

**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 am Lighthouse Hospital in Lilongwe, Malawi“

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Karina-Anatolia Plugaru

aus Königshofen an der Kahl

Würzburg, Juli 2023

Referentenblatt

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

Korreferentin: Prof. Dr. med. Martina Prelog

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Als Wegweiser für die Zukunft widme ich diese Arbeit mit Liebe meinen Kindern
Mila und Leonard.

1	Einleitung	1
1.1	Geschichte	1
1.2	Gruppen und Subtypen	2
1.3	Struktur des HI-Virus	2
1.3.1	Genom	3
1.3.2	Transmission des HI-Virus	4
1.4	Replikationszyklus	5
1.4.1	Genetische Variabilität	6
1.5	Infektionsverlauf und Stadien	7
1.5.1	Infektionsnachweis	10
1.6	Therapie und Angriffsziele	11
1.6.1	Substanzklassen	12
1.7	Aktuelle Daten	13
1.7.1	HIV-Therapie in Malawi	14
1.7.2	Prävention der Mutter zu Kind Transmission PMTCT	15
1.8	Gesundheitswesen in Malawi	16
1.8.1	Das Lighthouse Trust	17
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Material	20
3.1.1	Chemikalien	20
3.1.2	Enzyme	20
3.1.3	Geräte	20
3.1.4	Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	21
3.1.5	Primer für Reverse-Transkriptions-PCR	22
3.1.6	Primer für die nested-PCR	22
3.1.7	Primer für die Sequenzierung	22
3.1.8	Kits	23
3.1.9	Verbrauchsmaterial	23
3.1.10	Längenstandards	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Patientenrekrutierung / Probengewinnung / Studiendesign	25
3.2.2	RNA-Isolierung aus Plasma	25

3.2.3	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion	26
3.2.4	Polymerasekettenreaktion	28
3.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	30
3.2.6	Aufreinigung des PCR-Produktes	31
3.2.7	Photometrische Messung von Reinheit und Konzentration der DNA	32
3.2.8	Sequenzierung.....	33
3.2.9	Software, Auswertung und Statistik.....	34
3.3	Ethikvotum	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Patientengruppe	36
4.2	Subtypenverteilung	36
4.3	Schweregrade der Resistenzen	37
4.4	Resistenzlage in der untersuchten Patientengruppe	37
4.4.1	Schweregrad der Resistenzen innerhalb der Medikamentenklassen	39
4.4.2	Schweregrad der Resistenzen gegenüber einzelnen Substanzen	40
4.4.3	Resistenzlage gegenüber der Erstlinien Tripple Therapie TLE	42
4.5	Vorkommen der Mutationen.....	48
4.5.1	Verteilung der Mutationen in den Medikamentenklassen	48
4.5.2	Häufigste Mutationen in der Medikamentenklassen	49
4.5.3	Stellung von Nevirapin.....	51
5	Diskussion	52
5.1	HIVDR.....	53
5.1.1	Lage in Malawi	54
5.1.2	HIVDR in der vorliegenden Arbeit	55
5.2	PMTCT in Malawi	58
5.3	WHO, die 90-90-90-Ziele und INIs.....	58
6	Zusammenfassung.....	61
7	Literatur- und Abbildungsverzeichnis	64
8	Appendix	72

1 Einleitung

Seit Beginn der Verbreitung von HIV/AIDS bis zum Gipfel des pandemischen Geschehens nach dem Jahr 2000, forderte die Erkrankung Millionen Menschenleben und sorgte vor allem in den ärmlicheren Gegenden der Welt für verzweifelte Zustände. Heute, nahezu 40 Jahre seit der Entdeckung von HIV, hat sich die initial immer tödlich verlaufende Infektion zu einer chronischen Erkrankung entwickelt. Vor allem auf Grund der Verfügbarkeit von neuen Wirkstoffen und des leichteren Zugangs zu einer adäquaten antiretroviralen Therapie (ART) ist für die Erkrankten ein langes, produktives Leben möglich (Wandeler, Johnson, and Egger 2016; Yeo et al. 2020)).

1.1 Geschichte

Anfang der 1980er Jahre wurde in den USA von mehreren klinisch und durch biopsische Sicherung bestätigten Fällen einer *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie in zuvor gesunden, homosexuellen Männern mittleren Alters berichtet (Follansbee et al. 1982). Bei diesen Patienten lag eine schwere Immundefizienz vor, begleitet von zusätzlichen CMV Infektionen, Manifestation eines Kaposi-Sarkoms und/oder invasiven Candidosen. Es folgen im Verlauf mehrere Berichte solcher, sowohl bei Homosexuellen als auch Heterosexuellen vorkommenden, zunehmenden Fälle. 1982 beschreibt das amerikanische CDC erstmalig den Begriff „acquired immunodeficiency syndrome“ AIDS. Kurze Zeit später, im Jahr 1983, wurde ein Retrovirus erstmalig von den Pariser Forschern Barré-Sinoussi und Montagnier isoliert und als Ursache für das komplexe Immunschwächesyndrom verantwortlich gemacht (Barré-Sinoussi et al. 1983). In den folgenden Jahren wurde dieses Ergebnis durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt und schließlich ab 1986 die Bezeichnung humanes Immundefizienz Virus (HIV) vom *International Committee on Taxonomy of Viruses* eingeführt. Ursprünglich wurde das HI-Virus als Zoonose von afrikanischen Primaten Anfang des 20. Jahrhunderts auf Menschen übertragen ('Human Immunodeficiency Virus (HIV)' 2016). 1986 wurde in AIDS Patienten aus West-Afrika das HIV-2 Virus identifiziert (Hughes and Corrah 1990).

1.2 Gruppen und Subtypen

Das HI-Virus kann in zwei Typen unterteilt werden: HIV-1 und HIV-2. Morphologisch bestehen zwischen den zwei Virustypen keine Unterschiede. Auf Genomebene zeigen sich Unterschiede von bis zu 40%. Im Gegensatz zu HIV-1 führt eine HIV-2 Infektion in selteneren Fällen zu AIDS. Die Virulenz ist niedriger und die Klinik häufiger von fehlender Symptomatik und einem milden und langsameren Verlauf gekennzeichnet. Die HIV-2 Infektion ist überwiegend auf Länder in West-Afrika begrenzt (Nyamweya et al. 2013).

Die weiteren Ausführungen dieser Arbeit werden sich auf die Infektion mit dem HIV-Typ 1 beziehen. Durch Sequenzunterschiede im Genom des HIV-1 ist eine Einteilung in die Gruppen M, N, O bereits bekannt. Die deutlich häufigeren Infektionen, welche für den Ausbruch der Pandemie ab 1980 verantwortlich sind, kommen mit dem HIV-1 aus der Untergruppe M vor. Diese Untergruppe wird ihrerseits auf Grund von genomischen Sequenzunterschieden von bis zu 20% in 8 Subtypen (A, B, C, D, F, H, J und K) unterteilt (Hemelaar 2012; 'Human Immunodeficiency Virus (HIV)' 2016). Weltweit verursacht HIV-1 Subtyp C die höchste Anzahl an Infektionen (v.a. Süd- und Ostafrika, Indien), gefolgt von Subtyp A (v.a. West- und Zentralafrika). In Deutschland sind die Infektionen mit dem Subtyp B am häufigsten verbreitet. Neben den Subtypen verbreiten sich immer mehr rekombinante Formen aus, sog. „circulating recombinant forms“ (CRFs). Die CRFs sind Mosaikgenome resultierend aus der Infektion eines Individuums mit zwei viralen Genomen von unterschiedlichem Subtyp, das in mindestens zwei Menschen isoliert werden konnte. Besteht eine genetische Rekombination bei einem einzelnen Menschen, wird dies als „unique recombinant form“ bezeichnet (URFs) (Bbosa, Kaleebu, and Ssemwanga 2019).

1.3 Struktur des HI-Virus

Das in den 1980er Jahren zuerst identifizierte HIV-1 gehört zur Familie der Retroviridae und genauer zum Genus der Lentiviren. Der Aufbau des HI-Virus (Abb. 1) ist typisch für die meisten Retroviren. Das virale Capsid ist von einer äußeren Lipidmembran umgeben. In diese verankert ist das transmembranäre, nach außen ragende Glykoprotein gp120 und das in der Membran liegende Glykoprotein gp40. Unmittelbar darunter bilden die Matrixproteine p17 eine netzartige Hülle um das Virion. Zentral gelegen findet sich das Viruscapsid bestehend aus dem Capsidprotein p24.

Das Viruscapsid enthält zwei identische mRNA-Stränge, das Virusgenom. Jeder Strang steht in Verbindung zu dem Nucleocapsid p7. Im Capsid befinden sich auch mehrere Enzyme: die Integrase (IN), Protease (PR), sowie die Reverse Transcriptase (RT) ('Human Immunodeficiency Virus (HIV)' 2016). Die Enzyme spielen eine zentrale Rolle für die Vermehrung von HIV.

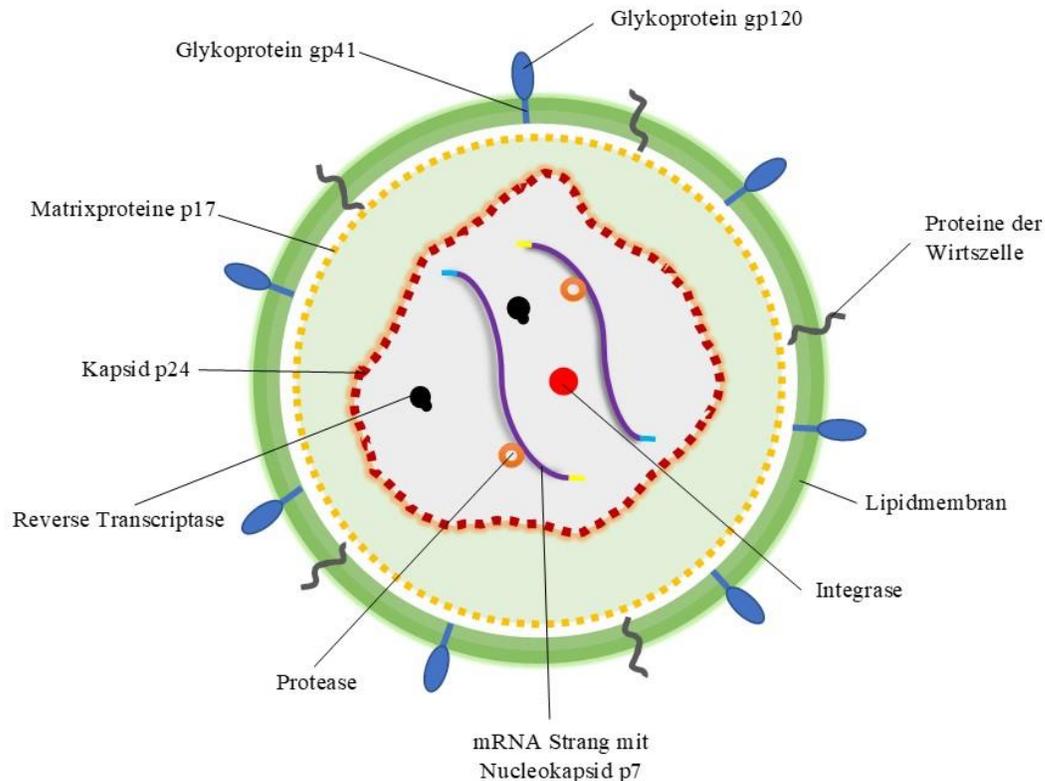


Abbildung 1 Die Struktur des HI-Virus (eigene Grafik)

1.3.1 Genom

Das Genom des HI-Virus besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen mRNA Sequenzen, die im Capsid lokalisiert sind und eine Länge von weit über 9000kpb erreichen (Abb. 1). Nach der Infektion der Wirtszelle und der reversen Transkription entspricht das Genom des HI-Provirus einer doppelsträngigen HIV-DNA Sequenz, die im menschlichen Genom eingebaut wird. Diese Sequenz wird in beiden Richtungen von „long-terminal-Repeats flankiert“ (LTR, Abb.2).

Dem 5' -LTR folgt das gag-Gen, das für die Matrix- (MA, p17) Capsid- (CA, p24) und Nucleocapsidproteine (NC, p7) codiert. Die MA, die CA, sowie die NC-Proteine sind Teil gruppenspezifischer Antigene der infektiösen Virionen, sogenannte „Gag-Proteine“. In 3'-Richtung folgt das pol-Gen, welches für die Enzyme Protease (P, p12), Integrase (IN, p32) und Reverse Transcriptase (RT, p51) codiert. Die in der äußeren Membran liegenden Glykoproteine gp120 und gp 40 werden durch das env-Gen codiert, welches dem pol-Gen folgt. Im Bereich des 3'-Endes liegen mehrere codierende Sequenzen für Proteine, die für die Replikation notwendig sind (Tat Protein und Rev) oder regulatorischen Charakter haben (Vif, Vpr, Vpu, Nef) (Turner and Summers 1999).

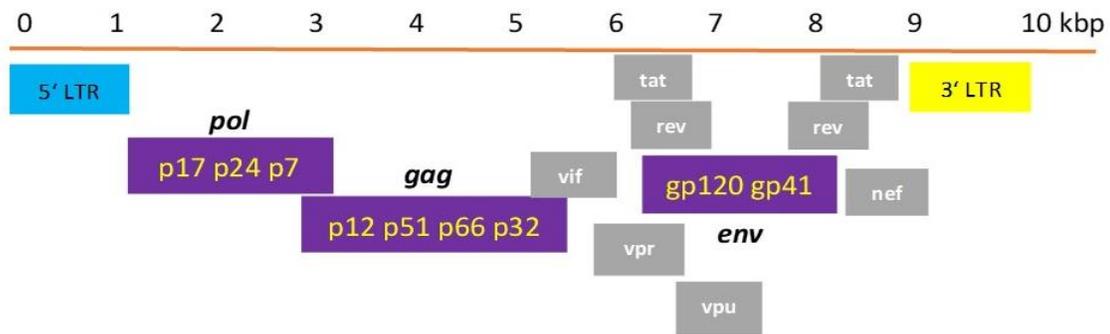


Abbildung 2 HIV-1 Genom (eigene Grafik)

1.3.2 Transmission des HI-Virus

Eine Übertragung des HIV erfolgt von Mensch zu Mensch durch virushaltige Körperflüssigkeiten. Am häufigsten resultiert dies durch ungeschützte Sexualkontakte (v.a. Analverkehr, geschlechtsunabhängig), aber auch parenteral durch infizierte Nadeln oder infizierte Instrumente (z.B. Needle-Sharing bei iv-Drogenmissbrauch, kontaminierte medizinische Instrumente, kontaminierte Blutprodukte) oder vertikal („Mother-to-child Transmission“ MTCT durch Geburt/Stillen). Ziel des Virus sind die CD4-positiven Zellen des Immunsystems (T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), die befallen und im Verlauf zerstört werden. Durch den starken Abfall der immun-kompetenten Zellen kommt es langfristig zu einer Immunschwäche mit Gefahr von schweren, opportunistischen Infektionen.

1.4 Replikationszyklus

Der erste Schritt der Infektion wird durch Wechselwirkungen zwischen dem CD4-Rezeptor der Wirtszelle und dem Transmembranproteinkomplex des Virus vermittelt (Abb. 3, Schritt 1). Das gp120 bindet an die C4-Domäne des CD4-Rezeptors, wodurch die Bindung an einen Korezeptor (der Chemokinrezeptor 4 - CXCR4 u.a. auf Makrophagen bzw. Chemokinrezeptor 5 - CCR5 u.a. auf Lymphozyten) ermöglicht wird. Hierdurch erfolgt eine Konformationsänderung von gp120 und gp41 und die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran beginnt (Abb. 3, Schritt 2 und 3). Das Capsid mit den RNA-Genomen und die entsprechenden Enzyme werden in die Zelle aufgenommen. Im Zytoplasma wird die HIV-RT aktiviert. Es wird über komplexe Vorgänge zunächst eine zum RNA-Strang komplementäre cDNA transkribiert, die zunächst als Hybrid vorliegt. Durch die RNase-H-Funktion der RT wird die RNA (bis auf einen kurzen Abschnitt, welcher später als Primer dient) abgebaut, sodass eine Einzelstrang-DNA resultiert. Im zweiten Schritt wird durch die RT an der Einzelstrang-cDNA die Doppelstrang-DNA gebildet (Abb. 3, Schritt 4). Nach dem Transport des DNA-Genoms in den Zellkern erfolgt die Integration der proviralen DNA an einer beliebigen Stelle des Wirtszellgenoms durch die IN (Abb. 3, Schritt 5). Die bereits integrierte, provirale DNA wird von RNA-Polymerase II der Wirtszelle transkribiert. Nach dem Transport der genomischen mRNA aus dem Zellkern erfolgt die Translation (Abb. 3, Schritt 6). Die bereits erwähnten regulatorischen Proteine Tat, Rev, Nef werden nach der Translation in den Zellkern transportiert und führen zu einer verstärkten, effizienteren Transkription (Rücker et al. 2004). Die viralen Strukturproteine, die akzessorischen Polypeptide und die Genome lagern sich der Zellmembran aus und es kommt zur Knospung oder „Budding“ von unreifen Viruspartikeln (Abb. 3, Schritt 7). Die Reifung zum infektiösen Virus geschieht nach der Ausknospung und die darauffolgende Aktivierung der Protease, welche die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine herbeiführt (Fanales-Belasio et al. 2010).

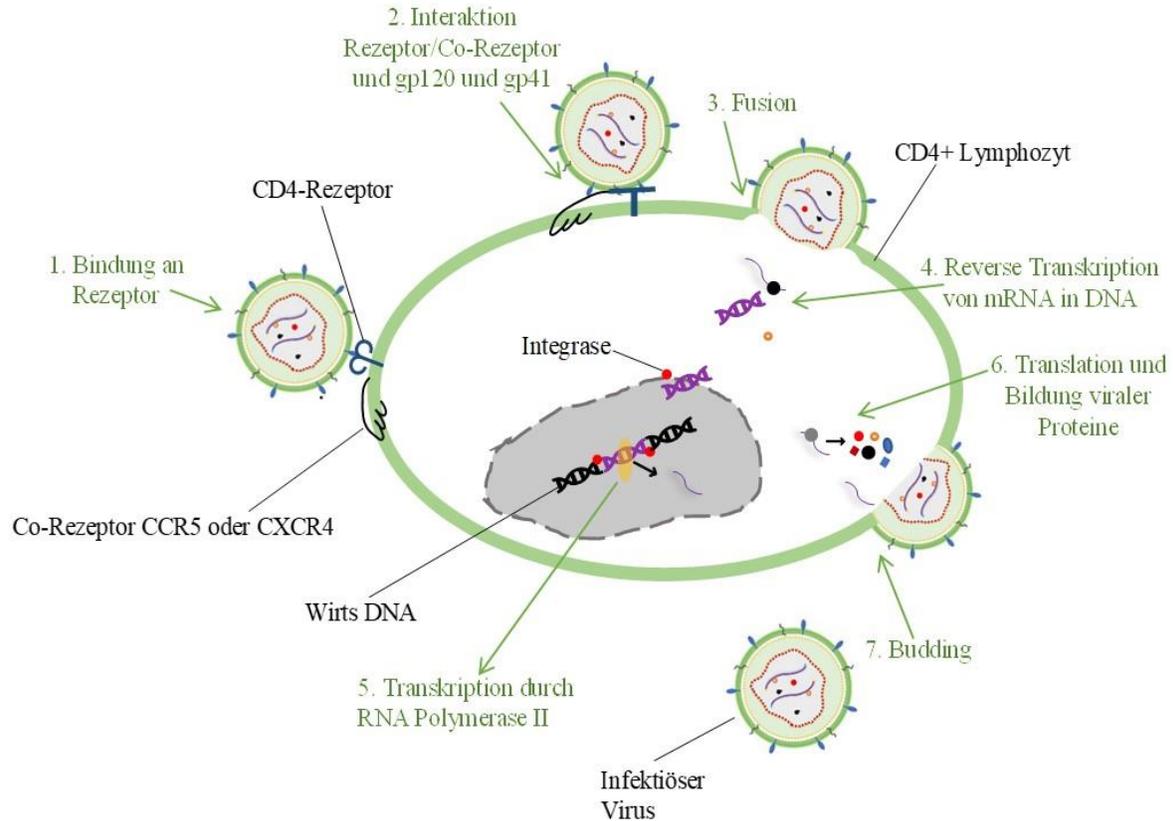


Abbildung 3 HIV-Replikationszyklus, vereinfachte Darstellung (eigene Grafik)

1.4.1 Genetische Variabilität

Die Arbeit der Wirts-RNA-Polymerase II als auch der viralen RT ist ungenau und die Enzyme verfügen über keine Korrekturmechanismen. Dadurch entstehen viele virale Mutationen, sog. Quasispezies (Biebricher and Eigen 2006). Durch CRFs, URFs, durch ungenaue Enzymarbeit während des viralen Replikationszyklus oder auf Grund wirtsspezifischer Mechanismen, kommt es zu einer erhöhten Rate an Mutationen und Rekombinationen des Virus, die somit eine breite genetische Variabilität verursachen. Dies spielt eine wichtige Rolle bezogen auf die Transmission, Immunogenität, klinisches Management und auf die Therapie. Sie erschweren die Surveillance und die Entwicklung von wirksamen Medikamenten, Impfungen oder generieren im Verlauf Medikamentenresistenzen (Sosin and Tchurikov 2017; Liu et al. 2020).

1.5 Infektionsverlauf und Stadien

Die initiale Phase der akuten Infektion (HIV-Stadium A, Abb. 4) kann mehrere Monate dauern und kann anhand des Auftretens der Detektierbarkeit von HIV-RNA durch moderne Testungsmethoden dargestellt werden. Die Zeit zwischen Infektion sowie der Nachweisbarkeit von HIV-RNA im Plasma wird als diagnostische Lücke bezeichnet. Ca. 24h nach Infektion einer Zelle werden die ersten Viren aus der Zelle freigesetzt ('Human Immunodeficiency Virus (HIV)' 2016). Bei der lokalen Ausbreitung auf zellulärer und Gewebsebene wird das angeborene Immunsystem aktiviert, v.a. durch Produktion von Zytokinen, die durch positives Feedback weitere Zellen rekrutieren, z.B. Monozyten und natürliche Killerzellen (Borrow and Bhardwaj 2008). In den ersten 2 bis 4 Wochen nach der Infektion kommt es bei vielen infizierten Patienten auf Grund rasant steigender Plasmavirämie zu grippe-ähnlicher Symptomatik mit Fieber, Abgeschlagenheit, Lymphadenopathie, Myalgien, gastro-intestinale Beschwerden, Neuropathien und/oder Exanthem in variablen Ausprägungsformen. Diese Symptome können auch gänzlich fehlen, sind unspezifisch und werden oft als grippaler Infekt verkannt. Korrelierend zur Manifestation der klinischen Symptomatik erreicht die HIV-RNA im Plasma ihren Maximalwert von bis zu 10^8 Kopien/ml innerhalb der ersten 4 Wochen (Moir, Chun, and Fauci 2011; McMichael et al. 2010). Hierbei werden immer mehr CD4-positive Zielzellen infiziert. Sie werden durch das Immunsystem erkannt und abgetötet oder gehen durch Apoptose und Zytolyse nach HIV-Budding zugrunde. Der hohe Verlust der CD4-positiven Zellen führt zu einem initial kurzzeitigen Absinken der Zellzahl auf kleiner als $500/\mu\text{l}$ und somit zu einer Immunsuppression.

Das Immunsystem bekämpft die virale Ausbreitung zusätzlich durch die humorale Antwort (Modrow 2010; Lucas and Nelson 2015), die Viruslast sinkt und die Zahl der CD4-positiven Zellen erholt sich zum Teil (Abb. 4). Wenn keine antiretrovirale Therapie begonnen wird, geht die akute Infektion in die chronische Latenzphase über (HIV-Stadium B). Diese Phase ist symptomarm und kann sich über Jahre erstrecken. Bei einigen Patienten kann es zu subfebrilen Temperaturen kommen, Dermatome-bezogenen Herpes Zoster Infektionen, oraler Haarleukoplakie und oraler oder genitaler Mykose. Diese Erkrankungen gehören aber noch nicht zu den AIDS-definierenden Erkrankungen. Eine virale Replikation bei erhöhter Rate von Mutationen findet weiterhin statt.

Die Konsequenzen sind eine langsam ansteigende Viruslast, eine fortschreitende Immunsuppression durch Depletion CD4-positiver Lymphozyten, Veränderung der

Lymphknotenarchitektur, Verlust der Immunkompetenz vorhandener Zellen und Erschöpfung von Regenerationskapazitäten, wie z.B. im Thymus (Moir, Chun, and Fauci 2011).

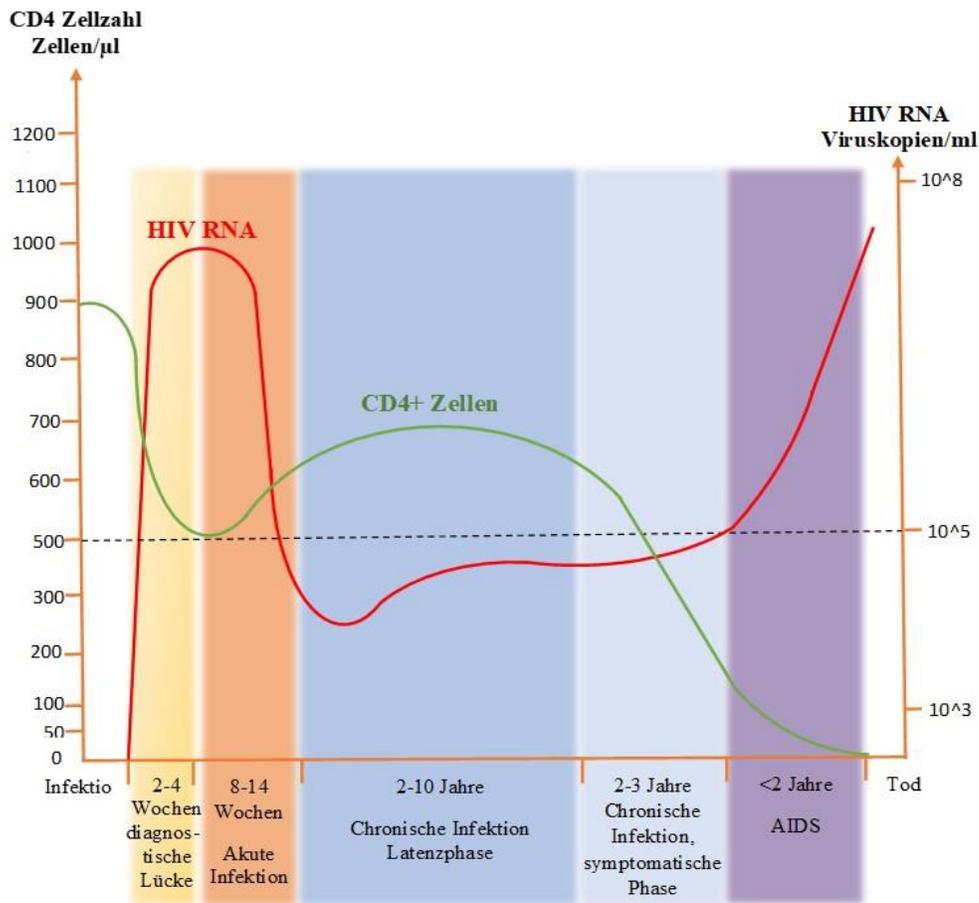


Abbildung 4 Infektionsverlauf und Stadien (eigene Grafik)

Im Endstadium der Erkrankung (HIV-Stadium C) kommt es zum massiven Anstieg der Viruslast und Absinken der CD4-positiven Lymphozyten unter einen kritischen Wert. Dies begünstigt das Auftreten von AIDS-definierenden Erkrankungen. Hierzu gehört der Ausbruch opportunistischer Infektionen, wie z.B. einer Infektion durch *Pneumocystis-jirovecii*, einer CMV-Retinitis, systemische Candidosen, oder eine Reaktivierung einer Tuberkulose- oder Toxoplasmose-Infektion. Es kann zu einer HIV-Enzephalopathie kommen (einem fortschreitenden Befall des zentralen Nervensystems mit schrittweisem Verlust der Kognition durch Schädigung der Mikroglia).

Die Patienten nehmen schwerwiegend an Gewicht ab und klagen über Fieber und Diarrhoe (das sog. „Wasting“-Syndrom). Zu den AIDS-definierenden Erkrankungen zählen zudem das Auftreten von Malignomen wie das Kaposi-Sarkom oder Lymphome. Die Erkrankung und ihre Komplikationen führen unbehandelt zum Tod (Lucas and Nelson 2015; Herold and Mitarbeiter 2013).

Um den Verlauf verständlicher zu machen, gibt es heute mehrere gültige Klassifikationen. Die seit 1993 bestehende amerikanische Klassifikation des Center of Disease Control (CDC 2021) sieht eine Einteilung anhand der Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten und der klinischen Symptomatik vor (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: CDC-Klassifikation der HIV-Infektion

Anzahl der CD4+ Lymphozyten Zellzahl /μL	Stadium A akute Infektion, Latenzphase	Stadium B symptomatische chronische Infektion	Stadium C AIDS definierende Erkrankungen
≥ 500	A1	B1	C1
200-499	A2	B2	C2
< 200	A3	B3	C3

Eine andere, klinisch orientierte Klassifikation bietet die World Health Organisation (WHO). Hier wird eine Klassifikation in 4 Stadien vorgesehen (WHO 2016a).

Primäre Infektion: In dieser Phase kann, die bereits in Kapitel 1.5 erwähnte Symptomatik auftreten. Ein Teil der Patienten zeigt einen asymptomatischen Verlauf.

Stadium 1: In dieser Phase können die Patienten eine generalisierte Lymphadenopathie aufweisen. Ein Teil der Patienten zeigt auch in dieser Phase einen asymptomatischen Verlauf.

Stadium 2: Charakteristisch für dieses Stadium ist ein moderater Gewichtsverlust, Infekte der oberen Atemwege, orale Ulzerationen, sowie Hauterkrankungen (Nagelmykose, Dermatitis, Herpes Zoster).

Stadium 3: Für dieses Stadium charakteristisch sind die NICHT-AIDS-definierenden Erkrankungen. Dazu gehören ein schwerwiegender Gewichtsverlust, rezidivierendes Fieber oder subfebrile Temperaturen, orale Haarleukoplakie, pulmonale Tuberkulose, schwere, orale Ulzerationen, orale oder genitale Candidosen.

Stadium 4: Beschreibt das Vollbild von AIDS mit den AIDS-definierenden Erkrankungen, die bereits in Kapitel 1.5 aufgeführt wurden.

1.5.1 Infektionsnachweis

Um eine HIV-Infektion nachzuweisen, stehen inzwischen sowohl indirekte Testungsmethoden als auch der direkte Virusnachweis aus Blut oder anderen Körperflüssigkeiten zur Verfügung. In der diagnostischen Lücke (Abb. 4), die Zeit direkt nach Transmission und Beginn der Infektion, kann eine Infektion nicht nachgewiesen werden.

Ab ca. Tag 15 nach Infektion kann das p24-Capsid Antigen im Plasma nachgewiesen werden. Hierfür stehen verschiedene Immunoassay Tests (Enzyme linked Immunosorbent Assay ELISA) zur Verfügung. Etwa ab dem 20. Tag sind HIV-Antikörper, zunächst IgM und später IgG, nachweisbar. Ein reaktiver HIV-Suchtest (p24/anti-p24-ELISA) wird mittels Antikörper-Western Blot bestätigt (Hurt et al. 2017). Der Nachweis von Antigenen und Antikörpern kann laborgebunden erfolgen oder als Schnelltests (Point-of-care, POC) durchgeführt werden. Die POC-Testung revolutionierte seit der Einführung den schnellen Nachweis der Infektion und bietet vor allem in Ländern mit suboptimaler medizinischer Versorgung, viele Vorteile. Der Nachteil der POC-Testung ist die etwas geringere Sensitivität, vor allem in dem Anfangsstadium der Erkrankung.

Nach ca. 12 Tagen kann HIV-RNA im Plasma bereits nachgewiesen werden. Am zuverlässigsten gelingt der Nachweis spätestens nach 4 Wochen nach Infektion, wenn die Viruslast ein Maximum

erreicht (Abb. 4). Dies ist mittels der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (PCR) aus Plasma möglich.

1.6 Therapie und Angriffsziele

Ziel der Therapie ist die Reduktion der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze, sowie die Wiederherstellung und Erhaltung eines kompetenten Immunsystems. Daraus resultieren sowohl eine niedrigere infektionsbezogene Morbidität und Mortalität (Louie and Markowitz 2002), als auch ein positiver Effekt in der Prävention durch niedrigere vertikale und horizontale Transmission.

Nach Entschlüsselung des viralen Replikationszyklus kam es zu einer schnellen Entwicklung von Substanzen mit verschiedenen Angriffspunkten. Ende der 1980er wurde die erste Substanz (Zidovudin), ein nukleosidischer reverse Transkriptase-Inhibitor (NRTI), zugelassen. Trotz initial guter antiviraler Aktivität konnte das Medikament allein keine nachhaltige Wirkung auf die Virusvermehrung erzielen, weil eine Monotherapie innerhalb weniger Wochen zur Selektion von Resistenzmutationen führt. Erst Mitte der 1990er Jahre kam eine weitere Substanzklasse dazu und die Kombinationstherapie als „highly active antiretroviral therapy“ (HAART) wurde mit signifikanten Erfolgen eingeführt (Pau and George 2014). Inzwischen gibt es 5 Substanzklassen und über 25 verschiedene Präparate. Außer den NRTIs zählen noch die nicht-nukleosidischen reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), die Protease-Inhibitoren (PI), die Integrase-Inhibitoren (INI) und die Entry-Inhibitoren zu den weiteren Substanzklassen (Atta, De Seigneux, and Lucas 2019). Die Therapie erfolgt als Kombination von verschiedenen Präparaten, um einen additiven Effekt zu erreichen, indem möglichst viele Schritte des viralen Replikationszyklus unterbunden werden. Aktuell wird eine Therapie aus zwei NNRTI kombiniert, mit einem NRTI, einem PI oder einem INI empfohlen.

Eine zeitgerecht begonnene medikamentöse Therapie ermöglicht den Patienten eine nahezu normale Lebenserwartung bei hoher Lebensqualität und niedrigem Leidensdruck. Eine komplette Viruselimination durch die Therapie wird allerdings nicht erreicht. Es wird angenommen, dass die im Wirtsgenom integrierte virale DNA in inaktiven Zellen noch vorhanden ist und es somit wieder reaktiviert werden kann (Louie and Markowitz 2002; Ramratnam et al. 2000).

1.6.1 Substanzklassen

Nukleosidische reverse Transkriptase Hemmer NRTI:

Diese zuerst zugelassene Substanzklasse der NRTIs mit Zidovudin als Prototyp verhindert die Transkription der einzelsträngigen mRNA in DNA. Dies geschieht, indem das NRTI mit dem natürlichen Substrat der reversen Transkriptase konkurriert und es nach dem Einbau im Strang zu einem Kettenabbruch führt.

Nicht nukleosidische reverse Transkriptase Hemmer NNRTI:

In ihrer Funktion als nicht-kompetitive Hemmer der viralen reversen Transkriptase, bindet diese Substanzklasse an der RT und bewirkt eine Hemmung der enzymatischen Aktivität.

Protease Inhibitoren PI:

Durch das späte Eingreifen im viralen Replikationszyklus hemmen die PIs die Aktivität der viralen Protease. Somit kann das Gag-Pol-Protein nicht in ihre aktiven Untereinheiten gespalten werden und es werden nicht-infektiöse Viruspartikel gebildet.

Integraseinhibitoren INI:

Das dritte Schlüsselenzym des viralen Replikationszyklus kann durch die Integraseinhibitoren blockiert werden. Die INIs sind nahezu 20 Jahre nach den NRTIs erst zugelassen worden und verhindern, dass die virale DNA in die Wirts-DNA eingebaut wird (Atta, De Seigneux, and Lucas 2019; Pau and George 2014).

Entry-Inhibitoren:

Diese zuletzt zeitlich neuere Wirkstoffklasse verhindert den Eintritt des Virus in die Zelle. Hierzu zählt der CCR5-Chemokinezeptor-Antagonist Maraviroc, der selektiv nur den CCR5-Chemokinrezeptor blockieren und prätherapeutisch eine Tropismus-Analyse benötigt. Eine weitere Substanz, welche die Fusion des Virus über das gp41 Protein mit der Zellmembran verhindert, ist Enfuvirtide. Diese beiden Substanzen werden seltener eingesetzt und gehören zur Zweitlinientherapie, z.B. bei Therapieversagen (Lehmann et al. 2019; Mostashari Rad, Saghaie, and Fassihi 2018).

1.7 Aktuelle Daten

In den regelmäßigen Berichterstattungen der UNAIDS, ein Programm der Vereinten Nationen zu HIV kann die globale Entwicklung zahlenmäßig mit einer Zunahme der Patienten unter ART und eine Abnahme der Mortalität, nachvollzogen werden (Abb. 5). Im Jahr 2015 zeigen sich bereits deutliche Fortschritte in den globalen Bemühungen, die Erkrankung einzudämmen.

Das Programm nimmt sich diesbezüglich für das Jahr 2020 die „90-90-90-Ziele“ vor. Dabei soll erreicht werden, dass 90% der Menschen, die mit HIV infiziert sind, von ihrer Diagnose wissen. Davon sollen 90% Zugang zu einer ART haben und wiederum 90% davon sollen eine insofern erfolgreiche Therapie erfahren haben, dass die Viruslast im Blut unter die Nachweisgrenze sinkt (UNAIDS 2015). Diese Hauptziele wurden erweitert. Bis zum Jahr 2020 sollte jeweils eine weltweite Reduktion der Neuinfektionen sowie der AIDS assoziierten Todesfälle unter 500.000 erreicht werden (UNAIDS 2016).

Numbers of AIDS-related deaths and people receiving HIV treatment, global, 2000–2020

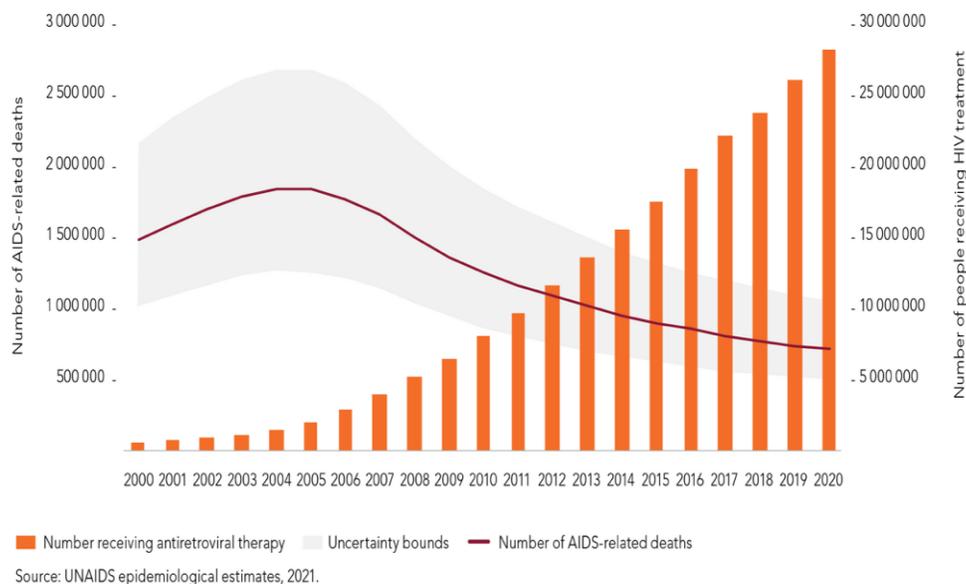


Abbildung 5: globale Entwicklung der AIDS bedingten Mortalität und Verfügbarkeit von Medikamenten über die Jahre, Graphik entnommen aus „Global Aids Update“ (UNAIDS 2021a)

In den am schwersten von der Epidemie betroffenen Ländern im Osten und Süden Afrikas haben sich der Zugang zu Therapie, Diagnostik und die Rahmenbedingungen gebessert. Hier zeigt sich eine steigende Prävalenz bei gleichzeitig sinkender Mortalität und Inzidenz (UNAIDS 2021a). Dies ist maßgeblich der ART zuzuschreiben.

Der Einsatz und das Erforschen der ART hat jedoch auch gezeigt, dass das Virus schnelle Medikamentenresistenzen entwickeln kann. Dies erschwert zusätzlich die globale Bekämpfung der Erkrankung und die Etablierung von allgemeingültigen Therapieregimes, vor allem in Entwicklungsländern.

1.7.1 HIV-Therapie in Malawi

Afrika ist der am schwersten von der HIV-Infektion und AIDS betroffene Kontinent. Etwa 25 Millionen HIV-positive Menschen leben hier. Ein großer Anteil von ca. 22 Millionen lebt in Subsahara Afrika. Hier ist HIV-1 Gruppe M, Subtyp C am häufigsten zu finden. Die Transmission erfolgt am meisten über heterosexuelle Kontakte, wobei Prostitution und sexuelle Gewalt eine zentrale Rolle spielen ('Human Immunodeficiency Virus (HIV)' 2016).

Der zu den ärmsten der Welt gehörende Staat Malawi befindet sich in Südostafrika. Das pro-Kopf-Einkommen beträgt hier weniger als einen US-Dollar pro Tag. In diesem Land herrscht eine hohe Analphabeten Quote von >60% der insgesamt 17,5 Millionen Einwohner. Für eine solch immense Aufgabe wie die Bewältigung der HIV-Epidemie ist in Malawi, wie auch in vielen anderen afrikanischen Staaten, internationale Hilfe notwendig. Das Land wird sowohl durch die WHO, UNICEF, das Globale Fonds zur Bekämpfung von Aids, Tuberkulose und Malaria (GFATM), als auch durch U.S. President's Emergency Plan for AIDS Relief (PEPFAR) maßgeblich finanziell unterstützt. Vor allem die Versorgung mit antiretroviralen Medikamenten erfolgt durch Gelder der GFATM und UNICEF (Schouten, Jahn, Ben-Smith, et al. 2011).

Im Jahr der Durchführung dieser Arbeit, 2015, lag die HIV-Prävalenz in Malawi laut WHO bei 9.9%. Ca. 1 Million Menschen in Malawi waren mit HIV infiziert, davon 110.000 Kinder. Insgesamt wussten 70% von ihrem HIV-Status. 24.000 Menschen starben an den Folgen der Erkrankung und 66% der infizierten Menschen hatten Zugang zu ART (WHO 2016b). Die Standardtherapie im Jahr 2015 beinhaltete eine Kombination von 2 NRTIs und 1 NNRTI:

Tenofovir/Lamivudin/Efavirenz sog. TLE (TDF/3TC/EFV). Unabhängig von der CD4-Zahl wurde jedem Patienten eine Therapie, welche lebenslang durchgeführt werden muss, empfohlen.

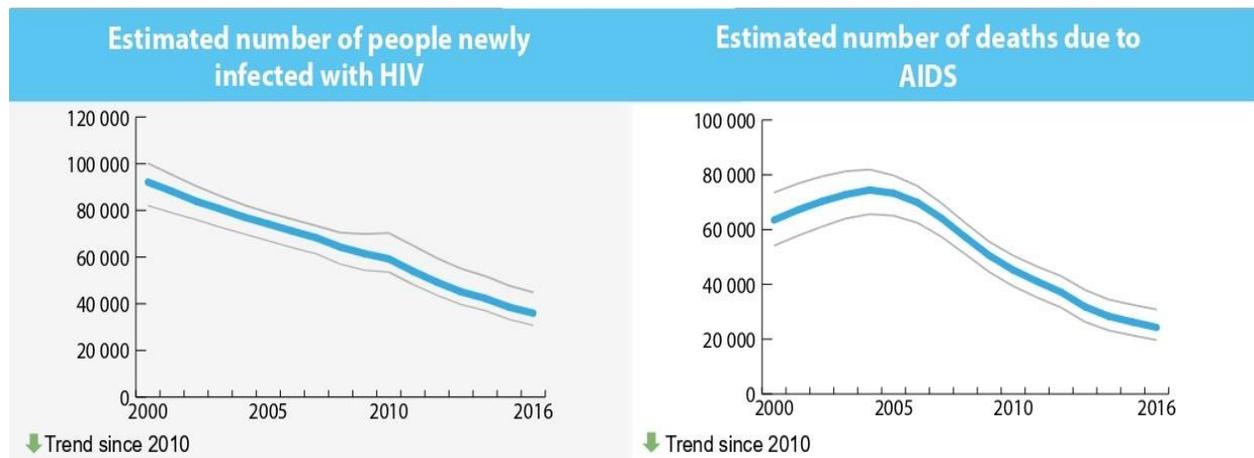


Abbildung 6: Entwicklung der HIV Neuinfektionen und Mortalität in Malawi, Grafik entnommen aus WHO/Malawi -HIV Country Profile (WHO 2016b)

In Kooperation mit internationalen Organisationen stehen aber auch die nationalen Bemühungen, die Versorgung zu verbessern, indem die Koordination, Verteilung und Infrastruktur geschaffen werden, ebenfalls im Vordergrund. Auch in Malawi konnte bis Jahr 2016 ein positiver Trend in der Abnahme der Prävalenz sowie Mortalität verzeichnet werden (Abb. 6).

Bis heute ist die HIV-Prävalenz in Malawi nur leicht gesunken (8.1%, UNAIDS 2020), die Zahl der AIDS-bedingten Todesfälle konnte jedoch dank der flächendeckend verfügbaren (86%) antiretroviralen Therapie gegenüber 2016 auf ca. 12.000 Todesfälle halbiert (UNAIDS 2020a).

1.7.2 Prävention der Mutter zu Kind Transmission PMTCT

Bei der „prevention of mother to child transmission“ handelt es sich um die Prävention von vertikalen Übertragungen des Virus. Dies erfolgt von der HIV-positiven Mutter auf das Kind während der Schwangerschaft, während der Geburt oder während der Stillzeit. Die

Wahrscheinlichkeit der Infektion ohne medikamentöse Intervention liegt zwischen 30-45% (Chen, Liu, and Kong 2011).

Im Jahr 2011 rief die WHO zur Prävention vertikaler Transmissionen auf und gab hierzu eine Empfehlung ab. Bei einer CD4+-Zellzahl der Schwangeren $\leq 350/\mu\text{l}$ oder Stadium 3 oder 4 der Erkrankung, soll eine dreifach ART begonnen werden. Bei allen anderen Patientinnen soll entweder Option A (bei der Mutter und Kind Nevirapin während bzw. nach Geburt bekommen) oder Option B (bei der die Mutter eine erst-linie ART während Schwangerschaft und Stillzeit bekommt und das Kind 6 Wochen nach Geburt Nevirapin) greifen (WHO 2014, 2016b).

1.8 Gesundheitswesen in Malawi

Die medizinische Versorgung im Land ist Aufgabe des Ministry of Health. Die Versorgung wird in einem 4-Stufen-System organisiert. Auf Ebene des Dorfs befinden sich sog. „dispensaries“ oder „village clinics“ welche den Charakter einer rudimentären, ambulanten Praxis haben und meistens nicht durch einen Arzt, sondern durch „medical assistants“ (ähnlich wie eine Pflegekraft) oder einem „clinical officer“ (3-jährige medizinische Ausbildung) besetzt sind (Muula 2019; Malawi 2016). Zu Stufe 4 gehören die überregional versorgende „central hospitals“.

Auf Grund fehlender Ressourcen (starke Armut des Landes, limitierte Finanzierungsmittel, Fachkräftemangel, schlechte Verteilung von Ressourcen) ist die medizinische Versorgung von Patienten in Malawi mangelhaft. Vor allem in ländlichen Gebieten fehlt es an Fachpersonal, um die Betreuung von HIV-Patienten zu gewährleisten (Hofer 2009). In den größeren Städten ist die medizinische Versorgungslage durch die höhere Personaldichte und größere medizinische Einrichtungen zwar etwas besser aber auch hier werden Ressourcen häufig knapp. Das größte Krankenhaus in der Hauptstadt Lilongwe, das Kamuzu Central Hospital, ist ein überregionaler Versorger, der für die zentralmalawische Region mit ca. 43% der Gesamtbevölkerung Malawis zuständig ist (Kamuzu Hospital 2022).

1.8.1 Das Lighthouse Trust

Auf dem Campus des Kamuzu Central Hospitals in Lilongwe befindet sich das Lighthouse Trust – ein spezielles medizinisches Versorgungszentrum für Menschen mit HIV/AIDS. Was initial im Jahr 1997 als Freiwilligenarbeit begonnen hat, entwickelte sich über die Jahre zu einer großen, unentbehrlichen Organisation, eine Stiftung mit Klinikcharakter. Die Organisation ist die erste ihrer Art und sie arbeitet eng mit dem Ministry of Health in Malawi zusammen, ist aber nicht von diesem abhängig und erhält ihre Finanzierung durch internationale Hilfsfonds. Die Entwicklung erfolgte unter dem Mitwirken von Einheimischen (z.B. Prof. Dr. Sam. Phiri – aktueller Direktor des Lighthouse Trust) als auch von internationalen Medizinern (z.B. Dr. Florian Neuhahn bis 2005 - aktuell Universität Heidelberg). Die Mission des Lighthouse besteht darin, die Menschen, die an HIV/AIDS erkrankt sind sowie deren Angehörige qualitativ medizinisch und sozial zu versorgen bzw. zu begleiten. Die inzwischen ca. 300 im Trust arbeitenden Menschen beraten Patienten und deren Angehörige im täglichen Umgang mit der Erkrankung. Sie führen Aufklärungsarbeiten und Testungen durch, leiten eine ART ein oder wechseln Therapieregimes. Hier erfolgen auch Ergänzungen in der Behandlung von Patienten, welche vorher stationär in Behandlung waren. Die vorhandenen Ressourcen werden koordiniert und die Arbeit mit nationalen und internationalen Partnern sowie Forschung werden eingeleitet und gepflegt. Im Jahr 2015 wurden ca. 60.000 Menschen am Lighthouse beraten oder behandelt (Phiri et al. 2017). Mit dem Begriff „Trust“ oder „Hospital“ wird in folgenden Ausführungen die gleiche Organisation beschrieben.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die zunehmend gebesserte Verfügbarkeit von ART, das breitere Spektrum an möglichen Therapieregimes, Therapieversager, Therapieregimewechsel, Fehltherapie und Non-compliance oder Teilen von Medikamenten in Kombination mit der von Natur aus vorhandenen, hohen Mutationsquote des HI-Virus, führte zu der Entwicklung von Medikamentenresistenzen. Dies bringt die Frage nach Monitoring der Erkrankung, der Compliance und Status der HIV-Medikamentenresistenzen/HIV-drug-resistance (HIVDR) mit sich, vor allem bei der Empfehlung zu einem schnellen Therapiestart. Laut WHO war im Jahr 2015 eine Mutationsrate von 10% gegen NNRTIs wie EFV und NVP in Ostafrika registriert worden (WHO 2016a). Es sind inzwischen über 200 Mutationen, die mit einer HIV-Medikamentenresistenz assoziiert sind, bekannt (Shafer and Schapiro 2008). Diese Erkenntnisse sind besonders in Ländern mit hohen Prävalenzen an Infektionen und mehreren etablierten Therapieregimes, wie Malawi, von Interesse.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich bereits mit der Frage nach HIVDR in einigen Ländern in der Subsahara Afrikas, z.B. im Nachbarland Tansania (Kasang et al. 2011). Im Hinblick auf die langsam zunehmende Resistenzlage, wurden für Malawi durch das nationale HIV-Programm Untersuchungsreihen durchgeführt, welche zeitabschnittsweise die Lage der HIVDR widerspiegeln. Hier zeigte sich eine HIVDR Prävalenz in früheren Untersuchungen im Jahr 2007 <5% (Kamoto and Aberle-Grasse 2008).

In der vorliegenden analytischen Querschnittsstudie soll unabhängig von der nationalen Initiative untersucht werden, wie die Prävalenz medikamentenresistenter HIV-Infektionen bei therapienaiven Patienten am Lighthouse Hospital in Lilongwe, der Hauptstadt Malawis, im Jahr 2015 ist. Das Lighthouse bezieht eine besondere Stellung in der Entwicklungsgeschichte der HIV-Versorgung und ist heute das größte malawische Zentrum für Versorgung von Patienten mit HIV/AIDS. Durch die Mitwirkung des deutschen Virologen Dr. Florian Neuhann war die Zusammenstellung der zu untersuchenden Proben im Rahmen der Lighthouse Tenofovir Cohort Study (LighTen) möglich (Sam Phiri 2004).

Es wurde Plasma von 161 therapienaiven Patienten im Jahr 2014-2015 untersucht, um darzustellen, wie die Resistenzlage in dem entsprechenden Jahr und verglichen zu den initialen nationalen Messungen war.

Am relevantesten sollte dargestellt werden, inwiefern das im Jahr 2015 gültige first-line Therapieregime (TLE, die Kombination aus Tenofovir/Lamivudin/Efavirenz bzw. TDF/3TC/EFV) eine gute Wirksamkeit zeigt oder durch die Erkenntnisse gegebenenfalls überdacht werden muss. Zudem sollen die Ergebnisse mit den bis ins Jahr 2021 eingetretenen oder ausgebliebenen Fortschritten in der Entwicklung der Therapie in Kontext gesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 2 verwendete Chemikalien

Agarose	Eurogentec
DNA-Ladepuffer	Fermentas
dNTP-Mix	Fermentas
Ethanol, unvergällt	Roth
Gene Ruler 1kb DNA- Leiter	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth
H₂O, RNase-frei	Qiagen

3.1.2 Enzyme

Tabelle 3: verwendete Enzyme

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

3.1.3 Geräte

Tabelle: 4 verwendete Geräte

Agarose Gelelektrophorese Kammer	Institutswerkstatt
Agarose Gelgießkammer	Institutswerkstatt
Autoklav 5057 ELC	Tuttnauer Systec
Eismaschine AF-1	Scotsman
Gefriertruhen	Liebherr
Gelelektrophoresedokumentationssystem	Intas

GelDoc-1000	
Feinanalysewaage	Sartorius
Kühl- und Gefrierschrank	Bosch
Laborwaage	Scaltec
Mikroliterpipette	Eppendorf, Gilson
Mikrowelle	Brother, Powerwave ER-200
NanoDrop Spektrometer (ND-2000)	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank BSB 4A	Gelaire
Thermocycler	Bio-Rad
My Cycler, Gradient	
Tischzentrifuge	
Biofuge Pico	Heraeus
Mikro 200 R	Hettich
Vortexmischer	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert/Hartenstein

3.1.4 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Tabelle 5: für Agarosegelelektrophorese verwendete Puffer und Lösungen

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

3.1.5 Primer für Reverse-Transkriptions-PCR

Tabelle 6: Primer, welche für die rt-PCR verwendet wurden

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

3.1.6 Primer für die nested-PCR

Tabelle 7: Primer, welche für die nested PCR verwendet wurden

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

3.1.7 Primer für die Sequenzierung

Tabelle 8: Primer, welche für die Sequenzierung verwendet wurden

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

3.1.8 Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

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

3.1.9 Verbrauchsmaterial

Tabelle 10: Verbrauchsmaterial

Agarosekämme 20 µl, 40 µl	Institutswerkstatt
Autoklavierbare Kunststofftüten	Hartenstein
Glasflaschen	Schott
Glaskolben, -messbecher, -messzylinder	Ilmabor, Rasotherm, Schott
Glaspipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand
Kryoröhrchen 2 ml	Hartenstein
Labor Schutzbrille	Roth
Messzylinder 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1 l	Brand
PCR-Plastikreaktionsgefäße, 200 µl	Hartenstein

Pipettenspitzen, gestopft	Nerbe plus
Pipettenspitzen, ungestopft	Roth
Plastikreaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Plexiglasschlitten	Insitutswerkstatt
Schraubverschlussröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Terralin Liquid (Desinfektionsmittel)	Schülke & Mayr
Zellstofftücher	Kimberly-Clark

3.1.10 Längenstandards

Für das Agarosegel wurde als Marker der Nukleinsäurestandard das „Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (Abb. 7) verwendet, bezogen von der Firma Thermo Fisher Scientific.

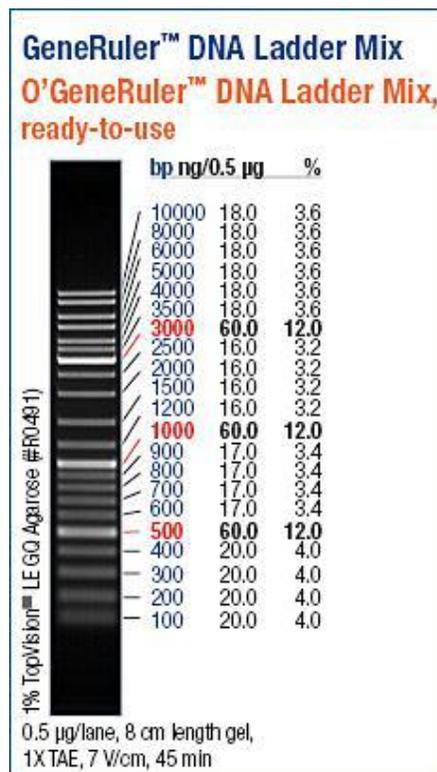


Abbildung 7: Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Nukleinsäuren-Längenstandard, verwendet für die Gelelektrophorese. Das gesuchte Gen-Bereich in den Untersuchungen befindet sich im Zielbereich von etwa 1000 – 1200 bp (Basenpaare)

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenrekrutierung / Probengewinnung / Studiendesign

Die „Lighthouse Tenofovir Cohort Study“ wurde als prospektive malawische Beobachtungsstudie konzipiert, welche in Zusammenarbeit mit der medizinischen Universität in Heildeberg und Köln initiiert wurde. Die Studie beschäftigte sich primär mit der Frage nach Medikamentensicherheit und Untersuchung der Langzeitauswirkung auf TDF basierten Therapieregimes bei HIV-Patienten, welche am Lighthouse Hospital in Behandlung sind. In dieser Studie sollten ca. 1500 Teilnehmer im Zeitraum 2014 bis 2015 eingeschlossen werden. Um in die Studie eingeschlossen zu werden, mussten die HIV-infizierten Patienten mindestens 18 Jahre alt sowie anamnestisch therapienaiv bezüglich Ihrer HIV-Erkrankung sein, und das schriftlich dokumentierte Einverständnis der Patienten musste vorliegen (Phiri 2015). Der Zeitraum des Follow-up wurde auf 36 Monate festgelegt. Primäre Endpunkte der Studie sind die Bestimmung der Prävalenz sowie das Ausmaß von Niereninsuffizienz, welche durch eine Langzeitbehandlung mit TDF hervorgerufen werden kann, als auch die Bestimmung der Prävalenz von weiteren noch nicht diagnostizierten Komorbiditäten (z.B. Hepatitis-C oder -B-Infektion).

Als sekundäre Endpunkte wurden unter anderem die Bestimmung der Prävalenz von HIVDR bei einem Teil der therapienaiven Patienten vor Beginn der Therapie durchgeführt (UKHD 2015). Für die Untersuchung der HIVDR wurden Proben zufällig ausgewählt ohne Beachtung von sonstigen Kriterien. Die Proben wurden während des Rekrutierungszeitraums von den Patienten als Blutentnahme gewonnen, im Anschluss zentrifugiert, eingefroren und im Verlauf an die entsprechenden Institute versandt.

3.2.2 RNA-Isolierung aus Plasma

Die Plasmaproben wurden nach Zentrifugation von Vollblut gewonnen und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach dem Transport nach Würzburg, Deutschland, wurden sie bis zur Analyse bei -80 °C in Gefriertruhen des Instituts für Virologie aufbewahrt. Die Kühlkette wurde nicht unterbrochen und die Proben wurden anschließend, reihenweise, jeweils 10 Proben auf einmal untersucht. Hierfür erfolgte zunächst das Auftauen bei Raumtemperatur.

Auf Grund der Arbeiten mit infektiösem Material erfolgte die Isolierung der Virus-RNA aus den Plasmaproben in dem institutseigenen BSL-3-Labor unter Beachtung aller Sicherheitsmaßnahmen.

Dafür verwendet wurde das Kit QIAmp® MinElute® Virus Spin Kit (cat. no. 577004, Qiagen 2014).

Vor Beginn der Arbeit, nach Beendigung der Arbeit und bei Arbeitsplatzwechsel erfolgte, um Kontaminationen zu vermeiden, stets eine gründliche Reinigung aller Arbeitsflächen (v.a. der Hood) und Arbeitsgeräte mit dem Desinfektionsmittel Terralin Liquid. Um eine weitere Kontamination durch RNase so gering wie möglich zu halten, wurden gestopfte Pipettenspitzen und sterile, RNase-freie 2.0ml-Reaktionsgefäße verwendet. Zudem wurden alle Proben und Komponenten des Kits nur unter der Hood geöffnet.

Der Isolierungsprozess der RNA findet in 4 Schritten gemäß der Angaben des Herstellers statt. Als erstes erfolgt der Zellaufschluss durch die Lysierung und Homogenisierung von jeweils 50µl mit dem AL-Puffer. Dieser enthält Carrier-RNA-AVE. Hierdurch soll die Denaturierung des Plasmas sowie die gleichzeitige Inaktivierung von evtl. vorhandenen RNAsen erreicht werden. Das Lysat wird dann an eine Silikamembran einer QIAamp MinElute Säule gebunden. Anschließend erfolgt das dreimalige Waschen der Filtermembran mit alkoholhaltigen Puffern. Die gebundene RNA wurde zuletzt mit 50µl Puffer AVE eluiert.

3.2.3 Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion

Im weiteren Prozess erfolgt die Transkription der isolierten viralen RNA in DNA mithilfe der reversen-Transkriptase-PCR. Für diese Methode wurde in den durchgeführten Experimenten das Kit QIAgen OneStep RT-PCR verwendet (cat. No 210212, Qiagen 2014), worin alle benötigten Komponenten enthalten sind. Diese wurden vor Beginn der reversen Transkription hinzugefügt (Master Mix), wobei sowohl die reverse Transkription als auch die Polymerasekettenreaktion nacheinander in der gleichen Tube stattfanden. Eine Zugabe weiterer Substanzen während oder zwischen beiden Reaktionen war nicht notwendig. Es handelt sich also um eine Kombination aus zwei Verfahren.

Zunächst wird durch die reverse Transkriptase (RT) die isolierte RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Dabei besitzt dieses Enzym mehrere Funktionen. Zum einen eine RNA- abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, welche mittels des ersten Primers und Desoxydinukleotiden (dNTPs) einen zum RNA-Strang komplementären DNA-Strang (cDNA) synthetisiert, des weiteren noch eine RNase-H-Aktivität, welche für die Spaltung des RNA-Strangs

sorgt und zuletzt eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, welche mittels des zweiten Primers aus der einzelsträngigen cDNA eine doppelsträngige DNA synthetisiert. Die doppelsträngige DNA dient in der nachfolgenden PCR als Vorlage, aus welcher die gewünschten Sequenzen amplifiziert werden können. Die Anzahl und Dauer der Zyklen sowie die Reaktionsschritte mit den jeweiligen Temperatur-Optima können aus Tabelle 12 entnommen werden.

Master Mix für RT-PCR

- 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

23 µl Mastermix.....+ 2 µl in AVE gelösten RNA

Das gesamte Volumen von 25µl wird in einem PCR-Röhrchen pipettiert und in eine PCR Maschine platziert.

Tabelle 11: PCR-Programm für RT-PCR

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Reverse Transkription	50°C	30 Min.
1	PCR Aktivierung	95°C	15 Min.
30	a) Denaturierung	94°C	20 Sek.
	b) Annealing	55°C	30 Sek.
	c) Extension	72°C	1 Min.
1	Finale Extension	72°C	10 Min.
1	Kühlung	15°C	

3.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein enzymkatalysiertes Verfahren, wodurch bestimmte Gen-Sequenzen eines vorliegenden DNA-Strangs amplifiziert werden können. Die Amplifikation bezeichnet die Vermehrung von DNA-Abschnitten. Für dieses Verfahren ausschlaggebend ist die Vorlage eines DNA-Strangs mit mindestens teilweise bekannter Gensequenz, der als Matrize dient. Für die Reaktion werden zwei spezifische Primer, also Startersequenzen, 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 einer speziellen Maschine, einem Thermocycler, statt. Hier finden Reaktionszyklen statt, welche wiederum aus 3 Schritten bestehen.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung. Die Temperatur wird auf bis zu 95°C erhöht, dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA-Matrize aufgespalten, sodass zwei Einzelstränge vorliegen.

Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf 50 °C herabgesetzt und die Hybridisierung kann erfolgen. Die zwei Primer, welche eine Länge von 20-40 Basen haben, sind zur gewünschten Sequenz komplementär und binden an das 3'-Ende der beiden Einzelstränge (Annealing). Die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Abschnitte dienen nun als Startpunkt für die DNA-Polymerase.

Im dritten Schritt wird die Temperatur erneut auf 68°C bis 72°C erhöht, die Primer-Sequenz durch die Anlagerung der Nukleotide verlängert und ein DNA-Doppelstrang wird gebildet. Dieser enthält die zu amplifizierende Sequenz.

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

Nach der Transkription der viralen DNA erfolgt nun die Amplifikation des für diese Arbeit gewünschten Gen-Bereichs, nämlich der gag-pol Region in der sog. nested-PCR.

Bei der nested-PCR handelt es sich um eine Variante der PCR, die sich vor allem für die Amplifikation sehr geringer DNA-Mengen eignet. Bei diesem Verfahren soll die Menge an unspezifischen PCR-Produkten reduziert werden. Zunächst wird die DNA in einer ersten PCR mit nur wenigen Zyklen amplifiziert (siehe Kapitel 3.2.3)

Aus diesem Gemisch erhält man neben der gewünschten DNA-Sequenz auch unerwünschte

Sequenzbereiche. Zur Amplifikation des gewünschten Genbereichs wird ein Teil des Gemisches mit anderen Primern zusammengebracht. Diese Primer sind so gewählt, dass sie in DNA-Bereichen binden, die sich weiter innen befinden als die Primer-Bindungsstellen der vorangegangenen PCR. Somit ist die Reaktion spezifischer und es werden nur die Produkte weiter amplifiziert, die benötigt werden.

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.

Master Mix für nested-PCR:

25 µl Taq 2x

1,25 µl Primer HIV-PR nest 50prot2

1,25 µl Primer HIV-RT nest NE13

20,5 µl dH₂O

48 µl Master Mix +2µl RT-PCR-Produkt

Der Reaktionsansatz wurde jeweils in 0,25ml PCR-Reaktionsgefäße auf Eis pipettiert und nach kurzer Resuspension und Zentrifugation im Thermocycler platziert. Die Anzahl und Dauer der Zyklen sowie die Reaktionsschritte mit den jeweiligen Temperatur-Optima können aus Tabelle 13 entnommen werden.

Table 12: Programme für die nested-PCR

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

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Nach der nested-PCR erfolgt eine Längenbestimmung der gewonnenen Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierbei handelt es sich um ein biochemisches Trennverfahren, bei dem geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern. Die stark negativ geladenen Nukleinsäuren können so von der Kathode zur Anode wandern, wobei kleinere Moleküle schneller durch die Gelporen wandern als größere Moleküle.

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde als erstes 1,5g Agarose abgewogen und mit 150 ml 1xTAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben gemischt. Das Gemisch wurde anschließend vier Minuten in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agaroseflocken sich vollständig aufgelöst hatten. 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 wurde dann in einen vorbereiteten Gelschlitten (Institutswerkstatt) gegossen und ein Kamm für die Formung der Geltaschen eingebracht. 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. Bei einer Spannung von 100-130 Volt erfolgte dann die Auftrennung der DNA-Fragmente über eine Dauer von 60 Minuten. Schließlich konnte die Gelelektrophorese mittels UV-Licht durch ein Geldokumentationsgerät analysiert werden.

Die vorhandenen Nukleinsäuren konnten in dem zuvor mit GelRed markierten Gel als Banden sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis wurde fotografisch festgehalten und im Computer abgespeichert (Abb. 8). Die aufgesuchte Gensequenz lag im Bereich von 1000-1200bp. Dies entspricht etwa dem mittleren Bereich der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (siehe Abb.7).

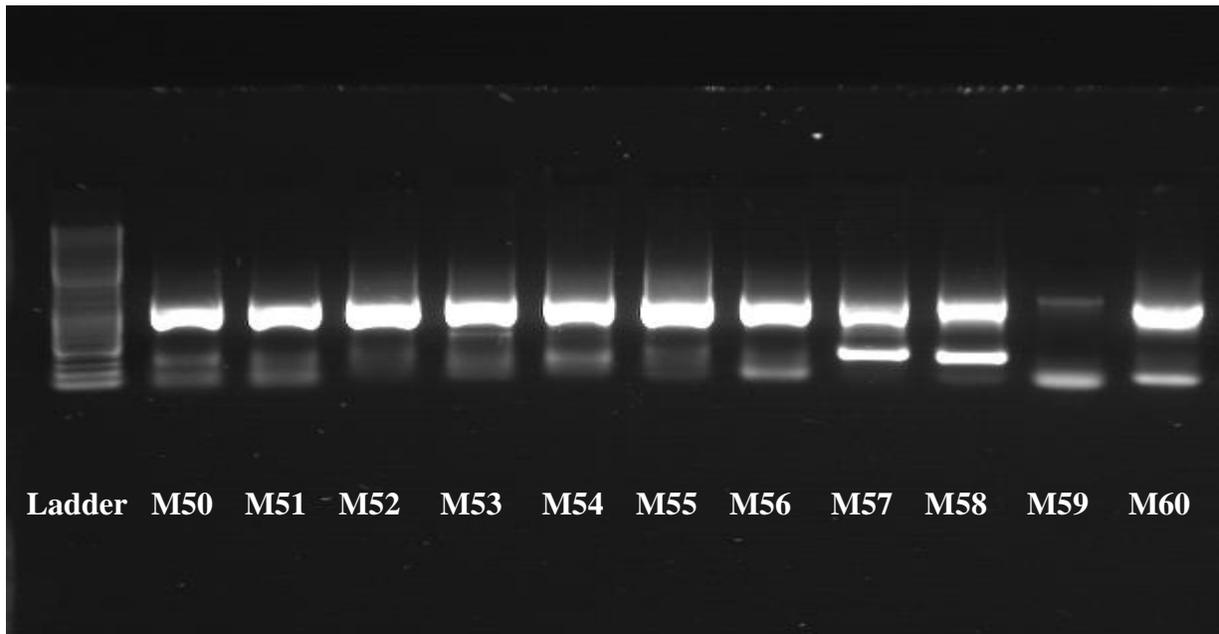


Abbildung 8: Beispiel eines DNA-Agarosegels aus dieser Arbeit. Nach der RNA-Isolierung von 10 Proben erfolgte die RT-PCR, gefolgt von der nested-PCR mit einem Teil dieses Produkts. Anschließend wurden die Proben mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Im Zielbereich von etwa 1000 – 1200 bp befanden sich Probe M51-M58 und M60. Diese wurden aufgereinigt und sequenziert. In Probe M59 konnte keine Nukleinsäure nachgewiesen werden.

3.2.6 Aufreinigung des PCR-Produktes

Nach der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte unter Verwendung des GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, NA 1020) nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt. Ziel dieses Verfahrens ist, die amplifizierte PCR-Produkte von den PCR Komponenten zu separieren, da diese die Sequenzierung stören können. Es handelt sich dabei um Primer der DNA-Polymerase, Puffer, Nukleotide und Salze.

3.2.7 Photometrische Messung von Reinheit und Konzentration der DNA

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde der DNA-Gehalt der PCR-Produkte durch ein NanoDrop Spektrometer (ND-2000, Thermo Scientific) bestimmt. Dies wird dadurch möglich gemacht, dass Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260nm haben. Hingegen liegt das Absorptionsmaximum für Proteine, bedingt durch die Absorption aromatischer Seitenketten von Aminosäuren, bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Das System wurde zunächst mit dem korrespondierenden Puffer als Referenzwert kalibriert. Anschließend wurde jeweils 2 µl Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und das Verhältnis der Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260nm zu 280nm bestimmt. Aus dem Quotienten 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)

3.2.8 Sequenzierung

Im Anschluss an die Bestimmung des DNA-Gehalts und der DNA-Reinheit erfolgte die Sequenzierung der DNA-Abschnitte nach der Didesoxymethode von Sanger, welche auch als Kettenabbruch-Synthese bekannt ist.

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

Die Polymerisationsprodukte werden in einem automatischen Sequenzanalysegerät nach ihrer unterschiedlichen Länge aufgetrennt und die endständigen ddNTPs mittels Laser zur Fluoreszenz detektiert. Die Anzahl und Dauer der Zyklen sowie die Reaktionsschritte mit den jeweiligen Temperatur-Optima können aus Tabelle 13 entnommen werden.

Master Mix für die Sequenzierung:

2 µl H₂O

1 µl DNA

1 µl Primer

1 µl BigDye Version 1.1

55 µl Gesamtvolumen

Tabelle 14: Programm für die Sequenzierung

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

3.2.9 Software, Auswertung und Statistik

Das sequenzierte virale Genom wurde im Anschluss mit der Computersoftware SeqMan von DNASTAR analysiert und bei fehlerhafter Kodierung entsprechend angepasst. Die Daten bezüglich der analysierten Proben (Name der anonymisierten Proben, Aufbewahrungsort, Ergebnis der RNA-Isolierung und Genom-Sequenzierung, die entsprechenden Subtypen der Genome, Auftreten von Mutation, Art und Name der Mutation, Ergänzungen) wurden in Tabellen in den Office Programmen (Word oder Excel) von Microsoft verwaltet.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism (Version 6 für Macintosh) verwendet. Proben ohne Mutation wurde der Wert „0“, Proben mit Mutation der Wert „1“ zugeordnet. Die Werte wurden mit Hilfe des D'Agostino-Pearson Testes auf Normalverteilung untersucht. Da es sich bei allen Datensätzen um nicht-normalverteilte Werte handelte, wurden zur Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen multiplen Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ gesetzt. Mit Hilfe der Prism-Software wurden auch Mittelwerte und Konfidenzintervalle (95% CI) bestimmt.

Die Bestimmung des HIV-Subtyps sowie die vorliegenden Mutationen innerhalb des Genoms erfolgte online, indem die entschlüsselten Sequenzen in die „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University eingegeben wurden. Eine zusätzliche Bestimmung über das online verfügbare „REGA Subtyping Tool“ der Katholieke Universiteit Leuven erfolgte zur Kontrolle der Ergebnisse.

3.3 Ethikvotum

Die vorliegende Arbeit wurde unter Beachtung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Für die Untersuchung der anonymisierten Blutproben lag ein Ethik Votum vor (NHSRC # 1199, National Health Sciences Research Committee, Lighthouse Trust, Lilongwe, Malawi).

4 Ergebnisse

4.1 Patientengruppe

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden an 161 Plasmaproben von Patienten über 18 Jahren durchgeführt, die kurz vor der Initiierung einer ART standen. Die Patienten waren bis dahin therapienaiv. Eine weitere Einteilung der Patienten, z.B. nach Alter, Geschlecht, wie bspw. in den Tansaniastudien unserer Arbeitsgruppe (Kasang et al. 2011; Rudovick et al. 2018), wurde nicht vorgenommen, da die Proben vollkommen anonymisiert zu uns verschickt wurden. Die Proben wurden im Jahr 2014-2015 im Rahmen der „Lighthouse Tenofovir Cohort Study“ (LighTen) gesammelt. Um einen der sekundären Endpunkte der Studie zu bestimmen, wurde ein Teil der Proben zufällig ausgewählt um die HIVDR-Lage vor Beginn der Therapie (PDR) bezogen auf das Standard Erstlinien Therapieregime TLE (TDF/3TC/EFV) zu untersuchen.

4.2 Subtypenverteilung

Nach der Sequenzierung erfolgte die Bestimmung der Subtypen des HIV-Genoms. Dies wurde online durchgeführt, nach Eingabe der entschlüsselten Sequenzen in die „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University. Analysiert wurden dabei der Subtyp der reversen Transkriptase (RT), als auch der Protease (PR). Eine zusätzliche Bestimmung über das „REGA Subtyping Tool“ der Katholieke Universiteit Leuven erfolgte zur Kontrolle der Ergebnisse. Es wurden insgesamt 100 Proben erfolgreich sequenziert und anschließend in den Datenbanken analysiert. Bei den restlichen 61 Proben konnte auch nach Wiederholung des Untersuchungsprozesses keine HIV-DNA isoliert werden.

100% der analysierten Gensequenzen entsprachen HIV-Subtyp C, sowohl bezogen auf die RT, als auch auf die PR. CRFs oder URFs konnten in den analysierten Proben nicht festgestellt werden. Der Subtyp C ist für Subsahara Afrika zu erwarten.

4.3 Schweregrade der Resistenzen

Durch das online Programm „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University wurden auch vorliegende Mutationen innerhalb der Sequenzen analysiert. Diese mit Medikamentenresistenzen assoziierte Mutationen (drug resistance mutation, DRM) sind standardmäßig in 4 Schweregraden eingeteilt. Sie sind als „high-, „intermediate-, „low-, und „potential low-level“ kategorisiert.

Werden DRMs als high-level eingestuft, bedeutet dies eine in-vitro aufgehobene Wirkung des Medikaments mit klinisch zu erwartende Therapieversagen. Intermediate-level DRMs zeigen in vitro eine mäßig reduzierte Wirksamkeit bei klinisch noch guter Wirksamkeit des Medikaments. Bei Vorliegen einer low-level kategorisierten DRM zeigt sich eine leicht reduzierte in-vitro-Wirksamkeit des Medikaments und eine minimal reduzierte klinische Wirksamkeit des Medikaments bezüglich der Virämie. Potential low-level DRM können auf eine vorhergehende Therapie mit ART hindeuten und haben meist nur dann eine klinische Bedeutung, wenn sie in Kombination mit anderen Mutationen auftreten (Paredes et al. 2017).

4.4 Resistenzlage in der untersuchten Patientengruppe

Es wurde zwischen Resistenzen gegenüber den verschiedenen Medikamentenklassen, den nicht-nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI), den nukleosidischen reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTI), sowie den Proteaseinhibitoren (PI) unterschieden. Zudem wurde auch der Schweregrad der Resistenzen bezogen auf die Erstlinientherapie TLE betrachtet.

Von den 100 erfolgreich sequenzierten und analysierten Proben wurde bei 17 mindestens eine Mutation (DRM) festgestellt, die mit einer HIVDR assoziiert ist, unabhängig vom Schweregrad. Dies entspricht einer Prävalenz von 17% innerhalb der untersuchten Gruppe (Abb. 9). Bei den meisten Patienten lagen gleich zwei oder mehrere Mutationen verschiedenen Schweregrades vor, welche gleich mit Resistenzen gegen zwei Medikamente assoziiert sind. Wenn nicht anderes angegeben, wurde immer die schwerwiegendste Resistenz betrachtet.

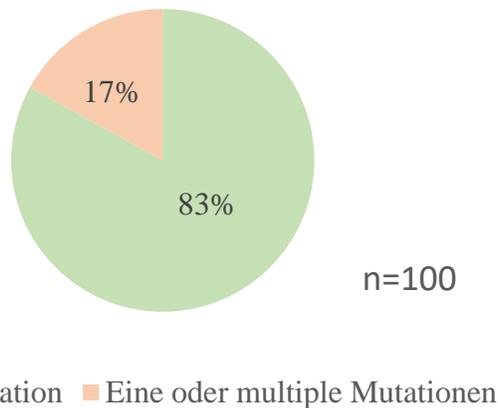


Abbildung 9: Prävalenz der HIVDR bei den Patienten in der untersuchten Gruppe. Von den 161 untersuchten Proben konnten 100 erfolgreich sequenziert (n=100) werden. Davon wiesen 83% keine Mutation auf und 17% eine oder multiple Mutationen.

Weiterhin wurde berechnet, inwieweit die einzelnen Medikamentenklassen betroffen waren (Abb. 10). Insgesamt waren 13 Patienten (13%) von einer Resistenz gegen ein NNRTI betroffen. Bei einem der Patienten lag eine Resistenz gegen ein NRTI (1%) und bei 8 gegen ein PI (8%) vor. Die Konfidenzintervalle sind in Tabelle 12 einsehbar.

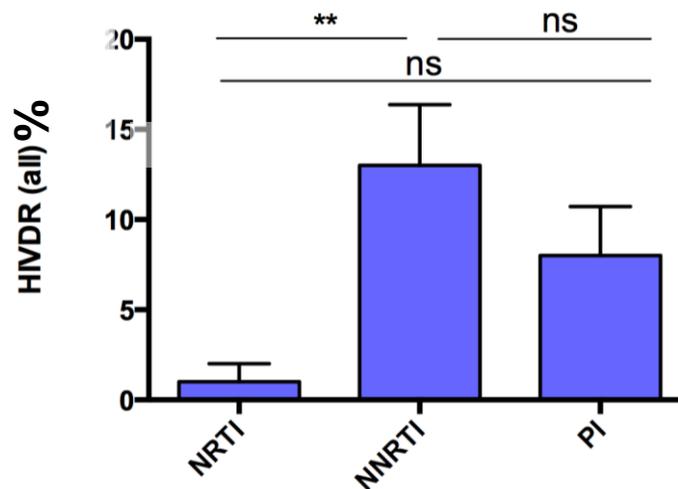


Abbildung 10: Anteil von HIVDR betroffenen Medikamentenklassen in den untersuchten Proben. Von 100 Proben (n=100) waren 13% der Resistenzen gegen die Gruppe der nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), 8% gegen die Gruppe der Proteaseinhibitoren (PI) und 1% gegen die Gruppe der nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) (Kruskal-Wallis Test für nicht-normalverteilte Werte mit Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$; ns= nicht signifikant; ** = $p < 0.01$)

Tabelle 13: Konfidenzintervalle

HIVDR	Mean	Konfidenzintervall (95%)
NNRTI	13 %	6,2 – 19,7 %
NRTI	1 %	-0,9 – 2,9 %
PI	8 %	2,5 – 13,4 %

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.

4.4.1 Schweregrad der Resistenzen innerhalb der Medikamentenklassen

In der weiteren Darstellung (Abb. 11) soll gezeigt werden, inwieweit die drei Medikamentenklassen von den unterschiedlichen Schweregraden der Medikamenteresistenzen betroffen sind. Wie bereits in 4.3 erwähnt, wird eine Einteilung in 4 Kategorien vorgenommen, wobei die „high-level“ die schwerwiegendste Resistenz ist. Die Daten wurden aus dem Programm der „HIV DRUG RESISTANCE DATABASE“ der Stanford University entnommen. Gewertet wurde bei der Auswertung nur jeweils die schwerste Resistenz, bezogen auf die gesamt-HIVDR.

Von den detektierten Resistenzen gegen die Gruppe der NNRTI entsprachen 27,1 % einer „high-level-resistance“, 38,9 % einer „intermediate-level-resistance“ und 5,0 % einer „potential-low-level-resistance“. Keine der Proben wiesen eine „low-level-resistance“ auf.

Für die Klasse der NRTI waren 3,4 % „high-level“ Resistenzen, sowie jeweils 1,7 % „low-level“ und „potential-low-level“ Resistenzen. Es wurden keine „intermediate-level-resistance“ für diese Medikamentenklasse in der untersuchten Gruppe festgestellt. Interessanterweise traten diese Resistenzen bei nur einem Patienten auf.

In der Medikamentenklasse der PIs traten Resistenzen jeden Schweregrades auf. Sowohl für die „high-level“, für die „intermediate-level“, als auch für die „low-level“ Resistenzen zeigt sich ein Anteil von 1,7 %. 16,7 % der Resistenzen waren hingegen „potential-low-level“.

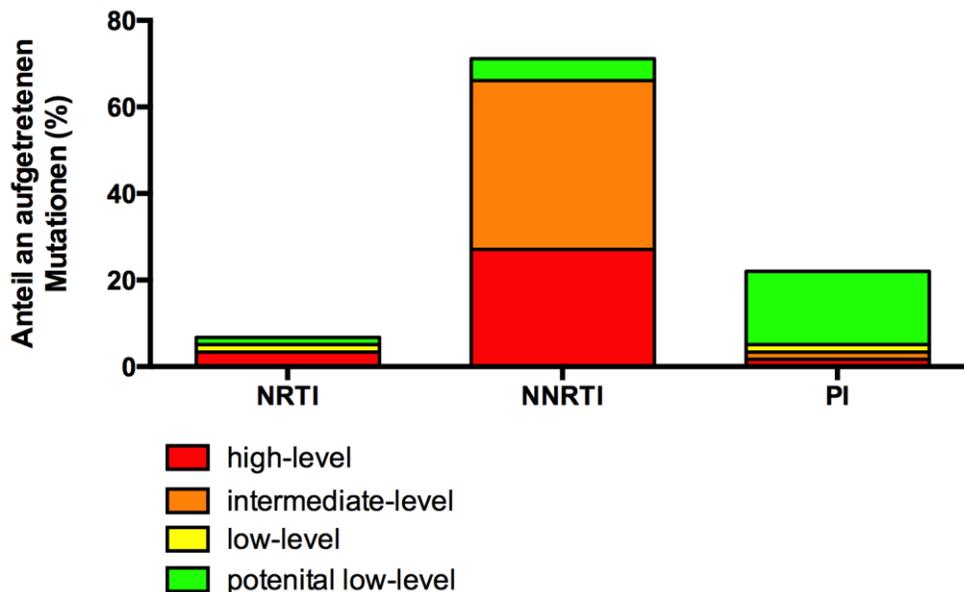


Abbildung 11: Anteil der Schweregrade der detektierten Resistenzen gegen die 3 Medikamentenklassen bezogen auf die gesamt detektierte HIVDR in der Gruppe. In der Gruppe der nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) entsprachen 27,1% einer high-level Resistenz, 38,9% einer intermediate-level und 5% einer potential low-level Resistenz (n=13). In der Gruppe der Proteaseinhibitoren waren die high-level, intermediate-level und low-level-Resistenzen mit einem Anteil von 1,7% vertreten (n=8). 16,7% der Resistenzen waren potential-low-level. In der Gruppe der nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) waren 3,4% der Resistenzen high-level und 1,7% low- und potential-low level (n=1).

4.4.2 Schweregrad der Resistenzen gegenüber einzelnen Substanzen

Die nächste Auswertung zeigt die Resistenzen gegen einzelne Wirkstoffe verschiedener Substanzklassen im Vergleich. Die dreifache Medikamentenkombination, die 2015 als Erstlinientherapie in Malawi eingesetzt wurde, nämlich die Kombination aus TDF/3TC/EFZ (Tenofovir, Lamivudin, Efavirenz) zusammen TLE, ist unterstrichen. Hier auffällig ist besonders die Gruppe der NNRTI, wo viele „high- und „intermediate-level“ Resistenzen nicht nur gegen EFV, sondern gegen die meisten gängigen Substanzen vorliegen. In der Gruppe der PIs sind überwiegend nur „low-level“ Resistenzen aufgetreten (Abb. 12).

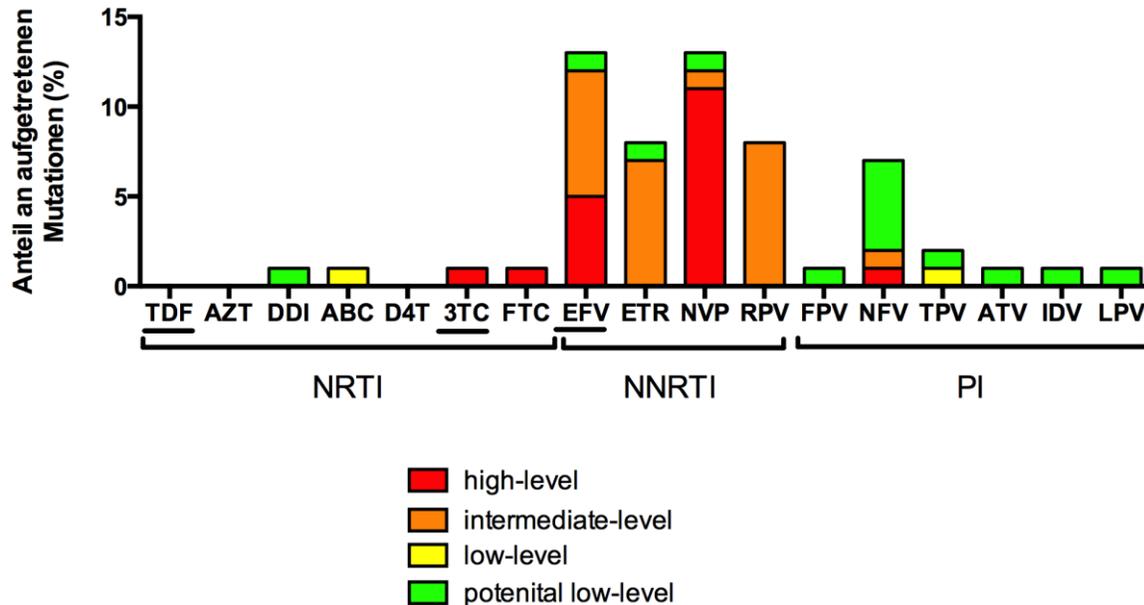


Abbildung 12: Übersicht über die Resistenzlage gegen einzelne Medikamente aus den verschiedenen Wirkstoffklassen. Es wurde jede Resistenz berücksichtigt. Unterstrichen sind Tenofovir (TDF), Lamivudin (3TC) und Efavirenz (EFV), welche im Rahmen der first-line-Triple-Therapie (TLE) in Malawi im Jahr 2015 eingesetzt wurden.

In Tabelle 15 ist der Schweregrad der Resistenzen bei den einzelnen Medikamenten genauer dargestellt. 13 % der Resistenzen waren gegen EFV, davon 5 % „high-level“ und 7% „intermediate level“. Auch gegen RPV und ETR konnte ein höherer Anteil von 8% „intermediate-level“ Resistenzen festgestellt werden. Gegen 3TC sind 1% „high-level“ Resistenzen aufgetreten, gegen TDF konnte in unserer Gruppe keine Resistenz festgestellt werden. Bei den PIs war NFV mit 8% am häufigsten von einer Resistenz betroffen.

Table 14: Anteil an Resistenzen gegen die verschiedenen Wirkstoffe der einzelnen Medikamentenklassen.

	high-level	intermediate-level	low-level	potential low-level
TDF				
AZT				
DDI				1 %
ABC			1 %	
D4T				
3TC	1 %			
FTC	1 %			
EFV	5 %	7 %		1 %
ETR		7 %		1 %
NVP	11 %	1 %		1 %
RPV		8 %		
FPV				1 %
NFV	1 %	1 %		5 %
TPV			1 %	1 %
ATV				1 %
IDV				1 %
LPV				1 %

4.4.3 Resistenzlage gegenüber der Erstlinien Tripple Therapie TLE

In Malawi wurde ein festes Therapieregime als first- (TLE) und second-line (TEE, die Kombination aus TDF/FTC/EFV) 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 100 untersuchten Patienten waren 13 von mindestens einer Resistenz gegen Efavirenz, Tenofovir oder Lamivudin betroffen. Dies entspricht einer Prävalenz von 13 %. Die Verteilung wird in Abb. 13 unter „all levels“ dargestellt. Eine „high-level-resistance“ trat bei 7 %, eine „intermediate-level-resistance“ bei 5 % und eine „low-level-resistance“ bei 1% der Patienten auf. Eine „potential-low-level-resistance“ gab es nicht.

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.

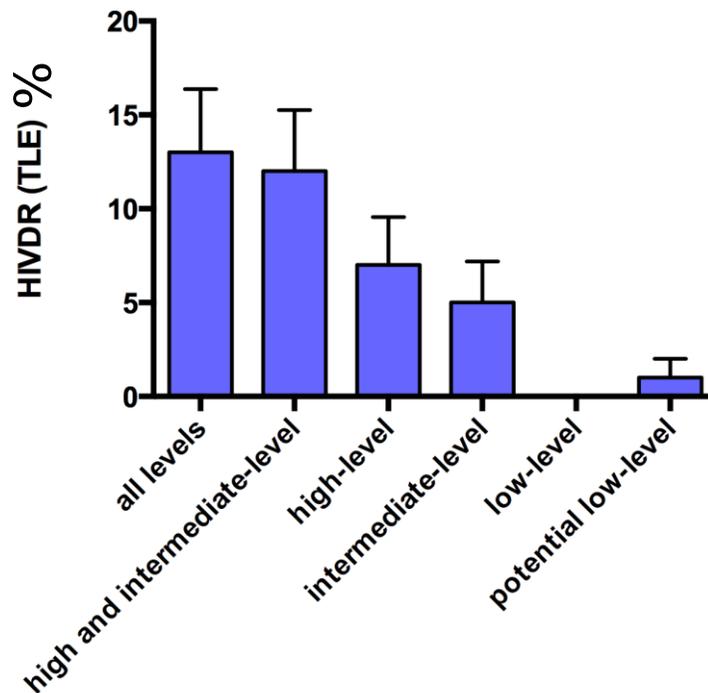


Abbildung 13: Schweregrade der Resistenzen gegen die Triple-Therapie (TLE) in der untersuchten Gruppe (n=100). Bezogen auf alle Schweregrade (all levels) konnten 13% Resistenzen gegen TLE festgestellt werden. Davon waren 12% high- und intermediate-level, 7% high-level, 5% intermediate-level und 1% low-level Resistenzen. (Darstellung als mean mit SEM)

Table 15: Konfidenzintervalle der Resistenzen gegenüber der Tripple-Therapie (TLE)

HIVDR	Mean	Konfidenzintervall (95%)
All levels	13 %	6,3 % - 19,7 %
High- and intermediate-level	12 %	5.5 % - 18.5 %
High-level	7 %	1.9 % - 12.0 %
Intermediate-level	5 %	0,6 % - 9,3 %
Low-level	1%	-0.9 % - 2,9 %

Im nächsten Schritt wurde die prozentuale Verteilung der Resistenzen für alle Wirkstoffe der first- und second-line Therapie analysiert. Hieraus soll ersichtlich gemacht werden, welche Medikamente besonders gefährdet sind, ein schlechtes Ansprechen oder ein Therapieversagen zu bewirken.

Besonders oft sind Mutationen vorgekommen, die mit einer Resistenz gegen Efavirenz assoziiert sind. In den untersuchten Proben konnten bei 6 Menschen eine „high-level“ und bei anderen 6 eine „intermediate-level“ Resistenz gegen EFV festgestellt werden. Somit ergibt sich eine Prävalenz von 12% gegen des sowohl im first- als auch im second-line Regime eingesetzte Medikament. Verglichen dazu konnte bei 3TC und FTC jeweils eine „high-level“ Resistenz im gleichen Patienten erfasst werden. Gegen TDF konnten in unserer Patientengruppe keine Resistenzen festgestellt werden (Abb. 14).

Nach dem Kruskal-Wallis-Test besteht in der untersuchten Patientengruppe eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für eine „high-level-resistance“ gegen EFV als für die anderen Medikamente der Tripple-Therapien beider Regimes.

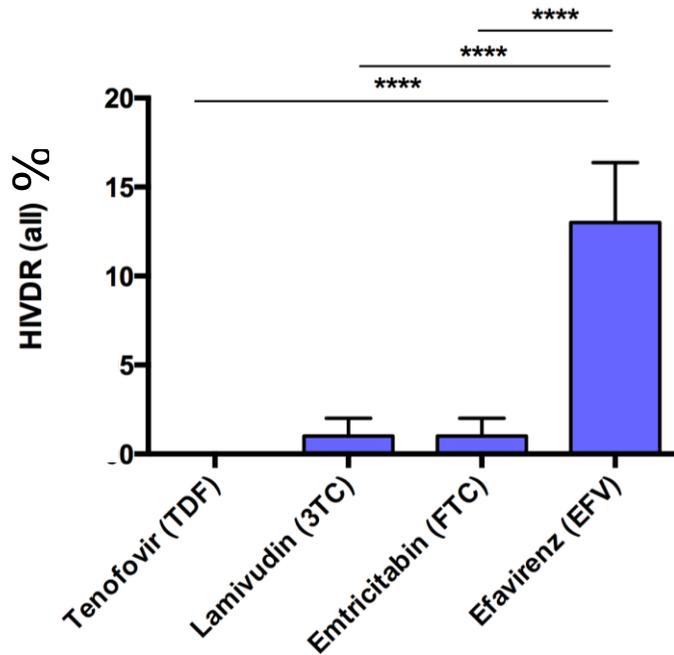


Abbildung 14: Wahrscheinlichkeit einer HIVDR für die Medikamente der first-line- und second-line-Triple-Therapie in Malawi (n=100). Mit 12% ist besonders Efavirenz (EFV) von Resistenzen betroffen. Weniger betroffen sind Lamivudin (3TC) und Emtriciabin (FTC). Gegen TDF konnte in der untersuchten Gruppe keine Resistenz festgestellt werden. Darstellung als means mit SEM; Kruskal-Wallis_test für nicht-normalverteilte Werte mit Signifikanzniveau Alphafehler = 0.05; signifikant; **** = $p < 0.0001$

Bezogen auf die gesamten Schweregrade der auftretenden Resistenzen verdeutlicht Abb. 15, dass Efavirenz nicht nur zahlenmäßig häufiger von einer HIVDR betroffen ist, sondern wenn eine Resistenz gegen das Medikament auftritt, dann handelt es sich meistens um eine „intermediate-level“ (6 %) oder eine „high-level“ Resistenz (6 %), also um eine schwerwiegende Resistenz.

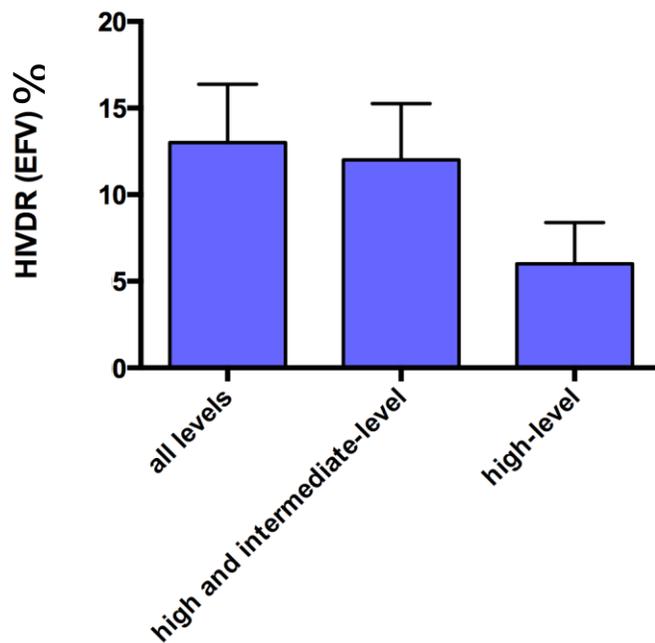


Abbildung 15: Verteilung der schwereren Resistenzen gegen Efavirenz (EFV) in der untersuchten Gruppe (n=100). Tritt eine Resistenz gegen das Medikament (all-levels = 13%) auf, dann handelt es sich meist um eine high- (6%) oder intermediate-level Resistenz (6%). Eine low-level Resistenz konnte ebenfalls festgestellt werden. (Darstellung als mean mit SEM)

Um diese Erkenntnisse zu verdeutlichen und die Bedeutung für die betroffenen Patienten in dem untersuchten Kollektiv aufzuzeigen, fasst Tabelle 17 alle Patienten zusammen, bei denen eine oder mehrere Resistenzen gegen die Tripple-Therapie aus TDF, 3TC und EFV auftraten. Hier wird erneut deutlich, dass 6% der Patienten eine „high-level“ Resistenz gegen EFV besitzen. Patient M14 weist sogar eine „high-level“ Resistenz gegen 3TC, wie auch eine „intermediate-level“ Resistenz gegen EFV auf. Betrachtet man nur diese Schweregrade, ergibt sich die Prävalenz von 12%. Wenn man davon ausgeht, dass alle 100 untersuchten Patienten das TLE-Regime im Anschluss erhalten haben, dann ist eine eingeschränkte Wirksamkeit bei diesen Patienten zu erwarten. Bei Patient M14 ist unter dem TLE-Regime auf Grund der Ergebnisse ein sehr schlechtes Ansprechen oder sogar ein Therapieversagen zu erwarten.

Die Untersuchungen haben bei den restlichen 87 Proben keine Resistenzen gegen das in Malawi übliche Therapieregime gezeigt. Dies bedeutet, dass 87% dieser Patienten mit einer wirksamen Therapie behandelt wären. Berücksichtigt man nur die „high-level- und „intermediate-level“ Resistenzen, so hätten 88 % eine ausreichende Therapie erhalten.

Tabelle 16: Liste der Patienten, welche von einer Resistenz gegenüber einer Tripple-Therapie aus TLE betroffen waren.

Sample number	High-level	Intermediate-level	Low-level	Potential low-level
M5	EFV			
M14	3TC, FTC	EFV		
M47	EFV			
M55	EFV			
M61		EFV		
M62	EFV			
M77			EFV	
M88	EFV			
M103		EFV		
M115		EFV		
M120		EFV		
M126	EFV			
M128		EFV		

4.5 Vorkommen der Mutationen

4.5.1 Verteilung der Mutationen in den Medikamentenklassen

In der folgenden Abbildung (Abb. 16) ist die Verteilung der vorkommenden Mutationen des HIV, die in unserer Gruppe mit einer HIVDR assoziiert waren, zusammengefasst worden. Die farbliche Kennzeichnung erfolgte zu Veranschaulichungszwecken und hat keine Relevanz bezüglich der Schweregrade der HIVDR.

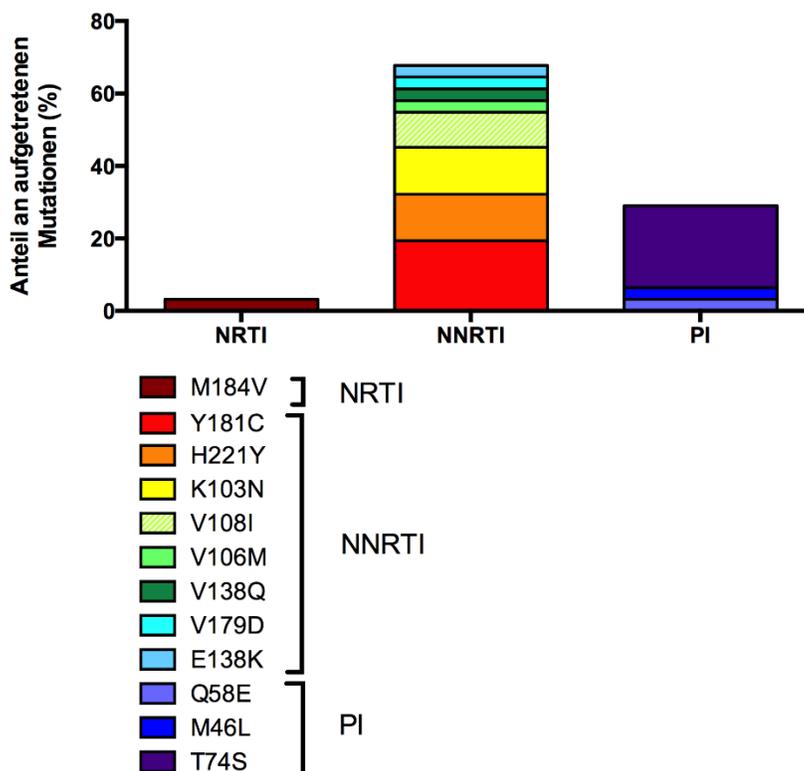


Abbildung 16: Verteilung der mit HIVDR-assoziierten Mutationen in den Medikamentenklassen. In der Gruppe der nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren trat Mutation Y181C mit 19,8% (n=13) am häufigsten auf. In der Gruppe der nukleosidische- Reverse-Transkriptase-Inhibitoren trat Mutation M184V auf (n=1). Bei den Protease-Inhibitoren war Mutation T74S mit 22,5% am häufigsten (n=8).

Von den insgesamt untersuchten 161 Proben konnten nur 100 Proben erfolgreich sequenziert werden und bei 17% wurde eine mit HIVDR-assoziierte Mutation festgestellt. Die meisten Mutationen sind in der Klasse der NNRTIs aufgetreten, gefolgt von den PIs. Bei den NRTIs traten in einer einzigen Probe Mutationen auf. Die Nomenklatur der Mutationen stellt sich wie folgt zusammen:

- M** → Wildtyp Aminosäure
- 184** → Position der Veränderung
- V** → Aminosäure, die zu einer Resistenz führt

4.5.2 Häufigste Mutationen in der Medikamentenklassen

NRTI: Bei dem in Tabelle 17 aufgeführten Patient M14 traten Mutationen auf, die zu einer Resistenz gegen NRTIs und NNRTI geführt hatten. Bezogen auf die NRTIs handelt es sich um die Mutation M184V, die zu den am häufigsten vorkommenden Mutationen für diese Substanzklasse zählt (Shafer and Schapiro 2008). In unseren Patienten führte die Mutation zu einer „high-level“ Resistenz für 3TC und FTC. Die Tatsache, dass solche schweren Resistenzen durch diese Mutation hervorgerufen werden können, ist bereits bekannt. Treten auch andere NRTI-Mutationen auf, können auch weitere Medikamente dieser Klasse, z.B. ABC, von „high-level“ Resistenzen betroffen sein (Shafer and Schapiro 2008).

NNRTI: Ersichtlich in Tabelle 18 ist, dass alle vier Wirkstoffe NVP, EFV, ETR, RPV gleichermaßen von Resistenzen betroffen sind, welche durch verschiedene Mutationen hervorgerufen sind. Bei näherer Betrachtung der Auswertungsergebnisse fällt allerdings auf, dass die meisten „high-level“ Resistenzen selten nur durch eine Mutation hervorgerufen sind. In vielen Fällen trat eine Kombination aus 2 bis 3 Mutationen auf. Für die häufigsten Mutationen sind die Kombinationen mitaufgeführt.

Tabelle 17: Charakterisierung des Auftretens der Mutationen in der Substanzklasse der NNRTIs

Mutation	Häufigkeit	Schweregrad der HIVDR	HIVDR	Vorkommen
Y181C	6x 19.4 %	2 high-level 4 intermediate level	NVP, EFV, ETR, RPV	4x V108I, H221Y 1x K103N 1x einzeln
K103N	5x 12.9 %	5 high level	NVP, EFV	3x einzeln 1x V138Q, Y181C 1x V106M
H221Y	12.9 %	1 high level 3 intermediate level	NVP, EFV, ETR, RPV	4x V108I, H221Y
V108I	3x 9.7 %	1 high-level 2 intermediate level	NVP, EFV, ETR, RPV	
V106M	3.2 %	1 high level	NVP, EFV, ETR, RPV	
V138Q	3.2 %	1 high level	NVP, EFV, ETR, RPV	
V179D	3,2 %	1 intermediate level	NVP, EFV, ETR, RPV	
E138K	3,2 %	1 low-level	NVP, EFV, ETR, RPV	

In der Substanzklasse der NNRTIs wurden insgesamt 8 verschiedene Mutationen in unserer Gruppe festgestellt. Eine genauere Darstellung und der Schweregrad der erzeugten Resistenz, sowie das Medikament, ist in Tabelle 18 zusammengefasst.

Die Mutation Y181C trat mit 19.8 % am häufigsten bei der untersuchten Gruppe auf und verursacht v.a. „intermediate-level“ aber auch „high-level“ Resistenzen. Ein einziges Mal tritt Y181C als einzelne Mutation auf, verursacht in dem Fall für NVP eine „high-level-resistance“. Für EFV (als Bestandteil des TLE-Regimes), sowie für ETR, RPV entsteht dadurch eine „intermediate-level“ Resistenz. Absolut betrachtet, tritt die Kombination aus den Mutationen V108I/H221Y/Y181C vier

Mal häufiger auf. Diese verursacht in jedem Fall eine „high-level“ Resistenz für NVP und eine „high-level-resistenz“ für EFV. Somit ist es nicht deutlich zu belegen, ob die Kombination oder das alleinige Vorkommen von Y181C sich mehr auf den Schweregrad der Resistenz auswirkt oder nicht.

Die zweithäufigste aufgetretene Mutation mit 12.9 % ist K103N. Die Mutation trat am häufigsten als einzelne Mutation gegen diese Substanzklasse auf. Unabhängig von der Anzahl der noch evtl. noch vorhandenen Mutationen führt K103N nach Angaben der Stanford Database immer zu einer „high-level“ Resistenz sowohl gegen NVP als auch gegen EFV.

PI: Die Mutation T74S trat mit 22,5 % am häufigsten auf und verursachte v.a. „low-level“ Resistenzen gegen NFV. Die Mutation M46L trat mit 3.22% am zweithäufigsten auf. Einmalig in unserer Gruppe war die Kombination aus T74S und M46L, was eine „intermediate-level“ Resistenz gegen NFV hervorrief.

4.5.3 Stellung von Nevirapin

Im Jahr 2000 wurde von den WHO-Leitlinien eine Monotherapie mit Nevirapin empfohlen, um das Risiko für eine Übertragung des HI-Virus von der Mutter auf ihr Kind während und nach der Schwangerschaft zu senken. Dies wurde als Monotherapie während der Schwangerschaft und als Prophylaxe dem Neugeborenen verabreicht. (siehe 1.7).

Im Plasma der 100 untersuchten Patienten konnte bei insgesamt 11 Sequenzen eine Resistenz gegenüber NVP nachgewiesen werden, was einer Prävalenz von 11 % entspricht. Es traten 1 „low-level“ und 10 „high-level“ Resistenzen auf. Leider ist das Geschlecht der Patienten und ob sie eine Therapie i.S. der PMTCT erfahren haben, nicht bekannt. Alle für die vorliegende Arbeit untersuchten Patienten waren allerdings therapienaiv, sodass anzunehmen ist, dass es sich bei den vorliegenden Resistenzen gegen NVP bereits um übertragene und nicht um erworbene Resistenzen handelt.

Nevirapin als Monotherapie verlor nicht nur in Malawi, sondern auch weltweit auf Grund der sich häufenden Resistenzen seine Stellung in der PMTCT.

5 Diskussion

Anfang des Jahres 2021 lebten weltweit insgesamt 37,7 Millionen Menschen mit HIV, davon wussten 84% von ihrer Diagnose und wiederum 87% davon hatten Zugang zu einer ART. Bis Mitte des Jahres 2021 waren 28,2 Millionen Menschen unter Therapie. Das waren ca. 2 Millionen Menschen mehr wie im Jahr 2019 und etwa 20 Millionen mehr verglichen mit dem Jahr 2010. Die Zahlen haben sich also diesbezüglich zweifelsfrei gebessert. Auch die Gesamtmortalität wurde durch den Zugang zu ART um 64% reduziert und ist somit deutlich geringer seit der Aufzeichnung des höchsten Werts im Jahr 2004 (UNAIDS 2021b, 2021a).

Die Zahl der HIV-Infizierten in Malawi hat sich seit 2015 stabil gehalten. 1,1 Millionen Menschen in Malawi waren im Jahr 2021 mit HIV infiziert, bei einer über die Jahre leicht rückläufigen Inzidenz von bis 27.000 Neuinfektionen pro Jahr. Hauptziele in Malawi in den Jahren seit 2015 waren die Aufklärung zur Prävention, sowie die Schaffung von Ressourcen und Investitionen. Diese sollten v.a. in die Entwicklung medizinischer Einrichtungen fließen, um dadurch der Bevölkerung mehr Zugang zu einer adäquaten Behandlung zu ermöglichen und eine antiretrovirale Therapie i.S. der „90-90-90“-Ziele zu etablieren (UNAIDS 2020c).

Die „90-90-90 Ziele“ in Malawi zeigen sich laut UNAIDS bereits 2019 in greifbarer Nähe. Von der gesamt infizierten Population befinden sich 2021 etwa 92% der Erwachsenen und 73% der Kinder unter ART. Somit gehört Malawi laut den Daten der UNAIDS zu den ersten 8 Ländern der Welt welche die „90-90-90 Ziele“ erreichen. Dies allerdings mit einer noch inhomogenen Verteilung viralen Suppression unter Männern, Frauen und v.a. Kinder.

Diese doch beeindruckenden Zahlen in Malawi zeigen eine positive Entwicklung, welche kulturelle und sozioökonomische Barrieren durchbricht und die man maßgeblich in der medikamentösen Versorgung der Erkrankten vermutet. Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe soll diskutiert werden, ob angesichts der gebesserten Versorgung die kalkulierte TLE-Therapie ausreicht, ob die Zahlen der HIVDR in anderen Ländern reproduzierbar sind und inwieweit eine Resistenztestung vor Therapiebeginn sinnvoll ist (UNAIDS 2021).

5.1 HIVDR

Die höchste Herausforderung bezüglich der Entwicklung einer gleichbleibend wirksamen Therapie oder einer Impfung ist die genetische Variabilität des HIV. Bereits nach Infektion kommt es zu einer rasanten Veränderung des Virus. Es erfolgen 10^{-5} - 10^{-3} Fehler/(bp und Zyklus). Die meisten Mutationen entstehen durch die Arbeit der RT. Es kommt dadurch im Verlauf zu einer 59% Veränderung der viralen RNA (Yeo et al. 2020). Die Reaktion des Immunsystems erhöht den Selektionsdruck für die Viren, welche sich den Abwehrmechanismen entziehen können. Das Immunsystem wird den kontinuierlichen Veränderungen des viralen Genoms nicht gerecht, sodass lediglich die virale Unterdrückung, aber nicht die Elimination bewirkt werden kann (Borrow and Bhardwaj 2008; Fanales-Belasio et al. 2010).

Seit 2015 wird von der WHO eine antiretrovirale Therapie für alle Patienten, lebenslang, unabhängig vom Alter, klinischem Stadium und CD4-Zahlen im Blut empfohlen. Unter ART kommt es zum Selektionsvorteil für therapieresistente Quasispezies und damit zur Entwicklung von Resistenzen. Eine Dreifach-Kombination wird eingesetzt (TLE oder TEE), um möglichst viele Angriffspunkte zu erreichen und die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzselektion zu minimieren. Die Empfehlung der WHO aus dem Jahr 2015 bedeutet, dass weltweit mehr als 35 Millionen Menschen eine ART brauchen.

Der häufigere Einsatz an ART könnte auch zu einer Zunahme in der Entwicklung resistenter HI-Viren führen. Die meisten klinisch relevanten Medikamentenresistenzen entstehen, wenn eine ART ineffektiv (Clutter et al. 2016) oder während einer Therapie zur PrEP oder PMTCT als Monotherapie durchgeführt wird. Nicht unterschätzt werden soll aber auch eine mangelnde Patienten-Compliance. Durch inadäquaten Gebrauch antiretroviraler Medikamente in der Selbstversorgung, z.B. durch Einnahme von ART ohne ärztliche Beratung, Abbruch der Therapie, Besorgen von Medikamenten auf dem Schwarzmarkt oder Teilen von Medikamenten mit anderen, kommt es ebenfalls zur Resistenzentwicklung. Der Zugang zu medizinischen Einrichtungen, Aufklärung und die Compliance der Patienten in der Therapie spielen eine zentrale Rolle. Die resistenten Stämme können durch Übertragung auf den bislang bekannten Infektionswegen weitergegeben werden. Das bedeutet, dass auch ein therapienaiver Patient eine relevante HIVDR aufweisen kann, ohne zuvor eine Therapie gehabt zu haben.

5.1.1 Lage in Malawi

Über die Resistenzlage in Malawi gibt es wenige Untersuchungen. Im Jahr 2008 wurde eine nationale Studie durchgeführt an 4 großen malawische HIV-Zentren, inklusive des Lighthouse-Hospitals. Hier zeigte sich eine HIVDR Prävalenz in therapienaiven Patienten von 2,5-6,5%, je nach Klinik. Die meisten dieser Mutationen waren gegen NNRTI (3.3%). Genauer betrachtet waren die Mutationen K103N (in 43% der Fälle) sowie Y181C (34 %) am häufigsten festgestellt worden. Es wurden über 500 Proben untersucht und keine Resistenz gegen PIs festgestellt (Wadonda-Kabondo et al. 2012). Die Datenlage nach dieser Studie wird karger. Eine andere Publikation berichtet über keine relevanten Mutationen bei Schwangeren, therapienaiven Frauen (Kamoto and Aberle-Grasse 2008) und geht von einer HIVDR-Prävalenz <5%. In Malawi, wie auch in vielen afrikanischen Ländern, wird keine Resistenzmessung routinemäßig durchgeführt.

Dies ist maßgeblich aus Kostengründen nicht möglich und der fehlenden Infrastruktur für solche Diagnostik geschuldet. Viel wichtiger sind aber die regelmäßigen klinischen Visiten und die Routine Labordiagnostik. Hier hat zu den CD4-Zahlen v.a. die Bestimmung der Viruslast eine große Bedeutung, da bei Therapieversagen auch grenzwertige CD4-Zahlen vorliegen können (Kanopathipillai et al. 2011; van Oosterhout et al. 2009). Eine CD4-Labordiagnostik ist in Malawi weiterhin nicht flächendeckend vorhanden. Die Bemühungen, eine PCR-Diagnostik zu etablieren, sind im Gange. Eine PCR-Diagnostik wird durch die Guidelines 6 Monaten nach Beginn der ART sowie zweijährlich empfohlen (Ministry of Health and Population MoHP 2018) oder wenn klinische Zeichen eines Therapieversagens deutlich sind. Dennoch kann ein Therapiewechsel auch dann erfolgen, wenn solche diagnostische Mittel nicht zur Verfügung stehen. Die Bestimmung der Viruslast durch eine Zunahme der Point-of-Care Diagnostik zeigte sich nicht nur kosteneffizienter als laborgebundene Diagnostik, sondern auch schneller und zuverlässiger. Dies erlaubt eine ebenfalls schnelle Reaktion bezogen auf die Therapie (Mahon 2019). Um eine Therapie einzuleiten oder zu überprüfen, soll im Idealfall der Zugang zu einer adäquaten medizinischen Versorgung vorliegen. Oft müssen die Patienten vor allem in ländlichen Gegenden lange Wege auf sich nehmen um „dispensaries“ oder „village clinics“ zu erreichen. Auch hier ist es nicht gewährleistet, dass der richtige medizinische Ansprechpartner oder die passende Therapie verfügbar ist. Dies bedeutet, dass die Patienten in größere Kliniken gehen müssten, was oft aus Kostengründen nicht passiert.

5.1.2 HIVDR in der vorliegenden Arbeit

Alle untersuchten Sequenzen entsprachen dem HIV-Subtyp C. Dies ist der am häufigsten vorkommende Subtyp weltweit wie auch im Süden Afrikas. Rekombinante Formen konnten nicht festgestellt werden. Diese scheinen bislang keine relevante Rolle in Malawi zu spielen, wobei sie immer häufiger innerhalb Afrikas detektiert werden (Bbosa, Kaleebu, and Ssemwanga 2019).

In 13 von 100 Proben wurde eine Resistenz gegen einen Bestandteil der first-line Regimes TLE (TDF/3TC/FTC) nachgewiesen. 7 von den Proben wiesen eine „high-level“ Resistenz, 5 davon eine „intermediate-level“ Resistenz auf. Diese waren vor allem gegen den Wirkstoff EFV, das sowohl im TLE-Regime als auch im TEE (das second-line Regime) enthalten ist und NVP. Die Resistenzen höheren Grades gegen TLE erreichten in unserer Studie eine Prävalenz von 12% (95% CI: 5.5%-18.5%). In unserer Gruppe zeigte sich eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit, dass eine schwerwiegende Resistenz gegen EFV vorliegt als für die anderen Medikamente der Triple-Therapien beider Regimes.

Das am Lighthouse-Hospital eingesetzte TLE-Regime verfügt somit über eine insgesamt gute Wirksamkeit, allerdings kann bei einem Anteil von 12% der Patienten eine eingeschränkte Wirksamkeit zu erwarten sein. Um dies rechtzeitig festzustellen, bedarf es regelmäßiger Visiten. Viele Patienten stellen sich im Verlauf nicht mehr vor und müssen die entsprechenden Konsequenzen tragen. Dies kann verschiedene Gründe haben, z.B. der Wechsel in eine andere Klinik, zu weite Wege oder das anderweitige Besorgen von Medikamenten. Manche Patienten hören auf, die Medikamente zu nehmen oder haben Lücken in der Therapie, manche fangen die Therapie gar nicht erst an, obwohl sie die Medikation bekommen haben. Um dem „loss to follow-up“ entgegenzuwirken, ist es sinnvoll, die Patienten an ihre Termine zu erinnern (Wadonda-Kabondo et al. 2012) oder Programme zu organisieren, um die Patienten ausfindig zu machen, sie zu schulen und einen erneuten Therapiebeginn zu veranlassen (Tweya et al. 2010).

Die in dieser Arbeit bestimmte Häufigkeit von PDR ist nicht zwingend auf die Gesamtheit der Patienten am Lighthouse Hospital oder aber gar für die Bevölkerung in Malawi insgesamt übertragbar, da die hier untersuchte Stichprobe keinen repräsentativen Charakter hat, sondern rein zufällig zusammengestellt wurde. Sie erlaubt jedoch eine gewisse Einschätzung der Situation und ob sich ggf. weiter ausgedehnte Untersuchungen sinnvoll sind. Die Autoren der „Lighthouse

Tenofovir Cohort Study“ haben sich aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit entschieden, eine größere Stichprobe von Patienten auf HIVDR zu untersuchen, und fanden in ihrer Arbeit eine Gesamtprävalenz von 13.7%, was der Größenordnung der hier gefundenen Resistenzen entspricht (Neuhann et al. 2020).

Das Lighthouse Hospital liegt in der Hauptstadt Malawis, in Lilongwe. Das Zentrum bezieht eine zentrale Stellung in die Behandlung der Patienten welche bezüglich HIV beraten und therapiert werden. Die Anzahl der Patienten, welche pro Jahr die Leistungen des Zentrums in Anspruch nahmen, lag bei knapp 60.000 im Jahr 2015. Davon erhielten ca. 20.000 Patienten eine ART (Phiri et al. 2017). Verglichen hierzu ist die Größe der hier untersuchten Gruppe zu gering, um eine generelle Aussage über die Wirksamkeit des Therapieregimes zu treffen. Die hier durchgeführte Untersuchung hat überwiegend explorativen Charakter.

Die regelmäßige, monozentrische Untersuchung der HIVDR wurde in Folge einer deutlichen Zunahme der ART-Verfügbarkeit von der WHO empfohlen (WHO 2017). Da solche Untersuchungen vor oder während einer Therapie in Ländern wie Malawi aufgrund fehlender Ressourcen nicht routinemäßig eingesetzt werden können, können stichprobenartige Untersuchungen einen Lichtblick auf die Lage der Resistenzen liefern. Zudem zeigen sich in anderen Untersuchungen ähnliche Zahlen bzw. Entwicklungen über die Jahre.

Im Nachbarland Tansania wurde 2011 eine damals alarmierend hohe Rate an HIVDR mit einer Prävalenz von 18,2% in ART-naiven Patienten über 25 Jahren festgestellt (Kasang et al. 2011). Bereits damals bestand die Überlegung, dass die durch antiretrovirale Therapie entstandenen resistenten Viren zwischen Partnern direkt übertragen werden können und somit eine deutlich höhere Prävalenz bei therapienaiven Patienten vorliegt, die sog TDR (transmitted HIVDR). In der darauffolgenden Studie, bezogen auf die Jahre 2013-2015, bei der meine Co-Autorschaft besteht, zeigt sich für Tansania eine weniger hohe HIVDR Prävalenz von 4,7% bei Patienten unter 25 Jahren (Rudovick et al. 2018). Die häufigste Mutation hier war K103N. Auch in der malawischen Gruppe wurde vor allem die Mutation K103N und Y181C vorgefunden. Diese gehören zu den relevantesten Mutationen für die Substanzklasse der NNRTI (Rhee et al. 2015).

In der tansanischen und in der malawischen Untersuchung scheinen die Patienten sich mit Viren infiziert zu haben, die bereits eine Mutation aufwiesen, wenn man davon ausgeht, dass die Patienten, so wie sie angegeben hatten, noch nie eine HIV-Therapie hatten. Also wird hier von einer prätherapeutische HIVDR (PDR) ausgegangen. Da aber die Angaben der Patienten nicht

immer verlässlich sind, bleiben weiterhin die Hypothesen, dass Medikamente fälschlicherweise und eigenständig eingenommen wurden. Hier sind die weiteren Verbesserungen der Aufklärungsmaßnahmen sowie verpflichtende Partnertestung anzuraten. Das obere Ziel muss sein, nicht nur die Infizierten mit Medikamenten zu versorgen, sondern ihnen Zugang zu Einrichtungen zu verschaffen, um ihre Angehörigen und Partner aufzuklären und somit Fehlverhalten zu vermeiden, die zu einer Infektion oder ein HIVDR führen können. Der Fokus sollte zudem dringlich auf der Entstigmatisierung der Erkrankung liegen, v.a. bezogen auf Kinder und Jugendliche. Offiziellen Angaben zufolge gibt es über 700 HIV-care-clinics (HCC) in Malawi. In diesen Praxen mit Zugang zu Beratung, Testung, Therapie und die Möglichkeit von regelmäßigen Visiten, wird auch präventiv gearbeitet und es werden Schulungen ermöglicht. (Ministry of Health and Population MoHP 2014).

Bezogen auf die prätherapeutische HIVDR untersuchte eine größere, im Jahr 2020 publizierte malawische Studie 1316 Patienten zwischen den Jahren 2015-2017, nachdem diese für mindestens 6 Monate eine ART erhalten haben (Gupta-Wright et al. 2020). Bei 32% der Patienten wurde ein virologisches Therapieversagen beobachtet. Diesem lag in 92% der Fälle eine Resistenz gegen EFV, in 82% der Fälle gegen 3TC und in 54% gegen TDF zugrunde. Das Vorliegen einer möglichen PDR wurde in der Studie nicht untersucht. Bezugnehmend auf die Ergebnisse dieser Untersuchung ist davon auszugehen, dass ein großer Teil der bei Gupta-Wright et al. beschriebenen Fälle von Therapieversagen auf PDR zurückgeführt werden könnten. Da 13% der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben eine derartige PDR gegen TLE aufweisen, besteht der Verdacht, dass in ca. 40% der von Gupta-Wright et al. beschriebenen Fälle bereits vor Therapiebeginn eine TLE-Resistenz vorgelegen haben könnte. Neben der Entwicklung von Resistenzen unter Therapie (z.B. aufgrund mangelnder Compliance) ist die PDR also ein wichtiger Faktor für auftretendes Therapieversagen. Aufgrund der Verteilung der bei Gupta-Wright et al. beschriebenen Resistenzen unter Therapie (92% EFV gefolgt von 82% 3TC, und 54% TDF) verglichen mit den Daten der vorliegenden Arbeit vor Therapie (93% EFV, 7% 3TC, 0% TDF) ist ferner davon auszugehen, dass in vielen Fällen die EFV-Prätherapie-Resistenz der Auslöser für das beobachtete Therapieversagen ist. Nach Wegfall von EFV aus dem TLE-Regime als wirksame Substanz aufgrund einer vorliegenden PDR reduziert sich das TLE-Regime auf zwei aktive Substanzen, nämlich 3TC und TDF. Es ist davon auszugehen, dass zwei Substanzen nicht dauerhaft

das Auftreten von Resistenzen verhindern können, so dass diese in kurzer Folge ebenfalls an Wirkung verlieren und die HIVDR zunimmt. Diese Daten zeigen deutlich, welche gravierende Auswirkungen eine unentdeckte PDR auch nur einer einzigen Substanz innerhalb weniger Monate auf die Wirksamkeit eines Therapieregimes haben kann.

5.2 PMTCT in Malawi

In Malawi lebten im Jahr 2015 55.000 Kinder mit HIV, weltweit sind es 1,8 Millionen Kinder (UNAIDS 2020b). Die Zahlen der infizierten Kinder waren in den Vorjahren deutlich höher. Die Mehrheit der Transmissionen erfolgte vertikal von der Mutter auf das Kind. Die nationalen Bemühungen in der Bekämpfung und Prävention von HIV lassen sich in Malawi durch das Programm zur Prävention der Mutter zu Kind Transmission am besten belegen.

Die WHO sprach eine Empfehlung aus in Form von Option A und Option B für die PMTCT (siehe 1.7.2). Der Therapiebeginn erfolgte nach Bestimmung der CD4- Zahlen. In Malawi erwies sich die Durchführung der Empfehlung als schwierig, da zu wenige dezentrale, medizinische Einrichtungen vorhanden waren und zudem die CD4+-Labordiagnostik nicht ausgereift war. Um dennoch die Bedürfnisse der erkrankten Schwangeren und Neugeborenen gerecht zu werden, entwickelte das Land Option B+. Bei diesem PMTCT-Programm sollten alle HIV-positiven Schwangeren unabhängig der CD 4-Zellzahl oder des WHO Stadiums so schnell wie möglich eine first-line ART bekommen und lebenslang fortsetzen (Schouten, Jahn, Midiani, et al. 2011). Neugeborene sollen in den ersten 6 Wochen zudem eine Therapie mit Nevirapin bekommen.

Diese ressourcen- und bedarfsgerechte Lösung stieß initial v.a. aus Kostengründen auf Kritik, wurde aber im Laufe der Jahre von der WHO in den Guidelines aufgenommen (WHO 2012). Verlaufsstudien zeigten zudem eine deutlich bessere Wirksamkeit der Option B+ in Bezug auf die Senkung der HIV-Übertragung, zumal bei der Einzelgabe von Nevirapin eine hohe Resistenzlage von >30% bei den Müttern und >50% bei den Neugeborenen festgestellt wurde (Arrivé et al. 2007).

5.3 WHO, die 90-90-90-Ziele und INIs

Die auf die NNRTIs bezogenen Resistenzen finden sich in der Berichterstattung der WHO wieder. Weltweit soll eine Prävalenz an HIVDR gegen NNRTIs ab dem Jahr 2015 von 10% und höher

vorliegen. Inzwischen haben sich die Daten dramatisch verschlechtert und die WHO berichtet im Jahr 2020 von einer Erhöhung der HIVDR gegen NNRTIs, besonders bei Therapieversagen von über 50%. Diese Zahlen sind nicht nur in afrikanischen Ländern, sondern auch in Asien und Südamerika registriert worden. Es nehmen nicht allein die Resistenzen gegen NNRTIs zu, sondern auch die gegen NRTIs, wie bspw. TDF, das in Afrika weitläufig noch eingesetzt ist.

Die hier vorliegenden Resultate spiegeln sich in dieser zunehmenden Lage der Resistenzen wider. Die weltweite Verschärfung der Resistenzlage forderte eine Konsequenz und Überarbeitung der Therapiekonzepte und Reaktionsmöglichkeiten. Eine routinemäßige Resistenztestung vor Therapie bleibt weiterhin Ländern vorbehalten, welche die nötigen finanziellen Mittel und konsequente Verfügbarkeit von Medikamenten aufweisen. Die WHO Empfehlung ist im Sinne einer prätherapeutischen Resistenztestung oder einer Überprüfung des Therapieerfolges mittels Bestimmung der Viruslast je nach Verfügbarkeit vor Ort. Für Länder deren Stichproben eine PDR des HIV gegen NNRTIs (NVP, EFV) ergeben haben, soll laut WHO ein anderes Therapieregime ausgesucht werden (WHO 2021).

Innerhalb der Europäischen Union wird ebenfalls von einer grenzwertig-hohen Prävalenz der HIVDR gegen NNRTIs von ca. 9% in therapienaiven Patienten berichtet (van de Laar et al. 2019).

Diese überzeugenden Daten führten dazu, dass die Therapieempfehlungen zur Behandlung der HIV-Infektion von der WHO im Jahr 2018 überarbeitet wurden. Dolutegravir (DTG), ein Integraseinhibitor (INI), wurde zu den first-line Regimes hinzugefügt. Die Kombination aus DTG mit zwei NRTIs senkt die Viruslast effektiver (WHO 2019). Laut Berichterstattungen ist DTG nicht nur besser verträglich, sondern ist weniger anfällig für Mutationen und Therapieversagen (Anstett et al. 2017). Es erscheint als Hoffnungsschimmer in der HIV-Therapie, dass die Lage bzgl. der Resistenzen deutlich entspannen soll. Seit 2019 wurde DTG laut WHO in den meisten erst- und Zweitlinien Therapieregimes weltweit aufgenommen.

Bis 2019 sind auch in Malawi 8 Medikamente sowie weitere first-line Medikamentenregimes zugelassen worden. Eine überarbeitete Version der „*Malawi Guidelines for Clinical Management of HIV in adults and children*“ trat 2018 in Kraft und fügte Dolutegravir ebenfalls zu der first-line Therapie hinzu. Das neue Regime aus Dolutegravir/Lamivudin/Tenofovir DTG/3TC/TDF soll, außer bei Frauen im gebärfähigen Alter, bevorzugt werden und ersetze TDF/3TC/EFV (Ministry

of Health and Population MoHP 2018). Das TLE-Regime gehört aber weiterhin noch zu den first-line Regimes.

Die weltweiten Bemühungen HIV einzudämmen sind deutlich sichtbar und dennoch ist alles kritisch zu betrachten. Auch DTG kann, selbst wenn seltener, von Medikamentenresistenzen betroffen sein (Anstett et al. 2017), hierzu bedarf es weiterer Beobachtungsstudien und Untersuchungen über die Jahre. Auffällig ist, dass in den malawische Guidelines 17 Therapieregimes aufgezeichnet sind und 8 davon zu den Erstlinientherapie gehören. Zudem sind die Medikamente, auch wenn in den Guidelines aufgenommen und empfohlen, nicht flächendeckend erhältlich, sodass nicht selten mit dem verfügbaren Medikament behandelt wird (Ministry of Health and Population MoHP 2019). Zu den landeseigenen finanziellen Mitteln, Geografie und medizinischer Infrastruktur sind auch patientenbezogene Faktoren und auch schicksalhafte Ereignisse zu beachten, die zu einer Verschlechterung der Therapieverfügbarkeit führen können.

Die COVID-19 Pandemie führte in Malawi, aber auch in den meisten afrikanischen Ländern und vielen anderen strukturschwachen Ländern weltweit, zu Lieferengpässen in der Versorgung mit Medikamenten. Im Normalfall können schon von der Bestellung der Medikamente bis zur Lieferung auch mehrere Monate vergehen (Schouten, Jahn, Ben-Smith, et al. 2011). Viele Patienten konnten dadurch keine Therapie starten oder forstsetzen. Viele Veranstaltungen hinsichtlich der Aufklärung und Testung der Bevölkerung sind zudem ausgefallen. Die AIDS-bezogene Mortalität nahm dadurch leicht zu und kann bei dauerhaften Engpässen zu einer Erhöhung der Mortalität auf das 1,6-fache führen (Jewell et al. 2020).

Die „90-90-90“-Ziele wurden auf Grund der COVID-19 Pandemie weltweit knapp verfehlt (UNAIDS 2020b). Malawi hat es trotz widrigen soziokulturellen und ökonomischen Umständen und der COVID-19 Pandemie es geschafft, unter den Erwachsenen die Ziele im Jahr 2020 zu erreichen. Bei Kindern bis 14 Jahren wurde das Ziel bezogen auf die Diagnose und virale Suppression auch in Malawi nicht erreicht. Wie die langfristige Wirkung der COVID-Pandemie auf die HIV-Lage weltweit sein wird, wie sich durch Therapieunterbrechungen oder Verzögerungen das HIVDR verschärfen wird und ob die von der UNAIDS 2015 überarbeiteten, noch ambitionierteren „95-95-95“-Ziele bis 2030 erreicht werden können, bleibt abzuwarten.

6 Zusammenfassung

Seit der Isolierung von HIV in den 1980er Jahren und die Entdeckung als Verantwortlicher für das AIDS, gab es im zeitlichen Verlauf eine deutlich positive Entwicklung in allen Hinsichten. Bei der HIV-Infektion spricht man nun von einer chronischen Erkrankung, welche unter adäquater Therapie die Führung eines normalen Lebens möglich macht. Dennoch handelt es sich weiterhin um eine unheilbare Infektion. Die deutliche Mehrheit der Infizierten lebt in armen Ländern, wo der Zugang zu einer adäquaten medizinischen Versorgung trotz beachtlicher Erfolge in den letzten Jahren nicht flächendeckend gewährleistet, ist. Die weltweite Herausforderung besteht darin, dies möglich zu machen, indem gültige Therapieregimes etabliert werden und der Zugang zu medizinischen Einrichtungen, Medikamenten und Möglichkeiten zur Nachsorge konstant verfügbar sind.

Diese Aufgaben werden durch die Fähigkeit des Virus, schnelle Mutationen auszubilden und somit Medikamentenresistenzen zu entwickeln, zusätzlich erschwert. Die WHO empfiehlt eine Triple-Therapie, die Kombination von Wirkstoffen verschiedener Substanzklassen, um die virale Replikation möglichst effektiv zu hemmen und eine rasche Reduktion der Viruslast zu bewirken. Diese ART soll jedem HIV-positiv getesteten Patienten, unabhängig von klinischem Stadium und CD4-Zahl, ermöglicht werden. In den wirtschaftlich stark entwickelten Ländern ist eine Resistenztestung vor Therapiebeginn zur Routine geworden. So wird ein gutes Therapieansprechen von Beginn an erwartet und mit der optimalen Therapie begonnen.

In wirtschaftlich unterentwickelten Ländern ist ein solches Vorgehen weiterhin nicht für jeden möglich. Eine prätherapeutische Resistenztestung wird nicht routinemäßig vorgenommen. In diesen Ländern, z.B. auch Malawi, wurde im Jahr 2015 noch mit dem TLE-Regime, bestehend aus TDF/3TC/EFV, behandelt. Das Therapieansprechen wurde anhand der CD4-Zahlen oder wenn nicht verfügbar anhand der klinischen Untersuchung und Symptome des Patienten überprüft. Bis dahin war die Sorge um Medikamentenresistenzen gering. Die Resistenztestungen, die im Rahmen von Studien durchgeführt wurden, gingen von einer Prävalenz $\leq 5\%$ aus. In den Nachbarländern, wie Tansania, wurde diese Sorge bereits 2011 deutlich und von unserer Arbeitsgruppe untersucht. Hier zeigte sich eine 19 % Prävalenz für Medikamentenresistenzen in unbehandelten Patienten, sodass man hier von einer TDR (transmitted drug resistance) ausgegangen ist, bei der die Resistenzen durch den Partner weitergegeben wurden. Dies wirft die Frage nach der Lage der

Medikamentenresistenzen in Malawi. Die Ergebnisse der Prävalenzbestimmung der HIVDR bei therapie-naiven Patienten, welche am Lighthouse Hospital im Jahr 2015 in Malawi behandelt wurden, soll aus dem Blickwinkel der Erstlinien-Therapie im Jahr 2015 kritisch betrachtet werden und in den Kontext des Jahres 2021 gesetzt werden.

Die Untersuchung erfolgte in der vorliegenden analytischen Querschnittsstudie an Proben von malawischen HIV-Patienten. Die vorab zentrifugierten, zufällig ausgewählten Plasmaproben der Patienten wurden eingefroren und an das Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg verschickt. Aus 161 Proben wurde zunächst versucht RNA zu isolieren, mittels RT-PCR in DNA zu transkribieren, um anschließend die gag-pol-Region des viralen Genomes mithilfe der nested-PCR zu amplifizieren. Nach Überprüfung der richtigen Sequenzlänge in der Agarosegelelektrophorese wurde das Produkt aufgereinigt und überlappend sequenziert. Dies ist bei 100 Proben erfolgreich gelungen. In 61 Proben konnte mit der vorliegenden Methode auch nach Wiederholung der Untersuchung keine DNA amplifiziert werden. Die resultierenden DNA-überlappenden Sequenzen wurden anschließend im Computer zusammengesetzt, überprüft und mit online-Datenbanken (HIV-Drug Resistance Database der Stanford University, „REGA Subtyping Tool“ der Katholieke Universiteit Leuven) verglichen, um den HIV-Subtyp sowie Mutationen, welche mit Medikamentenresistenzen assoziiert sind, zu bestimmen.

Es wurde eine Häufigkeit für Medikamentenresistenzen von insgesamt 17% in der Stichprobe festgestellt. Es waren 13 Patienten (13%) von einer Resistenz gegen ein NNRTI betroffen. Bei einem der Patienten lag eine Resistenz gegen ein NRTI (1%) und bei 8 gegen ein PI (8%) vor. In 13% der Proben wurde eine Resistenz gegen einen Bestandteil der first-line Therapieregimes TLE nachgewiesen. 7 der Proben wiesen eine „high-level“ und 5 eine „intermediate-level“ Resistenz auf. Diese bestanden insbesondere gegen EFV und NVP. In unserer Untersuchung zeigt sich somit eine TLE-Resistenz von 12%. Die Zahlen sprechen dafür, dass das im Jahr 2015 am Lighthouse eingesetzte TLE-Regime über eine gute Wirksamkeit verfügte, jedoch besteht aufgrund der Resistenzlage die Erwartung einer eingeschränkten Wirksamkeit der Therapie bei 12 % der Patienten. Für die deutliche Mehrheit der Patienten wäre dennoch die Therapie ausreichend gewesen, ohne zuvor kostspielige Resistenzuntersuchungen durchzuführen. Verglichen mit den vorliegenden Daten zeigen neuere Studien mit größerer Patientenzahl zudem, wie bedeutsam die Bestimmung der PDR ist, wenn eine höhere Resistenzrate v.a. gegen NNRTIs bereits vorliegt und ein solches Therapieregime eingeleitet wird.

Die Zahlen spiegeln sich in der weltweiten Zunahme der Medikamentenresistenzen, insbesondere gegen die Gruppe der NNRTIs, in den Untersuchungen nach 2015 wider. Dies führte zu einer Reaktion seitens der WHO mit der Änderung des first-line Regimes. Seit 2018 soll mit einer Kombinationstherapie aus dem für Resistenzen weniger anfälligen DTG und 2 NRTIs behandelt werden. Diese Empfehlung wurde in den malawischen Leitlinien ebenfalls aufgenommen. Das TLE-Regime bleibt dennoch eine gute Alternative und ist weiterhin als first-line Regime in den Leitlinien aufgeführt. Zudem wird häufig mit den vor Ort verfügbaren Medikamenten behandelt. Inzwischen wird in Malawi zunehmend PCR-Diagnostik eingesetzt, um die Viruslast zu bestimmen. So kann ein Therapieversagen möglicherweise auch unabhängig vom Therapieregime früher erkannt werden.

Ob das neue Therapieregime sich positiv auf den Entwicklungstrend auswirkt und ob der Einsatz flächendeckend möglich ist, werden die nächsten Jahre in hoffentlich neuen Untersuchungen darlegen.

7 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

Anstett, K., B. Brenner, T. Mesplede, and M. A. Wainberg. 2017. 'HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors', *Retrovirology*, 14: 36.

Arrivé, E., M. L. Newell, D. K. Ekouevi, M. L. Chaix, R. Thiebaut, B. Masquelier, V. Leroy, P. V. Perre, C. Rouzioux, and F. Dabis. 2007. 'Prevalence of resistance to nevirapine in mothers and children after single-dose exposure to prevent vertical transmission of HIV-1: a meta-analysis', *Int J Epidemiol*, 36: 1009-21.

Atta, M. G., S. De Seigneux, and G. M. Lucas. 2019. 'Clinical Pharmacology in HIV Therapy', *Clin J Am Soc Nephrol*, 14: 435-44.

Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. 'Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)', *Science*, 220: 868-71.

Bbosa, N., P. Kaleebu, and D. Ssemwanga. 2019. 'HIV subtype diversity worldwide', *Curr Opin HIV AIDS*, 14: 153-60.

Biebricher, C. K., and M. Eigen. 2006. 'What is a quasispecies?', *Curr Top Microbiol Immunol*, 299: 1-31.

Borrow, P., and N. Bhardwaj. 2008. 'Innate immune responses in primary HIV-1 infection', *Curr Opin HIV AIDS*, 3: 36-44.

CDC, U.S. Department Health an Human Sevices. 2021. 'HIV Basics', Accessed 14.05.2021. <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>.

Chen, X. Q., C. Liu, and X. H. Kong. 2011. 'The role of HIV replicative fitness in perinatal transmission of HIV', *Viol Sin*, 26: 147-55.

Clutter, D. S., M. R. Jordan, S. Bertagnolio, and R. W. Shafer. 2016. 'HIV-1 drug resistance and resistance testing', *Infect Genet Evol*, 46: 292-307.

Fanales-Belasio, E., M. Raimondo, B. Suligoj, and S. Buttò. 2010. 'HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview', *Ann Ist Super Sanita*, 46: 5-14.

Follansbee, S. E., D. F. Busch, C. B. Wofsy, D. L. Coleman, J. Gullet, G. P. Aurigemma, T. Ross, W. K. Hadley, and W. L. Drew. 1982. 'An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men', *Ann Intern Med*, 96: 705-13.

Gupta-Wright, A., K. Fielding, J. J. van Oosterhout, M. Alufandika, D. J. Grint, E. Chimbayo, J. Heaney, M. Byott, E. Nastouli, H. C. Mwandumba, E. L. Corbett, and R. K. Gupta. 2020. 'Virological failure, HIV-1 drug resistance, and early mortality in adults admitted to hospital in Malawi: an observational cohort study', *Lancet HIV*, 7: e620-e28.

Hemelaar, J. 2012. 'The origin and diversity of the HIV-1 pandemic', *Trends Mol Med*, 18: 182-92.

Herold, and und Mitarbeiter. 2013. *Innere Medizin - wichtige Infektionskrankheiten* S. 889-898 (Verlag Arzt + Information: Köln).

Hofer, Sigrid. 2009. "Malawi: Oft große Probleme." In. Deutsche Aerztebaltt International.

Hospital, Kamuzu Central. 2022. 'Let's know about Kamuzu Central Hospital', Accessed 28.12.2022. <https://www.kch.gov.mw/index.php/about-us-2>.

Hughes, A., and T. Corrah. 1990. 'Human immunodeficiency virus type 2 (HIV2)', *Blood Rev*, 4: 158-64.

'Human Immunodeficiency Virus (HIV)'. 2016. *Transfus Med Hemother*, 43: 203-22.

Hurt, C. B., J. A. E. Nelson, L. B. Hightow-Weidman, and W. C. Miller. 2017. 'Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers', *Sex Transm Dis*, 44: 739-46.

Jewell, B. L., E. Mudimu, J. Stover, D. Ten Brink, A. N. Phillips, J. A. Smith, R. Martin-Hughes, Y. Teng, R. Glaubius, S. G. Mahiane, L. Bansi-Matharu, I. Taramusi, N. Chagoma, M. Morrison, M. Doherty, K. Marsh, A. Bershteyn, T. B. Hallett, and S. L. Kelly. 2020. 'Potential effects of disruption to HIV programmes in sub-Saharan Africa caused by COVID-19: results from multiple mathematical models', *Lancet HIV*, 7: e629-e40.

Kamoto, K., and J. Aberle-Grasse. 2008. 'Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi', *Antivir Ther*, 13 Suppl 2: 83-7.

Kanopathipillai, R., M. McGuire, R. Mogha, E. Szumilin, A. Heinzelmann, and M. Pujades-Rodríguez. 2011. 'Benefit of viral load testing for confirmation of immunological failure in HIV patients treated in rural Malawi', *Trop Med Int Health*, 16: 1495-500.

Kasang, C., S. Kalluvya, C. Majinge, A. Stich, J. Bodem, G. Kongola, G. B. Jacobs, M. Mlewa, M. Mildner, I. Hensel, A. Horn, W. Preiser, G. van Zyl, H. Klinker, E. Koutsilieri, A. Rethwilm, C. Scheller, and B. Weissbrich. 2011. 'HIV drug resistance (HIVDR) in antiretroviral therapy-naïve patients in Tanzania not eligible for WHO threshold HIVDR survey is dramatically high', *PLoS One*, 6: e23091.

Lehmann, C., J. Malin, I. Suárez, and G. Fätkenheuer. 2019. '[Modern HIV treatment]', *Internist (Berl)*, 60: 411-19.

Liu, Y., L. Jia, B. Su, H. Li, Z. Li, J. Han, Y. Zhang, T. Zhang, T. Li, H. Wu, J. Li, and L. Li. 2020. 'The Genetic Diversity of HIV-1 Quasispecies Within Primary Infected Individuals', *AIDS Res Hum Retroviruses*, 36: 440-49.

Louie, M., and M. Markowitz. 2002. 'Goals and milestones during treatment of HIV-1 infection with antiretroviral therapy: a pathogenesis-based perspective', *Antiviral Res*, 55: 15-25.

Lucas, S., and A. M. Nelson. 2015. 'HIV and the spectrum of human disease', *J Pathol*, 235: 229-41.

Mahon, Caitlin. 2019. 'Routine point-of-care viral load testing a success in Malawi'.

Malawi, Ministry of Health. 2016. 'Health care system', Accessed 28.12.2022. <https://www.health.gov.mw/index.php/2016-01-06-19-58-23/national-aids>.

McMichael, A. J., P. Borrow, G. D. Tomaras, N. Goonetilleke, and B. F. Haynes. 2010. 'The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development', *Nat Rev Immunol*, 10: 11-23.

Ministry of Health and Population MoHP, Department of HIV & AIDS, Malawi. 2014. Accessed 01.06.2021. <https://www.hiv.health.gov.mw/index.php/2014-05-19-12-34-56/art-pmtct/art-pmtct-antiretroviral-therapy-prevention-of-mother-to-child-transmission-of-hiv>.

Ministry of Health and Population MoHP, Department of HIV & AIDS, Malawi. 2019. '2019 Policy Updates Addendum to the 4th Edition of the Malawi Integrated Guidelines and Standard Operating Procedures for Clinical HIV Services', Accessed 15.05.2022. <https://differentiatedservicedelivery.org/Portals/0/adam/Content/x8bFLkQfECqbTEpxM8C9Q/File/Malawi%20Clinical%20HIV%20Guidelines%202019%20Addendumversion%208.1.pdf>.

Ministry of Health and Population MoHP, Malawi. 2018. '4th Edition of the Malawi Guidelines for Clinical Management of HIV in Children and Adults', Accessed 01.06.2021. [https://differentiatedservicedelivery.org/Portals/0/adam/Content/yb4xSSLvE0SW98_z7wTm_w/File/Malawi%20Clinical%20HIV%20Guidelines%202018%20\(1\).pdf](https://differentiatedservicedelivery.org/Portals/0/adam/Content/yb4xSSLvE0SW98_z7wTm_w/File/Malawi%20Clinical%20HIV%20Guidelines%202018%20(1).pdf).

Modrow, Falke Truyen Schätzl. 2010. *Molekulare Virologie - humapathogene Retroviren S. 440-450* (Spektrum Akademischer Verlag).

Moir, S., T. W. Chun, and A. S. Fauci. 2011. 'Pathogenic mechanisms of HIV disease', *Annu Rev Pathol*, 6: 223-48.

Mostashari Rad, T., L. Saghaie, and A. Fassihi. 2018. 'HIV-1 Entry Inhibitors: A Review of Experimental and Computational Studies', *Chem Biodivers*, 15: e1800159.

Muula, A. S. 2019. 'Recent changes in the Malawi Health System: A time for reflection', *Malawi Med J*, 31: 223-24.

Neuhann, F., A. de Forest, E. Heger, A. Nhlema, C. Scheller, R. Kaiser, H. M. Steffen, H. Tweya, G. Fätkenheuer, and S. Phiri. 2020. 'Pretreatment resistance mutations and treatment outcomes in adults living with HIV-1: a cohort study in urban Malawi', *AIDS Res Ther*, 17: 22.

Nyamweya, S., A. Hegedus, A. Jaye, S. Rowland-Jones, K. L. Flanagan, and D. C. Macallan. 2013. 'Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis', *Rev Med Virol*, 23: 221-40.

Paredes, R., P. L. Tzou, G. van Zyl, G. Barrow, R. Camacho, S. Carmona, P. M. Grant, R. K. Gupta, R. L. Hamers, P. R. Harrigan, M. R. Jordan, R. Kantor, D. A. Katzenstein, D. R. Kuritzkes, F. Maldarelli, D. Otelea, C. L. Wallis, J. M. Schapiro, and R. W. Shafer. 2017. 'Collaborative update of a rule-based expert system for HIV-1 genotypic resistance test interpretation', *PLoS One*, 12: e0181357.

Pau, A. K., and J. M. George. 2014. 'Antiretroviral therapy: current drugs', *Infect Dis Clin North Am*, 28: 371-402.

Phiri, S., F. Neuhann, N. Glaser, T. Gass, T. Chaweza, and H. Tweya. 2017. 'The path from a volunteer initiative to an established institution: evaluating 15 years of the development and contribution of the Lighthouse trust to the Malawian HIV response', *BMC Health Serv Res*, 17: 548.

Phiri, Sam. 2015. 'The Lighthouse Tenofovir Cohort Study (LighTen)', Accessed 10.06.2021. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02381275>.

Ramratnam, B., J. E. Mittler, L. Zhang, D. Boden, A. Hurley, F. Fang, C. A. Macken, A. S. Perelson, M. Markowitz, and D. D. Ho. 2000. 'The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy', *Nat Med*, 6: 82-5.

Rhee, S. Y., M. R. Jordan, E. Raizes, A. Chua, N. Parkin, R. Kantor, G. U. Van Zyl, I. Mukui, M. C. Hosseinipour, L. M. Frenkel, N. Ndembu, R. L. Hamers, T. F. Rinke de Wit, C. L. Wallis, R. K. Gupta, J. Fokam, C. Zeh, J. M. Schapiro, S. Carmona, D. Katzenstein, M. Tang, A. F. Aghokeng, T. De Oliveira, A. M. Wensing, J. E. Gallant, M. A. Wainberg, D. D. Richman, J. E. Fitzgibbon, M. Schito, S. Bertagnolio, C. Yang, and R. W. Shafer. 2015. 'HIV-1 Drug Resistance Mutations: Potential Applications for Point-of-Care Genotypic Resistance Testing', *PLoS One*, 10: e0145772.

Rücker, E., J. C. Grivel, J. Münch, F. Kirchhoff, and L. Margolis. 2004. 'Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo', *J Virol*, 78: 12689-93.

Rudovick, L., J. M. Brauner, J. Englert, C. Seemann, K. Plugaru, B. R. Kidenya, S. E. Kalluvya, C. Scheller, and C. Kasang. 2018. 'Prevalence of pretreatment HIV drug resistance in Mwanza, Tanzania', *J Antimicrob Chemother*, 73: 3476-81.

Sam Phiri, Ralf Weigel, Mina Housseinipour, Matt Boxshall, Florian Neuhann. 2004. 'THE LIGHTHOUSEA centre for comprehensive HIV/AIDS treatment and care in Malawi', Accessed 01.06.2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43011>.

Schouten, E. J., A. Jahn, A. Ben-Smith, S. D. Makombe, A. D. Harries, F. Aboagye-Nyame, and F. Chimbandira. 2011. 'Antiretroviral drug supply challenges in the era of scaling up ART in Malawi', *J Int AIDS Soc*, 14 Suppl 1: S4.

Schouten, E. J., A. Jahn, D. Midiani, S. D. Makombe, A. Mnthambala, Z. Chirwa, A. D. Harries, J. J. van Oosterhout, T. Meguid, A. Ben-Smith, R. Zachariah, L. Lynen, M. Zolfo, W. Van Damme, C. F. Gilks, R. Atun, M. Shawa, and F. Chimbandira. 2011. 'Prevention of mother-to-child transmission of HIV and the health-related Millennium Development Goals: time for a public health approach', *Lancet*, 378: 282-4.

Shafer, R. W., and J. M. Schapiro. 2008. 'HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART', *AIDS Rev*, 10: 67-84.

Sosin, D. V., and N. A. Tchurikov. 2017. '[Molecular Mechanisms of HIV-1 Genetic Diversity]', *Mol Biol (Mosk)*, 51: 547-60.

Turner, B. G., and M. F. Summers. 1999. 'Structural biology of HIV', *J Mol Biol*, 285: 1-32.

Tweya, H., D. Gareta, F. Chagwera, A. Ben-Smith, J. Mwenyemasi, F. Chiputula, M. Boxshall, R. Weigel, A. Jahn, M. Hosseinipour, and S. Phiri. 2010. 'Early active follow-up of patients on antiretroviral therapy (ART) who are lost to follow-up: the 'Back-to-Care' project in Lilongwe, Malawi', *Trop Med Int Health*, 15 Suppl 1: 82-9.

UKHD, Heidelberger Institut für Global Health. 2015. 'Baseline Characteristics and outcome of patients initiating Tenofovir-based first line ART at the Lighthouse '. https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/index.php?id=8013&no_cache=1&L=6&type=98.

UNAIDS, www.unaids.org. 2015. 'AIDS by the numbers', Accessed 27.05.2021. https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_en.pdf.

UNAIDS, www.unaids.org. 2016. 'Global AIDS Update 2016', Accessed 27.05.2021. https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf.

UNAIDS, www.unaids.org. 2020a. 'Country factsheets Malawi 2020', Accessed 10.05.2022. <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/malawi>.

UNAIDS, www.unaids.org. 2020b. 'Global AIDS Report 2020', Accessed 27.05.2021. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/global-aids-report>.

UNAIDS, www.unaids.org. 2020c. 'HIV and AIDS Estimates Malawi', Accessed 15.05.2022. <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/malawi>.

UNAIDS, www.unaids.org. 2021a. 'Global AIDS Update 2021', Accessed 10.15.2022. https://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2021/september/20210906_global-roll-out-hiv-treatment

UNAIDS, www.unaids.org. 2021b. 'Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet', Accessed 15.05.2022. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.

van de Laar, M. J., A. Bosman, A. Pharris, E. Andersson, L. Assoumou, E. Ay, N. Bannert, B. Bartmeyer, M. Brady, M. L. Chaix, D. Descamps, K. Dauwe, J. Fonager, A. Hauser, M. Lunar, M. Mezei, M. Neary, M. Poljak, A. van Sighem, C. Verhofstede, A. J. Amato-Gauci, and E. K. Broberg. 2019. 'Piloting a surveillance system for HIV drug resistance in the European Union', *Euro Surveill*, 24.

van Oosterhout, J. J., L. Brown, R. Weigel, J. J. Kumwenda, D. Mzinganjira, N. Saukila, B. Mhango, T. Hartung, S. Phiri, and M. C. Hosseinipour. 2009. 'Diagnosis of antiretroviral therapy failure in Malawi: poor performance of clinical and immunological WHO criteria', *Trop Med Int Health*, 14: 856-61.

Wadonda-Kabondo, N., D. Bennett, J. J. van Oosterhout, K. Moyo, M. Hosseinipour, J. Devos, Z. Zhou, J. Aberle-Grasse, T. R. Warne, C. Mtika, B. Chilima, R. Banda, O. Pasulani, C. Porter, S.

Phiri, A. Jahn, D. Kamwendo, M. R. Jordan, S. Kabuluzi, F. Chimbwandira, M. Kagoli, B. Matatiyo, A. Demby, and C. Yang. 2012. 'Prevalence of HIV drug resistance before and 1 year after treatment initiation in 4 sites in the Malawi antiretroviral treatment program', *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 4: S362-8.

Wandeler, G., L. F. Johnson, and M. Egger. 2016. 'Trends in life expectancy of HIV-positive adults on antiretroviral therapy across the globe: comparisons with general population', *Curr Opin HIV AIDS*, 11: 492-500.

WHO. 2012. 'Use of Antiretroviral Drugs for Treating Pregnant Women and Preventing HIV Infection in Infants', Accessed 05.06.2021. https://www.who.int/hiv/PMTCT_update.pdf.

WHO. 2014. 'Bulletin of World Health Organisation ', Accessed 05.06.2021. <https://www.who.int/bulletin/volumes/92/3/13-122523/en/>.

WHO. 2016a. 'Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach. 2nd edition. Geneva: World Health Organization; 2016. ANNEX 10, WHO clinical staging of HIV disease in adults, adolescents and children. ', Accessed 05.06.2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK374293/>.

WHO. 2016b. 'Malawi country Profile', Accessed 09.06.2021. https://www.who.int/hiv/data/Country_profile_Malawi.pdf.

WHO. 2017. 'HIV Drug Resistance Report', Accessed 06.06.2021. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255896/9789241512831-eng.pdf;jsessionid=020BAD924142BCEDAFF2CC9FDBA3475E?sequence=1>.

WHO. 2019. 'Update of Recommendations on First- and Second-Line Antiretroviral Regimens'.

WHO. 2021. 'HIV Drug Resistance', Accessed 15.05.2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-drug-resistance>.

Yeo, J. Y., G. R. Goh, C. T. Su, and S. K. Gan. 2020. 'The Determination of HIV-1 RT Mutation Rate, Its Possible Allosteric Effects, and Its Implications on Drug Resistance', *Viruses*, 12.

8 Appendix

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
3TC	Lamivudin
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ART	antiretrovirale Therapie
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
DTG	Dolutegravir
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRM	drug resistance mutation
EFV	Efavirenz
env	envelope
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabin
g	Gramm
gag	group specific antigen
GFATM	Globale Fonds zur Bekämpfung von Aids, Tuberkulose und Malaria
gp	Glykoprotein

HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HIVDR	HIV drug resistance
INI	Integrase-Inhibitoren
LTR	long terminal repeats
Min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NNRTI	Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NVP	Nevirapin
PCR	polymerase chain reaction
PDR	prätherapeutische HIVDR
PI	Protease-Inhibitor
PMTCT	Prevention of mother-to-child transmission
PR	Protease
PREPFAR	President's Emergency Plan for AIDS Relief
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
Sek	Sekunde
TDF	Tenofovir
TEE	Tripple-Therapie aus Tenofovir, Emtricitabin und Efavirenz
TLE	Tripple-Therapie aus Tenofovir, Lamivudin und Efavirenz
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

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die Struktur des HI-Virus (eigene Grafik).....	3
Abbildung 2 HIV-1 Genom (eigene Grafik)	4
Abbildung 3 HIV-Replikationszyklus, vereinfachte Darstellung (eigene Grafik)	6
Abbildung 4 Infektionsverlauf und Stadien (eigene Grafik).....	8
Abbildung 5: globale Entwicklung der AIDS bedingten Mortalität und Verfügbarkeit von Medikamenten über die Jahre, Graphik entnommen aus „Global Aids Update“ (UNAIDS 2021a).....	13
Abbildung 6: Entwicklung der HIV Neuinfektionen und Mortalität in Malawi, Grafik entnommen aus WHO/Malawi -HIV Country Profile (WHO 2016b).....	15
Abbildung 7: Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Nukleinsäuren- Längenstandard, verwendet für die Gelelektrophorese.	24
Abbildung 8: Beispiel eines DNA-Agarosegels aus dieser Arbeit.	31
Abbildung 9: Prävalenz der HIVDR bei den Patienten in der untersuchten Gruppe.....	38
Abbildung 10: Anteil von HIVDR betroffenen Medikamentenklassen in den untersuchten Proben.	38
Abbildung 11: Anteil der Schweregrade der detektierten Resistenzen gegen die 3 Medikamentenklassen bezogen auf die gesamt detektierte HIVDR in der Gruppe.	40
Abbildung 12: Übersicht über die Resistenzlage gegen einzelne Medikamente aus den verschiedenen Wirkstoffklassen.....	41
Abbildung 13: Schweregrade der Resistenzen gegen die Triple-Therapie (TLE) in der untersuchten Gruppe (n=100).....	43
Abbildung 14: Wahrscheinlichkeit einer HIVDR für die Medikamente der first-line- und second-line-Triple-Therapie in Malawi (n=100).....	45
Abbildung 15: Verteilung der schwereren Resistenzen gegen Efavirenz (EFV) in der untersuchten Gruppe (n=100).....	46
Abbildung 16: Verteilung der mit HIVDR-assozierten Mutationen in den Medikamentenklassen.	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CDC-Klassifikation der HIV-Infektion	9
Tabelle 2 verwendete Chemikalien	20
Tabelle 3: verwendete Enzyme	20
Tabelle: 4 verwendete Geräte	20
Tabelle 5: für Agarosegelelektrophorese verwendete Puffer und Lösungen	21
Tabelle 6: Primer, welche für die rt-PCR verwendet wurden	22
Tabelle 7: Primer, welche für die nested PCR verwendet wurden	22
Tabelle 8: Primer, welche für die Sequenzierung verwendet wurden	22
Tabelle 9: Verwendete Kits	23
Tabelle 10: Verbrauchsmaterial	23
Tabelle 11: PCR-Programm für RT-PCR	27
Tabelle 12: Programme für die nested-PCR	30
Tabelle 13: Konfidenzintervalle	39
Tabelle 14: Anteil an Resistenzen gegen die verschiedenen Wirkstoffe der einzelnen Medikamentenklassen	42
Tabelle 15: Konfidenzintervalle der Resistenzen gegenüber der Tripple-Therapie (TLE) ..	44
Tabelle 16: Liste der Patienten, welche von einer Resistenz gegenüber einer Tripple-Therapie aus TLE betroffen waren	47
Tabelle 17: Charakterisierung des Auftretens der Mutationen in der Substanzklasse der NNRTIs	50

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Carsten Scheller für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sowie für die selbstverständliche, stetige und konstruktive Unterstützung von Beginn bis zum heutigen Tag herzlich bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei meiner Kollegin Dr. Johanna Englert für die gute Einführung in die Laborarbeit sowie Unterstützung in der Umsetzung der Methoden.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kindern, welche mich immer vorantreiben, mich zu entwickeln und über meine Grenzen hinauszuwachsen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Vielen Dank an meine Mutter, die mir von Anfang an die richtigen Werte für meine berufliche Zukunft mitgegeben hat. Vielen Dank an Heike für die bedingungslose Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Partnerin Maria bedanken, die mir neben dem stressigen Berufsalltag immer den Rücken freigehalten hat, unsere Kinder umsorgt und mich stets ermutigt hat, diese Arbeit fertigzustellen.

Eigene Publikationen und Kongresse:

Rudovick, L., J. M. Brauner, J. Englert, C. Seemann, **K. Plugaru**, B. R. Kidenya, S. E. Kalluvya, C. Scheller, and C. Kasang. 2018. 'Prevalence of pretreatment HIV drug resistance in Mwanza, Tanzania', *J Antimicrob Chemother*, 73: 3476-81.

Florian Neuhann, **Karina Plugaru**, Sam Phiri, Thom Chaweza, Angellina Chinsinga, Jane Chiwoko, Carsten Scheller, 2018, 13. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin „Prävalenz medikamentenresistenter HIV-Infektionen in therapienaiven HIV-Patienten am Lighthouse Hospital, Lilongwe, Malawi“ Poster-Präsentation

