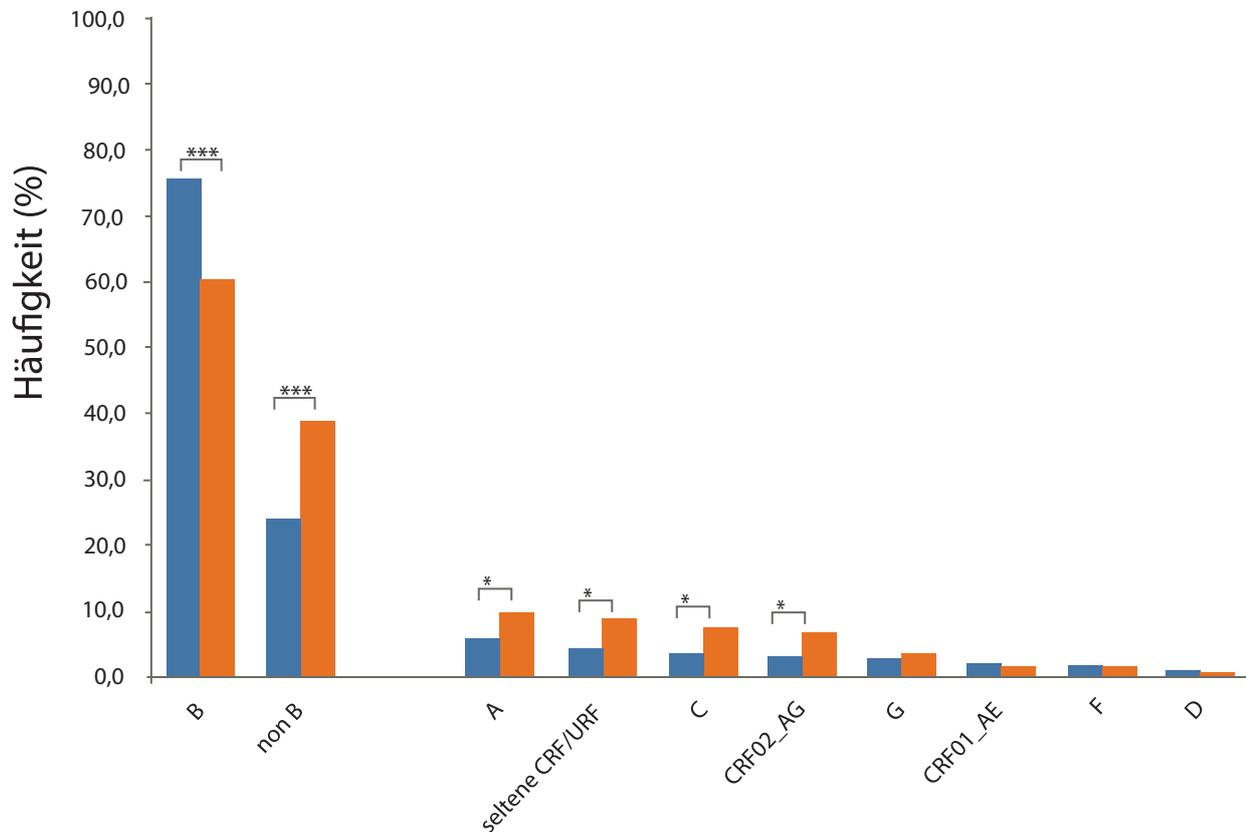


Abb. 32. Gegenüberstellung rezenter und länger bestehender HIV-1-Infektionen hinsichtlich der Subtypverteilung.

Rezente HIV-Infektionen sind in blau und länger bestehende in orange dargestellt. Unterschiede sind als „*“, „***“ und „****“ für signifikant ($p \leq 0,05$), sehr signifikant ($p \leq 0,01$) und hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

Der Vergleich der Anzahl und Verteilung der TDR bei frisch und länger HIV-Infizierten ist in Abb. 33 veranschaulicht. Bei den rezenten trägt ein großer Anteil resistente Virusvarianten in sich (10,7%) als bei den länger bestehenden (8,4%). Am häufigsten kommen bei den rezenten Infektionen NRTI (4,3%) auf zu gleichen Teilen NNRTI und PI (je 2,7%). Zwei bzw. mehrere Resistenzen konnten bei 0,8% (dual) bzw. 0,3% (multi) der Fälle festgestellt werden. Auch bei den lang bestehenden Infektionen sind die NRTI zusammen mit den NNRTI (je 3,1%) Grund für die meisten Resistenzen. Weniger häufig resultiert eine Resistenz aus den PI (0,9%). In 1,3% der länger bestehenden HIV-Infizierten zirkulieren zwei Resistenzen, jedoch konnte keine Multiresistenz im Studienpanel nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich von rezenten und länger bestehenden HIV-Infektionen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit von TDR -allgemein oder einzelne- gezeigt werden (Anhang 1).

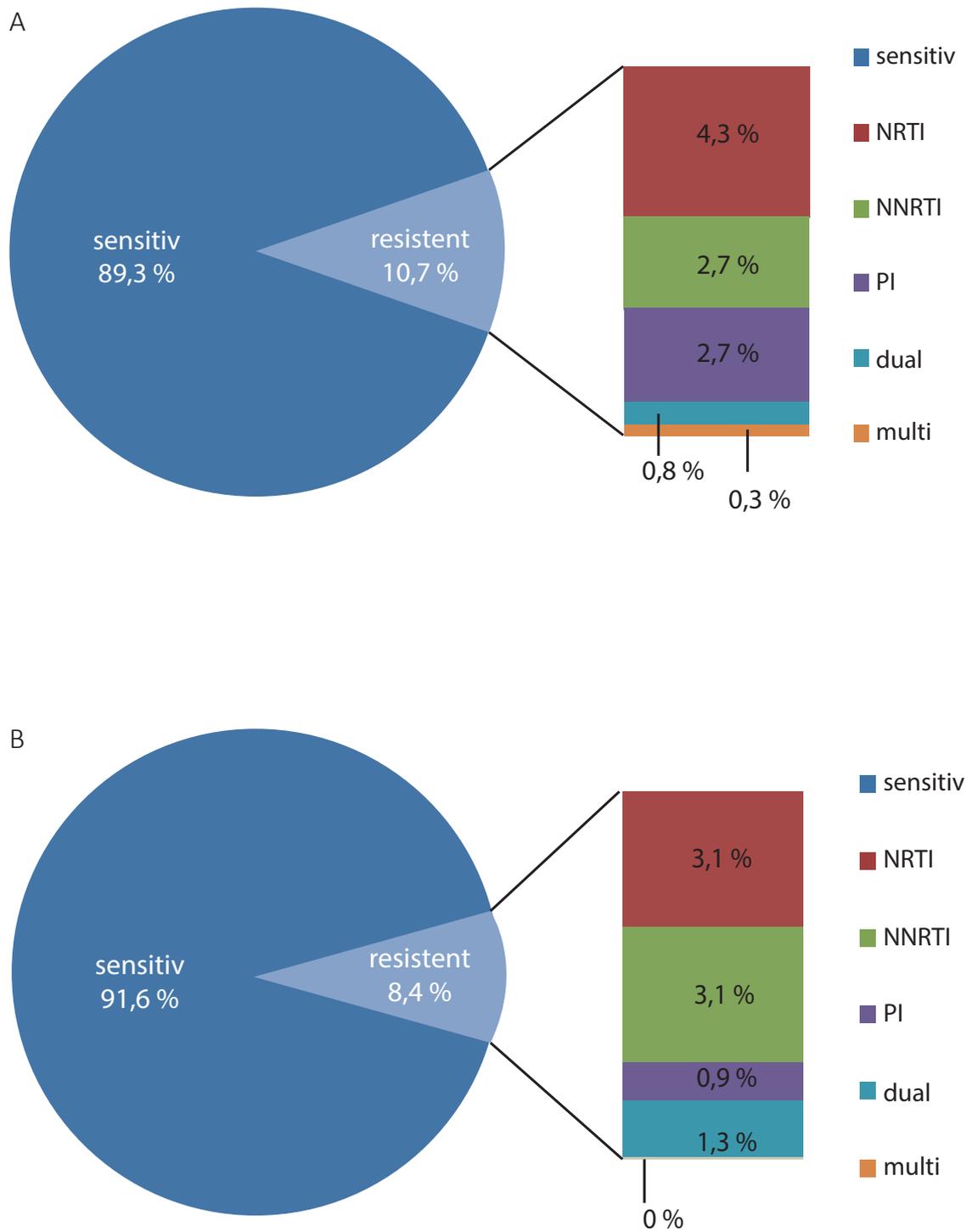


Abb. 33. TDR innerhalb der Gruppen der rezenten (A) und der länger bestehenden (B) HIV-1-Infektionen. Die Legende bezieht sich auf beide Abbildungen. Im Kreisdiagramm ist nur die Unterscheidung in sensitiv bzw. resistent vorgenommen. Im Balken daneben wurden die Resistenztypen genauer betrachtet.

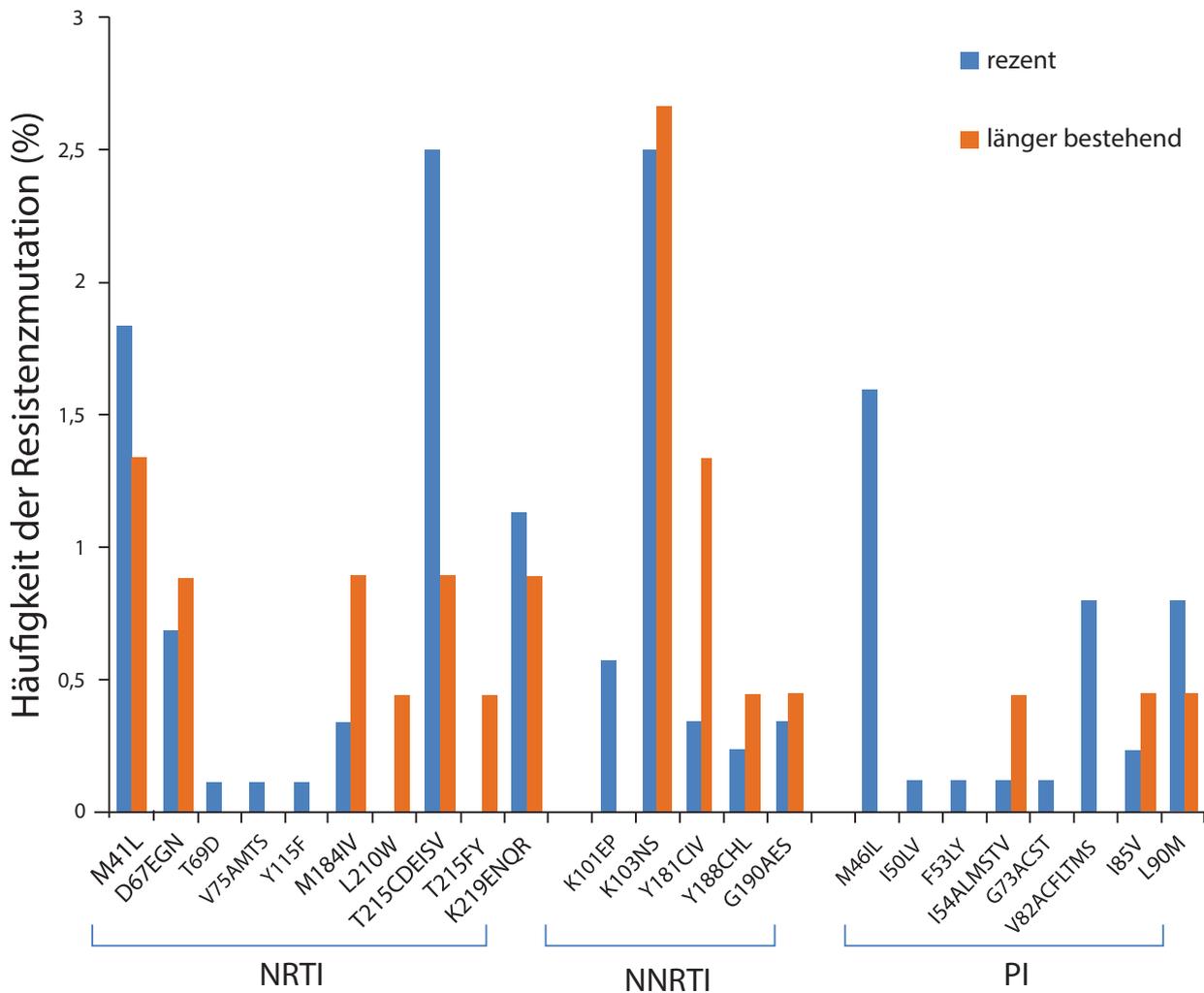


Abb. 34. Gegenüberstellung rezenter und länger bestehender HIV-1-Infektionen in Bezug auf die Häufigkeiten für Resistenzmutationen innerhalb der Wirkstoffklassen NRTI, NNRTI, PI.

Gesamtzahl der Resistenzmutationen bei rezenter Infektionen n= 27 (NRTI: 13, NNRTI: 11, PI: 3).

Gesamtzahl der Resistenzmutationen bei länger bestehenden Infektionen n= 27 (NRTI: 60, NNRTI: 35, PI: 34).

Insgesamt sind keine großen Unterschiede bei den entstandenen Resistenzmutationen für die NRTI und die NNRTI zwischen den rezenter und den länger bestehenden Infektionen zu entdecken. Bei den PI hingegen ist bei den rezenter Infektionen eine größere Anzahl an Resistenzmutationen zu verzeichnen. Außerdem wurden verhältnismäßig höhere Resistenzlevel erreicht (Abb. 34).

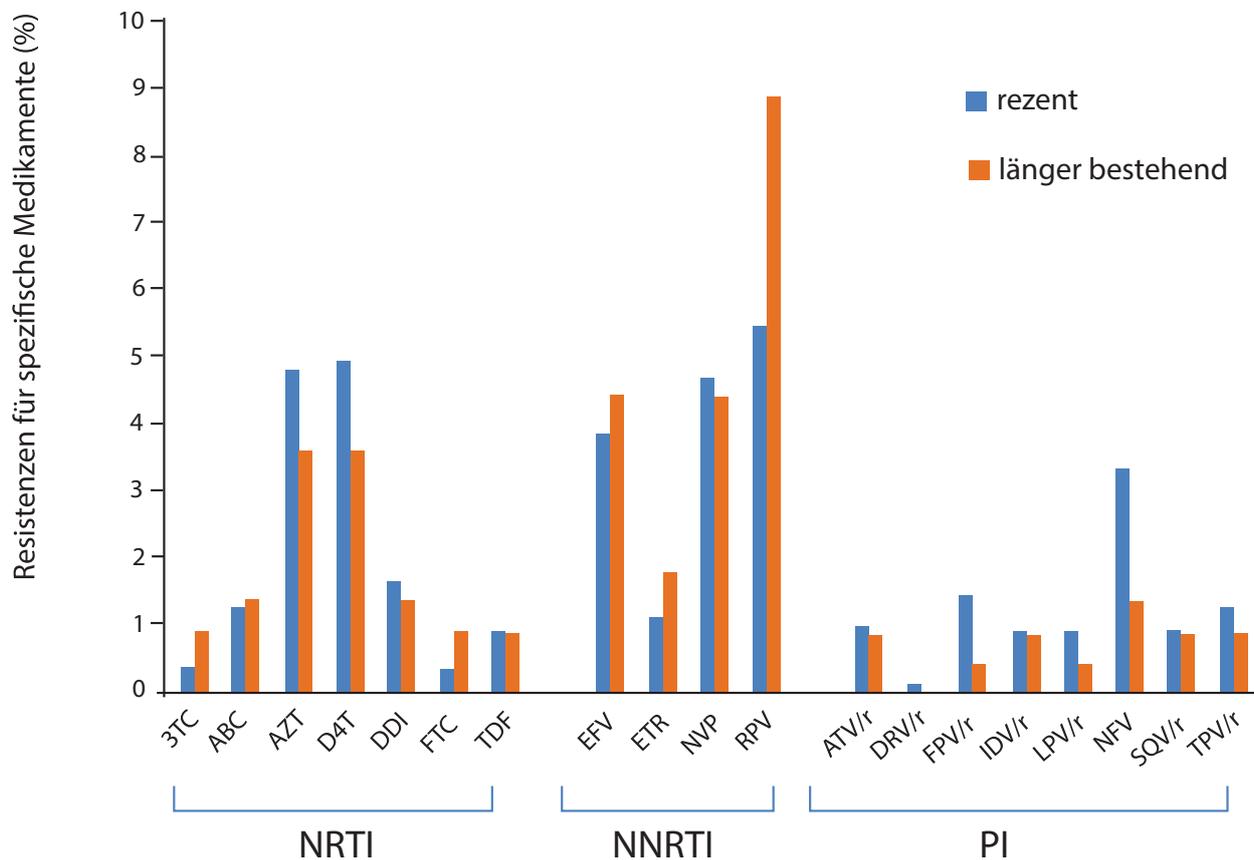


Abb. 35. Gegenüberstellung rezenter und länger bestehender HIV-1-Infektionen in Bezug auf die Häufigkeiten für Medikamentenresistenzen innerhalb der Wirkstoffklassen NRTI, NNRTI und PI. Resistenzvorhersage entsprechend dem SIR-Algorithmus der Stanford University: intermediäre und hohe Resistenzlevel sind zusammengefasst. Schwache und potentiell schwache Level sind nicht angegeben

Resistenzvorhersage entsprechend dem SIR-Algorithmus der Stanford University: intermediäre und hohe Resistenzlevel sind zusammengefasst. Schwache und potentiell schwache Level sind nicht angegeben.

Für NRTI und NNRTI ähneln sich die Anteile der Medikamentenresistenzen, während PI-Resistenzen häufiger bei der Gruppe der rezenter zu beobachten sind (Abb. 35).

5.6 Vergleich der Klassifikationen von lang bestehenden HIV-Infektionen durch den BED-CEIA und den Dual Assay Algorithmus

Aus dem Untersuchungszeitraum (15. Oktober-31. Dezember 2014) konnten zusätzlich 299 Proben von 335 rezenter Infektionen (bestimmt durch den BED-CEIA) mit dem BioRad nachuntersucht werden. Von 75 rezenter Infektionen (laut BED-CEIA) wurden 15 Proben durch den DAA als späte Diagnosen klassifiziert. Dies bedeutet, dass der BED-CEIA 20% der Proben (15/75) anders bestimmt hat. Alle Proben des Studienpanels (n=225) sind im Vorfeld vom BED-CEIA als long term klassifiziert worden. 21/225 davon wurden mittels DAA jedoch als rezent eingestuft; dies entspricht einer Abweichung von 9,3%.

Um zu sehen inwiefern sich die unterschiedlichen Klassifikationen von BED-CEIA und DAAs auf die Zusammensetzung der untersuchten Studienpanels auswirken, wurden beide Methoden gegenübergestellt (Abb. 36).

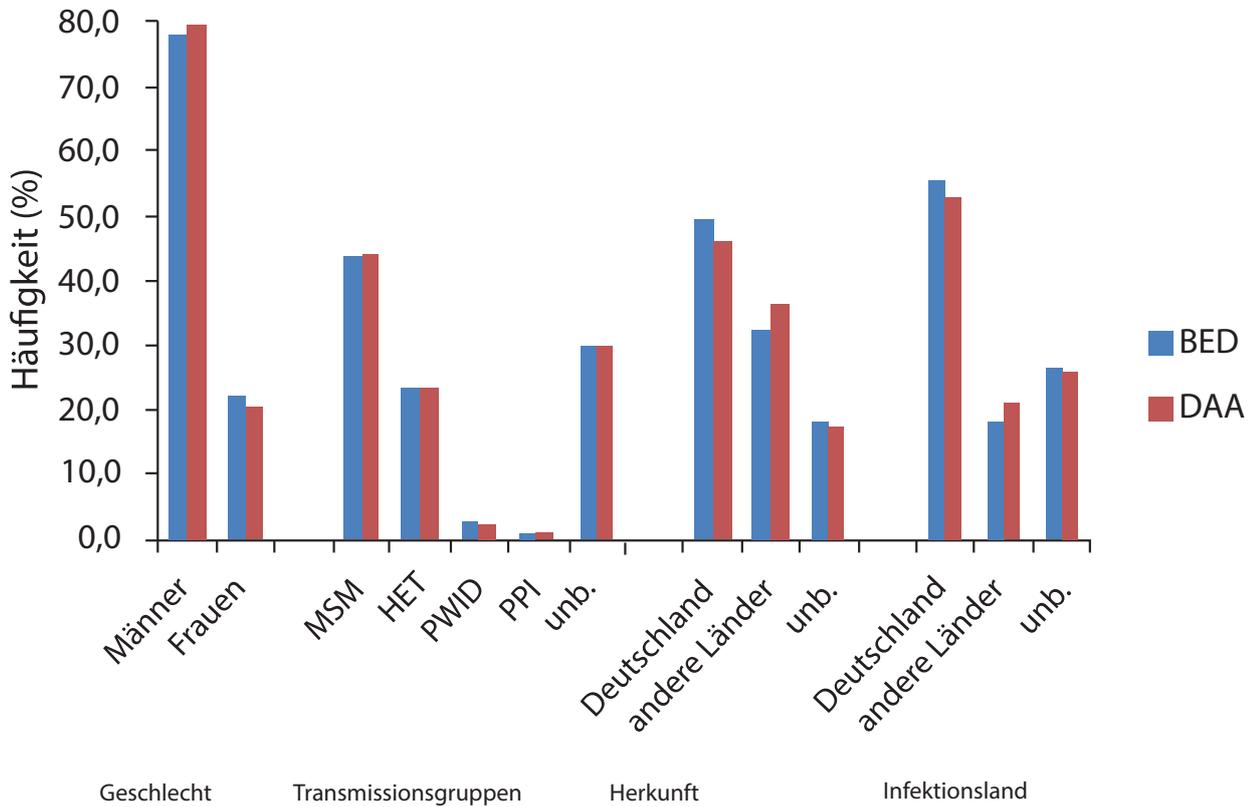


Abb. 36. Gegenüberstellung der länger bestehenden HIV-1-Infektionen in Bezug auf Geschlechterverteilung, Risikogruppen, Herkunft und Infektionsland eingeteilt durch den BED-CEIA und den DAA. Gesamtprobenzahl für den BED: n= 225 und den DAA: n= 219.

Beide Abbildungen (Abb. 36; Abb. 37) zeigen bei Betrachtung der Geschlechter- und Subtypverteilung sowie in Bezug auf TDR, Herkunft und Infektionsland keine signifikanten Unterschiede auf.

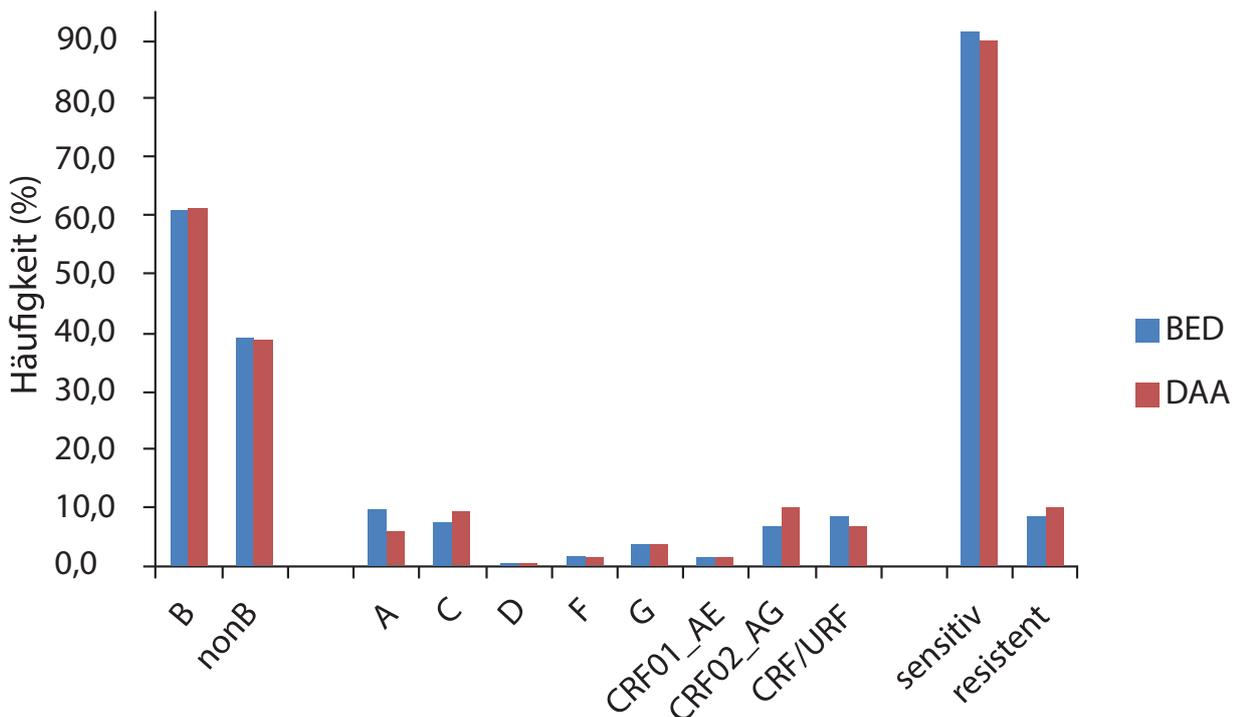


Abb. 37. Gegenüberstellung der länger bestehenden HIV-Infektionen in Bezug auf Subtypverteilung und Resistenz eingeteilt durch den BED-CEIA und den DAA. Gesamtprobenzahl für den BED: n= 225 und den DAA: n= 219.

6 Diskussion

6.1 Studienpanel und Repräsentativität

Eine repräsentative Anzahl von 286 filtergetrockneten Blutproben von chronischen HIV-Neudiagnosen (Untersuchungszeitraum 15.10-31.12.2014) wurden für diese Pilotstudie ausgewählt. Von diesen konnten 226 Proben erfolgreich genotypisiert werden. Gründe für den Probenausfall waren: zu wenig Ausgangsmaterial (weniger als vier Filterspots), zu geringe Viruslast (<1000 Kopien/ml), zu wenig PCR-Produkt, nicht direkt auswertbare Sequenzen und Doppelmeldungen. Da den einsendenden Laboren nur das restliche Serum von HIV-Neudiagnosen zur Verfügung stehen, war z.T. nicht die notwendige Menge an Probenmaterial vorhanden. Zu geringe Viruslasten waren meist mit Versagen der *2pol*-RT-PCR verbunden. Ursache dafür können auch längere Transportzeiten bei Raumtemperatur gewesen sein, die zur Degradation der RNA und somit zu falsch-negativen PCR-Ergebnissen führt. War die Menge des PCR-Produktes für die Sanger-Sequenzierung zu gering, oder die Sequenzqualität nicht ausreichend, wurde die Probe ebenfalls ausgeschlossen. In einem Fall wurde bei der phylogenetischen Analyse eine zweite, identische Sequenz festgestellt. Bei Proben mit identischem Geburtsdatum und Herkunftsort (im Meldebogen als 3-stellige Postleitzahl angegeben), wurde von einer Doppelmeldung ausgegangen. Dementsprechend wurde nur eine von beiden in die Auswertung mit einbezogen. Anonyme Doppelmeldungen werden normalerweise bei den Meldungen mit Hilfe von mehreren Indikatoren, welche im vorliegenden Fall nicht vollständig waren, identifiziert.

Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass weder bei den rezenteren noch bei den länger bestehenden Infektionen Verzerrungen durch Probenausfall entstanden waren. Laut Poweranalyse war mit der untersuchten Probenanzahl eine Bestimmung der Prävalenz von non-B Subtypen und TDR mit einem 90%-igem bzw. 95%-igem Konfidenzniveau möglich. Sowohl die Probenzahl als auch die Zusammensetzung der Transmissionsgruppen war repräsentativ.

Für den gleichen Untersuchungszeitraum wurden 170 DSS rezenter Infektionen im Rahmen der Inzidenzstudie untersucht.

6.2 Charakteristika der Studienpopulation

Das Studienpanel bestand hauptsächlich aus Männern (78%); auch unter den Transmissionsgruppen waren MSM mit 43% am häufigsten vertreten. Unter den gesamten gemeldeten Neudiagnosen in Deutschland bilden die MSM zahlenmäßig ebenfalls die größte Transmissionsgruppe von HIV (Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 27, 6. Juli 2015).

Die häufigsten Herkunftsländer spät diagnostizierter Personen waren Deutschland mit ca. 50%, Afrika (17%) und Ost- und Zentraleuropa (3,6% und 4,4%). Als Orte der Infektion wurde Deutschland mit über 55% angegeben, Afrika mit 11% während in anderen Ländern nur sehr selten (<6%) Infektionen stattfanden. Höhere Anteile an länger bestehenden Infektionen in Deutschland als bei Deutschen lassen darauf schließen, dass sich auch hier lebende Ausländer (Afrika, Ost- und Zentraleuropa) in Deutschland infiziert haben müssen. Aus anderen europäischen Ländern wurde ebenfalls berichtet, dass HIV-Infektionen häufig durch Kontakte innerhalb sogenannter Communities erfolgen z.B. Treffen von Migranten mit eigenen Landsleuten im jeweiligen Aufenthaltsland (Abecasis et al., 2013).

6.3 HIV-Subtypen und übertragene Resistenzen bei spät diagnostizierten HIV-Infektionen

Im Studienpanel waren 60% der Infektionen durch Subtyp B und 40% durch non-B Subtypen verursacht. Höchste Anteile wiesen die Subtypen A (7%), und C (8%) und die CRF02_AG (10%) auf, die vor allem in Osteuropa und Afrika prävalent sind (Hemelaar et al., 2006). Es wurden aber auch Infektionen mit den Subtypen D, G, F sowie den unterschiedlichsten CRF und einiger URF identifiziert. Die Transmissionswege für die jeweiligen HIV-Subtypen sind unterschiedlich: Während Subtyp B größtenteils unter MSM übertragen wird, werden der Subtyp C und CRF_02AG meist durch heterosexuelle Kontakte übertragen. Die Subtypen A und G zirkulieren am häufigsten unter den PWID oder wurden durch heterosexuelle Kontakte weitergegeben. Diese Ergebnisse stimmen mit den bekannten Länder-/Regionstypischen Transmissionsrouten überein: 1) Subtyp B ist vor allem in Westeuropa und den USA prävalent, wo für die MSM das höchste Infektionsrisiko besteht, 2) Subtyp A ist in Osteuropa prävalent und wird auch dort hauptsächlich über die PWID und heterosexuelle Kontakte verbreitet und 3) Subtyp C und CRF02_AG sind prävalent in Afrika, wo hauptsächlich ein heterosexuelles Transmissionsrisiko vorliegt.

Bei detaillierter Analyse der HIV-1 non-B-Infektionen waren signifikant häufiger 1) Frauen als Männern, 2) Personen mit heterosexuellen Kontakten als MSM, 3) Personen nicht-deutscher Herkunft als Deutsche und 4) Personen mit Infektionen außerhalb Deutschlands versus Personen mit Infektionen in Deutschland betroffen. Die non-B-Infektionen bei Frauen waren fast ausschließlich bei Migrantinnen (n=32 vs. Deutsche n=2) und hier v.a. bei Afrikanerinnen (n=23) zu finden, die sich in der Regel über heterosexuelle Kontakte (n=28) und größtenteils in Deutschland (n=8) oder Afrika (n=11) infiziert hatten. Ob sich Migrantinnen in Deutschland durch Kontakte mit Deutschen oder nicht-Deutschen (in den Communities mit Landsleuten) mit non-B Subtypen infiziert hatten, kann aus den Daten nicht abgeleitet werden.

Non-B-Infektionen den Männern hingegen betrafen sowohl die Migranten (n=24) wie aber auch die Deutschen (n=17). Die Infektionen wurden im Ausland (n=20) wie auch in Deutschland (n=16) erworben, sowohl über den heterosexuellen (n=17) als auch den homosexuellen Transmissionsweg (MSM, n=13). Ein bevorzugter Transmissionsweg ließ sich hier also nicht feststellen. Unter non-B-Infektionen bei Menschen deutscher Herkunft wurden mehr deutsche Männer als deutsche Frauen mit non-B Viren identifiziert.

Die Häufigkeiten der Subtypen innerhalb der Geschlechter und der Transmissionsgruppen lässt sehr ähnliche Anteile innerhalb der Gruppen „Frauen“ und „heterosexueller Kontakt“ und bei „Männern“ und „MSM“ erkennen, was auf eine enge Korrelation zwischen Geschlecht und den genannten Transmissionswegen spricht. Dies ist damit zu erklären, dass die Gruppe der Personen mit heterosexuellen Kontakten zum größeren Teil aus weiblichen Personen besteht. Heterosexuelle Männer waren ebenfalls etwas häufiger mit non-B Viren infiziert im Vergleich zu den MSM.

Die spät diagnostizierten HIV-Infektionen, ohne Angabe zum Transmissionsweg, wurden in der Gruppe der „unbekannten“ zusammengefasst. Ein Vergleich der Subtypverteilung in dieser Gruppe versus aller Personen mit bekanntem Transmissionsweg zeigt jedoch, dass die beiden Gruppen in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich waren und somit keine Verzerrung der Ergebnisse vorlag.

Übertragene Resistenz (TDR) wurden bei 8% der späten Diagnosen identifiziert. In den Subgruppen der Studienpopulation (Geschlecht, Transmissionsgruppe, Herkunft und Infektionsland) waren die Anteile nicht signifikant verschieden. Resistente Viren werden demnach in allen Subpopulationen gleichermaßen übertragen. Mit insgesamt 19 vorhergesagten übertragenen Resistenzen ist die Anzahl für statistische Analysen jedoch sehr klein.

Unter den TDR waren Resistenzen gegen NNRTI und NRTI (3,1%) gleich häufig vertreten. Die PI-Resistenzen machten bei chronischen Infektionen nur 1% aus. Die Prävalenz der PI-selektierten Resistenzmutationen war demzufolge gering und damit ebenso die Prävalenz der Medikamentenresistenzen gegen PI.

6.4 Gegenüberstellung von kürzlich erworbenen und länger bestehenden HIV-Infektionen

Vergleicht man die Gruppen rezente und lang bestehende Infektionen miteinander, sind die erst kürzlich Infizierten jünger und haben eine höhere CD4-T-Zellzahl sowie eine höhere Viruslast. Kurz nach Beginn einer HIV-Infektion ist die Viruslast generell hoch, weil sich der viral Setpoint noch nicht eingestellt hat. Die CD4-T-Zellzahl nimmt im Verlauf der Infektion ab und auch mit den Ergebnissen in dieser Arbeit zeigt sich, dass länger Infizierte geringere Werte bei der CD4-T-Zellzahl aufweisen.

Das Geschlechterverhältnis bei rezenten und Langzeit-Infektionen unterscheidet sich deutlich. Der Anteil der Frauen ist bei den späten Diagnosen doppelt so hoch. Auch der Anteil an Personen mit heterosexuellem Transmissionsweg ist höher, während der Anteil an MSM wesentlich geringer ist. Unter den länger infizierten Personen sind deutlich häufiger Migranten.

Risikofaktoren für späte Diagnosen aus dem Review von Adler et al. 2010 konnten trotz großer Varianz bei den Definitionen für den Begriff „späte Diagnose“ in den einzelnen Studien für die folgende drei Faktoren mit diesem Projekt bestätigt werden: nicht deutsche Herkunft, höheres Alter und heterosexueller Transmissionsweg. Zur Herkunft aus Gegenden mit geringer HIV-Prävalenz kann in dieser Arbeit bisher keine Angabe gemacht werden, da die Gegenden nicht ausgewertet wurden.

In Adlers Review sind Männer mit einer späten Diagnose assoziiert. In der vorliegenden Studie sind zwar auch Männern anteilmäßig häufiger unter den späten Diagnosen, in Abgrenzung zu den rezenten Infektionen sind es aber wiederum eher die Frauen, die sich erst spät in der Infektion testen lassen. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die genannten Subpopulationen gezielter über Testmöglichkeiten aufgeklärt werden müssten, um eine möglichst frühe Therapie zu erwirken.

Die Gegenüberstellung der Subtypen zeigte, dass der non-B Anteil bei den spät Diagnostizierten weit höher war als bei den rezent Infizierten. Grund dafür könnte wiederum der höhere Anteil an Migranten und Personen mit heterosexuellem Kontakt bei den späten Diagnosen, die mit den non-B Infektionen korrelieren. Statistisch konnten signifikant höhere Anteile für die Subtypen A, C, CRF_02AG und die seltene CRF/URF aufgezeigt werden.

TDR sind in beiden Gruppen mit ähnlichen Anteilen identifiziert worden. Tendenziell sind

bei den länger bestehenden Infektionen weniger PI assoziierte Resistenzen vorhanden, da diese in der Prä-cART Ära nicht zur Verfügung standen und lange Zeit in Ressourcenschwachen Regionen wie Subsahara Afrika oft aufgrund der höheren Kosten weniger Anwendung fanden. Im Studienpanel befinden sich mehr Personen nicht deutscher Herkunft als in der Gruppe der Rezenten, sodass dies eine Erklärung sein könnte.

Insgesamt sind die beschriebenen Unterschiede zwischen den rezenten und länger bestehenden HIV-Infektionen nicht signifikant, denn die Gesamtzahl an aufgedeckten Resistenzen war im Studienpanel recht klein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchung der länger bestehenden HIV-1-Infektionen als sinnvoll erachtet wird, da der Anteil der non-B Subtypen hier höher liegt als bei den rezenten Neudiagnosen. Die Analysen haben gezeigt, dass diese Infektionen mit non-B Subtypen auch teilweise bereits in Deutschland erfolgen, möglicherweise unter Migranten auf heterosexuellem Transmissionsweg innerhalb deren Communities. Folglich könnten also für diese Gruppen Präventionsmaßnahmen entwickelt werden. Die Identifikation seltener non-B Varianten ist zudem wichtig um HIV-Nachweismethoden anzupassen und die Sicherheit in der Diagnostik zu gewährleisten.

6.5 Bewertung der Ergebnisse unterschiedlicher Ansätze zur Inzidenztestung (BED-CEIA vs. DAA)

Die Klassifikation der HIV-Neudiagnosen erfolgte basierend auf den Ergebnissen des BED-CEIA allein und auf denen des Dual Assay Algorithmus (DAA). Für die Inzidenztestung mit dem BED-CEIA werden der HIV-spezifische IgG-Antikörpertiter in Proportion zum Gesamt-IgG in den Proben gemessen während der DAA auf zwei verschiedenen Testparametern (Antikörpertiter mit dem BED-CEIA und Antikörperavidität mit dem BioRad Aviditätstest) beruht. Eine Verbesserung der Testrichtigkeit für den DAA wurde von Han (2014) vor allem bei den rezenten Infektionen (signifikant kleinere FRR) gezeigt, während bei länger bestehenden Infektionen nur geringer Unterschiede in der FLTR beobachtet werden konnten.

Trotz bekannter Fehlerrate bei der Klassifikation des BED-CEIA wurden keine signifikanten Unterschiede in den Subgruppen der späten Diagnosen nach DAA-basierter Klassifizierung im Vergleich zur BED-CEIA-basierten Einteilung beobachtet. Eine detaillierte Analyse für die Subtypen scheint Unterschiede bei den non-B Subtypen A, CRF_02AG, C und den CRF/URF zu zeigen. Hohe FRR wurden auch bei Kassanjee et al. für die Subtypen A, D und C im BED-CEIA gezeigt. Um signifikante Unterschiede in Bezug auf die einzelnen Subtypen zu identifizieren, müsste eine größere Probenzahl untersucht werden.

Ob sich die Ergebnisse bei den rezenten Neudiagnosen durch Anwendung des DAA signifikant von denen des BED-CEIA unterscheiden, muss noch untersucht werden. Erst dann kann eine Entscheidung über eine Einführung des kosten- und zeitintensiveren DAA als Grundlage für die Inzidenzstudie getroffen werden.

7 Ausblick

Grundsätzlich wäre die Auswertung der Laborergebnisse mit vollständigeren Angaben für die epidemiologischen Daten auf dem gesetzlichen Meldebogen von den HIV-Infizierten wünschenswert. Eine zentrale elektronische Meldung wird voraussichtlich in den kommenden Jahren eingeführt, von der eine bessere Datenlage erwartet wird.

Für die Charakterisierung der lang bestehenden HIV-1-Infektionen ist eine größere Probenzahl von Vorteil, da die Fälle in den Subgruppen-Analysen für die Anwendung statistischer Tests zu gering war. Die Ergebnisse werfen folgende Fragen auf:

- Liegt der geringe Anteil an PI-Resistenzen am größeren Anteil an Migranten aus Ländern, in denen die Therapie mit PI bislang nicht zur Initialtherapie gehört?
- Können Risikogruppen identifiziert werden, die von gezielten HIV-Testangeboten zur früheren Diagnose und damit verbunden einem früheren Therapiebeginn profitieren würden?
- Können Risikogruppen identifiziert werden, die von gezielteren Präventionsmaßnahmen zur Eindämmung der HIV-Transmission profitieren würden?
- Zirkulieren spezielle non-B Subtypen in bestimmten länderspezifischen Communities?
- Werden Personen aus Regionen mit geringer HIV-Prävalenz häufiger spät getestet (Adler et al., 2009)?

Da aufgrund der Evaluationsergebnisse mit einer Verbesserung in der Richtigkeit der Klassifikation zu rechnen ist, sollte in einer weiteren Pilotstudie der Unterschied der Ergebnisse vom BED-CEIA und DAA detaillierter untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Van de Vijver DA, et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*. 2013;10:7. PubMed PMID: 23317093. PMCID: 3564855.

Adler A, Mounier-Jack S, Coker RJ (2009). Review: Late diagnosis of HIV in Europe: definitional and public health challenges. *AIDS Care* 2009;21:284-93.

Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B (2008) Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res* 6: 388-400.

Barre-Sinoussi, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 56, 126-129 (2004).

Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, Somogyi S, Kollan C, Jessen H, Dupke S, Hamouda O (2010) Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PLoS One*. 2010 Oct 7;5(10):e12718. doi: 10.1371/journal.pone.0012718.

Batzing-Feigenbaum, J. et al. Implications of and perspectives on HIV surveillance using a serological method to measure recent HIV infections in newly diagnosed individuals: results from a pilot study in Berlin, Germany, in 2005-2007. *HIV medicine* 10, 209-218 (2009).

Bennett DE et al. Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug-Resistance: 2009 Update *PLoS one* 4(3): e4724. 2009.

Brenner B, Routy JP, Quan Y, Moisi D, Oliveira M, et al. (2004) Persistence of multidrug-resistant HIV-1 in primary infection leading to superinfection. *Aids* 18(12):1653-1660.

Brookmeyer, R., Konikoff, J., Laeyendecker, O., Eshleman, S. H. Estiman of HIV Incidence Using Multiple Biomarkers. *American Journal of Epidemiology* 177(3), 264-272 (2012)

Charpentier C, Dwyer DE, Mammano F, Lecossier D, Clavel F, et al. (2004) Role of minority populations of human immunodeficiency virus type 1 in the evolution of viral resistance to protease inhibitors. *J Virol* 78: 4234-4247.

Cleland A, Davis C, Adams N, Lycett C, Jarvis LM, Holmes H, et al. Development of multiplexed nucleic acid testing for human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus. *Vox Sang*. 2001;81(2):93-101. PubMed PMID: 11555468.

Coffin JM (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267: 483-489.

Curtis KA, Kennedy MS, Charurat M, Nasidi A, Delaney K, et al. (2012) Development and

characterization of a bead-based, multiplex assay for estimation of recent HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28: 188–197

de Ronde A, van Dooren M, van Der Hoek L, Bouwhuis D, de Rooij E, et al. (2001) Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol* 75: 595-602.

Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, Version 1.0, 2014. (http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1/Deutsch_Osterreichische%20Leitlinien%20zur%20antiretroviralen%20Therapie%20der%20HIV_Infektion.pdf)

European AIDS Clinical Society (EACS):

- Guidelines Version 8.0, Oktober 2015, Initial Combination Regimen for ART-naïve Adult HIV-positive Persons; S. 9 (http://www.eacsociety.org/files/2015_eacsguidelines_8.0-english_revised-20151104.pdf)
- Guidelines Version 7.1 November 2014. European Guidelines for treatment of HIV-infected adults in Europe 2014; S. 87.

Erice A, Mayers DL, Strike DG, Sannerud KJ, McCutchan FE, et al. (1993) Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 328: 1163-1165.

Flys TS, Donnell D, Mwatha A, Nakabiito C, Musoke P, et al. (2007) Persistence of K103N-containing HIV-1 variants after single-dose nevirapine for prevention of HIV-1 mother-to-child transmission. *J Infect Dis* 195: 711-715

Frentz D, Van de Vijver DA, Abecasis AB, Albert J, Hamouda O, Jorgensen LB, et al. Increase in transmitted resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors among newly diagnosed HIV-1 infections in Europe. *BMC Infect Dis.* 2014;14:407. PubMed PMID: 25047543. PMCID: 4223652.

Hallett TB, Ghys P, Barnighausen T, Yan P, Garnett GP (2009) Errors in 'BED'-derived estimates of HIV incidence will vary by place, time and age. *PLoS One* 4: e5720.

Hallett, T.B. Estimating the HIV incidence rate: recent and future developments. *Current opinion in HIV and AIDS* 6, 102-107 (2011).

Han O (2014): Evaluation neuer Methoden zur HIV-Inzidenztestung (Bachelorarbeit)

Hargrove, J.W. et al. Improved HIV-1 incidence estimates using the BED-CEIA capture enzyme immunoassay. *AIDS (London, England)* 22, 511-518 (2008).

Hauser A, Hofmann A, Hanke K, Bremer V, Bartmeyer B, Kuecherer C, Bannert N (2015). National molecular surveillance of recently acquired HIV infections in Germany, 2013-2014. Zur Publikation eingereicht im August 2015.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*. 2006 Oct 24;20(16):W13-23. PubMed PMID: 17053344.

HIV Buch 2014/2015. Available: <http://www.aidsgesellschaft.info/news/14/66/HIV-Buch-2014-2015.htm>

Hu, D.J. et al. HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: use of the IgG capture BED enzyme immunoassay. *AIDS research and human retroviruses* 19, 727-730 (2003).

Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, et al. (2008) Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 5: e158

Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, Paredes R, Pillay D, et al. (2011) 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 19:156-164.

Kassanjee, R., McWalter, T.A. & Welte, A. Short Communication: Defining optimality of a test for recent infection for HIV incidence surveillance. *AIDS research and human retroviruses* 30, 45-49 (2014).

Kim, A.A. et al. Evaluating the BED capture enzyme immunoassay to estimate HIV incidence among adults in three countries in sub-Saharan Africa. *AIDS research and human retroviruses* 26, 1051-1061 (2010).

Laeyendecker, O. et al. Specificity of four laboratory approaches for cross-sectional HIV incidence determination: analysis of samples from adults with known nonrecent HIV infection from five African countries. *AIDS research and human retroviruses* 28, 1177-1183 (2012).

Laeyendecker O, Brookmeyer R, Cousins MM, Mullis CE, Konikoff J, et al. (2013) HIV incidence determination in the United States: a multiassay approach. *J Infect Dis* 207: 232–239

Laeyendecker O, Kulich M, Donnell D, Komarek A, Omelka M, et al. (2013) Development of Methods for Cross-Sectional HIV Incidence Estimation in a Large, Community Randomized Trial. *PLoS One* 8: e78818

Lecossier D, Shulman NS, Morand-Joubert L, Shafer RW, Joly V, et al. (2005) Detection of minority populations of HIV-1 expressing the K103N resistance mutation in patients failing nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38: 37-42.

Loschen, S. et al. Comparison of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1-specific immunoglobulin G capture enzyme-linked immunosorbent assay and the avidity index method for identification of recent HIV infections. *Journal of clinical microbiology* 46, 341-345 (2008).

Loubser S, Balfe P, Sherman G, Hammer S, Kuhn L, et al. (2006) Decay of K103N mutants in

cellular DNA and plasma RNA after single-dose nevirapine to reduce mother-to-child HIV transmission. *Aids* 20: 995-1002.

MacLeod IJ, Rowley CF, Thior I, Wester C, Makhema J, et al. (2010) Minor resistant variants in nevirapine-exposed infants may predict virologic failure on nevirapine-containing ART. *J Clin Virol* 48: 162-167.

Martinez-Picado J, Martinez MA. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: a view from the clinic and ex vivo. *Virus Res.* 2008 Jun;134(1-2):104-23. PubMed PMID: 18289713.

Masciotra S, D.T., Dobbs T, Candal D, Hanson D, Delaney K, Rudolph D, et al. Antibody avidity-based assay for identifying recent HIV-1 infections Based on Genetic Systems[™] 1/2 Plus O EIA [#937]. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, 2010, San Francisco, CA. (2010).

McDougal, J.S. et al. Comparison of HIV type 1 incidence observed during longitudinal follow-up with incidence estimated by cross-sectional analysis using the BED capture enzyme immunoassay. *AIDS research and human retroviruses* 22, 945-952 (2006).

Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, et al. (2009) Minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naive and -adherent patients. *Clin Infect Dis* 48: 239-247.

Neifer S, Somogyi S, Schlote F, Berg T, Poggensee G, et al. (2006) Persistence of a sexually transmitted highly resistant HIV-1: pol quasispecies evolution over 33 months in the absence of treatment. *Aids* 20: 2231-2233.

Palmer S, Boltz V, Martinson N, Maldarelli F, Gray G, et al. (2006) Persistence of nevirapine-resistant HIV-1 in women after single-dose nevirapine therapy for prevention of maternal-to-fetal HIV-1 transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7094-7099.

Pao D, Andradý U, Clarke J, Dean G, Drake S, et al. (2004) Long-term persistence of primary genotypic resistance after HIV-1 seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37: 1570-1573.

Parekh, B.S. et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS research and human retroviruses* 18, 295-307 (2002).

Poggensee G, Kucherer C, Werning J, Somogyi S, Bieniek B, Dupke S, et al. Impact of transmission of drug-resistant HIV on the course of infection and the treatment success. Data from the German HIV-1 Seroconverter Study. *HIV Med.* 2007 Nov;8(8):511-9. PubMed PMID: 17944684

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271: 1582-1586.

Robert-Koch Institut, *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 44 „Schätzung der Prävalenz und

Inzidenz von HIV-Infektionen in Deutschland“, 3. November 2014

Robert-Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 26 „Erkrankungen in Deutschland - Bericht zur Entwicklung im Jahr 2013 aus dem Robert Koch-Institut“, 30. Juni 2013

Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nr. 27 „HIV-Diagnosen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland - Bericht zur Entwicklung im Jahr 2014 aus dem Robert Koch-Institut“, 6. Juli 2015

Santiago, M.L. et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of virology* 79, 12515-12527 (2005).

Santos, A. F., and Soares, M. A. (2010) HIV Genetic Diversity and Drug Resistance, *Viruses* 2, 503-531.

Scheer, S. et al. Estimated HIV Incidence in California, 2006-2009. *PloS one* 8, e55002 (2013).

Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de Groot T, et al. (1999) Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol.* 37:2291-2296.

Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, et al. (2003) Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9: 727-728.

Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, Macarthur RD, et al. (2009) Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 199: 693-701.

Suligoj, B., Galli, C., Massi, M. Precision and Accuracy of a Procedure for Detecting Recent Human Immunodeficiency Virus Infections by Calculating the Antibody Avidity Index by an Automated Immunoassay-Based Method. *J Clin Microbiol.* 40(11), 4015-4020 (2002)

Surveillance, U.W.W.G.o.G.H.A.a.S. When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level. 2011. Available: http://www.who.int/diagnostics_laboratory/hiv_incidence_may13_final.pdf. (2011).

Thomas, H.I. et al. Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1. *Clinical and experimental immunology* 103, 185-191 (1996).

UNAIDS Reference Group on Estimates MaP (2005) Statement on the use of the BED assay for the estimation of HIV-1 incidence for surveillance or epidemic monitoring, Available: http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2006/statement_bed_policy_13dec05_en.pdf

UNAIDS 2013 Global Report Epidemiology Slides (2014). Available: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/01_Epi_slides_2014July.pdf

Wittkop L, Gunthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, de Luca A, et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011 May;11(5):363-71. PubMed PMID: 21354861

Yang WL, Kouyos RD, Boni J, Yerly S, Klimkait T, Aubert V, et al. Persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations associated with fitness costs and viral genetic backgrounds. *PLoS Pathog.* 2015 Mar;11(3):e1004722. PubMed PMID: 25798934. PMCID: 4370492.

Zu Knyphausen F, Scheufele R, Kucherer C, Jansen K, Somogyi S, Dupke S, et al. First line treatment response in patients with transmitted HIV drug resistance and well defined time point of HIV infection: updated results from the German HIV-1 seroconverter study. *PLoS One.* 2014;9(5):e95956. PubMed PMID: 24788613. PMCID: 4006817.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AI	Aviditätsindex
AIDS	engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome (erworbenes Immundefizienzsyndrom)
ART	antiretrovirale Therapie
AS	Aminosäure
as	engl. antisense
BED-CEIA-CEIA	engl. BED-CEIA-capture enzyme immunoassay (Rezenztest für Subtyp B, E, D)
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaare
C	Cutoff
ca.	circa
cART	engl. combined Anti-Retroviral Therapy (antiretrovirale Kombinationstherapie)
CDC	engl. Centers for Disease Control and Prevention
CRF	engl. circulating recombinant form (zirkulierende rekombinante Form)
DAA	engl. dual assay algorithm (Dual Assay Algorithmus)
DEA	Diethylamin
d.h.	das heißt
DPS/DSS	engl. dried plasma / serum spots (Filterspots mit getrocknetem Plasma/Serum)
DTT	Dithiothreitol
ELISA	engl. enzyme linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immunnachweis)
Engl.	englisch
Env	engl. envelope (Hüllglykoproteinkomplexe / Hüllproteine)
EtOH	Ethanol
Euro-O	Osteuropa
Euro-W	Westeuropa
Euro-Z	Zentraleuropa
evtl.	eventuell
FKS	fetales Kälberserum
FRR	engl. False-recent rate (Rate der falsch Rezenten)
Gag	engl. group-specific antigen
gp36	Glykoprotein 36
gp120	Glykoprotein 120
gp160	Glykoprotein 160
Häm	Hämophilie
HEP	Hepatitis
HET	heterosexuelles HIV-Transmissionsrisiko
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HTLV-III	Humanes T-lymphotrophes Virus Typ III
IgG/M	Immunglobulin G/M

inkl.	inklusive
IQR	engl. interquartile range (Interquartilbereich)
LTR	engl. Long terminal repeats
MAA	engl. Multiassay algorithm (Mutli Assay Algorithmus)
MDR	engl. Mean Duration of Recency (mittlere Infektionsdauer)
min	Minuten
MSM	engl. Men having sex with men (Männer, die mit Männern Sex haben)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NAT	Nukleinsäureamplifikationstest
NNRTI	Nicht nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
ODn	Optische Dichte, normalisiert
p24	Kapsidprotein des HIV-1
PBS	engl. phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	engl. Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PI	Protease-Inhibitoren
<i>pol</i>	DNA-Polymerase (HIV)
PPI	prä-/perinatal infizierte Kinder (Mutter-zu-Kind-Übertragung)
PR	Protease
PWID	engl. person who inject drugs (Personen, die intravenöse Drogen konsumieren)
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Reverse Transkriptase/Reverse Transkription
RTI	Reverse Transkriptase-Inhibitoren
s	engl. sense
sec	Sekunden
SDRM	engl. surveillance drug resistance mutations
SPREAD	engl. Strategy to Control the Spread of HIV-1
Tab.	Tabelle
TDR	engl. Transmitted drug resistance (übertragene Medikamentenresistenz)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRI	engl. test for recent infection (Rezenztest)
u.ä.	und ähnliche
unb.	Unbekannt
URF	engl. unique recombinant form (einmalig vorkommende rekombinante Form)
WHO	engl. World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WP	Waschpuffer
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Weltweite Subtypverteilung von HIV-1.....	7
Abb. 2. Verlauf einer HIV-Infektion ohne antiretrovirale Therapie.....	8
Abb. 3. Angriffsstellen verschiedener Wirkstoffklasse der ART im Replikationszyklus von HIV.....	12
Abb. 4. Schematischer Ablauf des BED-CEIA.....	22
Abb. 5: Schematischer Aufbau des MAA nach Brookmeyer et al., 2012.....	24
Abb. 6. Dual Assay Algorithmus zur Klassifikation von HIV-1-Infektionen nach Orjin Han (Bachelorarbeit, 2014).....	25
Abb. 7. Schema der RNA-Extraktion mittels NucliSense® easyMAG.....	25
Abb. 8. Schematischer Aufbau des HIV-Genoms.....	27
Abb. 9. Schema der Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Agencourt® AMPure XP.....	28
Abb. 10. Vergleich der Häufigkeit der Transmissionsgruppen im gesamten Studienpanel zu dem Untersuchungspanel.....	32
Abb. 11. Vergleich der Häufigkeit der Transmissionsgruppen für das Probenpanel des Untersuchungszeitraumen, das Probenpanel mit durchführbarer Extraktion und das Probenpanel nach erfolgreicher Genotypisierung.....	33
Abb. 12. Geschlechterverteilung im Probenpanel der länger bestehenden Infektionen (N=225).....	34
Abb. 13. Anteile der Risikogruppen im Studienpanel der länger bestehenden Infektionen (N=225).....	34
Abb. 14. Herkunft (A) und Land der Infektion (B) HIV-Infizierter Personen im Studienpanel (N=225).....	35
Abb. 15. Subtypverteilung im Studienpanel (N=225).....	35
Abb. 16. Verteilung innerhalb der non-B Subtypen (n=88) in Bezug auf Geschlecht, Transmissionsgruppe, Herkunfts- sowie Infektionsland.....	36
Abb. 17. Herkunft von Frauen und Männern mit Subtyp non-B-Infektionen.....	37
Abb. 18. Infektionsort von Frauen und Männern mit Subtyp non-B-Infektionen.....	37
Abb. 19. Anteile der Transmissionsgruppen bei Frauen und Männer mit Subtyp non-B-Infektionen.....	38
Abb. 20. Subtypverteilung innerhalb der Geschlechter und Transmissionsgruppen.....	38
Abb. 21: Anteile Risikogruppen innerhalb der einzelnen Subtypen.....	39
Abb. 22. Subtypverteilung für alle bekannten und unbekanntem Transmissionswege.....	40
Abb. 23. Verteilung der Primärresistenzen im Studienpanel (N=225).....	41
Abb. 24. Häufigkeit der Resistenzen in den Subgruppen Geschlecht, Transmissionsgruppe, Herkunft und Infektionsland.....	41
Abb. 25. Häufigkeiten der Resistenzmutationen pro Patient selektiert durch NRTI, NNRTI und PI.....	42
Abb. 26. Häufigkeiten der Resistenzen gegen spezifische Medikamente unterteilt nach Wirkungsgrad.....	43
Abb. 27. Charakterisierung rezenter und länger bestehender HIV-Infektionen in Bezug auf die Verteilung der Geschlechter, Transmissionsgruppen, Herkunfts- und Infektionsländer.....	44
Abb. 28. Vergleich der Geschlechterverteilung von rezenter (A) und long term (B) HIV-1-Infektionen.....	45

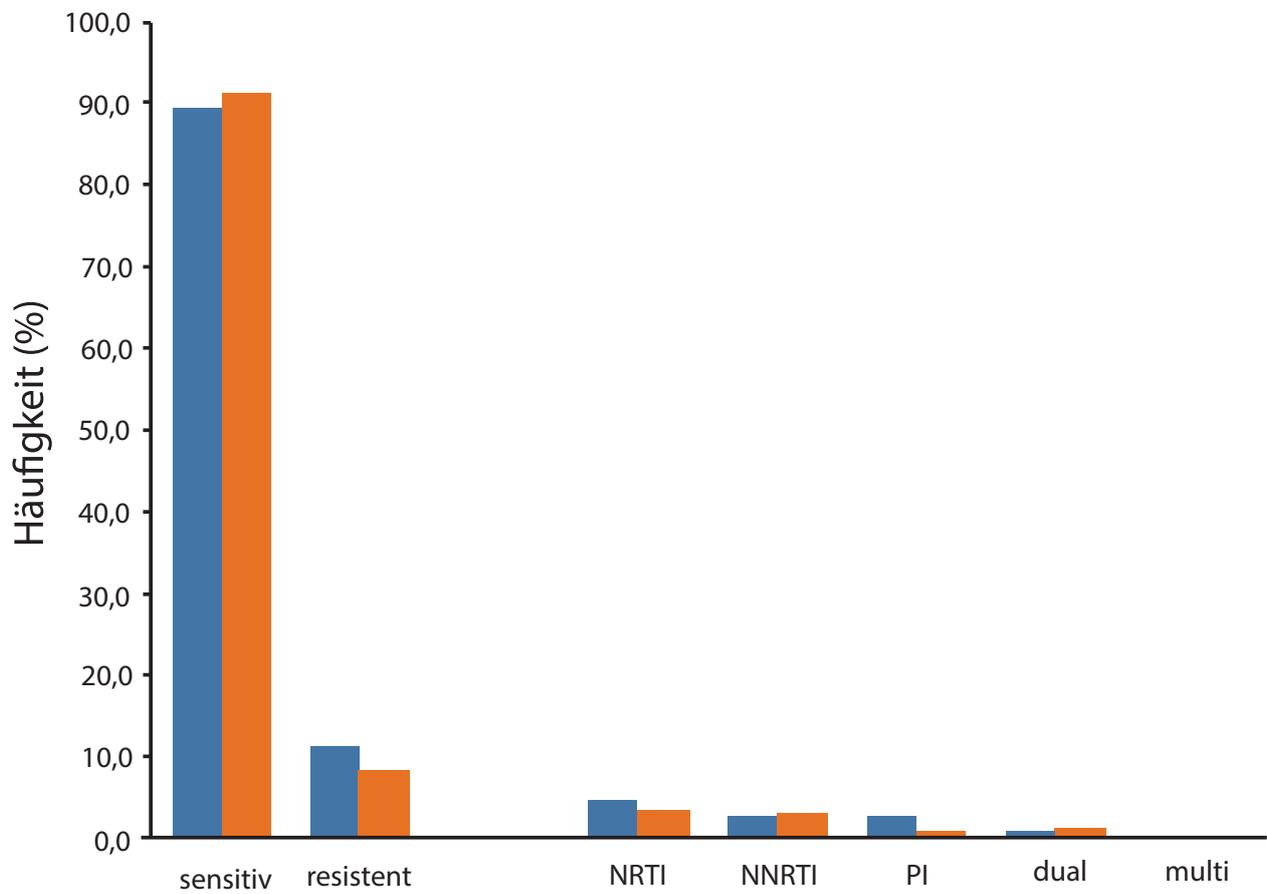
Abb. 29. Vergleich der Anteile der Risikogruppen von rezenten (A) und long term (B) HIV-1-Infektionen.....	45
Abb. 30. Gegenüberstellung der Herkunftsländer (oben) und der Infektionsländer (unten) der rezenten und long term HIV-1-Infizierten.....	45
Abb. 31. Gegenüberstellung der Subtypverteilung innerhalb der Populationen der rezenten (A) und der long term (B) HIV-Infektionen.....	46
Abb. 32. Gegenüberstellung rezenter und länger bestehender HIV-1-Infektionen hinsichtlich der Subtypverteilung.....	47
Abb. 33. TDR innerhalb der Gruppen der rezenten (A) und der länger bestehenden (B) HIV-1-Infektionen.....	48
Abb. 34. Gegenüberstellung rezenter und länger bestehender HIV-1-Infektionen in Bezug auf die Häufigkeiten für Resistenzmutationen innerhalb der Wirkstoffklassen NRTI, NNRTI, PI.....	49
Abb. 35. Gegenüberstellung rezenter und länger bestehender HIV-1-Infektionen in Bezug auf die Häufigkeiten für Medikamentenresistenzen innerhalb der Wirkstoffklassen NRTI, NNRTI und PI.....	50
Abb. 36. Gegenüberstellung der länger bestehenden HIV-1-Infektionen in Bezug auf Geschlechterverteilung, Risikogruppen, Herkunft und Infektionsland eingeteilt durch den BED-CEIA und den DAA.....	51
Abb. 37. Gegenüberstellung der länger bestehenden HIV-Infektionen in Bezug auf Subtypverteilung und Resistenz eingeteilt durch den BED-CEIA und den DAA. eingeteilt durch den BED-CEIA und den DAA.....	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Einteilung der HIV-Infektion des CDC in Bezug auf Laborparameter seit 2008.	11
Tab. 2. Reagenzienliste.	20
Tab. 3. Liste der Test Kits.	21
Tab. 4. Bezeichnung, Sequenz en, Hersteller und Versuche aller verwendeten Primer.	22
Tab. 5. Geräteliste.	23
Tab. 6. Reaktionsansätze für die Reverse Transkription und Amplifikation der <i>pol</i> -Fragmente.	28
Tab. 7. Protokolle für die Reverse Transkription und Amplifikation der <i>pol</i> -Fragmente. ...	29
Tab. 8. Reaktionsansatz für die Sequenzierung.	30
Tab. 9. Reaktionsansatz für die Reverse Transkription der RNA.	31
Tab. 10. Protokoll für die Reverse Transkription.	32
Tab 11. Reaktionsansatz für die Taq-Man PCR.	32
Tab. 12. Protokoll für die Taq-Man PCR.	32
Tab. 13. Gegenüberstellung von Alter, CD4-T-Zellzahl und Viruslast bei rezenten und länger bestehenden HIV-1-Infektionen.	46

Anhang

Anhang 1: Gegenüberstellung der TDR von rezenten (links) und langer bestehenden (rechts) HIV-Infektionen. Gekennzeichnet sind Unterschiede mit „*“, „**“ und „***“ für signifikant ($p \leq 0,05$), sehr signifikant ($p \leq 0,005$) und hoch signifikant ($p \leq 0,0001$).



Anhang 2: Liste der Resistenzmutationen in den Wirkstoffklassen nach Bennett (2009)

PI	NRTI	NNRTI
M46IL	M41L	L100I
I47AV	K65R	K101EP
G48V	D67GEN	K103NS
I50VL	T69D	V106AM
L53LVY	T69S_X (T69insertion)	V179F
I54ALMSTV	K70RE	Y181CIV
G73ACST	L74VI	Y188LHC
L76V	V75AMTS	G190AES
V82ACFLTMS	F77L	P225H
I84ACV	Y115F	M230L
I85V	F116Y	
N88DS	Q151M	
L90M	M184VI	
	L210W	
	T215CDEISV	
	T215YF	
	K219QENR	
	K219R	

Anhang 3: Liste antiretroviraler Medikamente gegliedert nach Wirkstoffklasse

Abkürzung	generischer Name	Handelsname	Zulassung EU	Zulassung USA	Firma
PI					
IDV	Indinavir	Crixivan		13.03.1996	Merck
NFV	Nelfinavir	Viracept		14.03.1997	AgouronPharmaceuticals
FPV	Fos am prenavir	Telzir/Lexiva	2004	20.10.2003	GSK
SQV	Saquinavir	Invirase	1995	1995	Hoffm Roche
LPV	Lopinvir	Kaletra/Aluvia		15.10.2000	Abbott
ATV	Atazanavir	Reyataz	2004	2003	BMS
TPV	Tipranavir	Aptivus		22.06.2005	Boehringer
DRV	Darunavir	Prezista		2006	Tibotec
NRTI					
AZT	Zidovudin	Retrovir	1987	1987	GSK
ddl	Didanosin	Videx	1991	1991	BMS
3TC	Lamivudin	Epivir	1996	1995	GSK
d4T	Stavudin	Zerit	1994	1994	BMS
ABC	Abacavir	Ziagen		1998	GSK
FTC	Emtricitabin	Emtriva		02.08.2004	Gilead
TDF	Tenofovir	Viread		2002	Gilead
NRTI					
ETR	Etravirin	Intelence	2008	18.01.2008	Tibotec Therapeutics
NVP	Nevirapin	Viram une XR	1996	21.06.1996	Boehringer Ingelheim
EFV	Efavirenz	Sustiva/Stocrin	1998	17.09.1998	BMS
RPV	Rilpivirin	Edurant	11_2011	20.05.2011	Tibotec Therapeutics
Booster					
RTV (r)	Ritonavir	Norvir	01.03.1996		Abbott

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen, die mich während der Anfertigung meiner Masterarbeit unterstützt haben, bedanken!

Herrn Prof. Dr. Bannert möchte ich danken für die Übernahme des Erstgutachtens und die Aufnahme in das FG 18. Ich bin sehr froh, dass es mir ermöglicht wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Kücherer meine Masterarbeit zu schreiben. Vielen Dank dafür und die freundliche Aufnahme ins gesamte Team! Frau Dr. Hauser möchte ich besonders danken: Als nächste Ansprechpartnerin stand sie mir jederzeit für Fragen zur Verfügung. Herzlichen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die Hilfe bei allen Belangen und die tolle Zusammenarbeit!

Auch bei Frau Prof. Dr. Arndt (Universität Potsdam) möchte ich mich für die Einwilligung zur Begutachtung meiner Abschlussarbeit danken.

Ganz lieben Dank gilt natürlich Frau Ewelina Caspers, die mich in die Methoden einführte, und bei Problemen alles stehen und liegen ließ, um herbei zu eilen. Frau Katrin Arndt danke ich ebenfalls für die Hilfe im Studienlabor (Haus 4). Für die Einführung in NGS möchte ich mich bei Frau Dr. Meixenberger bedanken. Natürlich möchte ich nicht die TAs des Sequenzierlabors vergessen. Ein großes Dankeschön an alle, denn ohne euch wären die ganzen Ergebnisse wahrscheinlich noch immer nicht da und zeitweise waren es so viele Proben, dass ich schon Beschwerden befürchten musste.

Auch denen, die mir -außer den bereits genannten Personen- während meines Aufenthalts mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich danken! Die Zeit am Robert Koch-Institut ist wie im Flug vergangen und ich werde sie in guter Erinnerung behalten!

