

Aus der Tropenmedizinischen Abteilung des Klinikums Würzburg Mitte gGmbH
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg
Chefarzt: Prof. Dr. August Stich

**Optimierung und Validierung einer qualitativen PCR-Minipool-Strategie
zum kombinierten Nachweis von virologischem Therapieversagen und
antiretroviralen Medikamentenresistenzen
bei HIV-1 positiven Patienten im südlichen Afrika**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Lukas Breunig
aus Lindau (Bodensee)

Würzburg, Oktober 2017

Referent:	Prof. Dr. August Stich
Korreferent:	Prof. Dr. Lars Dölken
Dekan:	Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2018

Der Promovend ist Arzt

“HIV is not only transmitted by sex. It is transmitted by sexism, racism, poverty and homophobia. If we are going to end AIDS, we must cure the disease in our hearts and minds first.”

Charlize Theron, United Nations Messenger of Peace
International AIDS Conference, Durban 2016

Diese Arbeit widme ich allen Menschen,
die von HIV und AIDS betroffen sind.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV)	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ursprung	1
1.1.3	Klassifizierung und geographische Ausbreitung.....	2
1.1.4	Aufbau und Lebenszyklus	3
1.1.5	Infektionswege	5
1.1.6	Verlauf der Infektion	5
1.1.7	Antiretrovirale Therapie und Therapiemonitoring.....	7
1.1.8	Virologisches Therapieversagen	9
1.2	HIV im südlichen Afrika	10
1.2.1	Epidemiologie	10
1.2.2	Antiretrovirale Therapie	11
1.2.3	Therapiemonitoring.....	12
1.3	Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit.....	13
1.3.1	Stellenwert des Viruslastmonitorings	13
1.3.2	Bedarf im südlichen Afrika	14
1.3.3	Konzept von Tilghman et al. 2012	15
1.3.4	Zielsetzung der Arbeit.....	17
1.3.5	Institutioneller Hintergrund	17
2	Material, Methoden, Projektaufbau und -durchführung	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Patientenproben.....	18
2.1.2	HIV-negatives Plasma	18
2.1.3	Kontrollen	19
2.1.4	Weitere Materialien	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Referenzmethode zur Viruslastbestimmung.....	19
2.2.2	Nukleinsäureextraktion	20
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	21
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese und Geldokumentation	25
2.2.5	DNA-Aufreinigung.....	26

2.2.6	Messung der DNA-Konzentration.....	26
2.2.7	Sequenzierung	26
2.2.8	Alignment, Sequenzanalyse und Resistenzinterpretation	28
2.3	Projektaufbau	28
2.3.1	Optimierung.....	28
2.3.2	Validierung.....	29
2.3.3	Ethische Klärung	29
2.4	Projektdurchführung.....	29
2.4.1	Optimierung der PCR für HIV-1 Subtyp C	29
2.4.2	Bestimmung des Detektionslimits der Nested-PCR	32
2.4.3	Minipool-Studie	33
2.4.4	Genotypische Resistenztestung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Bestimmung des Detektionslimits der Nested-PCR.....	35
3.1.1	Testung von Verdünnungsreihen	35
3.1.2	Probit-Analyse zur Bestimmung des Detektionslimits	36
3.2	Validierung der qualitativen PCR-Minipool-Strategie	37
3.2.1	Minipool-Studie	37
3.2.2	Genotypische Resistenztestung	40
4	Diskussion.....	41
4.1	Diskussion des Optimierungsprozesses.....	42
4.1.1	Optimierung der PCR für HIV-1 Subtyp C	42
4.1.2	Testung von Verdünnungsreihen und Probit-Analyse	44
4.1.3	Adaptation der analytischen Sensitivität	46
4.2	Diskussion der Testvalidierung	48
4.2.1	Studiendesign	48
4.2.2	Minipool-Studie	49
4.3	Limitationen und Stärken der Methode	52
4.3.1	Limitationen.....	52
4.3.2	Stärken.....	54
4.4	Aktuelle Entwicklungen und Ausblick.....	56
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literaturverzeichnis.....	62
7	Anhang: Materialtabellen	70

7.1	Kommerzielle Kits	70
7.2	Geräte	70
7.3	Reagenzien und Chemikalien.....	72
7.4	Verbrauchsmaterialien	72
7.5	Computersoftware.....	73
7.6	Online Datenbanken und Tools	73

Abkürzungen und Einheiten

AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (englisch: Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AZT	Zidovudin
bp	Basenpaare
CA	Kalifornien (englisch: California)
ca.	circa
CD4	Oberflächenprotein auf bestimmten Blutzellen (englisch: Cluster of Differentiation 4)
CD4+	CD4-positiv
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Komplementäre DNA (englisch: complementary DNA)
CMV	Cytomegalievirus
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
ddATP	Didesoxy-Adenosintriphosphat
ddGTP	Didesoxy-Guanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxy-Thymidintriphosphat
ddCTP	Didesoxy-Cytidintriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat

D4T	Stavudin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GC-Gehalt	Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin in einem DNA-Molekül
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HXB2	HIV-Referenzsequenz
IAPAC	International Association of Physicians in AIDS Care
INSTI	Integrasehemmer (englisch: Integrase Strand Transfer Inhibitor)
Kopien/ml	HIV-RNA Moleküle pro Milliliter
Kopien/Reaktion	HIV-RNA Moleküle pro Reaktionsansatz
Log ₁₀	Logarithmus zur Basis 10
m	Geradensteigung
ml	Milliliter
mol/l	Stoffmengenkonzentration Mol pro Liter
mmol/l	Millimol pro Liter
μmol/l	Mikromol pro Liter
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NHLS	National Health Laboratory Service
nm	Nanometer

NNRTI	Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NPV	Negativer prädiktiver Wert
NRTI	Nukleosidische/nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PI	Protease-Inhibitoren
PPV	Positiver prädiktiver Wert
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: revolutions per minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.u.	siehe unten
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
T _M	Schmelztemperatur (englisch: melting temperature)
UNAIDS	Gemeinsames Programm der Vereinten Nationen zu HIV/AIDS (englisch: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS)
US\$	US Dollar
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (englisch: United States of America)
V/cm	Volt pro Zentimeter
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organization)

w/v

Gewicht pro Volumen
(englisch: weight per volume)

z.B.

zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV)

1.1.1 Epidemiologie

In den frühen 1980er Jahren wurde das HI-Virus als auslösendes Agens der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert [2]. Seither beobachtete man die globale Ausbreitung der Infektion im Sinne einer Pandemie. Noch immer steigt die Zahl der mit einer HIV-Infektion lebenden Menschen stetig an, laut UNAIDS waren 2016 weltweit 36,7 Millionen Menschen betroffen. Seit etwa der Jahrtausendwende fällt die globale Inzidenz und beträgt aktuell etwa 1,8 Millionen Neuinfektionen pro Jahr. Die Zahl der AIDS-bedingten Todesfälle konnte seit ihrem Höchststand um das Jahr 2005 fast halbiert werden auf 1,0 Millionen im Jahr 2016.

Gut die Hälfte aller HIV-Infizierten leben im Osten und im Süden Afrikas. Allerdings sinkt in dieser Region die Zahl der Neuerkrankungen. Osteuropa und Zentralasien tragen mit 1,6 Millionen Betroffenen einen eher geringen Anteil der weltweiten HIV-Last. Doch stieg die Zahl der Neuinfektionen in dieser Region um 57 % zwischen 2010 und 2015 – so rasant wie in keiner anderen Region der Welt. [3-5]

In Deutschland lebten im Jahr 2015 85.000 Menschen mit HIV, die Anzahl der Neuinfektionen betrug 3.200 [6].

1.1.2 Ursprung

Das HI-Virus entwickelte sich aus dem Simian Immunodeficiency Virus (SIV), welches seit Jahrtausenden in afrikanischen Affenpopulationen endemisch ist [7]. Die speziesübergreifende Übertragung des SIV vom Affen auf den Menschen wird durch direkten Kontakt zu infiziertem Affenblut im Rahmen der Jagd und Verarbeitung von „Bushmeat“ erklärt. Durch die lange Tradition der „Bushmeat“ Jagd waren bestimmte Populationen Afrikas seit langer Zeit in engem Kontakt mit SIV, ohne dass sich epidemisches HIV entwickelte. Der Beginn der HIV-Epidemie wird in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts im westlichen Zentralafrika vermutet. [8-10]

Der Übergang von der individuellen menschlichen SIV-Infektion hin zur HIV-Epidemie erforderte die genetische Anpassung des Virus an den Menschen, z.B. durch die Überwindung von wirtsspezifischen Restriktionsfaktoren. Um die dafür nötigen Mutationen anzusammeln, muss sich das Virus in einem gewissen Ausmaß replizieren. Die Wahrscheinlichkeit einer Adaptation des Virus an den Menschen steigt durch Umstände, welche die Übertragung von Mensch zu Mensch begünstigen. [11]

Möglicherweise geben die Bedingungen, die im 20. Jahrhundert im kolonialen und postkolonialen Afrika herrschten, Antwort auf die Frage, warum HIV gerade in dieser Zeit epidemisch wurde. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang koloniale Praktiken, postkoloniale soziokulturelle Entwicklungen und iatrogene Übertragung durch massenhafte unsterile Injektionen. [9, 11-13]

1.1.3 Klassifizierung und geographische Ausbreitung

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) gehört zur Familie der Retroviridae und zur Gattung Lentivirus [14]. Es existieren zwei Spezies, HIV-1 und HIV-2. Beide Spezies werden in Gruppen unterteilt, wobei jede dieser Gruppen aus einer unabhängigen SIV-Übertragung auf den Menschen resultiert: HIV-1 Gruppe M, N, O und P und HIV-2 Gruppe A-H. HIV-1 Gruppe M ist der Verursacher der HIV-Pandemie und für den Großteil aller HIV-Infektionen verantwortlich, während HIV-1 Gruppe N, O und P sowie HIV-2 hauptsächlich auf West- und Zentralafrika begrenzt sind und mitunter nur wenige Menschen betreffen. Innerhalb der HIV-1 Gruppe M wiederum werden neun verschiedenen Subtypen (A–D, F–H, J, K) unterschieden, die Resultat der weiteren genetischen Diversifizierung des Virus im Verlauf der Epidemie sind. Rekombinanten zwischen verschiedenen Subtypen werden als Circulating Recombinant Forms (CRFs) bezeichnet. Die epidemische Verbreitung der Gruppe M nahm in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts ihren Ausgang im heutigen Kinshasa (Demokratische Republik Kongo). Es konnte gezeigt werden, dass dort bereits in den 1960er Jahren eine erhebliche genetische Diversität des Virus vorlag [15, 16]. Während der weltweiten Verbreitung innerhalb der nächsten Jahrzehnte kam es zu einer Reihe von Gründereffekten, sodass einzelne Subtypen sich in bestimmten Regionen der Welt vorrangig etablierten. [8, 11, 17, 18]

Abbildung 1 zeigt die geographisch stark unterschiedliche Verteilung der HIV-1 Subtypen aus Gruppe M und bezieht sich auf Daten, die von 2004-2007 erhoben wurden [19]. Die größte Diversität an Subtypen und CRFs findet man am Ausgangspunkt der HIV-Epidemie in Zentralafrika. Subtyp B dominiert auf dem amerikanischen Doppelkontinent, in West- und Zentraleuropa und in Australien, macht jedoch nur 11 % der Gesamtheit der HIV-Infektionen weltweit aus. Die Epidemie im südlichen Afrika, Äthiopien und Indien ist fast ausschließlich durch Subtyp C verursacht, der knapp die Hälfte aller HIV-Infektionen weltweit bedingt. [19-22]

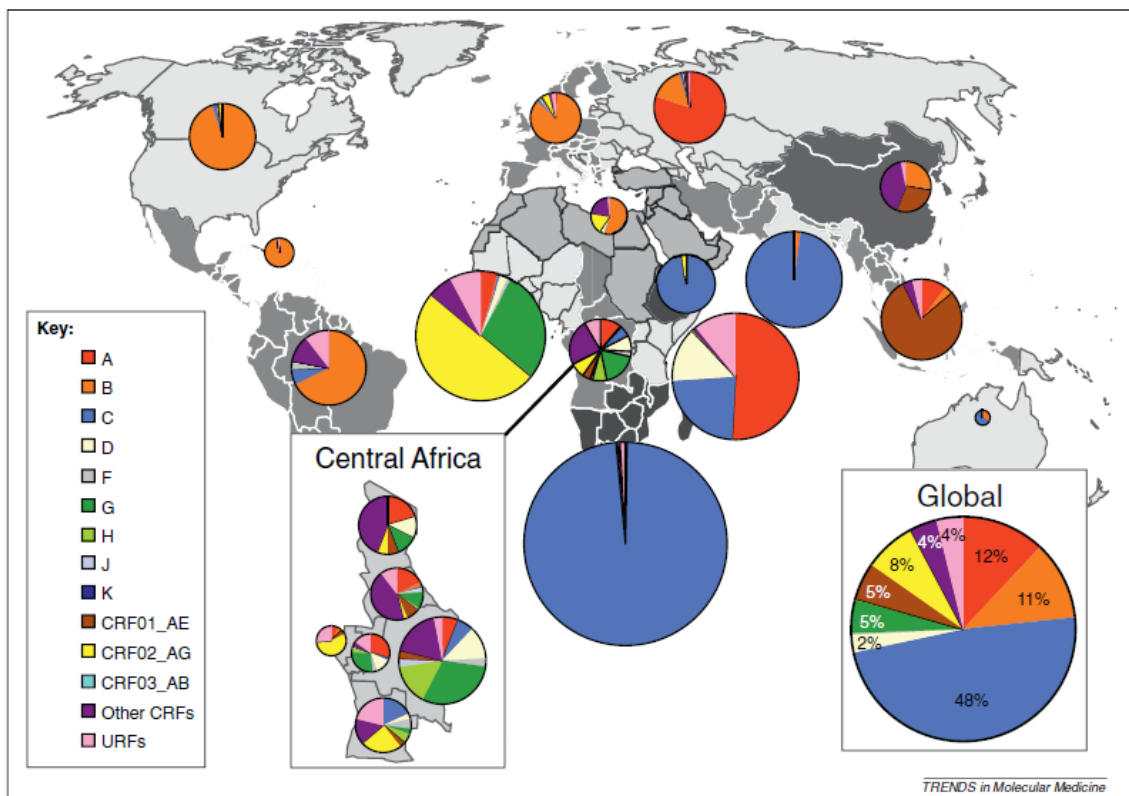


Abbildung 1: Globale Verteilung der HIV-1 Subtypen und CRFs. Die Tortendiagramme veranschaulichen die Verteilung verschiedener Subtypen und CRFs in einer Region, während sich die Größe der Kreise auf die Anzahl an HIV-Infizierten Menschen in den jeweiligen Regionen bezieht. Aus Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007*. *AIDS*, 2011 mit freundlicher Genehmigung von Hr. Hemelaar und Wolters Kluwer Health, Inc., Lizenznummer 3966160448936

1.1.4 Aufbau und Lebenszyklus

Das HI-Virion hat einen Durchmesser von 120 nm. Es ist von einer Lipidhülle umgeben, welche mit 72 Glykoproteinkomplexen besetzt ist. Diese Komplexe bestehen aus Trimeren des externen Glykoproteins gp120 und dem die Membran durchspannenden Protein gp41. Weiterhin können Wirtsproteine wie HLA-Proteine in der Lipidhülle

enthalten sein. An der Innenseite der viralen Lipidhülle sind die Matrixproteine verankert. Das Nukleokapsid beinhaltet zwei Kopien des viralen RNA-Genoms. Die einzelsträngige RNA befindet sich im Komplex mit weiteren Proteinen und Enzymen, darunter die Reverse Transkriptase. Das virale Genom verfügt über die Gene *gag* (group antigen), *pol* (polymerase), *env* (envelope) und weitere regulatorische Gene. Während *gag* für Strukturproteine und *env* für die Glykoproteine der Virushülle kodieren, beinhaltet *pol* die Informationen für die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. [14, 23]

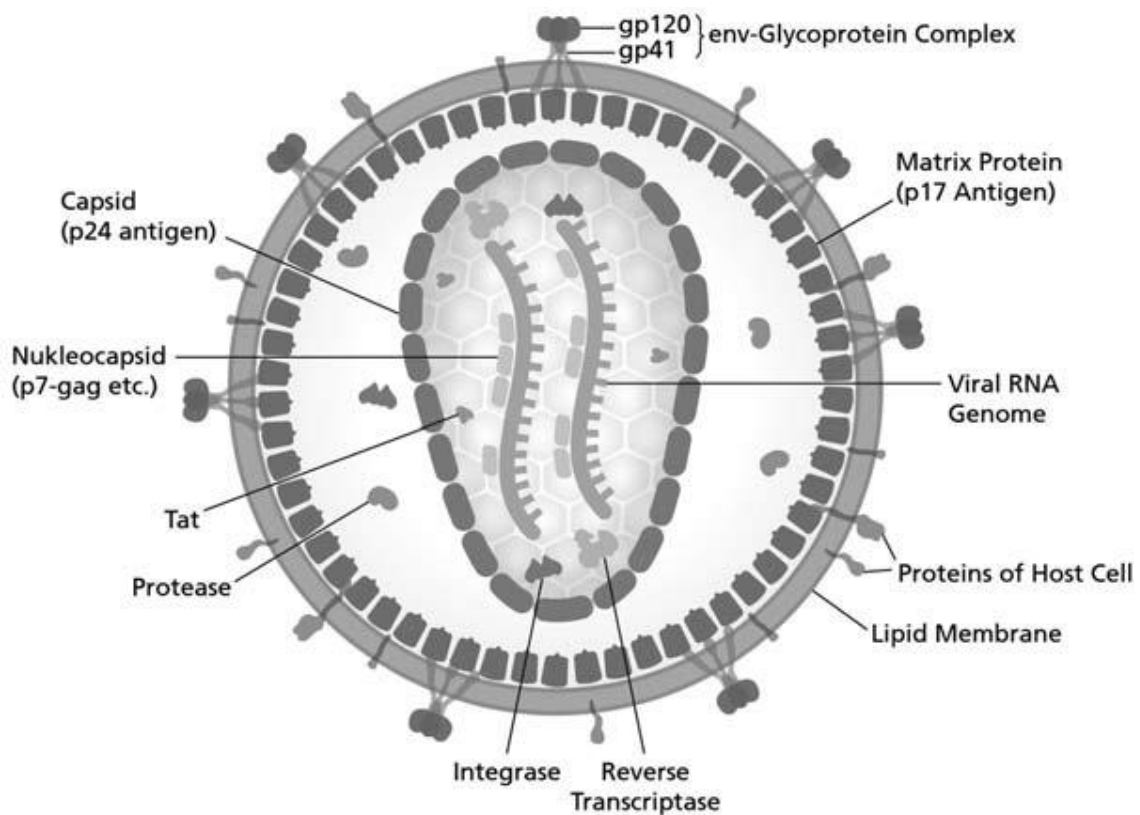


Abbildung 2: Aufbau des HI-Virions [aus: Hoffmann, Rockstroh, HIV 2015/2016, Medizin Fokus Verlag, 2015] mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Rockstroh

Das HI-Virion befällt hauptsächlich aktivierte CD4+ Lymphozyten, aber auch andere CD4+ Zellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mikroglia. Für die Fusion mit der Wirtszelle ist die Interaktion der Oberflächenstrukturen des Virions (gp120 und gp41) mit CD4 und Korezeptoren (CCR5 und CXCR4) auf der Oberfläche der Wirtszelle entscheidend. Im Zytoplasma schreibt das virale Enzym Reverse Transkriptase die virale RNA in provirale DNA um. Diese wird von der Integrase ins Wirtsgenom eingebaut. Nach Transkription und Translation werden die viralen Proteine durch das

Enzym Protease prozessiert, was notwendig für die Bildung neuer Viruspartikel ist. Strukturproteine, Enzyme und HIV-RNA formieren neue Viruspartikel, die durch Knospung (englisch: budding) aus der Wirtszelle entlassen werden. [14, 18, 23]

1.1.5 Infektionswege

Das HI-Virus kann sexuell, parenteral und vertikal übertragen werden [24]. Ungeschützter Geschlechtsverkehr mit einem HIV-positiven Partner ist die häufigste Ursache einer HIV-Infektion. Dabei beeinflussen die Viruslast des HIV-positiven Partners, die Sexualpraktik und eventuelle Vorschädigungen der Schleimhäute, z.B. durch andere Geschlechtskrankheiten, die Übertragungswahrscheinlichkeit. [25]

Das gemeinsame Benutzen von Injektionskanülen (needle sharing) beim intravenösen Drogenkonsum birgt eine hohe Übertragungswahrscheinlichkeit. Eine Infektion durch Blutprodukte ist selten in Ländern, in denen Blutspenden systematisch auf HIV getestet werden. Im medizinischen und paramedizinischen Bereich kann HIV durch perkutane Inokulation, z.B. im Rahmen einer Nadelstichverletzung übertragen werden. Das Risiko hierfür wird auf 0,3 % geschätzt. [5]

HIV kann von der Mutter auf ihr Kind in utero, während der Entbindung und durch das Stillen mit Muttermilch übertragen werden [26]. Ohne Intervention infizieren sich bis zu 40 % der Neugeborenen HIV-positiver Mütter. Durch geeignete Maßnahmen, z.B. die Kontrolle der Viruslast der Schwangeren durch antiretrovirale Therapie, konnte das Übertragungsrisiko auf 1-2 % gesenkt werden. [5, 14]

Werden Blut zu Blut Kontakte vermieden, stellen Alltagskontakte, z.B. zwischen Familien- oder Haushaltsmitgliedern, kein Übertragungsrisiko dar. Auch eine Übertragung über Insekten scheint nach derzeitigem Wissen nicht möglich zu sein. [5]

1.1.6 Verlauf der Infektion

In den ersten Wochen nach der Infektion mit HIV treten in einigen Fällen Symptome wie Fieber, Lymphknotenschwellungen und Hautausschläge auf [14]. Im Verlauf der folgenden Jahre sind die meisten Patienten asymptomatisch, während das Immunsystem sukzessive durch das Virus beeinträchtigt wird. Es können Infektionen wie orale Candidiasis, orale Haarleukoplakie oder Herpes Zoster auftreten. [5]

Sobald die CD4-Zellzahl unter 200/ μ l bzw. 14 % fällt, oder eine AIDS-definierende Erkrankung auftritt, ist gemäß der überarbeiteten CDC-Klassifikation das Stadium 3 der HIV-Infektion erreicht, das AIDS genannt wird. Zu den AIDS-definierenden Erkrankungen gehören opportunistische Infektionen wie CMV-Retinitis oder Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie, maligne Erkrankungen wie das Kaposi-Sarkom und HIV bedingte Leiden, z.B. die HIV-Enzephalopathie. [27]

AIDS-definierende Erkrankungen treten durchschnittlich 8-10 Jahre nach der Infektion auf und enden ohne Therapie in der Regel letal [5]. Zwei Laborparameter sind zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes von großer Bedeutung: Die Viruslast, also die Zahl an HIV-RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma, und die Zahl an CD4+ Lymphozyten pro μ l Blut [28]. Das Verhalten von Viruslast und CD4-Zellzahl im Verlauf der Infektion ist in Abbildung 3 dargestellt.

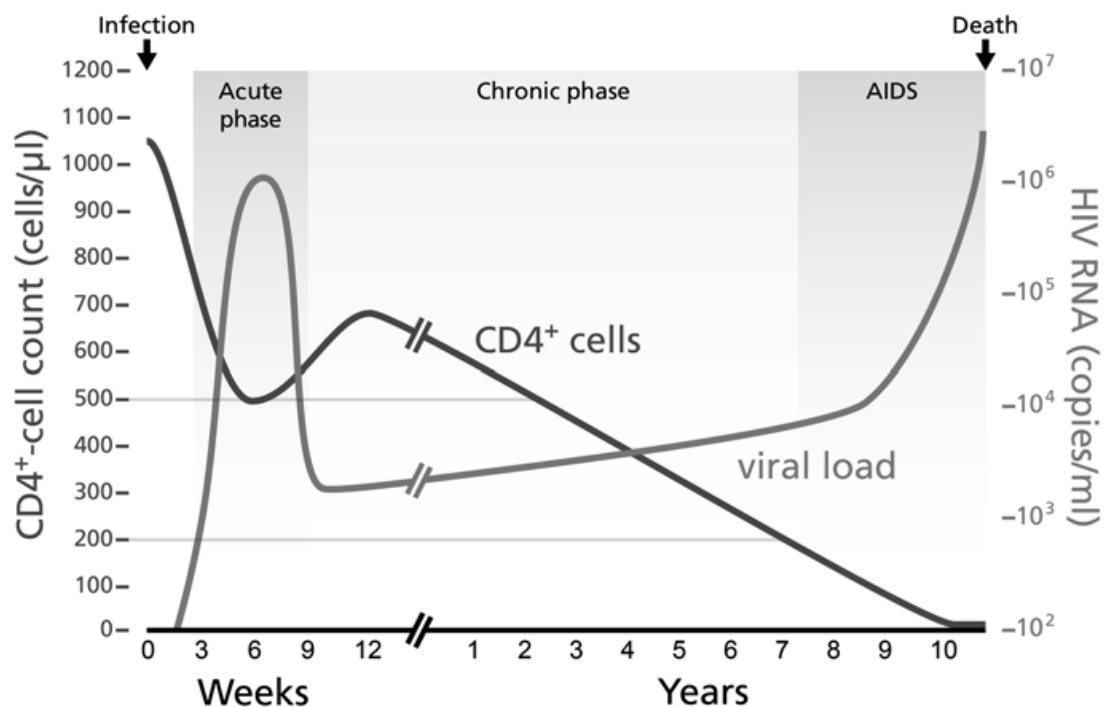


Abbildung 3: Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion [aus: Hoffmann, Rockstroh, HIV 2015/2016, Medizin Fokus Verlag, 2015] mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Rockstroh

Kurz nach der Infektion ist die Viruslast hoch, um dann mit Beginn der Immunantwort kontrolliert zu werden. Die CD4-Zellzahl fällt nach initialer Erholung kontinuierlich ab, was mit einem Wiederanstieg der Viruslast einhergeht. Im weiteren Krankheitsverlauf ist die Viruslast ein Prädiktor für die Geschwindigkeit des Krankheitsfortschritts,

während die CD4-Zellzahl Auskunft über die HIV-bedingte Immunsystemschiidigung gibt. [24, 28]

1.1.7 Antiretrovirale Therapie und Therapiemonitoring

Die antiretrovirale Therapie (ART) hat die HIV-Infektion vom Todesurteil in eine behandelbare chronische Infektionskrankheit verwandelt - den Zugang zur Therapie vorausgesetzt [24]. In den ausgehenden 1980er Jahren wurden die ersten Erfolge der antiretroviralen Monotherapie verzeichnet [29, 30]. Mitte der 1990er Jahre erkannte man die Notwendigkeit einer Dreifachkombination von Wirkstoffen für einen nachhaltigen Therapieerfolg [31, 32]. Die Zahl der Therapieempfänger betrug im Jahr 2000 weniger als eine Million Menschen und konnte bis zum Ende des Jahres 2016 auf weltweit 19,5 Millionen Menschen gesteigert werden – ein großer Erfolg im Kampf gegen HIV und AIDS [33, 34].

Heute stehen fünf Klassen antiretroviraler Wirkstoffe zur Verfügung, deren Angriffsziele der Viruseintritt (englisch: entry) in die menschliche Zelle sowie die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease sind:

(1) Nukleosidische/nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

NRTIs sind Analoga physiologischer Nukleotide. Mit diesen konkurrieren sie um den Einbau in die DNA, der durch das virale Enzym Reverse Transkriptase katalysiert wird. Einmal eingebaut verhindern sie den Anbau weiterer Nukleotide an die DNA und beenden somit die virale Replikation.

(2) Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

NNRTIs sind allosterische Inhibitoren der Reversen Transkriptase. Sie binden in einer hydrophoben Tasche nahe der Substratbindungsstelle der Reversen Transkriptase. Dies bewirkt eine Konformationsänderung und Inaktivierung des Enzyms.

(3) Protease-Inhibitoren (PI)

Durch die Hemmung des Enzyms Protease können virale Proteine nicht in ihre endgültige Form gespalten werden. Es entstehen nicht-infektiöse Viruspartikel.

(4) Integrase-Inhibitoren

Das virale Enzym Integrase vermittelt den Transfer der viralen DNA vom Zytoplasma in den Zellkern und deren Integration in das Wirtsgenom. Heutige Integrase-Inhibitoren greifen beim Strangtransfer ein und verhindern diesen. Sie werden als Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTI) bezeichnet.

(5) Entry-Inhibitoren

Entry-Inhibitoren beeinträchtigen auf verschiedene Weise den Eintritt des Virions in die Wirtszelle. Der Fusions-Inhibitor Enfuvirtide verhindert die gp41-vermittelte Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszelle. Der CCR5-Rezeptorantagonist Maraviroc verändert die Konformation des CCR5-Rezeptors auf den Wirtszellen. Dadurch behindert er die Bindung des viralen gp120 an die Zelle. [24, 35, 36]

Gemäß WHO-Definition versteht man unter antiretroviraler Therapie (ART) die Kombination von mindestens drei antiretroviral wirksamen Medikamenten zur Therapie der HIV-Infektion. Es handelt sich dabei um eine lebenslange Therapie, eine Eradikation des Virus ist mit heutigen Medikamenten nicht möglich [35]. Seit 2015 empfiehlt die WHO, ART bei jedem HIV-positiven Patienten unabhängig von der klinischen Symptomatik und der CD4-Zellzahl zu initiieren [37]. Als Erstlinientherapie sieht die WHO die Kombination zweier NRTIs mit einem NNRTI oder einem INSTI vor. Der Therapieerfolg kann nach virologischen, immunologischen und klinischen Kriterien beurteilt werden. Therapieziel nach virologischen Kriterien ist die Virussuppression, die laut WHO als Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze definiert ist. [38]

Die positiven Auswirkungen der Virussuppression sind vielfältig. Der Reduktion der Viruslast folgt die immunologische und klinische Besserung des Patienten, was die Viruslast zum wichtigsten Surrogat-Parameter des Therapieerfolgs macht [24]. Weiterhin minimiert eine konsequente Virussuppression das sexuelle und vertikale Übertragungsrisiko des Virus [39-43] und die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Medikamentenresistenzen (vgl. Absatz 1.1.8).

Dem Monitoring des Therapieerfolges durch die regelmäßige Viruslastbestimmung bei Patienten unter ART kommt eine große Bedeutung zu (vgl. Absatz 1.3.1). Die WHO

empfiehlt die routinemäßige Viruslastbestimmung für Patienten, die stabil unter ART sind, mindestens einmal jährlich [38]. In Deutschland sind Viruslastkontrollen alle zwei bis vier Monate empfohlen [44].

Die Prognose HIV-Infizierter unter ART ist gut. Unter optimalem Management der Infektion und in Abwesenheit weitere Risikofaktoren nähert sich die Lebenserwartung Betroffener an die der Allgemeinbevölkerung an. [35, 45-47]

1.1.8 Virologisches Therapieversagen

Die WHO definiert virologisches Versagen als eine Viruslast von über 1.000 Kopien/ml nach einer Therapiedauer von mindestens sechs Monaten [38]. Steigt bei Patienten unter ART die Viruslast, so kann das unterschiedliche Ursachen haben. Wichtige Gründe sind mangelnde Therapieadhärenz oder Resistenzen gegen die verwendeten Medikamente, aber auch Unterdosierung, Medikamenteninteraktionen, verminderte Absorption oder gesteigerte Metabolisierung der antiretroviralen Medikamente können eine Rolle spielen [44, 48].

Mangelnde Therapieadhärenz hat ernste Konsequenzen für HIV-Infizierte. Die unzureichende Suppression der viralen Replikation führt zu medizinischen Komplikationen und wirkt sich negativ auf die Prognose aus [49]. Beratungsgespräche zur Steigerung der Adhärenz hingegen zeigen einen positiven Effekt auf die Virussuppression. In einer Metaanalyse führte Adhärenzberatung bei Patienten mit erhöhter Viruslast unter ART in 70 % der Fälle zur erneuten Virussuppression. [50]

Auch bei der Entstehung von Medikamentenresistenzen spielt mangelnde Therapieadhärenz eine Rolle. Eine prospektive Kohortenstudie aus den USA kam zu dem Ergebnis, dass das Auslassen von 11-30 % der Medikamentendosen ein besonders hohes Risiko der Resistenzentwicklung birgt [51].

Bei der Resistenzentstehung ist die ausgeprägte Dynamik der HIV-Replikation von Bedeutung. Die Replikationsrate von HIV ist sehr hoch, in infizierten Individuen entstehen pro Tag bis zu einer Milliarde Viruspartikel [52]. Das im Replikationszyklus entscheidende Enzym Reverse Transkriptase besitzt keine Korrekturfunktion und erzeugt durchschnittlich einen Fehler pro 10.000 Basen [35]. Aus diesen Umständen resultiert ein hohes Maß an genetischer Diversität des Virus innerhalb eines Wirts. Mit

dem Beginn einer ART bekommen Virusmutanten mit Resistenzmutationen einen Selektionsvorteil. Ist die Virussuppression unzureichend, können diese Mutanten weiter replizieren und zusätzliche Resistenzmutationen ansammeln. Bei Verdacht auf Medikamentenresistenz kann durch eine genotypische Resistenztestung (siehe Absatz 2.2.7) das Vorliegen von Resistenzmutationen untersucht werden. Dem behandelnden Arzt hilft dies bei der Entscheidung, ob im Falle eines virologischen Versagens eine Umstellung der Therapie auf ein Zweitlinienregime notwendig ist. [17, 24, 35, 44, 53]

1.2 HIV im südlichen Afrika

1.2.1 Epidemiologie

Während HIV/AIDS in einigen Industrienationen ein eher marginales Gesundheitsproblem darstellt, ist es eine der häufigsten Todesursachen in Afrika [5].

Am härtesten betroffen ist die UNAIDS-Region südliches und östliches Afrika. Die Hälfte aller HIV-positiven Menschen lebt dort, während die Population dieser Region nur 6,2 % der Weltbevölkerung ausmacht [54]. Die höchsten HIV-Prävalenzen innerhalb dieser

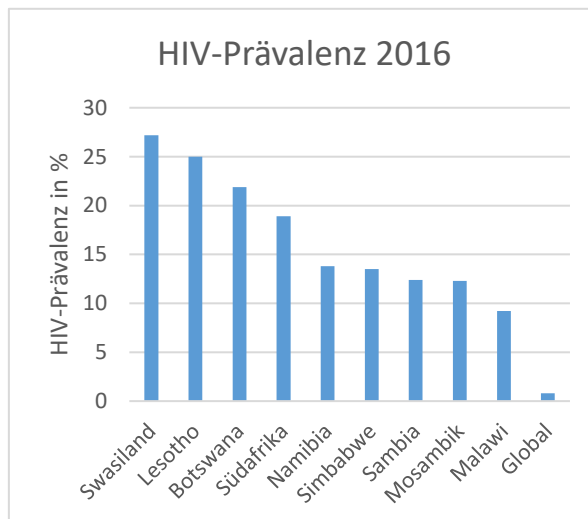


Abbildung 4: Die neun Länder mit den höchsten HIV-Prävalenzen im Jahr 2016. Daten heruntergeladen von <http://aidsinfo.unaids.org/>, Zugriff am 01.10.2017

Region wiederum findet man im Süden. Abbildung 4 zeigt neun Staaten mit den weltweit höchsten HIV-Prävalenzen im Jahr 2016, und im Vergleich dazu die globale HIV-Prävalenz. Alle dieser Länder sind Festlandstaaten im Süden Afrikas. Sie stehen in der vorliegenden Arbeit besonders im Fokus und werden fortan unter dem Begriff „südliches Afrika“ zusammengefasst. In diesen Hochprävalenzländern wird die HIV-

Epidemie fast ausschließlich durch HIV-1 Subtyp C verursacht, der für über 98 % der HIV-Infektionen im südlichen Afrika verantwortlich ist [19].

In den neun Staaten der Region südliches Afrika leben 13,5 Millionen Menschen mit HIV, 7 Millionen davon allein in der Republik Südafrika. 2016 verzeichnete die Region 540.000

Neuinfektionen und 270.000 AIDS-assoziierte Todesfälle. Die Zahl der AIDS-Waisen wird auf ca. 4 Millionen geschätzt. [55]

Einen Eindruck davon, wie massiv die Auswirkungen der HIV-Epidemie auf die Bevölkerung im Süden Afrikas waren und sind, vermittelt Abbildung 5. Sie zeigt die dramatische Reduktion der Lebenserwartung in den Ländern des südlichen Afrikas im Verlauf der Epidemie von 1960 bis 2014.

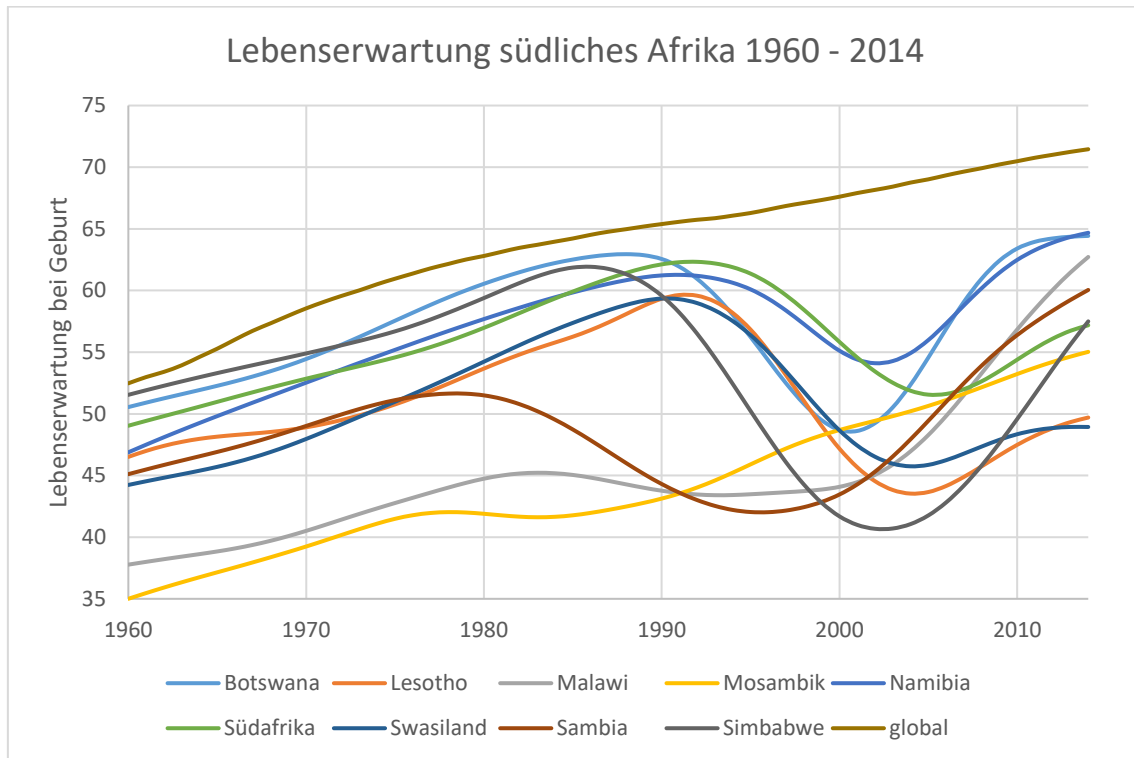


Abbildung 5: Verlauf der Lebenserwartung im südlichen Afrika von 1960 bis 2014. Daten heruntergeladen von <http://data.worldbank.org>, Zugriff am 01.12.2016

1.2.2 Antiretrovirale Therapie

In den vergangenen Jahren fand eine massive Ausweitung der globalen Verfügbarkeit der antiretroviralen Therapie statt. Dies stellt einen großen Erfolg im Kampf gegen HIV und AIDS dar und ist maßgeblich am Rückgang der AIDS-assoziierten Todesfälle um 48 % seit dem Jahr 2005 beteiligt. [3]

Ende 2016 hatten 19,5 Millionen Menschen Zugang zu Therapie, davon 8,2 Millionen im südlichen Afrika [34, 55]. Den Anteil der HIV-Infizierten unter ART (englisch: ART-Coverage) in den verschiedenen südafrikanischen Staaten zeigt Abbildung 6. In keinem der Länder liegt die ART-Coverage unterhalb des globalen Durchschnitts von 53 %.

Schätzungen von UNAIDS zufolge wurden im südlichen Afrika seit 2010 durch ART über 3 Millionen AIDS-Todesfälle verhindert [55]. Trotz dieser Erfolge steht die Region großen Herausforderungen gegenüber. Die WHO empfiehlt seit 2015, die antiretrovirale Therapie bei allen HIV-Infizierten unabhängig von klinischer Symptomatik und CD4-Zellzahl zu

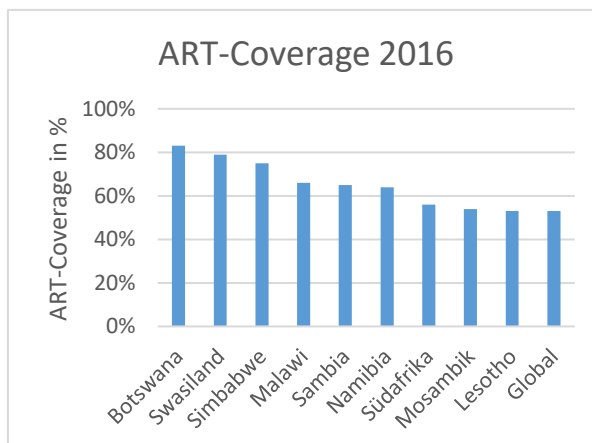


Abbildung 6: ART-Coverage im südlichen Afrika 2016. Daten heruntergeladen von <http://aidsinfo.unaids.org>, Zugriff am 01.10.2017

initiieren [37]. Diese Maßgabe wurde von allen Staaten im südlichen Afrika in die landeseigenen Guidelines übernommen [54]. Um dieses Ziel zu erreichen, muss weiteren 5 Millionen Menschen, die im südlichen Afrika mit HIV leben, der Zugang zur ART ermöglicht werden. Gegenwärtig empfehlen die nationalen Therapieleitlinien der Staaten des südlichen Afrikas eine auf NRTIs und NNRTIs basierte Erstlinientherapie [56-63]. Die einzige Ausnahme hiervon stellt Botswana da, wo seit 2016 der Integraseinhibitor Dolutegravir neben zwei NRTIs Bestandteil der Erstlinientherapie geworden ist [64].

1.2.3 Therapiemonitoring

Im südlichen Afrika empfehlen inzwischen alle neun Staaten die routinemäßige Viruslastbestimmung als Standardmethode für das Monitoring der antiretroviralen Therapie. Zuletzt übernahm Simbabwe diese Empfehlung in die 2016 neu veröffentlichte ART-Leitlinie. Trotz dieser weitreichenden Empfehlungen ist die Verfügbarkeit der Technologie in der Region begrenzt. Gemäß *hivpolicywatch.org* ist im südlichen Afrika nur in Botswana, Namibia und Südafrika Viruslastmonitoring ausreichend verfügbar. [63, 65]

Die routinemäßige Testung auf Medikamentenresistenzen bei Patienten mit virologischem Therapieversagen wird momentan nicht von der WHO empfohlen, da sie im Rahmen eines Public Health Konzeptes zu teuer und zu komplex ist [38]. Während in Deutschland und anderen Ländern mit hohem Einkommen die genotypische

Resistenztestung Teil der Routinediagnostik HIV-Infizierter ist, ist sie im südlichen Afrika außerhalb von Referenz- und Forschungslaboren und der privaten Gesundheitsversorgung üblicherweise nicht verfügbar [66-68]. Am südafrikanischen National Health Laboratory Service Tygerberg in Kapstadt ist seit 2011 ein laboreigener genotypischer Resistenztest im Einsatz, auf den im Rahmen dieser Arbeit zugegriffen werden konnte [69].

1.3 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

1.3.1 Stellenwert des Viruslastmonitorings

Die WHO empfiehlt die routinemäßige Viruslastbestimmung als Goldstandard für das Monitoring der antiretroviralen Therapie. Falls keine Viruslastbestimmung verfügbar ist, werden CD4-Zellzahlbestimmung und klinisches Monitoring zur Überwachung des Therapieerfolgs empfohlen. [38]

In zahlreichen Publikationen konnte jedoch gezeigt werden, dass immunologische und klinische Kriterien ungeeignet sind, um virologisches Therapieversagen zeitnah festzustellen. Zwar korrelierten Änderungen der CD4-Zellzahl auf Gruppenebene signifikant mit der Viruslast. Auf individueller Ebene jedoch führten CD4-Zellzahlbasierte oder klinische Therapieentscheidungen häufig zu einer vorzeitigen und unnötigen Umstellung auf ein Zweitlinienregime, während die geringe Sensitivität dieser Kriterien bei anderen Patienten dazu führte, dass virologisches Therapieversagen unentdeckt blieb. [70-75]

Die Viruslast repräsentiert die Virusproduktion im Wirt [76]. Folglich sind Änderungen der Viruslast ein direktes Maß der Replikationshemmung durch die ART, während immunologische und klinische Veränderungen zumeist erst als zeitlich versetzte Konsequenzen einer Viruslaständerung auftreten. Daher kann die Viruslastbestimmung ein Therapieversagen viel früher und sensitiver detektieren. Häufig besteht dann noch die Möglichkeit, die Erstlinientherapie durch Verbesserung der Therapieadhärenz zu erhalten [50]. Falls Adhärenzprobleme ausgeschlossen sind, kann eine sofortige Umstellung auf eine Zweitlinientherapie erfolgen. [77]

Wird die antiretrovirale Therapie ohne Viruslastmonitoring durchgeführt, ergeben sich negative Folgen auf individueller und auf der Public Health Ebene. Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine hohe Prävalenz von Medikamentenresistenzen in Settings ohne Viruslastmonitoring und vergleichsweise niedrigere Prävalenzen in Settings mit Viruslastmonitoring [74, 78-80]. Der Grund dafür könnte die Akkumulation von Resistenzmutationen in Patienten mit einem lange unentdeckten Therapieversagen sein [79]. Andererseits führen unnötige Wechsel auf ein Zweitlinienregime zu vermeidbaren Nebenwirkungen, Medikamententoxizitäten und Kosten [74]. Es ist anzunehmen, dass sich die ungünstigeren Therapieumstände in Abwesenheit von Viruslastmonitoring auf die Prognose auswirken. In einer Analyse von 17 ART Programmen im südlichen Afrika mit fast 100.000 Patienten konnte eine höhere Mortalität unter den Patienten festgestellt werden, die keinen Zugang zu Viruslastmonitoring haben, im Vergleich zu Patienten mit routinemäßiger Viruslastbestimmung. [81]

Im Hinblick auf die Eindämmung der HIV-Pandemie gewinnt der präventive Effekt der antiretroviralen Therapie zunehmend an Bedeutung [82]. Daten einer Studie an 17.000 südafrikanischen Patienten ergaben eine Reduktion des statistischen Ansteckungsrisikos einer HIV-negativen Person um 38 % in einer Population mit einer 30-40 prozentigen ART-Coverage im Vergleich zu einer Population mit einer ART-Coverage unter 10 % [83]. Die Gemeinschafts-Viruslast (englisch: community viral load) einer Population korreliert dabei stark mit der Zahl an Neuinfektionen und kann ein wertvoller epidemiologischer Parameter zur Evaluation der Effektivität von Präventions- und Behandlungsprogrammen sein [84, 85].

1.3.2 Bedarf im südlichen Afrika

2014 hat UNAIDS die 90-90-90 Ziele definiert, welche den Weg zur Beendigung der HIV-Pandemie bereiten sollen. Sie sehen vor, dass bis zum Jahr 2020 90 % aller HIV-Infizierten ihren HIV-Status kennen, von denen wiederum 90 % ART erhalten, welche bei 90 % der Behandelten zur Virussuppression führen soll. [86]

Neben vielen weiteren Maßnahmen ist eine massive Ausweitung der Verfügbarkeit von Viruslasttests nötig, um diese Ziele zu erreichen. Im Rahmen der internationalen AIDS

Konferenz in Melbourne 2014 forderten über 30 HIV-Organisationen eine weitverbreitete Implementierung des Viruslastmonitorings. [77]

In ressourcenknappen Gegenden erschweren die relativ hohen Kosten von Viruslasttests deren Einsatz [87]. Weiterhin stellen die gängigen kommerziellen Hochdurchsatz-Systeme hohe Anforderungen an die infrastrukturelle Ausstattung der Labore und die technische Expertise der Anwender [68, 88]. Es besteht ein großer Bedarf an einfach durchführbaren, kosten- und ressourcenextensiven Testsystemen zum Viruslastmonitoring in Ländern des südlichen Afrikas, in denen diese Technologien bisher noch nicht erschwinglich sind. [54, 87]

1.3.3 Konzept von Tilghman et al. 2012

Ein neuartiges Konzept für das Therapiemonitoring in ressourcenknappen Regionen wurde 2012 von Tilghman et al. [68] publiziert, welches als Vorlage für diese Arbeit dient. Es handelt sich um ein Vorgehen, das methodisch in einigen Punkten von kommerziellen Hochdurchsatz-Systemen zur Viruslasttestung abweicht. Diese Viruslast-Plattformen von Herstellern wie Abbott, bioMérieux, Roche und Siemens beruhen auf verschiedenen Nukleinsäureamplifikationsverfahren. Durch Echtzeitdetektion der amplifizierten Nukleinsäuren ermöglichen sie eine quantitative Bestimmung der Viruslast einer Probe. Die amplifizierten Genabschnitte liegen, je nach Plattform, auf hochkonservierten Regionen des *pol integrase* oder *gag* Gens. [88]

In der Publikation von Tilghman et al. 2012 wird eine konventionelle RT-PCR (siehe Absatz 2.2.3) durchgeführt und das amplifizierte DNA-Fragment durch eine Gelelektrophorese visualisiert. Dadurch kann lediglich eine qualitative Aussage über den Nachweis von HIV-RNA in einer Probe getroffen werden. Eine spezifische Bande in der Gelelektrophorese entspricht dem Nachweis von HIV-RNA in der Probe, ist keine Bande vorhanden, so konnte keine HIV-RNA nachgewiesen werden. Weiterhin werden jeweils fünf Einzelproben zu einem Pool vereint und dann gemeinsam getestet. Nur wenn ein Pool positiv getestet wird, muss durch Nachtestung der individuellen Proben (Dekonvolution) herausgefunden werden, welche Probe(n) die nachweisbare HIV-RNA im Pool verursacht hat/haben. Dies dient einerseits der Einsparung von Tests, da ein negativ getesteter Pool keine Dekonvolution nach sich zieht und somit im Vergleich zur

individuellen Testung vier Tests einspart. Andererseits wurde bei Tilghman et al. 2012 der Verdünnungseffekt durch das Poolen genutzt, um die analytische Sensitivität der PCR anzupassen. Die Idee hinter der qualitativen Viruslasttestung ist nämlich, durch eine begrenzte analytische Sensitivität nur diejenigen Proben positiv zu testen, deren Viruslast so hoch ist, dass ein Therapieversagen wahrscheinlich ist. Proben von Patienten, die unter ART eine suffiziente Virussuppression aufweisen, sollen negativ getestet werden. Eine weitere Neuerung der von Tilghman et al. 2012 vorgestellten Methode ist die Amplifikation eines Genabschnittes, der auf dem HIV-1 *pol* Gen liegt und für das virale Enzym Reverse Transkriptase kodiert. Werden Therapieregime verwendet, die auf NRTIs und NNRTIs basieren und sich gegen die Reverse Transkriptase richten, so ist bei Therapieversagern dieser Genabschnitt relevant für die Suche nach Resistenzmutationen. Tilghman et al. verwenden für den genotypischen Resistenznachweis positiv getesteter Proben einen laboreigenen Sequenzierungs-Assay auf der Grundlage der Sequenzierungsmethode nach Sanger (vgl. Absatz 2.2.7).

Zusammenfassend kombiniert die von Tilghman et al. 2012 vorgestellte Strategie zum Therapiemonitoring in ressourcenknappen Regionen einen gepoolten qualitativen Viruslasttest mit der nachfolgenden genotypischen Resistenztestung von positiv getesteten Patientenproben. Die zugrundeliegende Idee ist, dass eine hohe Viruslast zwar das Vorliegen eines virologischen Therapieversagens beweist, aber noch keine Auskunft über die Ätiologie des Therapieversagens gibt. Die wichtigste Frage für den behandelnden Arzt ist in dieser Situation, ob die aktuelle Therapie erhalten werden kann, z.B. durch eine Verbesserung der Therapieadhärenz, oder ob Medikamentenresistenzen vorliegen, die den Wechsel auf ein Zweitlinientherapieregime notwendig machen. Diese Frage kann durch eine genotypische Resistenztestung direkt beantwortet werden.

In einer retrospektiven Studie an 295 mit HIV-1 Subtyp B-infizierten Proben aus San Diego (CA, USA) zeigten Tilghman et al. 2012 die prinzipielle Umsetzbarkeit des Konzeptes unter nordamerikanischen Bedingungen. [68]

1.3.4 Zielsetzung der Arbeit

Die von Tilghman et al. 2012 vorgeschlagene kombinierte Therapiemonitoringstrategie zum Nachweis von virologischem Versagen und antiretroviralen Medikamentenresistenzen wurde bislang nur an HIV-1 Subtyp B-infizierten Patienten in den USA getestet. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der Methode für ressourcenknappe Länder des südlichen Afrikas mit hohen HIV-Prävalenzen und Subtyp C-Prädominanz, gefolgt von der Validierung der Methode in einem solchen Setting. Die folgenden Schritte wurden im Rahmen der Zielsetzung festgelegt:

- Optimierung des Testdesigns mit Fokus auf HIV-1 Subtyp C
- Bestimmung des Detektionslimits der RT-PCR
- Anpassung der Menge des Probenmaterials, das in die RT-PCR eingetragen wird, sodass Proben mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml positiv getestet werden, während niedrigere Viruslasten zu einem negativen Ergebnis führen
- Vergleich der qualitativen PCR-Minipool-Strategie mit der Referenzmethode bezüglich der Detektion von virologischem Versagen
- Evaluation der relativen Effizienz der Poolstrategie
- Genotypische Resistenztestung positiv getesteter Proben

1.3.5 Institutioneller Hintergrund

Institutionelle Grundlage dieser Arbeit war die Kooperation der Universität Würzburg mit der Stellenbosch University und der University of Cape Town im Rahmen des DFG-geförderten IRTG 1522 (International Research Training Group 1522) unter dem Titel „HIV/AIDS und assoziierte Infektionserkrankungen im südlichen Afrika“ von 2008-2013. Die Forschungsarbeit wurde von Januar bis Mai 2013 in den Laboren der Division of Medical Virology an der Stellenbosch University am Tygerberg Campus in Kapstadt, Südafrika durchgeführt.

2 Material, Methoden, Projektaufbau und -durchführung

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Als HIV-positives Testmaterial dienten Patientenblutproben, die von Januar bis Mai 2013 von staatlichen Kliniken der Provinz Western Cape in Südafrika zur Routineviruslastbestimmung an die virologische Sektion des National Health Laboratory Service Tygerberg (NHLS Tygerberg) gesendet wurden. Es handelte sich dabei um mit EDTA versetztes, venöses Blut HIV-1-positiver Patienten unter antiretroviraler Therapie. Zwischen Blutentnahme und Probeneingang im NHLS Tygerberg vergingen, abhängig von Entfernung und logistischer Anbindung der einsendenden Klinik, zwischen 24 Stunden und sieben Tagen. Unmittelbar nach Eingang der Proben wurden diese für zehn Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert (Allegra™ X-12 Centrifuge), anschließend wurde die Plasma-Viruslast durch den Abbott RealTime HIV-1 Assays (Abbott Molecular) bestimmt. Überbleibendes zentrifugiertes EDTA Blut wurde bei 4 °C aufbewahrt. Dieses Probenmaterial stand zur Testoptimierung und Validierung zur Verfügung und wurde hierfür bis maximal 24 Stunden nach Viruslastbestimmung weiterverarbeitet. Außer dem Viruslastergebnis wurden keine Patientendaten verwendet. Die Probenbearbeitung erfolgte anonymisiert, wobei die Patientenummer, die mit den Patientendaten verknüpft war, durch einen Studiennamen ersetzt wurde und die Zuordnung zwischen beiden verworfen wurde.

2.1.2 HIV-negatives Plasma

HIV-negatives Plasma diente als Negativkontrolle und zur Verdünnung von HIV-positivem Plasma. Hierfür wurde HIV-negatives Blut von einem freiwilligen Probanden gespendet, in EDTA-Blut Röhrchen (BD Vacutainer® K2E (EDTA)) gesammelt und unmittelbar nach der Entnahme für zehn Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert (Allegra™ X-12 Centrifuge). Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bei 4 °C für maximal zwei Wochen aufbewahrt.

2.1.3 Kontrollen

2.1.3.1 Positivkontrollen

Eine ausreichend große Zahl HIV-1-positiver Plasmen verschiedener Patienten wurde gepoolt, aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Viruslast der gepoolten Positivkontrolle betrug 21.000 Kopien/ml (Abbott RealTime HIV-1 Assay). Eine Positivkontrolle wurde in jedem Experiment parallel mitgeführt und durchlief alle Schritte von der Nukleinsäureextraktion bis zur Gelelektrophorese.

2.1.3.2 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle diente HIV-negatives Plasma eines freiwilligen Spenders. Eine Negativkontrolle wurde in jedem Experiment parallel mitgeführt und durchlief alle Schritte von der Nukleinsäureextraktion bis zur Gelelektrophorese.

2.1.3.3 Non template control

Als non template control diente nukleasefreies Wasser. Diese Kontrolle diente der Überwachung von Kontaminationen im Verlauf des Prozesses. Sie wurde parallel in jedem Experiment mitgeführt und durchlief beide PCR-Durchgänge sowie die Gelelektrophorese.

2.1.4 Weitere Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Kits, Geräte, Reagenzien und Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Computersoftware sowie Online Datenbanken und Tools sind in Tabellen in Absatz 7 (Anhang) zusammengefasst.

2.2 Methoden

2.2.1 Referenzmethode zur Viruslastbestimmung

Im NHLS Tygerberg wird die HIV-1 Routineviruslastbestimmung seit dem Jahr 2010 mit dem Abbott RealTime HIV-1 Assay (Abbott Molecular) durchgeführt. Die mit dieser Methode ermittelten Viruslastergebnisse dienen als Referenz für die in der vorliegenden Arbeit entwickelten qualitativen RT-PCR.

Das Abbott m2000 RealTime System besteht aus zwei Instrumenten, welche eine weitgehende Automatisierung der Probenvorbereitung und PCR-Amplifikation erlauben. Die RNA-Extraktion und die Vorbereitung des PCR Master Mix werden vom m2000sp™ Instrument durchgeführt, während die reverse Transkription, die PCR-Amplifikation und die auf real-time PCR-Technologie basierende Detektion und Quantifizierung im m2000rt™ Instrument ablaufen. Amplifiziert wird die hoch konservierte Integrase Region auf dem HIV-1 *pol* Gen [89, 90]. Der Test eignet sich zur Detektion von HIV-1 Gruppe M Subtypen A-D, F-K und einigen zirkulierenden rekombinanten Formen (CRF) sowie HIV-1 Gruppen N, O und P [91]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Protokolle für Plasmavolumina von 1,0 ml und 0,6 ml ermöglichten eine Quantifizierung im Viruslastbereich von 40 Kopien/ml bis 10⁷ Kopien/ml. Pro Durchlauf konnten maximal 93 Patientenproben getestet werden [92].

2.2.2 Nukleinsäureextraktion

Vor der Vervielfältigung viraler Nukleinsäuren mittels PCR müssen diese zunächst aus dem Probenmaterial extrahiert werden [93]. Dieser Schritt beeinflusst entscheidend die Güte und Reproduzierbarkeit von nachgeschalteten Amplifikationsverfahren. Besonders bei Probenmaterial mit niedriger Nukleinsäurekonzentration sind die Abwesenheit von Nukleasen, chemischen Verunreinigungen und inhibitorischen Substanzen äußerst wichtig für die erfolgreiche enzymatische Vervielfältigung der Nukleinsäuren [94]. Für die Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Patientenplasma wurde das automatisierte NucliSens® easyMAG™ System (bioMérieux) verwendet, welches am NHLS Tygerberg routinemäßig im Rahmen eines laboreigenen HIV-1 Resistenztestes zum Einsatz kommt [69]. Das Prinzip des NucliSens® easyMAG™ Systems basiert auf der Bindung von Nukleinsäuren an magnetische Silica-Partikel in Anwesenheit der chaotropen Substanz Guanidiniumthiocyanat [95, 96]. Nach mehreren Waschschritten werden die Nukleinsäuren durch einen Elutionspuffer von den Silica-Partikeln gelöst. Das Eluat enthält die aufgereinigten Nukleinsäuren des Probenmaterials. Das NucliSens® easyMAG™ System bietet einen Durchsatz von 24 Proben in weniger als einer Stunde [97]. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll Generic 2.0.1 operiert mit Probenvolumina von 10 µl bis 1.000 µl. Das Elutionsvolumen kann von 110 µl bis 25 µl

variiert werden. Folglich können die im Plasma enthaltenen Nukleinsäuren bis zu 40-fach konzentriert und bis zu 11-fach verdünnt ausgegeben werden. Diese Flexibilität bei der Konzentrierung der extrahierten Nukleinsäuren war nützlich für die Optimierung des Nukleinsäure-Eintrags in die PCR. Die für die qualitative PCR-Minipool-Strategie verwendeten Extraktionsparameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Extraktionsparameter

	Plasmavolumen	Elutionsvolumen	Konzentrationsfaktor	Protokoll
Minipools	500 µl	100 µl	5	Generic 2.0.1
Individuelle Patientenprobe	100 µl	100 µl	1	Generic 2.0.1

Unmittelbar nach der Extraktion wurden die Eluate aliquotiert, bei -20 °C aufbewahrt und innerhalb von zwei Monaten getestet.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) wurde Mitte der 1980er Jahre von Kary B. Mullis beschrieben und entwickelte sich seitdem zu einer der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie [98, 99]. Voraussetzung sind zwei Oligonukleotidmoleküle (Primer), welche aufgrund ihrer Sequenz spezifisch an jeweils einen Strang der Nukleinsäure binden. Das zu amplifizierende DNA-Segment liegt zwischen den beiden Primerbindungsstellen. Nach Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges lagern sich die Primer komplementär an jeweils einen Strang an (Annealing) und bieten der hitzestabilen DNA-Polymerase ein freies 3'-Ende dar. Das Enzym katalysiert die Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung anhand der Vorlage des jeweiligen Matrizenstranges. Sobald die neu synthetisierten Stränge die Länge des von beiden Primern flankierten DNA-Segments erreicht haben, entsteht dort eine zum jeweils anderen Primer komplementäre Bindungsstelle. Nach erneuter Denaturierung stehen also auch die neu synthetisierten Stränge als Matrize zur Verfügung. Durch die konsekutive Wiederholung des dreistufigen Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNA-Synthese, kommt es zur exponentiellen Vermehrung des

von den beiden Primern eingeschlossenen DNA-Fragmentes. So können mit dieser Methode spezifische DNA-Fragmente innerhalb weniger Stunden um über sieben Zehnerpotenzen vervielfältigt und somit durch nachfolgende Methoden nachweisbar gemacht werden [100, 101]. Die hohe Sensitivität und Spezifität der PCR eröffnet ihr ein breites Anwendungsspektrum in der Diagnostik von Viruserkrankungen [102].

Liegt das virale Genom, wie beim HI-Virus, in Form von RNA vor, so muss die aus dem Probenmaterial extrahierte RNA *in vitro* durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (englisch: complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Die cDNA dient dann als Vorlage für die weitere PCR-Amplifikation. Dies wird als RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) bezeichnet. [99]

Bei einer Nested-PCR wird das Produkt eines ersten PCR-Durchgangs (englisch: round) als Matrize für einen zweiten PCR-Durchgang verwendet. Das für den zweiten Durchgang verwendete Primer-Set ist so gewählt, dass es innerhalb des im ersten Durchgang amplifizierten Fragments bindet. [103]

Im Rahmen der Optimierung der qualitativen PCR-Strategie in dieser Arbeit wurde eine Nested-PCR entworfen. Im Folgenden sind die Nested-PCR-Protokolle aufgeführt, die Ergebnis des Optimierungsprozesses waren und für die Validierung der qualitativen PCR-Strategie verwendet wurden.

2.2.3.1 Erster PCR-Durchgang: RT-PCT

Im ersten Durchgang kam das SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) zum Einsatz. Dieses Einschritt-RT-PCR System vereint die reverse Transkription der viralen RNA mit der darauffolgenden PCR-Amplifikation der entstandenen cDNA in einem Experiment. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pipettierschema und das Thermocycler-Protokoll sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefasst. Vor der reversen Transkription wurde ein RNA-Denaturierungsschritt eingeführt, um RNA-Sekundärstrukturen zu beseitigen. Der Master Mix I wurde erst anschließend zum RNA-Extrakt hinzugefügt, um das Enzym Reverse Transkriptase während des RNA-Denaturierungsschrittes bei 65 °C nicht zu schädigen. Zunächst wurden pro Reaktion 10 µl RNA-Extrakt in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und die RNA-Denaturierung im Thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700,

Applied Biosystems) bei 65 °C durchgeführt. Nach Ablauf der 30 Sekunden wurden die Reaktionsgefäße aus dem Thermocycler genommen, sofort stark gekühlt (IsoFreeze mini cooler) und je 40 µl des bereits vorbereiteten Master Mix I hinzugefügt. Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße wieder im Thermocycler platziert und das Programm wurde mit der reversen Transkription fortgesetzt.

Tabelle 2: Pipettierschema erster PCR-Durchgang

Reagenz		Volumen pro Reaktionsansatz
Master Mix I	Nukleasefreies Wasser (Promega)	9 µl
	2X Reaction Mix (3,2 mmol/l, MgSO ₄ , 400 µmol/l of each dNTP) (Invitrogen™)	25 µl
	Primer Mj3 forward (10 µmol/l)	2 µl
	Primer Mj4 reverse (10 µmol/l)	2 µl
	SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix (Invitrogen™)	2 µl
Nukleinsäure	RNA-Extrakt	10 µl

Tabelle 3: Thermocycler-Protokoll erster PCR-Durchgang

Schritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
RNA-Denaturierung	1x	65 °C	30 Sekunden
Reverse Transkription	1x	50 °C	30 Minuten
Denaturierung	1x	94 °C	2 Minuten
Denaturierung	35x	94 °C	20 Sekunden
Primer-Anlagerung		55 °C	30 Sekunden
DNA Synthese		68 °C	90 Sekunden
Finale Synthese	1x	68 °C	5 Minuten
Kühlen		4 °C	∞

2.2.3.2 Zweiter PCR-Durchgang: Nested-PCR

Im zweiten Durchgang kam das Kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) zum Einsatz. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Master Mix II wurde zeitgleich mit dem Master Mix I hergestellt. Pro Reaktion wurden 23 µl des Master Mix II in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt und bis zum Start des zweiten PCR-Durchgangs für maximal vier Stunden bei -20 °C aufbewahrt. Nach Abschluss des ersten Durchgangs wurden je 2 µl des PCR-Produkts in das korrespondierende Reaktionsgefäß für den zweiten Durchgang übertragen und die PCR im Thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) gestartet. Das Pipettierschema und das Thermocycler-Protokoll sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Pipettierschema zweiter PCR-Durchgang

Reagenz		Volumen pro Reaktionsansatz
Master Mix II	Nukleasefreies Wasser (Promega)	11,25 µl
	5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	5 µl
	PCR nucleotide mix (10 mmol/l each) (Promega)	0,5 µl
	Magnesium Chloride Solution (25 mmol/l) (Promega)	2 µl
	Primer 5RT-LONG-C forward (10 µmol/l)	2 µl
	Primer 4RT reverse (10 µmol/l)	2 µl
	GoTaq® DNA Polymerase (Promega)	0,25 µl
Nukleinsäure	PCR-Produkt aus erstem Durchgang	2 µl

Tabelle 5: Thermocycler-Protokoll zweiter PCR-Durchgang

Schritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1x	94 °C	2 Minuten
Denaturierung	35x	94 °C	20 Sekunden
Primer-Anlagerung		55 °C	30 Sekunden
DNA Synthese		68 °C	60 Sekunden
Finale Synthese	1x	68 °C	5 Minuten
Kühlen		4 °C	∞

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese und Geldokumentation

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe. Aufgrund ihrer negativen Ladung bei neutralem pH-Wert wandert DNA im elektrischen Feld auf die Anode zu. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen, doppelsträngigen DNA-Molekülen in der Agarose-Gelmatrix invers proportional zum \log_{10} der Basenzahl [104]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von amplifiziertem PCR-Produkt nach dem zweiten PCR-Durchgang verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden 2 % w/v Agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza) in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht, in eine Agarose-Gelelektrophorese-Kammer gegossen und nach dem Erstarren mit 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer überschichtet. 5 μ l PCR-Produkt wurde mit 1 μ l Novel Juice (GeneDireX®) vermischt und in das Gel geladen. Ebenso wurde mit 3 μ l DNA-Längenstandard DNA Ladder RTU 100bp (GeneDireX®) verfahren. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 8 V/cm über 40 Minuten, wobei das Gel zum effektiveren Abtransport der entstehenden Wärme mit ca. 50 rpm (LAB. Rotator, Digisystem Laboratory Instruments) bewegt wurde, sobald die DNA in das Gel eingedrungen war. Die Geldokumentation erfolgte mittels des Uviprochemi II Geldokumentationssystems (Uvitec) bei UV-Licht mit 312 nm Wellenlänge. Eine Bande bei 552 bp entsprechend der Länge des im zweiten PCR-Durchgang amplifizierten DNA Fragments wurde als positives Ergebnis gewertet. Für die Bildbearbeitung wurde die Software Uviband Version 12.11 (Uvitec) verwendet.

2.2.5 DNA-Aufreinigung

Durch die DNA-Aufreinigung werden Enzyme sowie ungenutzte Primer und dNTPs aus dem PCR-Produkt entfernt, um die Qualität der anschließenden Sequenzierung zu verbessern [105]. Hierfür wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dieses Kit basiert auf der Bindung von DNA an eine Silica-Membran. Ein Waschschrift entfernt Verunreinigungen, anschließend wird die DNA in eine geringe Menge Puffer eluiert [106, 107].

2.2.6 Messung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung kann UV-spektroskopisch ermittelt werden. Die Absorption von UV-Strahlung der Wellenlänge 260 nm dient dabei als Maß der DNA-Konzentration, während der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bzw. bei 260 nm und 230 nm Aussagen über die Verunreinigung der DNA mit Proteinen bzw. Extraktionsreagenzien (z.B. Guanidiniumthiocyanat) zulässt [106]. Die DNA-Konzentration des aufgereinigten PCR-Produkts wurde mit dem NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer bestimmt. Anhand der gemessenen DNA-Konzentrationen ließen sich Verdünnungsfaktoren ermitteln, um für die Sequenzierung geeignete DNA-Konzentrationen von 10-25 ng/μl zu erhalten.

2.2.7 Sequenzierung

Für eine genotypische Resistenztestung wird die Nukleotid-Abfolge relevanter viraler Gene bestimmt. Durch ihren Abgleich mit großen Sequenzdatenbanken können resistenzassoziierte Mutationen identifiziert werden [108, 109]. Eine Möglichkeit der Sequenzanalyse beruht auf dem Prinzip der von Sanger et al. beschriebenen Didesoxymethode [110]. Die Weiterentwicklung dieser Methode macht sich fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zunutze, die zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) im Reaktionsansatz vorhanden sind und ebenfalls als Substrat der DNA-Polymerase dienen. Jedem der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddTTP und ddCTP) ist eine eigene Fluoreszenzfarbe zugeordnet. Der Einbau eines ddNTP hat aufgrund der Abwesenheit der 3'-Hydroxygruppe einen Kettenabbruch zur Folge. Es resultieren unterschiedlich lange DNA-Stränge, die jeweils

durch ein fluoreszierendes ddNTP terminiert werden. Automatisierte DNA-Sequenzen trennen die Stränge mittels Kapillargelelektrophorese ihrer Länge nach auf, wobei Längenunterschiede von nur einem Nukleotid aufgelöst werden können. Durch Detektion der unterschiedlichen Emissionsspektren der die Stränge terminierenden ddNTPs kann auf die Basenabfolge der Matrizen-DNA geschlossen werden [105, 111, 112]. Das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) wurde zur Sequenzierung des PCR-Amplifikats verwendet, wenn die entsprechende Patientenprobe positiv für virologisches Versagen getestet wurde. Als Thermocycler diente das GeneAmp® PCR System 9700 von Applied Biosystems. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte für jede der Proben in zwei getrennten Reaktionsansätzen, wobei je einer den Primer 5RT-LONG-C forward, der andere den Primer 4RT reverse (Ausgangskonzentration je 5 µM) beinhaltete. So wurden Plus- und Minusstrang des PCR-Produkts sequenziert. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pipettierschema und das Thermocycler Protokoll sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Pipettierschema Sequenzierungsreaktion

Reagenz		Volumen pro Reaktionsansatz
Master Mix	Nukleasefreies Wasser (Promega)	4 µl
	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)	1 µl
	5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	3 µl
	Primer (5RT-LONG-C forward oder 4RT reverse) (5 µM)	1 µl
Nukleinsäure	Aufgereinigtes PCR-Produkt (10-25 ng/µl)	1 µl

Tabelle 7: Thermocycler-Protokoll Sequenzierungsreaktion

Schritt	Wiederholungen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	25x	96 °C	10 Sekunden
Primer-Anlagerung		50 °C	5 Sekunden
DNA Synthese		60 °C	4 Minuten
Kühlen		4 °C	∞

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde das BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) entsprechend der Herstellerangaben zur Entfernung nicht verbrauchter Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt [113]. Kapillargelelektrophorese und Detektion der Basensequenz erfolgten im 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.8 Alignment, Sequenzanalyse und Resistenzinterpretation

Für Alignment und Bearbeitung der Sequenzen wurde die Software Sequencer V10.1 (Gene Codes Corporation) verwendet. Die Sequenzdaten beider Stränge wurden berücksichtigt. Zur Sequenzanalyse und Resistenzinterpretation wurde das HIVdb Program (Genotypic Resistance Interpretation Algorithm) der Stanford University verwendet (<http://hivdb.stanford.edu/>).

2.3 Projektaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Übertragung des von Tilghman et al. 2012 vorgeschlagenen Therapiemonitoringkonzeptes (siehe Absatz 1.3.3) auf das südliche Afrika. Dieses Projekt wurde in zwei Phasen unterteilt, die Optimierung der Methode für die im südlichen Afrika vorherrschenden Bedingungen und die Validierung der optimierten Methode in einem südafrikanischen Setting.

2.3.1 Optimierung

Zunächst musste die PCR für HIV-1 Subtyp C optimiert werden und eine ausreichende analytische Sensitivität aufweisen. Als analytische Sensitivität wird in dieser Arbeit die Fähigkeit der PCR bezeichnet, geringe Analytkonzentrationen zu detektieren. Die kleinste detektierbare Analytmenge wird Detektionslimit genannt. In Abgrenzung dazu

beschreibt die diagnostische Sensitivität den Anteil richtig positiv getesteter Personen an allen für das gesuchte Merkmal positiven Personen. [114, 115]

Im nächsten Schritt wurde das Detektionslimit der PCR als absolute Zahl von HIV-1 RNA-Molekülen (fortan: Kopien) bestimmt, die notwendig sind, um ein positives Ergebnis zu erzielen. Mit diesem Wissen konnte der Eintrag an Probenmaterial in die PCR so abgestimmt werden, dass Pools positiv getestet wurden, die mindestens eine Probe mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml enthielten. Gleichzeitig musste gewährleistet sein, dass bei der Dekonvolution positiver Pools individuelle Proben mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml positiv getestet wurden, während Proben mit niedrigerer Viruslast negativ blieben. Die Definition von virologischem Therapieversagen als Viruslast von über 1.000 Kopien/ml steht im Einklang mit der WHO-Definition und den ART-Leitlinien der Staaten des südlichen Afrikas (Ausnahme Botswana, hier 400 Kopien/ml) [38, 116].

2.3.2 Validierung

Die optimierte qualitative PCR-Minipool-Strategie wurde im Rahmen einer Studie an 50 Patientenproben aus der routinemäßigen Viruslasttestung am NHLS Tygerberg in Südafrika mit der Referenzmethode verglichen. Nachfolgend wurden vier positiv getestete Proben sequenziert und die Sequenzen mithilfe einer HIV-Resistenzdatenbank auf das Vorliegen von Resistenzmutationen geprüft.

2.3.3 Ethische Klärung

Das Studienprotokoll wurde vom Health Research Ethics Committee der University of Stellenbosch gebilligt (Ethics Protocol Number: S12/03/064).

2.4 Projektdurchführung

2.4.1 Optimierung der PCR für HIV-1 Subtyp C

Mit den von Tilghman et al. 2012 beschriebenen Primern [68] und einem PCR-Durchgang wurde bei der Testung von HIV-1 Subtyp C-infizierten Proben keine ausreichende analytische Sensitivität erreicht. Daher wurde eine Nested-PCR entworfen und

optimiert. Wichtige methodische Elemente des Optimierungsprozesses werden im Folgenden dargestellt, während der Optimierungsprozess in der Diskussion (Absatz 4.1) ausführlich erläutert wird.

2.4.1.1 Primer

Als äußeres Primersset wurden die von Plantier et al. [117] publizierten Primer Mj3 und Mj4 verwendet, deren Sequenzen und Charakteristika in Tabelle 8 dargestellt sind. Als inneres Primerpaar wurden 5RT long C und 4RT designt, die für HIV-1 Gruppe M mit spezieller Berücksichtigung von Subtyp C optimiert sind, vgl. Absatz 4.1.1. Sequenzen und Charakteristika der Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 8: Sequenzen und Charakteristika des äußeren Primersets; die T_M-Werte wurden mit dem Exiqon T_M Prediction Tool berechnet, verfügbar auf <https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx>, Zugriff am 01.12.2016

Primer	Sequenz (5'-3')	Nukleotidposition relativ zu HXB2	T _M [°C]	Designer
Mj3 (forward)	AGTAGGACCTACACCTGTCA	2480 → 2499	61	Plantier
Mj4 (reverse)	CTGTTAGTGCTTTGGTTCCTCT	3399 ← 3420	62	Plantier

Tabelle 9: Sequenzen und Charakteristika des inneren Primersets; Die T_M-Werte wurden mit dem Exiqon T_M Prediction Tool berechnet, verfügbar auf <https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx>, Zugriff am 01.12.2016

Primer	Sequenz (5'-3')	Nukleotidposition relativ zu HXB2	T _M [°C]	Designer
5RT long C (forward)	CTGAAAATCCATATAAACTCCAATATTTGY	2704 → 2734	62- 63	Van Zyl, G.U.
4RT (reverse)	GATGGAGTTCATACCCCATCCA	3234 ← 3255	64	Van Zyl, G.U.

2.4.1.2 Amplifizierte DNA-Fragmente

Das Testdesign sieht vor, das PCR-Produkt zur genotypischen Resistenztestung zu verwenden. Daher wurden die Primer 5RT long C und 4RT so entworfen, dass sie die wichtigsten resistenzassoziierten Mutationen der für die Reverse Transkriptase kodierenden Genregion einschließen, wie in Abbildung 7 zu sehen ist. Einzig die Mutation M41L liegt außerhalb des vom inneren Primerset flankierten DNA-Fragments. Details zu den Fragmenten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

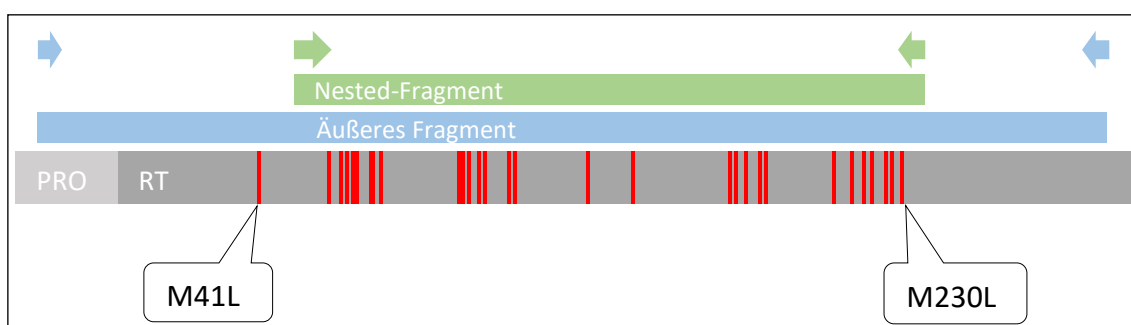


Abbildung 7: Die virale RNA ist grau dargestellt, sie zeigt einen Ausschnitt des pol Gens mit Anteilen der für die Protease (PRO) und die Reverse Transkriptase (RT) kodierenden Regionen. Die Pfeile markieren die Primer auf Höhe ihrer Bindungsstellen. MJ3(→) und MJ4 (←) schließen das äußere Fragment (blau) ein, während 5RT long C (→) und 4RT (←) das nested-Fragment (grün) flankieren. Die roten Balken markieren die Positionen wichtiger Mutationen in der Reverse Transkriptase kodierenden Genregion, welche mit Resistenzen gegen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs und NNRTIs) assoziiert sind. Resistenzdaten aus Wensing et al. 2015 [1], Sequenzdaten aus der Los Alamos HIV sequence database, verfügbar unter <http://www.hiv.lanl.gov/> Zugriff am 01.12.2016

Tabelle 10: Abmessungen der Fragmente und ihre relative Position innerhalb des HIV-1 Genoms, Sequenzdaten aus der Los Alamos HIV sequence database, verfügbar unter <http://www.hiv.lanl.gov/> Zugriff am 01.12.2016

Fragment	Länge	Nukleotidposition relativ zu HXB2	Aminosäureposition	
			Relativ zu Pol (Codon 1) in HXB2	Relativ zu RT (Codon1) in HXB2
Äußeres Fragment	941 Nukleotide	2480 → 3420	133 → 446	1 → 291
Nested Fragment	552 Nukleotide	2704 → 3255	207 → 391	52 → 236

2.4.1.3 Protokolle

Unter der Maßgabe, zunächst eine möglichst hohe analytische Sensitivität zu erzielen, wurden die Reaktionsansätze und Thermocycler-Protokolle der Nested-PCR optimiert. Die Protokolle sind in Absatz 2.2.3 dargestellt.

2.4.2 Bestimmung des Detektionslimits der Nested-PCR

Für die Bestimmung des Detektionslimits wurden zunächst Verdünnungsreihen hergestellt. Als Verdünnungsmittel diente HIV-negatives Plasma. Eine Patientenprobe mit bekannter Viruslast wurden auf einen bestimmten Viruslast Ausgangswert vorverdünnt. Dann wurden durch seriell Verdünnen abgestufte Viruslastwerte erzeugt, wobei die Viruslast zwischen den Verdünnungsstufen jeweils halbiert wurde. Anschließend wurden die Proben unmittelbar der Nukleinsäureextraktion zugeführt oder für maximal zwei Wochen bei -20 °C bis zur Extraktion aufbewahrt.

Für die experimentelle Bestimmung des Detektionslimits wurden sechs Verdünnungsreihen mit einheitlichen Verdünnungsstufen im Bereich des vermuteten Detektionslimits der Nested-PCR angefertigt. Unter Berücksichtigung der RNA-Konzentrationen der Verdünnungsstufen und des Volumens an extrahierter RNA, die in die PCR eingebracht wurde, konnte die absolute Anzahl an HIV-1 RNA-Kopien pro PCR-Reaktionsansatz (Kopien/Reaktion) angegeben werden. Es wurden RNA-Input-Abstufungen von 40 Kopien bis 0,625 Kopien getestet, wobei sich die Zahl an RNA-Kopien zwischen zwei Stufen jeweils halbierte. Jede Stufe einer jeden Verdünnungsreihe wurde doppelt getestet. Es wurden die in Absatz 2.2.3 beschriebenen Protokolle verwendet, mit der Abweichung, dass der RNA-Input im ersten Durchgang 5 µl betrug und folglich 14 µl nukleasefreies Wasser verwendet wurde. Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese wurde im Anschluss an die PCR das Vorliegen von amplifiziertem PCR-Produkt beurteilt.

Zur Regressionsanalyse der Daten wurde eine Probit-Analyse mit dem Programm SPSS Statistics 22 (IBM) durchgeführt. Die Probit-Analyse ist eine gängige Regressionsanalyse für die empirische Bestimmung der niedrigsten Analytkonzentration, die von einem molekularen Test zuverlässig detektiert werden kann (Detektionslimit). Sie ist geeignet für die Analyse binomial verteilter Daten, d.h. Daten mit nur zwei möglichen Ergebnissen, hier „positiv“ oder „negativ“. Die Probit-Analyse transformiert die Analytkonzentration-Ergebnis-Kurve in eine Gerade, welche zur Regressionsanalyse genutzt werden kann. Üblicherweise wird als Detektionslimit die Analytkonzentration bezeichnet, bei der 95 % der Proben positiv getestet werden. [115]

2.4.3 Minipool-Studie

Zur Validierung der qualitativen PCR-Minipool-Strategie wurde eine retrospektiv methodenvergleichende Studie an 50 Patientenproben durchgeführt. Die Patientenproben stammten aus der routinemäßigen Viruslasttestung am NHLS Tygerberg und wurden im April und Mai 2013 sukzessive gesammelt, wenn sie folgende Einschlusskriterien erfüllten: Erwachsener Patient unter Erstlinien-ART und ausreichendes verbleibendes Probenvolumen nach der routinemäßigen Viruslastbestimmung. Die quantitative Viruslastbestimmung durch die Referenzmethode (Abbott RealTime HIV-1 Assay, siehe Absatz 2.2.1) war zum Zeitpunkt der Probenakquise bereits im Gange oder abgeschlossen. Die Probenverarbeitung und Testdurchführung erfolgte verblindet bezüglich der Viruslastergebnisse, welche erst offengelegt wurden, als alle Testergebnisse der qualitativen PCR-Minipool-Strategie vorlagen.

Für die Herstellung der Minipools wurden 50 Patientenproben à 300 µl gesammelt. Jeweils fünf Patientenproben wurden gepoolt. Hierfür wurden 120 µl jeder Patientenprobe in ein Reaktionsgefäß (Greiner bio-one) gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Unmittelbar nach ihrer Herstellung wurden die Minipools der Nukleinsäureextraktion zugeführt. Das Poolvolumen von 600 µl wurde gewählt, um ein suffizientes Pipettieren des bei der Extraktion benötigten Plasmavolumens von 500 µl zu gewährleisten. Die verbleibenden 180 µl jeder individuellen Patientenprobe wurden aus Gründen der Zeitersparnis ebenfalls direkt zur Extraktion gegeben, wofür ein Volumen von 100 µl benötigt wurde. Die extrahierte RNA der Pools und individuellen Patientenproben wurden aliquotiert und bei -20 °C bis zur Durchführung der PCR aufbewahrt. Für die Testung der Minipools wurden die in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Protokolle verwendet. Amplifiziertes PCR-Produkt wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese detektiert. Alle individuellen Proben positiv getesteter Minipools wurden im Anschluss in gleicher Weise getestet.

Die Ergebnisse der qualitativen PCR-Strategie wurden mit der Referenzmethode verglichen. Dabei wurde die Übereinstimmung beider Methoden hinsichtlich der Detektion von Proben mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml untersucht. Eine

Kappa Statistik (SPSS Statistics 22, IBM) wurde durchgeführt um zu prüfen, ob die beobachtete Übereinstimmung beider Methoden größer war als die allein durch Zufall zu erwartende Übereinstimmung. Weiterhin wurden die diagnostische Sensitivität und Spezifität und der negative und positive prädiktive Wert der qualitativen PCR-Strategie bestimmt. Die relative Effizienz der Minipool-Methode wurde anhand dieser Formel berechnet:

$$\text{Relative Effizienz} = \left(1 - \frac{N_{Tests}}{N_{Proben}}\right) \cdot 100$$

mit N_{Tests} = Zahl der durchgeführten Tests und N_{Proben} = Zahl der gescreenten Proben [118].

2.4.4 Genotypische Resistenztestung

Die PCR-Produkte von vier positiv getesteten Patientenproben wurden sequenziert. Dafür durchliefen die Proben nach der PCR-Amplifikation die Schritte DNA-Aufreinigung (2.2.5), Messung der DNA-Konzentration (2.2.6), Sequenzierung (2.2.7) sowie Alignment, Sequenzanalyse und Resistenzinterpretation (2.2.8). Zwei der Proben sollten während der PCR-Optimierungsphase zeigen, ob die Nested-PCR mit den Primern 5RT LONG C und 4RT ein sequenzierbares PCR-Produkt erzeugte. Weiterhin wurde das PCR-Amplifikat zweier positiv getesteter Patienten der Minipool-Studie sequenziert. Diese beiden Proben durchliefen beispielhaft den gesamten im Testdesign vorgesehenen Prozess, von der gepoolten Testung über die Dekonvolution der positiven Pools bis zur genotypischen Resistenzbestimmung positiv getesteter individueller Patientenproben.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Detektionslimits der Nested-PCR

In diesem Absatz werden für die Optimierung entscheidende Laborergebnisse dargestellt, während der Optimierungsprozess in der Diskussion (Absatz 4.1) ausführlich erläutert wird.

3.1.1 Testung von Verdünnungsreihen

Das Detektionslimit wurde durch die Testung von Verdünnungsreihen mit niedrigen HIV-1 RNA-Konzentrationen bestimmt. Hierfür wurden von sechs Patientenproben Verdünnungsreihen mit einheitlichen RNA-Konzentrationen angefertigt. Jede Verdünnungsstufe einer jeden Verdünnungsreihe wurde doppelt getestet. Dadurch entstanden zwölf binäre Testergebnisse (positiv oder negativ) pro Verdünnungsstufe.

Rechnerisch wurde die absolute Zahl an RNA-Kopien bestimmt, die bei der Testung der

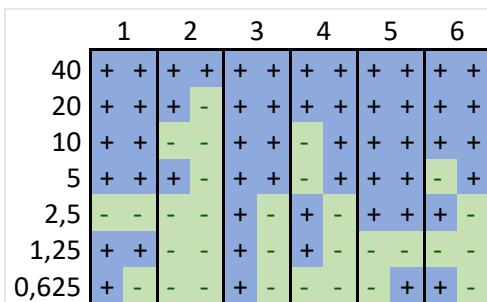


Abbildung 8: Die Verdünnungsreihen sind von 1 - 6 nummeriert. Am linken Rand ist der RNA-Input als absolute Zahl von RNA-Kopien/Reaktion angegeben. Positive Ergebnisse sind blau hinterlegt, negative grün

jeweiligen Verdünnungsstufe in die PCR-Reaktion eingetragen wurde. Es wurden Stufen von 40 Kopien bis 0,625 Kopien getestet.

Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Verdünnungsreihentestung. In Abbildung 9 ist die absolute und prozentuale Zahl positiver Ergebnisse auf die verschiedenen Verdünnungsstufen bezogen.

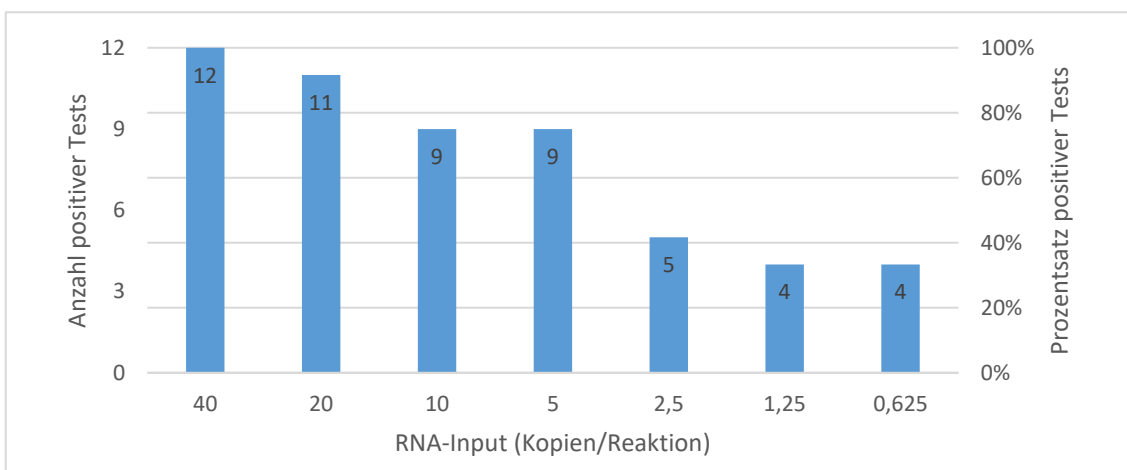


Abbildung 9: Absolute und prozentuale Zahl positiver Ergebnisse pro Verdünnungsstufe

3.1.2 Probit-Analyse zur Bestimmung des Detektionslimits

Zur Auswertung der Daten wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Die damit erzeugte Regressionsgerade ist in Abbildung 10 dargestellt.

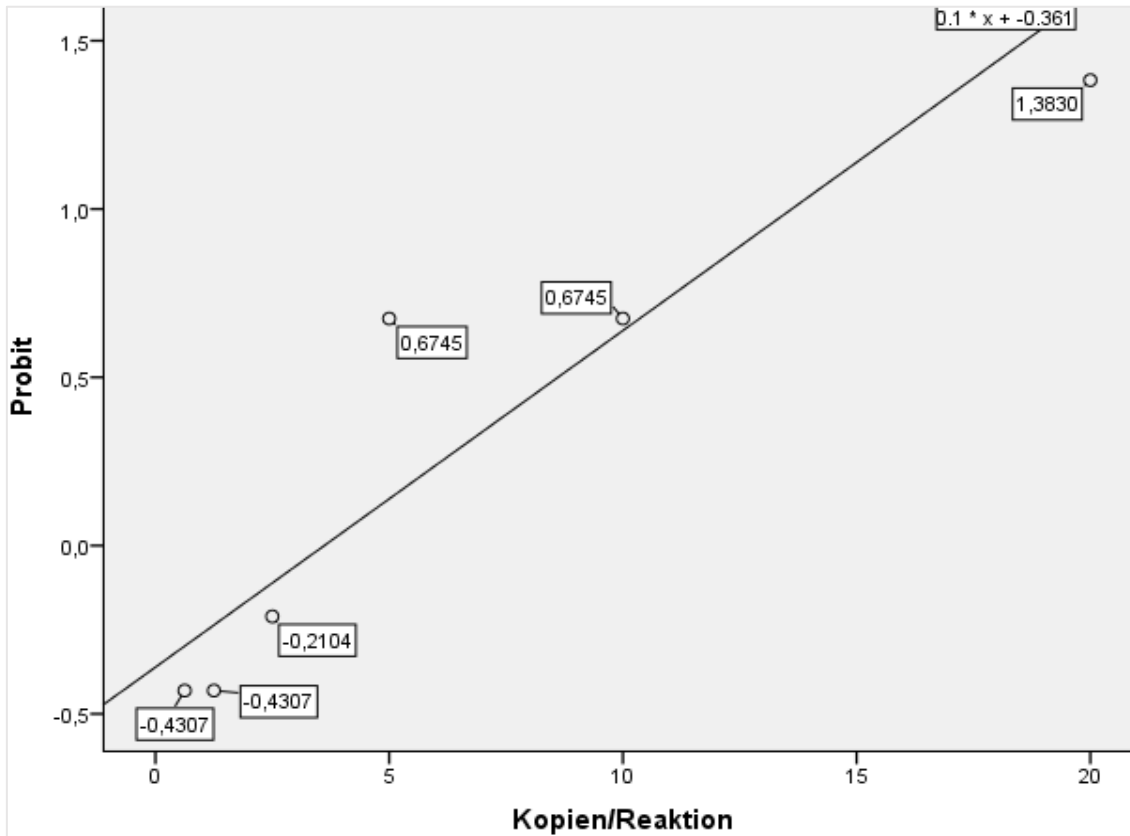


Abbildung 10: Kopien/Reaktion gegen Probit-Werte; die Gleichung der Regressionsgerade ist rechts oben angezeigt

Weiterhin wird durch das Statistikprogramm eine Tabelle ausgegeben, in der die geschätzte Anzahl an RNA-Kopien (inkl. zugehöriger 95 %-Konfidenzgrenzen) aufgeführt ist, die im Reaktionsansatz vorhanden sein muss, um mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit ein positives PCR-Ergebnis zu erzielen. Der Probit-Wert (vgl. Abbildung 10) ist hier in eine prozentuale Wahrscheinlichkeit konvertiert. Die Werte der Tabelle sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt. Wird das Detektionslimit einer Methode als Analytmenge definiert, bei der 95 % der Proben positiv getestet werden, so beträgt das Detektionslimit der optimierten Nested-PCR 20 RNA-Kopien (95 % Konfidenzintervall 14 – 41 Kopien).

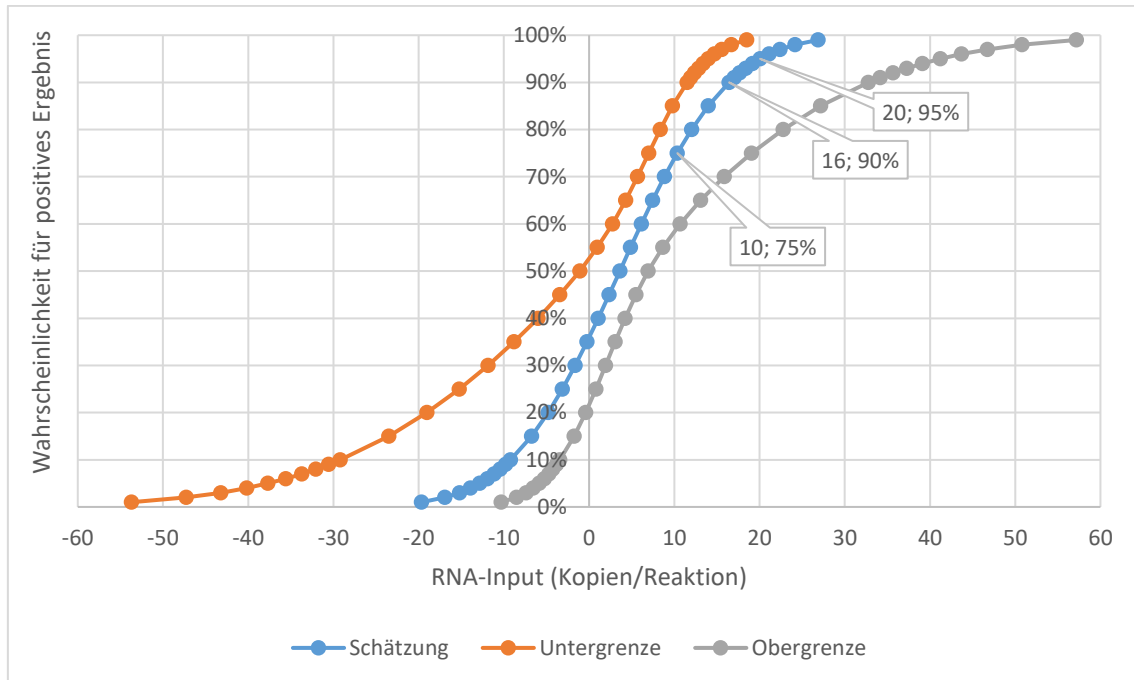


Abbildung 11: Schätzung (blau) und 95 % Konfidenzgrenzen (braun und grau) der RNA-Kopien die notwendig sind, um mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit ein positives PCR-Ergebnis zu erzielen. 20 RNA-Kopien werden zu 95 % positiv getestet, 16 RNA-Kopien zu 90 % und 10 RNA-Kopien zu 75 %.

3.2 Validierung der qualitativen PCR-Minipool-Strategie

3.2.1 Minipool-Studie

3.2.1.1 Studienpopulation und Ergebnisse der Referenzmethode

50 Patientenproben aus der Routine-Viruslasttestung am NHLS Tygerberg wurden in die Studie eingeschlossen. Die mit der Referenzmethode erhobenen quantitativen Viruslastergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst: Der Viruslastbereich detektierbarer Proben erstreckte sich von 43 – 114.845 Kopien/ml. Die mittlere Viruslast betrug 7.942 Kopien/ml.

11 der 50 Patientenproben wiesen eine Viruslast von über 1.000 Kopien/ml auf, die Prävalenz des virologischen Versagens in der Studienpopulation war somit 22 %.

Die Viruslastverteilung in der Studienpopulation ist in Abbildung 12 veranschaulicht.

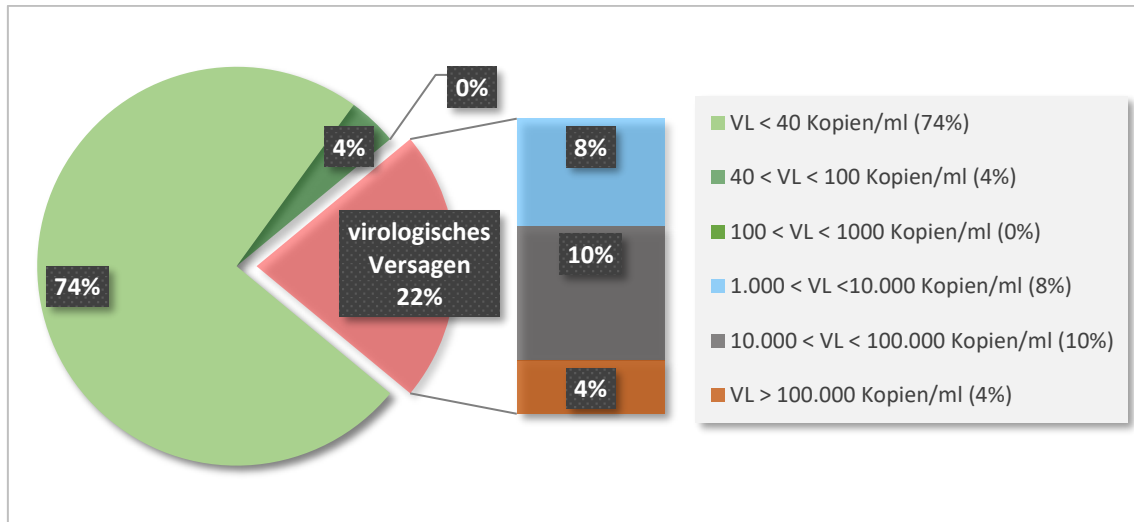


Abbildung 12: Viruslastverteilung in der Studienpopulation

3.2.1.2 Ergebnisse der qualitativen PCR-Minipool-Strategie

Aus den 50 Patientenproben wurden 10 Minipools à 5 Proben erstellt und mit der qualitativen PCR getestet. 7 Pools fielen positiv aus, 3 negativ. Zur Dekonvolution der 7 positiven Pools wurden 35 Patientenproben individuell getestet, wovon 10 positiv ausfielen.

3.2.1.3 Übereinstimmung der Methoden

Als Übereinstimmung wurde gewertet, wenn Proben mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml mit der qualitativen PCR positiv getestet wurden und wenn Proben mit einer Viruslast unter 1.000 Kopien/ml mit der qualitativen PCR negativ getestet wurden. Als Fehlklassifizierung galt hingegen, wenn Proben über 1.000 Kopien/ml mit der qualitativen PCR negativ getestet wurden (falsch negativ) oder wenn Proben unter 1.000 Kopien/ml von der qualitativen PCR positiv getestet wurden (falsch positiv).

Der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigte, dass von den 11 Proben mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml 10 Proben durch die qualitative PCR positiv getestet wurden. Falsch negativ fehlklassifiziert wurde eine Probe mit 8.885 Kopien/ml. Alle der 39 Proben mit einer Viruslast unter 1.000 Kopien/ml wurden durch die qualitativen PCR negativ getestet, es gab also keine falsch positiv getesteten Proben. Jeder der 7 positiv getesteten Pools enthielt mindestens eine Probe mit einer Viruslast über 1.000 Kopien/ml, während alle 3 negativ getesteten Pools ausschließlich Proben mit Viruslasten unter 1.000 Kopien/ml enthielten. Die Pooling-Methode führte also nicht

zum Verpassen von Proben mit virologischem Versagen. Die falsch negativ getestete Probe war Teil eines positiv getesteten Pools. Bei der Dekonvolution dieses Pools wurde eine Probe mit einer Viruslast von 1.191 Kopien/ml positiv getestet, während die Probe mit 8.885 Kopien/ml negativ blieb. Der verbliebene RNA-Extrakt der falsch negativ getesteten Probe wurde mehrfach nachgetestet. In keinem der Tests wurde ein positives Ergebnis erzielt.

Der Methodenvergleich mit 50 Patientenproben ergab nur eine Fehlklassifizierung durch die qualitative PCR-Strategie. Die Übereinstimmung beider Tests bezüglich der Klassifikation der Proben entweder als „virologisches Versagen“ oder „kein virologisches Versagen“ beträgt 98 %. Um zu untersuchen, ob die beobachtete Übereinstimmung beider Methoden größer war, als die allein durch Zufall zu erwartende Übereinstimmung, wurde eine Kappa Statistik durchgeführt. Mögliche Kappa Werte reichen von -1 bis 1, wobei 1 eine perfekte Übereinstimmung, 0 genau die durch Zufall erwartete Übereinstimmung und -1 keine Übereinstimmung bedeutet. Die Kappa Statistik ergab einen Kappa Wert von 0,94. Tabelle 11 zeigt die im Rahmen der Studie erhobenen Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen, die durch Zufall zu erwarten wären.

Tabelle 11: Die Tabelle zeigt die gemessenen Ergebnisse (Anzahl) und jeweils darunter die Zahl der Ergebnisse, die gemäß Kappa Statistik durch Zufall zu erwarten wären (erwartete Anzahl)

			Referenzmethode		Gesamtsumme
			kein virologisches Versagen	virologisches Versagen	
qualitative PCR-Minipool-Strategie	kein virologisches Versagen	Anzahl	39	1	40
		Erwartete Anzahl	31,2	8,8	40,0
	virologisches Versagen	Anzahl	0	10	10
		Erwartete Anzahl	7,8	2,2	10,0
Gesamtsumme		Anzahl	39	11	50
		Erwartete Anzahl	39,0	11,0	50,0

3.2.1.4 Gütekriterien der Klassifikation

Die diagnostische Sensitivität der qualitativen PCR-Strategie für die Detektion von virologischem Versagen war 91 %, der negative prädiktive Wert (NPV) 98 %. Die Spezifität und der positive prädiktive Wert (PPV) betragen jeweils 100 %.

3.2.1.5 Relative Effizienz der Minipool-Methode

Die relative Effizienz beschreibt den prozentualen Anteil eingesparter Tests durch die Minipool-Methode gegenüber der Testung jeder einzelnen Patientenprobe.

Die Minipool-Strategie benötigte 45 Tests für 50 Patientenproben, folglich beträgt die relative Effizienz 10 %.

3.2.1.6 Übersicht der Ergebnisse der Minipool-Studie

Tabelle 12: Ergebnisse der Minipool-Studie

Übereinstimmung mit Referenzmethode	98 %
Kappa Wert	0,94
Diagnostische Sensitivität	91 %
NPV	98 %
Spezifität	100 %
PPV	100 %
Relative Effizienz	10 %

3.2.2 Genotypische Resistenztestung

Die PCR-Produkte von vier positiv getesteten Patientenproben wurden sequenziert. Sequenzdaten aller vier PCR-Produkte konnten erfolgreich generiert werden. Das HIVdb Program (Stanford University) identifizierte alle eingegebenen Sequenzen als Reverse Transkriptase kodierende Genregion von HIV-1 Subtyp C. Jede der Sequenzen enthielt eine oder mehrere Mutationen, die mit Resistenzen gegen NRTIs oder NNRTIs assoziiert sind. In Tabelle 13 sind Viruslastergebnisse, analysierte Codons der Reverse Transkriptase kodierenden Genregion und Resistenzmutationen aller sequenzierten Patientenproben zusammengefasst.

Tabelle 13: Sequenzierte Patientenproben

Probe	Optimierung 1	Optimierung 2	Pool Studie 1	Pool Studie 2
Viruslast [Kopien/ml]	1.488	21.443	114.845	1.191
RT Codons	55 - 230	55 - 231	56 - 230	56 - 230
NRTI Resistenzmutationen	A62AV, M184V	A62AV	A62AV	A62AV
NNRTI Resistenzmutationen	Y181C	K103N	E138K	-

4 Diskussion

Der Nutzen des routinemäßigen Viruslastmonitorings zur Sicherung eines nachhaltigen Erfolgs der antiretroviralen Therapie ist unbestritten. Es verbessert das individuelle Outcome HIV-infizierter Patienten, trägt zur Prävention der HIV-Infektion bei und verringert möglicherweise den Bedarf an teuren Zweit- und Drittlinienmedikamenten [77]. Dies schlägt sich auch in den aktuellen WHO-Empfehlungen zum Therapiemonitoring [38] und den Anstrengungen der UNAIDS Diagnostics Access Initiative¹ und von Médecins Sans Frontières (MSF) zur Steigerung der Verfügbarkeit von Viruslastmonitoring in ressourcenknappen Ländern nieder [119, 120]. Trotz diesen Empfehlungen und Maßnahmen mangelt es noch in vielen Ländern des südlichen Afrikas an Viruslasttests. Es besteht ein hoher Bedarf an der Ausweitung der Verfügbarkeit von Viruslasttestsystemen, welche den Anforderungen dieser Länder gerecht werden. [54, 87, 121]

Obwohl die Viruslasttestung die sensitivste Methode zum Nachweis von virologischem Therapieversagen ist, gibt sie zunächst keine Auskunft über die Ätiologie des Therapieversagens. In Ländern mit gut ausgestattetem Gesundheitssystem ist eine genotypische Resistenztestung bei Therapieversagen Standard, um möglichst schnell eine Auskunft über das Vorliegen von Resistenzmutationen zu bekommen [44, 122]. Auch in ressourcenknappen Ländern wäre dies eine wertvolle Information, jedoch ist die genotypische Resistenztestung aufgrund ihrer hohen Kosten und ihrer Komplexität im Rahmen des Public Health Konzeptes der WHO noch nicht empfohlen [38] und in ressourcenknappen Settings kaum verfügbar [66, 67, 123, 124].

In dieser Arbeit wurde eine kostengünstige und ressourcenextensive Methode zur gepoolten qualitativen Viruslasttestung und nachfolgenden genotypischen Resistenzbestimmung für Länder des südlichen Afrikas vorgestellt.

¹ Die UNAIDS Diagnostics Access Initiative ist ein Zusammenschluss folgender Organisationen: UNAIDS, WHO, Clinton Health Access Initiative (CHAI), United States President's Emergency Plan for AIDS Relief (PEPFAR), Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria, US Centers for Disease Control and Prevention (CDC), African Society for Laboratory Medicine, USAID, UNITAID und UNICEF

4.1 Diskussion des Optimierungsprozesses

4.1.1 Optimierung der PCR für HIV-1 Subtyp C

Tilghman et al. publizierten 2012 ein neuartiges Vorgehen zum kombinierten Nachweis von virologischem Versagen und Resistenzmutationen im Rahmen einer Studie an nordamerikanischen Patienten mit HIV-1 Subtyp B-Infektion. Durch sein kostensparendes und technisch wenig aufwendiges Design ist dieses Konzept jedoch besonders für den Einsatz in ressourcenknappen Regionen geeignet, in denen kommerzielle Viruslast- und Resistenztestung nicht erschwinglich sind. [68]

In dieser Arbeit diente das Konzept von Tilghman et al. 2012 als Vorlage. Das Testdesign wurde für die im südlichen Afrika vorherrschenden Bedingungen optimiert. Berücksichtigt wurde dabei die HIV-1 Subtyp C-Prädominanz dieser Region und die Anforderung einer sensitiven und niederstringenten PCR. Dieser Optimierungsprozess wird im Folgenden erläutert:

Mit den von Tilghman et al. 2012 beschriebenen Primern und einem Durchgang RT-PCR wurde für HIV-1 Subtyp C keine ausreichende analytische Sensitivität erzielt. Beim Alignment der Primer mit HIV-1 Sequenzen der Los Alamos HIV sequence database (QuickAlign) zeigten sich Mismatches mit HIV-1 Subtyp C-Sequenzen. Daraufhin wurden die Primer 5RT long C und 4RT design, die in hochkonservierten Regionen des HIV-1 *pol* Gens binden. Sie sind für HIV-1 Gruppe M Sequenzen unter besonderer Berücksichtigung von Subtyp C optimiert. Beim Design wurde auf einen hohen GC-Gehalt und auf ähnliche T_M -Werte beider Primer sowie auf die Lage der 3'-Enden in hochkonservierten Regionen geachtet. Da das PCR-Produkt positiv getesteter Proben zur genotypischen Resistenzbestimmung genutzt werden sollte, wurden die Primer so design, dass das amplifizierte DNA-Fragment die wichtigsten resistenzassoziierten Mutationen der für die Reverse Transkriptase kodierenden Genregion beinhaltet (vgl. Absatz 2.4.1.2).

Zur weiteren Steigerung der analytischen Sensitivität wurde eine Nested-PCR eingeführt, welche besonders bei der Detektion von Proben mit niedriger Viruslast hilfreich ist [125], aber auch die Spezifität des PCR-Produkts steigert [126]. Für den ersten PCR-Durchgang, welcher reverse Transkription der RNA und Amplifikation der

cDNA in einem Schritt vereint, wurden die von Plantier et al. [117] beschriebenen Primer Mj3 und Mj4 und das Enzym SuperScript® III RT/Platinum® Taq Mix (Invitrogen™) verwendet. Vor der Reversen Transkription wurde ein RNA-Denaturierungsschritt eingeführt, um RNA-Sekundärstrukturen zu beseitigen, welche die Reverse Transkriptase beeinträchtigen können [126-128]. Dieser Denaturierungsschritt beeinflusste in einer vorausgegangenen Arbeit die Menge an erzieltm PCR-Produkt positiv [69]. Die reverse Transkription wurde bei einer moderat erhöhten Temperatur von 50° C durchgeführt, was einen Kompromiss aus vermindertem Auftreten von RNA-Sekundärstrukturen und weiterhin suffizientem Primer-Annealing an die RNA darstellt [126]. Das weitere Protokoll des ersten Durchgangs (vgl. Absatz 2.2.3.1) orientiert sich weitgehend an den Empfehlungen des Enzym-Herstellers [129]. Allerdings wurde der Primer-Input verdoppelt auf eine finale Konzentration von 0,4 µmol/l pro Primer.

Im zweiten Durchgang kamen die Nested-Primer 5RT long C und 4RT und das Enzym GoTaq® DNA Polymerase (Promega) zum Einsatz. Das von Claassen [69] optimierte Protokoll wurde übernommen und geringfügig angepasst (vgl. Absatz 2.2.3.2). Der Primer-Input wurde halbiert auf eine finale Konzentration von 0,8 µmol/l pro Primer. Da das hier amplifizierte Fragment wesentlich kürzer ist als das Nested-Fragment im Protokoll von Claassen, wurde die Synthesezeit auf 60 Sekunden verkürzt. Durch die Wahl relativ niedriger Annealing-Temperaturen (55 °C in beiden Durchgängen) bei einer mittleren T_M der Primer von ca. 62 °C wurden niederstringente Bedingungen für die Primerhybridisierung geschaffen. Dies steigert die Toleranz der PCR gegenüber Primer-Template Mismatches [130, 131]. Die niedrige Stringenz der PCR sollte gewährleisten, dass HIV-Genome, die Mismatches im Bereich der Primerbindungsstellen aufweisen, gleichermaßen amplifiziert werden wie Genome, deren Sequenzen genau komplementär zu den Primersequenzen sind.

Die Zahl der Zyklen wurde im Laufe der Optimierung für beide Durchgänge auf 35 reduziert, wodurch weiterhin gute Ergebnisse bei geringerem Zeitaufwand erzielt wurden.

Ziel des Optimierungsprozesses war es, eine sensitive und wenig stringente PCR zu schaffen, die eine hohe Toleranz gegenüber Primer-Template Mismatches besitzt und

gute Ergebnisse bei der Testung von HIV-1 Subtyp C erzielt. Zusammenfassend wurden bei der Optimierung im Hinblick auf diese Ziele folgende Punkte beachtet:

- Optimierung der Primer
- Einführung einer Nested-PCR
- RNA-Denaturierung vor der reversen Transkription
- Hohe Temperatur während der reversen Transkription
- Relativ niedrige Annealing-Temperaturen

4.1.2 Testung von Verdünnungsreihen und Probit-Analyse

Die Ergebnisse der Testung von Verdünnungsreihen und deren statistische Auswertung durch die Probit-Analyse zeigten das Verhalten der PCR am unteren Ende ihres Detektionsbereichs. Gemäß Abbildung 11 (Absatz 3.1.2) würden 30 Kopien/Reaktion in nahezu 100 % der Fälle positiv getestet. Bei 20 Kopien/Reaktion wäre in 95 % der Fälle ein positives Ergebnis zu erwarten. Aus der Grafik geht weiterhin hervor, dass auch 0 Kopien/Reaktion noch zu 35 % positiv getestet würden, und dass theoretisch ein negativer RNA-Input notwendig wäre, um eine weitere Senkung der Wahrscheinlichkeit positiver Ergebnissen zu erzielen. Hierbei muss beachtet werden, dass es sich um eine Extrapolation der Ergebnisse der Verdünnungsreihentestung handelt. Keineswegs wurden mit der Nested-PCR Proben positiv getestet, die faktisch keine HIV-RNA enthielten (z.B. Negativkontrollen und non template controls).

Dass die durch die Probit-Auswertung vorhergesagte Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses bei 0 RNA-Kopien nicht ebenfalls null beträgt, ist darauf zurückzuführen, dass bei der Testung der Verdünnungsreihen die niedrigste Verdünnungsstufe, mit einem errechneten RNA-Input von 0,625 Kopien, in vier von zwölf Experimenten positiv getestet wurde. Idealerweise sollte für die experimentelle Bestimmung des Detektionslimits die höchste Verdünnungsstufe ausschließlich positive Ergebnisse hervorbringen, während die Analytkonzentration der niedrigsten Verdünnungsstufe so gering ist, dass kein Test mehr positiv wird. Bei der Planung des Experiments wurde davon ausgegangen, dass mit einem errechneten RNA-Input von 0,625 Kopien kein positives PCR-Ergebnis mehr erzielt werden könne. Dass dennoch vier von zwölf Tests dieser Verdünnungsstufe positiv wurden, wäre durch eine sehr hohe analytische

Sensitivität der Nested-PCR zu erklären. Eine andere Erklärung wäre eine moderate Unterquantifizierung der Viruslast der Patientenproben, die zur Anfertigung der Verdünnungsreihen verwendet wurden, durch die Referenzmethode, welche auch schon an anderer Stelle beschrieben wurde [91, 132, 133]. Dies würde bedeuten, dass die reale Viruslast der einzelnen Verdünnungsstufen höher wäre als die aus den Ergebnissen der Referenzmethode errechnete Viruslast. Da die Ergebnisse der qualitativen PCR-Strategie in Übereinstimmung mit der Referenzmethode stehen sollen und andere Ursachen für das Positivwerden der vier Proben nicht ausgeschlossen werden können, wird der möglichen Unterquantifizierung im Folgenden keine Bedeutung beigemessen.

Wäre die niedrigste Verdünnungsstufe ausschließlich negativ getestet worden, so würde die RNA-Input-Wahrscheinlichkeits-Kurve spätestens beim Input von 0 RNA-Kopien den Wahrscheinlichkeitsnullpunkt durchlaufen. Da dies nicht der Fall war, ist das untere Ende der Kurve verzerrt. Dennoch wird angenommen, dass die oberen Anteile der Kurve aussagekräftig sind, da die höchste Verdünnungsstufe ausschließlich positiv getestet wurde und von dort die absteigende Wahrscheinlichkeit positiver Ergebnisse bei sinkendem RNA-Input durch die Probit-Regression simuliert wird. Dies steht im Einklang mit einem Review-Paper über die Validierung von molekularen Tests für Infektionskrankheiten von Eileen M. Burd. Dort wird in einem Beispielexperiment das Detektionslimit eines molekularen Tests mit Hilfe einer Probit-Analyse bestimmt. Die zugrundeliegenden Ergebnisse der Testung von Verdünnungsreihen zeigen, dass auch hier die niedrigste Verdünnungsstufe in 25 % positiv getestet wurde. Dennoch kann die Probit-Regressionsanalyse auf diese Daten angewandt und das Detektionslimit ermittelt werden. [115]

Abbildung 11 (Absatz 3.1.2) macht deutlich, dass es einen Schwellenwert (in Kopien/Reaktion) gibt, über welchem nahezu alle Proben positiv getestet werden, während unterhalb einem niedrigeren Schwellenwert fast alle Proben negativ getestet werden. Zwischen diesen beiden Schwellen gibt es einen Bereich, in dem die Proben intermittierend positiv getestet werden. Dieses Verhalten einer PCR im Bereich niedriger Analytkonzentrationen wurde bereits von Smieja et al. beschrieben [134].

Auch Eileen M. Burd betont, dass es im Bereich niedriger Analytkonzentrationen immer ein Kontinuum der Ungewissheit gibt und die im Rahmen einer Regressionsanalyse bestimmten Cut-offs eine Vereinfachung darstellen [115]. In dieser Arbeit ermöglichten die Ergebnisse der Probit-Analyse ein besseres Verständnis für Lage und Ausdehnung des Bereichs, in welchem Proben intermittierend positiv werden, und halfen so bei der Adaptation der analytischen Sensitivität.

4.1.3 Adaptation der analytischen Sensitivität

In der WHO-Leitlinie zur antiretroviralen Therapie, sowie in den meisten ART-Leitlinien der Staaten des südlichen Afrikas, ist virologisches Therapieversagen als eine Viruslast von über 1.000 Kopien/ml definiert [38, 116]. Im Einklang mit dieser Definition sollte die qualitative PCR-Minipool-Strategie Proben mit einer Viruslast über 1.000 Kopien/ml positiv testen, während Proben mit niedrigerer Viruslast negativ getestet werden sollten. Es galt die analytische Sensitivität der Methode so anzupassen, dass sie diese Differenzierung leisten konnte. Dies sollte durch Verringerung des RNA-Inputs in die PCR erreicht werden, da die Nested-PCR nach der Optimierung zu sensitiv war und auch sehr niedrige Viruslasten detektierte. Andere Möglichkeiten, die analytische Sensitivität zu vermindern, wie z.B. die Erhöhung der Annealing-Temperatur, wurden verworfen, um die Stringenz der PCR bezüglich Primer-Template Mismatches nicht zu erhöhen [130, 131].

Das Resultat der Probitanalyse war, dass die Nested-PCR bei einem RNA-Input von 20 Kopien/Reaktion in 95 % der Fälle positiv ausfallen würde. Würde man nun den RNA-Input so limitieren, dass 2 % der HIV-RNA eines Milliliters Patientenplasma in die Nested-PCR eingetragen würde, so würden von einer Probe mit 1.000 Kopien/ml genau 20 Kopien in die PCR gelangen. Dies hätte eine hohe diagnostische Sensitivität der qualitativen PCR-Strategie zur Folge, da fast alle Proben mit einer Viruslast über 1.000 Kopien/ml positiv getestet würden. Allerdings geht die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses unterhalb von 20 Kopien/Reaktion nicht sofort gegen null. Abbildung 11 (Absatz 3.1.2) ist zu entnehmen, dass 16 Kopien/Reaktion noch in 90 % der Fälle positiv getestet würden. Wenn man, wie oben vorgeschlagen, 2 % der in einem Milliliter vorhandenen RNA in die PCR eintragen würde, entsprächen 16

Kopien/Reaktion einer Ausgangsviruslast von 800 Kopien/ml. Diese Probe sollte eigentlich bereits negativ getestet werden, und nicht in 90 % der Fälle ein positives Testergebnis liefern. Die hohe diagnostische Sensitivität wäre also auf Kosten einer geringen Spezifität erkauft, da es viele falsch positiv getestete Proben im Viruslastbereich unter 1.000 Kopien/ml gäbe. Daher wurde der RNA-Input in die PCR noch weiter reduziert, auf 1 % der HIV-RNA, die in einem Milliliter Patientenplasma enthalten ist. Das bedeutet, dass von einer Probe mit 1.000 Kopien/ml rechnerisch genau 10 Kopien in die PCR eingetragen wurden. Gemäß Abbildung 11 (Absatz 3.1.2) würde eine solche Probe in 75 % der Fälle positiv getestet werden. Eine Probe mit 2.000 Kopien/ml würde zu 95 % positiv getestet werden, während eine Probe mit 500 Kopien/ml in etwa 55 % der Fälle positiv getestet werden würde. Diese Beispiele machen deutlich, dass im Viruslastbereich um 1.000 Kopien/ml immer ein gewisser Teil falsch positiver bzw. falsch negativer Ergebnisse zu erwarten sind. Das Ziel der qualitativen PCR-Minipool-Strategie ist es jedoch, als Screening-Instrument Patienten mit guter Virussuppression, d.h. einer Viruslast unterhalb des Detektionslimits der Referenzmethode (hier 40 Kopien/ml), von virologischen Therapieversagern mit einer Viruslast von über 1.000 Kopien/ml zu unterscheiden.

Der RNA-Input von 1 % der in einem Milliliter Patientenplasma vorhandenen HIV-RNA schien auf der Grundlage der Ergebnisse der Probit-Analyse ein guter Kompromiss zwischen einer akzeptablen diagnostischen Sensitivität und Spezifität zu sein.

Technisch wurde dies folgendermaßen gelöst: Von einer individuellen Patientenprobe wurde 100 µl (entspricht 10 % der in einem Milliliter enthaltenen HIV-RNA) zur RNA-Extraktion gegeben. Die extrahierte RNA wurde in 100 µl Puffer eluiert, wovon wiederum 10 µl (entspricht 1 % der in einem Milliliter enthaltenen HIV-RNA) in die PCR eingetragen wurde. Um der fünffachen Verdünnung individueller Patientenproben in den Minipools Rechnung zu tragen, wurde die HIV-RNA aus 500 µl gepooltem Plasma extrahiert und durch das NucliSens® easyMAG™ System (bioMérieux) fünffach konzentriert (100 µl) ausgegeben. Wiedermum 10 µl dieses RNA-Extraktes dienten als Testmaterial für die PCR. Somit war auch bei der Testung der Pools 1 % der HIV-RNA jeder individuellen Patientenprobe in der PCR vertreten.

4.2 Diskussion der Testvalidierung

4.2.1 Studiendesign

Anschließend an den Optimierungsprozess sollte eine Studie die Übereinstimmung der qualitativen PCR-Minipool-Strategie mit der Referenzmethode untersuchen. Für diese „Proof-of-concept“-Studie wurde Patientenplasma aus der Routine-Viruslasttestung am NHLS Tygerberg verwendet, das nach der Testung durch die Referenzmethode übriggeblieben war. Die zu vergleichenden Methoden wurden also nicht gleichzeitig durchgeführt. Wie auch bei Tilghman et al. 2012 wurden die Ergebnisse beider Methoden retrospektiv verglichen. Während Tilghman et al. 2012 jedoch Proben verwendeten, die zum Teil über 10 Jahre lang gelagert worden waren, waren in dieser Studie die Zeitabstände zwischen der Testung durch die Referenzmethode und der Testung durch die qualitative PCR-Minipool-Strategie relativ gering. Die Herstellung der Pools und die Nukleinsäureextraktion erfolgte maximal 24 Stunden nach der Testung der Proben durch die Referenzmethode, und die extrahierte RNA wurde bis zur Durchführung der PCR für maximal 3 Wochen bei -20 °C aufbewahrt. Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Stabilität von HIV-RNA, die zu dem Ergebnis kommen, dass sich die Viruslast bei Lagerung von EDTA-Plasma bei Raumtemperatur oder 4 °C für 24 bis 48 Stunden und selbst bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen nicht signifikant verändert [135-137]. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Unterschiede in der Präanalytik beider Methoden keinen systematischen Fehler bedingten und keinen relevanten Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Proben hatten. Um Zeit zu sparen, wurde die Nukleinsäureextraktion von Minipools und individuellen Proben parallel durchgeführt. In Anbetracht der Lagerungsfähigkeit von HIV-RNA in EDTA-Plasma könnte man bei Anwendung des Konzeptes in ressourcenknappen Regionen die individuellen Patientenproben bis zum Erhalt der Ergebnisse der Pooltestung bei 4 °C aufbewahren, um dann nur jene Proben weiterzubearbeiten, die in einem positiv getesteten Pool enthalten sind. 50 Patientenproben wurden in 10 Minipools à 5 Proben getestet. Diese erste Validierung sollte zeigen, ob die optimierte qualitative PCR-Minipool-Strategie eine gute Übereinstimmung mit der Referenzmethode zeigte. Eine umfangreichere Validierung der Methode folgte daraufhin in einer Studie mit 300

Patientenproben, die 2014 im Journal of Clinical Virology publiziert wurde [138]. Das Konzept zur kombinierten Testung von virologischem Versagen und Medikamentenresistenzen, das von Tilghman et al. vorgeschlagen und in dieser Arbeit für die Bedingungen im südlichen Afrika optimiert wurde, sieht die genotypische Resistenztestung aller positiv getesteten Proben vor. In dieser Machbarkeitsstudie wurden beispielhaft vier positiv getestete Patientenproben sequenziert und auf das Vorliegen von genotypischen Medikamentenresistenzen untersucht.

4.2.2 Minipool-Studie

Die qualitative PCR-Minipool-Strategie klassifizierte 49 von 50 südafrikanische Patientenproben in Übereinstimmung mit der Referenzmethode bezüglich des Vorliegens einer Viruslast von über oder unter 1.000 Kopien/ml. Der Kappa Wert von 0,94 spricht dabei für eine exzellente Übereinstimmung beider Methoden jenseits des Zufalls [115, 139]. Nur eine Probe mit einer Viruslast von 8.885 Kopien/ml wurde mit der qualitativen PCR falsch negativ getestet. Von dieser Probe standen drei weitere Aliquote extrahierter RNA zur Verfügung, die erneut getestet wurden. Eine Amplifikation blieb weiterhin aus. Es sind verschiedene Gründe für die Fehlklassifizierung dieser Probe denkbar. Eine wahrscheinliche Erklärung sind Primer-Template Mismatches, die bei der Amplifizierung der genetisch hochdivergenten HIV-Genome ein bekanntes Problem darstellen [138, 140], zumal nicht ausgeschlossen ist, dass es sich bei dieser Probe um einen anderen HIV-1 Subtyp als Subtyp C handelte. Auch technische Fehler, z.B. bei der Nukleinsäureextraktion, wären eine mögliche Erklärung.

In der Minipool-Studie gab es ein falsch negatives, aber kein falsch positives Ergebnis. Man könnte daher argumentieren, dass die PCR zu wenig sensitiv sei und die analytische Sensitivität durch eine Erhöhung des RNA-Inputs angehoben werden müsse. Es ist jedoch zu beachten, dass in der Studie keine Proben mit Viruslasten zwischen 100 und 1.000 Kopien/ml vertreten waren, wohl aber Proben mit Viruslasten zwischen 1.000-10.000 Kopien/ml. Diese Verteilung senkte möglicherweise die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse. Dass die analytische Sensitivität der Methode nicht tendenziell zu niedrig ist, legen auch die Ergebnisse einer nachfolgenden Studie nahe. Newman et al. (2014) validierten die hier beschriebene Methode in einer Studie an 300

südafrikanischen Patientenproben. In Vorexperimenten wurde eine hohe Zahl an falsch positiven Ergebnissen festgestellt, weshalb der RNA-Input in die RT-PCR sogar nochmals reduziert wurde auf 0,5 % der in einem Milliliter Patientenplasma enthaltenen RNA. Selbst diese weitere Reduktion des RNA-Inputs führte bei Newman et al. 2014 zum Überwiegen der falsch positiv klassifizierten über die falsch negativ klassifizierten Patientenproben. [138]

Die diagnostische Sensitivität der qualitativen PCR-Minipool-Strategie für die Detektion von virologischem Versagen betrug in dieser Arbeit 91 %. Tilghman et al. erzielten mit ihrer 2012 beschriebenen qualitativen PCR nach einem PCR-Durchgang eine diagnostische Sensitivität und Spezifität von 100 % für die Detektion von Pools, die mindestens eine Probe mit einer Viruslast über 1.000 Kopien/ml beinhalten. Jedoch wurde aufgrund von unzureichenden Probenvolumina keine Dekonvolution positiver Pools durchgeführt, sodass keine Aussage über die Güte der Methode für die Detektion individueller Patientenproben mit virologischem Versagen möglich ist. Weiterhin war die Prävalenz von virologischem Versagen in der nordamerikanischen Studienpopulation mit 1,4 % sehr gering. Die absolute Zahl von 4 Patientenproben mit virologischem Versagen in der 295 Proben umfassenden Studienpopulation von Tilghman et al. war damit wesentlich kleiner als die 11 Proben mit virologischem Versagen in unserer Studienpopulation.

In dieser Arbeit wurde das von Tilghman et al. 2012 vorgeschlagene Konzept in einem Setting mit HIV-1 Subtyp C-Prädominanz und hoher Prävalenz von virologischem Versagen optimiert und validiert. Mit einem negativen prädiktiven Wert von 98 % und einer Spezifität und einem positiven prädiktiven Wert von jeweils 100 % konnte gezeigt werden, dass sich dieses Konzept erfolgreich auf die Gegebenheiten im südlichen Afrika übertragen ließ.

Die Pooling-Strategie erzielte in dieser Studie eine relative Effizienz von 10 %. Das bedeutet, 10 % der Tests konnten durch die Pooling-Strategie im Vergleich zur Testung jeder einzelnen Patientenprobe gespart werden. Die Effizienz von Pooling-Strategien ist abhängig von der Größe der Pools und der Prävalenz des gesuchten Merkmals. In dieser Arbeit betrug die Prävalenz des virologischen Versagens 22 %. Eine mathematische

Simulation verschiedener Poolstrategien von May et al. errechnet eine relative Effizienz kleiner 10 % für Fünferpools, wenn die Prävalenz des virologischen Versagens 22 % beträgt [118]. Wäre die Prävalenz des virologischen Versagens in der zu screenenden Population tatsächlich 22 %, so könne die relative Effizienz der Pooling-Strategie durch eine Reduktion der Poolgröße auf 3 Proben pro Pool erhöht werden. Doch selbst dadurch wäre gemäß mathematischer Modelle lediglich eine relative Effizienz zwischen 10 % und 20 % zu erreichen [118, 141]. Daher müsste in einem solchen Setting grundsätzlich diskutiert werden, ob die Einsparung von 10 – 20 % der nötigen Tests die Nachteile einer Pooling-Strategie aufwiegen würde. Nachteile des Poolens sind z.B. die längere Zeit bis zum endgültigen Ergebnis von Proben, welche sich in positiv getesteten Pools befinden, der zusätzliche Arbeitsaufwand für das Erstellen der Pools und die Fehlerquellen bei der Durchführung.

Es ist davon auszugehen, dass Patientenproben mit virologischem Versagen in dieser Studie überrepräsentiert waren. 2010 publizierten van Zyl et al. Ergebnisse von 2546 Patientenproben, die von 2008 bis 2009 am NHLS Tygerberg im Rahmen der routinemäßigen Viruslasttestung erhoben wurden. Die Prävalenz des virologischen Versagens betrug hier 14,2 %. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass durch Vorselektion von Patienten mit einer niedrigen Vortestwahrscheinlichkeit für virologisches Versagen dessen Prävalenz im selektierten Kollektiv deutlich gesenkt werden konnte, wodurch wiederum die Effizienz der Pooling-Strategie stieg. [142]

Die Validierung der qualitativen PCR-Minipool-Strategie durch Newman et al. 2014 an 300 Patientenproben aus dem NHLS Tygerberg ergab eine Prävalenz des virologischen Versagens von 8,7 %. Die Minipool-Strategie erzielte in dieser Studie eine relative Effizienz von 43 %. [138]

Der Nutzen einer Pooling-Strategie sowie die optimale Poolgröße müssen von der Prävalenz des virologischen Versagens in der Patientenpopulation und von lokalen Gegebenheiten abhängig gemacht werden. Die hier präsentierte Methode bietet aufgrund der Kenntnis um das Detektionslimit der PCR die Flexibilität, durch Variation des RNA-Inputs die analytische Sensitivität der PCR an die erforderliche Poolgröße bzw. an die individuelle Testung anzupassen.

4.3 Limitationen und Stärken der Methode

4.3.1 Limitationen

Eine Besonderheit der hier vorgestellten Methode ist, dass für den Viruslastnachweis amplifiziertes PCR-Produkt positiv getesteter Proben anschließend zum genotypischen Nachweis von Resistenzmutationen verwendet werden kann. Diese elegante Strategie birgt jedoch eine systeminhärente Limitation. Denn die Primer für den Viruslastnachweis binden in einer Genregion, die für das Therapieziel Reverse Transkriptase kodiert. Entsteht in dieser Region eine Mutation, welche die Resistenz des Virus gegen die eingesetzten Medikamente erhöht, so erfährt die Virusmutante unter Therapie einen Selektionsvorteil gegenüber Wildtyp-Viren [24]. Bei Patienten mit Therapieversagen sind Mutationen also besonders in Regionen zu erwarten, die für Therapieziele kodieren. Liegen diese Mutationen im Bereich der Primerbindungsstellen, führt dies zu Primer-Template Mismatches und somit womöglich zur präferentiellen Amplifikation nichtresistenter Viren oder sogar zur falsch negativen Testung der Probe durch die qualitative PCR. Zwar wurde darauf geachtet, dass die Primer in hochkonservierten Regionen binden und die PCR eine niedrige Stringenz besitzt. Auch erzielte dieses Testdesign in der vorliegenden Arbeit und in der Arbeit von Newman et al. 2014 eine gute Übereinstimmung mit der Referenzmethode [138]. Bislang wurden jedoch nur die Ergebnisse der Viruslasttestung mit der Referenzmethode verglichen, nicht jedoch die Ergebnisse der genotypischen Resistenztestung mit einem anderen Verfahren. Daher sollte in weiteren Studien überprüft werden, ob es im Rahmen der Viruslasttestung zum systematischen Verpassen von Viren mit Resistenzmutationen oder zur präferentiellen Amplifikation von Viren ohne solcher Mutationen kommt.

Eine weitere Limitation ist der Ausschluss der NRTI-Resistenzmutation M41L aus der genotypischen Resistenztestung. Abbildung 7 (Absatz 2.4.1.2) zeigt, dass diese Mutation außerhalb des im zweiten PCR-Durchgang amplifizierten Nested-Fragments liegt, welches im Rahmen der genotypischen Resistenzbestimmung sequenziert wird. M41L bedingt in Kombination mit T215Y (eine NRTI-Resistenzmutation, die von unserer Methode erfasst wird) eine moderate bis hohe Resistenz gegen die NRTIs AZT und D4T [143], beide aus der Gruppe der Thymidin-Analoga [144]. M41L kommt laut Daten der

Stanford HIV Drug Resistance Database bei HIV-1 Subtyp C-infizierten Patienten mit Therapieversagen unter NRTI/NNRTI-Regime in 9,2 % vor, als isolierte Mutation jedoch nur in 2,2 % [145]. Am NHLS Tygerberg wurde M41L bei Therapieversagern unter Thymidin-Analogon basiertem Regime sogar nur in 2,8 % gefunden und nur in einem Viertel dieser Fälle stellte sie die einzige Thymidin-Analogon-Mutation dar [138, 146].

Die NNRTI-Resistenzmutation M230L ist theoretisch im Nested-Fragment enthalten. Das Codon 230 auf dem Reverse-Transkriptase kodierenden Gen wurde in jeder der vier sequenzierten Patientenproben miterfasst (vgl. Tabelle 13 in Absatz 3.2.2). Durch die Lage am äußersten Rand des Nested-Fragments liegt es jedoch im Bereich einer Primerbindungsstelle. Bei der Sequenzierung wird daher in diesem Bereich die Primersequenz bestimmt und nicht die Sequenz des zugrundeliegenden HIV-Genoms. Weiterhin ist problematisch, dass durch die Lage der Mutation im Bereich der Primerbindungsstelle die oben erwähnten Konsequenzen von Primer-Template-Mismatches während der PCR-Amplifikation auftreten können. Allerdings findet sich M230L nur in 3,5 % der therapieversagenden HIV-1 Subtyp C-Patienten, die mit einem NNRTI behandelt werden und extrem selten als alleinige NNRTI-Mutation [138, 147]. Auf der Grundlage dieser Daten wird davon ausgegangen, dass der Ausschluss der beiden Resistenzmutationen die klinische Aussagekraft der genotypischen Resistenztestung nicht wesentlich beeinträchtigte.

Zwei Schritte der Methode, wie sie in dieser Arbeit beschrieben ist, sind auf Infrastruktur angewiesen, die in ressourcenknappen Ländern nur in zentralen Referenzlaboren vorhanden ist. Dies stellt eine Limitation bei der Implementierung der Methode in einem ressourcenknappen Setting im südlichen Afrika dar. Zum einen wurde die Nukleinsäureextraktion in dieser Arbeit mit dem automatisierten NucliSens® easyMAG™ System von bioMérieux (vgl. Absatz 2.2.2) durchgeführt. Um den Gegebenheiten eines einfacher ausgestatteten Labors gerecht zu werden, könnte die Nukleinsäureextraktion jedoch auf ein manuelles System umgestellt werden [148].

Genotypische Resistenzbestimmungen sind in ressourcenknappen Regionen des südlichen Afrikas außerhalb von Referenz- und Forschungslaboren und der privaten Gesundheitsversorgung kaum verfügbar [66-68]. Würde die qualitative PCR-Minipool-

Strategie zum Screening auf virologisches Therapieversagen in einem dezentralen Labor eingesetzt werden, so könnte die genotypische Resistenztestung im Rahmen einer Kooperation mit einem Forschungs- oder Referenzlabor wie dem NHLS Tygerberg organisiert werden. Das PCR-Amplifikat positiv getesteter Proben würde zur Sequenzierung und Resistenzanalyse an das Kooperationslabor geschickt werden, was eine logistische Herausforderung für Proben- Ergebnistransfer bedeuten würde, andererseits aber die zentrale Erfassung zirkulierender Resistenzmutationen vereinfachen würde.

In dieser Arbeit wurde eine Methode vorgestellt, die eine kostengünstige und ressourcenextensive Alternative zu kommerziellen Systemen für die Viruslasttestung und genotypische Resistenztestung bieten soll. Eine Limitation der Studie ist jedoch, dass keine Kostenanalyse durchgeführt wurde. Eine Kostenschätzung in der Publikation von Newman et al. 2014 vermittelte eine grobe Vorstellung der Kosteneffizienz der Methode [138]. Letztendlich kann eine präzise Kostenanalyse jedoch erst in dem Setting durchgeführt werden, in welchem die Methode implementiert werden soll, da die Kosten maßgeblich durch lokale Faktoren beeinflusst werden. Ein wichtiger Faktor ist die Prävalenz des virologischen Versagens in der Population, woraus sich wiederum ableitet, ob eine Pooling-Strategie überhaupt sinnvoll ist. In weiteren Studien müssen daher die Kosten der Methode im Rahmen konkreter Projekte im südlichen Afrika evaluiert werden.

4.3.2 Stärken

In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien vorgestellt, um im Hinblick auf den Bedarf ressourcenknapper Länder die Kosten und die Komplexität von Viruslastmonitoring und genotypischer Resistenztestung zu senken. Gepoolte Viruslasttestung führte zur Einsparung von Tests und erzielte negative prädiktive Werte von über 90 % für die Detektion von virologischem Versagen [118, 149, 150]. Qualitative statt quantitative Testung reduzierte die Komplexität der Viruslastbestimmung [151]. Die Sequenzierung eines möglichst kurzen Abschnitts der für die Reverse Transkriptase kodierenden Region auf dem *pol* Gen, der alle wichtigen NRTI- und NNRTI-Resistenzmutationen beinhaltet, senkte die Kosten der genotypischen Resistenztestung

im Vergleich zu anderen kommerziellen und laborentwickelten Assays [66]. Tilghman et al. stellen 2012 ein Konzept vor, das alle diese Ansätze vereinte: Eine qualitative PCR zur Viruslastbestimmung gepoolter Proben, wobei ein Abschnitt der für die Reverse Transkriptase kodierenden Genregion amplifiziert wurde, der bei Verdacht auf virologisches Therapieversagen zum Nachweis wichtiger Resistenzmutationen sequenziert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Konzept erfolgreich für HIV-1 Subtyp C optimiert und in einem südafrikanischen Setting validiert. Neben einer qualitativen Aussage über die Viruslast bietet die Methode Informationen über das Vorliegen von Resistenzmutationen. Diese Informationen sind für den behandelnden Arzt wichtiger als ein quantitatives Viruslastergebnis, wenn es um die Entscheidung über die Notwendigkeit einer Umstellung der antiretroviralen Therapie auf ein Zweitlinienregime geht. Und über das individuelle Patientenmanagement hinaus ist die genotypische Resistenztestung ein wichtiges Public Health Instrument für die Erfassung der Verbreitung von Resistenzmutationen innerhalb einer Population [123]. Ein großer Vorteil dieser Arbeit ist die Bestimmung des Detektionslimits der qualitativen PCR. Mit dem Wissen um die Zahl von HIV-RNA Kopien, die notwendig sind um mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit ein positives PCR-Ergebnis zu erzielen, kann die analytische Sensitivität der Methode an verschiedenste Anforderungen angepasst werden. Tilghman et al. erzielten mit einem PCR-Durchgang eine hervorragende diagnostische Sensitivität und Spezifität für die Detektion von Therapieversagern, wenn Fünferpools getestet wurden und Therapieversagen als Viruslast größer 1.000 Kopien/ml definiert war. Wurden niedrigere Schwellenwerte für virologisches Therapieversagen definiert, so konnten durch die Hinzunahme eines zweiten PCR-Durchgangs der Sensitivitätsverlust nicht kompensiert werden [68]. Die Variation der Anzahl der PCR-Durchgänge erwies sich nicht als erfolgreich, um die analytische Sensitivität der PCR anzupassen. In dieser Arbeit wurde der RNA-Input in die PCR als Variable bei der Anpassung der analytischen Sensitivität an verschiedene Anforderungen gewählt. So wurde die extrahierte RNA individueller Patientenproben im Vergleich zum RNA-Extrakt der Minipools fünffach verdünnt in die PCR eingetragen. Dadurch wurde der fünffachen Verdünnung individueller Proben in den Minipools

Rechnung getragen, sodass die analytische Sensitivität bei der Pooltestung und der individuellen Testung gleich war. Dies ermöglichte die akkurate Dekonvolution positiver Pools. Ist die analytische Sensitivität der Methode zu hoch oder zu niedrig, oder soll virologisches Therapieversagen anders definiert werden, so erlaubt die Methode die informierte Anpassung der analytischen Sensitivität über den RNA-Input. Dies geschieht auf der Grundlage der Probit-Auswertung, welche die Wahrscheinlichkeit positiver PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit vom RNA-Input darstellt. Soll die hier vorgestellte Methode in einem neuen Setting implementiert werden, oder werden neue Nested-Primer eingesetzt, um die genotypische Erfassung weiterer Resistenzmutationen möglich zu machen, so kann durch eine erneute Verdünnungsreihentestung und Probit-Analyse nach dem Vorbild dieser Arbeit die Wahrscheinlichkeit positiver PCR-Ergebnisse bei verschiedenen RNA-Inputs neu ermittelt werden. Gemäß der lokalen Definition für virologisches Versagen und der gewünschten Poolingstrategie kann der RNA-Input im Anschluss festgelegt werden. Dieses Vorgehen ermöglicht eine hohe Flexibilität und Anpassungsfähigkeit der Methode an die verschiedenen Gegebenheiten ressourcenknapper Länder im südlichen Afrika.

4.4 Aktuelle Entwicklungen und Ausblick

Während bisher versucht wurde, Schritt für Schritt Erfolge im Kampf gegen HIV und AIDS zu erreichen, ist das Ziel in der Ära nach 2015 kein geringeres, als die AIDS-Pandemie bis 2030 zu beenden [86]. Auf diesem Weg spielt der präventive Effekt der antiretroviralen Therapie auf die Übertragungswahrscheinlichkeit von HIV eine entscheidende Rolle [54]. Die UNAIDS 90-90-90 Ziele sehen vor, dass 2020 90 % der HIV-infizierten Menschen ihren HIV-Status kennen, von denen wiederum 90 % antiretrovirale Therapie erhalten, die bei 90 % der therapierten Menschen zur Virussuppression führt. Mathematische Modelle zeigen, dass die Umsetzung dieser Ziele, im Verbund mit Präventionsmaßnahmen, die HIV-Inzidenz und die AIDS-assoziierte Mortalität bis 2030 um 90 % senken könnte, was das Ende der HIV/AIDS-Pandemie als globales Gesundheitsproblem bedeuten würde [86, 152]. 10-30 % der Patienten unter Erstlinien-ART entwickeln im Laufe der Zeit ein virologisches Therapieversagen [67, 153-156].

Therapieversager müssen identifiziert und wenn nötig auf ein Zweitlinientherapieregime umgestellt werden. Eine Virussuppression bei 90 % aller Patienten unter ART, wie von UNAIDS gefordert, kann daher nur durch universellen Zugang zu routinemäßigem Viruslastmonitoring erreicht werden. Auf dem Weg dorthin gibt es zahlreiche vielversprechende Entwicklungen. Dazu gehört die Reduktion des CD4-Zellzahl-Monitorings zugunsten der Viruslastbestimmung. In Südafrika wurde die CD4-Zellzahl-Bestimmung bei Patienten, die stabil unter ART sind, eingestellt. Dadurch konnten massive Kosteneinsparungen erreicht werden. Diese Maßnahme steht im Einklang mit der aktuellen WHO-Leitlinie und wird inzwischen auch von anderen afrikanischen und asiatischen Staaten empfohlen, wenn Viruslastmonitoring verfügbar ist. [38, 77, 157]

Kommerzielle Systeme zur Viruslasttestung werden immer günstiger. 2014 verkündete die UNAIDS Diagnostics Access Initiative eine Vereinbarung mit Roche über einen Höchstpreis für Viruslasttests von weniger als 10 US\$ in 83 Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen [77]. Zwischen dem „Globalen Fonds zur Bekämpfung von AIDS, Tuberkulose und Malaria“ und sieben führenden Diagnostikherstellern wurden 2015 Rahmenvereinbarungen getroffen mit dem Ziel, den Markt für Viruslasttests transparenter und kompetitiver zu machen und Kosten dadurch maßgeblich zu senken [88]. Mehrere Point-of-care-Viruslasttests befinden sich in der Entwicklung oder sind bereits auf dem Markt verfügbar. Im Sinne der Dezentralisierung des Viruslastmonitorings sollen diese Systeme eine klinische Entscheidungsfindung auf der Basis eines Viruslastergebnisses noch während des Patientenbesuchs ermöglichen. Dabei stellen sie minimale Anforderungen an Bedienung und Infrastruktur. Den Problemen zentralisierter Viruslasttestung wie Probentransport, Ergebnisübermittlung und der Gefahr, dass der Patient im Laufe des Prozesses aus dem Versorgungsprogramm ausscheidet, kann mit diesen Technologien begegnet werden. [88, 158]

Médecins Sans Frontières (MSF) führte von 2013-2016 eine Initiative zur Steigerung der Verfügbarkeit von Viruslastmonitoring in sieben afrikanischen Ländern durch. 2016 wurden die Projekte evaluiert und ein Bericht über die Studienergebnisse und die gewonnenen Erfahrungen publiziert. Es wurden sowohl kommerzielle

Hochdurchsatzsysteme als auch „beinahe“-point-of-care-Systeme eingesetzt. MSF kommt zu dem Schluss, dass die universelle Verfügbarkeit von Point-of-care-Systemen unwahrscheinlich bleibt und setzt daher für die Zukunft auf einen Mix an Technologien unter Berücksichtigung lokaler Gegebenheiten. Systeme zur Resistenztestung wurden in den MSF-Projekten nicht implementiert, eine Aussage über das Vorliegen von Resistenzmutationen lag den behandelnden Ärzten also nicht vor. Daher wurde der WHO-Algorithmus zur Klärung der Ätiologie von virologischem Versagen angewandt: Wird eine erhöhte Viruslast gemessen, so erhält der Patient eine Adhärenzberatung und wird zur erneuten Viruslasttestung in drei Monaten einbestellt. Ist nach dieser Zeit die Viruslast trotz der Adhärenzintervention erhöht, so wird von Resistenzmutationen ausgegangen und die ART auf ein Zweitlinienregime umgestellt.

Die MSF-Analyse der Umsetzung des Algorithmus zeigte, dass auf jeder Ebene Patienten verloren gingen. So betrug die Wahrscheinlichkeit, nach einem initial erhöhten Viruslastwert einen zweiten Test zu erhalten, zwischen 23 % und 71 %. Wurde beim zweiten Test eine persistierend hohe Viruslast festgestellt, so erfolgte eine leitliniengerechte Umstellung auf ein Zweitlinienregime in 10 % - 68 % der Fälle. [159, 160]

Die in dieser Arbeit vorgestellte PCR-Minipool-Strategie bietet neben einer qualitativen Aussage über die Viruslast die Möglichkeit einer genotypischen Resistenztestung positiver getesteter Proben. Der Einsatz in einem ressourcenknappen Setting wäre im Rahmen einer Kooperation mit einem Referenzlabor möglich. Bei einem positiven Testergebnis für virologisches Versagen könnte bei dem Patienten eine Adhärenzberatung begonnen werden. Das PCR-Produkt würde dann zur genotypischen Resistenzbestimmung an das Referenzlabor gesendet werden. Eine erneute Blutentnahme oder PCR-Amplifikation der viralen RNA wäre dafür nicht nötig. Werden bei der Resistenztestung Medikamentenresistenzen nachgewiesen, die einen Therapieregimewechsel nötig machen, so könnte dieser sofort erfolgen. Im Vergleich zum WHO-Algorithmus würde die Zeit bis zum Therapieregimewechsel verkürzt und der zweite Viruslasttest einspart werden.

Die Methode stellt gewisse infrastrukturelle Anforderungen, wie kontinuierliche Stromversorgung, Tiefkühlung der Reagenzien, für molekulare Diagnostik geeignete Räumlichkeiten und geschultes Laborpersonal. Die Durchführung der Viruslastbestimmung bedarf jedoch nur sehr einfacher Geräte, die zur Grundausstattung eines molekulardiagnostischen Labors gehören. Dadurch entfallen bei der Implementierung die Kosten für die Anschaffung teurer und hochspezialisierter Geräte, wie sie für die Durchführung kommerzieller Tests benötigt werden. Aufgrund des vorrangig auf HIV-1 Subtyp C ausgerichteten Testdesigns könnte die qualitative PCR-Minipool-Strategie im südlichen Afrika, aber auch in Äthiopien und Indien eingesetzt werden [19].

Langfristig werden kommerziell verfügbare Hochdurchsatz- und Point-of-care-Systeme zum Standard beim Viruslastmonitoring in ressourcenknappen Regionen werden. Sie bieten automatisierte Abläufe und durchlaufen offizielle Zulassungsverfahren. Bis zu ihrer flächendeckenden Verfügbarkeit im südlichen Afrika ist es jedoch noch ein weiter Weg. MSF-Schätzungen zufolge hatten Ende 2015 in Swasiland 70 %, in Malawi 83 % und in Simbabwe 90 % der Patienten keinen Zugang zu Viruslastmonitoring [159]. Diese Menschen brauchen schon jetzt angepasste und unkomplizierte Strategien zum Monitoring der Wirksamkeit ihrer antiretroviralen Therapie. Die qualitative PCR-Minipool-Strategie wurde für einen solchen Einsatz entworfen. 2014 wurde sie im *Journal of Clinical Virology* publiziert [138]. In weiteren Studien soll der Nutzen der Methode bei ihrer konkreten Anwendung in ressourcenknappen Regionen evaluiert werden.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Die weltweit höchsten HIV-Prävalenzen finden sich im südlichen Afrika. In den letzten Jahren gelang in dieser Region die massive Ausweitung der Verfügbarkeit antiretroviraler Medikamente – ein großer Erfolg im Kampf gegen HIV und AIDS. Doch nur durch regelmäßiges Viruslastmonitoring können die Therapieerfolge nachhaltig gesichert werden. In vielen Ländern des südlichen Afrikas ist die Verfügbarkeit von Viruslasttests noch unzureichend. Gründe dafür sind die hohen Kosten und die Komplexität kommerzieller Testsysteme. Als Alternative für ressourcenknappe Regionen wurde eine qualitative PCR-Minipool-Strategie zum kombinierten Nachweis von virologischem Versagen und Medikamentenresistenzen vorgeschlagen. In dieser Arbeit sollte diese Methode an die Gegebenheiten des südlichen Afrikas adaptiert und im Rahmen einer Studie validiert werden.

Methoden: Die qualitative PCR wurde zunächst für HIV-1 Subtyp C optimiert. Dafür wurden Primer designt und in eine Nested-PCR integriert. Das Detektionslimit der optimierten Methode wurde bestimmt, um den HIV-1 RNA-Eintrag in die RT-PCR so abstimmen zu können, dass trotz der qualitativen Natur der PCR eine Unterscheidung zwischen hoch- und niedrigpositiven Proben möglich war. Im Rahmen einer Studie an 50 südafrikanischen Patientenproben wurde die qualitative PCR-Minipool-Strategie mit der Referenzmethode verglichen. An einigen positiv getesteten Proben wurde eine genotypische Resistenztestung durchgeführt.

Ergebnisse: Das Detektionslimit der Nested-PCR betrug 20 RNA-Kopien. Daraus wurde der optimale RNA-Eintrag in die RT-PCR abgeleitet. 50 Patientenproben wurden in 10 Minipools à 5 Proben getestet, anschließend erfolgte die Dekonvolution der 7 positiven Pools. Die qualitative PCR-Minipool-Strategie detektierte 10 der 11 Patientenproben mit einer Viruslast über 1.000 Kopien/ml. Die Übereinstimmung mit der Referenzmethode betrug 98 %, die diagnostische Sensitivität für die Detektion von Therapieversagern betrug 91 %, der negative prädiktive Wert 98 %. Die Spezifität und der positive prädiktive Wert betragen jeweils 100 %. Durch die Minipool-Methode konnten 10 % der Tests eingespart werden. Vier positiv getestete Patientenproben wurden der genotypischen

Resistenztestung durchgeführt. Alle wurden erfolgreich sequenziert und resistenzassoziierte Mutationen wurden identifiziert.

Schlussfolgerung: Die konsequente Virussuppression verbessert die Gesundheit der Patienten unter ART und ist eine Schlüsselmaßnahme auf dem Weg zur Beendigung der HIV-Pandemie. Viele Länder des südlichen Afrikas verfügen jedoch noch nicht über angepasste Technologien zum Monitoring der Viruslast. Die in dieser Arbeit optimierte Methode zeigte bei der qualitativen Viruslastbestimmung von 50 südafrikanischen Patientenproben eine hervorragende Übereinstimmung mit der Referenzmethode. Durch die Kombination mit einer genotypischen Resistenztestung bietet sie darüber hinaus wichtige Informationen über die Ätiologie des Therapieversagens. Dem behandelnden Arzt hilft das bei der Entscheidung über die Notwendigkeit einer Therapieumstellung. Durch ihr anpassungsfähiges und simples Testdesign ist die qualitative PCR-Minipool-Strategie für die Anwendung in ressourcenknappen Regionen des südlichen Afrikas geeignet.

6 Literaturverzeichnis

1. Wensing, A.M., et al., *2015 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1*. Topics in Antiviral Medicine™, 2015: p. 132.
2. Gallo, R.C. and L. Montagnier, *The discovery of HIV as the cause of AIDS*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(24): p. 2283-2285.
3. UNAIDS, *UNAIDS Data 2017*. 2017.
4. UNAIDS, *Fact Sheet November 2016*. 2016.
5. Rockstroh, J.K., *Introduction*, in *HIV 2015/2016*. 2015, Medizin Fokus Verlag: Hamburg. p. 2-14.
6. RKI, *HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung*. 2015.
7. Worobey, M., et al., *Island biogeography reveals the deep history of SIV*. Science, 2010. **329**(5998): p. 1487-1487.
8. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-614.
9. Chitnis, A., D. Rawls, and J. Moore, *Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? AIDS research and human retroviruses*, 2000. **16**(1): p. 5-8.
10. Peeters, M., et al., *Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat*. Emerg Infect Dis [serial on the Internet], 2002.
11. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2011. **1**(1): p. a006841.
12. Marx, P.A., P.G. Alcabes, and E. Drucker, *Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2001. **356**(1410): p. 911-920.
13. Pepin, J. and A.C. Labbé, *Noble goals, unforeseen consequences: control of tropical diseases in colonial Central Africa and the iatrogenic transmission of blood-borne viruses*. Tropical Medicine & International Health, 2008. **13**(6): p. 744-753.
14. Korsman, S.N.J., et al., *Virology: An Illustrated Colour Text*. 2012: Elsevier Health Sciences UK.
15. Worobey, M., et al., *Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 661-664.
16. Faria, N.R., et al., *The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations*. Science, 2014. **346**(6205): p. 56-61.
17. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends in molecular medicine, 2012. **18**(3): p. 182-192.
18. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. The Lancet, 2014. **384**(9939): p. 258-271.
19. Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007*. AIDS (London, England), 2011. **25**(5): p. 679.
20. Hemelaar, J., *Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic*. Journal of Infection, 2013. **66**(5): p. 391-400.
21. Aldrich, C. and J. Hemelaar, *Global HIV-1 diversity surveillance*. Trends in molecular medicine, 2012. **18**(12): p. 691-694.
22. Tebit, D.M. and E.J. Arts, *Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease*. The Lancet infectious diseases, 2011. **11**(1): p. 45-56.
23. Draenert, R., *Pathogenesis of HIV-1 Infection*, in *HIV 2015/2016*. 2015, Medizin Fokus Verlag: Hamburg. p. 22-45.

24. Pillay, D., A.M. Geretti, and R.A. Weiss, *Human Immunodeficiency Viruses*, in *Principles and Practice of Clinical Virology*, A.J. Zuckerman, et al., Editors. 2009, Wiley. p. 897-938.
25. Shaw, G.M. and E. Hunter, *HIV transmission*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. **2**(11): p. a006965.
26. Lehman, D.A. and C. Farquhar, *Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission*. Reviews in medical virology, 2007. **17**(6): p. 381-403.
27. Selik, R.M., et al., *Revised Surveillance Case Definition for HIV Infection - United States, 2014*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2014. **Vol. 63 No. 3** (Recommendations and Reports).
28. Mellors, J.W., et al., *Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection*. Annals of internal medicine, 1997. **126**(12): p. 946-954.
29. Volberding, P.A., et al., *Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection: a controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter*. New England Journal of Medicine, 1990. **322**(14): p. 941-949.
30. Fischl, M.A., et al., *The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection: a double-blind, placebo-controlled trial*. Annals of Internal Medicine, 1990. **112**(10): p. 727-737.
31. Cameron, D.W., et al., *Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease*. The Lancet, 1998. **351**(9102): p. 543-549.
32. Pomerantz, R.J. and D.L. Horn, *Twenty years of therapy for HIV-1 infection*. Nature medicine, 2003. **9**(7).
33. UNAIDS, *AIDS by the numbers*. 2016.
34. UNAIDS, *Fact Sheet July 2017*. 2017.
35. Hoffmann, C., *ART 2015/2016*, in *HIV 2015/2016*. 2015, Medizin Fokus Verlag: Hamburg. p. 64-280.
36. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2016*. 2015: Dr. med. Thomas Karow.
37. WHO, *Guideline on when to start ART and on PrEP for HIV*. 2015.
38. WHO, *Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach – 2nd ed*. 2016.
39. Rodger, A., et al. *153LB: HIV transmission risk through condomless sex if HIV+ partner on suppressive ART: PARTNER Study*. in *21st Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 2014.
40. Hughes, J.P., et al., *Determinants of per-coital-act HIV-1 infectivity among African HIV-1-serodiscordant couples*. Journal of Infectious Diseases, 2012: p. jir747.
41. Cohen, M.S., et al., *Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy*. New England journal of medicine, 2011. **365**(6): p. 493-505.
42. Attia, S., et al., *Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis*. Aids, 2009. **23**(11): p. 1397-1404.
43. Cooper, E.R., et al., *Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission*. JAIDS-HAGERSTOWN MD-, 2002. **29**(5): p. 484-494.
44. AIDS-Gesellschaft, D., *Deutsch-Österreichische Leitlinie zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion, Version 6*. 2015.

45. Nakagawa, F., et al., *Projected life expectancy of people with HIV according to timing of diagnosis*. *Aids*, 2012. **26**(3): p. 335-343.
46. Obel, N., et al., *Impact of non-HIV and HIV risk factors on survival in HIV-infected patients on HAART: a population-based nationwide cohort study*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22698.
47. Samji, H., et al., *Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada*. *PLoS one*, 2013. **8**(12): p. e81355.
48. Smith, D.M. and R.T. Schooley, *Running with scissors: using antiretroviral therapy without monitoring viral load*. *Clin Infect Dis*, 2008. **46**(10): p. 1598-600.
49. Turner, B.J., *Adherence to antiretroviral therapy by human immunodeficiency virus—infected patients*. *Journal of Infectious Diseases*, 2002. **185**(Supplement 2): p. S143-S151.
50. Bonner, K., et al., *Viral load monitoring as a tool to reinforce adherence: a systematic review*. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2013. **64**(1): p. 74-78.
51. Sethi, A.K., et al., *Association between adherence to antiretroviral therapy and human immunodeficiency virus drug resistance*. *Clinical Infectious Diseases*, 2003. **37**(8): p. 1112-1118.
52. Ho, D.D., *Time to hit HIV, early and hard*. *New England Journal of Medicine*, 1995. **333**(7): p. 450-451.
53. Braun, P. and E. Wolf, *HIV Resistance and Viral Tropism Testing*, in *HIV 2015/2016*. 2015, Medizin Fokus Verlag: Hamburg. p. 300-331.
54. UNAIDS, *Prevention Gap Report*. 2016.
55. UNAIDS. *AIDSinfo*. 2017 [cited 2017 October 1st]; Available from: <http://aidsinfo.unaids.org/>.
56. Lesotho, *National Guidelines On The Use Of Antiretroviral Therapy For HIV Prevention And Treatment*. 2016.
57. Malawi, *Malawi Guidelines for Clinical Management of HIV in Children and Adults, 3rd Edition*. 2016.
58. Moçambique, *Guia de Tratamento Antiretroviral e Infecções Oportunistas no Adulto, Criança, Adolescente e Grávida*. 2013.
59. Namibia, *National Guidelines for Antiretroviral Therapy, Fifth Edition 2016*. 2016.
60. SouthAfrica, *National Consolidated Guidelines For The Prevention Of Mother-To-Child Transmission Of HIV (PMTCT) And The Management Of HIV In Children, Adolescents And Adults*. 2015.
61. Swaziland, *Swaziland Integrated HIV Management Guidelines*. 2015.
62. Zamiba, *Zambia Consolidated Guidelines for Treatment and Prevention of HIV Infection*. 2016.
63. Zimbabwe, *Guidelines for Antiretroviral Therapy for the Prevention and Treatment of HIV in Zimbabwe*. 2016.
64. Botswana, *Handbook Of The Botswana 2016 Integrated HIV Clinical Care Guidelines*. 2016.
65. IAPAC. *Global HIV Policy Watch*. 2017 [cited 2017 October 1st]; Available from: <http://hivpolicywatch.org/>.
66. Aitken, S.C., et al., *A pragmatic approach to HIV-1 drug resistance determination in resource-limited settings by use of a novel genotyping assay targeting the reverse transcriptase-encoding region only*. *Journal of clinical microbiology*, 2013. **51**(6): p. 1757-1761.
67. Rhee, S.-Y., et al., *HIV-1 drug resistance mutations: Potential applications for point-of-care genotypic resistance testing*. *PLoS one*, 2015. **10**(12): p. e0145772.

68. Tilghman, M.W., et al., *A combined screening platform for HIV treatment failure and resistance*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35401.
69. Claassen, M., *In-house Genotypic Antiretroviral Resistance Test: Optimisation and Validation for Use in Research and Diagnostics*, in *Medical Virology*. 2011, University of Stellenbosch: Stellenbosch.
70. Badri, M., S.D. Lawn, and R. Wood, *Utility of CD4 cell counts for early prediction of virological failure during antiretroviral therapy in a resource-limited setting*. BMC Infect Dis, 2008. **8**: p. 89.
71. Kantor, R., et al., *Misclassification of first-line antiretroviral treatment failure based on immunological monitoring of HIV infection in resource-limited settings*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(3): p. 454-62.
72. Keiser, O., et al., *Accuracy of WHO CD4 cell count criteria for virological failure of antiretroviral therapy*. Trop Med Int Health, 2009. **14**(10): p. 1220-5.
73. Mee, P., et al., *Evaluation of the WHO criteria for antiretroviral treatment failure among adults in South Africa*. AIDS, 2008. **22**(15): p. 1971-7.
74. Sigaloff, K.C., et al., *Unnecessary antiretroviral treatment switches and accumulation of HIV resistance mutations; two arguments for viral load monitoring in Africa*. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 2011. **58**(1): p. 23-31.
75. Van Oosterhout, J.J., et al., *Diagnosis of antiretroviral therapy failure in Malawi: poor performance of clinical and immunological WHO criteria*. Tropical medicine & international health, 2009. **14**(8): p. 856-861.
76. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-126.
77. UNAIDS, *The need for routine viral load testing*. 2016.
78. Gupta, R.K., et al., *Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet infectious diseases, 2009. **9**(7): p. 409-417.
79. Hosseinipour, M.C., et al., *The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy*. AIDS (London, England), 2009. **23**(9): p. 1127.
80. van Zyl, G.U., et al., *Antiretroviral resistance patterns and factors associated with resistance in adult patients failing NNRTI-based regimens in the Western Cape, South Africa*. J Med Virol, 2011. **83**(10): p. 1764-9.
81. Keiser, O., et al., *Outcomes of antiretroviral treatment in programmes with and without routine viral load monitoring in Southern Africa*. AIDS (London, England), 2011. **25**(14): p. 1761.
82. Montaner, J.S., et al., *Expansion of HAART coverage is associated with sustained decreases in HIV/AIDS morbidity, mortality and HIV transmission: the "HIV Treatment as Prevention" experience in a Canadian setting*. PloS one, 2014. **9**(2): p. e87872.
83. Tanser, F., et al., *High coverage of ART associated with decline in risk of HIV acquisition in rural KwaZulu-Natal, South Africa*. Science, 2013. **339**(6122): p. 966-971.
84. Solomon, S.S., et al., *Community viral load, antiretroviral therapy coverage, and HIV incidence in India: a cross-sectional, comparative study*. The Lancet HIV, 2016. **3**(4): p. e183-e190.
85. Das, M., et al., *Decreases in community viral load are accompanied by reductions in new HIV infections in San Francisco*. PloS one, 2010. **5**(6): p. e11068.
86. UNAIDS, *90-90-90 An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic*. 2014.

87. MédecinsSansFrontières, *Achieving undetectable: What questions remain in scaling-up HIV virologic treatment monitoring?* MSF undetectable, 2014. **Volume 6**.
88. UNITAID, *HIV/AIDS Diagnostics Technology Landscape 5th edition*. 2015.
89. Gomes, P., et al., *Comparison of the NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0 with Abbott m2000rt RealTime HIV-1 assay for plasma RNA quantitation in different HIV-1 subtypes*. J Virol Methods, 2013. **193**(1): p. 18-22.
90. Swanson, P., et al., *Evaluation of performance across the dynamic range of the Abbott RealTime HIV-1 assay as compared to VERSANT HIV-1 RNA 3.0 and AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 using serial dilutions of 39 group M and O viruses*. J Virol Methods, 2007. **141**(1): p. 49-57.
91. Church, D., et al., *Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0, Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(1): p. 118-24.
92. Abbott, *Abbott RealTime HIV-1*. 2009. **REF 2G31 51-602100/R5**(package insert).
93. Doerr, H.W., et al., *Labordiagnostik*, in *Medizinische Virologie*, H.W. Doerr and W.H. Gerlich, Editors. 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. p. 95-126.
94. McClernon, D.R., E. Ramsey, and M.S. Clair, *Magnetic silica extraction for low-viremia human immunodeficiency virus type 1 genotyping*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(2): p. 572-4.
95. Boom, R., et al., *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(3): p. 495-503.
96. Jarvis, L.M., et al., *Suitability of an automated nucleic acid extractor (easyMAG) for use with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 nucleic acid amplification testing*. J Virol Methods, 2011. **171**(2): p. 364-8.
97. BioMérieux, *NucliSens® easyMAG™ User Manual Version 1.1*. **REF 280139**(user manual).
98. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology, 1987. **155**: p. 335.
99. Müller, H.-J., *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*. 2001, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. 134.
100. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-491.
101. Lisby, G., *Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology*. Molecular biotechnology, 1999. **12**(1): p. 75-99.
102. Storch, G.A., *Diagnostic virology*. Clinical infectious diseases, 2000. **31**(3): p. 739-751.
103. Jeffery, K. and E. Aarons, *Diagnostic Approaches*, in *Principles and Practice of Clinical Virology*, A.J. Zuckerman, et al., Editors. 2009, Wiley-Blackwell: Chichester. p. 1-27.
104. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Zweite ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1625.
105. van Pelt-Verkuil, E., A. van Belkum, and J.P. Hays, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. 2008, Dordrecht: Springer.
106. Green, M.R. and J. Sambrook, *Isolation and Quantification of DNA*, in *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, M.R. Green and J. Sambrook, Editors. 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 1-79.
107. Harry, M., et al., *Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances*. Analisis, 1999. **27**(5): p. 439-442.
108. Hirsch, M.S., et al., *Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **47**(2): p. 266-285.

109. Shafer, R.W., *Rationale and Uses of a Public HIV Drug-Resistance Database*. Journal of Infectious Diseases, 2006. **194**(Supplement 1): p. S51-S58.
110. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
111. Prober, J.M., et al., *A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides*. Science, 1987. **238**(4825): p. 336-341.
112. Men, A.E., et al., *Sanger DNA Sequencing*, in *Next-Generation Genome Sequencing*, M. Janitz, Editor. 2008, WILEY-VCH Verlag Weinheim. p. 3-11.
113. Janssen, L., et al., *Increased sensitivity for amplified STR alleles on capillary sequencers with BigDye® XTerminator™*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2009. **2**(1): p. 123-124.
114. Saah, A.J. and D.R. Hoover, *"Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings*. Annals of internal medicine, 1997. **126**(1): p. 91-94.
115. Burd, E.M., *Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases*. Clinical microbiology reviews, 2010. **23**(3): p. 550-576.
116. MédecinsSansFrontières, *Supplementary Material For Product Guide: Putting HIV and HCV To The Test*. 2015.
117. Plantier, J.C., et al., *HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots*. AIDS, 2005. **19**(4): p. 391-7.
118. May, S., et al., *Pooled nucleic acid testing to identify antiretroviral treatment failure during HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **53**(2): p. 194-201.
119. MédecinsSansFrontières. *Undetectable*. 2016 [cited 2016 December 1st]; Available from: <http://www.msfaccess.org/undetectable>.
120. UNAIDS, *Diagnostics Access Initiative to achieve the 90-90-90 treatment target*. 2015.
121. MédecinsSansFrontières, *Putting HIV And HCV To The Test*. MSF undetectable, 2017. **Volume 9**.
122. AIDSinfo, *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. 2016.
123. Inzaule, S., et al., *Field evaluation of a broadly sensitive HIV-1 in-house genotyping assay for use with both plasma and dried blood spot specimens in a resource-limited country*. Journal of clinical microbiology, 2013. **51**(2): p. 529-539.
124. Parry, C., et al., *Field study of dried blood spot specimens for HIV-1 drug resistance genotyping*. Journal of clinical microbiology, 2014. **52**(8): p. 2868-2875.
125. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
126. Schmidt, H. and S. Rothhämel, *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*, in *Gentechnische Methoden*. 2012, Springer. p. 135-171.
127. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. Journal of molecular endocrinology, 2000. **25**(2): p. 169-193.
128. Malboeuf, C.M., et al., *Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis*. Biotechniques, 2001. **30**(5): p. 1074-1085.
129. Invitrogen, *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase Product Information Sheet*. 2016.
130. Sipos, R., et al., *Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis*. FEMS microbiology ecology, 2007. **60**(2): p. 341-350.

131. Christopherson, C., J. Sninsky, and S. Kwok, *The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies*. Nucleic acids research, 1997. **25**(3): p. 654-658.
132. Saune, K., et al., *Analytical sensitivity of three real-time PCR assays for measuring subtype B HIV-1 RNA*. J Clin Virol, 2013. **57**(1): p. 80-3.
133. Garcia-Diaz, A., et al., *Comparative evaluation of the Artus HIV-1 QS-RGQ assay and the Abbott RealTime HIV-1 assay for the quantification of HIV-1 RNA in plasma*. Journal of Clinical Virology, 2013. **57**(1): p. 66-69.
134. Smieja, M., et al., *Replicate PCR testing and probit analysis for detection and quantitation of Chlamydia pneumoniae in clinical specimens*. Journal of clinical microbiology, 2001. **39**(5): p. 1796-1801.
135. Griffith, B.P., et al., *Comparison of the Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum, and plasma subjected to freeze-thaw cycles*. Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(12): p. 3288-3291.
136. Lew, J., et al., *Determinations of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome*. Journal of clinical microbiology, 1998. **36**(6): p. 1471-1479.
137. Ginocchio, C.C., et al., *Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma*. Journal of clinical microbiology, 1997. **35**(11): p. 2886-2893.
138. Newman, H., et al., *A qualitative PCR minipool strategy to screen for virologic failure and antiretroviral drug resistance in South African patients on first-line antiretroviral therapy*. Journal of Clinical Virology, 2014. **60**(4): p. 387-391.
139. Viera, A.J. and J.M. Garrett, *Understanding interobserver agreement: the kappa statistic*. Fam Med, 2005. **37**(5): p. 360-363.
140. Wainberg, M.A. and B.G. Brenner, *The impact of HIV genetic polymorphisms and subtype differences on the occurrence of resistance to antiretroviral drugs*. Molecular biology international, 2012. **2012**.
141. Dorfman, R., *The detection of defective members of large populations*. The Annals of Mathematical Statistics, 1943. **14**(4): p. 436-440.
142. van Zyl, G.U., et al., *Pooling strategies to reduce the cost of HIV-1 RNA load monitoring in a resource-limited setting*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(2): p. 264-70.
143. StanfordUniversity. *HIV Drug Resistance Database*. 2016 [cited 2016 December 1st]; NRTI Resistance Mutation Comments]. Available from: <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/comments/NRTI/>.
144. Lüllmann, H., K. Mohr, and L. Hein, *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 129 Tabellen*. 2006: Thieme.
145. StanfordUniversity. *HIV Drug Resistance Database*. 2016 [cited 2016 December 1st]; Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) Worksheet: NRTIs]. Available from: <https://hivdb.stanford.edu/pages/SDRM.worksheet.NRTI.html>.
146. Van Zyl, G.U., et al., *Trends in genotypic HIV-1 antiretroviral resistance between 2006 and 2012 in South African patients receiving first-and second-line antiretroviral treatment regimens*. PloS one, 2013. **8**(6): p. e67188.
147. StanfordUniversity. *HIV Drug Resistance Database*. 2016 [cited 2016 December 1st]; Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) Worksheet: NNRTIs]. Available from: <https://hivdb.stanford.edu/pages/SDRM.worksheet.NNRTI.html>.

148. Monleau, M., et al., *Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing*. Journal of clinical microbiology, 2009. **47**(4): p. 1107-1118.
149. Tilghman, M.W., et al., *Pooled nucleic acid testing to detect antiretroviral treatment failure in Mexico*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **56**(3): p. e70-4.
150. Smith, D.M., et al., *The use of pooled viral load testing to identify antiretroviral treatment failure*. AIDS, 2009. **23**(16): p. 2151-8.
151. Aitken, S.C., et al., *Development and evaluation of an affordable real-time qualitative assay for determining HIV-1 virological failure in plasma and dried blood spots*. Journal of clinical microbiology, 2013. **51**(6): p. 1899-1905.
152. Granich, R., et al., *Trends in AIDS deaths, new infections and ART coverage in the top 30 countries with the highest AIDS mortality burden; 1990–2013*. PloS one, 2015. **10**(7): p. e0131353.
153. Fox, M.P., et al., *Rates and predictors of failure of first-line antiretroviral therapy and switch to second-line ART in South Africa*. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999), 2012. **60**(4): p. 428.
154. Aghokeng, A.F., et al., *Extraordinary heterogeneity of virological outcomes in patients receiving highly antiretroviral therapy and monitored with the World Health Organization public health approach in sub-saharan Africa and southeast Asia*. Clinical infectious diseases, 2013: p. cit627.
155. McMahon, J.H., et al., *Viral suppression after 12 months of antiretroviral therapy in low-and middle-income countries: a systematic review*. Bulletin of the World Health Organization, 2013. **91**(5): p. 377-385.
156. Barth, R.E., et al., *Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review*. The Lancet infectious diseases, 2010. **10**(3): p. 155-166.
157. Stevens, W.S. and N. Ford, *Time to reduce CD4+ monitoring for the management of antiretroviral therapy in HIV-infected individuals*. SAMJ: South African Medical Journal, 2014. **104**(8): p. 558-559.
158. MédecinsSansFrontières, *Putting HIV and HCV To The Test*. MSF undetectable, 2015. **Volume 7**.
159. MédecinsSansFrontières, *Making Viral Load Routine Part 1: Programmatic Strategies*. MSF undetectable, 2016. **Volume 8**.
160. MédecinsSansFrontières, *Making Viral Load Routine Part 2: The Viral Load Laboratory*. MSF undetectable, 2016. **Volume 8**.

7 Anhang: Materialtabellen

7.1 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BigDye® XTerminator™ Purification Kit	Applied Biosystems
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen™ by life technologies™

7.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern	Institutswerkstatt
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems
IsoFreeze mini cooler	Lasec
Laborwaage PL1200	Mettler
LAB. Rotator	Digisystem Laboratory Instruments
Magnetic Stirrer	Fried Electric
Mikrowellenherd KOR-600A	Daewoo
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
NucliSens® easyMAG™	bioMérieux

<p>Pipetten</p> <p>BioPette™ Plus</p> <p>Finnpipette®</p> <p>Pipetman®</p>	<p>Labnet</p> <p>Thermo Scientific</p> <p>Gilson</p>
<p>Spannungsquellen für Gelelektrophorese</p> <p>EPS 2A200</p> <p>EPS 301</p>	<p>Hoefer</p> <p>Amersam Pharmacia Biotech</p>
<p>Uviprochemi II D77 WL/LS 26 M</p>	<p>Uvitec</p>
<p>Vortex Mischer</p> <p>IKA-Vibro-Fix</p> <p>Multi-Microplate Genie®</p>	<p>IKA</p> <p>Scientific Industries</p>
<p>Zentrifugen</p> <p>Allegra™ X-12 Centrifuge</p> <p>Centrifuge 5415 D</p> <p>Microfuge® 16 Centrifuge</p> <p>Spectrafuge™ Mini Centrifuge</p>	<p>Beckman Coulter</p> <p>Eppendorf</p> <p>Beckman Coulter</p> <p>Labnet</p>

7.3 Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller/ Zusammensetzung
DNA Ladder RTU 100bp	GeneDireX®
Ethanol 70 % v/v	SG Reagents
Natriumhypochlorit 3,5 %	Jik Regular Household Bleach
Novel Juice	GeneDireX®
SeaKem® LE Agarose	Lonza
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (50x)	2 mol/l Tris-Acetat, 0,05 mol/l EDTA

7.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Vacutainer® K2E (EDTA)	BD
Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner bio-one
Nitrile examination gloves	Lasec
Parafilm M®	Pechiney Plastic Packaging
PCR Tubes 0,2 ml	Scientific Specialties
Pipettenspitzen mit Filter	Labcon, ZAP™, QSP®
Reaction Tubes 2 ml	Greiner bio-one

7.5 Computersoftware

Programm	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters
Geneious 6.1	Biomatters
Office 2013	Microsoft
Sequencer V10.1	Gene Codes Corporation
SPSS Statistics 22	IBM
Uviprochemi II Software Uviband Version 12.11	Uvitec

7.6 Online Datenbanken und Tools

Name	Betreiber	Link
Los Alamos HIV Sequence Database	Los Alamos National Security, LCC	http://www.hiv.lanl.gov/
Stanford University HIV Drug Resistance Database	Stanford University	http://hivdb.stanford.edu/
LNA™ Oligo Tm Prediction	Exiqon A/S	https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. August Stich. Für seinen Einsatz, mir den Forschungsaufenthalt in Südafrika zu ermöglichen, für die intensive und lehrreiche Vorbereitung, die meine Begeisterung für Themen der globalen Gesundheit weckte, für die Durchsicht meiner Arbeit und für die sehr gute und persönliche Betreuung.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Preiser für die herzliche Aufnahme in seiner Abteilung in Tygerberg und die hervorragende Betreuung meines Projekts vor Ort. Zahlreiche weichenstellende Gespräche und Meetings machten den Erfolg der Arbeit erst möglich.

In diesem Zusammenhang danke ich auch Dr. Gert van Zyl, der mir mit seiner Expertise und seinen kreativen Ideen immer zur Seite stand.

Meinem Supervisor Dr. Howard Newman danke ich für die gute kollegiale Zusammenarbeit und den gemeinsam durchgestandenen Kampf gegen die Widrigkeiten der Forschung.

Mathilda Claassen danke ich ganz herzlich für ihre ständige Ansprechbarkeit, ihre unzähligen guten Ratschläge und Problemlösungen und für ihre Unterstützung bei der RNA-Extraktion und der Sequenzierung.

Mein Dank gilt auch Zwelethu Kashe, Amanda Moelich, Stella Pool, Constance Schreuder, Dr. Lerato Sikhosana, Ronell Taylor, Jan de Wit und allen Mitarbeitern der diagnostischen Sektion.

Für viele Ratschläge und eine wunderbare Zeit bedanke ich mich bei Keith Ryan, Dirk Hart, Randall Fischer, Nafiisah Chotun, Shahieda Isaacs, Ndapewa Laudika Ithete, Cynthia Raissa Tamandjou, Heleen and Stanley Loots und allen anderen Studenten der Forschungssektion.

Bei Antje Fuß und Waltraud Wernhart möchte ich mich für die gute Einarbeitung in Würzburg bedanken. Kristin Kaufmann danke ich für die freundliche Organisation im Rahmen des IRTG 1522. Mein herzlicher Dank gilt dem inzwischen verstorbenen Prof. Dr. Axel Rethwilm. Als Initiator und Sprecher des IRTG 1522 ermöglichte er wichtigen wissenschaftlichen und persönlichen Austausch zwischen Südafrika und Deutschland.

Sehr dankbar bin ich für die Unterstützung durch meine Familie, auf die ich mich immer verlassen kann. Meiner Mutter Lucia und meiner Tante Hildegund Benning danke ich ganz besonders für ihre wertvollen Korrekturen. Meinen Geschwistern danke ich für Anstöße in Wort und Tat, ohne die ich dieses Projekt nie gefunden hätte.

LEBENS LAUF | LUKAS BREUNIG

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 11.03.1989
Geburtsort: Lindau am Bodensee

SCHULBILDUNG

09.1995 - 06.1999: Grundschule Lindau/Reutin
09.1999 - 06.2008: Bodensee-Gymnasium Lindau
06.2008: Abitur

STUDIUM

10.2009: Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
08.2011: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2015: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.2016: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

BERUFLICHE ERFAHRUNG

Seit 02.2017 Assistenzarzt DRK Kliniken Berlin Westend

PUBLIKATIONEN

08.2014: Newman H., Breunig L., Van Zyl G., Stich A., Preiser W., *A qualitative PCR minipool strategy to screen for virologic failure and antiretroviral drug resistance in South African patients on first-line antiretroviral therapy*. Journal of Clinical Virology, 2014. 60: p. 387–391

Würzburg, Oktober 2017