

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Lars Dölken**

„Bestimmung der Prävalenz medikamentenresistenter HIV-Infektionen bei  
therapienaiven Patienten in der Viktoriasee-Region in Tansania“.

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Johanna Heidrich, geb. Englert**

**aus Würzburg**

**Würzburg, März 2019**

**Referent: Herr Prof. Dr. rer. nat. Carsten Scheller**

**Koreferent: Herr Prof. Dr. med Oliver Kurzai**

**Dekan: Herr Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2020**

**Die Promovendin ist Ärztin**

Mit Liebe und Dankbarkeit für die selbstverständliche Unterstützung in allen  
Lebenslagen widme ich diese Arbeit meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

## Abküzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Historie von HIV</b> .....	2
<b>1.2 Struktur von HIV</b> .....	2
<b>1.3 Infektion mit dem HI-Virus</b> .....	4
<b>1.4 Klassifikation des HI-Virus</b> .....	5
<b>1.5 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion</b> .....	6
<b>1.5.1 Die CDC-Klassifikation</b> .....	7
<b>1.5.2 WHO Stadien</b> .....	9
<b>1.6 Ansatzpunkte der Antiretroviralen Therapie</b> .....	10
<b>1.6.1 Nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)</b> .....	10
<b>1.6.2 Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI)</b> ...	10
<b>1.6.3 Protease-Inhibitoren (PI)</b> .....	11
<b>1.7 ART in Tansania</b> .....	12
<b>1.8 PMTCT</b> .....	14
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	16
<b>3. Material und Methoden</b> .....	17
<b>3.1 Material</b> .....	17
<b>3.1.1 Computersoftware</b> .....	17
<b>3.1.2 Chemikalien</b> .....	17
<b>3.1.3 Enzyme</b> .....	17
<b>3.1.4 Geräte</b> .....	18
<b>3.1.5 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese</b> .....	19
<b>3.1.6 Primer für Reverse-Transkriptions-PCR</b> .....	19
<b>3.1.7 Primer für nested-PCR</b> .....	19
<b>3.1.8 Primer für die Sequenzierung</b> .....	20
<b>3.1.9 Kits</b> .....	20
<b>3.1.10 Verbrauchsmaterial</b> .....	21
<b>3.1.11 Längenstandards</b> .....	22
<b>3.2 Methoden</b> .....	22
<b>3.2.1 RNA-Isolierung aus Plasma</b> .....	22
<b>3.2.2 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion</b> .....	23
<b>3.2.3 Polymerasekettenreaktion</b> .....	24

3.2.4	Agarosegelelektrophorese .....	26
3.2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	27
3.2.6	Photometrische Messung von Reinheit und Konzentration der DNA	27
3.2.7	Sequenzierung.....	28
4.	Ergebnisse .....	30
4.1	Patientengruppe .....	30
4.2	Subtypenverteilung der reversen Transkriptase .....	30
4.3	Resistenzlage in der untersuchten Patientengruppe.....	31
4.3.1	Schweregrad der Resistenzen innerhalb der Medikamentenklassen	33
4.3.2	Schweregrad der Resistenzen gegenüber einzelnen Medikamenten .	34
4.3.3	Resistenzlage gegenüber der Tripple-Therapie TLE.....	34
4.3.4	Resistenzverteilung gegen die Tripple-Therapie (TLE) innerhalb der einzelnen Subtypen.....	38
4.3.5	Prävalenz für Resistenzen gegen Nevirapin und der Zusammenhang mit PMTCT .....	39
4.3.6	Resistenzlage gegenüber TLE innerhalb der Geschlechter .....	39
5.	Diskussion.....	41
5.1	Subtypenverteilung der reversen Transkriptase und der Zusammenhang mit der Resistenzlage.....	41
5.2	Einfluss des Geschlechts und PMTCT auf die Resistenzlage .....	42
5.3	Resistenzlage therapienaiver Patienten in Tansania .....	43
6.	Zusammenfassung .....	47
7.	Literatur- und Abbildungsverzeichnis .....	49

**Danksagung**

**Lebenslauf**

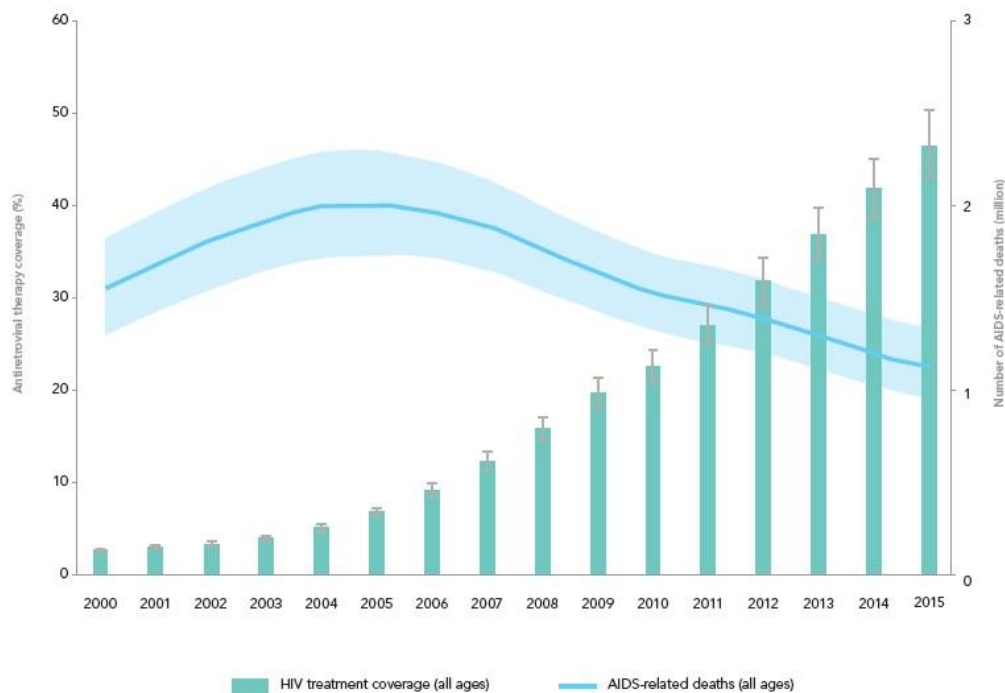
# Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
3TC	Lamivudin
ABC	Abacavir
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
ART	antiretrovirale Therapie
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudin
bp	Basenpaar
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	cluster of differentiation 4
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Circulating Desoxyribonucleic acid
CI	confidence interval
CRF	circulating recombinant forms
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Type 4
D4T	Stavudin
DDI	Didanosin
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EFV	Efavirenz
Env	envelope
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabin
g	Gramm
gag	group specific antigen
gp	Glykoprotein
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HIVDR	HIV drug resistance

IDV	Indinavir
INI	Integrase-Inhibitoren
LAS	Lymphadenopathie-Syndrom
LTR	long terminal repeats
Min	Minute
ml	Mililiter
NFV	Nelfinavir
nm	Nanometer
NNRTI	Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NVP	Nevirapin
PCR	polymerase chain reaction
PI	Protease-Inhibitor
PMTCT	Prevention of mother-to-child transmission
Pol	Polymerase
PR	Protease
PREPFAR	President's Emergency Plan for AIDS Relief
RNA	ribonucleic acid
RPV	Rilpivirin
RT-PCR	reverse transkriptase polymerase chain reaction
Sek	Sekunde
SEM	standard error of mean
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
TDF	Tenofovir
TLE	Tripple-Therapie aus Tenofovir, Lamivudin und Efavirenz
TPV	Tipranavir
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
URF	unique recombinant forms
UV	ultraviolet
UNICEF	United Nations Children's Fund
WHO	World Health Organization
z.B.	Zum Beispiel

## 1. Einleitung

Am Ende des Jahres 2015 lebten weltweit ca. 37 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion (UNAIDS 2016). Die Region Afrikas südlich der Sahara ist dabei mit einer Prävalenz von 4,9% am stärksten betroffen. Im Vergleich zum Jahr 2001 war die Anzahl an Neuinfektionen hier um 25% niedriger (UNAIDS 2012). Die Anzahl der Menschen, welche weltweit durch AIDS starben wurde im Jahr 2015 mit 1,1 Millionen angegeben. Im Vergleich zu 2005 (2,1 – 2,6 Millionen) und 2011 (1,5 – 1,9 Millionen) ist die Mortalität somit weiter gesunken. Die weiterhin ansteigende Prävalenz von HIV in Süd- und Westafrika bei gleichzeitig rückläufiger Mortalität ist durch einen besseren Zugang zur antiretroviralen Therapie erklärbar. Gleichzeitig bedeutet diese Tatsache jedoch auch, dass die HIV-Epidemie noch nicht eingedämmt ist. Die Zahl der Neuinfektionen weltweit ist in den letzten Jahren nicht gesunken (UNAIDS 2016).



**Abbildung 1: Verbreitung der antiretroviralen Therapie und AIDS-bedingte Mortalität, global 2010-2015**

(Graphik entnommen aus „Global Aids Update“, UNAIDS 2016)

Bereits kurz nach Einführung einer antiretroviralen Therapie wurde deutlich, wie schnell das HI-Virus in der Lage ist, Resistenzen zu entwickeln. Gleichzeitig ist der größte Anteil



der betroffenen Menschen in strukturschwachen Ländern zu finden, was die Durchsetzung eines globalen Therapieregimes zusätzlich erschwert.

### **1.1 Historie von HIV**

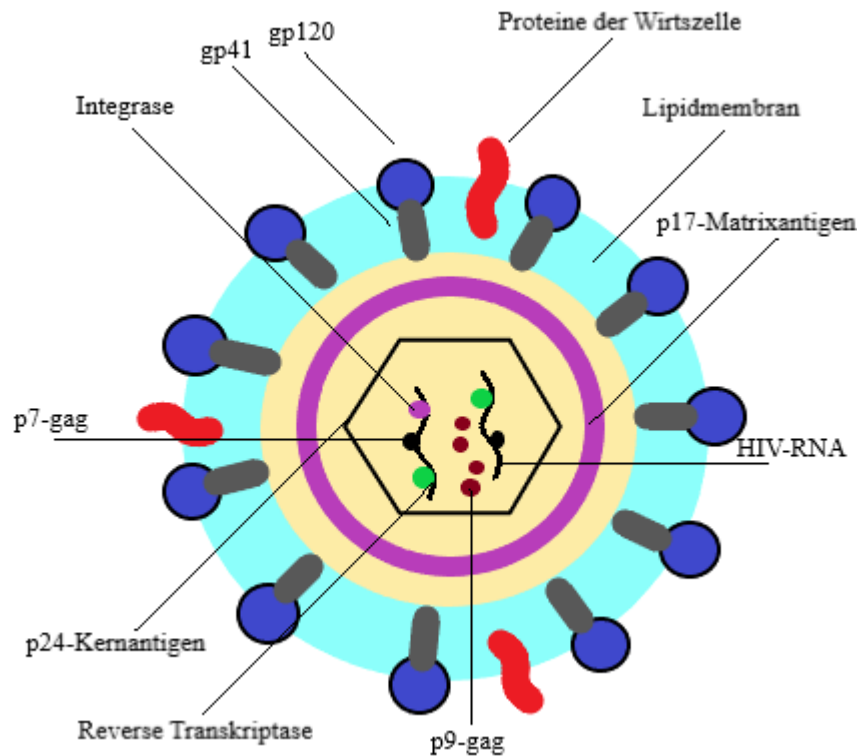
Erstmals wurden im Jahr 1981 an der amerikanischen Westküste von M. Gottlieb vier Fälle einer Pneumocystis-carinii-Pneumonie bei jungen, bisher gesunden homosexuellen Männern beschrieben (Gottlieb et. al 1981). Diese Erkrankung trat bis zu diesem Zeitpunkt nur bei Patienten mit stark eingeschränkter Immunabwehr auf, wie dies bei fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankungen, unter immunsuppressiver Therapie nach Transplantationen oder auch bei angeborenen Immundefizienzkrankheiten der Fall ist. Gleichzeitig kam es an der amerikanischen Ostküste zu einer ungewöhnlichen Häufung des Kaposi-Sarkoms, ebenfalls bei jungen homosexuellen Männern. Im Dezember 1981 fiel in der medizinischen Literatur zum ersten Mal der Begriff „severe acquired immunodeficiency“ (Siegal et al. 1981). Im Jahr 1982 wurden alle beschriebenen Erkrankungen unter dem Begriff „acquired immunodeficiency syndrome“ (AIDS) zusammengefasst. Bereits 1983 gelang der Arbeitsgruppe um Luc Montagnier im Pariser Pasteur Institut die Isolation des Retrovirus aus dem Lymphknoten eines betroffenen Patienten (Barré-Sinoussi et. al 1983). Bestätigt wurde dies durch verschiedene weitere Arbeitsgruppen (Gallo et. al 1983; Cooper et. al 1984). Im Jahr 1986 erhielt das Virus durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ den Namen „human immunodeficiency virus“ (HIV).

### **1.2 Struktur von HIV**

Das Humane Immundefizienz Virus gehört zur Familie der Retroviren aus der Gattung Lentiviren. Beschrieben werden zwei verschiedene Typen des Virus. Am weitesten verbreitet ist HIV-1 als Ursache der Erkrankungen mit AIDS, während HIV-2 zwar ähnliche klinische Symptome auslöst, aber insgesamt weniger pathogen ist als HIV-1 und im Wesentlichen auf das Gebiet der Elfenbeinküste beschränkt ist (Abbas, Lichtman, Pillai 2007).

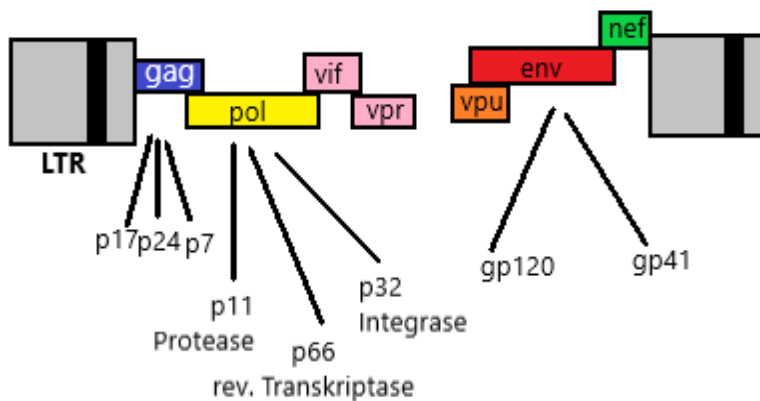
Die Größe eines HIV-1-Viruspartikels beträgt etwa 100 nm. Die Hülle besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, in welche Glykoproteinkomplexe eingebaut sind. Diese bestehen aus dem membranständigen Glykoprotein gp41 sowie dem externen gp120,

welche miteinander wechselwirken. Im Inneren des Virions befindet sich ein kegelförmiger Kern, welcher zwei RNA-Stränge sowie die Enzyme reverse Transkriptase, Protease und Integrase beinhaltet (Gelderblom, Hausmann et al., 1987) .



**Abbildung 2: Das HI-Virus** (Eigene Graphik)

Das Genom des HIV-1 besteht aus verschiedenen Sequenzen. Die *gag*-Sequenz codiert für die Strukturproteine des Kerns. Die *env*-Sequenz codiert die Glykoproteine gp120 und gp41, welche eine Infektion der Wirtszellen erst möglich machen. Die *pol*-Sequenz codiert für die reverse Transkriptase, die Protease sowie die Integrase. Des Weiteren gibt es zusätzliche Sequenzen (*tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu*), welche ebenfalls wichtig für die Vermehrung des Virus sind. Flankiert wird dieses Provirus von den Long Terminal Repeats (LTR). Hierbei handelt es sich um identische Sequenzen, welche sich ständig wiederholen. Sie sind essentiell für die Regulation der retroviralen Genexpression und die erfolgreiche Integration des Virusgenoms in die Wirtszelle (Fauci 1988).



**Abbildung 3: Das Genom des HI-Virus** (eigene Graphik)

### 1.3 Infektion mit dem HI-Virus

Eine Übertragung von HIV kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Neben ungeschütztem Sexuallkontakt gibt es den parenteralen Übertragungsweg über infektiöse Nadeln bei i.V.-Drogenmissbrauch, kontaminierten Blutprodukte oder auch Nadelstichverletzungen. Zudem die sogenannte vertikale Exposition von einer HIV-infizierten Mutter auf ihr Kind. Die Viren befinden sich in Blut, Sperma, Vaginalflüssigkeit und auch in Muttermilch. Als Zielzellen dienen Zellen, welche das CD4-Oberflächenantigen tragen, z.B. T-Helfer-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, Langerhans'-Zellen der Epidermis sowie Komponenten der Mikroglia.

Zunächst erfolgt die Bindung des Virus an die Wirtszelle. Als Rezeptor dienen neben dem CD4-Oberflächenprotein auch Korezeptoren wie CCR5 und CXCR4. Durch eine Interaktion zwischen diesen Rezeptoren mit den in die Virushülle eingebetteten Proteinkomplexen gp120 und gp41 kommt es zur Fusion mit der Wirtszelle. Diesen Vorgang nennt man Enhancement. Nach der Fusion erfolgt die Freisetzung zweier RNA-Stränge sowie von 4 Proteinen, der reversen Transkriptase, der Integrase und der Protease. Nach Transkription der RNA-Stränge und Umschreibung in DNA durch die reverse Transkriptase, wird diese durch die Integrase in den Zellkern transportiert und dort in die DNA der Wirtszelle integriert. Im Rahmen der zelleigenen Transkription wird nun auch

der virale Anteil der DNA in messenger-RNA umgeschrieben. Diese verlässt den Zellkern und durch Translation wird diese messenger-RNA in Virusmoleküle umgeschrieben, welche durch die Protease gespalten werden. Schließlich erfolgt das „Budding“, die Ausknospung der neu entstandenen Viren, welche weitere Zellen befallen (Schartl, Gessler, v. Eckardstein 2009; HEROLD 2012).

#### **1.4 Klassifikation des HI-Virus**

Am weitesten verbreitet sind Infektionen mit HIV-1 (Omobolaji, T. et al, 2011). Der 1986 isolierte Virustyp HIV-2 tritt vor allem in Westafrika auf (Gottlieb et al., 2008) und ist im Vergleich zu HIV-1 unter anderem durch eine längere asymptomatische Phase, einer niedrigeren Viruslast sowie einer langsameren Abnahme der CD4-positiven Zellen charakterisiert.

Die Einteilung der beiden Virustypen erfolgt in verschiedene Subtypen. Für HIV-2 werden die Subtypen A, B, C, D, E und F unterschieden. Für HIV-1 wurden 3 Hauptgruppen, nämlich Gruppe M (major), Gruppe O (outlier) sowie Gruppe N (not major, not outlier) festgelegt. Mit Abstand am weitesten verbreitet ist Gruppe M, welche in 9 weitere Subtypen (A, B, C, D, F, G, H, J, K) unterteilt wird (HEROLD 2012). Neben diesen Subtypen gibt es heute zahlreiche sogenannte circulating recombinant forms (CRFs), welche, wie der Name schon impliziert, eine Rekombination des Genoms zweier verschiedener Subtypen der Hauptgruppe M sind (Kalish et al., 2004). Als CRFs werden Rekombinationen bezeichnet, welche in mindestens drei verschiedenen Individuen ohne epidemiologischen Zusammenhang isoliert wurden und welche somit zur Entwicklung der Pandemie beigetragen haben (Hemelaar et al., 2011). Rekombinationen, die diese Kriterien nicht erfüllen werden unique recombinant forms (URFs) genannt.

Am weitesten verbreitet ist weltweit Subtyp C, gefolgt von Subtyp A und B. Rekombinante Formen spielen jedoch eine immer größere Rolle (Hemelaar 2011, UNAIDS 2007).

Ein weiterer Grund für die ausgeprägte genetische Variabilität des HI-Virus ist die hohe Mutationrate durch Replikationsfehler bei gleichzeitig sehr hoher Replikationsrate (Wie et al., 1995; Korber, Gaschen et al. 2001).

In einem infizierten Menschen liegen somit zahlreiche HI-Viren vor, welche sich in ihrem Genom nicht exakt ähneln. Diese Eigenschaft macht die Entwicklung eines Impfstoffs zu einer großen Herausforderung (Gaschen et al., 2002).

### 1.5 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Die Inkubationszeit nach einer HIV-Exposition beträgt Tage bis wenige Wochen. Der Klinische Verlauf lässt sich in verschiedene Phasen einteilen, in welchen die Viruslast und damit auch die Infektiosität zwei Gipfel zeigen (s. Abbildung 4).

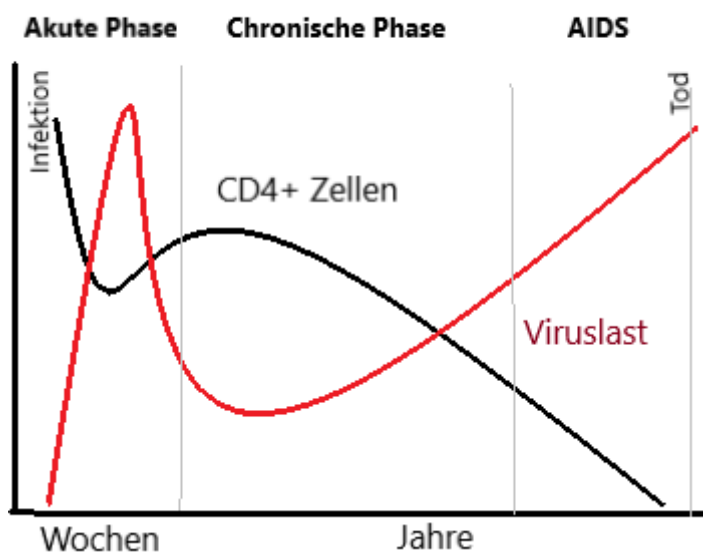


Abbildung 4: Phasen der HIV-Infektion (Eigene Graphik)

Innerhalb der ersten Wochen nach Infektion steigt die Viruslast rasant an. Die CD4+-Zellen fallen konsekutiv ab. In der anschließenden chronischen Phase, welche sich über Jahre hinziehen kann, schafft es das Immunsystem die Viruslast unter Kontrolle zu halten. Gerät die Anzahl der CD4+-Zellen schließlich in den kritischen Bereich unter 200 Zellen/ $\mu$ l, gewinnt erneut der Virus die Oberhand, die Viruslast explodiert und es kommt schließlich zum Vollbild der AIDS-Erkrankung (HEROLD 2012).

Für die Einschätzung des Erkrankungsstatus sowie der Entscheidung eines Therapiebeginns gibt es zwei wichtige Klassifikationen. Die CDC-Stadieneinteilung (CDC: Centers for Disease Control/USA) sowie die Einteilung nach Empfehlung der

WHO (World Health Organisation). Beide berücksichtigen die klinischen Symptome sowie auch die Zahl der T-Helferlymphozyten.

### **1.5.1 Die CDC-Klassifikation**

Die CDC-Klassifikation teilt die Krankheitssymptome in verschiedene Kategorien ein, welche jeweils nochmals abhängig von der Anzahl der T-Helferlymphozyten in verschiedene Stufen unterteilt werden.

#### Kategorie A

Nur bei etwa 30% der HIV-infizierten tritt zunächst das sogenannte akute retrovirale Syndrom auf (HEROLD, 2012). Die Symptome bestehen meist aus Fieber, Myalgien, Lymphknotenschwellungen und auch Splenomegalie und Angina und sind damit unspezifisch. Der HIV-AK-Test ist in dieser Phase in den meisten Fällen noch negativ. Die Anzahl der CD4-Lymphozyten nimmt zunächst ab. Gleichzeitig kommt es jedoch zu einer Immunaktivierung, durch welche schließlich HIV-Antikörper gebildet werden und die Viruslast wieder abnimmt. Anschließend folgt die Latenzphase bzw. die Phase der asymptomatischen Infektion, welche bis zu 10 Jahre dauern kann. Bei immungeschwächten Patienten auch deutlich kürzer. Es findet eine Vermehrung der Viren in den lymphatischen Geweben statt, weshalb die Patienten auch in dieser Phase ansteckend sind. Ca. 40% der Patienten leiden unter dem sogenannten Lymphadeopathie-Syndrom (LAS), welches die chronische Schwellung von mindestens zwei verschiedenen Lymphknoten außerhalb des inguinalen Bereichs beschreibt (HEROLD 2012).

#### Kategorie B

Diese Phase ist bestimmt vom weiteren Abfall der T-Helferzellen sowie dem Anstieg der Viruslast. Es treten Erkrankungen auf, welche durch die zunehmende Schwäche des Immunsystems begünstigt werden, jedoch nicht zu den AIDS-Indikatorkrankheiten gezählt werden. Zu nennen sind hier oropharyngeale oder vaginale Candidosen, subfebrile Temperaturen, der Befall mehrerer Dermatome durch Herpes Zoster sowie die orale Haarleukoplakie. Zudem treten häufig subfebrile Temperaturen sowie chronische Diarrhoe auf.

### Kategorie C

Zuletzt geht die Infektion in das „acquired immune deficiency syndrome“ (AIDS) über. Entscheidend hierfür ist der Zeitpunkt, an welchem die CD4-Zellzahl unter den kritischen Wert von 200 Zellen pro  $\mu\text{l}$  abfällt (HEROLD 2012) und im Zuge dessen die Viruslast exponentiell ansteigt (siehe Abbildung 4). In dieser Phase wird der Krankheitsverlauf nun von den sogenannten AIDS-definierenden Erkrankungen bestimmt. Das Wasting-Syndrom beschreibt einen ungewollten massiven Gewichtsverlust mit Abgeschlagenheit sowie chronischer Diarrhoe. Daneben wird die HIV-assoziierte Enzephalopathie beschrieben mit langsam fortschreitender Demenz, welche schließlich zu motorischen, kognitiven und auch depressiven Symptomen führt. Diese Entwicklung ist Ausdruck eines Befalls der Mikroglia.

Des Weiteren treten opportunistische Erkrankungen in Form von Infektionen, welche durch Pilze, Protozoen, Bakterien und Viren bedingt sind, auf.

Zuletzt gibt es Malignome wie das Kaposi-Syndrom, das Non-Hodkin-Lymphom sowie das invasive Zervixkarzinom, welche als AIDS-definierende Erkrankungen aufgezählt werden.

Beschrieben wurde der Verlauf einer HIV-Infektion bei Patienten, welche keine antiretrovirale Therapie erhalten.

**Tabelle 1: CDC-Klassifikation der HIV-Infektion**

	<b>Kategorie A</b>	<b>Kategorie B</b>	<b>Kategorie C</b>
<b>Anzahl der T-Helferlymphozyten (/<math>\mu\text{g}</math>)</b>	Akutes retrovirales Syndrom, LAS, Latenzphase	Symptome, kein AIDS	AIDS-Indikatorerkrankungen
> 500	A1	B1	C1
200 – 499	A2	B2	C2
< 300	A3	B3	C3

### **1.5.2 WHO Stadien**

Die WHO (World Health Organisation) beschreibt verschiedene Stadien, in welchen eine HIV-Infektion verläuft. Dabei werden insgesamt 5 Stadien wie folgt festgelegt.

#### Primäre HIV-Infektion

Es handelt sich um die Phase des akuten retroviralen Syndroms. Dieses muss wie bereits erwähnt nicht zwingend auftreten (siehe 1.5.1). Ein asymptomatischer Verlauf ist in dieser Phase möglich.

#### Stadium 1

Auch in diesem Stadium zeigen sich häufig noch keine Symptome. Eine generalisierte persistierende Lymphadenopathie kann auftreten.

#### Stadium 2

Beschrieben werden moderater Gewichtsverlust, persistierende respiratorische Infekte, Nagelcandidosen und Herpes Zoster.

#### Stadium 3

Dieses Stadium beschreibt das Auftreten von Nicht-AIDS-definierenden Erkrankungen wie der Haarleukoplakie oder oropharyngealen sowie vaginalen Candidosen. Zudem eine schwere Gewichtsabnahme (> 10% des Körpergewichts), subfebrile Temperaturen und chronische Diarrhoe, welche keine andere Ursache haben.

#### Stadium 4

Schließlich beschreibt Stadium 4 das Vollbild von AIDS mit den bereits in der CDC-Klassifikation genannten AIDS-Indikatorkrankheiten.



## **1.6 Ansatzpunkte der Antiretroviralen Therapie**

Genetisch werden verschiedene Subtypen des Virus unterschieden. Zusätzlich weist das HI-Virus aufgrund der schnellen und effizienten Replikation eine hohe Mutationsrate auf (Flint, Enquist, Racaniello, Skalka; 2009). Diese Eigenschaft machte eine erfolgreiche antiretrovirale Therapie zunächst zu einer Herausforderung. Deshalb wurde im Jahr 1997 das Protokoll der „highly active antiretroviral therapy (HAART)“ entwickelt. Das Ziel der Therapie ist, die Viruslast zu senken und somit krankheitsbedingte Symptome möglichst gering zu halten. Als Angriffspunkt dienen die für den Vermehrungszyklus essentiellen Enzyme. Es gibt die nukleosidischen und nicht-nukleosidischen reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI, NNRTI), die Protease-Inhibitoren (PI) sowie Integrase-Inhibitoren (INI). Empfohlen wird eine Therapie aus zwei NNRTI, kombiniert mit einem NRTI oder einem PI oder einem INI.

### **1.6.1 Nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)**

Wie der Name verrät, stellt der Angriffspunkt der NRTIs die reverse Transkriptase dar. Sie bestehen aus Nukleosiden, welche als „falsche“ Substrate mit den physiologischen Bausteinen zur reversen Transkription von RNA in DNA konkurrieren. Ein verändertes Zuckermolekül dieser Nukleoside führt durch die Unfähigkeit des Aufbaus eines stabilen Doppelstrangs zum Kettenabbruch. Diese Medikamentenklasse war die erste, welche zur Behandlung der HIV-Infektion zugelassen wurden (Hoffmann, Rockstroh, 2013).

### **1.6.2 Nicht-nukleosidische reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI)**

Auch NNRTIs greifen an der reversen Transkriptase an. Im Unterschied zu den NRTIs handelt es sich nicht um Nukleoside. Vielmehr binden sie nicht-kompetitiv an einem Bereich des Enzyms, welcher sich in unmittelbarer Nähe der Nukleosidbindungsstelle befindet. Es entsteht ein Komplex, welcher die Bindungsfähigkeit der reversen Transkriptase für Nukleoside einschränkt, wodurch die Virusreplikation schließlich gehemmt wird. Problematisch ist die rasche Entwicklung von Resistenzen, welche häufig mit Kreuzresistenzen für NRTIs verbunden sind (Flint, Enquist, Racaniello; 2009).

### **1.6.3 Protease-Inhibitoren (PI)**

Für die Entstehung eines infektiösen HI-Virusmoleküls ist die Spaltung des nach der Translation entstandenen Polypeptids (Gag-Pol-Sequenz) in die verschiedenen Enzyme sowie verschiedene weitere Proteine essentiell. Diese Aufgabe übernimmt die Protease. Durch eine Hemmung der Protease unterbleibt dieser Vorgang und es entstehen „nicht-infektiöse“ Virusmoleküle. Die chemische Struktur der Protease-Inhibitoren ähnelt dem natürlichen Substrat der Protease.

## 1.7 ART in Tansania

In Tansania ergeben sich für die Etablierung einer landesweiten antiretroviralen Therapie verschiedene Herausforderungen. Der größte Teil der antiretroviralen Therapie wird weiterhin durch Spendengelder finanziert, führend sind hier PREPFAR und UNICEF (TACAIDS 2015). In weiten Teilen des Landes fehlt die Infrastruktur, um landesweite medizinische Zentren zu schaffen. Diese Tatsache und auch sozialwissenschaftliche Aspekte machen es schwer, einen strikten und durchaus komplizierten Behandlungsplan zu etablieren. Incompliance sowie „Drug-Sharing“, also unkontrollierte Selbsttherapie über den Schwarzmarkt oder zwischen Partnern, führten in Tansania vermehrt zur Entwicklung von resistenten Virusstämmen.

Im Jahr 2016 lebten 1,4 Millionen Menschen mit HIV in Tansania, davon standen ca. 63% der Erwachsenen und 48% der Kinder unter antiretroviraler Therapie (UNAIDS 2017). Gleichzeitig kam es jedoch zu 55.000 registrierten Neuinfektionen. Dies zeigt, dass neben der Therapie auch immer noch die Aufklärung und Prävention ein großes Thema sind.

Im Jahr 2004 wurde in Tansania durch das „Ministry of Health, Community Development, Gender, Elderly, and Children“ ein Programm (National AIDS Control Programme, NACP) entwickelt, welches neben der Bereitstellung der antiretroviralen Medikamente auch die gesamte Koordination der Diagnostik sowie Therapiebegleitung übernehmen soll (National Guidelines for the management of HIV and AIDS, 2017).

Sobald ein Patient HIV-positiv getestet wurde, wird die Anbindung an ein Zentrum empfohlen. Das Programm richtet sich nach den Therapie-Leitlinien der WHO. Grundsätzlich kommt jeder Patient mit HIV für eine antiretrovirale Therapie in Frage, unabhängig von Stadium oder CD4-Zahl.

Die Standard-Therapie (First-Line) in Tansania ist die Dreifachkombination aus Tenofovir, Efavirenz und Lamivudin (TDF, EFV, 3TC). Diese Therapie ist auch kombiniert in einer Tablette erhältlich und muss vom Patienten einmal täglich abends eingenommen werden

Die häufigste Second-Line-Therapie ist die Kombination aus Zidovudine, Lamivudin sowie dem Proteaseinhibitor Azatanavir/Ritonavir (AZT/r) (National Guidelines for the management of HIV and AIDS, 2017).

In Zentren mit der Möglichkeit einer Viruslast-Bestimmung wird bis zu einer suffizienten Senkung der Viruslast (<50 Kopien/ml) eine Kontrolle der CD4-Zellen alle 6 Monate empfohlen. Sobald die Zellzahl mehr als 350 Zellen/mm<sup>3</sup> beträgt, ist kein weiteres CD4-Monitoring erforderlich, solange der Patient klinisch stabil ist. Liegen nach 6 Monaten mehr als 1000 Viruskopien/ml vor, ist ein Therapieversagen anzunehmen. Ist die Bestimmung der Viruslast nicht möglich, wird der Therapieerfolg über eine halbjährliche Bestimmung der CD4-Zahl kontrolliert. Bevor ein Therapieversagen postuliert wird, müssen andere Ursachen für die unzureichende Wirkung eruiert werden. In Frage kommen zum Beispiel Incompliance, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten oder Maladsorption.

Gleichzeitig ist auch eine regelmäßige Bestimmung der Nieren- sowie Leberwerte, Blutbild sowie Urintests zur Bestimmung von Proteinen und Glukose nötig. Des weiteren Tuberkulose-Tests (Sputum), Bestimmung der Hepatitis-Serologie sowie Schwangerschaftstests.

Es gestaltet sich schwierig, passende Quellen mit aussagekräftigen Zahlen zu finden, welche ein realistisches Bild über die tatsächliche Umsetzbarkeit von Viruslast-Bestimmungen in Tansania liefert. Eine primäre Resistenztestung ist nicht vorgesehen.

## 1.8 PMTCT

Weltweit leben 2,1 Millionen Kinder (< 15 Jahre) mit HIV (UNAIDS 2016). Im Jahr 2016 kamen etwa 160000 Neuinfektionen hinzu. Noch vor 10 Jahren lag die Zahl mit 520000 neuinfizierten Kindern deutlich höher. Die meisten Ansteckungen bei Kindern treten durch eine Übertragung von Mutter zu Kind während der Schwangerschaft, der Geburt oder durch das Stillen auf. Die Übertragungswahrscheinlichkeit von einer HIV-infizierten Mutter auf ihr Kind liegt zwischen 20 – 50% (De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, et al.; 2000).

Bereits im Jahr 2000 wurde durch die WHO eine Empfehlung zur Prävention einer HIV-Übertragung von Mutter auf ihr Kind gegeben. Dabei erfolgte die einmalige Einnahme von Nevirapin durch die Mutter während der Geburt, sowie anschließend durch das Neugeborene innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Entbindung (WHO 2000). Studien ergaben, dass hierdurch das Risiko einer Ansteckung um bis zu 50% gesenkt werden konnte (Jackson et al, 2003; Stringer et al., 2003). Zudem weist Nevirapin eine lange Plasmahalbwertszeit auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch 7 Tage nach der Geburt noch ein ausreichend hoher Spiegel in Muttermilch, Plasma der Mutter sowie des Kindes nachweisbar ist (Mirochnick et al., 1998; Musoke et al., 1999). Diese Form der Therapie ist kostengünstig und somit in strukturschwachen Ländern gut umsetzbar.

Bereits nach kurzer Zeit zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Resistenzentwicklung. Im Jahr 2007 beschrieben Arrive et al. eine Prävalenz für eine Resistenz gegenüber Nevirapin von 37,8 % bei den betroffenen Müttern, sowie von 52,7 % in Kindern, welche sich trotz der Prävention angesteckt hatten.

Mit diesen Erkenntnissen empfiehlt die WHO aktuell, dass alle mit HIV infizierten Frauen, die schwanger sind oder ihr Kind stillen mit der Tripple-Therapie aus Tenofovir, Lamivudin und Efavirenz starten. Diese Therapie wird unabhängig von WHO-Stadium oder CD4-Zahl initiiert und auch nach der Schwangerschaft lebenslang fortgeführt (Option B+, WHO 2015). Zudem wird empfohlen, dass die Kinder dieser Frauen, die mit Muttermilch gestillt werden, die ersten 6 Wochen eine Monotherapie mit Nevirapin erhalten. Kinder, die mit Muttermilchersatz ernährt werden, erhalten die ersten 4-6 Wochen ebenfalls Nevirapin einmal täglich oder alternativ Zidovudin zweimal täglich. Gleichzeitig sollte 4-6 Wochen nach der Geburt sowie nach 18 Monaten bzw. nach Beendigung der Stillzeit ein HIV-Test durchgeführt werden. Sollte sich ein Kind mit HIV

angesteckt haben, wird auch hier der unmittelbare Beginn der antiretroviralen Therapie lebenslang empfohlen. Mit den oben genannten Maßnahmen konnte eine deutliche Senkung der Neuinfektionen bei Kindern erreicht werden (UNAIDS 2011).

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Im Jahr 2011 berichtete unsere Arbeitsgruppe über eine deutlich höhere Resistenzlage gegenüber antiretroviralen Medikamenten in therapienaiven HIV-positiven Menschen in Tansania als bis dahin angenommen (Kasang, Kalluvya et al.). Untersucht wurden dabei Patienten, welche älter als 25 Jahre waren und bisher laut WHO-Kriterien nicht für die Einschätzung der Resistenzlage in Bevölkerungsgruppen berücksichtigt wurden.

Schon im Vorfeld wurde deutlich, dass, verglichen mit der guten Resistenzlage, die Rate eines Versagens der First-Line-Therapie innerhalb der ersten 12 Monate höher war als zu erwarten. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die Resistenzlage in den bisher untersuchten Patientengruppen nicht die tatsächliche Situation in der breiten Bevölkerung abbildet.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden weitere Proben von verschiedenen Patientengruppen in Tansania untersucht und sollen miteinander verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plasma von Patienten untersucht, welche älter als 15 Jahre waren. Es soll zunächst aufgezeigt werden, wie hoch die allgemeine Resistenzlage in der untersuchten Patientengruppe ist und ob diese sich weiter verschärft hat.

Das wichtigste Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, inwieweit die zurzeit verwendete Tripple-Therapie aus Lamivudin, Tenofovir und Efavirenz als First-Line-Therapie in Tansania wirksam ist und ob diese Empfehlung überarbeitet werden muss. Dafür wurde das Virus-Genom von 114 HIV-Patienten aus Tansania untersucht, welche unmittelbar vor Beginn einer antiretroviralen Therapie standen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Computersoftware

**Tabelle 2** Verwendete Computersoftware

<b>DNASTAR Lasergene, SeqMan</b>	M. Wayne Davis
<b>Microsoft Open Office 2007</b>	Microsoft
<b>Prism 6.01</b>	Graphpad

##### 3.1.2 Chemikalien

**Tabelle 3:** Verwendete Chemikalien

<b>Agarose</b>	Eurogentec
<b>DNA-Ladepuffer</b>	Fermentas
<b>dNTP-Mix</b>	Fermentas
<b>Ethanol, unvergällt</b>	Roth
<b>Gene Ruler 1kb DNA Leiter</b>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
<b>H<sub>2</sub>O, RNase-frei</b>	Qiagen

##### 3.1.3 Enzyme

**Tabelle 4:** Verwendete Enzyme

<b>BigDye Version 1.1</b>	Applied Biosystems
<b>OneStep RT-PCR Enzyme Mix</b>	Qiagen
<b>Taq 2x Master Mix</b>	New England Biolabs GmbH Frankfurt (Main)



### 3.1.4 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

<b>Agarose Gelelektrophorese Kammer</b>	Institutswerkstatt
<b>Agarose Gelgießkammer</b>	Institutswerkstatt
<b>Autoklav 5057 ELC</b>	Tuttnauer Systec
<b>Eismaschine AF-1</b>	Scotsman
<b>Gefriertruhen</b>	Liebherr
<b>Gelelektrophoresedokumentationssystem GelDoc-1000</b>	Intas
<b>Feinanalysewaage</b>	Sartorius
<b>Kühl- und Gefrierschrank</b>	Bosch
<b>Laborwaage</b>	Scaltec
<b>Mikroliterpipette</b>	Eppendorf, Gilson
<b>Mikrowelle</b>	Brother, Powerwave ER-200
<b>NanoDrop Spektrometer (ND-2000)</b>	Thermo Scientific
<b>Sicherheitswerkbank BSB 4A</b>	Gelaire
<b>Thermocycler My Cycler, Gradient</b>	Bio-Rad
<b>Tischzentrifuge Biofuge Pico Mikro 200 R</b>	Heraeus Hettich
<b>Vortexmischer</b>	Scientific Industries
<b>Wasserbad</b>	Memmert/Hartenstein

### 3.1.5 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Tabelle 6: Für Agarosegelelektrophorese verwendete Puffer und Lösungen

<b>TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (50x)</b>	TRIS pH 8,0 1,0 M Essigsäure 0,1 M EDTA
<b>1%iges Agarosegel</b>	1,5 g Agarose 150 ml TAE-Puffer 5 µl GelRed
<b>Ladepuffer DNA (6x)</b>	2,5 ml Bromphenolblau 3 ml Glycerol Add 10 ml ddH <sub>2</sub> O

### 3.1.6 Primer für Reverse-Transkriptions-PCR

Tabelle 7: Primer, welche für die Reverse-Transkriptions-PCR verwendet wurden

Name	Sequenz
<b>HIV-PR outer 50prot1</b>	5'-TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C-3'
<b>HIVRT outer Mj4</b>	5'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T-3'

### 3.1.7 Primer für nested-PCR

Tabelle 8: Primer, welche für die nested-PCR verwendet wurden

Name	Sequenz
<b>HIV-PR outer 50prot1</b>	5'-TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C-3'
<b>HIVRT outer Mj4</b>	5'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T-3'

### 3.1.8 Primer für die Sequenzierung

Tabelle 9: Primer, welche für die Sequenzierung verwendet wurden

Name	Sequenz
<b>HIV-PR outer 50prot1</b>	5'-TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C-3'
<b>HIVRT outer Mj4</b>	5'-CTG TTA GTG CTT TGG TTC CTC T-3'

### 3.1.9 Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits

Kit	Firma	Katalognummer
<b>Big Dye Ver. 1.1 Cycle sequencing Kit</b>	Applied Biosystems	4337450
<b>GenElute™ PCR Clean-Up Kit</b>	Sigma-Aldrich	NA 1020
<b>iScript™ cDNA Synthese Kit</b>	Bio-Rad	170-8890
<b>QIAmp MinElute Virus Spin Kit 50</b>	Qiagen	577004
<b>QIAGEN OneStep RT-PCR Kit</b>	Qiagen	210212

### 3.1.10 Verbrauchsmaterial

Tabelle 11: Verbrauchsmaterial

<b>Agarosekämme 20 µl, 40 µl</b>	Institutswerkstatt
<b>Autoklavierbare Kunststofftüten</b>	Hartenstein
<b>Glasflaschen</b>	Schott
<b>Glaskolben, -messbecher, -messzylinder</b>	Ilmabor, Rasotherm, Schott
<b>Glaspipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml</b>	Brand
<b>Kryoröhrchen 2 ml</b>	Hartenstein
<b>Labor Schutzbrille</b>	Roth
<b>Messzylinder 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1 l</b>	Brand
<b>PCR-Plastikreaktionsgefäße, 200 µl</b>	Hartenstein
<b>Pipettenspitzen, gestopft</b>	Nerbe plus
<b>Pipettenspitzen, ungestopft</b>	Roth
<b>Plastikreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)</b>	Eppendorf
<b>Plexiglasschlitten</b>	Institutswerkstatt
<b>Schraubverschlussröhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	Greiner
<b>Terralin Liquid (Desinfektionsmittel)</b>	Schülke & Mayr
<b>Zellstofftücher</b>	Kimberly-Clark

### 3.1.11 Längenstandards

Als Marker für das Agarosegel wurde der Nukleinsäurestandard Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix verwendet, bezogen von Thermo Fisher Scientific.

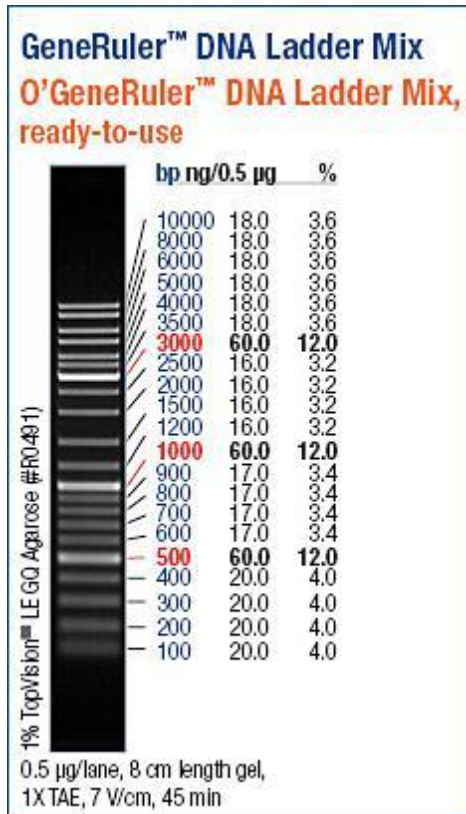


Abbildung 5: Für Agarosegel-Elektrophorese verwendeter Längenstandard Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 RNA-Isolierung aus Plasma

Die Isolierung der Virus-RNA aus Plasma wurde mit Hilfe des QIAmp® MinElute® Virus Spin Kits (cat. no. 577004, Quiagen 2014) durchgeführt. Aufgrund der Infektiosität des Plasmas erfolgte dieser Teil in einem S3-Labor. Verwendet wurden stets gestopfte Pipettenspitzen sowie sterile, RNase-freie 2.0ml-Reaktionsgefäße. Um die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination durch RNase möglichst gering zu halten, wurden alle Komponenten des Kits nur unter der Hood geöffnet. Zuvor erfolgte die gründliche Reinigung sämtlicher Arbeitsflächen und aller Arbeitsgeräte, welche in der Hood benötigt wurden, durch das Desinfektionsmittel Terralin Liquid. Die RNA-Isolierung wurde in 4 Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgte der Zellaufschluss durch

die Lysierung und Homogenisierung der Proben mit dem AL-Puffer, welcher Carrier-RNA-AVE enthält. Ziel dieses Schrittes war die Denaturierung des Plasmas sowie die gleichzeitige Inaktivierung von zusätzlichen RNAsen. Dann erfolgte die Bindung des Lysats an die Silikanmembran einer QIAamp MinElute Säule. Im nächsten Schritt wurde die Filtermembran dreimal mit alkoholhaltigen Puffern gewaschen. Die gebundene RNA wurde zuletzt mit 50 Puffer AVE eluiert.

### **3.2.2 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion**

Bei der reversen Transkriptase PCR handelt es sich um die Kombination aus zwei Verfahren. Zunächst wird mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) die isolierte RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Dabei besitzt dieses Enzym eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, welche mittels Primer und Desoxydinukleotiden (dNTPs) einen zum RNA-Strang komplementären DNA-Strang (cDNA) synthetisiert, eine RNase-H-Aktivität, welche für die Spaltung des RNA-Strangs sorgt, und zuletzt eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche mittels des zweiten Primers aus der einzelsträngigen cDNA eine doppelsträngige DNA synthetisiert. Diese dient in der nachfolgenden PCR als Vorlage, aus welcher die gewünschten Sequenzen amplifiziert werden können.

Für diese Methode wurde in den durchgeführten Experimenten das QIAgen OneStep RT-PCR Kit verwendet (Qiagen, 2010), welches alle für die Reaktionen benötigten Komponenten enthält. Diese wurden vor Beginn der reversen Transkription hinzugefügt, wobei sowohl die reverse Transkription als auch die Polymerasekettenreaktion nacheinander im gleichen Tube stattfanden. Eine Zugabe weiterer Substanzen während oder zwischen beiden Reaktionen war nicht notwendig.

5	µl	Quiagen One-Step-RT-PCR-Puffer
1	µl	dNTP Mix
1	µl	Primer HIV-PR outer 50prot1
1	µl	Primer RTouter Mj4
1	µl	Enzyme Mix
14	µl	Rnase-freies Wasser
<hr/>		
23	µl	Gesamtvolumen

**Tabelle 12: PCR-Programme für RT-PCR**

<b>Anzahl der Zyklen</b>	<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>1</b>	Reverse Transkription	50°C	30 Min.
<b>1</b>	PCR Aktivierung	95°C	15 Min.
<b>30</b>	Denaturierung	94°C	20 Sek.
	Anealing	55°C	30 Sek.
	Extension	72°C	1 Min.
<b>1</b>	Finale Extension	72°C	10 Min.
<b>1</b>	Kühlung	15°C	

### **3.2.3 Polymerasekettenreaktion**

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein enzymkatalysiertes Verfahren zur Amplifikation bestimmter Gen-Sequenzen eines vorliegenden DNA-Strangs. Dabei wird das Prinzip der DNA-Replikation angewandt. Essentiell ist zunächst ein DNA-Strang, welcher als Matrize dient und dessen Sequenzen mindestens teilweise bekannt sind. Zudem werden zwei spezifische Primer benötigt, die jeweils am 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz beider komplementären Stränge binden können, sowie eine hitzestabile Polymerase und einzelne Nukleosidtriphosphat-Moleküle. Die Reaktion findet in der Regel in einem Thermocycler statt und besteht aus drei verschiedenen Schritten, welche jeweils einen Zyklus bilden.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung, bei der durch eine Erhöhung der Temperatur auf bis zu 95°C die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA-Matrize aufgespalten werden und nun zwei Einzelstränge vorliegen.

Im nächsten Schritt erfolgt bei einer Temperatur von 50 °C die Hybridisierung. Die Primer, welche eine Länge von 20-40 Basen haben und zur gewünschten Sequenz komplementär sind, binden an das 3'-Ende der beiden Einzelstränge (Annealing). Die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Abschnitte dienen nun als Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche im dritten Schritt bei einer Temperatur von 68°C-72°C die Primer-Sequenz durch die Anlagerung der Nukleotide verlängert und somit einen DNA-Doppelstrang bildet, welcher die zu amplifizierende Sequenz enthält.

Dieser Reaktionszyklus kann beliebig oft wiederholt werden, wobei die Menge der DNA-Fragmente exponentiell zunimmt.

### **Nested-PCR**

Die nested-PCR ist ein Variante der PCR, die sich vor allem für die Amplifikation sehr geringer DNA-Mengen eignet. Es handelt sich um ein Verfahren, welches die Menge an unspezifischen PCR-Produkten reduzieren soll. Zunächst wird die DNA in einer ersten PCR mit nur wenigen Zyklen amplifiziert. Aus diesem Gemisch wird dann eine kleine Menge an PCR-Produkten, welche neben der gewünschten DNA-Sequenz auch unerwünschte Sequenzbereiche enthält, entnommen und in einer weiteren PCR-Reaktion mit anderen Primern zusammengebracht. Diese Primer sind so gewählt, dass sie auf dem gewünschten DNA-Abschnitt in Bereichen binden, die sich weiter innen befinden als die Primer-Bindungsstellen der vorangegangenen PCR. So werden nur die Produkte weiter amplifiziert, welche zu allen Primern komplementär sind und die Spezifität dieser PCR erhöht.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde die initiale PCR im Rahmen der RT-PCR durchgeführt. Für die nested-PCR wurde eine Taq-Polymerase eingesetzt, welche thermostabil ist und aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird.

25 µl Taq 2x Mastermix  
1,25 µl Primer HIV-PR nest 50prot2  
1,25 µl Primer HIV-RT nest NE13  
20,5 µl dH<sub>2</sub>O  
2 µl Template  
50 µl Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde jeweils in 0,25ml PCR-Reaktionsgefäße auf Eis pipettiert und nach kurzer Resuspension und Abzentrifugation im Thermocycler platziert.



**Tabelle 13: PCR-Programme für die nested-PCR**

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit
1	PCR Aktivierung	95°C	5 Min.
30	Denaturierung	94°C	20 Sek.
	Anealing	60°C	30 Sek.
	Extension	68°C	1 Min.
1	Finale Extension	68°C	10 Min.
1	Kühlung	15 °C	

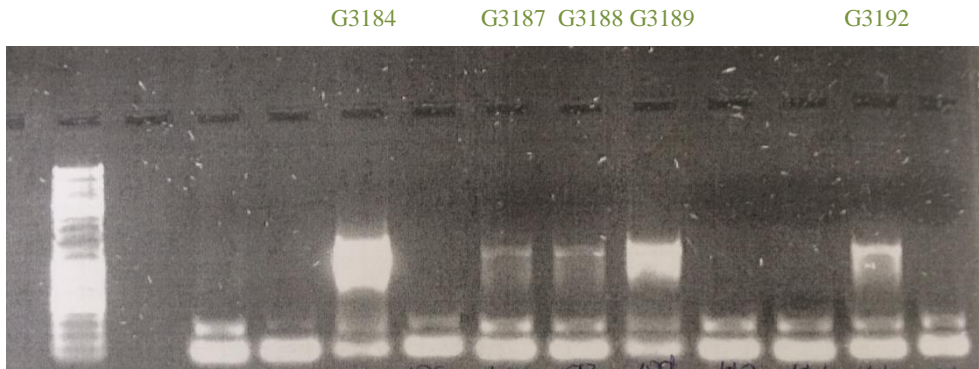
### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe der gewonnenen PCR-Produkte zu bestimmen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein biochemisches Trennverfahren, bei welchem man sich die Tatsache zunutze macht, dass geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern. Da Nukleinsäuren eine starke negative Ladung besitzen, wandern sie von der Kathode zur Anode, wobei die Moleküle schneller wandern, je geringer ihre Länge ist.

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde zunächst 1,5g Agarose abgewogen und mit 150 ml 1xTAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben gemischt. Dann erfolgte ein vierminütiges Erhitzen in der Mikrowelle, bis die Agaroseflocken vollständig gelöst waren. Um die Nukleinsäuren später sichtbar zu machen, erfolgte die Zugabe von 5 µl GelRed, welches durch vorsichtiges Schwenken in der Lösung verteilt wurde. Das Gemisch konnte dann in einen vorbereiteten Gelschlitten (Institutswerkstatt) gegossen und ein Kamm für die Formung der Geltaschen eingebracht werden. Nach ca. 40 Minuten war das Gel ausgehärtet und wurde nach Entfernung des Kamms in eine Gelkammer (institutseigene Werkstatt) gegeben, welche mit 1xTAE-Puffer befüllt war.

Die aufzutrennende Probe wurde im Verhältnis 1:10 mit dem Ladepuffer versetzt und in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 100-130 Volt für ca. 60 Minuten. Schließlich konnte die Elektrophorese mittels UV-Licht durch ein Geldokumentationsgerät analysiert und vorhandene Banden, welche durch GelRed

markiert wurden, sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis wurde fotografisch festgehalten und im Computer abgespeichert.



**Abbildung 6: Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese nach RT-PCR mit anschließender nested-PCR**

Nach der RNA-Isolierung von 10 Proben erfolgte die RT-PCR, anschließend die nested-PCR mit einem Teil dieses Produkts. Dann wurden die Proben mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Im Zielbereich von etwa 1000 – 1200 bp befanden sich Probe G3184, G3187, G3188, G3189, G3192. Diese wurden aufgereinigt und sequenziert.

### 3.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, NA 1020) nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt. Ziel dieses Verfahrens ist, die amplifizierten PCR-Produkte von den für die PCR benötigten Primern, der DNA-Polymerase, Puffern, Nukleotiden und Salze zu entfernen, da diese Komponenten die Sequenzierung stören können.

### 3.2.6 Photometrische Messung von Reinheit und Konzentration der DNA

Die photometrische Messung des DNA-Gehalts der PCR-Produkte wurde durch ein NanoDrop Spektrometer (ND-2000, Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass Nukleinsäuren UV-Licht mit einer maximalen Wellenlänge von 260 nm absorbieren. Proteine hingegen weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf, was vor allem durch die aromatisierten Seitenketten bedingt ist.

In den durchgeführten Experimenten wurde das System zunächst mit einem korrespondierenden Puffer als Referenzwert kalibriert. Nach dem Auftragen von

2 µl der Probenlösung auf die Messvorrichtung wurde die Absorption sowohl bei einer Wellenlänge von 260nm als auch 280nm bestimmt. Aus dem Quotient dieser beiden Werte kann auf die Reinheit der Probe geschlossen werden.

$$\text{Reinheit} = A_{260}/A_{280}$$

- $dA_{260}$  = gemessene Absorption bei 260nm
- $A_{280}$  = gemessene Absorption bei 280nm

Ein Reinheitsquotient von unter 1,6 gab einen Hinweis auf eine Verunreinigung der Probe.

$$\text{Konzentration} = \frac{A_{260} \times V \times U}{2 \mu\text{l}}$$

- $V$  = Verdünnungsfaktor
- $U$  = Umrechnungsfaktor (50 für doppelsträngige DNA)

### 3.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Abschnitte erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger, welche auch als Kettenabbruch-Synthese bekannt ist.

Auch hier werden die DNA-Doppelstränge zunächst zu Einzelsträngen denaturiert. Es folgt die Hybridisierung mit einem Sequenzierprimer, welcher durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert wird. Um später die genaue Basenreihenfolge bestimmen zu können, werden fluoreszierende 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) dem Reaktionsansatz hinzugefügt, wobei jedes der vier unterschiedlichen ddNTPs mit einem anderen Farbstoff gekoppelt ist. Dadurch ist eine Aufspaltung in vier getrennte Ansätze, wie es bei der Verwendung von radioaktiv markierten Nukleotiden der Fall ist, nicht notwendig. Bei Didesoxynukleotiden fehlt die Hydroxygruppe am 3'-Kohlenstoff-Atom, weshalb es bei deren Einbau in die wachsende DNA-Kette zum Synthese-Abbruch kommt. Dieser Einbau der ddNTPs erfolgt zufällig und so entstehen viele Polymerisationsprodukte unterschiedlicher Länge, an deren Ende sich jeweils ein fluoreszierendes Nukleotid befindet.

In einem automatischen Sequenzanalysegerät werden die Polymerisationsprodukte nach ihrer unterschiedlichen Länge aufgetrennt und die endständigen ddNTPs mittels Laser zur Fluoreszenz angeregt.

2 µl H<sub>2</sub>O

1 µl DNA

1 µl Primer

1 µl BigDye Version 1.1

5 µl Gesamtvolumen

**Tabelle 14: Programm für die Sequenzierung**

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
<b>1</b>	PCR-Aktivierung	96°C	1 Minute
<b>25</b>	Denaturierung	96°C	10 Sekunden
	Anealing	50°C	5 Sekunden
	Extension	60°C	4 Minuten
	Kühlung	15°C	

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Patientengruppe**

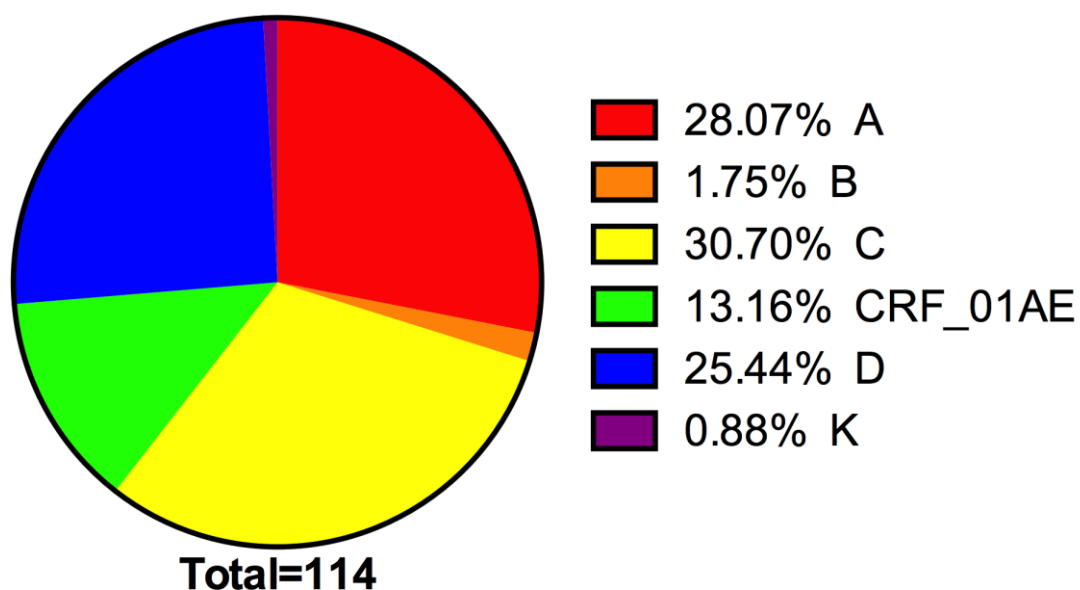
Für die Auswahl der Patienten galten folgende Kriterien:

- Alter > 25 Jahre
- Geschlecht: weiblich und männlich
- HIV-positiv (neue oder bereits länger zurückliegende Diagnose)
- bisher therapienaiv (keine HAART)
- HAART wird nach der Studienvisite begonnen

Die untersuchten Blutproben wurden im medizinischen Zentrum Bugando in Mwanza (Tansania) gewonnen. Das entnommene Vollblut wurde zentrifugiert und anschließend als EDTA-Plasma-Probe bei -80°C eingefroren und gelagert. Anschließend erfolgte der Transport nach Würzburg, ohne die Kühlkette zu unterbrechen. Bis zur Untersuchung der Proben wurden diese auch in Würzburg bei -80°C gelagert.

### **4.2 Subtypenverteilung der reversen Transkriptase**

Die Bestimmung der Subtypen des HIV-Genoms erfolgte online durch die Eingabe der entschlüsselten Sequenzen in die „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University. Dabei wurde sowohl der Subtyp der reversen Transkriptase (RT) als auch der Proteinase (PR) analysiert. Zur Kontrolle erfolgte, ebenfalls online, eine zusätzliche Bestimmung über das „REGA Subtyping Tool“ der Katholieke Univeriteit Leuven.



**Abbildung 7: Subtypenverteilung der reversen Transkriptase HIV-positiver Patienten in Tansania**

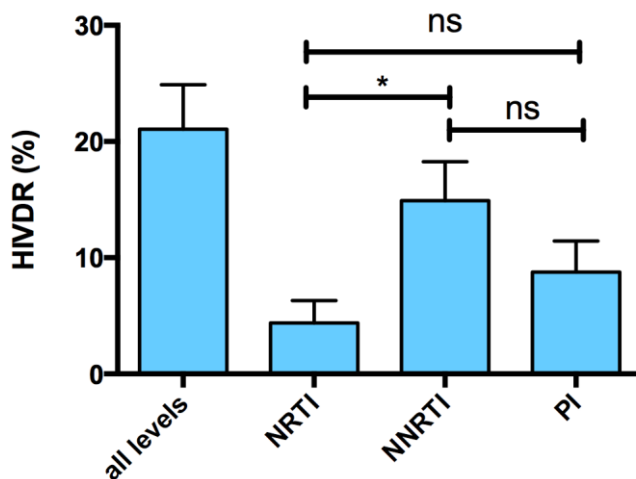
Insgesamt wurden 114 Sequenzen analysiert. Bezogen auf die reverse Transkriptase konnte bei 32 (28,07 %) Proben der Subtyp A detektiert werden, 35 (30,7 %) wiesen Subtyp C auf und 29 (25,44 %) Sequenzen konnten dem Subtypen D zugeordnet werden. Bei der Unterform CRF\_01 AE handelt es sich um eine zirkulierende rekombinante Form, welche bei 15 (13,16 %) Patienten auch vertreten war. Zudem trat zweimal Subtyp B und einmal Subtyp K auf.

#### **4.3 Resistenzlage in der untersuchten Patientengruppe**

Auch vorliegende Resistenzen innerhalb der Sequenzen wurden durch das Programm der „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University analysiert. Unterschieden wurde dabei zwischen 4 Schweregraden. Zudem zwischen Resistenzen gegenüber den verschiedenen Medikamentenklassen, den nicht-nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI), den nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI) sowie den Proteaseinhibitoren (PI).

Insgesamt wurde das Plasma von 114 HIV-positiven Patienten untersucht. Bei 24 Patienten konnte mindestens eine Resistenz gegenüber einem antiretroviralen Medikament nachgewiesen werden, unabhängig von deren Schweregrad (siehe Abb. 8). Dies entspricht einer Prävalenz von 21,5 % innerhalb der untersuchten Gruppe.

Weiterhin wurde berechnet, inwieweit die einzelnen Medikamentenklassen betroffen waren. Insgesamt waren 17 Patienten (14,91 %) von einer Resistenz gegen ein NNRTI betroffen. Bei 5 der untersuchten Plasmaproben lag eine Resistenz gegen ein NRTI und bei 10 gegen ein PI vor. Die Konfidenzintervalle sind in Tabelle 15 einsehbar.



**Abbildung 8: Resistenzlage**

Abgebildet ist der Anteil der Patienten, welche mindestens eine Resistenz gegenüber antiretrovirale Medikamente (HIVDR) aufwiesen. Daneben wird aufgezeigt, welche Medikamentenklassen betroffen waren.

**Tabelle 15: Konfidenzintervalle der Resistenzen**

HIVDR	Mean	Konfidenzintervall (95%)
<b>Gesamt</b>	21,5 %	13,45 – 28,65 %
<b>NNRTI</b>	14,91 %	8,27 – 21,55 %
<b>NRTI</b>	4,39 %	0,57 – 8,2 %
<b>PI</b>	8,77 %	3,5 – 14,04 %

Nach dem Kruskal-Wallis-Test ist ein statistisch signifikanter Unterschied nur zwischen der Gruppe der NNRTIs sowie der NRTIs zu sehen. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Resistenz gegen ein NNRTI in der untersuchten Gruppe gegenüber den NRTIs signifikant erhöht ist.

### 4.3.1 Schweregrad der Resistenzen innerhalb der Medikamentenklassen

Aufgezeigt werden soll im Folgenden, wie stark die einzelnen Medikamentenklassen vom Grad der Resistenz betroffen waren. Die schwerste ist die „high-level-resistance“, gefolgt von „intermediate-, low- und potential-low-level-resistance“. Gewertet wurde hierbei nur die schwerste Resistenz. Entnommen sind die Daten aus dem Programm der „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University.

Von den detektierten Resistenzen gegen die Gruppe der NNRTI entsprachen 6 einer „high-level-resistance“, 1 einer „intermediate-level-resistance“, 6 Proben wiesen eine „low-level-resistance“ und 4 eine „potential-low-resistance“.

Für die Klasse der NRTI wurden 2 Proben mit einer „high-level-resistance“, 2 mit einer „low-level-resistance“ und 1 mit einer „potential-low-resistance“ analysiert. Eine „intermediate-level-resistance“ trat bei keiner Probe als schwerste Mutation auf.

Bei den Proteaseinhibitoren konnte kein „high-level-,“ oder „intermediate-level-resistance“ gefunden werden. Es fanden sich 3 Patienten mit einer „low-level-resistance“ sowie 7 mit einer „potential-low-resistance“.

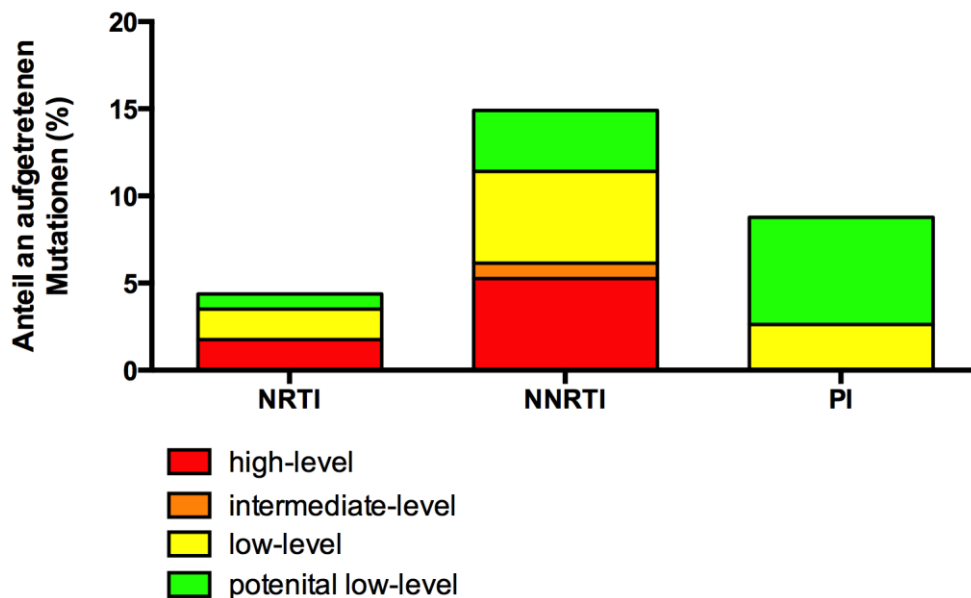


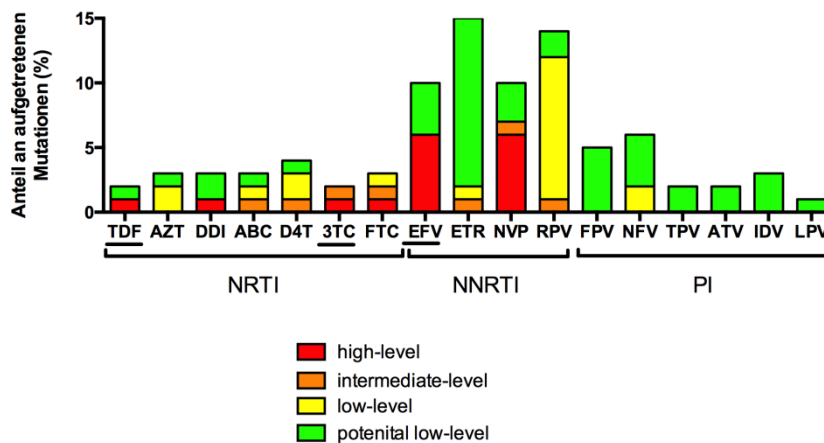
Abbildung 9: Anteil der detektierten Resistenzen gegenüber den Medikamentenklassen. Gezählt wurde jeweils die schwerste Resistenz gegen die jeweilige Medikamentenklasse innerhalb der Untersuchten Patientengruppe (n=114)



Der Kruskal-Wallis-Test ergab hier keine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für eine „high-level-resistance“ gegen ein NNRTI im Vergleich zu den anderen Medikamentenklassen. Interessant wäre hier die Untersuchung einer wesentlich höheren Patientenzahl.

### 4.3.2 Schweregrad der Resistenzen gegenüber einzelnen Medikamenten

In Abbildung 10 wurde jede detektierte Resistenz berücksichtigt, unabhängig davon, ob die Tripple-Therapie betroffen war. Die Gruppe der NNRTIs war am häufigsten betroffen, besonders EFV und NVP stechen hier bezüglich der „high-level-resistance“ heraus.



**Abbildung 10: Übersicht über die Resistenzlage der einzelnen Medikamente**

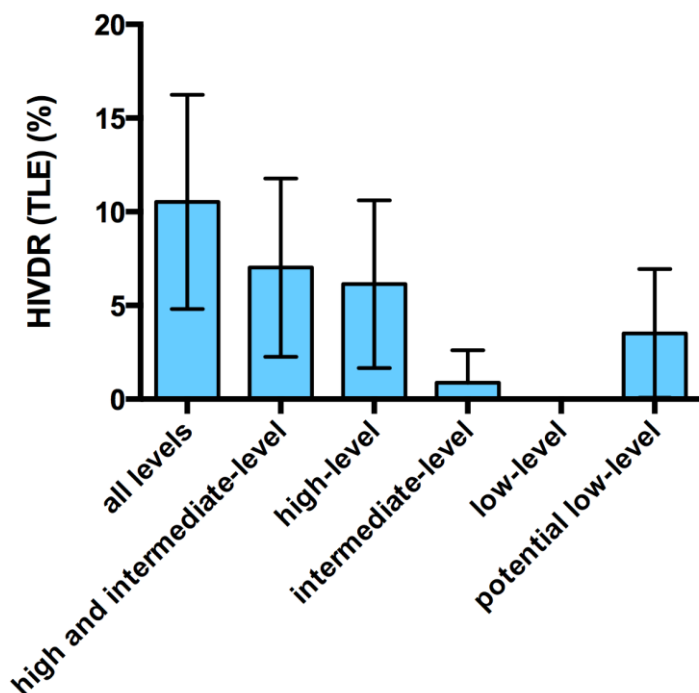
Es wurde jede Resistenz berücksichtigt. Unterstrichen sind Tenofovir (TDF), Lamivudin (3TC) und Efavirenz (EFV), welche im Rahmen der first-line-Tripple-Therapie in Tansania eingesetzt werden.

### 4.3.3 Resistenzlage gegenüber der Tripple-Therapie TLE

In Tansania wird ein festes Therapieregime in Form einer first-line- sowie einer second-line-Tripple Therapie (siehe 1.7) angewendet, ohne vorher eine Resistenztestung vorzunehmen. Um einschätzen zu können, welche Folgen die Resistenzlage der untersuchten Patientengruppe für den Therapieerfolg haben könnte, wurde untersucht, inwieweit die einzelnen Medikamente betroffen sind.

Von 114 untersuchten Patienten waren 12 Individuen von mindestens einer Resistenz gegen Efavirenz, Tenofovir oder Lamivudin betroffen. Dies spricht einer Prävalenz von

10,53 %. Eine „high-level-resistance“ trat bei 7 (6,14 %), eine „intermediate-level-resistance“ bei 1 (0,9%) und eine „potential-low-level-resistance“ bei 4 (3,51%) Patienten auf. Eine „low-level-resistance“ gab es nicht. Gewertet wurde hierbei jeweils die Resistenz, welche am schwersten war. Statistisch war nach dem Kruskal-Wallis-Test das Auftreten einer schwereren Resistenz nicht wahrscheinlicher als die einer leichteren. Die Konfidenzintervalle können aus Tabelle 16 entnommen werden.

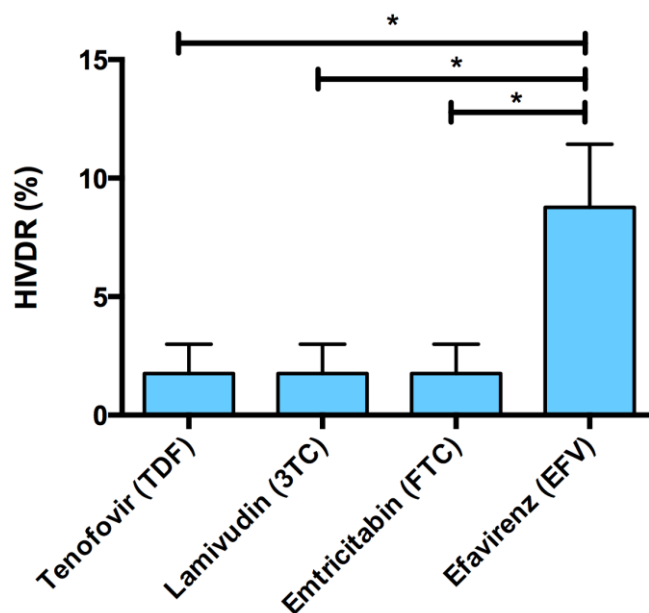


**Abbildung 11: Resistenzlage gegenüber der Tripple-Therapie (TLE)**  
Gewertet wurde die jeweils schwerste Resistenz

**Tabelle 16: Konfidenzintervalle der Resistenzen gegenüber der Tripple-Therapie (TLE)**

HIVDR	Mean	Konfidenzintervall (95%)
<b>Gesamt</b>	10,35 %	4,807 – 16,25 %
<b>High- und intermediate-level</b>	7,018 %	2,257 – 11,78 %
<b>High-level</b>	6,14 %	1,66 – 10,61 %
<b>Intermediate-level</b>	0,87 %	-0,86 – 2,62 %
<b>Potential-low-level</b>	3,51 %	0,08 – 6,95 %

Im nächsten Schritt wurde analysiert, bei wie vielen der 114 Patienten eine „high-level-resistance“ gegen eines der in den Tripple-Regimen eingesetzten Medikamente vorlag. Efavirenz (EFV) war bei 6 der untersuchten Proben von dieser schweren Resistenz betroffen, was einer Prävalenz von 6,84 % entspricht. Für Tenofovir (TDF), Lamivudin (3TC) und Emtricitabin (FTC) lag jeweils bei einer der untersuchten Sequenzen eine „high-level-resistance“ vor und somit eine Prävalenz von 1,14 %. Nach dem Kruskal-Wallis-Test sowie SEM (Standard error of Mean) besteht in der untersuchten Patientengruppe eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für eine „high-level-resistance“ gegen EFV als für die anderen Medikamente der Tripple-Therapie.



**Abbildung 12:** Wahrscheinlichkeit einer „high-level-resistance“ für die Medikamente der first-line- und second-line-Tripple-Therapie in Tansania (Beschreibung siehe Text)

Um die Konsequenz für die betroffenen Patienten in der untersuchten Kohorte aufzuzeigen, sind in Tabelle 17 alle Patienten aufgeführt, bei denen eine oder mehrere Resistenzen gegen die Tripple-Therapie aus Tenofovir (TDF), Lamivudine (3TC) und Efavirenz (EFV) auftraten. Es zeigte sich, dass bei 7 Personen der untersuchten Gruppe mindestens eine Mutation detektiert wurde, welche eine „high-level-resistance“ gegen mindestens eines dieser Medikamente aufwies. Dies entspricht einer Prävalenz von 6,14 %. Bei einer Person, Patient G3079, waren 2 Medikamente von einer high-level-resistance betroffen, Patient G3122 wies eine high-level- sowie eine intermediat-level-

resistance auf. Geht man also davon aus, dass alle untersuchten 114 Patienten die Tripple-Therapie aus Efavirenz, Lamivudin und Tenofovir erhalten haben, war diese bei 7 Patienten unzureichend. Ein Patient war sogar gegen 2 dieser Medikamente resistent.

**Tabelle 17: Liste der Patienten, welche von einer Resistenz gegenüber einer Tripple-Therapie aus TLE betroffen waren**

<b>Patient</b>	<b>High-level-resistance</b>	<b>Intermediate-level-resistance</b>	<b>Low-level-resistance</b>	<b>Potential-low-level-resistance</b>
<b>G3042</b>	EFV			
<b>G3056</b>				TDF
<b>G3061</b>	EFV			
<b>G3076</b>	EFV			
<b>G3079</b>	3TC, EFV			
<b>G3085</b>				EFV
<b>G3096</b>				EFV
<b>G3105</b>	EFV			
<b>G3122</b>	TDF	3TC		
<b>G3138</b>				EFV
<b>G3146</b>				EFV
<b>G3171</b>	EFV			

Bei 102 Sequenzen wurde keine Resistenz gegen das in Tansania übliche Therapieregime gefunden, was bedeutet, dass 89,5% der untersuchten Patienten voraussichtlich eine wirksame Behandlung erhalten hätten. Berücksichtigt man nur die „high-level-„ und „intermediate-level-resistance“, so hätten 93,86 % eine ausreichende Therapie erhalten.

#### 4.3.4 Resistenzverteilung gegen die Tripple-Therapie (TLE) innerhalb der einzelnen Subtypen

Weiterhin wurde betrachtet, ob der Subtyp des HI-Virus relevant für die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz gegenüber eines der Medikamente der in Tansania eingesetzten Tripple-Therapie ist. Insgesamt wiesen, bezogen auf die reverse Transkriptase, 32 Sequenzen Subtyp A auf. Von diesen waren wiederum 4 (12,5 %) von einer Resistenz gegen eines der in der Tripple- Therapie eingesetzten Medikamente, Efavirenz, Tenofovir oder Lamivudin, betroffen. Bei 35 Patienten wurde Subtyp C detektiert, wovon 4 (11,43 %) Sequenzen eine Resistenz gegen eines der oben genannten Medikamente aufwiesen. Bei der Rekombinanten Form CRF-01AE, welche sich in 15 untersuchten Proben fand, waren 3 (20%) Sequenzen von einer Resistenz betroffen und von den 29 mit Subtyp D war nur 1 (3,45 %) betroffen.

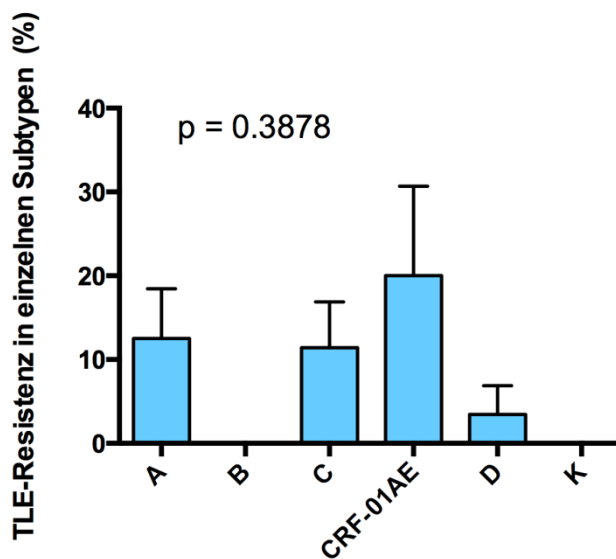


Abbildung 13: Resistenzlage gegen TLE in den einzelnen Subtypen

Gewertet wurde der Subtyp der reversen Transkriptase

Nach dem Kruskal-Wallis-Test bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Subtyp und dem Auftreten einer Resistenz gegen eines der in der Tripple-Therapie TLE verwendeten Medikamente.

#### 4.3.5 Prävalenz für Resistenzen gegen Nevirapin und der Zusammenhang mit PMTCT

Um das Risiko für eine Übertragung des HI-Virus von der Mutter auf ihr Kind während und nach der Schwangerschaft zu senken, wurde im Jahr 2000 von der WHO Leitlinien festgelegt, welche den Einsatz einer Monotherapie mit Nevirapin während der Schwangerschaft sowie auch als Prophylaxe für das Neugeborene empfohlen (siehe 1.8). Im Plasma der 114 untersuchten Patienten konnte bei insgesamt 10 Sequenzen eine Resistenz gegenüber Nevirapin (NVP) nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von 8,77 % entspricht. Es handelt sich um 9 Frauen und 1 Mann. Interessanterweise wurde bei keiner der betroffenen Frauen im Vorfeld eine Therapie im Sinne einer „PMTCT“ durchgeführt. Da alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten therapienaiv sind, ist anzunehmen, dass es sich bei den vorliegenden Resistenzen gegen NVP bereits um übertragene und nicht um erworbene Resistenzen handelt.

#### 4.3.6 Resistenzlage gegenüber TLE innerhalb der Geschlechter

Die untersuchte Patientengruppe bestand aus 80 Frauen und 34 Männern. Bei 2 der untersuchten Männer konnte eine Resistenz, unabhängig vom Schweregrad, gegen eines der Medikamente der Tripple-Therapie TLE gefunden werden. Das entspricht einer Prävalenz von 5,88 %. Insgesamt wiesen 10 der untersuchten Frauen eine solche Resistenz, was einer Prävalenz von 12,5 % entspricht.

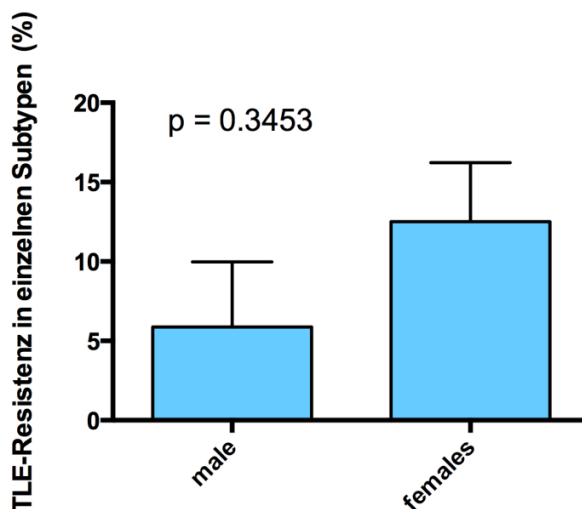


Abbildung 14: Resistenzlage gegenüber TLE innerhalb der Geschlechter

Wendet man den Vierfeldertest an, ist der berechnete Prüfwert kleiner als das Signifikanzniveau, sodass die Nullhypothese, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern bezüglich der Resistenzlage gegenüber TLE besteht, nicht nachgewiesen werden kann.

**Tabelle 18: Vierfeldertest zum Zusammenhang zwischen Geschlecht und Resistenzlage**

<b>Merkmal</b>	<b>Resistenz gegen TLE</b>	<b>Keine Resistenz gegen TLE</b>	<b>gesamt</b>
<b>weiblich</b>	10	70	80
<b>männlich</b>	2	32	34
<b>gesamt</b>	12	102	114

Das Geschlecht hatte in der vorliegenden Arbeit also keinen signifikanten Einfluss auf die Resistenzlage. Da die Anzahl der untersuchten Männer jedoch auch wesentlich geringer war, als die der Frauen, ist dieses Ergebnis wahrscheinlich nicht repräsentativ. Hierfür müssten größere Stichproben herangezogen werden.

## 5. Diskussion

In Tansania lebten im Jahr 2016 1,4 Millionen Menschen mit HIV. Aufklärung zur Prävention sowie Investitionen zur Schaffung von medizinischen Zentren und Etablierung einer antiretroviralen Therapie waren die letzten Jahre im Fokus. Dennoch standen in einem der strukturschwächsten Länder Afrikas im Jahr 2015 nur 63% der betroffenen Erwachsenen und 48% der Kinder unter antiretroviraler Therapie. Gleichzeitig wurden 55.000 Neuansteckungen registriert (UNAIDS 2017).

Neben der Herausforderung eine flächendeckende und suffiziente Therapie zu schaffen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine besorgniserregend hohe Prävalenz an Resistenten in therapienaiven Patienten festgestellt, die im Bereich von ca. 15% lag (Kasang et al. 2011). In dieser Untersuchung zeigten Patienten mit einem Alter von >25 Jahren deutlich höhere Prävalenzwerte für das Vorliegen einer HIV-Medikamentenresistenz auf als jüngere Patienten (Kasang et al. 2011). Aus diesem Grund wurden in der hier vorliegenden Arbeit Patienten mit einem Alter von >25 Jahren untersucht. Diese Arbeit ist Teil einer größeren Studie, in der auch Patienten mit einem Alter von <25 Jahren untersucht worden sind. Die Daten dieser Studie wurden im Jahr 2018 publiziert ([Prevalence of pretreatment HIV drug resistance in Mwanza, Tanzania](#). Rudovick L, Brauner JM, Englert J, Seemann C, Plugaru K, Kidenya BR, Kalluvya SE, Scheller C, Kasang C. J Antimicrob Chemother. 2018 Dec 1;73(12):3476-3481. doi: 10.1093/jac/dky332.) In der vorliegenden Arbeit soll diskutiert werden, ob das aktuelle kalkulierte Therapieschema ausreicht und inwieweit eine Resistenztestung vor Beginn der Therapie sinnvoll ist.

### 5.1 Subtypenverteilung der reversen Transkriptase und der Zusammenhang mit der Resistenzlage

Während in der westlichen Welt Subtyp B am häufigsten auftritt, wurde in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen, dass im östlichen Afrika Subtyp A, C und D sowie diverse Rekombinante vorherrschen. Somit handelt es sich hier um das Gebiet mit der größten HIV-Subtypen-Vielfalt. Für Tansania, speziell die Viktoriaseeregion, herrschen in diversen Studien Subtyp A und C vor (Nyombi et al.2008, Njai et al. 2013; Herbinger et al. 2006; Somi et al. 2008; Masimba et al., 2013, Kasang et al. 2011). Insgesamt spielen auch die rekombinanten Formen eine immer größere Rolle (Agyingi et al. 2014).



In der vorliegenden Arbeit wurde der Subtyp der reversen Transkriptase analysiert. Am häufigsten trat Subtyp C (30,7 %), gefolgt von Subtyp A (28%) und Subtyp D (25,4%) auf. Auch CRF\_01AE spielt als rekombinante Form mit 13 % eine Rolle. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der oben genannten Studien, wobei auffällt, dass Subtyp D etwas häufiger detektiert wurde (Njai et al. 2013, Masimba et al. 2013).

Die Resultate stellen lediglich einen Anhalt für den gesamten Subtyp des jeweiligen HIV-Genoms dar, da er sich nur auf die reverse Transkriptase bezieht. So ist möglicherweise der tatsächliche Anteil an Rekombinanten für das gesamte Genom noch höher, da in weiteren Genabschnitte, wie der Protease, ein anderer Subtyp vorliegen kann. Zudem kommen auch Mehrfachinfektionen (Hoelscher et al., 2002) in Frage, welche mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht berücksichtigt wurden.

Um ein genaueres Ergebnis für die Subtypenverteilung sowie die Rolle der Rekombinanten und Mehrfachinfektionen zu erhalten, wäre eine Studie mit einer Analyse des gesamten HIV-Genoms nötig.

Von Interesse war auch, ob bestimmte Subtypen anfälliger für die Entwicklung von Resistenzen waren. Berücksichtigt man die Resistenzen gegenüber der Tripple-Therapie aus Efavirenz, Tenofovir und Lamivudin, so war in dieser Studie kein signifikanter Unterschied bezüglich der Prävalenz zwischen den detektierten Subtypen. Die Prävalenz für Subtyp A betrug 12,5 %, für Subtyp C 11,4 %, für D 3,4 % und für die rekombinante Form CRF\_01AE von 20%. Vergleicht man diese Werte, so ist für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientengruppe zumindest eine nichtsignifikant höhere Wahrscheinlichkeit einer Resistenz gegen TLE für CRF\_01AE gegenüber den anderen Subtypen zu sehen. Zudem erscheint Subtyp D weniger betroffen zu sein. Jedoch müsste auch hier für ein exakteres Ergebnis eine weitere Studie mit höheren Fallzahlen sowie mit einer Sequenzierung des gesamten HIV-Genoms erfolgen.

## **5.2 Einfluss des Geschlechts und PMTCT auf die Resistenzlage**

Nach der Empfehlung der WHO im Jahr 2000 einer Monotherapie mit Nevirapin zur Vermeidung einer HIV-Übertragung von einer Mutter auf ihr Kind, fiel bereits wenige Jahre später eine hohe Resistenzrate für dieses Medikament auf (siehe 1.8). Auch für die

vorliegende Arbeit war es von Interesse, inwieweit diese Resistenzen die heutige Generation noch beeinflussen.

Die Prävalenz für eine Resistenz gegenüber Nevirapin betrug in der untersuchten Patientengruppe 8,77 % (9 Frauen, 1 Mann). Keine der Frauen war im Sinne einer PMTCT vorbehandelt. Berücksichtigt man diese Tatsache, lässt sich die These aufstellen, dass diese Resistenzen bereits erworben sind, also zwischen Sexualpartnern ausgetauscht wurden, was die Beobachtung von Kasang et al. Im Jahr 2011 bestätigt. Jedoch kommen auch andere Ursachen in Frage. So könnte die selbstständige Einnahme antiretroviraler Medikamente, sei es vom Partner oder über den Schwarzmarkt, eine Rolle spielen. Die Informationen über den Therapiestatus eines Patienten oder die Vorbehandlung im Sinne einer PMTCT lässt sich zwar vor Einleitung der antiretroviralen Therapie erheben, jedoch lässt sich nicht mit Sicherheit überprüfen, ob die Angaben der Patienten korrekt sind. Deshalb wird man nicht mit letzter Sicherheit andere Einflussfaktoren auf die Resistenzlage ausschließen können.

Ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Resistenzlage konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Da die Gruppe der untersuchten Männer jedoch auch wesentlich kleiner als die der Frauen war, ist dieses Ergebnis nicht repräsentativ.

### **5.3 Resistenzlage therapienaiver Patienten in Tansania**

Das HI-Virus bildet durch seine hohe Replikationsrate mit Replikationsfehlern ständig neue Mutationen. Bereits nach durchschnittlich 2,6 Tagen ist eine neue Generation an Viruspartikeln entstanden (Perelson et al. 1997). Durch die Reaktion des Immunsystems entsteht ein hoher Selektionsdruck für solche Viren, die sich einer Immunantwort noch entziehen können. Der ständigen leichten Veränderung des Virusgenoms kann sich das menschliche Immunsystem nicht schnell genug anpassen, sodass es lediglich gelingt die Viruslast zu senken, nicht aber sie komplett zu eliminieren (Nowak et al. 1991; Phillips et al. 1991). Die Situation ändert sich dramatisch, wenn eine antiretrovirale Therapie begonnen wird, da jetzt HI-Viren einen Selektionsvorteil haben, die gegen diese Medikamente resistent sind. Aus diesem Grund wird nach WHO-Empfehlung für die antiretrovirale Therapie eine Dreifachkombination (TLE oder TEE) eingesetzt. In strukturschwachen Ländern wie Tansania wird diese Therapie ohne vorherige

Resistenztestung vorgenommen. Wichtig ist eine regelmäßige Bestimmung der Viruslast, da die Gefahr einer Resistenzentwicklung und somit eines Therapieversagens ab einer Viruslast zwischen 100 und 300 Kopien/ml unter antiretroviraler Therapie zunimmt (García-Gascó 2008).

Mit der besseren Zugänglichkeit für antiretrovirale Therapie weltweit stieg auch die Sorge um die Resistenzentwicklung. Deshalb empfiehlt die WHO eine regelmäßige Untersuchung der Resistenzlage verschiedener Populationen um rechtzeitig durch eine Umstellung der Therapieempfehlungen reagieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das HIV-Genom von 114 therapienaiven Patienten untersucht, die unmittelbar eine antiretrovirale Behandlung beginnen würden. Hiervon wiesen 24 Sequenzen eine Resistenz gegen ein antiretrovirales Medikament auf, was einer Prävalenz von 21,5 % entspricht (CI95%, 13,45 – 28,65 %). In vorherigen Studien lag die Prävalenz deutlich niedriger, was auch an den von der WHO vorgegebenen Einschlusskriterien für Patienten lag (Alter < 25, keine Schwangerschaft im Vorfeld, keine ART im Vorfeld). Bereits 2011 wurde von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Kasang, Kalluvya et al.), dass durch antiretrovirale Therapie entstandene resistente Viren zwischen Partnern direkt übertragen werden können und somit eine deutlich höhere Prävalenz (19%) bei therapienaiven Patienten vorliegt.

Bezogen auf die einzelnen Medikamentenklassen war in der vorliegenden Arbeit die Gruppe der NNRTIs mit einer Prävalenz von 14,91 % (CI95%, 8,27 – 21,55 %) signifikant häufiger betroffen als NRTIs, welche eine Prävalenz von 4,39% (CI95%, 0,57 – 8,2 %) aufwiesen. Die Proteaseinhibitoren waren mit 8,77% (CI95%, 3,5 – 14,04 %) ebenfalls von Resistenzen betroffen. Bereits in vorangegangenen Studien waren die NNRTIs am stärksten von Resistenzen betroffen (Sanchez, Holguin 2014; Hong et al. 2011; WHO 2017)). Vergleichbare Zahlen für Proteaseinhibitoren können in anderen Arbeiten nicht nachgewiesen werden.

Die Prävalenz für eine „high-level-resistance“ gegen ein NNRTI lag in der untersuchten Patientengruppe bei 5,2 %, für NRTI bei 1,75 %. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant. Die PIs waren nicht betroffen.

Um einschätzen zu können, ob das von der WHO empfohlene first-line-Therapie-Regime für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten die richtige Strategie ist, wurde analysiert, inwieweit diese Medikamente betroffen waren.

Die Prävalenz für eine Resistenz, unabhängig von deren Schweregrad, gegen Lamivudin, Efavirenz oder Tenofovir betrug 10,53 %. (CI95%, 4,807 – 16,25 %). Diese Zahl deckt sich mit erst jüngst von der WHO veröffentlichten Daten (WHO 2017), wonach bereits in 6 von 11 berichtenden Ländern in Afrika, Asien und Lateinamerika eine Prävalenz von über 10 % für eine Resistenz gegen eines der gängigen antiretroviralen Medikamente hat, bevor eine Therapie begonnen wird.

8 Patienten (7,01%) der untersuchten Gruppe waren von einer „high-level-“, oder „intermediate-level-resistance“ betroffen (CI95%, 2,257 – 11,78 %). In den westlichen Industrienationen wird laut WHO eine Resistenztestung vor Beginn einer antiretroviralen Therapie empfohlen, um Primärresistenzen zu detektieren (Deutsches Ärzteblatt, 2010). Auch in Deutschland sind diese Primärresistenzen ein Thema. So ließ sich beispielsweise im Jahr 2005 in Nordrhein-Westfalen bei 9 % der neu diagnostizierten HIV-Infektionen mindestens eine Resistenz gegen eines der gängigen antiretroviralen Medikamente nachweisen (Sagir et al, 2007). Finanzielle Mittel und Infrastruktur machen es hier möglich, bereits vor Beginn der First-line-Therapie eine Genomanalyse durchzuführen. Diese Maßstäbe sind jedoch auf Tansania, einem der strukturschwächsten Länder der Welt, zum heutigen Zeitpunkt noch nicht übertragbar. Für die hohe Prävalenz der Primärresistenzen in der hier untersuchten Patientengruppe sind verschiedene Erklärungsansätze zu diskutieren. Offensichtlich können unter antiretroviraler Therapie entstandene resistente Viren zwischen (Sexual-)Partnern übertragen werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass auch die Ehepartner der Patienten, welche bereits eine antiretrovirale Therapie erhalten oder diese eingeleitet werden soll, untersucht werden.

Auch ein sogenanntes „Drug-Sharing“ kann durchaus eine Rolle spielen. Die Patienten, welche offiziell als therapienaiv gelten, könnten bereits Medikamente auf anderen Wegen, zum Beispiel durch Verwandte oder den Partner, erhalten haben. Hier hilft nur eine bessere Aufklärung und wiederum die Schaffung weiterer Zentren mit besserer Zugänglichkeit für eine kontrollierte antiretrovirale Therapie.

Im Jahr 2013 wurde durch UNAIDS das Ziel beschlossen, bis in das Jahr 2020 das sogenannte „90-90-90-Ziel“ zu erreichen:

- 90 % der HIV-positiven Menschen sollen von ihrer Erkrankung Kenntnis haben
- 90 % der Patienten, welche von ihrer Erkrankung wissen, sollen unter antiretroviraler Therapie stehen
- 90 % der antiretroviral behandelten Patienten sollen auf ihre Therapie suffizient ansprechen

Im Jahr 2015 lebten in Tansania 1,4 Millionen Menschen mit HIV, wovon 53 % eine antiretrovirale Therapie erhielten (UNAIDS 2016). Das Primäre Ziel sollte also zunächst sein, mehr Menschen den Zugang zu dieser Therapie zu ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wäre für 90% der untersuchten Patienten die First-Line-Therapie aus Tenofovir, Lamivudin und Efavirenz die richtige Wahl gewesen, womit das letzte Ziel erfüllt ist. Große Hoffnung ruht auch auf einer neuen Kombinationstherapie aus Tenofovir, Lamivudin und Dolutegravir, einem Integrase-Inhibitor, welcher bereits in einigen Ländern Afrikas eingesetzt wird (WHO 2018). Mehrere Studien sind sich darin einig, dass diese neue Therapie aufgrund der guten Verträglichkeit sowie einem besseren Therapieerfolg sogar kosteneffizienter ist (Hren, Refoios Camejo, 2014; Meyer-Rath, 2016; Ripin et al 2017). Es bleibt abzuwarten, ob diese neue Kombination eine zusätzliche Entspannung bezüglich der Primärresistenzen bringt und somit das wichtigste Ziel von UNAIDS, nämlich ein Ende der AIDS-Epidemie bis in das Jahr 2030, verwirklicht ist.

## **6. Zusammenfassung**

Seitdem HIV im Jahr 1983 als Ursache des „acquired immunodeficiency syndrome“ (AIDS) isoliert wurde, hat sich viel in der Therapie dieser Infektion getan. Trotzdem handelt es sich um eine Erkrankung, welche bisher nicht geheilt werden kann. Da der weitaus größere Anteil der betroffenen Menschen in strukturschwachen Ländern lebt, ist die größte Herausforderung, eine flächendeckende Therapie weltweit zu etablieren und diese für jeden zugänglich zu machen.

Eine weitere Schwierigkeit ist die hohe Mutationsrate des HI-Virus, welche bereits in den Anfängen der Therapie zu schneller Resistenzbildung führte. Um dieser Entwicklung entgegenzuwirken wurde eine Tripple-Therapie eingeführt, eine Kombination von verschiedenen Medikamentenklassen, welche die Virusreplikation an ganz unterschiedlichen Stellen hemmen soll. In der westlichen Welt wird vor Therapiebeginn eine Resistenztestung vorgenommen. So kann eine nahezu normale Lebenserwartung für HIV-infizierte Menschen erreicht werden, zudem die Viruslast auf ein Minimum gesenkt werden.

In strukturschwachen Ländern wie Tansania ist eine solches Vorgehen aktuell aufgrund fehlender Infrastruktur sowie geringer finanzieller Mittel nicht denkbar. Deshalb wird nach WHO-Empfehlung eine standardisierte Dreifachkombination, in der Regel Tenofovir, Lamivudin und Efavirenz, angewendet, ohne vorher eine Resistenztestung vorzunehmen. In regelmäßigen Nachuntersuchungen wird anhand von Viruslast und CD4-Zahl der Erfolg der begonnenen Therapie gemessen und nur bei einem Versagen dieser eine Umstellung vorgenommen.

Bereits im Jahr 2011 wurde von unserer Arbeitsgruppe (Kasang, Kalluvya et al.) nachgewiesen, dass eine deutlich höhere Prävalenz für Primärresistenzen von HI-Viren gegenüber antiretroviraler Therapie bestand, als zuvor angenommen. Betrachtet wurden dabei alle Patienten, welche neu als HIV-positiv getestet wurden und nun therapiert werden sollten. Neu war, dass auch ältere Patienten (>25 Jahre) mit einbezogen wurden. Aufgrund der hohen Prävalenz an Primärresistenzen (19%) nahm man an, dass durch antiretrovirale Therapie entstandene resistente Viren zwischen Partnern direkt übertragen werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Untersuchung einer größeren Patientengruppe dieser These nachgegangen werden. Untersucht wurde das Plasma von 114 Patienten (>

25 Jahre), welche unmittelbar vor dem Start einer antiretroviralen Therapie standen und bisher therapienaiv waren. Zur Bestimmung von möglicherweise vorliegenden Resistenzen erfolgte im S3-Labor zunächst die Isolierung der Virus-RNA aus dem Plasma. Diese wurde anschließend in DNA umgeschrieben, amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzen wurden online durch die „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University im Hinblick auf den Subtyp der reversen Transkriptase (RT), der Protease sowie auf Resistenzen gegenüber den gängigen antiretroviralen Medikamenten analysiert.

Insgesamt wiesen 24 Sequenzen eine Resistenz gegen ein antiretrovirales Medikament auf, was einer Prävalenz von 21,5 % entspricht. Die Medikamente der Tripple-Therapie waren in der untersuchten Gruppe mit einer Prävalenz von 10,53 % betroffen. Diese Ergebnisse sind besorgniserregend und bestätigen die von Kasang, Kalluvya et al. aufgestellte These. Dafür spricht auch, dass die Frauen, welche von einer Resistenz gegen Nevirapin betroffen waren, keine Vorbehandlung im Sinne einer PMTCT hatten. Auch hier lässt sich schlussfolgern, dass es sich um eine übertragene Resistenz handeln könnte. Für den weitaus größeren Teil der untersuchten Patienten wäre jedoch die Tripple-Therapie ausreichend gewesen und das, ohne vorher eine aufwendige und kostspielige Resistenztestung vorzunehmen. Bedenkt man noch die Tatsache, dass in Tansania zurzeit nur jeder zweite HIV-infizierte Mensch überhaupt unter antiretrovirale Therapie steht, wird deutlich, dass zunächst hier dringender Handlungsbedarf besteht. Finanzielle Mittel müssen zunächst für eine flächendeckende Zugänglichkeit der medikamentösen Behandlung genutzt werden, da dies die beste Methode ist, die Ausbreitung dieser Pandemie einzudämmen. Dennoch werden in den nächsten Jahren weiterhin Untersuchungen mit noch größeren Patientenzahlen nötig sein, um die Wirksamkeit des aktuellen Therapieregimes ständig zu überprüfen und gegebenenfalls eine Anpassung vorzunehmen.

## 7. Literatur- und Abbildungsverzeichnis

Abbas, Lichtman, Pillai : Cellular and molecular immunology (2007, 6th Edition, Elsevier)

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.(1983) : Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599):868-71.

Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM. (2010): Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis*.10:155–166.

Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF (2008): The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther*. 13 Suppl 2:1-13.

Cooper DA, Gold J, Maclean P, Donovan B, Finlayson R, Barnes TG, Michelmore HM, Brooke P, Penny R. (1985): Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*.1(8428):537-40.

De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, et al. (2000): Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: Translating research into policy and practice. *JAMA* 283: 1175–1182.

Fauci AS (1988): The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239(4840):617-22.

Flint, Enquist, Racaniello (2009): Principles of Virology (2009, 3th Edition, American Society for Microbiology)



- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. (1983): Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science*. 220(4599):865-7.
- García-Gascó P., Maida I., Blanco F., Barreiro P., Carbonero L., Vispo E., González-Lahoz J., Soriano V. (2008): Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 699– 704
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B (2002): Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*. 296(5577):2354-60.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA (1987): Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156(1):171-6.
- Gelderblom HR (1991): Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5(6):617-37.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981): Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency *N Engl J Med*. Dec 10;305 (24):1425-31.
- Gottlieb GS, Eholie´ SP, Nkengasong J, et al (2008): A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa. *AIDS*; 22:2069

- Harries AD, Zachariah R, van Oosterhout JJ, Reid SD, Hosseinipour MC, et al. (2010):  
 Diagnosis and management of antiretroviral-therapy failure in resource-limited  
 settings in sub-Saharan Africa: challenges and perspectives  
*Lancet Infect Dis.* 2 10:60–65.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys P, Osmanov S, and WHO-UNAIDS Network for HIV  
 Isolation and Characterisation (2001): Global trends in molecular epidemiology  
 of HIV-1 during 2000–2007 *AIDS*; 25(5): 679–689.
- Herbinger Karl-Heinz, Gerhardt Martina, Sucheep Piyasirisilp, Doreen Mloka Doreen,  
 Arroyo Miguel A., Hoffmann Oliver, Maboko Leonard, Birx Deborah L.,  
 Mmbando Donan, Mccutchan Francine E., Hoelscher Michael (2006):  
 Frequency of HIV Type 1 Dual Infection and HIV Diversity: Analysis of Low-  
 and High-Risk Populations in Mbeya Region, Tanzania.  
*AIDS Research and Human Retroviruses* 22(7): 599-606
- Herold Gerd und Mitarbeiter: Innere Medizin (2012, Herold)
- Hoffmann, C., & Rockstroh, J. K. (2014): HIV-Buch 2014/15 (Medizin Fokus Verlag)  
 erhältlich bei: <https://hivbuch.files.wordpress.com/2011/12/hiv2014-15.pdf>
- Hren, R. and R. Refoios Camejo (2014): Cost-Effectiveness Analysis of Dolutegravir for  
 HIV Patients in Slovenia 2014. *Value Health*, 17(7): p. A673
- Jackson JB, Musoke P, Fleming T, Guay LA, Bagenda D, Allen M et al. (2003):  
 Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for  
 prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-  
 month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. *The Lancet Volume* 362,  
 No. 9387, p859–868
- Kalish et al. (2004): Recombinant viruses and early global HIV-1 epidemic  
*Emerging Infectious Diseases* 10, 1227

- Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V (2001):  
Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation.  
*Br Med Bull.*; 58:19-42.
- Lyamuya E, Olausson-Hansson E, Albert J, Mhalu F, Biberfeld G. (2000):  
Evaluation of a prototype Amplicor PCR assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in blood samples from Tanzanian adults infected with HIV-1 subtypes A, C and D. *J Clin Virol*,17:57-63.
- Masimba P., Kituma E., Klimkait T., Horvath E., Stoeckle M., Hatz C., Mossdorf E., Mwaigomole E., Khamis S., Jullu B., Abdulla S., Tanner M., Felger I. (2013):  
Prevalence of Drug Resistance Mutations and HIV Type 1 Subtypes in an HIV Type 1-Infected Cohort in Rural Tanzania *AIDS Res Hum Retroviruses*. 29(9): 1229–1236
- McCutchan FE (2000). Understanding the genetic diversity of HIV-1.  
*Aids*, 14 Suppl 3:S31-44.
- Meyer-Rath G, M.S. (2016): Cost impact of replacing efavirenz with dolutegravir in first-line antiretroviral treatment of adults in South Africa *HE<sup>2</sup>RO Policy Brief*, Health Economics and Epidemiology Research Office: Johannesburg.
- Mhalu F, Bredberg-Raden U, Mbena E, Pallangyo K, Kiango J, Mbise R, Nyamuryekunge K, Biberfeld G. (1987):  
Prevalence of HIV infection in healthy subjects and groups of patients in Tanzania. *Aids*, 1:217-221.
- Ministry of Health, Community development, Gender, Elderly, and Children (Republic of Tanzania): National Guidelines for the management of HIV and AIDS, 2017

- Mirochnick M, Fenton T, Gagnier P, Pav J, Gwynne M, Siminski S, Sperling RS, Beckerman K, Jimenez E, Yogev R, Spector SA, Sullivan JL (1998): Pharmacokinetics of nevirapine in human immunodeficiency virus type 1-infected pregnant women and their neonates. *J Infect Dis.*; 178(2):368-74.
- Musoke P, Guay LA, Bagenda D, Mirochnick M, Nakabiito C, Fleming T, Elliott T, Horton S, Dransfield K, Pav JW, Murarka A, Allen M, Fowler MG, Mofenson L, Hom D, Mmiro F, Jackson JB (1999): A phase I/II study of the safety and pharmacokinetics of nevirapine in HIV-1-infected pregnant Ugandan women and their neonates *AIDS*;13(4):479-86.
- Nowak MA, Anderson RM, McLean AR, Wolfs TF, Goudsmit J, May RM (1991): Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS *Science*, 254(5034):963-9.
- Omobolaji, T., et al. (2011): Update on Human Immunodeficiency Virus (HIV)-2 Infection. *Clin. Infect. Dis.* 52 (6) 780-787.
- Palella FJ Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, SattenGA, Aschman DJ, Holmberg SD (1998): Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection *N Engl J Med*, 338(13):853-860
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996): HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time *Science*, 271(5255):1582-6.
- Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, et al. (1991): Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature*. 354(6353):453-9.

Ramadhani HO, Thielman NM, Landman KZ, Ndosi EM, Gao F, Kirchherr JL, Shah R, Shao HJ, Morpeth SC, McNeill JD, Shao JF, Bartlett JA, Crump JA (2007): Predictors of incomplete adherence, virologic failure, and antiviral drug resistance among HIV-infected adults receiving antiretroviral therapy in Tanzania  
*Clin Infect Dis*, 45(11):1492-1498

Ripin, D. and V.R. Prabhu (2017): A cost-savings analysis of a candidate universal antiretroviral regimen *HIV AIDS*, 12(4): p. 403-407.

Robbins KE, Banda CI, Levin A, Goedert JJ, Blattner WA, Brubaker G, Brown TM, Schochetman G, Kalish ML, Shao J, O'Brien TR (1996): Genetic variability of human immunodeficiency virus type 1 in rural northwest Tanzania.  
*AIDS Res Hum Retroviruses*, 12:1389-1391.

Sagir A, Oette M, Kaiser R, et al. (2007): Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany *J Antimicrob Chemother*; 60: 843–8.

Sajal K. Ghosh Maria E. Taylor Victoria A. Johnson Emilio A. Emini Paul Deutsch Jeffrey D. Lifson Sebastian Bonhoeffer Martin A. Nowak Beatrice H. Hahn Michael S. Saag & George M. Shaw (1995):  
Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection  
*Nature* 373, 117–122

Sánchez Patricia Rojas and Africa Holguín (2014): Drug resistance in the HIV-1-infected paediatric population worldwide: a systematic review  
*J Antimicrob Chemother*; 69: 2032–2042

Schartl M., Gessler M., v. Eckardstein A.: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen (2009, 1. Auflage, Elsevier)

Siegal Frederick P., M.D., Lopez Carlos, Ph.D., Hammer Glenn S., M.D., Brown Arthur, M.D., Kornfeld Stephen J., M.D., Gold Jonathan, M.D., Hassett Joseph, M.D. et al. (1981): Severe Acquired Immunodeficiency in Male Homosexuals, Manifested by Chronic Perianal Ulcerative Herpes Simplex Lesions  
*N Engl J Med* 1981; 305:1439-1444

Siwka W, Schwinn A, Baczek K, Pardowitz I, Mhalu F, Shao J, Rethwilm A, Meulen V (1994): vpu and env sequence variability of HIV-1 isolates from Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10:1753-1754.

Somi GR, Kibuka T, Diallo K, Tuhuma T, Bennett DE, et al. (2008): Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 77–82.

Stringera Jeffrey S.A., Sinkalaa Moses, Chapmana Victoria, Acostaa Edward P., Aldrovandia Grace M., Mudendab Victor, Stouta Julia P., Goldenberg Robert L., Kumwendaf Rosemary, Vermunds Sten H. (2003): Timing of the maternal drug dose and risk of perinatal HIV transmission in the setting of intrapartum and neonatal single-dose nevirapine *AIDS*; 17(11): 1659–1665

UNAIDS (2007): AIDS epidemic update

[http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/2007\\_epiupdate\\_en\\_1.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2007_epiupdate_en_1.pdf)

UNAIDS (2012): Report on the global AIDS epidemic

[http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120\\_globalreport2012/globalreport](http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120_globalreport2012/globalreport)

UNAIDS (2016): Global AIDS update

<http://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/Global-AIDS-update-2016>

UNAIDS (2017) UNAIDS Data 2017

[http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017\\_data\\_book](http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book)

Westreich D., Eron J., Behets F., van der Horst C., Van Rie A. (2007):  
Survival in Women Exposed to Single-Dose Nevirapine for Prevention of  
Mother-to-Child Transmission of HIV: A Stochastic Model  
*The Journal of Infectious Diseases*, 195(6), 837–846

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Carsten Scheller für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die selbstverständliche und konstruktive Unterstützung von Beginn bis zum heutigen Tag bedanken.

Vielen Dank auch an meine enge Freundin und Kollegin Dr. med Katja Engels für die gute Einführung in die Laborarbeit sowie die Umsetzung der Methoden. Insbesondere im S3-Labor haben wir viele gemeinsame Stunden verbracht, von denen ich keine einzige missen möchte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich immer in meinem Werdegang bestärkt und ermutigt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Zuletzt möchte ich meinem Verlobten Pascal danken, welcher mir neben dem stressigen Berufsalltag stets den Rücken freigehalten hat und mich auch in Momenten des Zweifels immer ermutigt hat, diese Arbeit fertigzustellen.